

CTGF 作用于体外培养牛晶状体上皮细胞的研究

陈博 曹阳 胡义珍

The effects of connective tissue growth factor on bovine lens epithelial cells in vitro

Chen Bo, Cao Yang, Hu Yizhen. Department of Ophthalmology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Technology and Science, Wuhan 430022, China

Abstract Objective This study was to observe the effects of connective tissue growth factor (CTGF) on migration and transdifferentiation of bovine lens epithelial cells (BLECs). **Methods** The culture and identification of BLECs adopted the method of Hu (reference 1). The 2-3 passages of BLECs were collected and used in this experiment at the concentration of 1×10^6 cells/hole. The free-serum DMEM containing 0.1 ng/L, 0.5 ng/L, 1.0 ng/L of CTGF was added into medium for 24 hours in different experimental group respectively, and only equal volume of free-serum DMEM was added in control group. Expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) mRNA and protein in the BLECs were examined by semiquantitative RT-PCR and Western blot, respectively. The transwell inserts were used to evaluate the migration ability of BLECs. **Results** The expression of α -SMA mRNA in cultured BLECs was gradually increased in different concentrations of CTGF groups. Compared with control group, the expression of α -SMA mRNA in experimental group was significantly enhanced ($F = 66.56, P < 0.01$). The expression of α -SMA protein followed the same pattern ($F = 65.43, P < 0.01$). The migration ability of BLECs was obviously elevated after CTGF stimulation under the light microscope. The migration rate of BLECs was considerably increased in experimental group compared with blank control group ($t = 51.7, P < 0.01$). **Conclusion** CTGF promotes the migration and transdifferentiation of BLECs at a dose-dependent manner in vitro. CTGF plays an important role in the formation of posterior capsule opacification.

Key words connective tissue growth factor; lens epithelial cells; migration; smooth muscle actin; cataract

摘要 目的 观察结缔组织生长因子(CTGF)在体外培养牛晶状体上皮细胞(LECs)迁移和转分化中的作用。**方法** 将体外培养的第2~3代牛LECs分为对照组和实验组,实验组分别经 0.1×10^6 、 0.5×10^6 、 1.0×10^6 ng/L CTGF处理24 h后,采用半定量RT-PCR和Western blot技术检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)mRNA以及蛋白表达的变化。迁移实验中,利用transwell小室对LECs的移行能力进行检测。**结果** 与空白对照组相比,CTGF能够明显促进 α -SMA mRNA以及蛋白的表达($F = 66.56, P < 0.01; F = 65.43, P < 0.01$)。迁移实验发现,CTGF能够促进LECs的移行,与空白对照组相比差异有统计学意义($t = 51.7, P < 0.01$)。**结论** CTGF以剂量依赖的方式促进牛LECs的分化和迁移,可能在后囊膜混浊(PCO)的LECs移行、转分化以及细胞外基质沉积的过程中发挥重要作用。

关键词 结缔组织生长因子;晶状体上皮细胞;迁移;平滑肌肌动蛋白;白内障

分类号 R 776.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)12-1068-05

后囊膜混浊 (posterior capsule opacification, PCO) 是白内障摘囊外摘出术最常见且最主要的并发症,成人发病率为30%~50%,儿童几乎是100%。研究发现,结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)在PCO的发生过程中起着重要的作用,其在细胞迁移、转分化以及细胞外基质沉积的过程中发挥必

不可少的作用^[1]。本实验拟观察CTGF对牛晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs) α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达及迁移能力的影响,进一步探讨PCO的发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

CTGF(英国Peprotech公司);DMEM培养液(美国Hyclone公司);Trizol(美国Invitrogen公司);逆转录试

本课题为湖北省自然科学基金资助(2006ABA097)
作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科
通讯作者:曹阳 (Email: ytsao@sohu.com)

