

# 氧化损伤诱导的人晶状体上皮细胞系基因表达谱的差异和表型改变

梅林<sup>1</sup>, 王嵩<sup>1</sup>, 闫博<sup>2</sup>, 杨安钢<sup>2</sup>, 赵晶<sup>2</sup>, 严宏<sup>1</sup>

基金项目:国家自然科学基金(No. 81370997)

作者单位:<sup>1</sup>(710038)中国陕西省西安市,第四军医大学唐都医院眼科;<sup>2</sup>(710032)中国陕西省西安市,第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室

作者简介:梅林,在读博士研究生,研究方向:白内障。

通讯作者:严宏,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向:白内障、小儿眼病. yhongb@fmmu.edu.cn

收稿日期:2016-02-22 修回日期:2016-04-11

## Discrepant gene expression profile and phenotype changes in human lens epithelial cells after oxidative damage

Lin Mei<sup>1</sup>, Song Wang<sup>1</sup>, Bo Yan<sup>2</sup>, An-Gang Yang<sup>2</sup>, Jing Zhao<sup>2</sup>, Hong Yan<sup>1</sup>

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81370997)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China; <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Hong Yan. Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. yhongb@fmmu.edu.cn

Received:2016-02-22 Accepted:2016-04-11

## Abstract

• AIM: To explore the discrepant gene expression profiles and the related phenotype changes in human lens epithelial cells (HLEC) after oxidative stimulation.

• METHODS: Human lens epithelial cell line (HLE-B3) were cultured in normal condition or with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24h. Total RNA were extracted for gene expression profiling assay and gene ontology analysis was performed for the significantly up-regulated genes using bioinformational database DAVID. The elevated expressions of up-regulated genes in HLEC after oxidative stimulation were confirmed by RT-qPCR. The apoptosis of HLEC induced by oxidative damage was detected using 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay and flow cytometry.

• RESULTS: Gene expression profiling assay demonstrated that 367 genes were up-regulated in HLEC after oxidative stimulation. These genes were enriched in 310 biological processes mainly associated with p53-

related signaling pathways, apoptosis, programmed cell death and etc. Six genes mainly pro- or anti-apoptotic, including BCL2A1, TP53I3, FAS, ZMAT3, DDB2 and BCL2L1, were confirmed to be up-regulated by oxidative stimulation using RT-qPCR ( $P < 0.05$ ). Results of MTT assay and flow cytometry showed that apoptosis of HLEC gradually appeared after cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and became the main consequence of oxidative stimulation.

• CONCLUSION: Oxidative stimulation can induce up-regulation of proapoptotic genes and lead to apoptosis of HLEC, even though antiapoptotic genes can also be promoted.

• KEYWORDS: human lens epithelial cells; oxidative damage; gene expression profile; apoptosis

Citation: Mei L, Wang S, Yan B, et al. Discrepant gene expression profile and phenotype changes in human lens epithelial cells after oxidative damage. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016; 16(5):822-825

## 摘要

目的:探讨人晶状体上皮细胞(human lens epithelial cells, HLEC)氧化刺激后基因表达谱的差异以及相应的表型改变。

方法:培养人晶状体上皮细胞系 HLE-B3 并给予 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激。24h 后,提取细胞总 RNA 进行基因表达谱芯片检测,并采用生物信息学数据库 DAVID 对氧化刺激组相对对照组显著上调的基因进行 Gene Ontology (GO) 功能富集分析。RT-qPCR 对上调的基因进行验证。通过 MTT 和流式细胞仪检测细胞凋亡水平。

结果:表达谱芯片结果显示,氧化刺激造成 HLEC 中 367 个基因上调,GO 分析表明这些基因富集于 310 个功能类别中,主要包括 p53 信号通路、细胞凋亡通路、细胞程序性死亡通路等。RT-qPCR 结果证实,6 个主要参与促凋亡或抗凋亡调节的基因,包括 BCL2A1、TP53I3、FAS、ZMAT3、DDB2 和 BCL2L1,在氧化刺激后表达水平明显上升。MTT 实验和流式细胞仪检测结果显示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激后 HLEC 凋亡逐渐上升,是细胞氧化损伤的主要表现。

结论:氧化刺激可同时诱导 HLEC 中促凋亡基因和抗凋亡基因表达水平上调,但最终仍然导致了细胞凋亡。

关键词:人晶状体上皮细胞;氧化损伤;表达谱芯片;细胞凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.5.07

