

CTGF 反义寡核苷酸对人晶状体上皮细胞转分化的探讨

徐国兴, 庄华, 徐巍, 郭健, 王婷婷, 谢茂松, 白月

基金项目: 中国国家自然科学基金资助项目 (No. 81070715); 中国福建省科技平台课题基金资助项目 (No. 2008Y0040)

作者单位: (350005) 中国福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院眼科中心 福建省眼科研究所

作者简介: 徐国兴, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 玻璃体视网膜病。

通讯作者: 徐国兴. zjfmuxgx@pub5.fz.fj.cn

收稿日期: 2010-12-09 修回日期: 2011-01-08

Influence of CTGF antisense oligonucleotide on human lens epithelial cells' trans-differentiation

Guo-Xing Xu, Hua Zhuang, Wei Xu, Jian Guo, Ting-Ting Wang, Mao-Song Xie, Yue Bai

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81070715); Key Science Foundation of Fujian Province, China (No. 2008Y0040)

Ophthalmic Institute of Fujian Province, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Correspondence to: Guo-Xing Xu. Ophthalmic Institute of Fujian Province, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. zjfmuxgx@pub5.fz.fj.cn
Received: 2010-12-09 Accepted: 2011-01-08

Abstract

• **AIM:** To investigate the influence of CTGF-ASON on expression of CTGF and α -SMA induced by transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in normal human lens epithelial cells (HLECs).

• **METHODS:** CTGF-ASON was transduced into normal HLECs by cotransfection with lipofectamine 2000 or direct ways. The transfection ratio of FITC-labeled ASON was measured by fluoroscope and the proliferation of HLECs was measured by CCK-8 assay. The expression of CTGF and α -SMA was detected by RT-PCR.

• **RESULTS:** Direct ASON transfection was slow, and no obvious cytotoxicity was observed within 72 hours. The proliferation of HLECs was not inhibited by direct ASON transfection until 72 hours. ASON treated for 48 hours, Culture in TGF- β_1 caused profound increase of CTGF and α -SMA that can be inhibited by direct ASON transfection, but not missense oligonucleotides transfection.

• **CONCLUSION:** CTGF-ASON can abrogate the influence of TGF- β_1 on increase of CTGF and α -SMA mRNA in HLECs. CTGF may be a potential therapeutic target to posterior capsular opacification.

• **KEYWORDS:** connective tissue growth factor; lens epithelial cell; antisense oligonucleotide

Xu GX, Zhuang H, Xu W, *et al.* Influence of CTGF antisense oligonucleotide on human lens epithelial cells' transdifferentiation. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(2):216-219

摘要

目的: 探讨结缔组织生长因子反义寡核苷酸对体外培养人晶状体上皮细胞 (HLECs) 合成 CTGF 与 α -SMA 表达的影响。

方法: 测定 CTGF 反义寡核苷酸对体外培养 HLECs 的转染率; 应用 CTGF 反义寡核苷酸直接转染第 3 代 HLECs 进行细胞生长曲线的测定; 采用逆转录多聚酶链式反应 (RT-PCR) 检测细胞 CTGF 和 α -SMA mRNA 水平。

结果: 直接导入法反义寡核苷酸进入较慢, 但 72h 未出现细胞毒性。CTGF-ASON 直接导入法培养细胞 72h 后可见对细胞增殖抑制作用。直接导入法处理 48h 后, TGF- β_1 刺激能显著增加 CTGF 以及 α -SMA mRNA 的表达, 但却可被 CTGF-ASON 直接导入法所抑制, 而错义寡核苷酸却没有这种作用。

结论: CTGF 反义寡核苷酸直接转染 HLECs 能抑制 TGF- β_1 诱导的 CTGF 与 α -SMA 表达上调, 提示阻断 CTGF 可能是防治后发性白内障的有效手段。