剂盒(日本 Toyobo 公司);PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司)。

1.2 方法

1.2.1 牛 LECs 的体外培养 牛 LECs 的体外培养参见文献[1]。

1.2.2 CTGF 对细胞的处理 取 2~3 代牛 LECs 以 1×10^6 个/孔的密度接种于 6 孔培养板内,24 h 吸出培养液,用 D-Hank 液洗 3 次,实验组加入含 CTGF 的无血清 DMEM 培养液 1 mL(质量浓度分别为 0.1×10^6 、 0.5×10^6 、 1.0×10^6 ng/L),对照组加入不含 CTGF 的等体积无血清培养液。

1.2.3 RT-PCR 测定 α -SMA mRNA 的表达 (1)总 RNA 的提取:LECs 培养 24 h 去除培养液后,每孔加入 1 mL Trizol,适当地振荡和吹打。10 min 后收集 Trizol,加入 200 μ L 氯仿,摇匀,4 $^{\circ}$ C 条件下 14 000 r/min 离心 15 min。取上清 500 μ L 加入等体积的异丙醇沉淀总 RNA,4 $^{\circ}$ C 条件下 14 000 r/min 离心 10 min,弃去上清,加入 1 mL 75% 乙醇洗涤沉淀,4 $^{\circ}$ C 条件下 7 500 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 20 μ L DEPC 水溶解沉淀,低温保存备用。(2)逆转录:按照试剂盒说明进行操作:RNase 8 μ L,5 \times buffer 4 μ L,dNTP 2 μ L,RNase inhibitor 1 μ L,Oligo(dT) 20 1 μ L,Total RNA 3 μ L,Rever Tra Ace 1 μ L,共 20 μ L。放入 PCR 扩增仪后,按照 30 $^{\circ}$ C 10 min,42 $^{\circ}$ C 20 min,99 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 5 min 的体系进行逆转录制备 cDNA。(3)PCR 体外扩增 cDNA: α -SMA 上游引物:5'-ACGCTCTGGAC GCACAAC-3';下游引物:5'-GATGAACGAGGGCT GGAACA-3',扩增后片断长度为 374 bp。内参 GAPDH 上游引物:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3';下游引物:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3',扩增后片断长度为 452 bp。采用 25 μ L 的 PCR 反应体系:ddH₂O 14 μ L,10 mmol/L dNTP 1 μ L,10 \times PCR buffer 2.5 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L,上游引物 1.5 μ L,下游引物 1.5 μ L,模板 cDNA 2 μ L,Taq 酶 1 μ L。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,56 $^{\circ}$ C (α -SMA)、58 $^{\circ}$ C (GAPDH) 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,31 次循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。(4)PCR 扩增产物电泳:扩增产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,于紫外线箱中观察、照相并记录,相对分子质量标记物选用北京天为时代公司的 DNA Maker II。

1.2.4 Western blot 检测牛 LECs 合成 α -SMA 48 h 去除培养液后,将培养板置于 0 $^{\circ}$ C 的平面上。加入 50 μ L/孔细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl,pH 7.2,1 mmol/L EDTA,150 mmol/L NaCl,0.1% SDS,0.5% 去

氧胆酸钠,1% NP-40,1 mmol/L PMSF,10 g/L Aprotinin)冰上孵育 30 min,期间给予适当振荡和吹打。30 min 后收集细胞裂解物,于 4 $^{\circ}$ C 以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清 BCA 法测蛋白浓度。取 60 μ g 蛋白上样于 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,电泳后转移样品蛋白至 NC 膜上。随后将膜于 5% 脱脂奶粉封闭液中室温封闭 2 h 后,以 1:500 抗 α -SMA 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 TBST(50 mmol/L Tris-HCl,pH 7.6,150 mmol/L NaCl,0.3% Tween20)洗膜 3 次,加 1:2 000 HRP 标记的二抗室温孵育 1.5 h。TBST 洗膜 3 次后,浸入增强化学发光试剂,暗室 X 线片压片曝光 2 min,洗片。

