

PEDF 对人晶状体上皮细胞生长调控的体内外研究

刘恬^{1*}, 项道满¹, 江福能²

(¹广州市妇女儿童医疗中心眼科, 广东 广州 510623; ²广州医科大学附属广州市第一人民医院, 广东省临床分子医学及分子诊断重点实验室, 广东 广州 510180)

[摘要] 目的:探讨在体内及体外色素上皮衍生因子(PEDF)对人晶状体上皮细胞(LEC)生长的调节作用。方法:体内研究用ELISA法检测年龄相关性白内障患者房水 PEDF 浓度,术中取前囊膜标本检测 LEC 密度,分析 PEDF 水平与 LEC 数量、白内障类型的关系;体外研究,加 PEDF 培养人晶状体上皮细胞株(HLE-B3),CCK8 法检测细胞生长活性,流式细胞仪通过 Annexin V-FITC/7-AAD 双染法检测细胞周期和凋亡变化。结果:120 例白内障患者房水 PEDF 浓度为(156.2 ± 41.2)ng/ml,中央区前囊下 LEC 密度随房水 PEDF 水平下降而降低($r = 0.556, P < 0.01$),控制年龄因素后仍呈正相关($r = 0.387, P < 0.05$),皮质型白内障房水 PEDF 浓度较核硬化型更低 ($P < 0.05$);体外培养的 LEC 细胞株加入 PEDF 后,细胞生长明显加快 ($F = 187.33, P < 0.01$),细胞凋亡被显著抑制,凋亡率从 13.50%降为 2.08%($t = 7.90, P < 0.01$),细胞分裂活性增强,G2 期 + S 期细胞比例从 28.54%升为 54.05%($t = 6.32, P < 0.01$)。结论:人眼内 PEDF 可能作为 LEC 营养因子发挥细胞周期调控和抗凋亡的重要作用,参与晶状体生理性状维持和白内障发生发展。

[关键词] 色素上皮衍生因子;晶状体上皮细胞/人;房水;体外培养

[中图分类号] R776

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)10-1368-05

doi:10.7655/NYDXBNS20131007

Effects of PEDF on human lens epithelial cells growth regulation *in vivo* and *in vitro*

Liu Tian^{1*}, Xiang Daoman¹, Jiang Funeng²

(¹Department of Ophthalmology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510623;

²Guangdong Key Laboratory of Clinical Molecular Medicine and Diagnostics, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate *in vivo* and *in vitro* the role of PEDF on human lens epithelial cells biological behaviour regulation. **Methods:** *In vivo* study, aqueous PEDF concentration was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in age-related cataract patients who underwent cataract phacoemulsification extraction surgery. The relationship of PEDF level was analyzed with LECs density on anterior lens capsular specimens and cataract types. *In vitro* study, PEDF was added in culture media of human lens epithelial cell line (HLE-B3). The growth activity of HLE-B3 was detected by Cell Counting Kit (CCK8). Flow cytometry with AnnexinV-FITC/7-AAD double staining method was used to detect the changes of cell cycle and apoptosis. **Results:** The mean aqueous PEDF concentration of 120 cataract cases was (156.2 ± 41.2)ng/ml. The central anterior subcapsular LEC density significantly decreased with aqueous PEDF level reducing ($r = 0.556, P < 0.01$), and the positive correlation remained after controlling the age factor ($r = 0.387, P < 0.05$). PEDF concentration in aqueous humor of cortical cataract was lower than that of nuclear sclerosis ($P < 0.05$). After adding PEDF in culture medium of HLE-B3 line, cell's growth accelerated significantly ($F = 187.33, P < 0.01$), and apoptosis was significantly inhibited (the apoptosis rate fell from 13.50% to 2.08%, $t = 7.90, P < 0.01$), and the proliferative division activity increased (cell ratio in G2+S phase rose from 28.54% to 54.05%, $t = 6.32, P < 0.01$). **Conclusion:** In human eyes, PEDF may function as LEC cytotrophic factor to play the important biological effects of cell cycle regulation and anti-apoptosis, involved in maintenance of lenticular physiological state and cataract development.