关键词: 结缔组织生长因子; 晶状体上皮细胞; 反义寡核苷酸

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.02.06

徐国兴, 庄华, 徐巍, 等. CTGF 反义寡核苷酸对人晶状体上皮细胞转分化的探讨. 国际眼科杂志 2011;11(2):216-219

0 引言

白内障术后残留的人晶状体上皮细胞 (human lens epithelial cells, HLECs) 在囊膜上转分化、增生、移行, 产生胶原, 是发生后发性白内障的主要原因。反义寡核苷酸技术是近年来出现的一种根据碱基互补原理, 通过抑制 mRNA 的转运、成熟和翻译, 诱导特异性核酸酶产生等机制对特定的靶基因表达产生阻滞, 从而抑制或封闭异常或高表达的基因, 使其丧失活性, 达到基因调控的目的^[1]。本研究通过体外细胞实验, CTGF 反义寡核苷酸干预细胞生长, 探讨 CTGF 在白内障发生中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 逆转录试剂盒、Trizol Reagent, Taq PCR MasterMIX (美国 Fermentas 公司), PCR 引物 (上海英骏生物技术有限公司), 人重组转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) (美国 Pepro Tech INC 公司), 阳离子脂质体转染剂 Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司), CTGF 反义寡核苷酸和错义寡核苷酸 (上海英骏生物技术有限公司), CCK-8 试剂盒 (碧云天生物技术有限公司)。PCR 引物根据 Pubmed 上各因子 mRNA 全长序列由 Invitrogen Biotechnology 公司设计、合成 (上海英骏生物技术有限公司), 序列为: (1)

CTGF: 上游 5'-AAATCTCCAAGCCTATCAAG-3'; 下游 5'-TTCATGCCATGTCTCCGTACA-3'; 扩增 cDNA 片段长度为 270bp。(2) α -SMA: 上游 5'-AGGTAACGAGTCAGAGCTTTGGC-3'; 下游 5'-CTCTCTGTCCACCTTCCAGCAG-3'; 扩增 cDNA 片段长度为 199bp。(3) β -actin: 上游 5'-GCATCCTGACCTGAAGTACC-3'; 下游 5'-GCTCATAGCTCTTCTC-CAGGG-3'; 扩增 cDNA 片段长度为 523bp。CTGF 反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASON) 和错义寡核苷酸 (scrambled oligonucleotide, SC) 根据人 CTGFmRNA 的全长序列和文献由上海英骏生物技术有限公司合成, 全部硫代磷酸化修饰, 寡核苷酸还进行 5'-异硫氰酸荧光素 (5'-FITC) 标记, 序列为: (1) CTGF 反义寡核苷酸 (ASON): 5'-TACTGGCGCGGTCAT-3' 全部硫代磷酸化修饰, 部分 5'-FITC 标记; (2) CTGF 错义寡核苷酸 (SC): 5'-GGTCTAGCTTGGCGAC-3' 全部硫代磷酸化修饰。

1.2 方法

1.2.1 反义寡核苷酸的导入 将 HLECs 按 1×10^5 /mL 的密度接种于 6 孔板, 用含 50mL/L FCS 的 DMEM/High Glucose 培养, 待细胞亚融合时, 改为含 20mL/L BSA 的培养液培养 24h。(1) 脂质体包裹法: 将 4 μ g 的 ASON 与 10 μ L 的脂质体混合, 室温放置 15min 后加入到培养液中, 作用 3, 6h (按 Lipofectamine 2000 使用说明书进行操作)。(2) 直接导入法: 将 4 μ g ASON 直接加入培养液中混匀, 作用 24, 48, 72h。上述两法的细胞液避光。用无血清 DMEM/High Glucose 洗细胞数次, 荧光显微镜观察 FITC 绿色荧光, 随机选择 20 个视野计算阳性细胞数, 以同一视野下荧光显微镜与光镜观察到的细胞数之比计算导入率。(3) ASON 以 30mg/L 的浓度直接导入 HLECs 中, 测定 ASON 的导入率。

1.2.2 CCK-8 比色实验检测 ASON 直接导入法对体外培养的 HLECs 增殖活力的影响 以每孔 5000 个细胞的密度接种于 96 孔板, 细胞贴壁后实验组加入含浓度为 30mg/L 无 5'-FITC 标记 ASON 的、含 80mL/L FCS 的 DMEM/High Glucose 培养基, 分别培养 24, 48, 72h 后, 吸去培养液, 每孔加 100 μ L 80mL/L FCS 的 DMEM/High Glucose 培养基以及 10 μ L CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱孵育 2h, 酶标仪测 450nm 吸光度 (A)。

1.2.3 RT-PCR 检测 CTGF-ASON 对体外培养的 HLECs CTGF 及 α -SMA 基因表达的影响 将体外培养的第 3 代 HLECs 按 2×10^5 /mL 的密度接种于 25cm² 培养瓶, 用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM/High Glucose 培养基培养, 待细胞 80% 融合时, 改为无血清 DMEM/High Glucose 培养基培养 24h, 使细胞达到同步。

