

# 高糖诱导的人晶状体上皮细胞葡萄糖关键代谢酶的表达

陈文静, 刘平

引用: 陈文静, 刘平. 高糖诱导的人晶状体上皮细胞葡萄糖关键代谢酶的表达. 国际眼科杂志 2019; 19(9): 1462-1465

Received: 2019-01-29 Accepted: 2019-07-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81470618)

作者单位: (150001) 中国黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第一医院眼科医院

作者简介: 陈文静, 在读硕士研究生, 研究方向: 白内障、角膜病基础和临床研究。

通讯作者: 刘平, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 中华医学会眼科专业委员会委员, 中华医学会眼科专业委员会白内障学组委员, 中华医学会眼科专业委员会防盲学组委员, 研究方向: 角膜病、晶状体疾病的基础与临床研究. Pingliu53@126.com

收稿日期: 2019-01-29 修回日期: 2019-07-31

## 摘要

**目的:** 探讨葡萄糖关键代谢酶在高糖诱导的人晶状体上皮 (HLEB3) 细胞中的表达情况。

**方法:** 将体外培养的 HLEB3 细胞分为正常对照组 (采用 DMEM 培养液培养, 含葡萄糖 5mmol/L)、氧化应激组 (采用含 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200μmol/L 的 DMEM 培养液培养)、高糖诱导组 (采用含葡萄糖 30mmol/L 的培养液培养), 培养 24h 后检测细胞凋亡情况和细胞活力及 6 种葡萄糖关键代谢酶 (6-磷酸果糖激酶-1、丙酮酸激酶、己糖激酶、柠檬酸合成酶、α-酮戊二酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶) 的 mRNA 表达情况。

**结果:** 高糖诱导 HLEB3 细胞凋亡, 高糖诱导组 (63.43% ± 3.40%) 细胞活力低于正常对照组 (100.00% ± 0.00%) 和氧化应激组 (91.90% ± 5.11%), 且高糖诱导组细胞 6 种葡萄糖代谢关键酶的 mRNA 表达水平均低于正常对照组和氧化应激组 (均  $P < 0.05$ )。

**结论:** 高糖可以诱导 HLEB3 细胞葡萄糖关键代谢酶的表达水平降低, 诱导细胞凋亡, 影响细胞活性。

**关键词:** 糖尿病性白内障; 葡萄糖关键代谢酶; 氧化应激; 晶状体上皮细胞

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.9.03

## High glucose induced glucose - key metabolic enzyme expression in lens epithelial cells

Wen-Jing Chen, Ping Liu

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 81470618)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

**Correspondence to:** Ping Liu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. Pingliu53@126.com

## Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of glucose key metabolic enzymes in human lens epithelial cells (HLEB3) induced by high glucose.

• **METHODS:** HLEB3 cells cultured *in vitro* were divided into normal control group (DMEM medium containing 5mmol/L of glucose), oxidative stress group (DMEM medium containing 5mmol/L of glucose and 200μmol/L of hydrogen peroxide), high glucose induction group (DMEM medium containing 30mmol/L of glucose). Apoptosis and cells were detected 24h after culture. Activity and expression of six key glucose metabolic enzymes (fructose - 6 - phosphate kinase - 1, pyruvate kinase, hexokinase, citrate synthase, α - ketoglutarate dehydrogenase and 6 - phosphate glucose dehydrogenase) were studied.

• **RESULTS:** Apoptosis of HLEB3 cells was induced by high glucose. The cell viability of high glucose-induced group (63.43% ± 3.40%) was lower than that of normal control group (100.00% ± 0.00%) and oxidative stress group (91.90% ± 5.11%), and the expression levels of six key enzymes of glucose metabolism in high glucose-induced group were lower than that of normal control group and oxidative stress group (all  $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** High glucose can induce the expression of glucose - key metabolizing enzymes in HLEB3 cells to decrease, induce apoptosis and affect cell activity.

