

# 尾加压素 II 促进晶状体上皮细胞增殖的实验研究

黄秀榕<sup>1</sup>, 祁明信<sup>2</sup>, 李坤鹏<sup>1</sup>, 陈 义<sup>1</sup>

基金项目: 中国福建省中医药重点资助项目 (No. Wzzb0601)  
作者单位: <sup>1</sup> (350003) 中国福建省福州市, 福建中医药大学病理生理研究中心; <sup>2</sup> (350003) 中国福建省福州市, 福建中医药大学附属第二人民医院眼科  
作者简介: 黄秀榕, 女, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 白内障。  
通讯作者: 祁明信, 男, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 白内障。 qihuang@netease.com  
收稿日期: 2010-01-07 修回日期: 2010-02-08

## Experimental study on proliferation induced by urotensin II in lens epithelial cell

Xiu-Rong Huang<sup>1</sup>, Ming-Xin Qi<sup>2</sup>, Kun-Peng Li<sup>1</sup>, Yi Chen<sup>1</sup>

**Foundation item:** Key Program of Fujian Traditional Chinese Medicine, China (No. Wzzb0601)

<sup>1</sup> Research Centre of Pathophysiology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China; <sup>2</sup> Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

**Correspondence to:** Ming-Xin Qi, Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China. qihuang@netease.com

Received: 2010-01-07 Accepted: 2010-02-08

## Abstract

• **AIM:** To study the effect of urotensin II (U-II), a new biological activity substance, on proliferation of lens epithelial cell (LEC).

• **METHODS:** Different concentrations of U-II were incubated with *in vitro* cultured LEC *in vitro*. The activities of LEC were detected via methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). The proliferations of LEC were detected via <sup>3</sup>H-TdR.

• **RESULTS:** The absorbences of groups 10<sup>-9</sup> mol/L U-II, 10<sup>-8</sup> mol/L U-II, 10<sup>-7</sup> mol/L U-II and 10<sup>-6</sup> mol/L U-II were higher than that in control group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ); the radio-activities of <sup>3</sup>H-TdR in groups 10<sup>-10</sup> mol/L, 10<sup>-9</sup> mol/L U-II, 10<sup>-8</sup> mol/L U-II, 10<sup>-7</sup> mol/L U-II and 10<sup>-6</sup> mol/L U-II were higher than that in control group ( $P < 0.01$ ), which were 1.36, 1.40, 1.45, 1.59 and 1.66 times respectively, with a dose-dependent manner.

• **CONCLUSION:** U-II can induce proliferation of LEC.

• **KEYWORDS:** urotensin II; lens epithelial cell; proliferation; after cataract

Huang XR, Qi MX, Li KP, *et al.* Experimental study on proliferation induced by urotensin II in lens epithelial cell. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(3):435-436

## 摘要

**目的:** 探讨尾加压素 II (urotensin II, U-II) 对晶状体上皮细胞 (lens epithelial cell, LEC) 增殖的影响。

**方法:** 采用不同浓度的 U-II 与体外培养的 LEC 共同孵育后, 用 MTT 法检测 LEC 的活性, 并用 <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶 (<sup>3</sup>H-TdR) 掺入法检测 LEC 增殖。

**结果:** 10<sup>-9</sup> mol/L U-II 组、10<sup>-8</sup> mol/L U-II 组、10<sup>-7</sup> mol/L U-II 组和 10<sup>-6</sup> mol/L U-II 组的吸光度值均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ )。10<sup>-10</sup> mol/L U-II 组、10<sup>-9</sup> mol/L U-II 组、10<sup>-8</sup> mol/L U-II 组、10<sup>-7</sup> mol/L U-II 组和 10<sup>-6</sup> mol/L U-II 组的 <sup>3</sup>H 掺入放射活性均显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 分别是对照组的 1.36 倍、1.40 倍、1.45 倍、1.59 倍和 1.66 倍。呈浓度依赖关系。

