

TGF- β 1 基因转染对人晶状体上皮细胞周期调控的影响

韩梅¹, 张劲松², 张瑞君³

作者单位:¹(154002)中国黑龙江省佳木斯市,佳木斯中心医院眼科;²(110005)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学附属第四医院眼科;³(110016)中国辽宁省沈阳市,辽宁省人民医院眼科
作者简介:韩梅,女,毕业于中国医科大学,副主任医师,眼科学博士,研究方向:白内障。
通讯作者:韩梅.han99171@126.com
收稿日期:2009-12-09 修回日期:2010-03-08

Effect of TGF- β 1 gene transfection on the cell cycle control of human lens epithelial cell

Mei Han¹, Jin-Song Zhang², Rui-Jun Zhang³

¹Department of Ophthalmology, Jiamusi Central Hospital, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China; ²Department of Ophthalmology, the 4th Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110005, Liaoning Province, China; ³Department of Ophthalmology, Liaoning Province People's Hospital, Shenyang 110016, Liaoning province, China

Correspondence to: Mei Han. Department of Ophthalmology, Jiamusi Central Hospital, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China. han99171@126.com

Received:2009-12-09 Accepted:2010-03-08

Abstract

• **AIM:** To investigate the change of p21, CDK2 and Smad4 on the HLEC transfected with pEGFP-TGF- β 1 plasmid and the effect of TGF- β 1 gene transfection on the cell cycle control of human lens epithelial cell.

• **METHODS:** Immortalized human lens epithelial cellline (HLEC-B3) was transfected by pEGFP-TGF- β 1 gene. The expression of TGF- β 1 mRNA, p21 mRNA, CDK2 mRNA and Smad4 mRNA and protein induced by transferred by TGF- β 1 gene were measured by RT-PCR and Western-blot at different time periods.

• **RESULTS:** RT-PCR detected that TGF- β 1 mRNA began to raise after 24h, culminated after 48h, decreased after 72h, decreased much after 96h, but still more than the normal. p21 mRNA accompanied with it. but CDK2 decreased with it. Western-blot detected that the consequence consisted with RT-PCR. The effect of TGF- β 1 gene was demonstrated from the lever of transcription and translation. Smad4 protein raised with the lever of TGF- β 1 gene at various time point, but disappeared very quickly.

• **CONCLUSION:** TGF- β 1 can increase p21, but decrease CDK2, to impact the cell cycle of HLEC. TGF- β /Smad4 pathway take part in the course.

• **KEYWORDS:** lens epithelial cells; TGF- β 1; genes transfer; p21; CDK2; Smad4

Han M, Zhang JS, Zhang RJ. Effect of TGF- β 1 gene transfection on the cell cycle control of human lens epithelial cell. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(3):440-442

摘要

目的:探讨脂质体介导的 TGF- β 1 基因(pEGFP-TGF- β 1)转染诱导人晶状体上皮细胞系-B3(HLEC-B3)细胞周期蛋白激酶抑制因子 p21 及细胞周期蛋白激酶 CDK2 的表达及其对细胞周期调控的影响。

方法:将 pEGFP-TGF- β 1 转染人晶状体上皮细胞系-B3(HLEC-B3),采用 RT-PCR 和 Western-blot 方法检测 pEGFP-TGF- β 1 转染后 24,48,72,96h p21,CDK2 和 Smad4 mRNA 和蛋白的表达,设立正常细胞组及 pEGFP-C2 转染组为对照组。
结果:pEGFP-TGF- β 1 转染组 TGF- β 1 24h 开始升高,48h 达到最高,72h 略有减少,96h 明显减少,但仍高于正常组,而空载体组与正常细胞组则无明显变化。p21 变化趋势和 TGF- β 1 相符,CDK2 组变化趋势则正好相反,Smad4 组 48h 明显升高,72h 下降明显,96h 基本恢复正常。