• **KEYWORDS:** diabetic cataract; glucose - key metabolizing enzyme; oxidative stress; lens epithelial cell

**Citation:** Chen WJ, Liu P. High glucose induced glucose - key metabolic enzyme expression in lens epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019; 19(9): 1462-1465

## 0 引言

白内障是一种表现为晶状体混浊化的眼病,除老龄化因素外,最常见的危险因素为糖尿病<sup>[1]</sup>。近 30a 全国流行病学调查发现,我国糖尿病患者数量增长了 17 倍,是新的流行病之一<sup>[2]</sup>。糖尿病性白内障 (diabetic cataract, DC) 会降低患者生活质量并影响社会经济发展,已成为重大的公共卫生问题<sup>[3]</sup>。研究表明,白内障发生的基本病理改变是人晶状体上皮 (human lens epithelial, HLE) 细胞的凋亡,高糖可能诱导 HLE 细胞凋亡,而氧化应激损伤是主要原因<sup>[4]</sup>。无氧酵解的代谢通路可代谢晶状体内的大部分葡萄糖,三羧酸循环代谢因需氧而较少发生。DC 的形成与葡萄糖关键代谢酶的改变关系密切,其表达情况和作用机制并未被完全阐明,具有较高的研究价值。

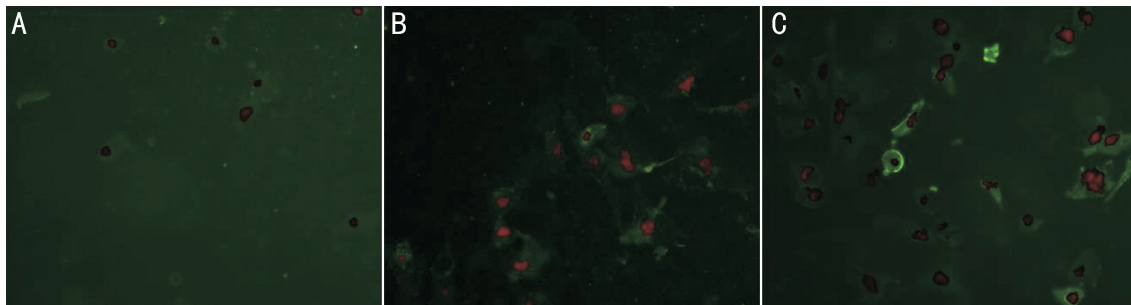


图1 各组细胞凋亡情况( $\times 400$ ) A:正常对照组;B:氧化应激组;C:高糖诱导组。

表1 引物序列

基因名称	上游引物	下游引物
$\beta$ -actin	GTCCACCGCAAATGCTTCTA	TGCTGTCACTTCACCGTTC
PFK-1	CTACAGTCTCCAACAATGTCC	CCACCCATAGTCTCAATGATA
PKM1	CATTCATCGGAAGGCATCTG	CACCGTCCAATCATCATCTTC
HK	TGTGAGGTCCACTCCAGATG	GCCCATTTGTCCTTACTTTTC
CS	AGGTCTGGGAGTGTCTGTTT	AGGTAGTGGCTTGTATTCTGT
OGDC	CTTGAGCCTGAGCCTTAGAATC	AGGAACAGCAGATAATGGACAC
G6PD	GGAGAATGAGAGCTGGGATG	ACTGCTGGTGAAGATGTCC

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人晶状体上皮细胞系(HLEB3细胞,中国广州吉妮欧生物科技有限公司);胎牛血清(FBS,以色列BI),青霉素/链霉素(美国Gibco公司),DMEM培养液(美国Gibco公司),Annexin V-FITC/PI细胞凋亡双染试剂盒(中国安必信),噻唑兰(MTT,北京赛因坦科技有限公司),二甲基亚砜(美国Sigma),总RNA提取试剂盒(中国爱思进),cDNA试剂盒(日本TOYOBO),荧光定量PCR试剂盒(日本TOYOBO);CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo),酶标仪(美国BioTek),倒置荧光显微镜(日本OLYMPUS),Nanodrop 2000c分光光度计(美国Thermo),7500 Fast实时定量PCR仪(美国ABI)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及分组处理** 使用含体积分数10% FBS的DMEM培养液(葡萄糖5mmol/L)于37℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养HLEB3细胞,2~3d换液,传代培养,当细胞呈现对数生长时分为3组:正常对照组(采用DMEM培养液培养,含葡萄糖5mmol/L)、氧化应激组(采用含H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 $\mu$ mol/L的培养液培养)、高糖诱导组(采用含葡萄糖30mmol/L的培养液培养),均培养24h后进行相应的实验。

