

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.17.003

高浓度葡萄糖诱导人晶状体上皮细胞发生 EMT*

刘蕊 周健[△] 李宝海 陈媛媛 李东旭

(第四军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所 陕西 西安 710032)

摘要 目的:观察高浓度葡萄糖诱导人晶状体上皮细胞发生上皮-间质转分化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)。**方法:**将人晶状体上皮细胞 HLE-B3 系分别培养在正常葡萄糖浓度(5.5 mmol/L)DMEM 培养基和高浓度葡萄糖(35.5 mmol/L)的 DMEM 培养基中 24 小时,于培养的 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 在倒置显微镜下观察细胞形态学变化,采用免疫荧光染色检测晶状体上皮细胞中 EMT 相关蛋白 E-cadherin 及 α -SMA 的表达变化。**结果:**与正常糖浓度组相比,随着时间的延长高糖组细胞逐渐丢失上皮细胞形态,细胞变细、变长,向纤维细胞的形态转变;同时随着时间的延长,高糖组晶状体上皮细胞中 E-cadherin 染色的荧光强度在各时间点均低于正常糖浓度组,而 α -SMA 的荧光强度却明显高于正常糖浓度组,在 6 h 和 12 h 时差异显著,有统计学意义($P < 0.01$)。**结论:**高浓度葡萄糖诱导人晶状体上皮细胞发生上皮-间质转分化。

关键词:葡萄糖;人晶状体上皮细胞;上皮-间质转分化

中图分类号:R-33;R776.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)17-3212-04

High Glucose Induced EMT of Human Lens Epithelial Cells*

LIU Rui, ZHOU Jian[△], LI Bao-hai, CHEN Yuan-yuan, LI Dong-xu

(Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Eye Institute of PLA, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of high glucose on epithelial-to-mesenchymal transition of human lens epithelial cells (HLEs). **Methods:** HLE-B3 cells were cultured in medium DMEM with normal glucose (5.5 mmol/L) or high glucose (35.5 mmol/L). After incubation of 0 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h, the morphological changes of HLEs were observed under the inverted microscope. The alterations of the expression level of E-cadherin and α -SMA in the HLEs were detected by immunofluorescence staining. **Results:** After high glucose induction, the morphology of HLE-B3 cells changed from polygon to spindle shape. Meanwhile, immunofluorescence staining showed that the fluorescence intensity of E-cadherin was lower in the high glucose group than that in the normal glucose group at all time points, and the expression of α -SMA was higher in the high glucose group than that in the normal glucose group, with significant differences at 6 h and 12 h time points ($P < 0.01$). **Conclusions:** High glucose may induce epithelial-to-mesenchymal transition in human lens epithelial cells.

Key words: Glucose; Human lens epithelial cells; Epithelial-to-mesenchymal transition

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R776.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)17-3212-04

前言

随着糖尿病患者的逐年增加,糖尿病性白内障的发生率也不断增高,已成为糖尿病眼部并发症第二大眼病,是致盲的重要原因,严重影响患者生活质量^[1]。后囊膜下混浊(Posterior Subcapsular Opacity, PSO)是糖尿病性白内障典型的临床表现之一,由于混浊位于视轴,早期就有明显的视觉障碍,其发病机制目前尚不明确。对年龄相关性后囊膜下性白内障的病理和超微结构的研究发现,后囊膜下出现异常的有核细胞及细胞外基质是后囊膜下发生混浊的病理基础^[2,3]。

研究发现上皮-间质转分化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)是前囊膜下性白内障混浊斑中细胞的主要改变,诱导晶状体上皮细胞发生转分化的因素是炎症和 TGF- β

等^[4,5]。前囊膜下混浊斑块中有纤维样细胞和聚集的胶原性细胞外基质^[6],这与后囊膜下白内障的病理改变极为相似。因此我们推测晶状体上皮细胞发生 EMT 有可能在后囊膜下白内障的发生过程中起重要作用。

本研究通过探讨高浓度葡萄糖是否能诱导体外培养的人晶状体上皮细胞发生 EMT,进而为阐明糖尿病性后囊膜下白内障的发病机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人晶状体上皮细胞 HLE-B3 系(北京眼科研究所张炜研究员惠赠);DMEM 培养液(葡萄糖浓度 5.5 mmol/L)、胎牛血清(FBS)和 0.25%胰蛋白酶(Hyclone 公司,美国);兔抗人 E-cad