结论:TGF- β 1 通过活化凋亡基因 p21,降低细胞周期蛋白激酶 CDK2。

关键词:晶状体上皮细胞;TGF- β 1 基因;转染;p21;CDK2;Smad4

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.03.012

韩梅,张劲松,张瑞君. TGF- β 1 基因转染对人晶状体上皮细胞周期调控的影响. 国际眼科杂志 2010;10(3):440-442

0 引言

转化生长因子- β (TGF- β)可抑制上皮细胞、内皮细胞、免疫细胞,以及某些肿瘤细胞的生长,并使这些细胞停滞在细胞周期的第一个间隔区:G1 期,从而阻止细胞进入 S 期^[1]。许多研究表明,高表达活性 TGF- β 1 的转基因鼠和其体外培养鼠晶状体均出现晶状体混浊的症状^[2,3],我们的前期实验证明 TGF- β 1 可抑制晶状体上皮细胞增殖,改变细胞周期,诱导其发生凋亡。目前已经发现 TGF- β 信号传导经典途径为:TGF- β 配体与细胞膜受体结合,激活细胞内 Smads 蛋白,协同多种转录因子,最终导致目的基因表达。Smads 类蛋白是 TGF- β 信号转导通路中必不可少的中介蛋白,存在于胞质中^[4]。Smad4 是通用枢纽分子,与上游分子形成核转运复合物后,将信号由胞质传入核内,协同转录因子上调或下调靶基因的表达。Smad4 由于其中枢作用而被认为是调控 TGF- β 信号通路的关键分子。我们通过基因转染技术对 TGF- β 1 抑制人晶状体上皮细胞,导致白内障发生的具体作用机制进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 永生化细胞系 HLEC-B3(中国医科大学眼科),HG-DMEM 培养液(美国 Highclone 公司),胎牛血清(杭州四季青生物公司),pSNAV-TGF- β 1,pEGFP-C2 质粒(北京本元正阳基因技术有限公司),Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司),Trizol 试剂盒(GIBCO/BRL 公司);RNA PCR Kit(AMV)Ver 3.0(大连宝生物工程公司);蛋白质免疫印迹化学发光试剂盒(德国 Borhringer Mannheim 公司);鼠抗人 CDK2 及 p21(NEB 公司);生物素标记的蛋白质标准样品,抗生物素标记的蛋白质标准二抗(美国 NEB 公司)。

复苏时将冻存细胞系 HLEC - B3 从液氮罐中取出,快速放入 37℃ 温水中溶解,溶化后以 1200r/min 离心约 3 ~ 5min,离心半径为 15cm。弃培养液后,放入含 150mL/L 胎牛血清、100mg/L 青霉素及 125mg/L 链霉素的 HG-DMEM 培养基中,置于 50mL/L CO₂, 37℃ 的细胞培养箱内培养。EcoR I 和 Sal I 双酶切 pSNAV-TGF-β1,回收插入片段(1.8kb),EcoR I 和 Sal I 双酶切 pEGFP-C2,回收线性载体(4.7kb),连接上述二种回收的 DNA,转化,筛选克隆,构建后的质粒命名为 pEGFP- TGF-β1。

1.2 方法 转染前 1d 将细胞接种至 6 孔板,细胞度为 1 × 10⁸ 个/L,在 50mL/L CO₂, 37℃ 饱和湿度下培养 24h,90% 细胞达到融合;转染前使用 PBS 缓冲液冲洗细胞 1 次,更换不含抗生素的培养液。无血清 HG-DMEM250μL 稀释 pEGFP- TGF-β14μg,温和摇匀。使用前轻轻混匀 Lipofectamine2000,然后将 Lipofectamine 2000 10μL 加入无血清的 HG-DMEM 250μL,混匀并于室温温育 5min。混合稀释的质粒和 Lipofectamine 2000 混匀,室温下放置 20min。将质粒/Lipofectamine 2000 复合物加入到 6 孔板的孔中,摇动培养板,轻轻混匀,在 50mL/L CO₂, 37℃ 饱和湿度下培养,6h 后更换含 150mL/L 胎牛血清的 HG-DMEM 培养基。将转染细胞,每日在倒置显微镜下观察并记录细胞的形态变化。实验分为 pEGFP-TGF-β1 转染 24, 48, 72, 96h 组;pEGFP-C2 转染 24, 48, 72, 96h 组;正常细胞对照组。提取总 RNA,按照 Trizol 试剂盒说明书进行,参照 Genebank 的 cDNA 序列,用 Primer Premier 5 软件设计引物:TGF-β1:5' CTGTGGCTACTGGTGCTGAC 3';5'CATAG ATTTCTGTGTGGTTTC 3'; p21: 5'CCCGTGAGCGATGGAA CT3'; 5'CGAGGCACAAGGTACAAGA3'; CDK2: 5'CCGCCT GGACACTGAGACT3'; 5'GAGGAGACCCGATGAGA3'; Smad 4: 5'CTGCCAACTTTCCCAACAT 3'; 5'AGAAGGGTCCACGT ATCCA 3';PCR 反应按下列组成配制 PCR 反应液:5 × Per buffer10μL、灭菌蒸馏水 28.75μL, TaKaRa Ex Taq® HS 0.25μL、上游引物 0.5μL、下游引物 0.5μL,将 PCR 反应液加入到反转录反应结束后的 PCR 反应管中按下列条件进行 PCR 反应:94℃ 预变性 2min, 94℃ 变性 30s, 50℃ ~ 65℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 0.5 ~ 4min, 变性至延伸进行 30 个循环,反应结束后,取 PCR 反应液进行琼脂糖凝胶电泳。实验重复 3 离心次。另实验分组同 RT-PCR,终止培养后,用冰冷的 0.02mol/L PBS 冲洗细胞 3 次,置于冰盒上,用细胞刮取器刮下细胞,置于 Eppendorf 管内,加入裂解液(2mmol/L/EDTA, 10mmol/L/EGTA, 20mmol/L/Tris-HCL, pH7.5, 2mmol/L MmPMSF, 0.25mol/L 蔗糖) 300μL 超声粉碎,4℃ 离心,17500r/min 离心 2h,将其标准化,将蛋白液样品用 120g/LSDS-PAGE 分离而后电转移至硝酸纤维膜上,含 50g/L 牛血清白蛋白的 TTBS 封闭 1h,加上特异性一抗(1:400)4℃ 过夜,TBS 洗 4 次,10min/次,加入碱性磷酸酶(1B2000),室温孵育 2h,加入 B-Naphthylacidphosphate 和 o-dignisidinetetrazotized 显色,膜经 Kodak1D 型凝胶自动成像扫描分析,记录吸光度,实验重复 3 次。