引用:梅林,王嵩,闫博,等.氧化损伤诱导的人晶状体上皮细胞系基因表达谱的差异和表型改变.国际眼科杂志 2016;16(5):822-825

## 0 引言

晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LEC)是晶状体抵抗氧化损伤、维持正常生理功能的重要防线。健康的LEC可合成抗氧化物及抗氧化酶,调节晶状体内环境,修复受损细胞及蛋白质等,LEC的生理状态对于保持晶状体透明性至关重要<sup>[1-2]</sup>。然而,来自外界环境的刺激如紫外线照射、外伤或手术引起的局部炎症以及糖尿病高血糖等都会对LEC造成损害,而其中一个共同途径就是这些有害因素均能造成细胞内活性氧簇分子(reactive oxygen species, ROS)增加,包括 $H_2O_2$ 、 $O_2^-$ 和 $\cdot OH$ 。当ROS的累积超出人晶状体上皮细胞(HLEC)的清除能力时,就会引起细胞的氧化损伤,使细胞新陈代谢异常,进而导致白内障形成<sup>[3]</sup>。既往研究表明,氧化损伤对细胞的影响涉及到细胞的生长、增殖、分化、凋亡等诸多方面,因此研究HLEC经受氧化损伤后最主要的表型变化并探索其阻断策略,对进一步了解白内障发病机制、寻找预防或治愈白内障的治疗方法具有重要意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人晶状体上皮细胞系HLE-B3来自中山大学眼科研究中心惠赠。DMEM低糖培养基、胎牛血清(美国HyClone公司),胰蛋白酶(上海碧云天公司),Affymetrix Prime View表达谱芯片(美国Affymetrix公司),Trizol试剂(日本TaKaKa公司),逆转录试剂盒(德国Qiagen公司),实时定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)试剂盒(德国Qiagen公司),RT-qPCR荧光探针(日本TaKaRa公司),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天公司),分光光度计(美国Bio-Rad公司),实时定量PCR仪(美国Bio-Rad公司),流式细胞仪(美国BD公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与分组** 人晶状体上皮细胞复苏后培养于6cm皿中,加入4mL含10%胎牛血清的DMEM低糖培养基,内含 $10^5$  U/L青霉素和 $10^5$  g/L链霉素。细胞置于37℃、含体积分数50mL/L  $CO_2$ 恒温培养箱内培养,细胞生长至80%融合状态时,向培养基中加入浓度为 $70\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$ 作为氧化损伤组,对照组细胞不予处理。24h后,使用Trizol提取细胞总RNA。

**1.2.2 表达谱芯片检测** 总RNA样品经Agilent Bioanalyzer 2100电泳进行质检,合格的RNA样品采用Affymetrix表达谱芯片配套试剂盒,根据标准操作流程对样品RNA中的mRNA进行放大、标记和纯化,获得带有生物素标记的cRNA。杂交时,采用杂交标准流程和配套试剂盒,在滚动杂交炉中45℃,16h滚动杂交,并在洗涤工作站按照标准流程进行芯片的洗涤。采用GeneChip Scanner 3000对芯片结果进行扫描,采用Command Console Software 4.0读取原始数据,采用Gene Spring Software 11.0中的RMA算法对质控合格的数据进行归一化处理<sup>[1,4]</sup>。

**1.2.3 Gene Ontology分析** 根据表达谱芯片结果,将氧化损伤组相比于对照组表达量比值 $>2.0$ 者定义为上调差异基因,并采用DAVID数据库(<http://david.ncifcrf.gov/>),对差异基因进行Gene Ontology(GO)功能富集分析。应用Fisher精确概率法找出差异基因中,相比整个

