

氯化锂对人眼 Tenon 囊成纤维细胞 TGF- β 及 CTGF 的影响

卢素素¹, 刘姗姗², 范晓军², 孙晓祥¹, 卞江华¹, 王继兵²

基金项目:潍坊市科学技术发展计划项目 (No. 2015WS017)
作者单位:¹(261000) 中国山东省潍坊市, 潍坊医学院临床学院;²(261041) 中国山东省潍坊市, 潍坊眼科医院
作者简介:卢素素, 毕业于潍坊医学院, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 青光眼防治。
通讯作者:王继兵, 毕业于华中科技大学同济医学院, 博士研究生, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 青光眼防治。
wangjb918@163.com
收稿日期: 2017-05-02 修回日期: 2017-08-03

Effects of lithium chloride on transforming growth factor beta and connective tissue growth factor in cultured human Tenon's capsule fibroblasts

Su-Su Lu¹, Shan-Shan Liu², Xiao-Jun Fan²,
Xiao-Xiang Sun¹, Jiang-Hua Bian¹, Ji-Bing Wang²

Foundation item: Science & Technology Development Project of Weifang City, China (No. 2015WS017)

¹Clinical College of Weifang Medical University, Weifang 261000, Shandong Province, China; ²Weifang Eye Hospital, Weifang 261041, Shandong Province, China

Correspondence to: Ji-Bing Wang. Weifang Eye Hospital, Weifang 261041, Shandong Province, China. wangjb918@163.com

Received: 2017-05-02 Accepted: 2017-08-03

Abstract

• **AIM:** To research the effects of lithium chloride on transforming growth factor beta (TGF- β) and connective tissue growth factor (CTGF) in cultured human Tenon capsule fibroblasts (HTFs) and explore its mechanism.

• **METHODS:** HTFs were cultured and identified by vimentin staining with immunofluorescence and the morphological characteristics. The experimental group was processed 48h with LiCl in concentration of 80mmol/L, the control group without LiCl. The mRNA expression of TGF- β and CTGF in two groups were analyzed with real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (real time-qPCR) and the protein expression was detected with Western blot.

• **RESULTS:** The cultured HTFs expressed TGF- β and CTGF. The mRNA expression of TGF- β and CTGF

significantly decreased compared with the control group ($t=20.042, 14.995, P<0.05$). the protein expression of TGF- β and CTGF also decreased significantly compared with the control group ($t=46.058, 12.452, P<0.05$)

• **CONCLUSION:** The cultured HTFs can express TGF- β and CTGF in mRNA and proteins' level. LiCl can reduce the expression of TGF- β and CTGF both in gene and proteins' level. LiCl has the potential to modulate wound healing for glaucoma filtration surgery.

• **KEYWORDS:** transforming growth factor beta; connective tissue growth factor; Tenon's capsule; fibroblasts; lithium chloride

Citation: Lu SS, Liu SS, Fan XJ, *et al.* Effects of lithium chloride on transforming growth factor beta and connective tissue growth factor in cultured human Tenon's capsule fibroblasts. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(9):1639-1642

摘要

目的: 研究氯化锂 (lithium chloride, LiCl) 对体外培养的人眼 Tenon 囊成纤维细胞 (human Tenon's capsule fibroblasts, HTFs) 转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 及结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 表达的影响并探讨其作用机制。

方法: 体外培养 HTFs 并通过 vimentin 免疫荧光染色技术及细胞形态特征观察鉴定细胞; 将 HTFs 分为实验组 (80mmol/L LiCl 处理 48h) 和对照组 (未用药)。用实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, Real time-qPCR) 检测两组细胞内 TGF- β 及 CTGF 基因的表达, Western blot 检测两组细胞内 TGF- β 及 CTGF 蛋白的表达。

结果: 体外培养的 HTFs 能够表达 TGF- β 及 CTGF。与对照组比较, 实验组中 TGF- β 、CTGF 基因表达下降, 差异均具有统计学意义 ($t=20.042, 14.995, P<0.05$); 与对照组比较, 实验组中 TGF- β 、CTGF 蛋白表达下降, 差异均具有统计学意义 ($t=46.058, 12.452, P<0.05$)。

结论: 体外培养的 HTFs 在基因和蛋白水平表达 TGF- β 及 CTGF, LiCl 能够抑制该过程, 其可能通过该机制抑制 HTFs 增殖, 此研究为 LiCl 用于青光眼滤过术后瘢痕化调控提供了实验依据。

