

转化生长因子-β2 体外抑制人角膜内皮细胞增殖的作用

樊廷俊, 王晶, 赵君, 杨洪收, 赵文卓, 杨秀霞

基金项目: 中国国家高技术研究发展 863 计划资助项目 (No. 2006AA02A132)

作者单位: (266003) 中国山东省青岛市, 中国海洋大学角膜组织工程重点实验室

作者简介: 樊廷俊, 男, 教授, 理学博士, 中国海洋大学角膜组织工程重点实验室主任, 中国海洋大学海洋生命学院副院长, 国家生命科学与技术人才培养基地主任, 国家细胞生物学教学团队带头人, 山东省高等学校教学名师, 研究方向: 动物细胞工程与细胞分化; 主要成果: 在国际上建立了首个非转染的人角膜内皮细胞系, 在体外重建出结构和功能与在体角膜内皮类似、移植后可使新西兰兔角膜长期维持透明的组织工程人角膜内皮等。

通讯作者: 樊廷俊. tjfan@ouc.edu.cn

收稿日期: 2010-04-09 修回日期: 2010-04-23

Inhibitory effect of transforming growth factor-β2 on the proliferation of human corneal endothelial cells *in vitro*

Ting-Jun Fan, Jing Wang, Jun Zhao, Hong-Shou Yang, Wen-Zhuo Zhao, Xiu-Xia Yang

Foundation item: National High Technology Research and Development Program ("863" Program) of China (No. 2006AA02A132)

Key Laboratory for Corneal Tissue Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Ting-Jun Fan. Key Laboratory for Corneal Tissue Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China. tjfan@ouc.edu.cn

Received: 2010-04-09 Accepted: 2010-04-23

Abstract

• **AIM:** To investigate the inhibitory effect of transforming growth factor (TGF)-β2 on the proliferation of human corneal endothelial cells (HCEC) *in vitro*, and its cellular and molecular mechanisms.

• **METHODS:** Synchronized HCEC, prepared from *in vitro* cultured HCEC line by serum-starvation, were treated with TGF-β2 at different concentration for different time duration, respectively. After HCEC treated with TGF-β2, the inhibitory effect of proliferation, phase status in cell cycle, and expression of p27^{kip1} and p21^{cip1} of HCEC was examined by methods of cell number counting, MTT staining, flow cytometry (FCM) and realtime PCR, respectively.

• **RESULTS:** TGF-β2 at the concentration of 1-15 μg/L had obvious inhibitory effects on HCEC proliferation in dose- and time-dependent manner, 9 μg/L was the peak concentration of TGF-β2 for inhibiting HCEC cell proliferation. After treated with 9 μg/L TGF-β2, the population of HCEC in G₁/G₀ phase increased obviously in

time-dependent manner. After HCEC treated with 9 μg/L TGF-β2, the expression of p27^{kip1} increased obviously after 24 hours, and expression of p27^{kip1} and p21^{cip1} increased obviously 48 hours later in time-dependent manner.

• **CONCLUSION:** TGF-β2 has obvious inhibitory effect on HCEC proliferation, and the inhibition is in dose- and time-dependent manner. The mechanism of TGF-β2 inhibition is most probably accomplished by inducing the in turn expression of p27^{kip1} and p21^{cip1} which keep HCEC rest on G₁/G₀ phase.

• **KEYWORDS:** human corneal endothelial cells; transforming growth factor-β2; proliferation; inhibition; cell cycle; p27^{kip1}; p21^{cip1}

Fan TJ, Wang J, Zhao J, *et al.* Inhibitory effect of transforming growth factor-β2 on the proliferation of human corneal endothelial cells *in vitro*. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(5): 841-843

摘要

目的: 研究转化生长因子 TGF-β2 对体外培养人角膜内皮细胞 (HCEC) 增殖的影响机制。

方法: 体外培养经血清饥饿法获得同步化的 HCEC, 用不同浓度 TGF-β2 对 HCEC 进行不同时间的处理, 采用细胞计数、MTT 染色以及流式细胞仪 (FCM) 和 Realtime PCR 检测 TGF-β2 对 HCEC 的增殖、细胞周期及细胞中 p27^{kip1} 和 p21^{cip1} 表达的影响。