[Key words] pigment epithelium-derived factor(PEDF); lens epithelial cells(LEC)/human; aqueous humor; *in vitro*

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(10): 1368-1372]

[基金项目] 广州市医药卫生科技项目(201102A213124)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 19437716@qq.com

晶状体的发育及维持透明性状、白内障的发生及发展,关键机制均是晶状体上皮细胞(LEC)性状受到胞外信号分子和胞内基因表达的调控。色素上皮衍生因子(PEDF)是在胚胎及成体内广泛分布的多效能因子,对其他组织细胞的调控和保护功能已有深入研究,现已发现它存在于人眼房水和 LEC 中,但关于 PEDF 对 LEC 细胞周期、增殖或凋亡等性状的作用目前尚无研究。本研究通过体内及体外实验,在细胞水平探讨外源性 PEDF 对人 LEC 增殖和凋亡等生物活动的作用,旨在揭示 PEDF 在晶状体生理病理过程中可能发挥的生物学效应。

1 对象与方法

1.1 对象

选择拟手术治疗的年龄相关性白内障 120 例(120 眼),年龄 50~95 岁,平均(70.3 ± 10.8)岁,排除先天性、代谢性、继发性白内障,排除合并糖尿病、青光眼、葡萄膜炎、眼底病变、眼外伤或内眼手术史的患者。人晶状体上皮细胞系 HLE-B3 由广东省临床分子医学及分子诊断重点实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 体内研究

术前行 Pentacam Sheimpflug 照像系统(Oculus 公司,美国)白内障程序分析每例患眼晶状体核密度及混浊形态,选择其中单纯核硬化及单纯皮质混浊的典型类型各 30 例。每例患眼行常规超声乳化白内障摘除手术,术中作透明角膜切口后抽取房水 100~200 μl,环形撕囊获取晶状体中央区前囊膜(含囊下上皮细胞)直径 5.0~5.5 mm。

按 PEDF-ELISA 试剂盒(Chemicon 公司,加拿大)指导,在包埋鼠抗人 PEDF 单抗板孔内先后加入样品、生物素化鼠抗人 PEDF 单抗、链亲合素过氧化物酶、显色剂、终止液,在酶标仪测各孔 450 nm 处吸光度,先测绘出标准浓度曲线方程 $Y = 0.164 + 0.029X$,再计算各样品的 PEDF 含量。经固定的前囊膜细胞标本平铺后用苏木素伊红染色,用接目镜测微尺附件进行上皮细胞计数,测定 LEC 密度。

1.2.2 体外实验

HLE-B3 细胞株培养于 10%FBS 的 DMEM 完全培养基中,光镜下观察细胞长势良好,达 70%~90% 密度,胰酶消化细胞保存待用。

1.2.2.1 CCK8 检测细胞活性

96 孔板中配置 1 000 个细胞/100 μl 的 HLE-B3 细胞悬液预培养,实验组和对照组分别加入 10 μl

的 PEDF(Peprotech 公司,美国)和 PBS 溶液,在孵育 12、24、48 和 72 h 不同时间点加入 CCK8 溶液,各检测点分别在 0.5、1.0、2.0、4.0 h 时用酶标仪测 450 nm 处吸光度并按差异最大时间点为最终观察结果,测定细胞增殖活力,制作实验组和对照组的细胞生长曲线。

1.2.2.2 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡

实验组和对照组分别为加入 PEDF 培养及正常培养的 HLE-B3 悬浮细胞(1×10^6 个),参考磷脂酰丝氨酸试剂盒(BD 公司,美国)说明,加入 100 μl Binding Buffer 和 10 μl Annexin V-FITC,避光孵育后再先后加入 7-AAD 溶液 5 μl 和 Binding Buffer 400 μl,即用流式细胞仪进行定量测定细胞凋亡系数和细胞周期分布,以不加 Annexin V-FITC 及 7-AAD 的样品作为阴性对照来设定参数值。

1.3 统计学方法

所有实验数据均用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均做 3 次重复实验,数据统计采用 SPSS13.0 统计软件处理,计量资料分别采用重复测量数据的方差分析或两独立样本 *t* 检验,相关性用 Pearson 分析。 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 体内房水 PEDF 水平与 LEC 性状相关

120 例年龄相关性白内障患眼内房水 PEDF 浓度为(156.2 ± 41.2)ng/ml,前囊下 LEC 密度为(4 202 ± 527)个/mm²(3 360~5 228 个/mm²)。经 Pearson 分析显示房水 PEDF 浓度与中央区 LEC 密度有正相关性($r = 0.556, P < 0.01$),由于 PEDF 房水水平与年龄呈负相关关系($r = 0.469, P < 0.01$),且 LEC 数量也会随年龄减少,用偏相关分析控制年龄因素后中央区 LEC 数量仍随房水 PEDF 水平下降呈减少趋势($r = 0.387, P < 0.05$)。

由于不同类型白内障的 LEC 性状有差异,选择典型的核硬化型及皮质混浊型的房水 PEDF 浓度分别为(163.2 ± 31.8)ng/ml、(142.3 ± 28.7)ng/ml,经单因素方差分析显示皮质型白内障的房水 PEDF 水平较核硬化型白内障更低($P < 0.05$)。