1.2.5 牛 LECs 迁移实验 细胞分为空白对照组和实验组,按照 transwell 使用说明进行实验:选用 24 孔培养板,加入 650 μ L 含 10% 胎牛血清的培养基,将 transwell 小室置于孔中,选取 2~3 代牛 LECs 消化,制备成细胞悬液,滴入 transwell 小室中,最终使小室内细胞悬液量为 100 μ L,血清浓度为 1%,细胞量为 1×10^4 个/孔,同时实验组小室中加入 CTGF 因子,终质量浓度为 1.0×10^6 ng/L。8 h 后将 transwell 小室拿出,PBS 清洗 2~3 次,细胞用 Gimmsa 染色,然后用棉签将小室上层细胞刮掉,显微镜下细胞计数,随机选取 5 个视野计算细胞数。

1.2.6 图像的采集及分析 Western blot 和 RT-PCR 电泳图片扫描后,经 IMAGE Quant 程序对条带中心密度进行测定,测定值主要与条带密度及条带周边背景色有关。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学分析。所有测试数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有实验均重复 3 次。不同质量浓度 CTGF 组和对照组 α -SMA mRNA 及蛋白在牛 LECs 中表达的总体比较采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 Turkey HSD 检验;实验组与对照组间牛 LECs 迁移率的比较采用独立样本的 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牛 LECs 的体外培养

牛 LECs 于培养 48 h 内贴壁,细胞形态各异,大小不一(图 1)。

2.2 CTGF 对 α -SMA mRNA 在培养的牛 LECs 中表达的影响

RT-PCR 产物电泳结果显示,各实验组在 374 bp 处出现特异性 α -SMA 基因条带,而空白对照组未见 α -SMA 表达。与空白对照组相比, α -SMA/GAPDH 条

带中心密度的比值随 CTGF 质量浓度增高而增高,表现出一定的量效关系,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 CTGF 能够质量浓度依赖性地促进 α -SMA mRNA 的表达(图 2)。

密度比值随 CTGF 质量浓度的增高而增高,表现出一定的量效关系,差异有统计学意义($F = 65.43, P < 0.05$)。CTGF 可以促进 α -SMA 蛋白的表达(图 3)。

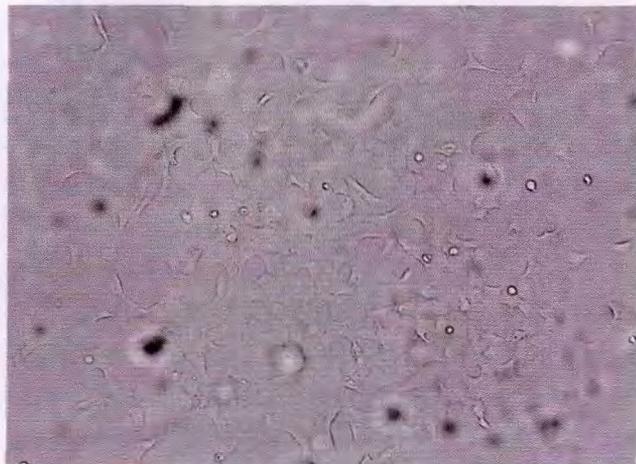


图 1 培养第 4 天的牛 LECs (x200)
Fig.1 Cultured BLECs at the 4th day (x200)

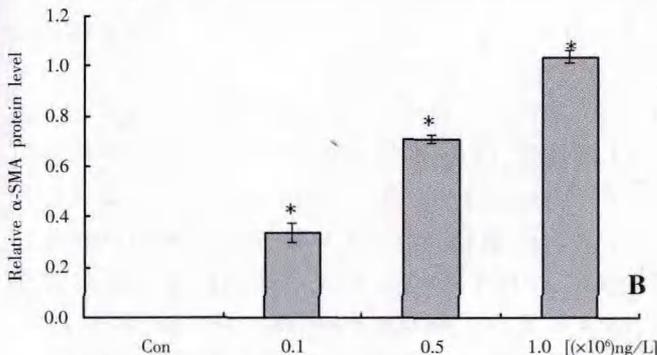
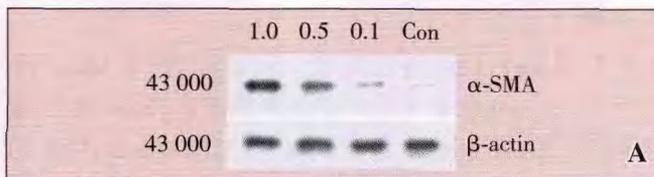


