

· 实验研究 ·

维拉帕米对人晶状体上皮细胞整合素表达的抑制作用

姚 刚 谭少健

Inhibition of expression of integrins in cultured human lens epithelial cells by verapamil

Yao Gang, Tan Shaojian. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract Objective To prevent the formation of after cataract is very important for the improvement of visual function after cataract surgery. Research showed that calcium channel blocker can inhibit the proliferation of lens epithelial cells by destroying the integrin. Present study was to explore the influence of verapamil, a calcium channel blocker, on integrins expression in cultured human lens epithelial cells (HLECs). **Methods** The human lens epithelial cells line, SRA01/04, was cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and maintained at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. Following trypsinisation, cells were incubated with 0.02, 0.04, 0.08 mmol/L verapamil for 24 hours, respectively. The cultured cells without verapamil were as control. The positive percentages of different integrin subunits in this HLECs line were detected by flow cytometry. **Results** The expression rate of integrin subunits α_2 , α_3 , α_5 , β_1 , β_2 in cultured SRA01/04 line was significantly different among control groups and 0.02, 0.04, 0.08 mmol/L verapamil groups ($\chi^2_{\alpha_2} = 4\,034.9$, $\chi^2_{\alpha_3} = 3\,009.1$, $\chi^2_{\alpha_5} = 6\,558.3$, $\chi^2_{\beta_1} = 1\,849.8$, $\chi^2_{\beta_2} = 100.2$, $P < 0.01$). The expression of α_2 , α_3 , α_5 , β_1 , β_2 in cultured SRA01/04 line was gradually declined with the decrease of verapamil concentration and showing considerable differences in comparison with control group ($P < 0.01$), indicating a strong inhibition for the proliferation of HLECs in vitro in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). **Conclusion** Verapamil inhibits integrin subunits expression in SRA01/04 and therefore arrest the proliferation, differentiation, and migration of residual LECs after cataract surgery. Verapamil may be a suitable drug of preventing and treating posterior capsule opacification (PCO).

Key words integrin; lens epithelial cell; verapamil; after cataract

摘要 目的 研究钙通道阻滞剂维拉帕米对人晶状体上皮细胞 (LECs) 株 SRA01/04 整合素表达的影响。 **方法** 对人 LECs 株 SRA01/04 进行培养并传代, 分别以 0.02、0.04、0.08 mmol/L 的维拉帕米作用于 SRA01/04 24 h, 经流式细胞仪检测 SRA01/04 各整合素的阳性表达率。 **结果** 整合素 α_2 、 α_3 、 α_5 、 β_1 、 β_2 在人 LECs 株 SRA01/04 中呈阳性表达, 维拉帕米对其表达具有抑制作用, 并随药物浓度的增加而逐渐增强 ($P < 0.05$)。 **结论** 钙通道阻滞剂维拉帕米对 LECs 整合素的表达具有抑制作用, 可能阻碍整合素介导的 LECs 黏附、移行和增生, 有望成为防治后发性白内障的有效药物。

关键词 整合素; 晶状体上皮细胞; 维拉帕米; 后发性白内障

分类号 R 776 R 988.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)06-0499-03

后发性白内障, 又称后囊膜混浊 (posterior capsule opacification, PCO), 是白内障囊外摘出术后的一种常见并发症。其发生的主要机制为残留的晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 增生、迁移、分化以及胶原和基底膜样物质形成^[1-2]。整合素是细胞表面的一

种跨膜蛋白, 通过 α 亚单位和 β 亚单位识别细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 中的精-甘-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp, RGD) 序列, 介导 LECs 黏附并影响其增生和分化^[3-4]。研究表明, 钙通道阻滞剂可通过抑制细胞内 Ca^{2+} 内流而使整合素蛋白结构改变, 影响整合素介导的信号转导, 提示钙通道阻滞剂可能通过损害整合素的机制来抑制 LECs 黏附、增生、迁移、分化, 从而抑制 PCO^[5-6]。本实验研究钙通道阻滞剂维拉帕米对人 LECs 株 SRA01/04 整合素表达的影响, 为药物防

本课题为国家自然科学基金资助 (30760268)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院眼科 (姚刚, 研究生, 现在广西壮族自治区人民医院眼科中心, 530021 南宁)