1.2.3.1 分组 (1) 正常对照组 (C 组): 用 DMEM/High Glucose 培养基培养, 作用 48h; (2) TGF- β_1 组 (T 组): 用含 TGF- β_1 10 μ g/L DMEM/High Glucose 培养基培养, 作用 48h; (3) 反义寡核苷酸组 (T + AS 组): 用含 TGF- β_1 10 μ g/L 和 30mg/L ASON 的 DMEM/High Glucose 培养基培养, 作用 48h; (4) 错义寡核苷酸组 (T + SC 组): 用含 TGF- β_1 10 μ g/L 和 30mg/L SC 的 DMEM/High Glucose 培养基培养, 作用 48h。

1.2.3.2 RT-PCR PBS 洗涤各组细胞, 在培养瓶中加入 Trizol RNA 提取液, 按说明书步骤提取总 RNA, 按 RT-PCR 试剂盒 (两步法) 操作, 总反应体积为 20 μ L。CTGF 反应参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 扩增 94 $^{\circ}$ C 30s, 53 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 30 个循环, 最终延伸 72 $^{\circ}$ C 7min。 α -SMA 反应参数:

表 1 ASON 直接导入法对人晶状体上皮细胞增殖活力的影响

| 组别 | $(\bar{x} \pm s, A)$ | | |
|-----|----------------------|-------------------|-------------------|
| | 24h | 48h | 72h |
| 对照组 | 0.665 \pm 0.209 | 0.992 \pm 0.308 | 2.404 \pm 0.060 |
| 实验组 | 0.469 \pm 0.216 | 1.057 \pm 0.163 | 2.100 \pm 0.136 |

94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 扩增 94 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 30 个循环, 最终延伸 72 $^{\circ}$ C 7min。 β -actin 反应参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 扩增 94 $^{\circ}$ C 30s, 59 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 30 个循环, 最终延伸 72 $^{\circ}$ C 7min。取 PCR 产物, 15g/L 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统成像, 用图像分析处理系统 (美国 Bio-Rad 公司) 进行灰度扫描, 以灰度值代表其表达量。用 β -actin 的量校正, 将二者灰度值的相对量进行分析。

统计学分析: 采用 SPSS 17.0 统计软件, 寡核苷酸导入阳性细胞以百分数 (%) 表示, 组间比较采用卡方检验; 其余结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用 one-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2. 结果

2.1 Lipofectamine-ASON 复合物的导入效率的检测 脂质体导入法 6h 见此时细胞变圆, 贴壁不良, 显示出脂质体的毒性作用。脂质体导入法 3, 6h 导入细胞阳性率分别为 41%, 85%。脂质体导入 6h, 可以显著增加反义寡核苷酸的导入 ($P < 0.05$), 但已对细胞有毒性作用 (图 1)。

2.2 ASON 直接导入法效率的检测 直接导入法 24h 的导入率较低, 为 23%, 表现为多数细胞仅仅细胞膜染色。48 和 72h 组导入率增加, 分别为 63% 和 66%, 后两者之间无显著性差异。直接导入法培养 72h 后, 细胞形态正常, 未见明显毒性作用。30mg/L ASON 48h 转染率达 75% (图 2)。

2.3 CCK-8 比色实验检测 ASON 直接导入法对体外培养的 HLECs 增殖活力的影响 SPSS 17.0 软件统计分析对照组与 ASON 直接导入 24, 48h 组无显著性差异 ($P > 0.05$), 对照组与 ASON 直接导入 72h 组有显著性差异 ($P < 0.05$), 实验组细胞增殖受明显抑制 (表 1, 图 3)。

2.4 RT-PCR 检测 CTGF-ASON 对体外培养的 HLECs CTGF 及 α -SMA mRNA 表达的影响 CTGF 反义寡核苷酸作用 48h, 可以大部分抑制 CTGFmRNA 与 α -SMAmRNA 的表达, 而错义寡核苷酸不能抑制 CTGFmRNA 与 α -SMA mRNA 的表达 (表 2; 图 4, 5)。