关键词: 转化生长因子 β ; 结缔组织生长因子; Tenon 囊; 成纤维细胞; 氯化锂

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.9.08

引用:卢素素,刘姗姗,范晓军,等.氯化锂对人眼 Tenon 囊成纤维细胞 TGF- β 及 CTGF 的影响.国际眼科杂志 2017;17(9):1639-1642

0 引言

人眼 Tenon 囊成纤维细胞 (human Tenon's capsule fibroblasts, HTFs) 过度增殖导致瘢痕化是青光眼滤过手术失败的主要原因,因此对 HTFs 增殖的适度调控可提高青光眼滤过术成功率并减少术后并发症。缝隙连接细胞间通讯 (gap junctional intercellular communication, GJIC) 在创伤愈合过程中具有重要作用^[1]。研究表明,体外培养的 HTFs 具有较强的 GJIC 功能^[2],而作为 GJIC 上调剂的氯化锂 (lithium chloride, LiCl) 能够抑制 HTFs 的增殖^[3-4]。此外,还有研究表明在体外培养的 HTFs 能够表达转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 及结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF),而两者都是创伤愈合的重要介质,是术后瘢痕化的重要参与因子^[5-6]。目前尚未见国内外关于 LiCl 上调 GJIC 功能,抑制 HTFs 细胞增殖,影响细胞自身 TGF- β 和其下游效应介质 CTGF 表达以及彼此之间关系的报道。本研究通过观察 GJIC 上调剂 LiCl 作用于体外培养的 HTFs 后对 TGF- β 及 CTGF 表达的影响,探讨其作用机制,为 LiCl 应用于青光眼滤过术后瘢痕化调控提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 主要试剂:高糖型 DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司);胎牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司);LiCl (美国 Sigma 公司);鼠抗人波形蛋白 (vimentin) 单克隆抗体、FITC 标记的兔抗鼠 IgG 二抗 (北京中杉公司);TGF- β 抗体 (美国 Proteintech 公司);CTGF、内参 β -actin 抗体 (上海 Santa Cruz 公司)。主要设备:CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Forma 公司);TH4-200 型光学倒置显微镜 (日本 Olympus 公司);Muhiskan Ascent 酶标仪 (美国 Thermo 公司);BiospectrumAC 凝胶成像分析系统 (美国 UVP 公司);Real time-qPCR 仪 (澳大利亚 Corbett 公司);Bio-Rad Mycycler PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及鉴定 将斜视矫正手术中所取的人眼 Tenon 囊组织剪成 1.5mm \times 1.5mm \times 1.5mm 大小组织块,贴于培养皿中,周围滴少许 DMEM 培养基 (含 15% 胎牛血清、100U/mL 青霉素、100U/mL 链霉素),将其放入 37 $^{\circ}$ C、50mL/L CO₂ 培养箱中培养 4h 左右后,待组织块贴壁牢固,向培养皿中加入少量培养液,使组织块浸入其中,继续培养,待细胞生长到 80% 左右时,用 2.5g/L 胰蛋白酶 1:1 传代。通过在倒置显微镜下观察细胞形态特征及 vimentin 免疫荧光染色鉴定细胞。

1.2.2 实验分组 将处于对数生长期 3 代的成纤维细胞接种于 6 孔板中,待细胞密度达 90% 时,参照本课题前期实验结果^[3],采用浓度为 80mmol/L 的 LiCl 处理细胞 48h

表 1 引物序列

基因名称	基因序列
TGF- β 1	F:5'AGCCCTGGACACCAACTATT3' R:5'TCCTTGC GGAAAGTCAATGT3'
CTGF-1	F:5'ACACTGTTCAGGAATCGGAA3' R:5'CACACACACACACACACACAA3'
GAPDH	F:5'CCATGTTTGTGATGGTGTGAACCA3' R:5'ACCAGTGGATGCAGGATGATGTTTC3'

作为实验组,只加培养基溶剂作为对照组。

1.2.3 Real time-qPCR 法检测 TGF- β 和 CTGF 基因表达 按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA,溶于 DEPC 水中,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测两组 TGF- β 、CTGF 基因表达量,内参管家基因 GAPDH。实验中阴性对照为超纯水 (无 RNA 酶,PCR 级)。按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各组的扩增效率。基因引物由宝生物工程 (大连) 有限公司设计合成,引物序列见表 1。