**1.2.2 Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测** 在6孔培养板底部铺盖玻片,将对数生长期的HLEB3细胞接种于其上,每孔2mL,约 $1 \times 10^5$ 个细胞,分组培养24h后用预冷的PBS缓冲液洗涤细胞2次,在500 $\mu$ L 1 $\times$ Binding Buffer中加入5 $\mu$ L Annexin V-FITC和5 $\mu$ L PI,轻轻混匀,将混合液加于盖玻片表面,使盖玻片表面均匀覆盖,避光室温反应15min,将盖玻片倒置于载玻片上,使用荧光显微镜进行双色滤光片观察。

**1.2.3 MTT实验检测细胞活力** 将对数生长期的HLEB3细胞接种在96孔培养板中,每孔100 $\mu$ L,约 $1 \times 10^4$ 个细胞,周围孔各用100 $\mu$ L PBS缓冲液填充,并设立调零孔。分组培养24h后,实验孔每孔加入20 $\mu$ L MTT溶液

(5mg/mL),继续培养4h,将上清液去掉,每孔加入150 $\mu$ L二甲亚砜,使用振荡器低速振荡10min,充分溶解结晶物。使用酶联免疫检测仪在570nm处测定各孔的OD值。细胞活性=(实验组OD值-调零孔OD值)/(正常对照组OD值-调零孔OD值) $\times 100\%$ 。

**1.2.4 qRT-PCR检测mRNA的表达** 将对数生长期的HLEB3细胞接种在6孔培养板中,每孔2mL,约 $1 \times 10^5$ 个细胞,分组培养24h后提取总RNA,紫外分光光度计测RNA浓度( $A_{260}/A_{280}$ )。使用cDNA逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。使用实时定量PCR仪检测6种葡萄糖关键代谢酶[6-磷酸果糖激酶-1(PFK-1)、丙酮酸激酶(PKM1)、己糖激酶(HK)、柠檬酸合成酶(CS)、 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶(OGDC)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PD)]mRNA的表达,引物序列见表1。反应条件:预变性(95℃ 20s),PCR反应(95℃ 3s,60℃ 60s,40循环),溶解曲线(95℃ 15s,60℃ 60s,95℃ 15s)。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

统计学分析:用SPSS 22.0统计软件分析数据,以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测** 荧光显微镜下观察,正常对照组细胞凋亡发生较少,氧化应激组和高糖诱导组细胞均发生凋亡,且高糖诱导组细胞凋亡现象最显著,可见凋亡的HLEB3细胞肿胀,胞质疏松,有空泡形成,细胞核大小不一,状态不佳,细胞形态不规则,细胞有重叠现象,见图1。

**2.2 MTT实验检测细胞活力** MTT实验检测结果显示,正常对照组、氧化应激组、高糖诱导组HLEB3细胞活力分别为 $100.00\% \pm 0.00\%$ 、 $91.90\% \pm 5.11\%$ 、 $63.43\% \pm 3.40\%$ ,差异有统计学意义( $F = 12.968, P = 0.001$ )。与正常对照组相比,氧化应激组和高糖诱导组细胞活力均下降,差异

表2 三组细胞6种葡萄糖关键代谢酶的mRNA表达水平

葡萄糖关键代谢酶	正常对照组	氧化应激组	高糖代谢组	F	P
PFK-1	1.00±0.00	1.0810±0.0201	0.8665±0.0381	19.234	0.002
PKM1	1.00±0.00	0.6941±0.0282	0.6285±0.0331	112.809	<0.001
HK	1.00±0.00	1.1276±0.0550	0.8029±0.0544	57.002	<0.001
CS	1.00±0.00	1.2058±0.0556	0.7791±0.0127	101.054	<0.001
OGDC	1.00±0.00	1.2030±0.1122	0.7702±0.0523	32.488	0.001
G6PD	1.00±0.00	1.0817±0.0403	0.8970±0.0167	33.383	0.001