图 3 α -SMA 蛋白在培养的牛 LECs 中的表达 A: α -SMA SDS-PAGE 凝胶电泳结果 B: 实验组能够明显地促进 α -SMA 蛋白的表达,并呈现质量浓度依赖性($F = 65.43, P < 0.05$)。与对照组比较, $* P < 0.05$ (One-way ANOVA, Turkey HSD 检验)

Fig.3 Expression of α -SMA protein in cultured BLECs A: Results of α -SMA SDS-PAGE electrophoresis B: CTGF promotes the expression of α -SMA protein in BLECs at a dose-dependent manner in experimental group($F = 65.43, P < 0.05$); $* P < 0.05$ vs control group (One-way ANOVA, Turkey HSD test)

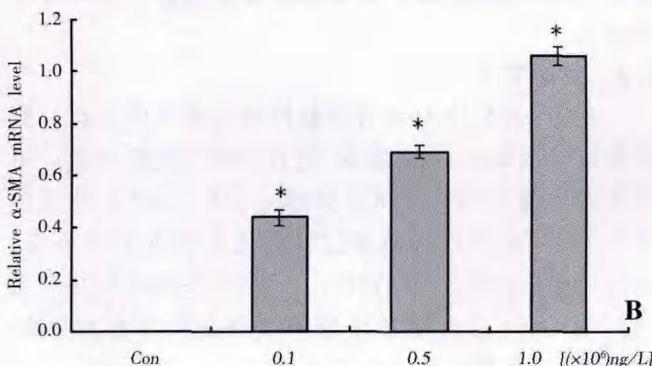
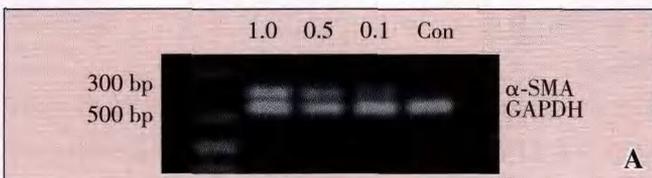


图 2 α -SMA mRNA 在培养的牛 LECs 中的表达 A: α -SMA RT-PCR 凝胶电泳结果 B: 实验组能够明显地促进 α -SMA mRNA 在牛 LECs 中的表达,并呈现质量浓度依赖性($F = 66.56, P < 0.05$)。与对照组相比, $* P < 0.05$ (One-way ANOVA, Turkey HSD)
Fig.2 Expression of α -SMA mRNA in cultured BLECs A: RT-PCR electrophoresis B: Expression of α -SMA mRNA is gradually elevated with the increase of concentration of CTGF ($F = 66.56, P < 0.05$); $* P < 0.05$ vs control group (One-way ANOVA, Turkey HSD test)

2.4 迁移实验结果分析

Transwell 小室对 CTGF 影响牛 LECs 的迁移能力检测 8 h 后,细胞经 Gimsa 染色,显微镜下观察发现,CTGF 刺激后牛 LECs 的迁移能力明显增强,与空白对照组相比,穿膜的细胞明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 4)。

3 讨论

晶状体本身具有自我修复和再生能力,但是它在纤维组织变性、色素的生成和沉积以及细胞外基质的沉积等病理过程中会逐渐丧失其透明性^[2],导致白内障的发生。随着白内障手术仪器及术式的不断改进,保留后囊的囊外摘出术和晶状体超声乳化白内障摘出术以及人工晶状体植入术被认为是目前比较理想的术式。但是白内障术后,后囊膜可再次混浊,引起后发性白内障的发生^[3],是严重影响术后视力的主要原因。