2 结果

2.1 TGF-β1, p21, CDK2, Smad4 mRNA 表达 TGF-β1 目的片段 319bp, p21 目的片段 351bp, CDK2 目的片段 271bp, Smad4 目的片段 440bp。pEGFP-TGF-β1 转染组 TGF-β1 24h 开始升高,48h 达到最高,72h 略有减少,96h 明显减少,但仍高于正常组,而空载体组与正常细胞组则无明显变化。p21 变化趋势和 TGF-β1 相符,CDK2 组变化趋势则正好相反,Smad4 组 48h 明显升高,72h 下降明显,96h 基本恢复正常(图 1A-D)。

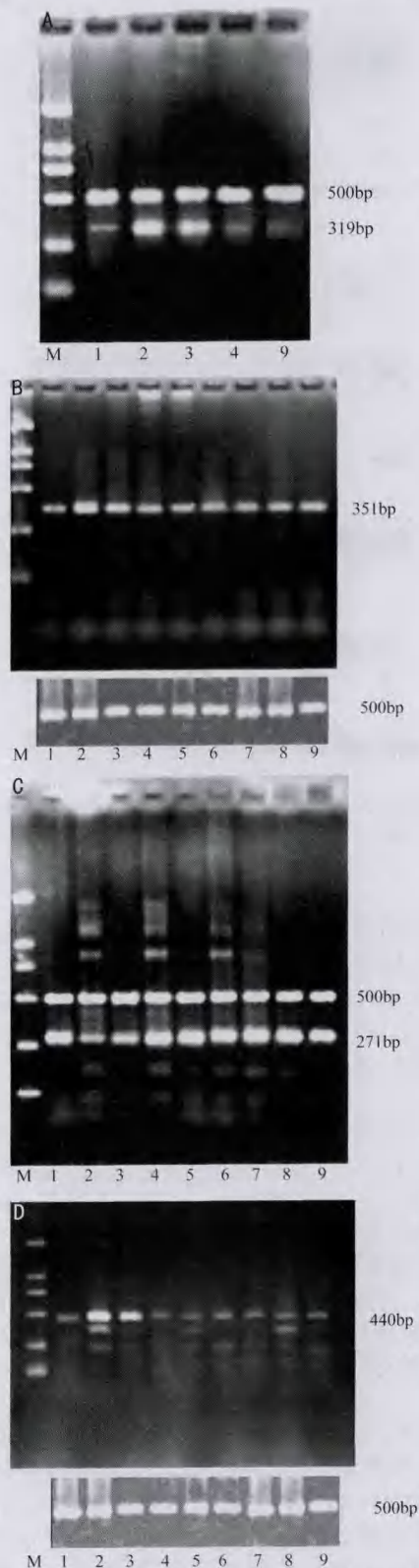


图 1 HLEC-B3 转染后电泳图 A: 1: 转染 pEGFP-TGF-β1 24h 组 2: 48h 组 3: 72h 组 4: 96h 组 9: 正常细胞组; B: 1: 转染 pEGFP-TGF-β1 24h 组 2: 48h 组 3: 72h 组 4: 96h 组 5: 转染 pEGFP-C2 24h 组 6: 48h 组 7: 72h 组 8: 96h 组 9: 正常细胞组; C: 1: 转染 pEGFP-TGF-β1 24h 组 2: 48h 组 3: 72h 组 4: 96h 组 5: 转染 pEGFP-C2 24h 组 6: 48h 组 7: 72h 组 8: 96h 组 9: 正常细胞对照组; D: 1: 转染 pEGFP-TGF-β1 24h 组 2: 48h 组 3: 72h 组 4: 96h 组 5: 转染 pEGFP-C2 24h 组 6: 48h 组 7: 72h 组 8: 96h 组 9: 正常细胞组。

2.2 Western-blot 检测 TGF-β1, p21, CDK2, Smad4 蛋白的表达 Western-blot 检测结果和 RT-PCR 基本相符(图 2A-D)。

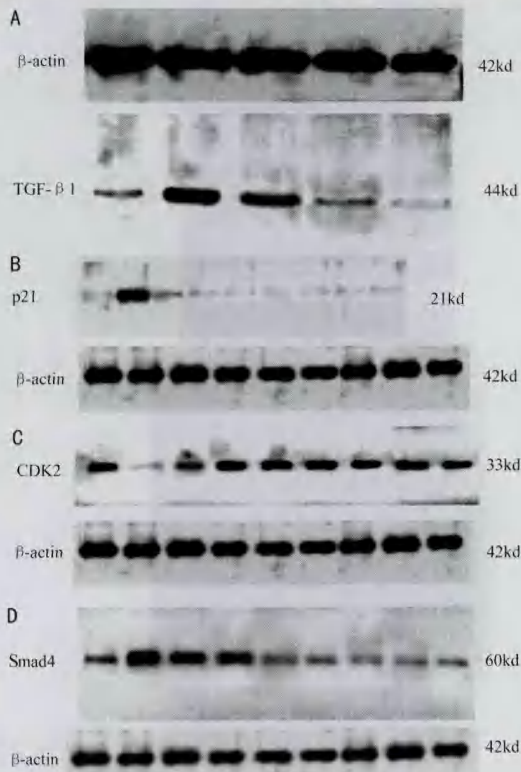


图2 HLEC-B3 转染后各蛋白表达 A: TGF-β1; B: p21; C: CDK2; D: Smad4。

