

基于 NF- κ B/p65 信号通路探究 IL-8 调控 MCP-1 分泌及表达影响晶状体囊袋内残留上皮细胞的迁移

司 玮^{1,2}, 徐 素^{1,2}, 张宇航¹, 毛 一¹, 郭柯宇¹, 胡延忠¹, 张凤妍¹

引用: 司玮, 徐素, 张宇航, 等. 基于 NF- κ B/p65 信号通路探究 IL-8 调控 MCP-1 分泌及表达影响晶状体囊袋内残留上皮细胞的迁移. 国际眼科杂志, 2025, 25(4): 537-543.

作者单位:¹(450000) 中国河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院眼科;²(450000) 中国河南省郑州市, 郑州大学

作者简介: 司玮, 在读博士研究生, 住院医师, 研究方向: 白内障。

通讯作者: 张凤妍, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 白内障. zhangfengyanx@aliyun.com

收稿日期: 2024-07-29 修回日期: 2025-03-03

摘要

目的: 探究炎症因子白介素-8 (IL-8) 影响后发性白内障 (PCO) 细胞迁移的过程中对晶状体上皮细胞 (LEC) 分泌的单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 的调控作用。

方法: 构建大鼠晶状体囊袋模型, 采用 10% 胎牛血清培养撕囊后的晶状体囊袋使 LEC 迁移至后囊 30%-50% 面积后, 撤去血清, 将囊袋分为对照组和 15 ng/mL IL-8 组, 并在不同时间点进行拍照观察囊袋 LEC 迁移。ELISA 法和 RT-qPCR 检测不同组 MCP-1 的分泌和信使 RNA (mRNA) 相对表达水平。免疫荧光检测不同组 MCP-1 表达水平。将 SRA01/04 细胞分为对照组、15 ng/mL IL-8 组和 15 ng/mL IL-8 + 200 μ mol/L Bindarit (BND) 组, 用 Transwell 法检测不同组迁移细胞数量。将 SRA01/04 细胞分为阴性对照 (NC) 组、NC + 15 ng/mL IL-8 组及 15 ng/mL IL-8 + p65 siRNA 组, ELISA 法和 RT-qPCR 检测不同组 MCP-1 的分泌和 mRNA 相对表达水平。

结果: 体外培养的大鼠晶状体囊袋 LEC 迁移水平显示, 在 48、72、96 h 时 15 ng/mL IL-8 组囊袋内细胞迁移明显增加 (均 $P < 0.05$)。ELISA 的结果显示, 15 ng/mL IL-8 组囊袋和 SRA01/04 细胞与对照组相比较, 在 12、24 h 分泌的 MCP-1 的水平升高 (均 $P < 0.05$); RT-qPCR 的结果同样显示 15 ng/mL IL-8 组 SRA01/04 细胞在 12、24 h 分泌的 MCP-1 mRNA 的相对表达水平增高 (均 $P < 0.05$)。免疫荧光的结果显示, 与对照组相比, 24 h 时 15 ng/mL IL-8 组的囊袋上皮细胞 MCP-1 表达水平升高 ($P = 0.007$)。Transwell 的检测结果显示, 与对照组相比, 15 ng/mL IL-8 组迁移数量增加 ($P = 0.001$); 与 15 ng/mL IL-8 组相比, 15 ng/mL IL-8 + 200 μ mol/L BND 组迁移数量减少 ($P = 0.003$)。ELISA 和 RT-qPCR 的结果显示, 与 NC 组相比, NC + 15 ng/mL IL-8 组在 12、24 h 时的 MCP-1 分泌和 mRNA 的相对表达增加 (均 $P < 0.01$); 与 NC + 15 ng/mL IL-8 组比较, 15 ng/mL IL-8 + p65 siRNA 组在 12、24 h 时的 MCP-1 分泌和 mRNA 的相对表达减少 (均 $P < 0.01$)。

结论: IL-8 可促进囊袋内残留上皮细胞的迁移, 调控晶状体上皮细胞 MCP-1 的分泌和表达水平, 推测其作用机制

与 NF- κ B/p65 信号通路有关。

关键词: 后发性白内障; 白介素-8 (IL-8); 晶状体上皮细胞; 细胞迁移; 单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1); NF- κ B/p65 信号通路

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2025.4.04

Effect of interleukin - 8 regulation on monocyte chemotactic protein-1 secretion and expression through the NF - κ B/p65 signaling pathway on the migration of residual epithelial cells in the lens capsule

Si Wei^{1,2}, Xu Su^{1,2}, Zhang Yuhang¹, Mao Yi¹, Guo Keyu¹, Hu Yanzhong¹, Zhang Fengyan¹

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China; ²Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Correspondence to: Zhang Fengyan. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China. zhangfengyanx@aliyun.com

Received: 2024-07-29 Accepted: 2025-03-03

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of interleukin-8 (IL-8) on the regulation of monocyte chemotactic protein - 1 (MCP-1) secreted by lens epithelial cells (LEC) during cell migration in the development of posterior capsule opacification (PCO).

• **METHODS:** A rat lens capsule model was established and cultured in medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Upon migration of LEC to 30%-50% of the posterior capsule, serum was removed. The capsule was subsequently divided into two groups: a control group and an IL-8 (15 ng/mL) treatment group. LEC migration was captured at multiple time points. The secretion and mRNA expression of MCP-1 were quantified using ELISA and RT - qPCR, respectively. Immunofluorescence was used to assess MCP - 1 expression in the different experimental groups. SRA01/04 cells were divided into three groups: control, IL - 8 (15 ng/mL), and IL - 8 (15 ng/mL) + 200 μ mol/L Bindarit (BND) groups, with migration measured by the Transwell assay. Additionally, SRA01/04 cells were divided into negative control (NC), NC + 15 ng/mL IL - 8, and 15 ng/mL IL - 8 + p65 siRNA groups, and MCP-1 secretion and mRNA expression were further analyzed by ELISA and RT-qPCR.