1.2.4 Western blot 法检测 TGF- β 和 CTGF 蛋白表达

按照试剂使用说明书提取细胞总蛋白。配制 12% 分离胶和 5% 浓缩胶。加入蛋白样品和上样缓冲液的混合溶液。电泳 3.5h,200mA 恒流转膜 1.5h,5% BSA 封闭 1h,一抗 (1:1000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,10min/次。二抗 (1:1500) 孵育 1h, TBST 洗涤 3 次,10min/次。配置 ECL 发光剂 (A、B 液等体积混匀),固定膜,暗室取胶片,曝光,显影、定影后流水冲洗,风干。Gel-Pro analyzer 对目的条带进行扫描和密度分析。

统计学分析:采用 SPSS 22.0 进行统计分析。实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。两组间比较采用独立样本 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HTFs 鉴定 原代细胞培养 7~10d,组织块周边可见少量细胞萌出,逐渐由细胞晕成长为细胞集落,多为突起的纺锤形或星形扁平状结构,细胞核呈规则的卵圆形 (图 1A),17d 细胞融合,细胞呈长梭形,呈典型极性排列 (图 1B)。体外培养的 HTFs 经 vimentin 免疫荧光检测,呈均匀的绿色荧光,胞核区为无荧光暗区,细胞呈边界清晰的狭长梭形 (图 1C)。根据取材部位、细胞形态特征及 vimentin 免疫荧光鉴定,确定培养的细胞为 HTFs。

2.2 LiCl 对 TGF- β 和 CTGF 基因表达的影响 LiCl (80mmol/L) 溶液作用于 HTFs 48h 后进行 Real time-qPCR 检测,对照组 TGF- β 与 CTGF 基因相对表达量为 1,实验组 TGF- β 基因相对表达量为 0.2630 \pm 0.0061,CTGF 基因相对表达量为 0.0704 \pm 0.0063,与对照组比较差异均具有统计学意义 ($t=20.042, 14.995, P<0.05$)。

2.3 LiCl 对 TGF- β 和 CTGF 蛋白表达的影响 对照组 TGF- β 和 CTGF 蛋白表达量分别为 0.712 \pm 0.003 和 0.418 \pm 0.003,实验组 TGF- β 和 CTGF 蛋白表达量分别为 0.400 \pm 0.005 和 0.301 \pm 0.008,较对照组均明显降低,差异均具有统计学意义 ($t=46.058, 12.452, P<0.05$,图 2)。

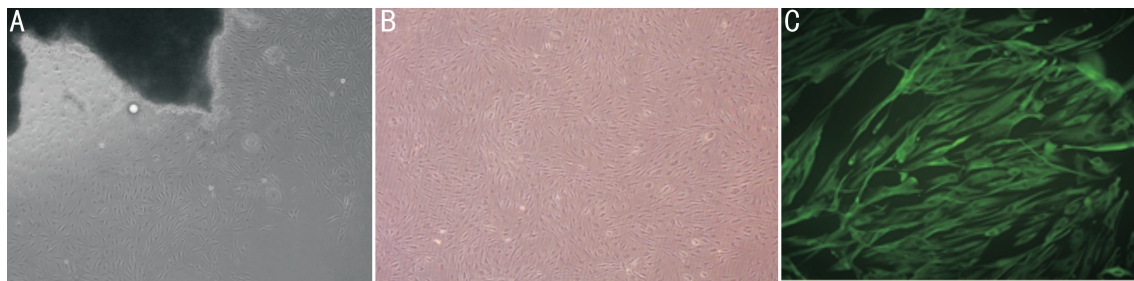


图1 HTFs 鉴定 A:HTFs 原代培养7~10d 组织块周边可见少量细胞萌出($\times 100$);B:HTFs 原代细胞传代后其细胞核呈规则的卵圆形($\times 100$);C:免疫荧光示成纤维细胞胞浆呈均匀的绿色荧光,胞核区为无荧光暗区($\times 400$)。