结果: TGF-β2 1 ~ 15 μg/L 对 HCEC 有显著的增殖抑制作用, 具有浓度和时间依赖性, 9 μg/L 是 TGF-β2 抑制 HCEC 细胞增殖的峰浓度。9 μg/L TGF-β2 处理后, 处于 G₁/G₀ 期 HCEC 数量显著增加, 并具有时间依赖性。9 μg/L TGF-β2 处理 24h 后, p27^{kip1} 表达量显著增加, 48h 后 p27^{kip1} 和 p21^{cip1} 的表达量均显著增加, 也具有时间依赖性。

结论: TGF-β2 对 HCEC 具有显著的浓度和时间依赖性增殖抑制作用, 可能通过先后诱导 p27^{kip1} 和 p21^{cip1} 表达量的增加将细胞拘留在 G₁/G₀ 期来实现的。

关键词: 人角膜内皮细胞; 转化生长因子 β2; 增殖; 抑制; 细胞周期; p27^{kip1}; p21^{cip1}

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2010. 05. 006

樊廷俊, 王晶, 赵君, 等. 转化生长因子-β2 体外抑制人角膜内皮细胞增殖的作用. 国际眼科杂志 2010;10(5): 841-843

0 引言

角膜内皮细胞是存在于角膜中靠近于房水面的单层细胞, 对维持角膜的透明有着关键作用。成年人角膜内皮细胞 (HCEC) 缺乏增殖能力, 局部细胞受到损伤后, 只能通过邻近细胞体积的增大和移行来填补缺损区^[1]。G₀/G₁ 期 HCEC 仍有增殖潜能^[2,3]。关于其丧失增殖能力的具体原因至今仍不清楚。转化生长因子-β (TGF-β) 属于 TGF-β

表1 Realtime PCR 实验中所用的寡核苷酸引物序列

基因名称	序列	GenBank 注册号
人 $p21^{cip1}$	Forward : 5'-GGA AGA CCA TGT GGA CCT GT-3'	NM_000389
	Reverse : 5'-AAT CTG TCA TGC TGG TCT GC-3'	
人 $p27^{kip1}$	Forward : 5'-CAA ATG CCG GTT CTG TGG AG-3'	NM_004064.3
	Reverse : 5'-TCC ATT CCA TGA AGT CAG CGA TA-3'	
人 $G3PDH$	Forward : 5'-CCC ACT CCT CCA CCT TTG AC-3'	NM_002046.3
	Reverse : 5'-CAC CCT GTT GCT GTA GCC A -3'	

超家族的成员,具有调控细胞的增殖、分化和凋亡等作用^[4-11]。而 TGF- β 2 主要存在于人房水中,可促进小鼠角膜上皮层和基质层的正常发育及内皮层的形成,抑制体外培养的兔和牛^[4,5]角膜内皮细胞的增殖。有关 TGF- β 2 对 HCEC 增殖和维持 HCEC 单层结构方面的影响及其调控作用,至今还未见到相关的报道。我们利用非转染人角膜内皮细胞系为体外研究体系,对 TGF- β 2 对 HCEC 的增殖、细胞周期及 $p27^{kip1}$ 和 $p21^{cip1}$ 表达的影响进行研究如下。

1 材料和方法

1.1 材料 非转染人角膜内皮细胞(HCEC)系,由本实验室自行建立,取第100代细胞用100mL/L胎牛血清(FBS)-DMEM/F12(1:1)培养液在37℃,50mL/L CO₂培养箱中进行培养;TGF- β 2 购自 Peprotech 公司,用含2g/L小牛血清白蛋白(BSA)的磷酸缓冲液(PBS)配制成10g/L的母液,分装后置-80℃保存备用;MTT 购自 Sigma-Aldrich 公司,用 PBS 配成5g/L的母液,经0.22 μ m 微孔滤膜抽滤后分装,置4℃避光保存备用。

