

人热敏瞬时受体通道1基因转染对兔角膜内皮细胞的影响

王莉¹, 杜兆江², 李鹏³

基金项目:陕西省科技厅自然科学基金项目(No. 2013JC2-06)
作者单位:¹(710021)中国陕西省西安市,西安医学院医学技术系眼视光教研室;²(710038)中国陕西省西安市,第四军医大学附属唐都医院眼科;³(710054)中国陕西省西安市,解放军第451医院眼科

作者简介:王莉,女,毕业于西安交通大学医学院,在读博士研究生,副教授,研究方向:眼视光学。

通讯作者:李鹏,男,毕业于西安交通大学医学院,在读博士研究生,副主任医师,研究方向:眼视光学、白内障。drlipeng@126.com

收稿日期:2015-07-01 修回日期:2015-11-17

Effects of human thermal transient receptor channel 1 gene transfection on cultured rabbit corneal endothelial cells *in vitro*

Li Wang¹, Zhao-Jiang Du², Peng Li³

Foundation item: Natural Science Foundation of Shaanxi Province Science and Technology Department(No. 2013JC2-06)

¹Department of Medicine Technology Optometry, Xi'an Medical College, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China;²Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China;³Department of Ophthalmology, No. 451 Hospital of Chinese PLA, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Peng Li. Department of Ophthalmology, No. 451 Hospital of Chinese PLA, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China. drlipeng@126.com

Received:2015-07-01 Accepted:2015-11-17

Abstract

• **AIM:** To explore the effects of human thermal transient receptor channel 1 gene transfection on corneal endothelial cell of rabbits.

• **METHODS:** Research group were dealt for thermal transient receptor channel 1 gene mediated by liposome transfection to rabbit corneal endothelial cells. MTT method was used to observe its influence on cell proliferation. Immunohistochemical staining and computer image analysis system were used to test the effects for proliferation cell nucleus antigen (PCNA) expression.

• **RESULTS:** Proliferation of corneal endothelial cell of rabbit was promoted after thermal transient receptor channel 1 gene transfected and the difference between

experiment group and control group ($t=3.01, P=0.013$). The expression of PCNA promoted after thermal transient receptor channel 1 gene transfected ($t=3.21, P=0.007$) compared with control group.

• **CONCLUSION:** The expression of PCNA in rabbit corneal endothelial cells can promote the proliferation of corneal endothelial cells of rabbits.

• **KEYWORDS:** thermal transient receptor channel 1; proliferating cell nuclear antigen; corneal endothelial cell

Citation: Wang L, Du ZJ, Li P. Effects of human thermal transient receptor channel 1 gene transfection on cultured rabbit corneal endothelial cells *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(12):2052-2054

摘要

目的:探讨人热敏瞬时受体通道1基因转染对培养的兔角膜内皮细胞增殖能力的影响。

方法:研究组为人热敏瞬时受体通道1基因通过脂质体介导的方法转染到体外培养的兔角膜内皮细胞中,采用MTT方法观察对细胞增殖的影响,免疫组织化学染色法和计算机图像分析系统检测对细胞增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响。

结果:热敏瞬时受体通道1基因转染后内皮细胞增殖增加,实验组与对照组比较差异有统计学意义($t=3.01, P=0.013$);实验组细胞PCNA表达明显增加,与对照组比较差异有统计学意义($t=3.21, P=0.007$)。

结论:人热敏瞬时受体通道1基因转染可以促进兔角膜内皮细胞增殖。

关键词:热敏瞬时受体通道1;增殖细胞核抗原;角膜内皮细胞

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.12.07

引用:王莉,杜兆江,李鹏.人热敏瞬时受体通道1基因转染对兔角膜内皮细胞的影响.国际眼科杂志2015;15(12):2052-2054

0 引言

角膜内皮细胞(cornea endothelial cell, CEC)是位于角膜后部的单层分化成熟的细胞。它的主要功能是使角膜处于脱水状态。在此状态下,基质的胶原纤维才能规则排列,保持角膜透明,这个功能只有在角膜内皮细胞层完整时才能发挥作用^[1]。如果角膜内皮细胞丢失过多,超过自身代偿能力,残余的角膜内皮细胞将失去其生理功能,角膜内皮细胞泵功能将降低,继而导致角膜的水肿和变性^[2]。长期的经验表明:角膜内皮细胞的再生能力是非常有限的,其被认为是不会进行再生或仅具有微弱