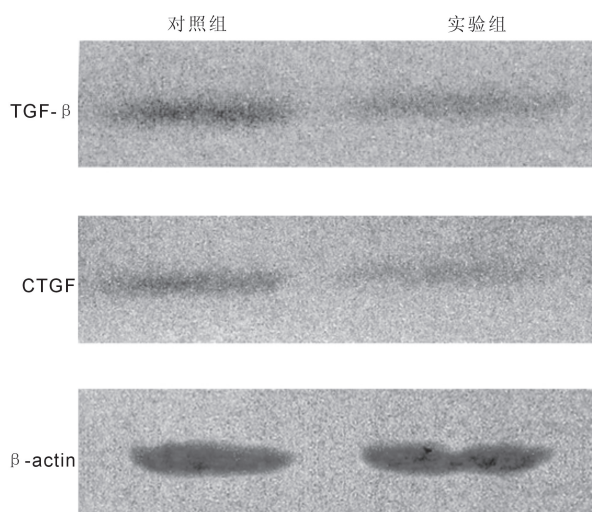


图2 LiCl 抑制 HTFs 细胞内 TGF- β 和 CTGF 蛋白的表达 实验组:80mmol/L LiCl 处理 48h;对照组:未用药。

3 讨论

青光眼是一种以特征性视神经萎缩和视野缺损为共同特征的不可逆性致盲眼病,据预测截止到 2020 年全球范围内可能会有超过 1 100 万人因青光眼双目失明^[7]。目前青光眼滤过术是降低眼压、控制病情进展的主要手段,而术后手术区的过度瘢痕化是该手术失败的最主要原因。目前临床上应用抗代谢药物(如 MMC、5-FU 等)抑制瘢痕形成,但由此产生的毒副作用使临床应用受到限制^[8-9]。寻求毒副作用小、靶向性强、作用强度及时间可控的生物学制剂是眼科界面临的巨大挑战。青光眼滤过术的伤口愈合过程包括组织修复、细胞因子释放、成纤维细胞增殖移行、胶原物质产生与积聚、纤维瘢痕组织形成。因此,控制细胞因子释放,进而控制细胞纤维化,成为滤过术后调控瘢痕化的重要靶点。

TGF- β 是一种强效的促进成纤维细胞增殖和胶原合成的诱发因子,能够促进成纤维细胞向肌成纤维细胞转化^[10]。研究表明,TGF- β 可能通过增加连接蛋白 Cx-43 在细胞质中的表达,提高磷酸化水平,进而显著下调大鼠肝星形细胞间的 GJIC 功能^[11-12]。CTGF 是继 TGF- β 之后发现的又一重要的促纤维化因子,被认为是 TGF- β 的下游作用元件及纤维化进程的启动因子^[13]。实验证明,CTGF 可以直接诱导 HTFs 活化、增殖并且分泌胞外基质,而减少 CTGF 表达能诱使 HTFs 周期停滞^[14]。因此,CTGF 可能是一个相对于 TGF- β 更安全、高效地调控滤过术后手术区瘢痕化的因子^[15]。

目前 LiCl 抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡的机制尚未完全阐明。Moyer 等^[16]发现 LiCl 可以上调 GJIC,进而促进大鼠肉芽组织成熟,加速瘢痕化的形成。本实验室前期研究结果显示,体外培养的 HTFs 具有丰富的 GJIC,并发现 LiCl 能够增强 Cx-43 mRNA 及其蛋白表达,上调 GJIC 抑制 HTFs 增殖,并将细胞周期阻滞于 G₂/M 期,其中 80mmol/L LiCl 对成纤维细胞增殖的抑制作用最为显著^[2]。本研究参照以往研究的显效浓度采用 80mmol/L LiCl 处理 HTFs 48h,结果显示细胞内 TGF- β 及 CTGF 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低,LiCl 可能通过这一过程显著抑制了 HTFs 的增殖。另外,有研究表明 LiCl 可通过抑制外源性 TGF- β 诱导的 α -SMA 的表达抑制 HTFs 向肌成纤维细胞的转化^[4],而 LiCl 是否能够抑制 HTFs 细胞内 α -SMA 的表达仍有待进一步研究。活体的整个愈合过程是一个连续动态的进程,各种愈合因素的交互作用在不同时间窗中处于不断变化中,因此愈合过程更加复杂。目前,关于 LiCl 在青光眼滤过手术后对伤口愈合的影响以及有关作用机制仍在实验研究阶段,还有待于进一步探讨。