1.2 方法 将长满单层的 HCEC 用 1.25g/L 胰蛋白酶(含 0.1g/L EDTA)消化处理,CASY 细胞快速分析仪进行计数,混合均匀后,按照 2.5×10^4 个/cm² 的细胞密度接种细胞到 24 孔培养板中,用 100mL/L FBS-DMEM/F12 培养液在 37℃ 50mL/L CO₂ 培养箱中过夜培养后,将培养液更换为无血清 DMEM/F12 培养液,继续培养 24h,获得饥饿后同步化到 G₁/G₀ 期的 HCEC。将培养液更换为含有不同浓度 TGF- β 2 (1 ~ 15 μ g/L) 的 100mL/L FBS-DMEM/F12 培养液(每个浓度组设 3 个平行孔,180 μ L/孔),继续培养 72h 后,加入 5g/L MTT 20 μ L,37℃ 避光孵育 4h, PBS 冲洗 1 次后每孔加入二甲亚砜(DMSO)150 μ L,用 Bio-Rad 公司的 550 型酶标仪测定 490nm 吸光,按照公式:抑制率 = (1-实验组平均吸光度/对照组平均吸光度) \times 100%,计算 TGF- β 2 对 HCEC 增殖的抑制率,确定 TGF- β 2 对 HCEC 增殖的峰值抑制浓度。使用 TGF- β 2 的峰值抑制浓度按上述方法培养和处理细胞,每隔 12h 取 3 孔细胞进行 MTT 染色与测定,同法计算 TGF- β 2 对 HCEC 增殖的抑制率,确定 TGF- β 2 处理不同时间对 HCEC 增殖的影响。使用 TGF- β 2 峰值抑制浓度处理的 HCEC,于 24,48 和 72h 分别各取 3 瓶细胞,按上述胰蛋白酶消化法收集细胞,1000r/min,离心 10min 漂洗后用 700mL/L 乙醇固定,PBS 漂洗后用 0.1g/L RNase A 于 37℃ 处理 30min,经 50mg/L 碘化丙锭室温避光染色 30min,200 目筛绢过滤后,按照 10⁸ 个/L 的细胞浓度用 Beckman Coulter 公司的 Cytomics FC 500 MPL 流式细胞仪及其配套软件对 HCEC 的细胞周期进行统计和分析。使用 TGF- β 2 峰值抑制浓度处理的 HCEC,于 24,48 和 72h 分别各取 3 瓶细胞,用 Takara 公司 RNAiso™ Plus 试剂盒提取总 RNA,经 Promega 公司 DNase I 处理后,用 Takara 公司 PrimeScript™ 试剂盒合成第一链 cDNA,采用 Takara

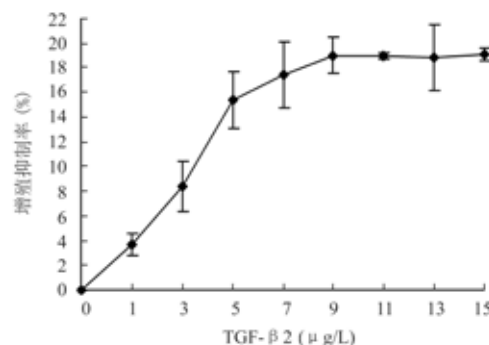


图1 不同浓度 TGF- β 2 72h 对 HCEC 增殖的效果。

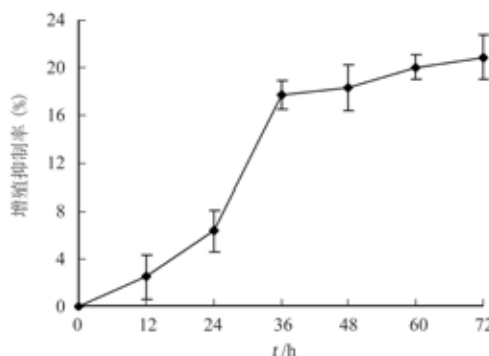


图2 不同时间 TGF- β 2 对 HCEC 增殖的抑制。

SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒按照其操作指南对 $p21^{cip1}$ 与 $p27^{kip1}$ 进行 Realtime PCR,目的基因和 $G3PDH$ 内参基因的引物设计见表1,对 PCR 扩增产物通过溶解温度曲线进行特异性分析,对 $p21^{cip1}$ 和 $p27^{kip1}$ 的特异性表达进行检测。上述所有实验每组均设 3 个平行样品,用无 TGF- β 处理 HCEC 的平行样品作为阴性对照。