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81370998);陕西省科技统筹创新工程项目(2012KTCQ03-03)

作者简介:刘蕊(1984-),女,硕士研究生,主要研究方向:白内障发病机理及药物防治研究,电话:13919910671, E-mail: 1024200350@qq.com

[△] 通讯作者:周健, E-mail: zhoujian@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2015-01-12 接受日期:2015-01-30)

herin, α -SMA 抗体(abcam 公司, 英国); 山羊抗兔荧光二抗(In vitrogen 公司, 美国)。

1.2 主要仪器

二氧化碳孵箱(HF151 力电科学仪器有限公司, 中国); 倒置显微镜 (Olympus IXT0, 日本); 倒置显微镜 (莱卡 DMI6000B, 德国); 激光共聚焦显微镜(Olympus FV1000 公司, 日本)。

1.3 方法

1.3.1 人晶状体上皮细胞的培养 人晶状体上皮细胞 HLE-B3 系由北京眼科研究所张炜研究员惠赠。人晶状体上皮细胞 HLE-B3 系培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (葡萄糖浓度 5.5 mmol/L) 中, 将其置于 25 cm² 的培养瓶内, 在 37 °C, 含 5% CO₂ 的孵箱内常规培养。当细胞生长融合至 70%~80% 时进行传代, 取对数生长期的细胞用于实验。

1.3.2 倒置显微镜观察人晶状体上皮细胞形态学变化 取对数生长期、融合至 70%~80% 的 HLE-B3 细胞用于实验, 0.25% 胰酶消化细胞并重悬为单细胞悬液后接种于 6 孔板内, 放于 37 °C、5% CO₂ 的孵箱内静置培养 24 h 后弃去培养液, 无菌 PBS 清洗细胞 2 次将培养液洗净, 随后加入含 0.5% FBS 的 DMEM 培养液 2 mL 常规培养 24 h 进行细胞同步化处理, 之后弃去培养液用无菌 PBS 清洗细胞并按分组分别加入含 0.5% FBS 的正常葡萄糖浓度 (5.5 mmol/L) DMEM 培养液和 0.5% FBS 的高浓度葡萄糖 (35.5 mmol/L) DMEM 培养液, 在培养的 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 用倒置显微镜观察细胞形态并采集图像。

1.3.3 免疫荧光染色检测人晶状体上皮细胞内蛋白的表达 取对数生长期、融合至 70%~80% 的 HLE-B3 细胞用于实验, 0.25% 胰酶消化细胞并重悬为单细胞悬液, 调整细胞浓度使其终浓度为 1×10^4 /mL 后, 用移液器吸取 500 μ L 细胞悬液接种于铺有 1 cm² 无菌爬片的 24 孔板中, 放于 37 °C、5% CO₂ 的孵箱内静置培养 24 h 后吸出培养液, 无菌 PBS 清洗细胞 2 次将培养液洗净, 随后加入含 0.5% FBS 的 DMEM 培养液 1 mL 常

规培养 24 h 进行细胞同步化处理, 之后吸出培养液用无菌 PBS 清洗细胞并按分组分别加入含 0.5% FBS 的正常葡萄糖浓度 DMEM 培养液和 0.5% FBS 的高浓度葡萄糖 DMEM 培养液, 在培养 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h 后, 取出细胞爬片, 用 PBS 洗 3 次, 再用 4% 多聚甲醛液固定 15 min, 将爬片晾干后用中性树胶固定于载玻片上。

用 pH7.2 的 PBS 漂洗爬片 3 次后, 0.3% 过氧化氢避光封闭 30 min、0.3% Triton-X100 破膜 15 min、50% 小牛血清室温下封闭 1 h。封闭结束后, 用 PBS 洗爬片 3 次。在室温下分别孵育一抗: 兔抗人 E-cadherin (1:50) 和兔抗人 α -SMA (1:50) 1 h 后放于在 4 °C 冰箱过夜; 用 PBS 洗爬片 3 次, 在室温下避光孵育荧光二抗 (山羊抗兔 1:500) 4 h, 经 PBS 漂洗后, 用 DAPI (1:1000) 标记细胞核 15 min, 再用 50% 甘油封片。在激光共聚焦显微镜相同的拍摄参数下观察并采集图像。