3 讨论

细胞周期调控的研究是近年来细胞生物学研究的热点之一,其核心机制为细胞周期蛋白激酶(cyclin dependent kinase, CDK)的活性表达与调控。CDK的激活是依赖于其调节亚基与胞周期蛋白(cyclin)结合形成复合物而发生作用的。而细胞周期蛋白激酶抑制因子(cyclin dependent kinase, CKI)是一组抑制CDK活性的活性因子,这也是CDK活性调节的另一方式^[3,4]。在细胞周期调控的过程中,cyclin与CDK结合形成复合物,推动细胞周期的进程,即形成细胞周期的动力系统。不同类型的cyclin/CDK复合物分别调控细胞周期中细胞生长、DNA复制及细胞分裂等重要过程。CKI通过与cyclin/CDK复合物黏附使其失活,导致细胞周期停止,从而阻断细胞的增殖过程,即为细胞周期的制动系统。CKI主要分为两类:(1) Cip和Kip类:包括p21^{Cip1}, p27^{Kip1}及p57^{Kip2}。(2) INK类:包括p16^{INK4}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}及p19^{INK4D}。这些类型的CKI主要抑制其相应激酶的活性;CKI过量表达可引起细胞周期的阻断。本实验中TGF-β1的真核表达载体转染晶状体上皮细胞株HLEC后,出现了细胞的生长抑制现象,同时还发现以往被认为是Smad4的下游靶基因的p21在TGF-β1作用后出现了明显增高表达,提示p21参与了该生长抑制过程,可能是通过增高p21的表达来抑制cyclin的作用,令细胞周期停止于G1/S期,同时CDK2的表达亦随时间明显降低。目前已知的TGF-β1的作用机制:上升的TGF-β1能够抑制正常细胞和早期肿瘤细胞增殖,促进细胞凋亡发生。其抑制作用是通过细胞膜上的TGF-βRI和TGF-βRII将信号传导至细胞质,在受体下游信号分子Smad家族等的参与下,最终抑制细胞生长周期G1/S期过渡实现的。在G1早期,TGF-β1诱导的抑制信号直接作用于原癌基因*c-myc*;而在G1晚期,TGF-β1可通过抑制CDKs的活性及这些酶的活性周期蛋白,包括cyclinA, cyclinE,