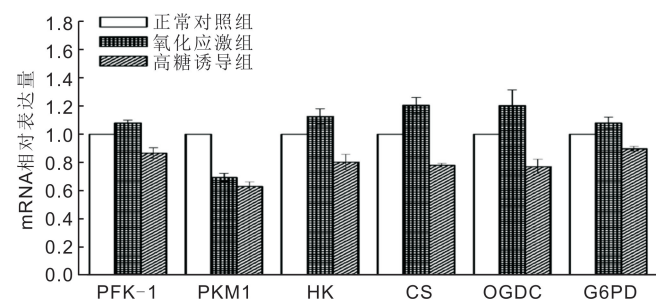


图2 三组细胞6种葡萄糖关键代谢酶mRNA表达情况。

均有统计学意义( $P < 0.01$ ),且高糖诱导组细胞活力低于氧化应激组。

### 2.3 qRT-PCR法检测6种葡萄糖关键代谢酶的mRNA表达

qRT-PCR检测结果显示,正常对照组、氧化应激组、高糖诱导组6种葡萄糖关键代谢酶的mRNA表达水平差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。氧化应激组细胞除丙酮酸激酶外的5种葡萄糖关键代谢酶的表达均高于正常对照组,而丙酮酸激酶的表达低于正常对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。高糖诱导组细胞6种葡萄糖关键代谢酶的表达均低于正常对照组和氧化应激组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表2,图2。

### 3 讨论

白内障是由多种致病机制共同作用的结果,已知糖尿病性白内障形成的机制有渗透压改变、蛋白质糖基化和氧化应激等<sup>[5]</sup>。氧化应激是细胞内氧化-抗氧化的失衡状态,参与了细胞内的多种病理过程,白内障发生过程中最基本的一个环节是晶状体上皮细胞凋亡,也是病理学基础<sup>[4]</sup>。金子夜等<sup>[6]</sup>研究发现糖尿病性白内障患者晶状体前囊膜细胞凋亡程度较年龄相关性白内障患者严重,且检测到凋亡相关基因的表达在糖尿病性白内障患者高于年龄相关性白内障。 $H_2O_2$ 诱导氧化应激是眼科常用的模拟年龄相关性白内障导致晶状体上皮细胞凋亡模型的方法,本实验使用高糖作为诱导条件,模拟糖尿病性白内障患者体内高糖状态。结果发现,高糖诱导的HLEB3细胞发生凋亡显著,细胞活力明显下降,且细胞凋亡程度较 $H_2O_2$ 诱导氧化应激组更加严重。

汤志铮等<sup>[7]</sup>在最近的研究中发现糖尿病性白内障与糖代谢异常关系密切。葡萄糖参与的代谢途径主要有无氧酵解、三羧酸循环、磷酸戊糖途径等。在糖代谢的某一环节出现问题,都能影响葡萄糖代谢水平,引起代谢障碍,进而影响白内障的形成<sup>[8]</sup>。己糖激酶是无氧酵解的关键酶,将进入细胞的葡萄糖磷酸化为6-磷酸葡萄糖,为其它途径提供底物6-磷酸葡萄糖和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate,

NADPH),参与糖原合成和磷酸戊糖途径<sup>[9]</sup>。已有研究证明,在高糖条件下,己糖激酶被葡萄糖饱和,山梨醇途径被激活,山梨醇过多堆积造成细胞功能退化促成糖尿病性白内障<sup>[10]</sup>。山梨醇途径在眼科研究较多,是公认的糖尿病性白内障形成的机制之一<sup>[11]</sup>。6-磷酸果糖激酶-1和丙酮酸激酶是糖酵解途径的另外两种关键酶,目前在眼科研究较少。三羧酸循环参与糖、蛋白质和脂肪的代谢过程是产生能量腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)的主要方式,柠檬酸合成酶是三羧酸循环最重要的酶,可以催化缩合反应产生大量的柠檬酸<sup>[11]</sup>。 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶也是其重要关键酶,能够产生活性氧,在缺氧损伤时其表达会抑制,活性受到影响<sup>[8]</sup>。葡萄糖的磷酸戊糖途径是产生NADPH和核糖-5-磷酸的途径,其关键酶为6-磷酸葡萄糖脱氢酶。

本研究发现,6种葡萄糖关键代谢酶在高糖诱导组细胞的表达均低于正常对照组,可以认为在高糖诱导的情况下,葡萄糖代谢的无氧酵解、三羧酸循环、磷酸戊糖途径均因为酶的减少,受到了不同程度的抑制,葡萄糖代谢功能失常,使大量葡萄糖堆积于细胞内,无氧条件下且ATP产生不足,促进了细胞的凋亡,进而可能促进了山梨醇途径,加快了白内障的生成进程。此外,我们发现6种葡萄糖关键代谢酶在高糖诱导组细胞的表达水平均低于氧化应激组,说明这些酶表达的减少现象发生在高糖诱导的细胞中是糖尿病性白内障所具有的。氧化应激组细胞除丙酮酸激酶外的5种关键酶表达均高于正常对照组,表明在氧化应激过程中HLEB3细胞的糖代谢过程大部分被促进,产生大量的能量。高糖诱导组细胞凋亡较氧化应激组严重,6种葡萄糖关键酶表达反而下降,在高糖状态下为了减少细胞内葡萄糖,大量的酶被消耗,使糖代谢被抑制,加快了细胞凋亡,进而加快了白内障的形成速度。表明葡萄糖代谢途径受阻会加速晶状体上皮细胞的凋亡,葡萄糖关键代谢酶可以起到一定程度的保护作用。