基因组背景相比,显著富集的基因功能分类。 $P<0.05$ 的功能分类定义为在差异基因中显著富集。

**1.2.4 RT-qPCR检测** 使用Trizol提取各组细胞总RNA,分光光度计对RNA样品质检并定量。使用逆转录试剂盒,根据操作流程获取cDNA,并进行RT-qPCR检测,反应体系为20.0 $\mu\text{L}$ :荧光探针10.0 $\mu\text{L}$ 、上下游引物各1.0 $\mu\text{L}$ 、cDNA模板2.0 $\mu\text{L}$ 、去离子水6.0 $\mu\text{L}$ 。反应条件:第一步95℃,3min;第二步95℃,10s;第三步55℃,15s;第四步72℃,15s。其中第二步到第四步设40个循环<sup>[1]</sup>。BCL2A1:上游,5'-GCAGTGTGGTCTCCGAATGTCT-3'; TP53I3:上游,5'-AAGGAAATAACCACCATGTTAGCCCGTGCAC-3<sup>[5]</sup>; FAS:上游,5'-CTACCTAAGAGCTATCTACCGTTC-3<sup>[6]</sup>; ZMAT3:上游,5'-ATGATCCTCTTGCAACACG-3<sup>[7]</sup>; DDB2:上游,5'-TCACTCCAGCACCTCACAC-3'; BCL2L1:上游,5'-GGACAGCATATCAGAGCTTTGAACA-3<sup>[8]</sup>; GAPDH作为内参:上游,5'-TCACCAGGGCTGCTTTTAAC-3'。所有下游引物均采用RT-qPCR试剂盒中的通用引物。

**1.2.5 MTT实验** 将HLE-B3以5000/孔接种于96孔板,常规培养至80%孔底面积,吸出培养液,加入含 $70\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$ 的新配培养液,分别于12、18、24、36h后,进行MTT实验,方法为:每孔加入5mg/mL MTT溶液,培养4h后,吸出废液,每孔加入150 $\mu\text{L}$  DMSO,置摇床上低速摇匀10min,使结晶物充分溶解。在酶标仪490nm处测量各孔的吸光值。每个浓度设5个复孔。

**1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡** 以同样方法对HLE-B3进行 $H_2O_2$ 刺激。24h后,收集氧化损伤组和对照组细胞,PBS洗涤后重悬。根据凋亡检测试剂盒的使用说明,对细胞分别进行Annexin V-FITC和PI染色,使用流式细胞仪分选细胞,并分析最终结果。

统计学分析:应用SPSS 18.0统计软件进行处理。计量资料以均值 $\pm$ 标准差表示,数据以常氧组与低氧组间相对比值表示,组间比较采用独立样本 $t$ 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 氧化损伤组与对照组的mRNA表达谱差异** 表达谱芯片中显著上调基因筛选标准:氧化损伤组表达量与对照组表达量比值 $>2.0$ 。根据这一标准,表达谱芯片结果显示, $H_2O_2$ 刺激诱导氧化损伤共引起367个mRNA表达上调,部分结果见表1。功能富集分析结果显示,上调的基因富集于310个相关分类中,富集值最高的分类为p53信号通路、细胞凋亡通路、细胞程序性死亡通路等(图1)。

**2.2 表达谱芯片结果验证** 经RT-qPCR对BCL2A1、TP53I3、FAS、ZMAT3、DDB2、BCL2L1表达水平进行检测,结果见表2。这些数据表明,氧化损伤发生后,此6个基因表达水平相比对照组显著提高(图2),实验结果与表达谱芯片结果相吻合。

**2.3 氧化损伤诱导HLEC细胞发生凋亡** MTT实验结果表明,HLE-B3细胞经过 $H_2O_2$ 刺激后,随着时间延长,细胞凋亡逐渐增加,直至氧化刺激后36h,仅7%细胞存活(图3)。Annexin V-FITC/PI染色后流式细胞仪分析显示, $H_2O_2$ 刺激后24h,存活细胞约占25%,而凋亡细胞比例达到57%,其结果与MTT实验大致相符(图4)。

