

TGF- β 1 诱导人 Tenon 囊成纤维细胞增殖及其机制

童俊¹,周宁天²,袁志兰^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院眼科,²心内科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:观察 TGF- β 1 是否促进人 Tenon 囊成纤维细胞(HTFs)增殖并且探讨其作用机制。方法:用 TGF- β 1(0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/ml)作用于体外培养的 3~6 代 HTFs 24 h,CCK-8 法、EdU 染色法检测其增殖;采用 Western blot 法检测 HTFs 中 RhoE 的表达及其下游细胞增殖相关蛋白 cyclinD1 和增殖细胞核抗原(PCNA)的表达,用慢病毒建立 RhoE 敲降细胞系。结果:TGF- β 1 可以剂量依赖性促进 HTFs 增殖,以 5 ng/ml TGF- β 1 处理后有统计学差异,EdU 掺入法检测发现,5 ng/ml TGF- β 1 组 EdU 标记率明显高于对照组。5 ng/ml TGF- β 1 组 HTFs 中 RhoE 蛋白的表达平均灰度值明显低于对照组,细胞增殖相关蛋白 cyclinD1、PCNA 的表达平均灰度值高于对照组。细胞中 RhoE 沉默后,CCK-8 法检测细胞活力较对照组上升,流式细胞术发现 S 期也升高,cyclinD1、PCNA 灰度值也上升。结论:TGF- β 1 可以通过降低 RhoE 引起下游周期蛋白 cyclinD1 的表达升高,诱导人 Tenon 囊成纤维细胞增殖。

[关键词] TGF- β 1;成纤维细胞;细胞增殖;青光眼

[中图分类号] R775

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)04-452-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140410

TGF- β 1 induces proliferation of human Tenon capsule fibroblast and its mechanism

Tong Jun¹,Zhou Ningtian²,Yuan Zhilan^{1*}

(¹Department of Ophthalmology,²Department of Cardiology,the First Affiliated Hospital of NJMU,Nanjing 210029,China)

[Abstract] **Objective:**To determine whether TGF- β 1 induces the proliferation of Tenon capsule fibroblast (HTFs) and explored its mechanism. **Methods:***In vitro* cultured 3~6 generations of HTFs were treated with various doses of TGF- β 1 (0,0.5,1.0,2.0,5.0 and 10.0 ng/ml) for 24 h. Cell proliferation was detected by the cell counting kit-8 (CCK-8) assay and 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) incorporation assay. The expression of RhoE and its downstream cell cycle related protein cyclinD1 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were detected by Western blot assay. The lentivirus was performed to establish the RhoE knockdown cell lines. **Results:**The proliferation of the TGF- β 1-treated HTFs increased in a dose-dependent manner. Treatment with 5 ng/ml TGF- β 1 caused a significant difference. EdU incorporation assay showed that the EdU labeling rate in the 5 ng/ml TGF- β 1 group were higher than that in the control group. The average gray value of the expression of RhoE protein in HTFs in the 5 ng/ml TGF- β 1 group was lower than that in the control group,while The average gray value of the expressions of cell proliferation protein cyclinD1 and PCNA were higher than those in the control group. After RhoE silenced in the cell,an increase of cell proliferation was detected by CCK-8 assay compared to the control group,flow cytometry showed that S period also increased and the gray value of cell proliferation protein cyclinD1 and PCNA were increased. **Conclusion:**TGF- β 1 increases the expression of downstream cell cycle related protein cyclinD1 via downregulating RhoE,and induces the proliferation of Tenon capsule fibroblast.