• **RESULTS:** LEC migration in the rat lens capsule cultured *in vitro* showed that the cells migration of the 15 ng/mL IL-8 group significantly increased at 48, 72 and 96 h (all $P < 0.05$). ELISA results revealed that MCP-1 levels in SRA01/04 cells from the 15 ng/mL IL-8-treated group were markedly higher than those in the control group at both 12 and 24 h (all $P < 0.05$). RT-qPCR analysis also demonstrated a significant increase in MCP-1 mRNA expression in the 15 ng/mL IL-8 group at both time points (all $P < 0.05$). Immunofluorescence staining indicated greater MCP-1 expression in capsular epithelial cells of the 15 ng/mL IL-8 group at 24 h ($P = 0.007$). Transwell assays further confirmed increased cell migration in the 15 ng/mL IL-8 group compared to the control group ($P = 0.001$), while the migration reduced in the 15 ng/mL IL-8+200 $\mu\text{mol/L}$ BND group compared to the 15 ng/mL IL-8 group ($P = 0.003$). Moreover, ELISA and RT-qPCR results demonstrated a significant increase in MCP-1 secretion and mRNA expression in the NC+15 ng/mL IL-8 group at both 12 and 24 h compared to the NC group (all $P < 0.01$). In contrast, MCP-1 secretion and mRNA expression were reduced in the 15 ng/mL IL-8+p65 siRNA group compared to the NC+15 ng/mL IL-8 group at both time points (all $P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** IL-8 promotes the migration of residual epithelial cells and regulates the secretion and expression of MCP-1 in LEC. The mechanism underlying IL-8's effects appears to be mediated through the activation of the NF- κB /p65 signaling pathway.

• **KEYWORDS:** posterior capsule opacification; interleukin-8 (IL-8); lens epithelial cells; cell migration; monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1); NF- κB /p65 signaling pathway

Citation: Si W, Xu S, Zhang YH, et al. Effect of interleukin-8 regulation on monocyte chemotactic protein-1 secretion and expression through the NF- κB /p65 signaling pathway on the migration of residual epithelial cells in the lens capsule. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2025, 25(4): 537-543.

0 引言

白内障是全世界致盲率最高的疾病,发病率随着年龄的增长而增加,50-60岁的发病率为60%-70%,70岁以上则可达80%^[1]。手术治疗是白内障最常规的治疗方法,然而,仍有20%-40%的成人白内障患者或几乎100%的儿童白内障患者在手术后发生后发性白内障 (posterior capsule opacification, PCO),使患者再次失明^[2-4]。PCO是一个复杂的病理过程,包括残留的晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LEC) 增殖、向后囊迁移、上皮-间充质细胞转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 和囊膜残留上皮细胞的纤维化。多种生长因子如转化生长因子- β_2 (transforming growth factor- β_2 , TGF- β_2)、成纤维细胞生长因子-2 (fibroblast growth factor-2, FGF-2)^[5-6] 和炎症因子如白介素-1 (interleukin-1, IL-1)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6)^[7-8] 等参与调节这一病理过程。IL-8是n端Glu-Leu-Arg (ELR) 基序含CXC趋化因子亚家族的典型成员,具有肿瘤细胞转移、炎症细胞趋化、内皮细胞血管

化^[9]等多种功能。在晶状体中,IL-8在白内障超声乳化术后的LEC中的mRNA表达上调^[10]。单核细胞趋化蛋白1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 是细胞迁移的重要趋化因子^[11],有研究表明,白内障术后人和动物眼中房水的MCP-1升高,上皮细胞MCP-1的mRNA水平明显上调,这一结果表明房水内的MCP-1可能来源于囊袋内增殖的上皮细胞^[12-13]。我们之前的研究^[14]也表明,IL-8能够调控晶状体囊袋内上皮细胞向后囊迁移和细胞间的紧密连接,但IL-8与MCP-1之间的调控关系尚未明确。本研究通过体外建立大鼠晶状体囊袋模型以及培养人晶状体上皮细胞系SRA01/04,分析体外干预IL-8对LEC分泌的MCP-1的调控作用及对迁移的影响,为研究晶状体囊袋内微环境细胞因子的调控及PCO的发病机制提供新的治疗思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 **动物** 雄性野生型SD大鼠20只,体质量220 \pm 20 g,由郑州大学实验动物中心供给。入组前排除角膜病、白内障、先天性近视等眼部疾病。动物实验符合伦理学标准,且通过伦理学委员会审查 (审批号: 2022-KY-0006-001)。

1.1.2 **细胞** 人晶状体上皮细胞株 (SRA01/04), 购买于美国ATCC细胞库 (ATCC-7282)。

1.1.3 **主要试剂与仪器** 高糖DMEM培养基、胰蛋白酶、青链霉素 (美国Gibco公司), 胎牛血清 (FBS, 德国PAN-biotech公司), 重组人IL-8 (CXCL8) (77 a. a.) (美国peprotech公司)。Bindarit (MCP-1抑制剂, 美国MCE公司), 大鼠及人MCP-1 ELISA试剂盒 (武汉Finetest生物技术公司), MCP-1抗体 (1:500, 英国Abcam公司), 免疫荧光二抗Alexa Fluor 488 (1:500, 美国Abcam公司), DAPI (1:1000, 上海碧云天生物有限公司), Lipofectamine 3000 (美国Invitrogen公司), 低熔点琼脂糖凝胶 (上海生工生物公司), 水合氯醛 (北京太阳生物生命科学公司), 逆转录试剂盒 (北京全式金生物公司), 引物、siRNA (北京擎科生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 **体外大鼠晶状体囊袋模型建立** 随机选取野生型SD大鼠3只, 100 g/L水合氯醛腹腔注射麻醉处死, 摘取眼球在无菌生理盐水中进行冲洗并剔除眼周组织, 取出晶状体。根据参考文献^[9]中的方法构建晶状体囊袋模型: 2% (37 $^{\circ}\text{C}$) 的低熔点琼脂糖凝胶固定大鼠晶状体, 前囊朝下。体视显微镜下对晶状体进行赤道部环形撕囊术, 用PBS洗涤去除晶状体纤维组织。

1.2.2 **大鼠晶状体囊袋及SRA01/04细胞的体外培养** 大鼠晶状体囊袋和SRA01/04细胞均采用DMEM完全培养基 (DMEM高糖培养基+10%胎牛血清FBS+1%青链霉素) 在37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养, 避免暴露于光线或氧气。