## 3 讨论

大量研究表明,ROS是晶状体混浊及白内障发病的罪魁祸首。正常情况下,ROS可以被细胞内的抗氧化系

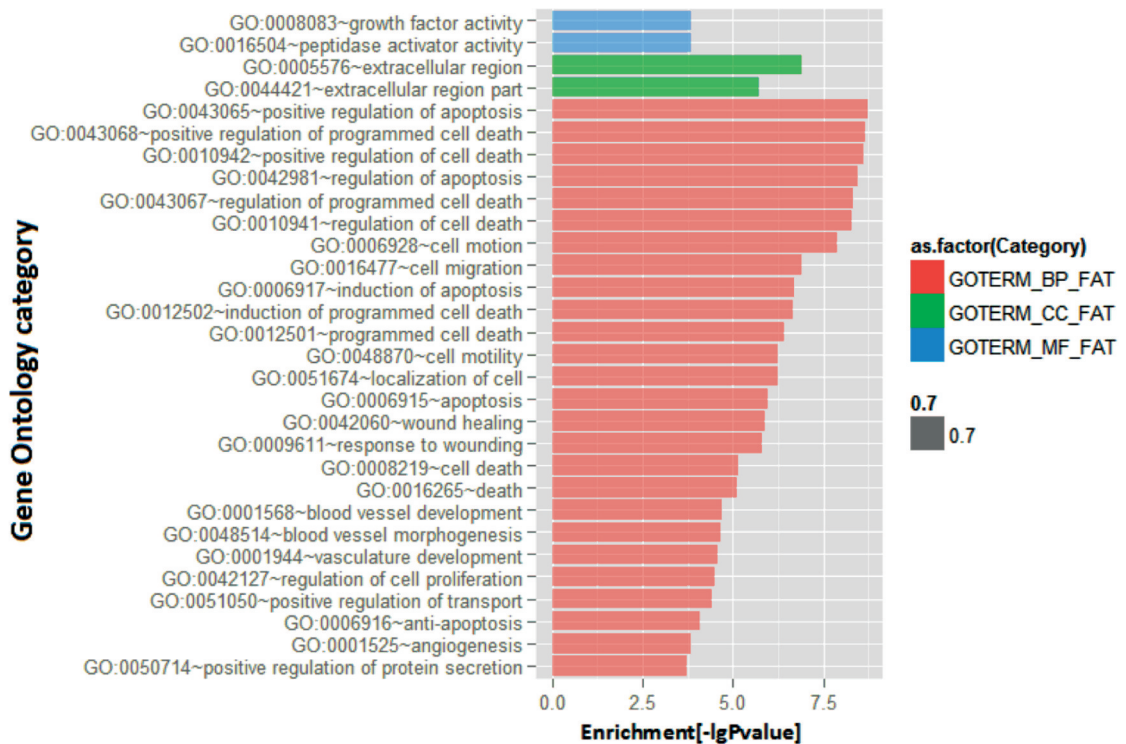


图1 实验组相对对照组上调差异基因的聚类分析(氧化损伤在细胞凋亡、程序性死亡通路、细胞活力等310个分类中有最高差异值)。

表1 氧化损伤后显著上调的基因

基因 ID	英文缩写	英文全称	上调比值
NM_153361	IL8	Interleukin 8	6.80
NM_006516	BCL2A1	B-cell lymphoma 2-related protein A1	5.78
NM_018689	TP53I3	Tumor protein p53 inducible protein 3	5.59
NM_020768	FAS	Fas(TNF receptor superfamily, member 6)	5.08
NM_022470	ZMAT3	Zinc finger, matrin-type 3	3.48
NM_004994	MMP9	Matrix metalloproteinase 9	3.20
NM_000089	LCE1F	Late cornified envelope 1F	3.10
NM_001001669	SAT1	Spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1	3.09
NM_006252	KANK3	KN motif and ankyrin repeat domains 3	3.05
NM_030915	DDB2	Damage-specific DNA binding protein 2	2.95
NM_000302	RRM2B	Ribonucleotide reductase M2 B	2.92
NM_001191	BCL2L1	B-cell lymphoma 2-like 1	2.76
NM_001025366	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase	2.69
NM_000610	CD44	CD44 molecule	2.51

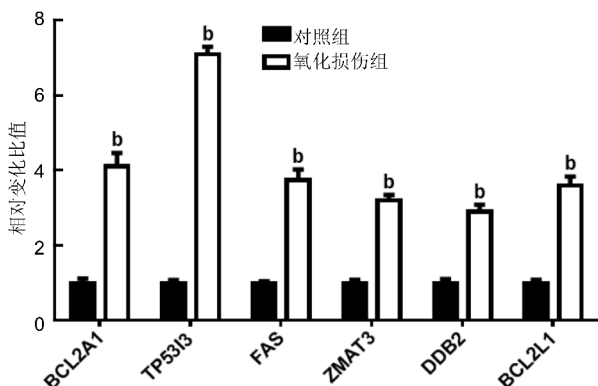


图2 RT-qPCR 验证过氧化氢刺激后所选基因 mRNA 水平提高 <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组。