3 讨论

后发性白内障又称为后囊膜混浊 (PCO), 是白内障术后最常见的并发症, 亦是白内障术后视力下降的主要原因。白内障术后残留的 HLECs 在囊膜上转分化、增生、移行, 产生胶原, 是发生 PCO 的主要原因。这些转分化的 HLECs 产生大量的细胞外基质 (ECM), ECM 是构成纤维化混浊的重要成分, 导致了纤维化斑块的形成, 最终导致后发性白内障^[2]。在此过程中, 残留的 LECs 表达 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)。 α -SMA 正常表达于平滑肌与心肌, 晶状体中出现过度表达的 α -SMA 为后发性白内障的标志, 因此, 过度表达的 α -SMA 可作为 HLECs 转分化的指标。转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 能促进 LECs 发生纤维化^[3,4]。TGF- β_1 除了致纤维化作用外, 尚有抗增殖、抗炎等重要功能, 长期抑制 TGF- β_1 的活性将对机体产生不利影响。TGF- β_1 下游的效应分子作为治疗的靶点将更具有实用价值。CTGF 作为 TGF- β_1 的下游因

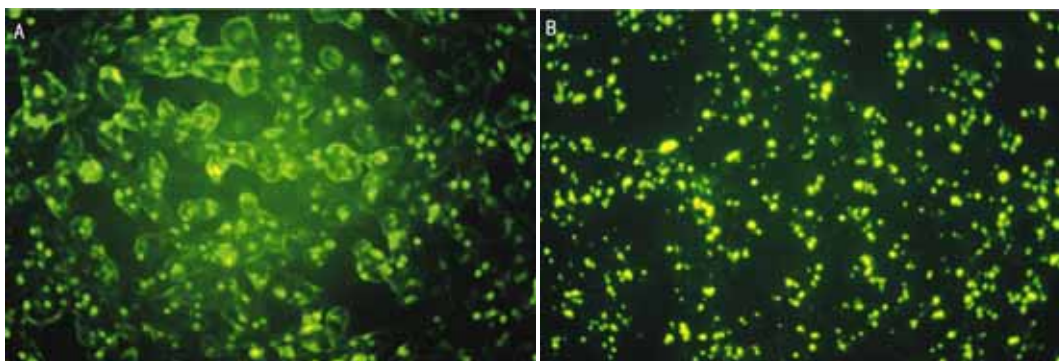


图1 Lipofectamine-ASON 复合物的导入效率(×100) A:导入3h;B:导入6h。

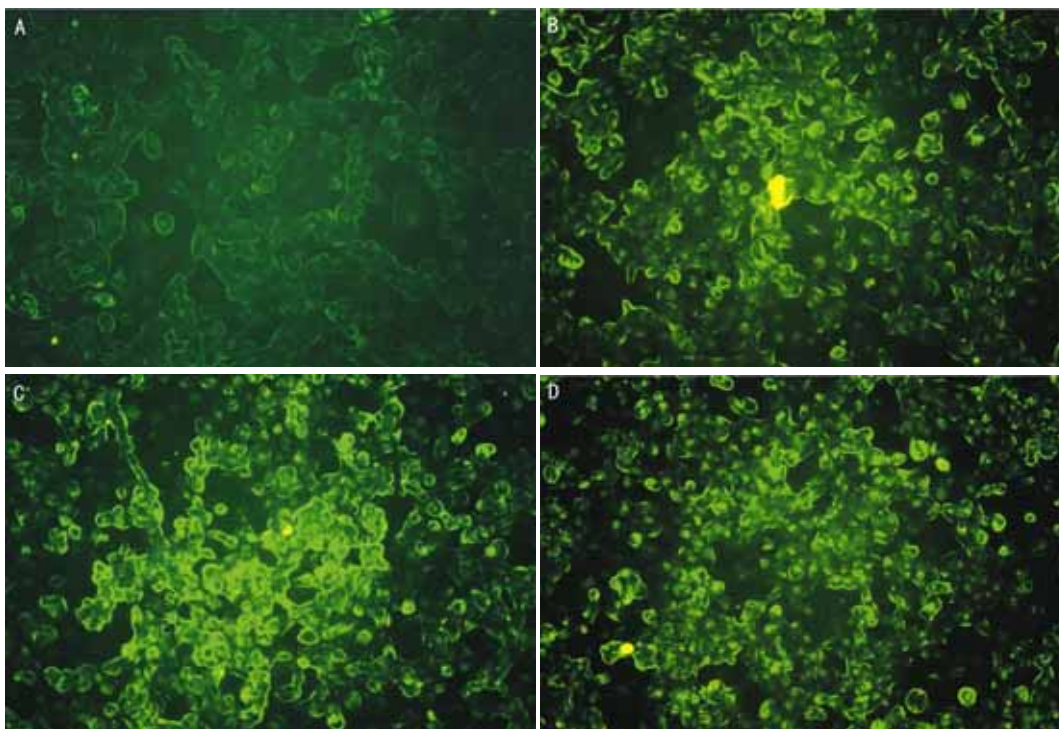


图2 ASON 直接导入法的导入效率(×100) A:导入24h;B:导入48h;C:导入72h;D:30mg/L ASON 直接导入48h。