[Key words] TGF- β 1;fibroblast;cell proliferation;glaucoma

[Acta Univ Med Nanjing,2014,34(04):452-456,477]

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81271001)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:zhilanyuan@vip.sina.com

青光眼是由于高眼压引起的视神经损伤和视野缺损,是全球第二大致盲性眼病^[1-2]。目前,滤过性手术被认为是降低眼压延缓视神经损伤及视野缺损最有效的方法。手术区域滤过道通畅使得前房水进入

结膜下的外引流是降低眼压的关键^[3-5]。据报道,青光术后手术区域结膜囊下成纤维细胞的增殖,细胞外基质沉积、胶原生成增加导致瘢痕的形成进而导致外引流率下降是手术失败的主要原因^[6-7]。转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是一种多功能细胞因子,具有调节细胞增殖、分化和促进细胞外基质产生等功能,其中调节细胞增殖是 TGF- β 1 的一个重要作用^[8]。滤过手术后,炎症反应激活静止期的 TGF- β 1 以及血-房水屏障破坏释放的 TGF- β 1 使得手术区域长期受到 TGF- β 1 的刺激,进而导致细胞增殖,瘢痕形成^[9]。目前临床上主要使用丝裂霉素 C(mitomycin, MMC)和 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)抗瘢痕,但是不可避免地带来一系列并发症^[10]。

前期研究发现,细胞生长周期负性调控基因 RhoE 可以调控细胞周期因子 cyclinD1^[11-12]。本实验体外培养成纤维细胞,通过探讨 TGF- β 1 与 RhoE 的相互作用,阐明成纤维细胞增殖、瘢痕形成的相关机制,为提升后期临床手术治疗成功率提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

胰蛋白酶、DMEM 培养基(Gibco 公司,美国);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK8, Dojindo 公司,日本);5-ethynyl-2-deoxyuridine(EdU, Invitrogen 公司,美国);TGF- β 1(PeproTech 公司,美国);Hochest33342 (life 公司,美国);Lipofectamine2000 (Invitrogen 公司,美国);BCA 蛋白定量试剂(Thermo 公司,美国);ELX800 酶标光度仪(BioTek 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人 Tenon 囊组织取材于南京医科大学第一附属医院眼库,眼球离体不超过 6 h。无菌操作取材后原代细胞培养及传代用含双抗(100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素)及 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)DMEM 培养基,置于 37℃体积分数 5%CO₂ 的细胞培养箱中进行。以细胞从组织中爬出为 0 代细胞,待细胞长满细胞培养皿约 90%密度时,用 25%胰蛋白酶进行消化传代。取 3~6 代生长状态良好的细胞进行实验。

1.2.2 CCK-8 比色法检测人 Tenon 囊成纤维细胞 HTFs 活性

采用 CCK-8 法检测细胞增生活性。HTFs 消化悬浮,以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板,每孔 100 μ l,每组设有 3 个复孔,无血清培养基饥饿过夜后加入含 TGF- β 1 浓度为 0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/ml 的无血清 DMEM 培养 24 h 后,加入 10 μ l CCK-8 后继续于 37℃,体积分数为 5%CO₂ 细胞培养箱中培养 2 h,每孔的光密度值(450 nm)用 ELX800 酶标光度仪进行比色,然后计算 3 个复孔平均值。

1.2.3 EdU 掺入法检测细胞增殖

生长状态良好的细胞接种于 24 孔板,对照组和处理组各设 3 个复孔,处理组加入 5 ng/ml TGF- β 1,两组细胞孵育 16 h 后,加入终质量浓度为 10 μ mol/L 的 EdU,继续培养 8 h,加入 3.7%多聚甲醛固定 15 min,3%BSA 洗 2 遍,加入 0.5%TrtonX-100 室温孵育 20 min,3%BSA 洗 2 遍,加入 Click-IT reaction cocktail,避光放置 30 min,3%BSA 洗 1 遍,HOECHST33342 避光孵育 30 min,PBS 洗 2 遍,荧光显微镜下观察并照相,计算 EdU 的标记率。

1.2.4 Western blot 法检测 RhoE、cyclinD1、PCNA 的蛋白含量

成纤维细胞接种于 6 cm 皿中,不同处理的细胞用冰 PBS 清洗 3 遍,每皿加入 60 μ l 十二烷基硫酸钠细胞裂解液(radio immunoprecipitation assay, RIPA)和 0.6 μ l 苯甲磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)进行细胞裂解,裂解后的细胞在 4℃,14 000 g,10 min 高速离心机离心,取上清液,BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。上清中加入 5 \times Buffer 100℃加热 5 min。取变性后的蛋白 10 μ l 进行凝胶电泳,再进行转膜,5%脱脂奶粉封闭,分别用抗 PCNA(1:800, CST 公司,美国)、抗 RhoE(1:1 000, R&D 公司,美国)、抗 cyclinD1(1:500, Santa Cruz 公司,美国)、抗 GAPDH(1:1 000, CST 公司,美国)孵育,4℃过夜。磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗膜 3 遍,孵鼠抗或者兔抗二抗(1:5 000, Abcam 公司,美国)1 h, ECL 发光液下显影。