2.2 体外 PEDF 促进 LEC 增殖

在活跃增殖的人晶状体上皮细胞株 HLE-B3 的培养液中未检测到 PEDF 免疫活性。

加入 PEDF 培养 HLE-B3,在 12、24、48 和 72 h 连续观察细胞形态并检测细胞增殖活性。对比加入 PBS 的细胞株,细胞形态无明显变化,随着培养时间

的延长实验组细胞增殖较对照组明显加快,两组生长曲线有显著差异($F = 187.33, P < 0.01$,图1)。

2.3 体外PEDE抑制LEC凋亡

利用流式细胞仪定量检测荧光标记的正常培养及加入PEDF培养的HLE-B3细胞株的细胞凋亡情况和细胞周期变化。对照组及实验组的凋亡系数分别为(13.50 ± 0.72)%、(2.08 ± 0.48)%,加入PEDF

培养的细胞凋亡被显著抑制($t = 7.90, P < 0.01$,图2)。细胞周期的G2期和S期为细胞分裂活动强弱主要指标,对照组G2期和S期所占比例分别为10.08%和18.45%,而同时期实验组G2期和S期所占比例分别为24.86%和29.19%,加入PEDF培养比正常培养的细胞活跃增殖的细胞比率明显增加($t = 6.32, P < 0.01$,图3)。

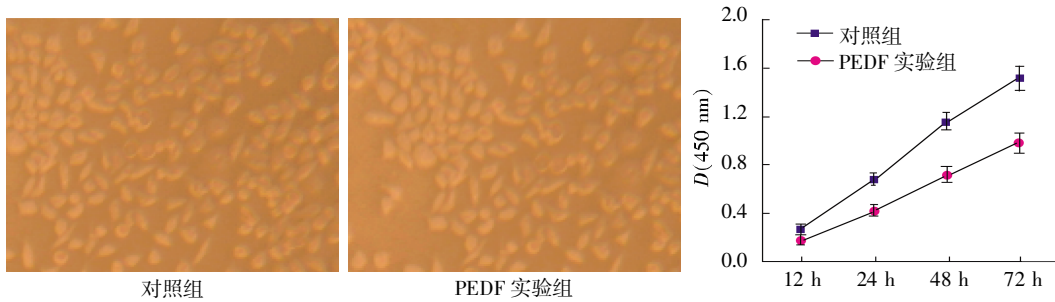


图1 PEDF作用HLE-B3后的细胞形态及增殖情况
Figure 1 Cellular morphology and proliferation of HLE-B3 treated with PEDF

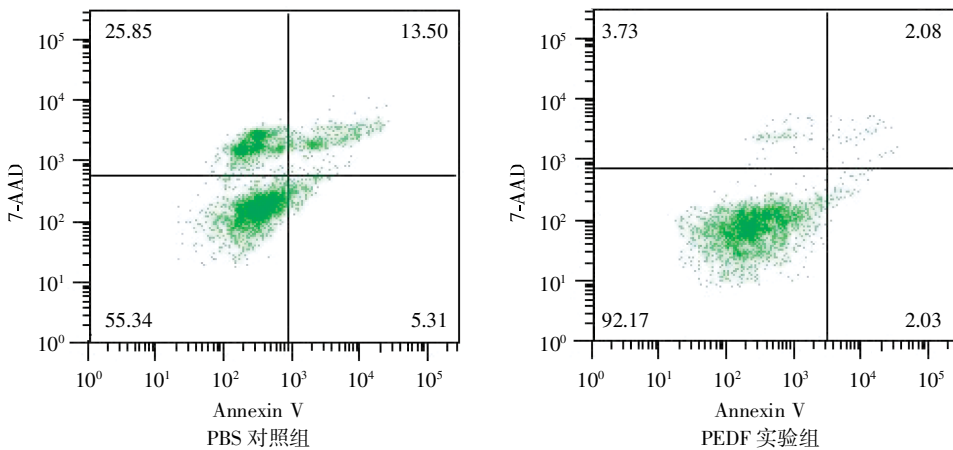


图2 流式细胞仪检测凋亡结果
Figure 2 Cellular apoptosis of HLE-B3 treated with PEDF by flow cytometry