表皮间充质样转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)是一个动态的过程。在这一过程中,上皮细胞分化为间充质细胞。早期认为 EMT 仅

2.3 CTGF 对 α -SMA 蛋白表达的影响

图片扫描后,经 IMAGE Quant 程序对条带中心密度测定,测定值主要与条带中心密度及条带周边背景色有关。与空白对照组相比, α -SMA/ β -actin 条带中心

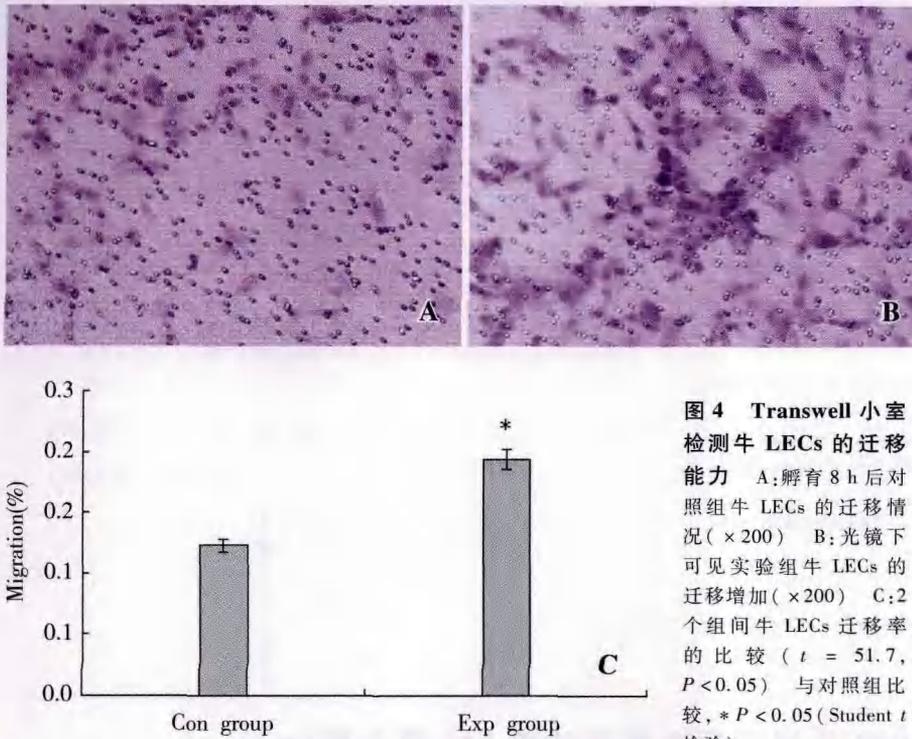


图 4 Transwell 小室检测牛 LECs 的迁移能力 A: 孵育 8 h 后对照组牛 LECs 的迁移情况 (×200) B: 光镜下可见实验组牛 LECs 的迁移增加 (×200) C: 2 个组间牛 LECs 迁移率的比较 ($t = 51.7, P < 0.05$) 与对照组比较, * $P < 0.05$ (Student t 检验)

Fig. 4 The migration rate of BLECs by transwell inserts migration assay A: The migration of cells in blank control group after incubation for 8 hours (×200) B: The migration of cells was enhanced in experimental group under the light microscope (×200) C: Compared with blank control group, CTGF could promote the migration of BLECs ($t = 51.7, P < 0.05$); * $P < 0.05$ vs control group (Student's t test)

发生于胚胎阶段, 目前研究发现, EMT 在一些特殊疾病, 如癌细胞的转移、病理性纤维化等^[4-5]病理过程中发挥着关键的作用。LECs 在前极白内障和 PCO 的形成过程中都会发生 EMT: LECs 转分化为肌成纤维细胞 (myofibroblast, MyoF), 表达其表型标志 α -SMA, 胶原-I (collagen-I, CA-I)、胶原-III (collagen-III, CA-III)、纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 等细胞外基质的异常堆积在转分化的 LECs 之间^[6-8]。最终引起细胞增生, 迁移能力增强, 囊膜发生褶皱、透明性消失。在 PCO 的 EMT 过程中, 有多种细胞因子参与, 例如转化生长因子- β 、肝细胞生长因子、表皮生长因子和 CTGF 等, 深入的研究可为探索 PCO 的防治寻找新的靶点。