1.2.5 慢病毒载体建立 RhoE 敲除细胞系

重组的慢病毒表达载体(干扰靶序列:5'-TAAGTAGAGCTCTCCAATCA-3')以及包装质粒(上海吉满生物科技有限公司)通过 Lipofectamine2000 共同转染 293T 细胞进行慢病毒包装,48 h 后收集上清、浓缩、测定滴度。将获得的慢病毒加入聚凝胺及嘌呤霉素感染 HTFs,96 h 后筛选感染效率高的细胞作为 RhoE 敲降(knockingdown, KD)组进行后续

实验。阴性对照慢病毒载体 (序列:5'-GTCCCG-GATACCTAATAAAA-3')采取上述方式构建,阴性对照(negative control,NC)组;未感染慢病毒的为空白对照(blank control,BC)组。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期

生长状态良好的成纤维细胞消化悬浮种于 2 个 6 cm 皿中,加入无血清 DMEM 饥饿 24 h,其中一皿接种 RhoE 敲降组(KD 组)细胞,另外一皿接种阴性对照慢病毒感染组(NC 组)细胞,24 h 后,用胰蛋白酶消化,冰 PBS 清洗 2 遍后,用 70%酒精固定,4℃过夜后,PBS 洗去固定液,加入 100 μl RNase 酶 37℃水浴 30 min,加入 400 μl 碘化丙啶(propidium iodide,PI),流式细胞仪检测细胞增殖。实验数据用 ModFit 2.0 软件分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,数据采用配对 *t* 检验及 SNK 法两两比较。 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 法检测不同浓度 TGF-β1 对 HTFs 的增殖作用

不同浓度 TGF-β1 (0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/ml)

处理 HTFs 24 h 后,CCK-8 法检测细胞活性有不同程度的增加,呈剂量依赖性。5.0、10.0 ng/ml TGF-β1 与 0 ng/ml TGF-β1 相比,差异有统计学意义。0.5、1.0、2.0 ng/ml 与 0 ng/ml TGF-β1 相比,差异无统计学意义。所以,本实验处理组选取 5 ng/ml TGF-β1 进行处理(图 1)。

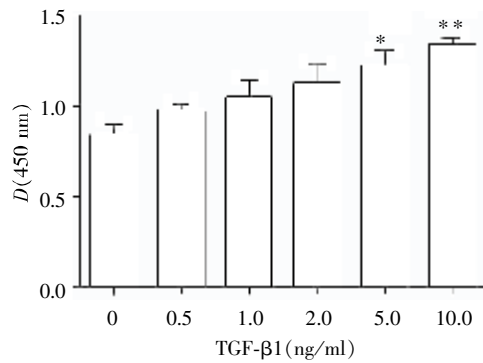


图 1 不同质量浓度 TGF-β1 作用后 HTFs 细胞活力
Figure 1 HTFs viability after treatment with different concentration of TGF-β1

2.2 EdU 掺入法检测 TGF-β1 对 HTFs 增殖能力的影响

EdU 法检测结果显示 5 ng/ml TGF-β1 作用 HTFs 24 h 后,EdU 的标记率明显高于对照组 ($P < 0.01, n = 3$,图 2)。