的分裂增生能力的组织。各种原因引起的角膜内皮细胞的损伤,在体内往往通过邻近细胞的变形、膨大来修补损伤所带来的缺损,这种能力也是非常有限的^[3]。实验证明,瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)通道1参与一系列包括温度在内的刺激调节,而且 TRP1 大量存在于支配角膜的周围神经末梢初级感觉神经元中^[4]。而且,研究也证明该基因可以通过调节 P27 蛋白的调节来抑制兔角膜内皮细胞增殖^[5]。细胞增殖细胞核抗原(proliferation cell nucleus antigen, PCNA)在细胞增殖的启动过程中起重要作用,与细胞的增殖周期密切相关^[6]。本研究通过观察转染热敏 TRP1 基因对兔角膜内皮细胞增殖及 PCNA 的影响,探讨热敏 TRP1 基因对角膜内皮细胞增殖周期的作用,为促进该基因应用于人角膜内皮细胞奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物:健康大耳白兔 20 只(由华中科技大学同济医学院实验动物学部提供),体质量 2.5 ~ 3.0kg,雌雄兼用,无眼部疾患。主要试剂与仪器:DMEM/F12 培养基(1:1)、胰蛋白酶(1:250)、小牛血清(美国 Gibco 公司);MTT (Fluka 公司);小鼠抗兔 PCNA 单克隆抗体(Santa Cruz 公司);Histostain TM-plus SP 试剂盒、DAB 试剂盒(购自北京中山生物技术公司);培养箱(Heraeus 公司);倒置相差显微镜(Olympus M081 型);ELX800 酶标检测仪(Bio Tek 公司产品);HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统(解放军第 451 医院病理计算分析中心提供)。

1.2 方法

1.2.1 兔角膜内皮细胞的培养

1.2.1.1 角膜内皮片的获取

按无菌原则摘除兔眼球,生理盐水冲洗干净后,环形剪下角膜;将角膜先用无菌生理盐水冲洗后,再用含 100U/mL 青霉素及 100 μ g/mL 链霉素的 PBS 液浸泡 30min;距后角膜缘内 1mm 环钻取下完整角膜放入 PBS 漂洗液中备用;手术显微镜下,钳夹小块双面刀片自角膜内皮面中央向边缘作一浅划口;显微无齿镊将边角卷起,后弹力层小心剥离,完整剥离出带后弹力层的角膜内皮片。

1.2.1.2 双酶消化法培养

内皮面朝上放入培养皿中,培养皿置于 CO₂ 培养箱中(37 $^{\circ}$ C, 4% CO₂, RH 100%),添加胶原酶(2mg/mL)37 $^{\circ}$ C 消化 4 ~ 6h;将后弹力层消化掉后,CEC 聚集成团, PBS 液漂洗;用胰酶进一步消化,离心,将细胞收集到培养皿中过夜贴壁;本实验所用为第 3 ~ 6 代细胞。透射电镜下可见完整丰富的线粒体和高尔基体等细胞器。细胞间有紧密相连。

1.2.2 人热敏瞬时受体通道 1 基因转染兔角膜内皮细胞

取正常人静脉血,快速萃取法提取基因组 DNA,通过聚合酶链反应克隆出 285bp 的热敏瞬时受体通道 1 基因,通过酶切法连接于真核表达载体上,转入大肠杆菌中进行扩增、提取和纯化,获得人热敏瞬时受体通道 1 基因转染表达载体。采用 EffecteneTM 脂质体在细胞培养瓶中进行转染,对实验组中加入人热敏瞬时受体通道 1 基因转染表达载体,对照组采用 PBS 代替表达载体加入培养基。评价转染效率:转染 12h 后移出脂质体继续培养,48h 后检测表达情况,通过基因的表达检测转染效率。转染率 = 转染细胞数/总细胞数 \times 100%。



图 1 兔角膜内皮细胞 PCNA 表达(\times 400 倍)。

1.2.3 人热敏瞬时受体通道 1 基因转染表达载体对兔角膜内皮细胞增殖的影响

设 3 组:不接种细胞作为空白调零组,接种细胞作为阴性对照组,实验组细胞中加入人热敏瞬时受体通道 1 基因转染表达载体,每组 8 孔。采用 MTT 法检测:空白调零组单纯加入培养基,实验组和阴性对照组以 1×10^4 /mL 的浓度接种细胞悬液于 96 孔板,培养 12h 细胞贴壁后,换含有 2% 小牛血清的 DMEM/F12 培养 24h,使细胞同步化。实验组加相应浓度的人热敏瞬时受体通道 1 基因转染表达载体,培养 48h 后每孔加入 20 μ L MTT 溶液离心,用 PBS 冲 2 ~ 3 遍后加入含 MTT 的培养液;终止后吸去孔内培养液;每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜,低速振荡 10min,使结晶物充分溶解。对 3 组的各孔加入 MTT 20 μ L,孵育后吸去原液,每孔加入二甲基亚砜 150 μ L 呈色,轻微震荡。以空白调零组调零,酶标仪测定 495nm 波长上的阴性对照组和实验组每孔的吸光度(A)值。