表2 不同处理组 HLECs CTGF mRNA 和 α -SMA 的表达情况 ($\bar{x} \pm s, \%$)

| 平均灰度值 | C 组 | T + AS 组 | T 组 | T + SC 组 |
|---------------|-----------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| CTGF mRNA | 0.8928 ± 0.0460 | 0.7907 ± 0.0439 ^a | 0.9683 ± 0.0714 ^{a,c} | 0.9461 ± 0.0630 ^{a,c} |
| α -SMA | 0.7574 ± 0.0262 | 0.6710 ± 0.0417 ^a | 0.8457 ± 0.0535 ^{a,c} | 0.8351 ± 0.0477 ^a |

^a $P < 0.05$ vs C 组; ^c $P < 0.05$ vs T + AS 组。

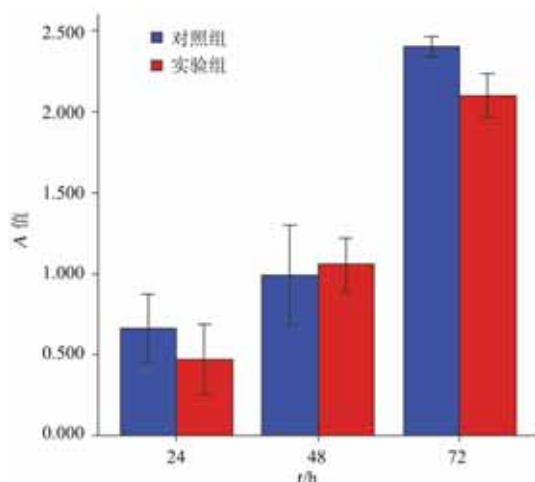


图3 ASON 直接导入法对人晶状体上皮细胞增殖活力的影响。

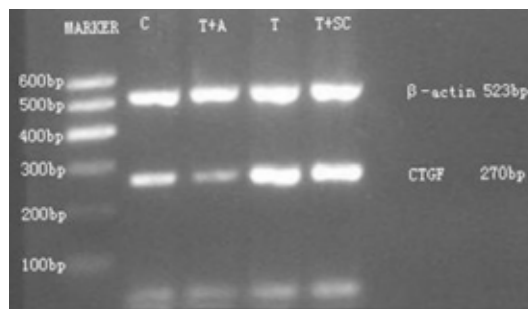


图4 CTGF mRNA 在人晶状体上皮细胞的表达。

子,特异地受 TGF- β_1 诱导表达^[5,6],介导 TGF- β_1 部分的促纤维化效应^[7]。CTGF 诱导 HLECs 分化为肌成纤维细胞,并表达 α -SMA。转分化的 LECs 可分泌大量 ECM,进而导致囊下混浊的发生。PCO 是当前白内障摘除术后影响视力恢复的最主要并发症之一,其发生率一般在术后 5a,成人为 50%,婴幼儿可达 100%^[8]。