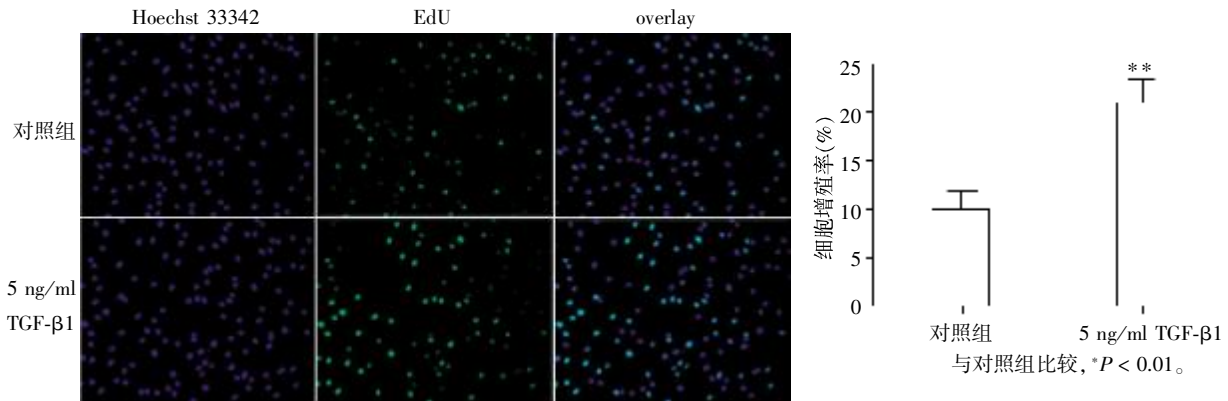


图 2 EdU 法检测 TGF-β1 对 HTFs 增殖能力
Figure 2 HTFs proliferation using EdU incorporation assay after treated with TGF-β1

2.3 TGF-β1 对 HTFs 中 RhoE、cyclinD1、PCNA 含量的影响

Western blot 法检测显示,与对照组相比,5 ng/ml TGF-β1 处理 HTFs 24 h 后,细胞中 RhoE 表达下降,RhoE 下游蛋白周期蛋白 cyclinD1 表达上升,PCNA 表达也上升($P < 0.01, n = 3$,图 3)。

2.4 慢病毒对 HTFs 细胞 RhoE 表达的沉默效果

分别提取空白对照组(BC)、阴性对照组(NC)以

及 RhoE 敲除组(KD)细胞总蛋白,Western blot 法检测 HTFs 中 RhoE 的表达(图 4)。KD 组与 BC 组、NC 组相比 RhoE 表达明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01, n = 3$)。

2.5 RhoE 沉默对 HTFs 细胞增殖的影响

慢病毒感染降低 HTFs 中 RhoE 的表达后,CCK-8 法检测细胞活性,KD 组较 NC 组上升(图 5A)。流式细胞术检测细胞周期显示 KD 组处于 S 期

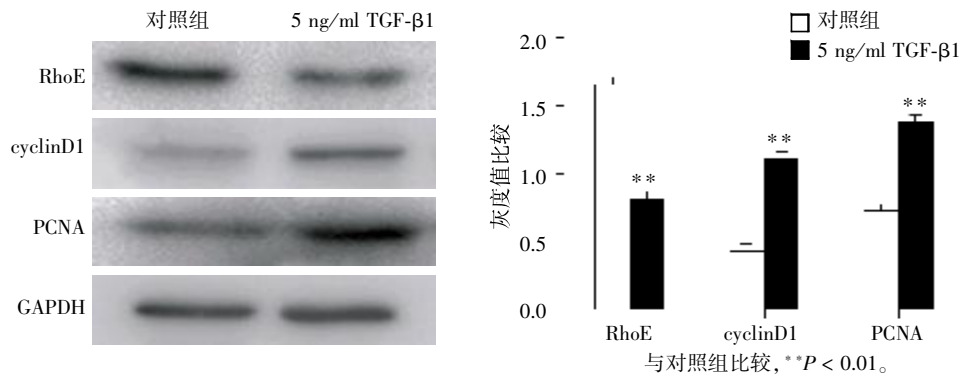


图 3 5 ng/ml TGF-β1 处理 HTFs 后 RhoE、cyclinD1、PCNA 蛋白表达

Figure 3 The expressions of RhoE, cyclinD1 and PCNA after treated with 5 ng/ml TGF-β1