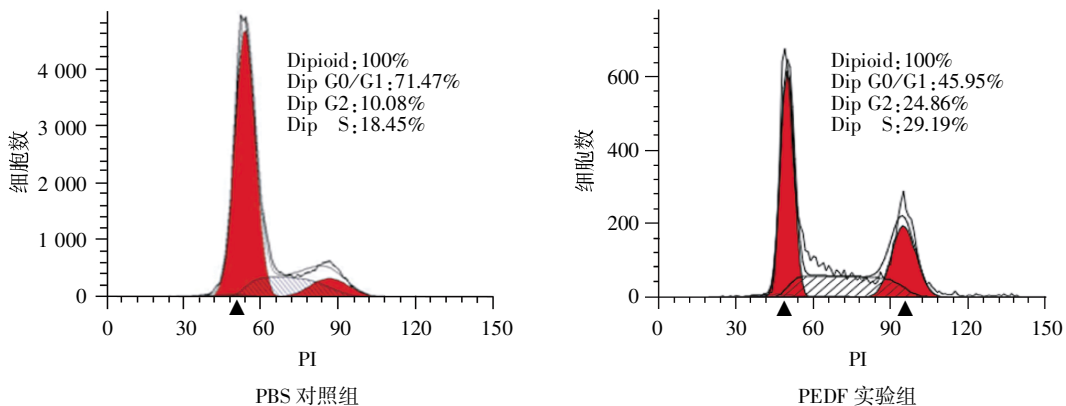


图3 流式细胞仪检测细胞周期结果
Figure 3 Cell cycles of HLE-B3 treated with PEDF by flow cytometry

3 讨 论

晶状体无血管神经支配,其发育、老化和病变发生发展均与房水中的晶状体细胞调控信号有密切关系。目前已经在人眼房水中发现了多种细胞因子,对细胞的生长、分化、凋亡具有或促进或抑制的功能,各因子还可相互诱生或拮抗,构成了调节 LEC 生命活动的复杂的细胞因子网络^[1]。PEDF 在胚胎及成体内广泛存在,对不同组织细胞类型呈现不同生物学效应。人胚胎 7 周龄始在眼内多种细胞中合成 PEDF,房水中的 PEDF 主要来源于视网膜和睫状体细胞^[2],并且房水 PEDF 水平有随年龄下降的特点^[3],前囊下 LEC 中也被发现 PEDF 的基因表达及其水平下调与年龄相关性白内障有关^[4]。然而 PEDF 对 LEC 性状的影响尚无进一步研究。

本研究先在体内研究中发现了人眼中央区 LEC 密度随房水 PEDF 水平降低而减少,以及皮质型白内障的房水 PEDF 更低的临床特征,继而在体外实验中揭示了 PEDF 参与 LEC 细胞周期调控并发挥促增殖、抗凋亡的作用。

PEDF 具有细胞类型特异性功能,已知其多效能性包括^[5-8]:①细胞寿命相关因子,PEDF 是年轻细胞或 G0 期细胞的特征性表达基因,反映细胞增殖潜能,在体内外常随组织细胞的衰老而下调,PEDF 处理的培养液可明显延长原代细胞的生存时间和传代次数;②细胞营养因子或保护因子,PEDF 在体内外可促进多种细胞的生长和分化,还可维持干细胞的存活及多向能生物活性,可通过 NF- κ B 介导等信号转导通路上调 Bcl-2 等基因抑制各种应激或损伤诱导的细胞凋亡,也可通过抑制胞内活性氧簇发挥抗氧化作用;③最强效的血管生成抑制因子;④天然的肿瘤抑制因子。

目前认为眼内 PEDF 的作用主要是保护及促进视网膜分化、抑制异常血管生成^[9]。根据本文体外实验结果,加入 PEDF 后,可增加 LEC 的增殖活性却未诱导分化,可通过抗凋亡促进 LEC 生长。因此本研究认为房水中的 PEDF 除了维持晶状体无血管化,还可作为信号因子参与 LEC 的细胞周期调控及营养保护,影响晶状体的生理病理过程。

晶状体细胞终生生长,生理状态下,中央区 LEC 多处于 G0 期并保持增殖潜能,赤道前生发区 LEC 活跃分裂,至赤道部适时脱离生长周期得以终末分化,房水中细胞因子网络的平衡调控必然对维持这个动态过程起了重要作用^[1]。晶状体细胞增殖

活性随年龄逐渐降低,胞外促进细胞增殖的因子下调是重要原因之一。本研究发现房水 PEDF 浓度随年龄减少的同时也与 LEC 密度有正相关性,提示 PEDF 可通过旁分泌方式发挥促进生发区细胞增殖活性及保护中央区细胞增殖潜能的作用,参与晶状体正常生长发育。