通讯作者: 谭少健 (Email: shaojiantan@yahoo.com.cn)

治 PCO 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人 LECs 细胞株 SRA01/04 由中国医学科学院基础医学研究所细胞中心提供。

1.1.2 主要试剂及仪器 盐酸维拉帕米注射液(5 mg: 2 mL/支,上海禾丰制药有限公司);DMEM/F-12 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS,天津灏洋 TBD 公司);小鼠抗人整合素 α_2 、 α_3 、 α_5 、 β_1 、 β_2 一抗(美国 Serotec 公司);FITC 标记的小鼠 IgG₁ 同型抗体(美国 Bio Legend 公司);FITC 标记的山羊抗小鼠二抗(美国 KPL 公司);CO₂ 培养箱(美国 Thermo Forma 公司);倒置相差荧光显微镜(德国 Zeiss 公司);流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人 LECs 细胞株 SRA01/04 移入 25 cm² 培养瓶中,加入含 10% FBS 的 DMEM/F-12 培养基 5 mL,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每 2~3 d 换液 1 次,至细胞相互融合、长满瓶底时 1:3 进行消化传代。

1.2.2 流式细胞仪检测维拉帕米对 LECs 整合素表达的影响 将细胞消化离心后制成细胞悬液,均匀接种于 6 孔培养板中培养,待细胞处于对数生长期时,取细胞生长状况较为一致的 5 个孔进行分组,每孔为 1 个组。1 号孔为同型对照组(不进行药物干预,实验中加入同型抗体);2~5 号孔为实验组(实验中加入相应的整合素抗体),其中 2 号孔不进行药物干预(实验对照组),3~5 号孔中分别加入不同浓度的维拉帕米,使最终浓度分别为 0.02、0.04、0.08 mmol/L。24 h 后消化制成 5 组细胞悬液(即同型对照组,实验对照组,0.02、0.04、0.08 mmol/L 维拉帕米组),经间接免疫荧光标记法处理后上流式细胞仪检测各组的 LECs 整合素阳性表达率。实验重复 3 次,结果取平均值。同法可检测出经不同浓度维拉帕米处理后整合素 α_2 、 α_3 、 α_5 、 β_1 、 β_2 的阳性表达率。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学分析。不同维拉帕米浓度组及对照组的整合素阳性表达率的总体比较以及组间的两两比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

整合素 α_2 、 α_3 、 α_5 、 β_1 、 β_2 在人 LECs 株 SRA01/04 呈阳性表达,表达率分别为 84.1%、97.1%、71.7%、96.8%、3.3%。各整合素中,各浓度维拉帕米处理组以及实验对照组整合素的阳性表达率的总体比较差异有统计学意义($P < 0.01$),各组间两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),整合素阳性表达率随药物浓度的增加而下降。维拉帕米对人 LECs 株 SRA01/04 整合素的表达具有抑制作用,并随药物浓度的增加而逐渐增强(表 1,图 1)。

表 1 不同浓度维拉帕米处理后各整合素在培养的 SRA01/04 中的表达率

Table 1 The positive expression rate of integrin in cultured SRA01/04 after treatment of verapamil

Integrin	Group	Positive cells	Negative cells	Positive percentage(%)	χ^2	P
α_2	Control	8 409	1 591	84.1	4 034.9	<0.01
	0.02 mmol/L	3 874	5 483	41.4		
	0.04 mmol/L	776	2 347	24.8		
	0.08 mmol/L	910	3 361	21.3		
α_3	Control	9 712	288	97.1	3 009.1	<0.01
	0.02 mmol/L	8 080	1 920	80.8		
	0.04 mmol/L	4 286	1 777	70.7		
	0.08 mmol/L	3 520	2 112	62.5		
α_5	Control	7 167	2 833	71.7	6 558.3	<0.01
	0.02 mmol/L	2 971	7 029	29.7		
	0.04 mmol/L	1 326	5 960	18.2		
	0.08 mmol/L	425	7 617	5.28		
β_1	Control	9 678	322	96.8	1 849.8	<0.01
	0.02 mmol/L	5 360	901	85.6		
	0.04 mmol/L	7 885	2 115	78.9		
	0.08 mmol/L	6 838	3 162	68.4		
β_2	Control	3 31	9 669	3.3	100.2	<0.01
	0.02 mmol/L	186	9 814	1.9		
	0.04 mmol/L	142	9 858	1.4		
	0.08 mmol/L	105	9 895	1.1		