1.2.4 人热敏瞬时受体通道 1 基因转染表达载体对兔角膜内皮细胞 PCNA 表达的影响

设两组:对照组(不加任何物质);实验组(加入人热敏瞬时受体通道 1 基因转染表达载体),每组 3 孔。以 1×10^4 /mL 的浓度接种传 2 ~ 3 代的兔角膜内皮细胞于预置有盖玻片的 12 孔板制成细胞爬片,培养 48h 后取出盖玻片。4 $^{\circ}$ C 冷丙酮固定 15min,采用 LAB 法免疫组织化学染色,检测 PCNA 的表达(其中 0.3% H₂O₂/甲醇溶液室温 30min;山羊血清封闭室温 20min;1:100 小鼠抗兔 PCNA 单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜;生物素化羊抗鼠二抗,37 $^{\circ}$ C 下孵育 30min;HRP 标记的链霉亲和素工作液,37 $^{\circ}$ C 下孵育 30min;DAB/H₂O₂ 显色;中性树脂封片。免疫组织化学计算机图像分析方法为:每组细胞爬片 3 张,每张随机取 5 个视野(\times 400 倍)做图像分析,测定阳性细胞的吸光度,取其平均值作为每组的阳性细胞平均吸光度(A)值(图 1)。

统计学分析:采用 SPSS 15.0 统计软件包进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 双酶消化法培养结果

均在 2h 后开始有少量细胞贴壁,显微镜下观察细胞外形呈圆形或多角形,周围连带少许后弹力层组织,接着细胞伪足突出,24h 内大部分细胞贴壁,胞浆丰富,72h 后细胞开始增殖,细胞数目增加

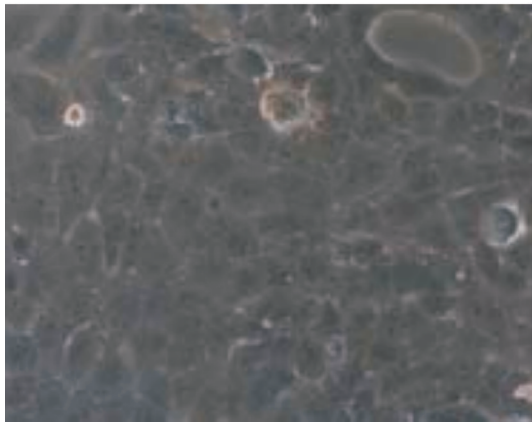


图2 双酶消化法第20d($\times 100$ 倍)。

并向周围迁移,细胞渐渐演变成多角形,随细胞数目增加,细胞慢慢连接成片,细胞之间建立连接,转化成多边形,7~8d左右细胞生长成小片。20d左右,细胞达到密集状态,达到密集状态后,细胞呈单层排列,细胞呈均匀的多变形,胞浆丰富,细胞核居中(图2)。

2.2 人热敏瞬时受体通道1基因转染兔角膜内皮细胞与表达载体的鉴定 表达载体扩增产物419bp,酶切后出现285和134bp两个片段(其中285为插入片段),转染率为13.5%。

2.3 人热敏瞬时受体通道1基因转染表达载体对兔角膜内皮细胞增殖的影响 与实验组(0.21 ± 0.01)比较,对照组细胞A值(0.13 ± 0.02)明显降低,差异有统计学意义($t=3.01, P=0.013$)。人热敏瞬时受体通道1基因转染表达载体对培养的兔角膜内皮细胞的增殖有明显的促进作用。

2.4 人热敏瞬时受体通道1基因转染表达载体对兔角膜内皮细胞PCNA表达的影响 人热敏瞬时受体通道1基因转染表达载体可增加PCNA的表达,其A值(0.06 ± 0.002)与对照组(0.04 ± 0.000)相比差异有统计学意义($t=3.21, P=0.007$)。

3 讨论

角膜内皮细胞是一单层细胞,其密度随年龄增大而减少,内眼手术、外伤、眼内炎症、角膜内皮细胞的自发性变性、坏死以及其他因素也可引起角膜内皮细胞的丢失,当加入某些细胞因子时,人角膜内皮细胞就有可能出现细胞分裂。