CTGF 是一大小为 36 000 ~ 38 000 的富含半胱氨酸的多肽生长因子, 首次在人的脐带内皮细胞中发现^[9], 是高度保守的即刻早期基因 CCN 家族成员之一, 在细胞增生、细胞移行、细胞外基质合成、细胞表型转化等方面发挥重要作用^[10]。在 CTGF 基因启动子序列中存在特异的 TGF- β 和 Smad 的反应元件, 可影响启动子对 TGF- β 的反应活性^[11]。作为 TGF- β 的下游效应因子, CTGF 与 TGF- β 介导的机体创伤修复和组织纤维化过程密切相关^[12]。有研究表明, CTGF 在多种细胞, 包括肾小管上皮细胞, 肺、肾、皮肤成纤维细

胞, 肝星形细胞向 MyoF 转分化的过程中介导了 TGF- β 的作用, 利用 CTGF 中和抗体或反义寡核苷酸能有效阻断 TGF- β 对细胞转分化的诱导作用^[13-16]。Wunderlich 等^[3]曾用原位杂交和 RT-PCR 法发现人白内障术后发生 PCO 的后囊膜有 CTGF mRNA 的表达, 同时表达的还有 MyoF 的表型标志 α -SMA。Wormstone^[17]的研究表明 TGF- β 可以明显促进体外培养人 LECs 表达 CTGF 的 mRNA。可见, CTGF 作为 TGF- β 的下游效应因子, 在 PCO 的发病过程中发挥了非常重要的作用, 深入研究 CTGF 在 TGF- β 介导的 LECs 的移行、增生和转分化过程中的可能作用及其表达调控, 可为探索 PCO 的发病机制提供新的思路。

本研究结果显示, CTGF 可以明显促进牛 LECs α -SMA 的表达,

并呈现剂量依赖性, CTGF 可以促进牛 LECs 发生 EMT, 转分化为 MyoF。同时, CTGF 还可以促进牛 LECs 发生迁移。据此推测, 白内障术后患者房水中 CTGF 质量浓度的增加, 将导致 LECs 的移行、增生, 并转分化为 MyoF, 引起 FN、CA 等细胞外基质的合成增多、大量聚集, 导致囊膜皱褶、透明性消失, 引发 PCO。本研究为进一步探讨 CTGF 与 PCO 发病之间的联系提供了实验基础, 但仍缺乏相应的体内实验研究。

参考文献

- 1 胡建石, 翁景宁, 郑志斌. 牛眼晶状体上皮细胞的培养、冻存与复苏 [J]. 上海实验动物科学, 2002, 22(4): 223 - 226
- 2 Scott JD. Lens changes in retinal detachment [J]. Trans Ophthalmol Soc UK, 1979, 99: 241 - 243
- 3 Wunderlich K, Pech M, Eberle AN, et al. Expression of connective tissue growth factor (CTGF) mRNA in plaques of human anterior subcapsular cataracts and membranes of posterior capsule opacification [J]. Curr Eye Res, 2000, 21(2): 627 - 636
- 4 Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation [J]. Acta Anat, 1995, 154: 8 - 20
- 5 Hay ED, Zuk A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced [J]. Am J Kidney Dis, 1995, 26: 678 - 690
- 6 Pau H, Novotny GE, Arnold G. Ultrastructural investigation of extracellular structures in subcapsular white corrugated cataract (anterior capsular cataract) [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1985, 23: 223 - 232

96 - 100

7 Hatae T, Ishibashi T, Yoshitomi F, et al. Immunocytochemistry of types I-IV collagen in human anterior subcapsular cataracts[J]. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol, 1993, 231: 586 - 590