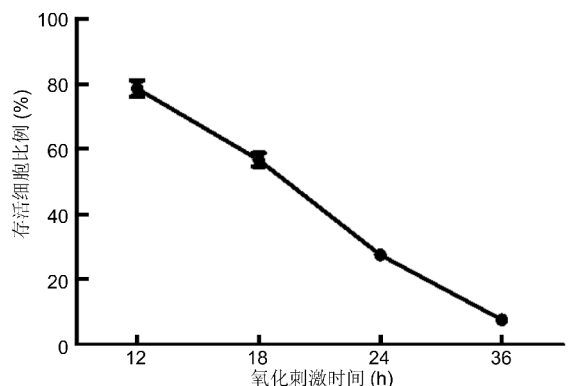


图3 氧化刺激后,HLEC 存活率随着时间推移逐渐下降。

表2 氧化损伤后高表达基因 RT-qPCR 验证结果  $\bar{x} \pm s$ 

基因	对照组	氧化损伤组	<i>t</i>	<i>P</i>
BCL2A1	1±0.12	4.12±0.35	14.61	0.0019
TP53I3	1±0.08	7.1±0.2	49.05	<0.01
FAS	1±0.05	3.75±0.28	16.75	0.0027
ZMAT3	1±0.09	3.2±0.15	21.78	0.0001
DDB2	1±0.11	2.9±0.19	14.99	0.0004
BCL2L1	1±0.09	3.6±0.24	17.57	0.001

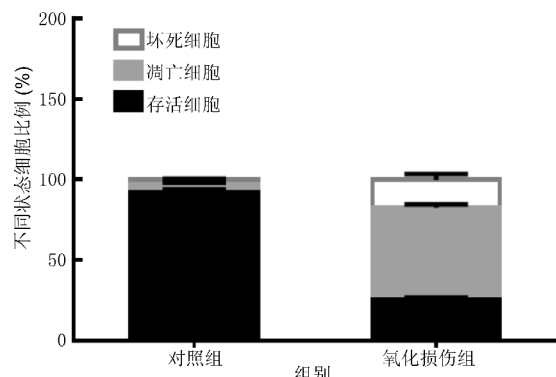


图4 过氧化氢处理24h后 HLEC 的凋亡水平。

统及时清除,但是当 ROS 产生增加,或衰老等因素导致细胞抗氧化能力减弱时,ROS 就会在体内累积,造成氧化损伤<sup>[9]</sup>。

本研究利用表达谱芯片对氧化损伤后 HLEC 基因表达水平的变化进行了检测,结果显示,氧化损伤组 367 个基因的表达水平相比于对照组明显上调。通过 GO 分析,我们发现显著上调的差异基因大部分位于细胞凋亡或程序性死亡相关信号通路中。由此推测,凋亡可能是氧化损伤对 HLEC 的最主要影响。首先,p53 信号通路的激活最为显著。p53 是目前研究相对明确的抑癌基因,它可以通过阻断细胞周期、加速细胞衰老、诱导细胞凋亡等方式抑制肿瘤细胞的生长和转移<sup>[10]</sup>。有研究表明,p53 相关凋亡通路对调控 HLEC 凋亡以及白内障的生成具有重要作用<sup>[11]</sup>。本研究发现,表达水平上调的 p53 下游基因中,以 TP53I3 和 FAS 较为典型。TP53I3 是 DNA 损伤应答 (DDR) 系统中的一员,当 DNA 发生轻度损伤时,可激活 TP53I3,参与受损 DNA 的修复。同时,DDR 系统会活化 p53,一方面可以阻断细胞周期来配合 DNA 损伤的修复,另一方面 p53 可以诱导产生更多活化的 TP53I3,但这一过程会产生少量 ROS。因此当外界刺激造成 DNA 严重损伤时,就会引起 p53 极端过表达并激活更多下游基因与 TP53I3 相互作用,导致 ROS 累积,最终启动细胞凋亡信号通路,如 FAS<sup>[12]</sup>。FAS 是肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族成员之一,也是 p53 诱导细胞凋亡的下游调控基因,当配体 FasL 与受体 FasR 结合后,会通过衔接蛋白活化起始 caspase,再经过 caspase 酶家族的其他成员将信号逐级放大传播,最终启动凋亡程序<sup>[13]</sup>。由此我们推测,本研究中,当 HLEC 经历氧化刺激后,TP53I3 的高表达一方面代表了 DDR 系统的激活,另一方面也意味着 p53 依赖的促凋亡信号通路的启动,而 FAS 的高表达可能直接导致了细胞的程序性死亡。其次,在诸多促凋亡基因高表达的同时,我们注意到,一些抑制凋亡基因的表达水平也有着明显上升,如 ZMAT3、BCL2A1 和 BCL2L1。其中 ZMAT3 也是 p53 的下游基因之一。p53 可以诱导 ZMAT-3 产生一