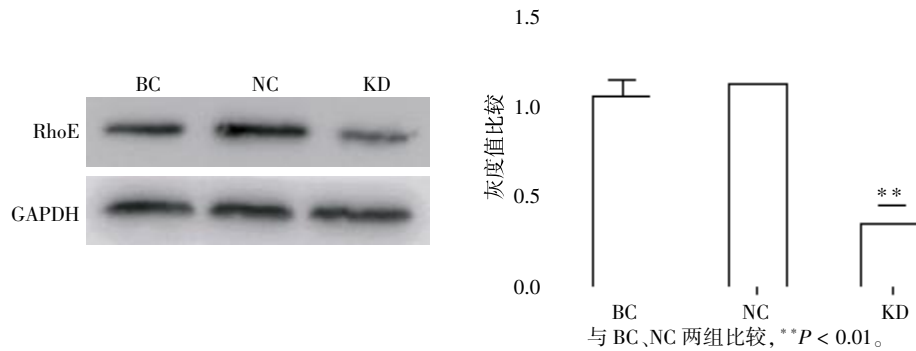
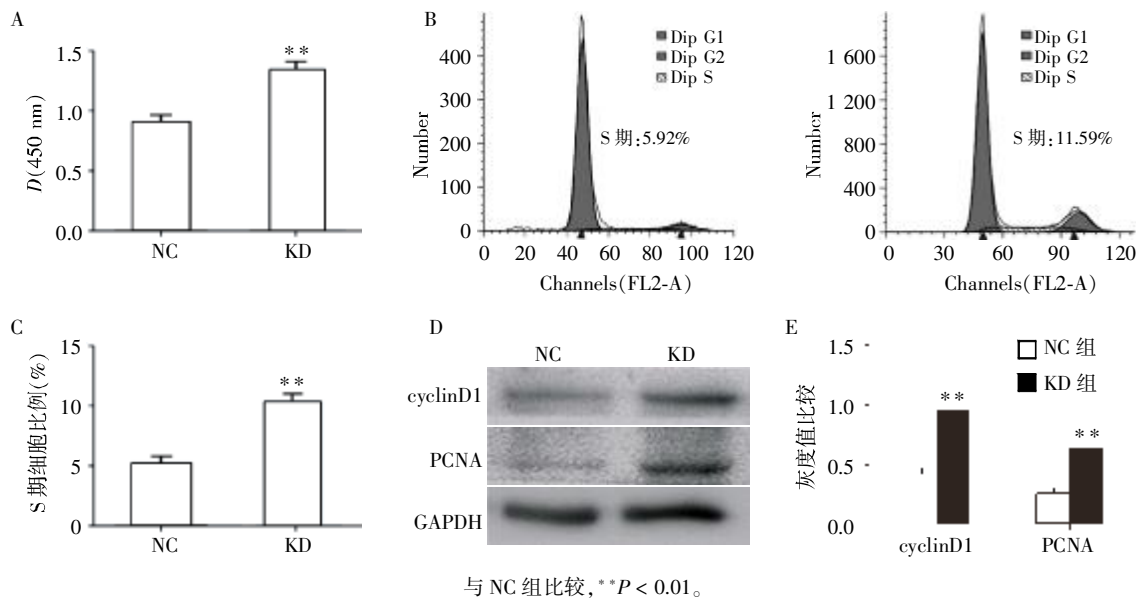


图 4 Western blot 法检测 RhoE 沉默效果

Figure 4 RhoE silence effect detected by Western blot



与 NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 5 RhoE 沉默后 HTFs 增殖

Figure 5 HTFs proliferation after RhoE knockdown

的细胞比例高于 NC 组(图 5B、C)。Western blot 法检测细胞周期蛋白 cyclinD1、PCNA 的表达高于 NC 组,差异具有统计学意义($P < 0.01$,图 5D)。