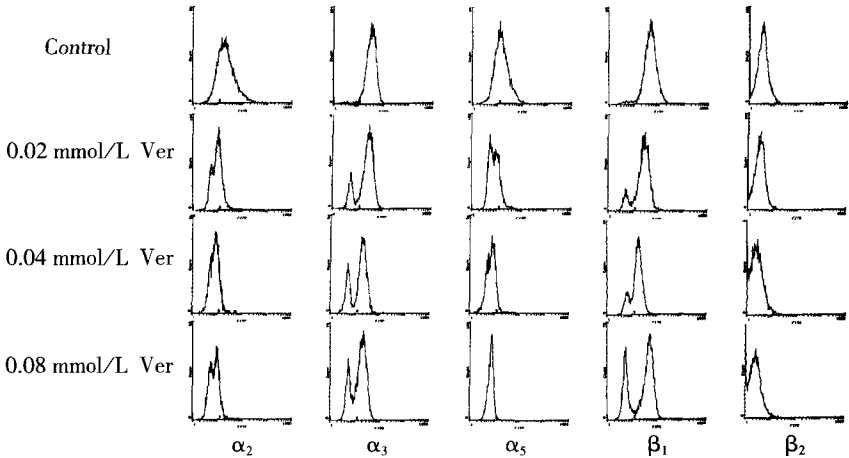


图 1 流式细胞仪检测各实验组整合素的表达

Fig. 1 Flow-cytometric evaluation of the expression of integrin subunits in human lens epithelial cell line SRA01/04

3 讨论

白内障术后 PCO 的发生率较高, Schaumborg 等^[7]报道白内障术后 1、3、5 年 PCO 的发生率分别为 11.8%、20.7%、28.5%。Nd:YAG 激光后囊切开术是目前治疗 PCO 最常用的方法,但激光治疗费用较贵,且有导致人工晶状体损伤、眼压升高、视网膜脱离和黄斑囊样水肿等并发症的危险。近年来,采用单克隆抗体和基因治疗等分子生物学方法能特异性地抑制 LECs,但前者价格昂贵,后者目的基因转染率低^[8],临床上难以推广。药物防治是当前的研究热点,最常用的药物为抗代谢药如 5-氟尿嘧啶、丝裂霉素等^[9-10],但严重的不良反应限制了其临床应用。因此,选择一种安全有效、不良反应小的药物,是 PCO 药物防治的关键问题。

整合素是细胞表面的一种跨膜蛋白,整合素通过 α 、 β 亚单位识别 ECM 中的 RGD 序列,介导细胞黏附、影响细胞分化和增生^[3-4]。近年来一些研究发现,LECs 表面亦表达 α_2 、 α_3 、 α_5 、 β_1 、 β_2 等多种整合素,可能对 LECs 的黏附、移行及增生起促进作用,从而导致 PCO 的发生^[11-14]。但这些研究采用的方法均为免疫组织化学法,而本实验应用流式细胞仪对来自同一群的单个 SRA01/04 细胞逐一检测不同整合素的表达,具有更好的灵敏性、客观性和准确性。

细胞内钙离子在整合素介导的信号转导中起重要作用。钙通道阻滞剂能在通道水平上选择性地阻滞钙离子通过细胞膜上的钙通道进入细胞内,从而减少细胞内 Ca^{2+} 的浓度,使蛋白激酶 C 的活性下降,细胞内一系列的蛋白质磷酸化受到抑制^[15-17]。因此,钙通道阻滞剂有可能通过抑制细胞内 Ca^{2+} 内流而使整合素蛋白结构改变,从而影响整合素介导的信号转导作用。Beck 等^[5]用钙通道阻滞剂 mibefradil 对培养的人 LECs 进行干预,发现其能减少人 LECs 膜表面整合素 β_1 和 α_3 的表达,并破坏了细胞表面整合素的分布。同时还发现细胞骨架成分,肌动蛋白、波形蛋白、角蛋白等的表达减少,提示钙通道阻滞剂可能通过破坏整合素及细胞骨架成分的蛋白结构而削弱了整合素介导的细胞黏附作用。Nebe 等^[6]通过流式细胞仪和共焦显微镜发现,mibefradil 能减少白内障术后原代培养的人 LECs 和人 LECs 株 HLE-B3 的培养细胞表面积,同时抑制了整合素的表达和上皮细胞的增生。维拉帕米是一种经典的电压依赖性钙通道阻滞剂,本实验以不同浓度的维拉帕米对人 LECs 株 SRA01/04 干预 24 h 后, SRA01/04 的 5 种整合素的表达均有不同程度地下调,