1.2.3 **实验分组** 用于囊袋和未转染细胞ELISA、实时荧光定量PCR (RT-qPCR) 和免疫荧光染色: 大鼠晶状体囊袋和 (或) SRA01/04细胞分为2组: (1) 对照组: 无血清培养基培养; (2) 15 ng/mL IL-8组: 含15 ng/mL IL-8的无血清DMEM培养基进行培养。

用于 Transwell 检测;SRA01/04 细胞分为 3 组:(1)对照组:无血清培养基培养;(2)15 ng/mL IL-8 组:含 15 ng/mL IL-8 的无血清 DMEM 培养基进行培养。(3)15 ng/mL IL-8+200 μ mol/L Bindarit(BND)组:含 15 ng/mL IL-8 + 200 μ mol/L BND 的无血清 DMEM 培养基进行培养。

用于 siRNA 转染细胞酶联免疫吸附法(ELISA)检测:SRA01/04 细胞分为 3 组:(1)阴性对照组(negative control, NC);阴性对照 siRNA 转染 36 h 后,更换无血清培养基继续培养 24 h;(2)NC+15 ng/mL IL-8 组:阴性 siRNA 转染 36 h 后,用含 15 ng/mL IL-8 的无血清 DMEM 培养基继续培养 24 h。(3)15 ng/mL IL-8+p65 siRNA 组:p65 siRNA 转染 36 h 后,用含 15 ng/mL IL-8 的无血清 DMEM 培养基继续培养 24 h。

1.2.4 大鼠晶状体囊袋迁移实验 体外成功建立大鼠晶状体囊袋模型后,用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养 72 h,此时囊袋内残留的晶状体上皮细胞已从赤道部向后囊迁移。当囊袋内残留细胞迁移至后囊面积的 30%-50%时撤去血清,分别在不同分组条件下继续培养囊袋 0、24、48、72 和 96 h 并在各个时间点拍照记录。采用 Image J 计算细胞迁移距离并进行统计学分析。

1.2.5 ELISA 检测 MCP-1 大鼠晶状体囊袋或 SRA01/04 细胞培养 6、12 和 24 h 后,分别收集并检测在对照组和 15 ng/mL IL-8 组上清液内 MCP-1 的分泌;SRA01/04 细胞培养 12 和 24 h 后,分别收集并检测在 NC 组和 NC+15 ng/mL IL-8 组和 15 ng/mL IL-8+p65 siRNA 组上清液内 MCP-1 的分泌。具体步骤参照 MCP-1 试剂盒说明书。

1.2.6 RT-qPCR 大鼠晶状体囊袋或 SRA01/04 细胞培养 6、12 和 24 h 后,分别收集并检测在对照组和 15 ng/mL IL-8 组囊袋组织内 MCP-1 的 mRNA 水平;SRA01/04 细胞培养 12 和 24 h 后,分别收集并检测在 NC 组和 NC+15 ng/mL IL-8 组和 15 ng/mL IL-8+p65 siRNA 组细胞内 MCP-1 的 mRNA 水平。采用 Trizol 法提取细胞总 RNA。按逆转录试剂盒说明书逆转录 cDNA。以 GAPDH 为内参,比较各组细胞 MCP-1 和 GAPDH 的 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析 MCP-1 mRNA 的表达情况。人 MCP-1 基因序列:正

向 5' - GAAAGTCTCTGCCGCCCTT - 3', 反向 5' - GGTGACTGGGGCATTGATTG-3';GAPDH 基因序列:正向 5' - TCCGAAACTGTCTGCCCACT - 3', 反向 5' - AGCATCGCCCCACTTGATTT-3'。

1.2.7 免疫荧光染色检测 大鼠晶状体囊袋染色:两组囊袋干预 24 h 后,在 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min,用 1 \times PBS 清洗 3 次,4 g/L Tritonx-100 破膜 5 min,5 g/L BSA 室温封闭 1 h。封闭结束后,用含有 5 g/L BSA 的封闭液孵育一抗过夜。第二天用 1 \times PBS 清洗一抗,用含有 5 g/L BSA 的封闭液避光孵育荧光二抗 1 h。1 \times PBS 清洗后,取出固定在低熔点琼脂糖上的囊袋,扣在滴有含 DAPI 的抗荧光淬灭剂载玻片上,随后用共聚焦显微镜拍照观察。Alexa Fluor 488 绿色免疫荧光表示目的蛋白的免疫活性,DAPI 蓝色荧光特异性表示细胞核。

1.2.8 SRA01/04 细胞迁移 Transwell 检测 5×10^4 cell/mL 的细胞接种在 200 μ L 的 transwell 上室,下室分别加入 600 μ L 不同干预条件下的培养基进行培养,24 h 后,用 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min,1 g/L 结晶紫染色 10 min。待自然干燥后,在倒置生物显微镜下随机选取 5 个视野拍照记录。采用 Image J 计算细胞迁移个数并进行统计学分析。

统计学分析:采用 SPSS 26.0 软件分析数据,结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。重复测量数据采用重复测量方差分析,多组间比较采用单因素方差分析,事后两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 IL-8 促进大鼠晶状体囊袋内晶状体上皮细胞的迁移

对照组晶状体囊袋内细胞在撤去血清后培养 48 h 时出现了明显的凋亡、脱落,并且未观察到明显的细胞增殖与迁移;而 15 ng/mL IL-8 组囊袋内的上皮细胞持续存在活性,并随培养时间延长,囊袋内细胞向后囊迁移的距离逐渐增加。对后囊迁移的最远距离进行计算的结果显示,15 ng/mL IL-8 组囊袋内晶状体上皮细胞迁移速度随时间与对照组相比增加,在 48、72 和 96 h 时差异均具有统计学意义($P=0.008, 0.008, 0.003$,图 1)。