PCNA是在细胞周期S期广泛表达的一种核蛋白,是一种仅在增殖细胞中合成和表达的36kD多肽,由261个氨基酸组成,是DNA聚合酶6的辅助蛋白和推动因子,参与调节DNA的合成。本实验研究发现,人热敏瞬时受体通道1基因转染表达载体可以使角膜内皮细胞增殖,并促进PCNA的表达。PCNA是存在于细胞核内的一种蛋白质,只出现在增殖状态的细胞中,PCNA阳性细胞的多少可反映细胞增殖状况^[7]。本实验运用PCNA作为兔角膜内皮细胞增殖检测指标,结果显示人热敏瞬时受体通道1基因转染表达载体显著促进兔角膜内皮细胞PCNA表达,说明人热敏瞬时受体通道1基因转染后可以促进角膜内皮细胞增殖。其原因可能有几个方面:首先,TRPV1属于热敏性通道,并大量存在于支配角膜的周围神经末梢初级感觉神经元中^[8]。该通道活性受热和机械影响,通过细胞信号连接到G蛋白偶联受体从而促进角膜内皮细胞增殖^[9]。比如,近年的研究表明,人类和小鼠的角膜上皮细胞瞬时受体电位辣椒素1(transient receptor

potential vanilloid 1,TRPV1)选择性激动剂通过钙离子诱导功能热敏性TRPV1表达^[10]。说明TRPV1促进角膜内皮的增殖可能与血浆膜钙离子涌入的增加有关,推测其机制为通过瞬时钙离子涌入和激活有丝分裂原蛋白激酶信号诱导促炎性细胞因子的释放增加相关^[11]。其次,TRPV1促进兔角膜内皮细胞的增殖,可能与调节多种蛋白的表达相关。例如,研究也证明该基因可以通过提高P27蛋白的表达来促进兔角膜内皮细胞增殖^[12]。因为P27蛋白属于细胞周期调节蛋白,成年人角膜内皮细胞受其表达的调节。P27蛋白通过抑制细胞周期蛋白或通过直接与细胞周期蛋白结合抑制细胞周期蛋白依赖性激酶,阻断细胞的增殖过程^[13]。且PCNA是存在于细胞核内的一种蛋白质,只出现在增殖状态的细胞中,PCNA阳性细胞的多少可反映细胞增殖状况,有实验证明ET-1、rhEGF、bFGF显著促兔角膜内皮细胞PCNA表达,并与剂量以及协同作用相关^[14]。

综上所述,TRPV1转染能够促进兔角膜内皮细胞的增殖,该结果为临床提供了实验室支持,并进一步为促进该基因应用于人角膜内皮细胞奠定理论基础。

参考文献

- 1 Amore G, Casares F. Size matters: The contribution of cell proliferation to the progression of the specification Drosophila eye gene regulatory network. *Developmental Biology* 2010;344(2):569-577
- 2 Meloni M, Pauly A, Servi BD, et al. Occludin gene expression as an early in vitro sign for mild eye irritation assessment. *Toxicology in Vitro* 2010;24(1):276-285
- 3 Mergler S, Valtink M, Coulson-Thomas VJ, et al. TRPV channels mediate temperaturesensing in human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2010;90(6):758-770
- 4 李中国,邱良秀,赵长松,等.神经生长因子对兔角膜内皮细胞增殖的影响. *眼科研究* 2001;19(4):312
- 5 Znsman I, Reifen R, Livni O. Role of apoptosis, proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in chemically induced colon cancer in rats fed corn cob fiber treated with the fungus *Pleurotus ostreatus*. *Anticancer Res* 1997;17(3):2105
- 6 Kubben FJ, Peeters HA, Engels LG, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation. *Gut* 1994;35(4):530
- 7 Pan Z, Yang H, Mergler S, et al. Dependence of regulatory volume decrease on transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) expression in human corneal epithelial cells. *Cell Calcium* 2008;44(4):374-385
- 8 Pingle SC, Matta JA, Ahem GP. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Handb Exp Pharmacol* 2007;179:155-171
- 9 Colton CK, Zhu MX. 2-Aminoethoxydiphenyl borate as a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3 channels. *Handb Exp Pharmacol* 2007;179:173-187
- 10 Ducret T, Guibert C, Marthan R, et al. Serotonin-induced activation of TRPV4-like current in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells. *Cell Calcium* 2008;43(4):315-323
- 11 Fian R, Grasser E, Treiber F, et al. The contribution of TRPV4-mediated calcium signaling to calcium homeostasis in endothelial cells. *J Recept Signal Transduct Res* 2007;27(2):113-124
- 12 Ueda T, Yamada T, Ugawa S, et al. TRPV3, a thermosensitive channel is expressed in mouse distal colon epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;383(1):130-134
- 13 Yamada T, Ueda T, Ugawa S, et al. Functional expression of transient receptor potential vanilloid 3 (TRPV3) in corneal epithelial cells: Involvement in thermosensation and wound healing. *Exp Eye Res* 2010;90(1):121-129
- 14 Yoshida Y, Ban Y, Kinoshita S. Tight junction transmembrane protein claudin subtype expression and distribution in human corneal and conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(5):2103-2108