用图像分析软件(Image-pro plus)进行平均荧光强度分析 (IOD/Area)。

以上实验均独立重复 3 次以上。

1.4 统计学分析

采用 SPSS17.0 数据分析软件对实验数据进行统计学分析, 所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两实验组间检测指标的数据比较采用独立样本 t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高浓度葡萄糖对人晶状体上皮细胞(HLEs)形态的影响

正常的晶状体上皮细胞呈多边形鹅卵石样细胞, 在观察的 24 h 中, 高糖组细胞逐渐丢失上皮细胞特性向纤维样细胞的形态变化。0 h 时, 高糖组细胞形态与正常糖浓度组细胞形态相似; 3 h 时, 高糖组细胞仍保持上皮样细胞特性, 但有少数细胞呈现出变长的趋势; 6 h 和 12 h 时, 与正常糖浓度组相比, 高糖组细胞丢失上皮细胞特性, 细胞明显变长, 呈梭型, 类似纤维细胞的表型。24 h, 高糖组细胞仍呈现为细长的纤维样表现 (图 1)。

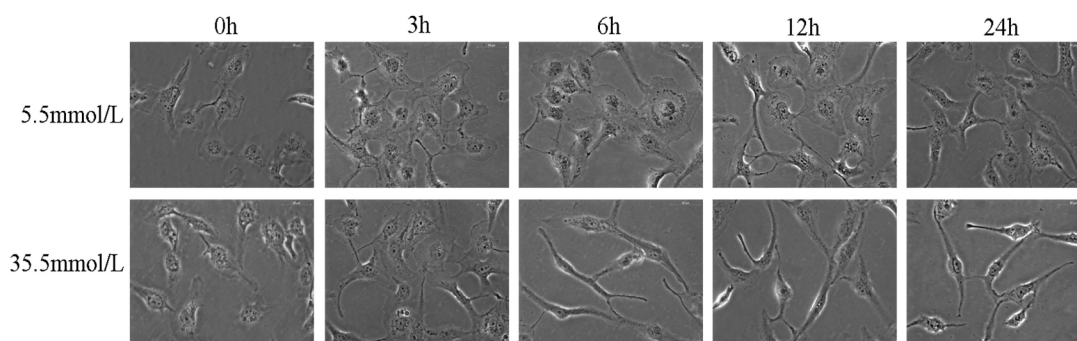


图 1 高浓度葡萄糖对人晶状体上皮细胞形态的影响 ($\times 40$, 标尺=100 μ m)

Fig. 1 The influences of high glucose on the morphology of HLEs ($\times 40$, bar=100 μ m)

2.2 高浓度葡萄糖对人晶状体上皮细胞(HLEs)E-cadherin 表达的影响

与正常糖浓度组相比, 在 0 h 和 3 h, 高糖组 E-cadherin 荧光强度与对照组相近; 随着时间的延长高糖组 E-cadherin 的荧光表达逐渐减弱, 于 6 h 和 12 h 高糖组 E-cadherin 的平均荧光

强度明显低于正常糖浓度组, 平均荧光强度存在显著性差异 ($F_{0.01}=12.667$, $P=0.001$; t 值分别为 $t_{0h}=4.969$, $t_{12h}=6.864$, $P<0.01$); 24 h 时高糖组 E-cadherin 的荧光强度仍稍低于正常糖浓度组 (图 2)。