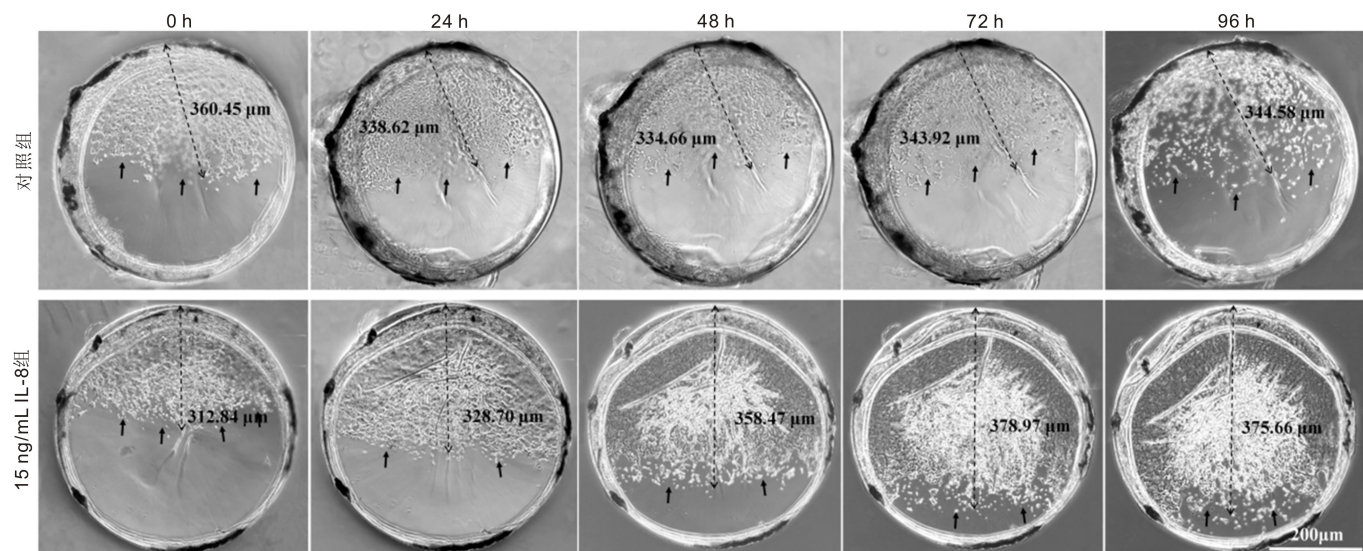


图 1 体外培养两组大鼠晶状体囊袋内残留上皮细胞向后囊迁移。

2.2 大鼠晶状体囊袋残留上皮细胞和 SRA01/04 细胞各组 MCP-1 的分泌和 mRNA 相对表达水平比较 ELISA 的结果表明,用 15 ng/mL IL-8 干预大鼠晶状体囊袋,在 6、12 和 24 h 囊袋内上皮细胞分泌的 MCP-1 水平分别为 3.53 ± 0.04 、 9.62 ± 0.38 、 30.51 ± 1.14 pg/mL;两组组间、时间比较差异有统计学意义($F_{\text{组间}} = 53.057$, $P_{\text{组间}} = 0.002$; $F_{\text{时间}} = 1573.984$, $P_{\text{时间}} < 0.0001$)。与对照组相比,15 ng/mL IL-8 组 MCP-1 水平在 6 h 没有明显差异,但 12、24 h 时,15 ng/mL IL-8 组囊袋分泌的 MCP-1 明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.0001$,表 1)。

SRA01/04 细胞系的结果显示,与对照组相比,15 ng/mL IL-8 组处理后晶状体上皮细胞分泌的 MCP-1 水平在 6、12、24 h 的水平分别为 114.74 ± 14.91 、 340.82 ± 34.47 、 462.62 ± 26.32 pg/mL;两组组间、时间比较差异有统计学意义($F_{\text{组间}} = 282.256$, $P_{\text{组间}} < 0.0001$; $F_{\text{时间}} = 15.786$, $P_{\text{时间}} = 0.016$)。结果与囊袋内的趋势一致,15 ng/mL IL-8 组与对照组相比在 12、24 h 均增高,差异有统计学意义($P = 0.024$ 、 0.011 ,表 2)。各组晶状体上皮细胞 qPCR 实验结果也显示,与对照组相比,15 ng/mL IL-8 组 MCP-1 mRNA 表达水平在 6 h 比较差异无统计学意义($P = 0.643$),但 12、24 h 时,15 ng/mL IL-8 组 MCP-1 mRNA 表达水平均升高,差异有统计学意义($P = 0.047$ 、 0.010 ,表 3)。

2.3 大鼠囊袋内晶状体上皮细胞中 MCP-1 的平均荧光强度比较 免疫荧光染色结果显示,在 24 h 时,MCP-1 在大

表 1 各组大鼠晶状体囊袋内 MCP-1 分泌比较

| ($\bar{x} \pm s$, pg/mL) | | | |
|----------------------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| 组别 | 6 h | 12 h | 24 h |
| 对照组 | 4.36 ± 1.04 | 5.53 ± 0.22 | 22.92 ± 1.13^c |
| 15 ng/mL IL-8 组 | 3.53 ± 0.04 | 9.62 ± 0.38^a | 30.51 ± 1.14^c |
| <i>t</i> | 1.370 | -15.867 | -8.162 |
| <i>P</i> | 0.243 | <0.0001 | <0.0001 |

注:^a $P < 0.05$ vs 6 h; ^c $P < 0.05$ vs 12 h。

鼠囊袋内上皮细胞质中呈现绿色荧光,表明囊袋内上皮细胞中存在 MCP-1 蛋白的表达(图 2)。其中对照组的平均荧光强度为 59.51 ± 4.66 ,15 ng/mL IL-8 组的平均荧光强度为 70.87 ± 3.22 。与对照组相比,15 ng/mL IL-8 处理组大鼠囊袋内晶状体上皮细胞中 MCP-1 平均荧光强度升高,差异有统计学意义($t = -4.009$, $P = 0.007$)。这表明 IL-8 增强了囊袋内晶状体上皮细胞 MCP-1 的表达。

2.4 各组 SRA01/04 细胞的迁移数量比较 Transwell 法检测结果显示,对照组、15 ng/mL IL-8 组和 15 ng/mL IL-8+200 $\mu\text{mol/L}$ BND 组 SRA01/04 细胞在 24 h 时的细胞迁移数量为 139.60 ± 12.26 、 206.80 ± 28.80 、 152.67 ± 28.95 ,与对照组相比,15 ng/mL IL-8 组 SRA01/04 细胞的迁移数增加($P = 0.001$);与 15 ng/mL IL-8 组比较,15 ng/mL IL-8+200 $\mu\text{mol/L}$ BND 组 SRA01/04 细胞的迁移数减少($P = 0.003$,图 3)。这一结果表明 BND 有效降低了 IL-8 引起的 SRA01/04 细胞的迁移增加。