种锌指蛋白,并作用于 p53 的下游基因如 FAS,起到加速其 mRNA 降解的作用,抑制细胞凋亡<sup>[14]</sup>。除了 ZMAT3、BCL2A1 和 BCL2L1 作为 BCL2 家族抗凋亡分子中的成员,其高表达可能也对抑制 HLEC 凋亡起重要作用。线粒体外膜透化并释放细胞色素 C 是细胞凋亡通路中的重要环节,而这一环节的启动源于 BH3-only 蛋白 (BCL2 homology domain 3-only protein) 与线粒体外膜的 BAX、BAK 受体结合,BCL2 家族的抗凋亡分子可以与 BH3-only 蛋白作用使其失活,或竞争性结合 BAX 和 BAK,从而阻断细胞色素 C 的释放,抑制细胞凋亡<sup>[15]</sup>。由此可见,HLEC 氧化损伤后,促凋亡基因与抗凋亡基因均有上调,而二者拮抗的结果将决定细胞的命运。因此,我们对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化刺激后细胞的凋亡水平进行了检测。MTT 实验表示,细胞经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 12h 时,仍有 85% 细胞存活,随后存活细胞数量逐渐减少,由此推测细胞的损伤修复和抗凋亡系统在氧化刺激初期可修复部分损伤、抵抗凋亡信号通路。随着时间的推移,由于氧化损伤较为严重,细胞的修复功能无法代偿,于是更多细胞发生凋亡。流式细胞仪分析结果也表示,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 后 24h,约 75% 细胞死亡,其中超过 70% 细胞发生了凋亡,坏死细胞仅占不到 30%,说明大多数细胞的死亡源于氧化刺激后凋亡程序的启动。

综上所述,细胞凋亡是 HLEC 发生氧化损伤后的重要表现,这一过程涉及多个凋亡和抗凋亡信号通路的调节。未来我们将对这些通路中的关键分子进行更为详细的研究,以进一步了解细胞凋亡在白内障发病过程中的作用,并为临床上通过抑制 HLEC 细胞凋亡以预防或治疗白内障提供理论依据。

#### 参考文献

- 王嵩,梅林,闫博,等. 生理低氧对人晶状体上皮细胞系基因表达谱的影响. 眼科新进展 2015;35(5):409-412
- Lou MF. Thiol regulation in the lens. *J Ocul Pharmacol Ther* 2000;16(2):137-148
- Martinez G, de Iongh RU. The lens epithelium in ocular health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42(12):1945-1963
- 王嵩. 参与生理氧环境下人晶状体上皮细胞氧化损伤关键基因的筛选与鉴定. 第四军医大学硕士论文 2015
- Lee JH, Kang Y, Khare V, et al. The p53-inducible gene 3 (PIG3) contributes to early cellular response to DNA damage. *Oncogene* 2010;29(10):1431-1450
- Seo JC, Han SW, Yin CS. Evaluation of a Apo-1/Fas promoter polymorphism in Korean stroke patients. *Exp Mol Med* 2002;34(4):294-298
- Luo S, Bai Y, Lan H. Influence of interference of WIG-1 on the multi-drug resistance in small cell lung cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2014;36(10):733-738
- Sun WC, Liang ZD, Pei L. Propofol-induced rno-miR-665 targets BCL2L1 and influences apoptosis in rodent developing hippocampal astrocytes. *Neurotoxicology* 2015;51:87-95
- Lou MF. Redox regulation in the lens. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(5):657-682
- Brooks CL, Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(2):164-171
- Lim SA, Joo CK, Kim MS, et al. Expression of p53 and caspase-8 in lens epithelial cells of diabetic cataract. *J Cataract Refract Surg* 2014;40(7):1102-1108
- Kotsinas A, Aggarwal V, Tan EJ, et al. PIG3: A novel link between oxidative stress and DNA damage response in cancer. *Cancer Lett* 2012;327(1-2):97-102
- Cullen SP, Martin SJ. Fas and TRAIL 'death receptors' as initiators of inflammation: implications for cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2015;39:26-34
- Bersani C, Xu LD, Vilborg A, et al. Wig-1 regulates cell cycle arrest and cell death through the p53 targets FAS and 14-3-3σ. *Oncogene* 2014;33(35):4407-4417
- Vogler M. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death Differ* 2012;19(1):67-74