本研究结果表明,高糖可以诱导HLEB3细胞葡萄糖关键代谢酶的表达水平降低,诱导细胞凋亡,影响细胞活性。由此可见,糖尿病性白内障的形成与糖代谢异常密不可分,未来有望通过调控糖代谢途径进行预防,达到控制甚至逆转晶状体混浊的目标。

### 参考文献

- 1 Yuan M, Han Y, Fang Y, et al. Child bearing May Increase the Risk of Nondiabetic Cataract in Chinese Women's Old Age. *J Ophthalmol* 2015; 2015: 1-8
- 2 Shen X, Vaidya A, Wu S, et al. The diabetes epidemic in China: an integrated review of national surveys. *Endocr Pract* 2016; 22(9): 1119-1129
- 3 Cui Y, Zhang L, Zhang M, et al. Prevalence and causes of low vision

and blindness in a Chinese population with type 2 diabetes: the Dongguan Eye Study. *Sci Rep* 2017; 7(1): 11195

4 Beebe DC, Holekamp NM, Shui YB. Oxidative damage and the prevention of age-related cataracts. *Ophthalmic Res* 2010; 44(3): 155-165

5 袁媛, 邱霞. 糖尿病性白内障发病机制及治疗研究进展. *转化医学杂志* 2014; 3(4): 244-245

6 金子夜, 王心森, 郜青叶, 等. 老年性白内障和糖尿病性白内障晶状体上皮细胞的超微结构改变及凋亡相关基因的表达. *中国临床保健杂志* 2015; 18(5): 483-485

7 汤志铮, 卢艳平, 陈学平. 糖尿病性白内障患者糖代谢异常、胰岛素

抵抗与房水及血清中炎症因子的相关性分析. *国际眼科杂志* 2019; 19(1): 41-43

8 刘欣萍. 2型糖尿病患者葡萄糖氧化代谢关键酶的测定和代谢组学研究. *中国现代药物应用* 2016; 10(3): 15-16

9 樊怡, 马健飞, 丁红, 等. d- $\alpha$ -生育酚对高糖诱导的人腹膜间皮细胞己糖激酶表达的调节作用. *中华医学杂志* 2006; 86(32): 2275-2280

10 王朝, 刘平, 苏胜, 等. 糖尿病性白内障相关的酶及蛋白质. *现代生物医学进展* 2014; 14(31): 6180-6182

11 Tang W, Martin KA, Hwa J. Aldose Reductase, Oxidative Stress, and Diabetic Mellitus. *Front Pharmacol* 2012; 3: 87

## 最新中国科技核心期刊眼科学类期刊主要指标及排名

刊名	核心总被引频次		核心影响因子		综合评价总分	
	数值	排名	数值	排名	数值	排名
中华眼科杂志	2040(3435)	2(2)	0.953(1.073)	1(4)	78.4	1
眼科新进展	1273(545)	3(4)	0.690(1.344)	4(3)	60.5	2
<b>国际眼科杂志</b>	<b>2446(5519)</b>	<b>1(1)</b>	<b>0.667(1.412)</b>	<b>5(2)</b>	<b>57.2</b>	<b>3</b>
中华眼底病杂志	865	5	0.878	2	54.3	4
中华实验眼科杂志	1018	4	0.692	3	46.2	5
临床眼科杂志	513	7	0.523	6	38.5	6
眼科	387	8	0.398	8	27.1	7
中华眼视光与视觉科学杂志	528	6	0.390	9	25.5	8
中国斜视与小儿眼科杂志	256	9	0.470	7	10.1	9
9种期刊平均值	1036		0.629			

摘编自 2018 版《中国科技期刊引证报告》核心版和扩展版(括号里面为扩展版的统计指标)