表 2 各组 SRA01/04 细胞 MCP-1 分泌量比较

| ($\bar{x} \pm s$, pg/mL) | | | |
|----------------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| 组别 | 6 h | 12 h | 24 h |
| 对照组 | 123.20 ± 8.90 | 249.92 ± 28.23^a | 357.87 ± 31.34^c |
| 15 ng/mL IL-8 组 | 114.74 ± 14.91 | 340.82 ± 34.47^a | 462.62 ± 26.32^c |
| <i>t</i> | 0.844 | -3.533 | -4.434 |
| <i>P</i> | 0.446 | 0.024 | 0.011 |

注:^a $P < 0.05$ vs 6 h; ^c $P < 0.05$ vs 12 h。

表 3 各组 SRA01/04 细胞 MCP-1 mRNA 相对表达量比较

| $\bar{x} \pm s$ | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 组别 | 6 h | 12 h | 24 h |
| 对照组 | 1.04 ± 0.12 | 1.12 ± 0.06 | 0.92 ± 0.12 |
| 15 ng/mL IL-8 组 | 1.12 ± 0.14 | 1.62 ± 0.30 | 1.54 ± 0.20 |
| <i>t</i> | -0.501 | -2.838 | -4.622 |
| <i>P</i> | 0.643 | 0.047 | 0.010 |

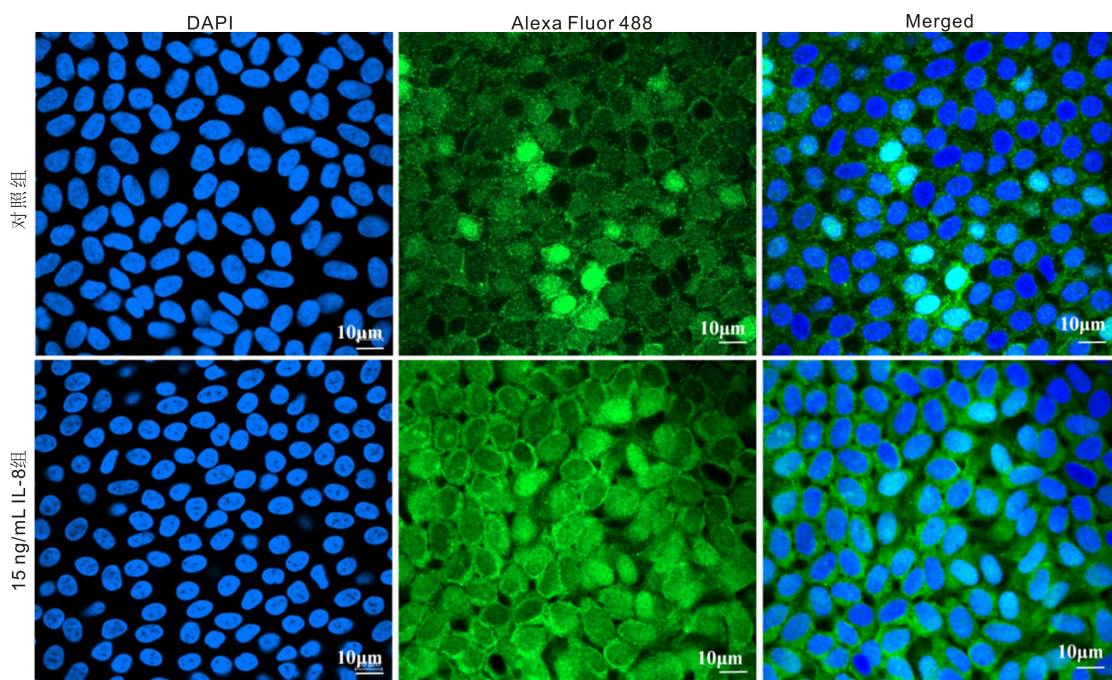


图 2 免疫荧光染色检测 24 h 时各组大鼠晶状体囊袋晶状体上皮细胞 MCP-1 蛋白表达 DAPI:细胞核呈现蓝色荧光染色;Alexa Fluor 488:MCP-1 呈现绿色荧光染色;Merged:融合两种荧光图像后。

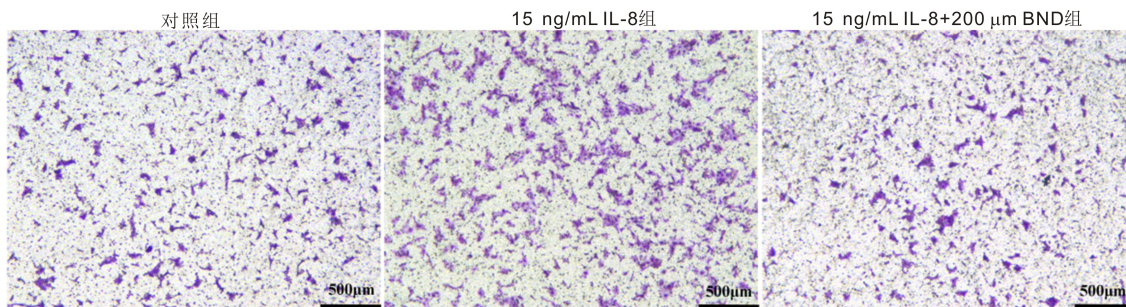


图3 Transwell 法检测 24 h 时各组处理对 SRA01/04 细胞迁移的影响。

2.5 各组 SRA01/04 细胞 MCP-1 的分泌及 mRNA 相对表达水平比较 ELISA 检测结果显示,与 NC 组相比,在 12、24 h 时,NC+15 ng/mL IL-8 组大鼠晶状体囊袋内 MCP-1 分泌均增加,差异均有统计学意义 ($t = -2.688, P = 0.0025; t = -2.866, P = 0.0025$);与 NC+15 ng/mL IL-8 组相比,12、24 h 时 15 ng/mL IL-8+p65 siRNA 组大鼠晶状体囊袋内分泌的 MCP-1 降低,差异均有统计学意义 ($t = -4.888, P = 0.002; t = 5.748, P < 0.0001$),见表 4。