8 McAvoy JW, Schulz MW, Maruno KA, et al. TGF-beta induced cataract is characterized by epithelial-mesenchymal transition and apoptosis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(4): 30

9 Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, et al. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediately early gene product CEF-10[J]. J Cell Biol, 1991, 114: 1285 - 1294

10 王侃, 严文华. 转化生长因子-β 与结缔组织生长因子在纤维化中的作用机制[J]. 浙江实用医学, 2004, 9: 208

11 Grotendorst GR. Connective growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblast[J]. Cytok Grow Fact Rev, 1997, 8: 171 - 179

12 Chen MM, Lam A, Abraham JA, et al. CTGF expression is induced by in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis [J]. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32: 1805 - 1819

13 张憬, 卓文磊, 王彦, 等. 结缔组织生长因子反义寡核苷酸抑制 TGF-beta1 诱导人肾小管上皮细胞转分化[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15: 316

14 张海燕, 李幼姬, 杜勇, 等. 结缔组织生长因子在转化生长因子 β 诱导的肾小管上皮细胞转分化中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(1): 179 - 183

15 Evans RA, Tian YC, Steadman R, et al. TGF-beta1 mediated fibroblast myofibroblast terminal differentiation the role of Smad proteins[J]. Exp Cell Res, 2003, 282: 90 - 100

16 Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, et al. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury [J]. Hepatology, 2002, 35(1): 49 - 61

17 Wormstone IM. Characterisation of TGF-beta 2 signaling and function in a human lens cell line[J]. Exp Eye Res, 2004, 78(3): 705 - 714

(收稿: 2009-02-26 修回: 2009-10-27)

(本文编辑: 尹卫靖)

《眼科研究》2008 年被引频次最高的前 112 篇文章(一)

<p>[1] 糖尿病视网膜病变各期血流动力学研究 【第一作者】安建斌 【年期】2005, (01)</p>	<p>[6] 视网膜 Müller 细胞在视网膜病变中的作用和研究现状 【第一作者】苟琳 【年期】2003, (02)</p>	<p>[11] 光学相干断层成像的特色和不足 【第一作者】王光璐 【年期】2005, (06)</p>
<p>[2] 玻璃酸钠降低滴眼剂中防腐剂不良反应的作用 【第一作者】凌沛学 【年期】2006, (04)</p>	<p>[7] 猫角膜内皮细胞的快速体外培养及其鉴定 【第一作者】李东侃 【年期】2006, (06)</p>	<p>[12] 复方樟柳碱不同给药方式治疗作用的临床观察 【第一作者】钱茜 【年期】2005, (04)</p>
<p>[3] 兔角膜内皮、上皮及基质细胞体外培养扩增的研究 【第一作者】傅瑶 【年期】2003, (01)</p>	<p>[8] 姜黄素对晶状体上皮细胞增殖的抑制作用 【第一作者】胡艳红 【年期】2006, (02)</p>	<p>[13] 大视杯人群视盘面积和视网膜神经纤维厚度的关联性分析 【第一作者】邵运良 【年期】2005, (03)</p>
<p>[4] 翼状胬肉发病机制及治疗研究进展 【第一作者】吕明 【年期】2003, (02)</p>	<p>[9] 糖尿病视网膜病变发生的相关危险因素分析 【第一作者】高翔 【年期】2003, (03)</p>	<p>[14] 正常角膜基质细胞密度和角膜厚度的研究 【第一作者】罗丽辉 【年期】2004, (05)</p>
<p>[5] 视野检查的临床应用(二) 【第一作者】袁援生 【年期】2006, (04)</p>	<p>[10] 不同阅读距离的调节反应在近视发生发展中的表达 【第一作者】徐丹 【年期】2006, (03)</p>	<p>[15] 羊膜移植抑制兔角膜碱烧伤后新生血管增殖的研究 【第一作者】邱培瑾 【年期】2004, (03)</p>

(未完待续)