**结论:** U-II 具有促进 LEC 增殖的作用。

**关键词:** 尾加压素 II; 晶状体上皮细胞; 增殖; 后发性白内障

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.03.010

黄秀榕, 祁明信, 李坤鹏, 等. 尾加压素 II 促进晶状体上皮细胞增殖的实验研究. *国际眼科杂志* 2010;10(3):435-436

## 0 引言

人尾加压素 II (human urotensin II, hU-II) 具有多种生物学效应<sup>[1,2]</sup>。体内多种组织中含有 U-II, 我们的研究也发现, 眼部各组织均含有 U-II。不少研究还表明, U-II 具有促进细胞增殖的作用, 可使大鼠心肌成纤维细胞、气道平滑肌细胞、肾系膜细胞和血管平滑肌细胞等发生增殖<sup>[3]</sup>。白内障囊外摘除联合人工晶状体植入术后的主要并发症之一是视力再度下降, 称为后发性白内障 (after cataract)。这是由于手术后残留的晶状体上皮细胞 (lens epithelial cell, LEC) 发生增殖、移行, 使晶状体后囊膜发生混浊所致。本文研究 U-II 对晶状体上皮细胞增殖的影响, 探讨后发性白内障的发生机制并寻求防治方法。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 采用健康新鲜小牛眼, 无菌操作取晶状体前囊膜, 用胰蛋白酶消化法在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中作晶状体上皮细胞原代和传代培养, 取第 3 代细胞进行如下实验。hU-II 为美国 Sigma 公司产品, <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶 (<sup>3</sup>H-TdR) 购自上海原子核研究所, H<sub>7</sub>, PD98059, W<sub>7</sub>, 尼卡地平 (nicardipine) 均系美国 Sigma 公司产品, 二甲基亚砜 (DMSO) 系美国 Amresco 公司产品, DMEM 培养基为美国 GIBCO 公司产品, 2,5-二苯基恶唑 (PPO) 及 1,4-双-(5-苯基恶唑基-2)-苯 (POPOP) 为中国医药集团上海化学试剂公司产品。全自动酶标读数仪 (购自美国 BioTek ELX808)。

## 1.2 方法

**1.2.1 LEC 活性的检测** 取第 3 代培养的 LEC, 台盼蓝染色, 计算活细胞数并调整细胞密度至 5 × 10<sup>8</sup> 个/L, 在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养 24h, 使细胞同步化。将实验分成 6 组, 每组 8 个样本。对照组在 LEC 内加入 DMEM 培养液, 10<sup>-10</sup> U-II 组, 10<sup>-9</sup> U-II 组, 10<sup>-8</sup> U-II 组, 10<sup>-7</sup> U-II 组和

10<sup>-6</sup>U-II组分别在对照组基础上加入终浓度为10<sup>-10</sup> mol/L, 10<sup>-9</sup> mol/L, 10<sup>-8</sup> mol/L, 10<sup>-7</sup> mol/L 和 10<sup>-6</sup> mol/L 的 hU-II。置 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 72h 后, 吸去培养液, 每孔分别加入终浓度为 0.5 g/L 的 MTT 100 μL。CO<sub>2</sub> 培养箱中继续放置 4h 后, 加入 DMSO 溶液 100 μL, 振荡 10min 后室温下静置 5min, 于全自动酶标仪上用 490nm 比色测定吸光度 A 值。

**1.2.2 LEC 增殖的检测** 取第 3 代培养的 LEC 并使细胞生长同步化。按照上述实验分组, 分别加入不同浓度的 hU-II, 每组 8 个样本, CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 12h 后, 吸去培养液, 每孔分别加入 <sup>3</sup>H-TdR (其放射比活性为每孔 3.7 × 10<sup>4</sup> 个/min), 继续培养 12h。吸去培养液, 消化细胞并用真空泵抽滤, 将细胞收集于玻璃纤维膜上。于 60℃, 30min 条件下烘干滤膜, 用液闪计数器测定 <sup>3</sup>H 放射活性。