RT-qPCR 检测结果显示,NC、NC+15 ng/mL IL-8 组和 15 ng/mL IL-8+p65 siRNA 组 SRA01/04 细胞中, MCP-1 mRNA 在 12、24 h 时的相对表达量见表 5。与 NC 组比较,NC+15 ng/mL IL-8 组 MCP-1 mRNA 表达在 12、24 h 时均明显升高,差异有统计学意义 ($t = -6.787, P = 0.002; t = -12.083, P < 0.0001$);与 NC+15 ng/mL IL-8 组比较,15 ng/mL IL-8+p65 siRNA 组 MCP-1 mRNA 表达在 12、24 h 时均降低,差异有统计学意义 ($t = 20.157, P < 0.0001; t = 11.811, P < 0.0001$)。结果表明,敲低 p65 后有效降低了由 IL-8 引起的 MCP-1 的分泌和 mRNA 的表达水平。

3 讨论

PCO 是白内障手术后最常见的并发症之一,白内障术后的 2-5 a 内,PCO 的发生会导致 20%-40% 的患者出现手术后继发性的视力下降。PCO 的形成与年龄有关。有研究表明,晶状体核硬度与 PCO 形成呈负相关,而儿童和年轻成年患者术后 3 a 的 PCO 发生率高于老年患者^[15-16]。

不同区域的晶状体上皮细胞发挥的功能不同:前囊区域的上皮细胞主要负责晶状体的代谢与维持,赤道区的上皮细胞则具有重要的增殖与分化作用,可以转变为晶状体纤维细胞。而后囊区域的上皮细胞在正常情况下相对较少^[17]。白内障手术后,这些细胞会重新增殖并可能导致 PCO 的形成。PCO 的病理机制主要是晶状体前囊残留的晶状体上皮细胞发生的病理性增殖、迁移、EMT 和纤维化^[18]。这一过程中,晶状体上皮细胞受到房水循环的多种细胞因子及生长因子的调控,如细胞因子 TGF- β_2 、FGF、骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)、血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 和炎症因子如白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、IL-8、巨噬细胞迁移抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF)、MCP-1 等^[2,4,13]。TGF- β_2 通过 smad 途径调节上皮细胞向肌成纤维细胞的转分化、胶原沉积和基质收缩^[19]。低剂量的 b-FGF 能够刺激 LEC 增殖,高剂量则能刺激上皮细胞向纤维细胞分

表 4 各组 SRA01/04 细胞炎症因子 MCP-1 表达比较

| 组别 | $(\bar{x} \pm s, \text{pg/mL})$ | |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | 12 h | 24 h |
| NC 组 | 180.43 \pm 13.44 | 317.38 \pm 22.40 |
| NC+15 ng/mL IL-8 组 | 217.96 \pm 28.49 ^b | 379.93 \pm 47.49 ^b |
| 15 ng/mL IL-8+p65 siRNA 组 | 134.43 \pm 3.67 ^d | 240.11 \pm 5.14 ^d |
| F | 16.297 | 21.126 |
| P | 0.001 | <0.001 |

注:^b $P < 0.01$ vs NC 组;^d $P < 0.01$ vs NC+15 ng/mL IL-8 组。

表 5 各组 SRA01/04 细胞 MCP-1 mRNA 相对表达量比较

| 组别 | $\bar{x} \pm s$ | |
|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 12 h | 24 h |
| NC 组 | 1.00 \pm 0.18 | 1.00 \pm 0.07 |
| NC+15 ng/mL IL-8 组 | 1.71 \pm 0.01 ^b | 1.94 \pm 0.11 ^b |
| 15 ng/mL IL-8+p65 siRNA 组 | 0.52 \pm 0.52 ^d | 0.90 \pm 0.11 ^d |
| F | 74.489 | 100.67 |
| P | 0.000 | 0.000 |

注:^b $P < 0.01$ vs NC 组;^d $P < 0.0001$ vs NC+15 ng/mL IL-8 组。

化,这些表现都与 PCO 的发病机制相关^[5,20]。另外,有研究^[7]表明炎症因子如 IL-6 可通过激活 JAK/STAT3 信号通路促进 TGF- β_2 的激活和细胞外基质的合成,从而促进 PCO 的发展。Hamid 等^[21]的研究表明,白内障患者促炎细胞因子 IL-8 水平升高,并且白内障术后晶状体上皮细胞 IL-8 表达增加^[12]。以上结果均表明白内障术后炎症因子与 PCO 的发生与发展密切相关。本研究通过沿晶状体赤道部环形撕囊构建大鼠晶状体囊袋模型,发现体外应用 IL-8 干预晶状体上皮细胞能够调控囊袋内 LEC 或 SRA01/04 细胞通过 NF- κ B/p65 信号通路分泌和表达 MCP-1,以促进晶状体上皮细胞迁移,提示 IL-8 在介导囊袋内残留晶状体上皮细胞发生 PCO 过程中发挥作用。

已有研究表明,IL-8 与细胞迁移有明显的相关性。在肿瘤细胞中,IL-8 可通过 ERK/Ets-1 通路激活其受体 CXCR1/2 增强结直肠癌细胞的迁移^[22]。机体的大多数炎症反应过程中,IL-8 主要作用于中性粒细胞,可以与 MCP-1 发挥协同作用,引起单核细胞牢固地黏附在 E 选择素周围^[23]。既往的研究^[12]发现,白内障超声乳化术后的房水内 IL-8 表达升高。本研究的结果表明,体外干预 IL-8 可以促进大鼠囊袋内残留的晶状体上皮细胞迁移。Kawai 等^[12]的研究发现,白内障术后 24 h,晶状体上皮细胞 MCP-1 的基因表达上调,术后 48 h,IL-8 的基因表达上