年龄相关性白内障是组织衰老性的病变。根据衰老的细胞学说和氧化学说,细胞衰老及凋亡是机体老化的物质基础,自由基累积反应是机体衰老的生化基础。晶状体终生处于紫外线、钙超载、氧化剂等引起的应激中,LEC 作为晶状体结构、代谢、功能的中心和第一道防线,细胞衰老以及多种刺激诱导的细胞氧化损伤和凋亡是晶状体老化、白内障发生发展的基本特征^[10]。已知 PEDF 下调与衰老的关系密切,而且 PEDF 可通过抑制胞内自由基、维持胞内钙平衡、激活多种抗凋亡蛋白表达等机制促进细胞生存。本研究进一步证实了 PEDF 也可维持 LEC 活性、抑制 LEC 凋亡,符合白内障眼内中央区 LEC 数量随着房水 PEDF 水平下降而减少的临床检测结果。因此推断 PEDF 可介导某些信号系统起抗氧化抗凋亡的作用来保护中央区 LEC,是 LEC 营养因子和晶状体防御体系的一部分,其水平下降可降低 LEC 的抗应激能力导致损伤和凋亡的增多,从而参与白内障发生发展的病理过程。

病理研究显示,白内障的早期改变是中央区 LEC 损伤及赤道部结构紊乱,组织发生学基础之一就是 LEC 发生不同程度的凋亡和增殖分化异常,这受到胞内基因改变及胞外调节因子失衡等多种因素影响^[11]。不同类型白内障在病理机制上是有区别的,研究发现核硬化型白内障 LEC 增殖抑制较弱,而皮质型白内障表现出更多的中央区 LEC 凋亡、生发区 LEC 生长抑制且异常转分化^[12],这与本课题组发现的皮质型白内障房水 PEDF 浓度更低的结果相符。推测在核硬化型白内障 PEDF 等促增殖因子水平相对较高可使核密度不断升高,在皮质型白内障 PEDF 水平较低可使 LEC 增殖活性和抗凋亡能力降低,提示 PEDF 与不同类型白内障的病理过程均有关。

本研究着眼于在体内外 PEDF 与 LEC 的关系,首次揭示 PEDF 对 LEC 具有促增殖和抗凋亡的功能,提出 PEDF 可能作为晶状体上皮细胞营养因子发挥重要的生物学效应,为后续的晶状体发育、白内障致病的分子机制研究奠定了必需的理论基础。

[参考文献]

- [1] Lovicu FJ, McAvoy JW. Growth factor regulation of lens development[J]. *Develop Biol*, 2005, 280(1):1-14
- [2] Karakojis PC, John SK, Behling KC, et al. Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues [J]. *Molecular Vision*, 2001, 7: 154-163
- [3] Liu T, Liu Y, Wu M. Pigment epithelium-derived factor in cataractous humor and lens epithelial cells [J]. *Eye Science*, 2006, 22(1):40-46
- [4] 刘恬, 刘奕志, 项道满. 色素上皮衍生因子在人晶状体上皮细胞表达的意义 [J]. *国际眼科杂志*, 2011, 6: 973-975
- [5] Tombran-Tink J, Bamstable CJ. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4(8):628-636
- [6] Francis MK, Appel S, Meyer C, et al. Loss of EPC-1/PEDF expression During Skin aging *in vivo* [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 122(5):1096-1105
- [7] Amanoa S, Yamagishia S, Inagaki Y, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits oxidative stress-induced apoptosis and dysfunction of cultured retinal pericytes [J]. *Microvascu Res*, 2005, 69(1-2):45-55
- [8] Kolomeyer AM, Sugino IK, Zarbin MA. Characterization of conditioned media collected from cultured adult versus fetal retinal pigment epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(8):5973-5986
- [9] Barnstable CJ, Tombran-Tink J. Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye; molecular targets and therapeutic potential [J]. *Prog Retinal Eye Res*, 2004, 23(5):561-577
- [10] Babizhayev MA, Vishnyakova KS, Yegorov YE. Telomere-dependent senescent phenotype of lens epithelial cells as a biological marker of aging and cataractogenesis; the role of oxidative stress intensity and specific mechanism of phospholipid hydroperoxide toxicity in lens and aqueous [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2011, 25(2):139-162
- [11] Beebe D. The lens, Adler's physiology of the eye [M]. In: Kaufman, ed. St. Louis: Mosby, 2003:158
- [12] Martinez G, de Iongh RU. The lens epithelium in ocular health and disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(12):1945-1963

[收稿日期] 2023-06-27

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》编辑部
荣获第四届江苏省科技期刊“金马奖”优秀团队奖!