3 讨论

TGF-β1 与青光眼密切相关,Jampel 等^[13]检测出

房水中存在 TGF- β , Tripathi 提出原发性开角型青光眼的发病机制与 TGF- β 1 的异常合成、分泌、活化和清除有关^[14], 青光眼手术后, 创伤炎症等导致瘢痕形成的因子大量分泌, TGF- β 1 分泌早而且持续高表达, 有学者在小鼠球结膜下注射 TGF- β 1, 小鼠结膜瘢痕形成^[15]。本实验发现, 不同浓度 TGF- β 1 作用于 HTFs 后, CCK-8 法检测细胞增生能力增强, 呈现剂量依赖性, EdU 掺入法检测发现 EdU 标记的细胞比例增加, 可以认为 TGF- β 1 促进成纤维细胞的增殖。对于抑制术后青光眼瘢痕, 曾有学者用重组的单克隆抗 TGF- β 抗体抗青光眼术后瘢痕形成取得成功^[16]。但是抗 TGF- β 单克隆抗体具有抑制炎症、抑制免疫、抑制上皮细胞增殖等作用, 会给机体带来不良反应。需要寻求新的方法既能够阻断 TGF- β 1 诱导的球结膜下成纤维细胞的增殖及瘢痕化, 又避免不良生物学效应。

RhoE 又称 RND3, 是 foster 等在 1996 年时采用酵母双杂交的方法发现并命名的, 是 Rho 家族重要成员之一, RhoE 与肿瘤细胞的迁移、增殖等多种生物行为密切相关^[11-12, 17]。有报道, 在 MDCK 细胞中, RhoE 可以抑制 cyclinD1 生成, 阻止细胞从 G1/S 期进入 S 期。RhoE 还可以通过 ERK 激活下调 cyclinD1 的生成^[18]。ROCK I 是 Rho 家族成员之一, 在球结膜下成纤维细胞中已经证明阻断 Rho/ROCK 能够抑制细胞增殖^[9]。RhoE 可以通过调节 cyclinD1 抑制 NIH 3T3 细胞增殖^[19]。由于 cyclinD1 对于细胞周期的增殖起着至关重要的作用。目前尚未明确 TGF- β 1 促进 HTFs 增殖过程中 RhoE 是否发挥作用。因此本文设计实验研究 RhoE 在 HTFs 增殖过程中的作用。TGF- β 1 作用 HTFs 后, Western blot 结果显示处理组较对照组 RhoE 表达含量下降, 其下游调控的 cyclinD1 表达上升。进一步将 HTFs 中 RhoE 敲降, 流式细胞术检测细胞周期, S 期升高, Western blot 显示 cyclinD1、PCNA 也升高。以上实验结果显示, RhoE 参与 TGF- β 1 引起的 HTFs 细胞增殖。

总之, TGF- β 1 可以明显促进结膜囊下成纤维细胞的增殖, 在增殖过程中, RhoE 发挥了重要作用, 其确切的信号通路有待进一步研究。在此基础上, 可以模拟青光眼术后结膜下瘢痕的形成过程, 为临床上寻找新型的抗青光眼术后瘢痕制剂提供理论基础。

[参考文献]

[1] Moore DB, Tomkins O, Ben-Zion I. A review of primary

congenital glaucoma in the developing world [J]. *Surv Ophthalmol*, 2013, 58(3): 278-285