cyclinD等,从而抑制S期的开始。TGF-β信号传导基本过程为:TGF-β配体与细胞膜受体结合,激活细胞内Smads蛋白,协同多种转录因子,最终导致目的基因表达。Smads类蛋白是TGF-β信号转导通路中必不可少的中介蛋白,存在于胞质中,Smad4是通用枢纽分子,与上游分子形成核转运复合物后,将信号由胞质传入核内,协同转录因子上调或下调靶基因的表达,因而部分肿瘤由于该通路的缺陷而使肿瘤细胞逃逸了TGF-β的生长抑制作用。Smad4由于其中枢作用而被认为是调控TGF-β信号通路的关键分子,它是TGF-β族各类信号转导过程中共同需要的介质,因此Smad蛋白家族作为TGF-β受体信号传递的关键效应分子,在胞膜信号与基因转录间开通了一条最为简捷的路径。本研究的结果显示随着TGF-β1表达的增加,Smad4在转录和翻译水平均有升高,其高表达具有一定的时间消减性。从而说明TGF-β1的Smad4依赖途径参与LEC的增殖抑制过程^[5]。目前的研究已经证明,TGF-β引起的晶状体上皮细胞外基质沉积是通过激活Smad信号通路发生的,Saika等通过免疫组化研究证明在损伤引起的晶状体混浊, MET沉积和PCO中,TGF-β受体激活Smad蛋白,Smad3, Smad3/Smad4结合物出现在细胞核,表明Smad/TGF-β信号途径的激活,同时TGF-β抗体可以阻断Smad3/Smad4的核转位。在Smad3基因敲除鼠和Smad7抑制子转染的人晶状体细胞中,随着Smad信号途径的抑制,损伤引起的细胞外基质沉积也被抑制。由此证明了Smad途径在TGF-β引起的晶状体混浊中起到重要作用^[6,9]。

综上所述,TGF-β1在白内障的发生发展过程中的作用是十分复杂的,通过启动凋亡基因p21,改变细胞周期蛋白CDK2,在分子水平抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,阻滞细胞周期于G1/S期。同时TGF-β/Smad经典信号传导途径中最重要的Smad4明显升高,证明TGF-β/Smad途径参与了该生长抑制过程,但其具体机制尚需进一步研究。

参考文献

- Kubo E, Miyazawa T. Development-and age-associated expression pattern of peroxire-doxin6 and its regulation in murine ocular lens. *Mech Ageing Dev* 2006;127(3):249-256
- Lovicu FJ, Schulz MW, Hales AM, et al. TGF induces morphologica land molecular changes typical of anterior subcapsular cataract. *Br J Ophthalmol* 2002; 86(12): 220-226
- Xiao Y, Zhao B, Gao Z, et al. Overaccumulation of transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor in lens epithelial cells of congenital cataract. *Can J Ophthalmol* 2009;44(2):189-192
- Verrecchia F, Tacheau C, Wagner EF, et al. A central role for the Jun-N-terminal kinase pathway in mediating the antagonistic activity of pro-inflammatory cytokines against transforming growth factor-beta-driven Smad3/4-specific gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278(3):1585-1593
- Weiss C, Schneider S, Wagner EF, et al. JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the activity of c-Jun. *EMBO J* 2003;22(14): 3686-3695
- Saika S, Kawashima Y, Miyamoto Y, et al. Immunolocalization of prolyl 4-hydroxylase subunit, alpha-smooth muscleactin, and extracellular matrix components in human lens capsules with lens implants. *Exp Eye Res* 1998; 66: 283-294
- Saika S, Ohnishi Y, Sato M, et al. Smad 3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury. *Am J Pathol* 2004;84(10):1245-1258
- Saika S, Miyamoto T, Ishida I, et al. TGFbeta-Smad signaling in postoperative human lens epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 2002;86(12): 1428-1433
- Saika S, Miyamoto T, Tanaka S, et al. Response of lens epithelial cells to injury: Role of lumican in epithelial-mesenchymal transition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(5):2094-2102