调,共同参与晶状体囊袋内的慢性炎症反应^[24-25]。但目前尚无相关文献表明 IL-8 与 MCP-1 在晶状体囊袋微环境中的相互调控作用。

MCP-1 是 G 蛋白偶联受体 C-C 趋化因子受体 2 型 (C-C motif chemokine receptor 2, CCR2) 的配体^[26]。已知多种细胞可以表达 MCP-1, 如白细胞、髓细胞、内皮细胞、肌肉细胞、成纤维细胞、上皮细胞和肿瘤细胞^[27]。白内障手术后晶状体上皮细胞分泌的 IL-8 和 MCP-1 水平升高,并在术后 17 mo 后仍能观察到房水内 MCP-1 和 IL-8 的升高,同时,术后 30-90 d 内 MCP-1 mRNA 表达水平平均增加。动物实验的结果也表明,房水内的 MCP-1 可能来源于残留囊袋增生的 LEC^[12],这些研究表明两种炎症因子均参与术后的炎症反应,但与 PCO 发生机制的关系尚不明确。本研究发现,体外用 IL-8 干预大鼠晶状体囊袋或 SRA01/04 细胞后的 12、24 h 时,囊袋内残留的 LEC 及 SRA01/04 细胞分泌的 MCP-1 水平较对照组均显著升高,同时,SRA01/04 细胞 MCP-1 的 mRNA 表达水平较对照组升高。此外,24 h 时,15 ng/mL IL-8 组大鼠囊袋内上皮细胞 MCP-1 的荧光表达较对照组显著增强。迁移实验的结果进一步表明,使用 BND 抑制 MCP-1 后,由 IL-8 引起的细胞迁移数量有所下降。这些结果表明 IL-8 在 LEC 发生迁移的过程中对 MCP-1 有一定的调控作用,并能够对细胞迁移产生影响。

NF- κ B/p65 信号通路参与细胞免疫、炎症反应、细胞凋亡等多种生物学进程^[28]。既往的文献表明,MCP-1 的启动子中鉴定出 κ B 序列,表明 MCP-1 的表达很大程度上依赖于 NF- κ B 信号通路。Wu 等^[29]的结果表明,在内皮细胞中,血管紧张素 2 (angiotensin II, Ang II) 可通过激活 NF- κ B 信号通路刺激 MCP-1 的表达,这一过程可完全被 MCP-1 的抑制剂 BND 逆转。在本研究中,BND 能够逆转由 IL-8 诱导的细胞迁移增加,这与之前的研究结果相似,表明 IL-8 可能是通过 NF- κ B 信号通路调控 MCP-1 的表达,继而影响细胞的迁移。Zhai 等^[30]的研究证明,IL-8 通过 NF- κ B 信号通路上调 ABCB1 从而促进胃癌上皮细胞的迁移和侵袭。同时,MCP-1 中和抗体能够治疗携带人类乳腺癌细胞的免疫缺陷小鼠,降低肿瘤的生长速度^[31],这些研究都表明 IL-8 和 MCP-1 均与细胞迁移显著相关。但截至目前尚无文献证明白内障术后晶状体囊袋内 IL-8 与 MCP-1 之间存在调控关系。本研究的实验结果表明,用 IL-8 干预敲低 p65 后的 SRA01/04 细胞,MCP-1 的分泌和 mRNA 表达与 NC+15 ng/mL IL-8 组相比均明显降低,提示 IL-8 可通过调节 NF- κ B/p65 信号通路调控细胞产生 MCP-1,参与 PCO 过程中的细胞迁移,但具体的调控机制仍需进一步探究。

既往研究表明,预防和治疗后发性白内障(PCO)的手段主要包括药物干预、手术治疗以及特殊人工晶状体的应用。已有研究发现,法舒地尔体外干预能够通过 Rho/ROCK 通路抑制 TGF- β 2 引起的 SRA01/04 细胞的增殖、迁移和上皮-间质转化(EMT),这一结果与我们之前的研究发现相一致^[32]。此外,在兔白内障手术过程中持续递送环孢菌素 A 微球(CSA-MS)能够有效防止 PCO 的形成^[33]。这些研究结果表明,外源性药物干预在 PCO 的发生和发展过程中具有一定的作用。本研究则主要通过探讨晶状体囊袋微环境内炎症因子和趋化因子之间的相互

作用,以及它们与 PCO 发生之间的关系,从而达到延缓 PCO 发展的目的。通过对囊袋内细胞因子进行多靶点联合干预,不仅有望提高 PCO 的防治效果,同时也可减少药物的剂量和副作用,这对进一步为开发细胞因子与信号通路联合作用来预防和治疗 PCO 提供了理论依据。

本研究的不足之处在于,研究主要依赖体外和离体模型,如 SRA01/04 细胞系和动物囊袋模型,这些模型虽然提供了重要的实验数据,但不能完全模拟人体内的复杂生理环境,缺乏足够的临床验证数据,这对研究结果的临床应用造成了限制。另外,尽管 IL-8 在 PCO 中对于 MCP-1 的调控作用进行了探究,但与其他生长因子、炎症细胞如巨噬细胞之间的交互作用未被充分深入研究,这也是本实验进一步的研究方向。

本研究的结果表明,IL-8 能够促进大鼠晶状体囊袋内残留的晶状体上皮细胞迁移增加,并通过调控 NF- κ B/p65 信号通路上调晶状体上皮细胞的 MCP-1 分泌和表达,而通过 200 μ mol/L BND 处理有效抑制了细胞迁移,降低了由 IL-8 引起的细胞迁移。本研究通过体外构建大鼠晶状体囊袋模型及体外细胞实验,揭示了白内障术后晶状体囊袋内微环境中炎症因子 IL-8 与 MCP-1 的调控作用,为 PCO 的发生机制提供了新的研究思路。

利益冲突声明: 本文不存在利益冲突。

作者贡献声明: 司玮论文选题与修改,实验设计,实施研究,初稿撰写;徐素、张宇航实施研究,数据分析;毛一、郭柯宇文献检索,数据分析;胡延忠选题指导;张凤妍选题指导,论文修改及审阅。所有作者均阅读并同意最终的文本。