参考文献

- Ehrlich HP. A Snapshot of Direct Cell-Cell Communications in Wound Healing and Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013;2(4):113-121
- 王继兵,黄旭东,邹会会,等. 人眼 Tenon 囊成纤维细胞间隙连接细胞间通讯的检测. *国际眼科杂志* 2011;11(10):1707-1709
- 邹会会,王继兵,黄旭东,等. 氯化锂对人眼 Tenon 囊成纤维细胞增殖的影响. *国际眼科杂志* 2012;12(7):1237-1241
- Liu S, Wang J, Zou H, et al. Effect of Apigenin on Gap Junctional Intercellular Communication in Human Tenon's Capsule Fibroblasts. *Eye Science* 2013;28(2):62-67
- Chung EJ, Sohn YH, Kwon SH, et al. Lithium chloride inhibits TGF- β 1-induced myofibroblast transdifferentiation via PI3K/Akt pathway in cultured fibroblasts from Tenon's capsule of the human eye. *Biotechnol Lett* 2014;36(6):1217-1224
- Zhang JY, Gao P, Ye W, et al. Functional characteristics of connective tissue growth factor on human Tenon's capsule fibroblast. *Curr Eye Res* 2014;39(1):53-61
- Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 2006;90(3):262-267
- Budenz DL, Hoffman K, Zacchei A. Glaucoma filtering bleb dysaesthesia. *Am J Ophthalmol* 2001;131(5):626-630

9 WuDurm D. Intracameral urokinase for dissolution of fibrin or blood clots after glaucoma surgery. *Am J Ophthalmol* 1997;124(5):693-695
 10 Shepard AR, Millar JC, Pang IH, et al. Adenoviral gene transfer of active human transforming growth factor- β 2 elevates intraocular pressure and reduces outflow facility in rodent eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(4):2067-2076
 11 刘镗利, 张志红, 王宗仁, 等. TGF- β 1 对大鼠睾丸 Leydig 细胞间连接蛋白 43 介导缝隙连接通讯功能的影响. *中华男科杂志* 2012;18(2):99-104
 12 Lim MC, Maubach G, Zhuo L. TGF- β 1 down-regulates connexin 43 expression and gap junction intercellular communication in rat hepatic stellate cells. *Eur J Cell Biol* 2009;88(12):719-730

13 Blom IE, Goldschmeding R, Leak A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol* 2002;21(6):473-82
 14 李静, 谢安明. 结缔组织生长因子对人 Tenon 囊成纤维细胞中 E-cadherin 蛋白表达的促进作用. *中华实验眼科杂志* 2015;33(8):695-698
 15 Zhang JY, Gao P, Ye W, et al. Functional Characteristics of connective tissue growth factor on Human Tenon's capsule fibroblasts. *Informa Healthcare* 2014;39(1):53-61
 16 Moyer KE, Davis A, Sagggers GC, et al. Wound healing; the role of gap junctional communication in rat granulation tissue maturation. *Exp Mol Pathol* 2002;72(1):10-16

中国科技核心期刊眼科学类期刊 2015 年主要指标及排名

刊名	总被引频次		影响因子		综合评价总分	
	数值	排名	数值	排名	数值	排名
中华眼科杂志	核心版 2037(扩展版 3690)	2(2)	核心版 1.075(扩展版 1.408)	1(1)	75.52	1
国际眼科杂志	核心版 2292(扩展版 4693)	1(1)	核心版 0.505(扩展版 0.988)	7(2)	47.46	2
眼科新进展	核心版 1184(扩展版 2151)	4(4)	核心版 0.573(扩展版 0.961)	4(3)	42.69	3
中华眼底病杂志	核心版 809(扩展版 1348)	6(6)	核心版 0.729(扩展版 0.928)	2(4)	42.30	4
中国实用眼科杂志	核心版 1527(扩展版 3336)	3(3)	核心版 0.548(扩展版 0.791)	6(6)	40.04	5
中华实验眼科杂志	核心版 928(扩展版 1508)	5(5)	核心版 0.412(扩展版 0.615)	9(8)	39.05	6
临床眼科杂志	核心版 485(扩展版 1179)	9(7)	核心版 0.467(扩展版 0.791)	8(6)	32.23	7
中华眼视光学与视觉科学杂志	核心版 613(扩展版 927)	7(8)	核心版 0.549(扩展版 0.783)	5(7)	26.20	8
眼科	核心版 497(扩展版 905)	8(9)	核心版 0.386(扩展版 0.483)	10(9)	17.19	9
中国斜视与小儿眼科杂志	核心版 295(扩展版 631)	10(10)	核心版 0.579(扩展版 0.891)	3(5)	16.88	10
10 种期刊平均值	1067		0.582			

国际眼科杂志社摘编自 2016 版《中国科技期刊引证报告》(核心版及扩展版)