- [2] Lim TC, Chattopadhyay S, Acharya UR. A survey and comparative study on the instruments for glaucoma detection [J]. *Med Eng Phys*, 2011, 34(2): 129-139
- [3] Freiberg FJ, Matlach J, Grehn F, et al. Postoperative subconjunctival bevacizumab injection as an adjunct to 5-fluorouracil in the management of scarring after trabeculectomy [J]. *Clin Ophthalmol*, 2013, 7: 1211-1217
- [4] Seibold LK, Sherwood MB, Kahook MY. Wound modulation after filtration surgery [J]. *Surv Ophthalmol*, 2012, 57(6): 530-550
- [5] Migdal C, Gregory W, Hitchings R. Long-term functional outcome after early surgery compared with laser and medicine in open-angle glaucoma [J]. *Ophthalmology*, 1994, 101(10): 1651-1656
- [6] Chung EJ, Lee HK, Jung SA, et al. Transduction of PTEN proteins using the tat domain modulates TGF-beta1-mediated signaling pathways and transdifferentiation in subconjunctival fibroblasts [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(1): 379-386
- [7] Fuchshofer R, Kottler UB, Ohlmann AV, et al. SPARC is expressed in scars of the Tenon's capsule and mediates scarring properties of human Tenon's fibroblasts in vitro [J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 177-185
- [8] Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins PJ. TGF- β signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(1): 264-268
- [9] Zhang XH, Sun NX, Feng ZH, et al. Interference of Y-27632 on the signal transduction of transforming growth factor beta type 1 in ocular Tenon capsule fibroblasts [J]. *Int J Ophthalmol*, 2012, 5(5): 576-581
- [10] 骆贵军. 丝裂霉素 C 应用于青光眼手术后并发症 [J]. *中国实用医药*, 2009, 25(4): 101-102
- [11] Chardin P. Function and regulation of Rnd proteins [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(1): 54-62
- [12] Riou P, Villalonga P, Ridley AJ. Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression [J]. *Bio Essays*, 2010, 32(11): 986-992
- [13] Jampel HD, Roche N, Stark WJ, et al. Transforming growth factor- β in human aqueous humor [J]. *Curr Eye Res*, 1990, 9(10): 963-969
- [14] Tripathi RC, Li J, Borisuth NS, et al. Trabecular cells of the eye express messenger RNA for transforming growth factor-beta 1 and secrete this cytokine [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993, 34(8): 2562-2569
- [15] Tripathi RC, Li J, Chalam KV, et al. Expression of growth

(下转第 477 页)

- porous scaffolds from mineralized collagen [J]. *J Biomed Mater Res*, 2009, 90(3): 852-862
- [12] Okumura M, Ohgushi H, Dohi Y, et al. Osteoblastic phenotype expression on the surface of hydroxyapatite ceramics [J]. *J Biomed Mater Res*, 1997, 37(1): 122-129
- [13] 袁 华, 陈 宁, 吕晓迎, 等. 天然羟基磷灰石-壳聚糖复合材料修复骨缺损的实验研究 [J]. *口腔医学*, 2005, 25(2): 65-67
- [14] Li T, Takikawa K, Yoshizawa K, et al. Reaction of hydroxyapatite-sol in bone marrow [J]. *Biomed Mater Eng*, 1995, 5(2): 83-92
- [15] Hu X, Zhang X, Dai L, et al. Histone deacetylase inhibitor trichostatin a promotes osteogenic differentiation of rat adipose-derived stem cells by altering the epigenetic modifications on Runx2 promoter in a BMP signaling-dependent manner [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(2): 248-255
- [16] 杨 舸, 朱 静. 曲古抑菌素干预骨髓间充质干细胞向心肌细胞特化体外实验 [J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(4): 389-392
- [17] Richon VM, O'Brien JP. Histone deacetylase inhibitors: a new class of potential therapeutic agents for cancer treatment [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(3): 662-664
- [18] Lee MH, Kim YJ, Yoon WJ, et al. Dlx5 specifically regulates Runx2 type II expression by binding to homeodomain-response elements in the Runx2 distal promoter [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(42): 35579-35587
- [19] Govender S, Csimma C, Genant HK, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2002, 84-A(12): 2123-2134
- [20] Sasano Y, Ohtani E, Narita K, et al. (1993). BMPs induce direct bone formation in ectopic sites independent of the endochondral ossification *in vivo* [J]. *Anat Rec*, 236(2): 373-380
- [21] Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder [J]. *Nat Mater*, 2007, 6(12): 997-1003
- [收稿日期] 2013-10-27

.....

(上接第 456 页)

- factor mRNAs by human Tenon's capsule fibroblasts [J]. *Exp Eye Res*, 1996, 63(3): 339-346
- [16] Cordeiro MF, Gay JA, Khaw PT. Human anti-transforming growth factor- β 2 antibody: a new glaucoma anti-scarring agent [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(10): 2225-2234
- [17] Foster R, Hu KQ, Lu Y, et al. Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and *in vivo* farnesylation [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(6): 2689-2699
- [18] Riento K, Totty N, Villalonga P, et al. RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation [J]. *EMBO J*, 2005, 24(6): 1170-1180
- [19] Villalonga P, Guasch RM, Riento K, et al. RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(18): 7829-7840
- [收稿日期] 2013-12-23