下调水平呈浓度依赖关系,即整合素阳性表达率随药物浓度的增加而逐渐下降。证明了钙通道阻滞剂维拉帕米能降低 LECs 上整合素的表达,从而可能抑制整合素介导的细胞黏附、移行及增生。

本研究提示,维拉帕米可能通过抑制整合素表达的机制来抑制 LECs 的增生、黏附、迁移及分化,从而抑制 PCO 的发生,有可能成为防治 PCO 的一条有效途径。但具体的抑制效果和应用前景仍需进一步的研究。

参考文献

- 何守志. 晶状体病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004:31-32
- Awasthi N, Wagner BJ. Suppression of human lens epithelial cell proliferation by proteasome inhibition, a potential defense against posterior capsular opacification[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(10): 4482-4489
- Elner SG, Elner VM. The integrin superfamily and the eye[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37(5): 696-701
- Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken[J]. Science, 1995, 268(5208): 233-239
- Beck R, Nebe B, Guthoff R, et al. Inhibition of lens epithelial cell adhesion by the calcium antagonist mibefradil correlates with impaired integrin distribution and organization of the cytoskeleton[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2001, 239(6): 452-458
- Nebe B, Kunz F, Peters A, et al. Induction of apoptosis by the calcium antagonist mibefradil correlates with depolarization of the membrane potential and decreased integrin expression in human lens epithelial cells[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2004, 242(7): 597-604
- Schaumborg DA, Dana MR, Christen WG, et al. A systematic overview of the incidence of posterior capsule opacification[J]. Ophthalmology, 1998, 105(7): 1213-1221
- Coudere BC, Neuville S, Douin V, et al. Retrovirus-mediated transfer of a suicide gene into lens epithelial cells in vitro and in an experimental model of posterior capsule opacification[J]. Curr Eye Res, 1999, 19(6): 472-482
- Chew J, Werner L, Stevens S, et al. Evaluation of the effects of hydrodissection with antimitotics using a rabbit model of Soemmering's ring formation[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2006, 34(5): 449-456
- Fernandez V, Fragoso MA, Billotte C, et al. Efficacy of various drugs in the prevention of posterior capsule opacification: experimental study of rabbit eyes[J]. J Cataract Refract Surg, 2004, 30(12): 2598-2605
- Zhang XH, Ji J, Zhang H, et al. Detection of integrins in cataract lens epithelial cells[J]. J Cataract Refract Surg, 2000, 26(2): 287-291
- Mathew MR, McLean SM, Murray SB, et al. Expression of CD18, CD49b, CD49c and CD49e on lens anterior capsules in human cataracts[J]. Eye, 2003, 17(4): 473-477
- Oharazawa H, Ibaraki N, Lin LR, et al. The effects of extracellular matrix on cell attachment, proliferation and migration in a human lens epithelial cell line[J]. Exp Eye Res, 1999, 69(6): 603-610
- McLean SM, Mathew MR, Kelly JB, et al. Detection of integrins in human cataract lens epithelial cells and two mammalian lens epithelial cell lines[J]. Br J Ophthalmol, 2005, 89(11): 1506-1509
- 陈修, 陈维洲, 曾贵云. 心血管药理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002: 310-313
- 刘秉文, 陈俊杰. 医学分子生物学[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2000: 190-193
- Nebe B, Holzhausen C, Rychly J, et al. Impaired mechanisms of leukocyte adhesion in vitro by the calcium channel antagonist mibefradil[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2002, 16(3): 183-193

(收稿:2008-09-13 修回:2009-04-06)

(本文编辑:刘 艳)