统计学分析: 用 SPSS 12.0 统计软件分析。所有结果用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 来表示。各组与对照组间数据比较采用 *t* 检验, 各组间数据比较采用单因素方差 One-Way ANOVA 分析。

## 2 结果

**2.1 U-II 可增加 LEC 活性** 10<sup>-10</sup> mol/L U-II 组的吸光度值与对照组无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 说明 10<sup>-10</sup> mol/L U-II 不能使 LEC 活性增高。10<sup>-9</sup> mol/L, 10<sup>-8</sup> mol/L, 10<sup>-7</sup> mol/L 和 10<sup>-6</sup> mol/L 组 U-II 的吸光度值均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), 其吸光度值分别是对照组的 1.26 倍、1.40 倍、1.45 倍和 2.05 倍。说明 10<sup>-6</sup> mol/L ~ 10<sup>-9</sup> mol/L U-II 均有使 LEC 活性增高的作用, 且随 U-II 浓度增加, 使 LEC 活性增高的作用越强, 呈浓度依赖关系 (表 1)。

**2.2 U-II 可促进 LEC 增殖** 10<sup>-10</sup> mol/L U-II 组, 10<sup>-9</sup> mol/L U-II 组, 10<sup>-8</sup> mol/L U-II 组, 10<sup>-7</sup> mol/L U-II 组和 10<sup>-6</sup> mol/L U-II 组的 U-II <sup>3</sup>H 掺入放射活性 (个/min) 均显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 其放射活性分别是对照组的 1.36 倍、1.40 倍、1.45 倍、1.59 倍和 1.66 倍。说明浓度范围在 10<sup>-6</sup> mol/L ~ 10<sup>-10</sup> mol/L 的 U-II 均有使 LEC 增殖的作用, 且随 U-II 浓度增加, 使 LEC 增殖的作用越强 ( $F = 17.893$ ,  $P < 0.05$ ), 呈浓度依赖关系 (表 1)。

## 3 讨论

研究表明 U-II 是具有多种生物学效应的新型生物活性物质。除了具有很强的收缩血管的作用之外, U-II 还具有促进细胞增殖的作用。有报道 U-II 可明显促进血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖, 使 G<sub>0</sub> 期细胞进入细胞周期。U-II 还能促进实验大鼠心肌成纤维细胞、气道平滑肌细胞、肾系膜细胞发生增殖, 且在一定的浓度范围内其促增殖作用具有浓度依赖性<sup>[4]</sup>。另有研究表明, U-II 可刺激离体培养的大鼠胸主动脉 VSMC 发生增殖, 呈浓度依赖关系。且降钙素基因相关肽、肾上腺髓质素、IL-10 等均能抑制由 U-II 诱导的 VSMC 增殖; U-II 上调 VSMC 内皮素基因表达并促进 VSMC 内皮素的合成释放; 肾上腺髓质素可浓度依赖性地抑制 U-II 刺激的 VSMC 内皮素 mRNA 水平的增加<sup>[4-6]</sup>。

经广泛查阅国内外文献, 有关 U-II 促进眼组织细胞增殖的研究尚未见报道, 更未见 U-II 促进晶状体上皮细胞增殖的报道。本研究用不同浓度的 U-II 与体外培养的牛晶状体上皮细胞共同孵育, 经 MTT 法检测发现 U-II 使 LEC 细胞活性显著增高; 经 <sup>3</sup>H-TdR 掺入法检测发现 U-II 能显著促进 LEC 发生增殖。且在一定的浓度范围内, 随着