2 结果

2.1 TGF- β 2 对 HCEC 增殖的影响 TGF- β 2 1 ~ 15 μ g/L 对 HCEC 的增殖抑制率具有一定的浓度依赖性,浓度为 9 μ g/L 时对 HCEC 的增殖抑制率达到峰值(图1)。9 μ g/L TGF- β 2 处理 12h 开始表现出对 HCEC 增殖的抑制作用($P < 0.05$),随着处理时间的延长,其抑制率逐渐升高,至 72h 时 TGF- β 2 对 HCEC 增殖抑制率可达到 20.9% (图2)。

2.2 TGF- β 2 处理对 HCEC 细胞周期的影响 TGF- β 2 处理 24 ~ 72h 后 G₁/G₀ 期 HCEC 数量比对照组显著增加($P < 0.05$),且随着处理时间的延长比例逐渐增大,处理 72h 时比例可高达(83.4 \pm 0.7)%,比对照组增加(8.0 \pm 1.4)% (图3)。

2.3 $p27^{kip1}$ 与 $p21^{cip1}$ 的表达 TGF- β 2 处理 24h HCEC 对 $p21^{cip1}$ 表达量与对照组相比没有显著差异($P > 0.05$),而处理 48 和 72h HCEC $p21^{cip1}$ 表达量增加($P < 0.05$,图4A);TGF- β 2 处理 24,48 和 72h HCEC $p27^{kip1}$ 表达量与同期对照组相比均显著增加($P < 0.05$,图4B)。

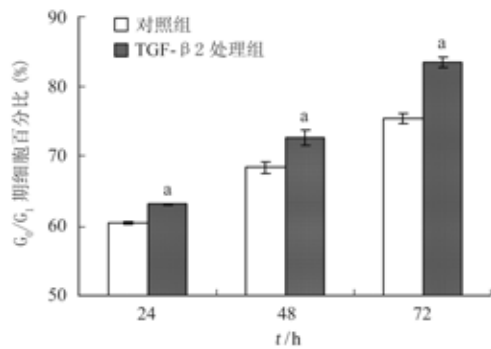


图3 TGF-β2 处理不同时间后 HCEC 细胞周期的变化 (^a P < 0.05 vs 对照组)。

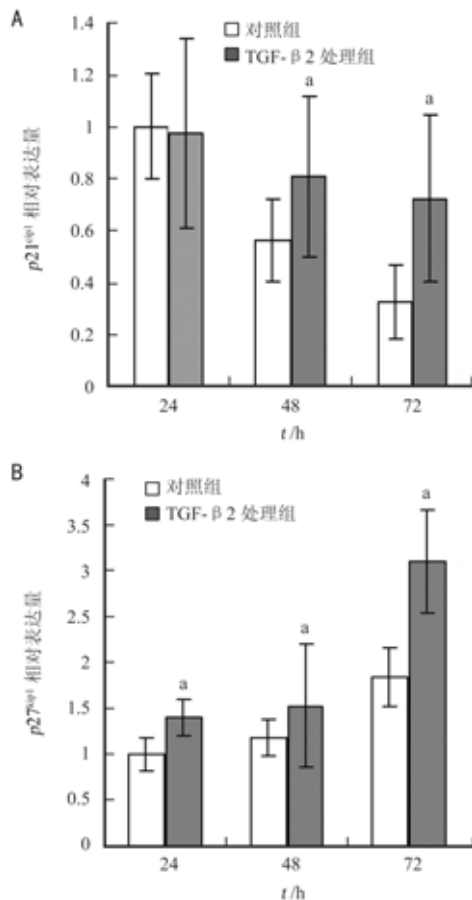


图4 TGF-β2 对 HCEC p 21 和 p 27 表达的影响 (^a P < 0.05 vs 对照组) A: p21^{cipl} ; B: p27^{kip1} 。

3 讨论

足够的 HCEC 数量是维持角膜透明度、厚度和为角膜提供营养等正常生理功能的前提,但成人 HCEC 丧失了增殖能力,并以每年 0.3% ~ 0.6% 的比例逐年减少。为了揭示 TGF-β2 对体外培养 HCEC 增殖的影响作用,我们采用血清饥饿法,即将培养液更换为无血清 DMEM/F12 培养液连续培养了 24h,获得了同步化到 G₁/G₀ 期的 HCEC,进而研究了 TGF-β2 不同浓度及不同处理时间对 HCEC 增殖活性的影响。MTT 染色结果显示,1 ~ 15 μg/L TGF-β2 均可抑制 HCEC 增殖,其峰值抑制浓度为 9 μg/L,该结果与在角膜内皮细胞中的研究结果相似^[4]。9 μg/L TGF-β2 处理 12h 便表现出对 HCEC 增殖的抑制作用,其抑制