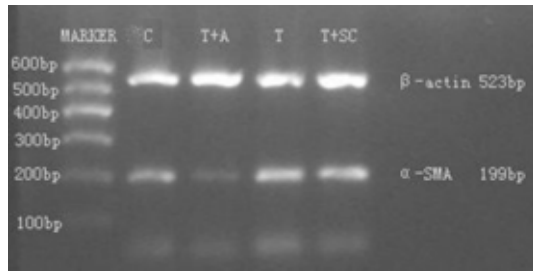


图5 α -SMA mRNA 在人晶状体上皮细胞的表达。

秋水仙碱^[9]、丝裂霉素 C(MMC)^[10]、5-FU^[11]、柔红霉素^[12]等抗代谢药物能明显抑制 LECs 生长。随着反义寡核苷酸进入 PCO 治疗研究领域中,国内学者刘宏伟等^[13]和李长福等^[14]分别进行了 bFGF 和 Bcl-2 的反义寡核苷酸对 LECs 增殖活性的影响研究。Kampmeier 等^[15]利用反转录病毒载体将反义细胞周期蛋白 G₁ 与反义 MAT₁ 分别转染体外培养的人胚胎 LECs,通过特异性下调细胞周期蛋白 G₁ 与 MAT₁ 的表达来抑制细胞的增殖活性,并观察到细胞停滞于 G₁ 期,而且凋亡细胞的数目有显著性增加,提示反义基因治疗防治 PCO 可能是一种新的有效的治疗方法。在 RT-PCR 实验中,TGF- β_1 组中,10 μ g/L TGF- β_1 直接转染 48h 可引起 CTGF mRNA, α -SMA mRNA 表达显著升高,说明 TGF- β_1 可以显著诱导 CTGF 和 α -SMA mRNA 的表达。但是这种诱导作用在反义寡核苷酸组中被 30mg/L CTGF 反义寡核苷酸所阻断,表明反义寡核苷酸可以在 mRNA 水平上部分阻断 TGF- β_1 对 CTGF 与 α -SMA 的诱导作用;在错义寡核苷酸组中,CTGF mRNA, α -SMA mRNA 的表达水平与 TGF- β_1 组无显著性差异。实验结果说明 CTGF 反义寡核苷酸特异地抑制了 TGF- β_1 促 LECs 分化的作用。阻断 CTGF 表达或抑制其活性,可为及早干预和防治前囊膜下白内障和后发性白内障提供新途径。

参考文献

1 Zhang XT, Song TB, Du BL, et al. Caspase-3 antisense oligodeoxynucleotides inhibit apoptosis in gamma-irradiated human leukemia HL-6 cells. *Apoptosis* 2007;12(4):743-751

2 徐国兴. 眼科学基础. 北京:高等教育出版社 2005:1-210
3 Meacock WR, Spalton DJ, Stanford MR. Role of cytokines in the pathogenesis of posterior capsule opacification. *Br J Ophthalmol* 2000;84(3):332-336
4 Guo Haik. Effect of TGF- β_1 on proliferation of rabbit lens epithelial cells and expression of connective tissue growth factor. *Chin Ophthalm Res* 2006;24(5):5-8
5 Abou-Shady M, Friess H, Zimmermann A, et al. Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis. *Liver* 2000;20(4):296-304
6 Homes A, Dargere D, Vidaud M, et al. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* 2001;276(14):10594-10601
7 Qi W, Chen X, Polhill TS, et al. TGF-beta1 induces IL-8 and MCP-1 through a connective tissue growth factor-independent pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290(3):703-709
8 Maltzman BA, Haupt E, Notis C. Relationship between age at time of cataract extraction and time interval before capsulotomy for opacification. *Ophthalmic Surg* 1989;20(5):321-324
9 Legler UFC, Apple DJ, Assia EI, et al. Inhibition of posterior capsule opacification: the effect of colchicine in a sustained drug delivery system. *J Cataract Refract Surg* 1993;19(4):462-470
10 Haus CM, Galand AL. Mitomycin against posterior capsular opacification: an experimental study in rabbits. *Br J Ophthalmol* 1996;80(12):1087-1091
11 Ismail MM, Alio JL, Ruiz Moreno JM. Prevention of secondary cataract by antimetabolic drug: experimental study. *Ophthalmic Res* 1996;28(1):64-69
12 Tetz MR, Ries MW, Lucas C, et al. Inhibition of posterior capsule opacification by an intraocular-lens-bound sustained drug delivery system: an experimental animal study and literature review. *J Cataract Refract Surg* 1996;22(8):1070-1078
13 刘宏伟,彭淑玲,周毅,等. bFGF 反义寡核苷酸抑制大鼠实验性晶状体损伤后晶状体上皮细胞的增殖和迁移. *眼视光学杂志* 2004;4(1):14-17
14 李长福,范芳,葛正龙,等. 反义 bcl-2 寡核苷酸对半乳糖诱导的晶状体上皮细胞的抑制作用. *第四军医大学学报* 2004;25(5):395-397
15 Kampmeier J, Behrens A, Wang Y, et al. Inhibition of rabbit keratocyte and human fetal lens epithelial cell proliferation by retrovirus-mediated transfer of antisense cyclin G1 and antisense MAT1 constructs. *Hum Gene Ther* 2000;11(1):1-8