表 1 U-II 对 LEC 活性和增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	吸光度(A)	放射活性(个/min)
对照组	0.099 ± 0.010	8646 ± 787
10 <sup>-10</sup> mol/L U-II 组	0.092 ± 0.027	11613 ± 338 <sup>b</sup>
10 <sup>-9</sup> mol/L U-II 组	0.125 0.017 <sup>a</sup>	12091 ± 419 <sup>b</sup>
10 <sup>-8</sup> mol/L U-II 组	0.139 0.028 <sup>a</sup>	12553 ± 553 <sup>b</sup>
10 <sup>-7</sup> mol/L U-II 组	0.144 0.024 <sup>b</sup>	13748 ± 257 <sup>b</sup>
10 <sup>-6</sup> mol/L U-II 组	0.203 0.031 <sup>b</sup>	14337 ± 1409 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

U-II 浓度增高, 其所促进的 LEC 活性增高越明显、促进 LEC 增殖越明显, 即 U-II 促进 LEC 增殖呈明显的浓度依赖关系。

检测细胞增殖这一重要生物学特性的指标有细胞计数法、MTT 检测法、放射性核苷酸掺入法等。MTT 法检测细胞活性从而反映细胞增殖的原理是: 细胞增殖时由于线粒体能量代谢旺盛、产生的琥珀酸脱氢酶增多, 该酶可将淡黄色的 MTT 还原成蓝紫色的结晶沉积在细胞内或细胞周围, 因此细胞增殖时形成的结晶多。在结晶中加入二甲亚砷使结晶溶解后即可在酶标仪上比色读得吸光度值。故吸光度值越高, 表示活细胞数越多、细胞增殖越明显。<sup>3</sup>H-TdR 掺入法检测细胞增殖的原理是: 用放射性同位素 <sup>3</sup>H 标记的胸腺嘧啶掺入细胞内, 再用 γ-液闪计数器测定 <sup>3</sup>H 放射活性。如 <sup>3</sup>H-TdR 掺入细胞增加, 则测得的 <sup>3</sup>H 放射活性高, 反映细胞内 DNA 合成增多, 说明细胞发生了增殖。本研究采用 MTT 法和 <sup>3</sup>H-TdR 掺入法检测 LEC 增殖, 两种方法的研究结果是一致的, 均表明 U-II 能促进 LEC 发生增殖, 并呈浓度依赖关系。

后发性白内障的基本病理过程是白内障手术后残留的 LEC 发生增殖, 同时移行至后囊下形成再生的晶状体结构如珍珠样 (Elschnig) 小体及 Soemmering 环, 并向成纤维细胞转化、分泌胶原形成纤维膜, 使晶状体后囊膜发生混浊而使白内障术后视力再度下降。本项目组的其他研究曾发现 U-II 在人眼各组织中均有一定的含量。我们又发现 U-II 能促进体外培养的 LEC 发生增殖, 揭示 U-II 促进手术后残留的晶状体上皮细胞发生增殖很可能是后发性白内障发生的重要机制之一, 为防治后发性白内障提出一个新的思路, 具有一定的科学意义。

### 参考文献

- 1 Matsushita M, Shichiri M, Fukai N, et al. Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for the porcine renal epithelial cell line. *Endocrinology* 2003;144(5):1825-1831
- 2 Maguire JJ, Kue RE, Davenport AP. Ophen-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1. *Br J Pharmacol* 2000; 131(3):441-446
- 3 张勇刚, 陈亚红, 马春艳, 等. 尾加压素的促丝裂作用. *中国动脉硬化杂志* 2001;9(1):14-16
- 4 夏春芳, 霍勇, 尹航, 等. IL-10 对尾加压素 II 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响. *北京大学学报(医学版)* 2001;33(4):332-334
- 5 齐永芬, 夏春芳, 陈亚红, 等. 肾上腺髓质素对尾加压素 II 刺激的血管平滑肌细胞增殖的影响. *中国病理生理杂志* 2002;18(3):230-232
- 6 袁杰, 李菊香, 李国华, 等. 降钙素基因相关肽对尾加压素 II 诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响. *贵阳医学院学报* 2002;21(3):129-132