率随着处理时间的延长而逐渐升高,处理 72h 对 HCEC 增殖抑制率可高达 20.9%,表明 TGF-β2 对 HCEC 细胞的增殖抑制作用具有一定的浓度和时间依赖性。该结论与在角膜内皮细胞中的研究结果是相似的^[5]。现有研究结果表明,成人 HCEC 之所以不再分裂是因为其被阻滞在 G₀/G₁ 期^[3,5]。为了揭示 TGF-β2 抑制 HCEC 增殖的机制,我们研究了 TGF-β2 对体外培养 HCEC 细胞周期的影响。流式细胞仪检测结果显示,TGF-β2 处理 24,48 和 72h G₁/G₀ 期细胞比例显著增加,而处于分裂期的细胞比例显著减少,表明 TGF-β2 对 HCEC 增殖的抑制作用是通过使其拘留在 G₁/G₀ 期来实现的。该结论与在人^[5]和猫中的研究结果是一致的。已有研究结果表明,TGF-β2 对细胞增殖的抑制作用主要是通过 G₁/G₀ 期增加 CDKI 的表达量进而抑制细胞由 G₁ 期进入 S 期来实现的^[7,8]。为了揭示 TGF-β2 抑制 HCEC 增殖的分子机制,我们又研究了 TGF-β2 对 HCEC 中 p27^{kip1} 和 p21^{cipl} 表达量的影响。Realtime PCR 检测结果显示,HCEC 经 TGF-β2 处理 24h 后 p27^{kip1} 表达量开始逐渐增加,48h 后 p21^{cipl} 表达量才开始逐渐增加,表明 TGF-β2 处理 HCEC 后首先可诱导 p27^{kip1} 表达量的增加,随后才能诱导 p21^{cipl} 表达量的增加,二者相互配合可能是将 HCEC 拘留在 G₁/G₀ 期的主要原因。该结论与他人的报道是一致的^[6,8,9],但我们关于 TGF-β2 引起 HCEC 中 p21^{cipl} 表达量变化的报道尚属首次。

综上所述,TGF-β2 对 HCEC 增殖抑制作用具有浓度和时间依赖性,其抑制机制可能是通过先后诱导 p27^{kip1} 和 p21^{cipl} 表达量的增加进而将 HCEC 拘留在 G₁/G₀ 期来实现的。

参考文献

- 1 陈根云,吴静.角膜内皮细胞生理和再生特性研究进展.生理科学进展 2008;39(3):279-281
- 2 Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(3):359-389
- 3 Joyce NC. Cell cycle status in human corneal endothelium. *Exp Eye Res* 2005;81(6):629-638
- 4 Lu J, Lu Z, Reinach P, et al. TGF-β2 inhibits AKT activation and FGF-induced corneal endothelial cell proliferation. *Exp Cell Res* 2006;312(18):3631-3640
- 5 陆秀兰,张明. TGF-β2 体外抑制角膜内皮细胞增殖的研究.国际眼科杂志 2009;9(6):1058-1060
- 6 Kikuchi M, Harris DL, Obara Y, et al. p27^{kip1} antisense-induced proliferative activity of rat corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(6):1763-1770
- 7 Lee HT, Kay EP. Regulatory role of cAMP on expression of cdk4 and p27^{kip1} by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(9):3816-3825
- 8 Yoshida K, Kase S, Nakayama K, et al. Involvement of p27^{kip1} in the proliferation of the developing corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(7):2163-2167
- 9 Kikuchi M, Zhu C, Senoo T, et al. p27^{kip1} siRNA induces proliferation in corneal endothelial cells from young but not older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(11):4803-4809
- 10 Heldin CH, Landström M, Moustakas A. Mechanism of TGF-β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21(2):166-176
- 11 Kang JS, Liu C, Derynck R. New regulatory mechanisms of TGF-β2 receptor function. *Trends Cell Biol* 2009;19(8):385-394