参考文献

- [1] Wang B, Tang LQ. Analysis of the effect of phacoemulsification and intraocular lens implantation combined with trabeculectomy on cataract and its influence on corneal endothelium. *Front Surg*, 2022,9:841296.
- [2] Wang L, Zhang Z, Koch DD, et al. Anterior chamber interleukin 1 β , interleukin 6 and prostaglandin E2 in patients undergoing femtosecond laser-assisted cataract surgery. *Br J Ophthalmol*, 2016, 100(4):579-582.
- [3] Dong N, Xu B, Wang BS, et al. Aqueous cytokines as predictors of macular edema in patients with diabetes following uncomplicated phacoemulsification cataract surgery. *Biomed Res Int*, 2015, 2015:126984.
- [4] Xu HP, Chen M, Forrester JV, et al. Cataract surgery induces retinal pro-inflammatory gene expression and protein secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011,52(1):249-255.
- [5] Mansfield KJ, Cerra A, Chamberlain CG. FGF-2 counteracts loss of TGF β affected cells from rat lens explants: implications for PCO (after cataract). *Mol Vis*, 2004,10:521-532.
- [6] de Iongh RU, Wederell E, Lovicu FJ, et al. Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation. *Cells Tissues Organs*, 2005, 179(1-2): 43-55.
- [7] Ma B, Yang L, Jing RH, et al. Effects of Interleukin-6 on posterior capsular opacification. *Exp Eye Res*, 2018,172:94-103.
- [8] Oppenheim JJ, Kovacs EJ, Matsushima K, et al. There is more than one interleukin 1. *Immunol Today*, 1986,7(2):45-56.
- [9] Zarogoulidis P, Katsikogianni F, Tsiouda T, et al. Interleukin-8 and interleukin-17 for cancer. *Cancer Invest*, 2014,32(5):197-205.

- [10] de Piano M, Cacciamani A, Balzamino BO, et al. Biomarker signature in aqueous humor mirrors lens epithelial cell activation: new biomolecular aspects from cataractogenic myopia. *Biomolecules*, 2023,13(9):1328.
- [11] Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez F, et al. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009,41(5):998-1001.
- [12] Kawai M, Inoue T, Inatani M, et al. Elevated levels of monocyte chemoattractant protein-1 in the aqueous humor after phacoemulsification. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012,53(13):7951-7960.
- [13] Jun JH, Sohn WJ, Lee Y, et al. Experimental lens capsular bag model for posterior capsule opacification. *Cell Tissue Res*, 2014,357(1):101-108.
- [14] Si W, Liu JJ, Wang YX, et al. IL-8 promotes lens capsular residual cells migration by down-regulates expression of E-cadherin and ZO-1 via the CXCR1/2 - NF- κ B - RhoA signal pathway. *Int Immunopharmacol*, 2024,142(Pt A):113074.
- [15] 包益辉. 后发性白内障的危险因素分析. 新疆医科大学, 2022.
- [16] Fong CS, Mitchell P, Rochtchina E, et al. Three-year incidence and factors associated with posterior capsule opacification after cataract surgery: The Australian Prospective Cataract Surgery and Age-related Macular Degeneration Study. *Am J Ophthalmol*, 2014,157(1):171-179.e1.
- [17] Liu ZZ, Huang S, Zheng YF, et al. The lens epithelium as a major determinant in the development, maintenance, and regeneration of the crystalline lens. *Prog Retin Eye Res*, 2023,92:101112.
- [18] Awasthi N, Wang-Su ST, Wagner BJ. Downregulation of MMP-2 and-9 by proteasome inhibition: a possible mechanism to decrease LEC migration and prevent posterior capsular opacification. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008,49(5):1998-2003.
- [19] Dawes LJ, Sleeman MA, Anderson IK, et al. TGF β /Smad4-dependent and-independent regulation of human lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009,50(11):5318-5327.
- [20] Meacock WR, Spalton DJ, Stanford MR. Role of cytokines in the pathogenesis of posterior capsule opacification. *Br J Ophthalmol*, 2000,84(3):332-336.
- [21] Hamid S, Gul A, Hamid Q. Relationship of cytokines and AGE products in diabetic and non-diabetic patients with cataract. *Int J Health Sci (Qassim)*, 2016,10(4):507-515.
- [22] Sun Q, Sun F, Wang B, et al. Interleukin-8 promotes cell migration through integrin α v β 6 upregulation in colorectal cancer. *Cancer Lett*, 2014,354(2):245-253.
- [23] Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*, 1999,398(6729):718-723.
- [24] Cooksley G, Lacey J, Dymond MK, et al. Factors affecting posterior capsule opacification in the development of intraocular lens materials. *Pharmaceutics*, 2021,13(6):860.
- [25] Ferrick MR, Thurau SR, Oppenheim MH, et al. Ocular inflammation stimulated by intravitreal interleukin-8 and interleukin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991,32(5):1534-1539.
- [26] Charo IF, Myers SJ, Herman A, et al. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994,91(7):2752-2756.
- [27] Gschwandtner M, Derler R, Midwood KS. More than just attractive: how CCL2 influences myeloid cell behavior beyond chemotaxis. *Front Immunol*, 2019,10:2759.
- [28] Zhang XT, Chen L, Zheng F, et al. The efficacy of microsurgery in the treatment of cerebral aneurysm rupture and its effect on NF- κ B, MCP-1 and MMP-9. *Exp Ther Med*, 2017,14(4):3744-3748.
- [29] Wu Z, Chang J, Ren W, et al. Bindarit reduces the incidence of acute aortic dissection complicated lung injury via modulating NF- κ B pathway. *Exp Ther Med*, 2017,14(3):2613-2618.
- [30] Zhai J, Shen JJ, Xie GP, et al. Cancer-associated fibroblasts-derived IL-8 mediates resistance to cisplatin in human gastric cancer. *Cancer Lett*, 2019,454:37-43.
- [31] Fujimoto H, Sangai T, Ishii G, et al. Stromal MCP-1 in mammary tumors induces tumor-associated macrophage infiltration and contributes to tumor progression. *Int J Cancer*, 2009,125(6):1276-1284.
- [32] Shao JZ, Qi Y, Du SS, et al. *In vitro* inhibition of proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition of human lens epithelial cells by fasudil. *Int J Ophthalmol*, 2018,11(8):1253-1257.
- [33] Pei C, Xu Y, Jiang JX, et al. Application of sustained delivery microsphere of cyclosporine A for preventing posterior capsular opacification in rabbits. *Int J Ophthalmol*, 2013,6(1):1-7.