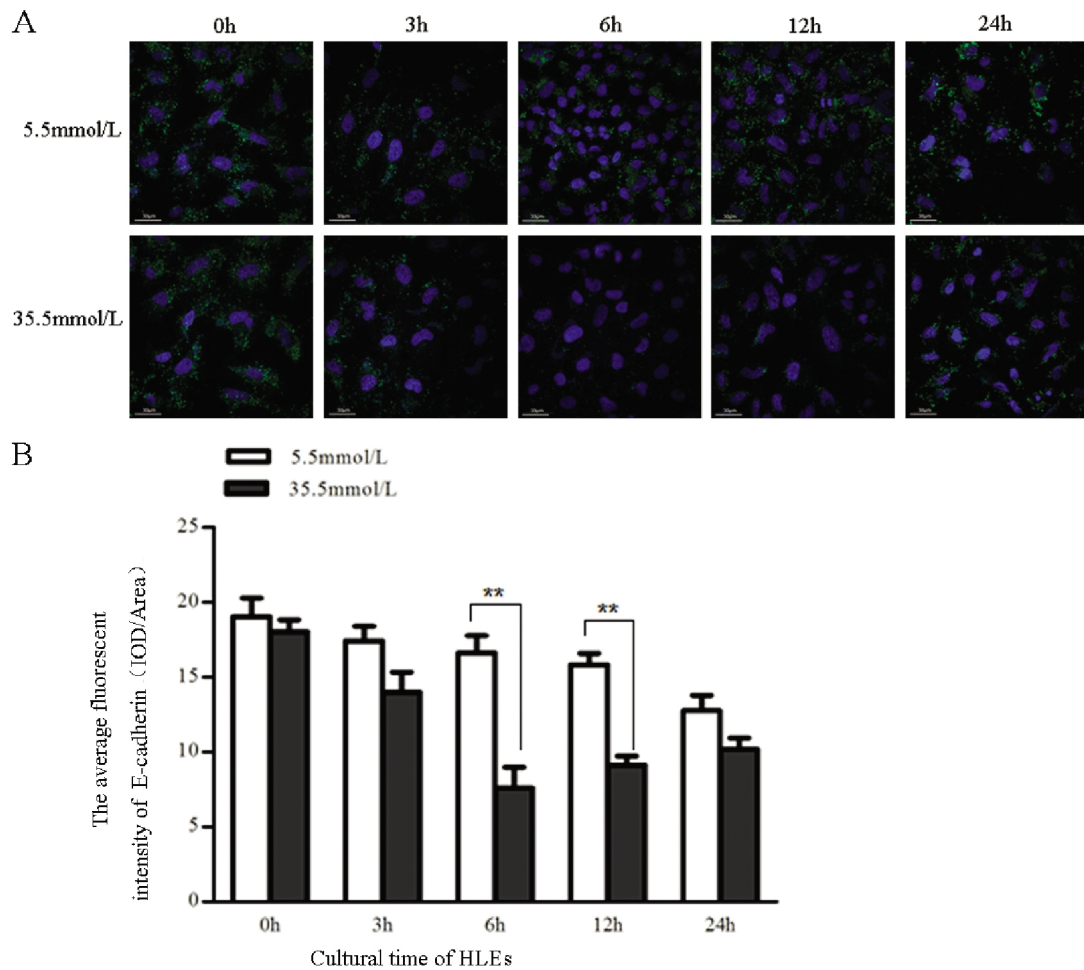


图2 高浓度葡萄糖对人晶状体上皮细胞 E-cadherin 表达的影响

A. 晶状体上皮细胞 E-cadherin 的免疫荧光染色 绿色荧光为 E-cadherin 的标记,蓝色荧光为细胞核标记;(× 60,标尺=30 μm)

B. 细胞中 E-cadherin 平均荧光强度的量化分析 **, $P < 0.01$

Fig. 2 The effects of high glucose on expression of E-cadherin in HLEs

A. Immunostaining of E-cadherin in HLEs The green fluorescence indicates the distribution of E-cadherin, and the blue DAPI staining labels nuclei. (× 60, bar=30 μm)

B. The variation analysis of average fluorescent intensity of E-cadherin in figure 2A **, $P < 0.01$

2.3 高浓度葡萄糖对人晶状体上皮细胞(HLEs)α-SMA 表达的影响

与正常糖浓度组相比,在 0 h 时高糖组 α-SMA 荧光强度与对照组相近;3 h 时高糖组 α-SMA 的荧光强度较正常糖组有所增加,随着作用时间的延长高糖组 α-SMA 的荧光表达呈增高趋势,于 6 h 和 12 h 高糖组 α-SMA 的平均荧光强度明显强于正常糖浓度组,平均荧光强度存在显著性差异($F_{6h}=4.340$, $P=0.046$;t 值分别为 $t_{6h}=-6.774$, $t_{12h}=-5.093$, $P < 0.01$);24 h 时高糖组 α-SMA 的荧光强度稍高于正常糖浓度组(图 3)。

3 讨论

晶状体上皮细胞(HLEs)是晶状体前囊膜上附着的单层上皮细胞,担负着晶状体的生长、分化以及损伤修复等重要生理功能,在维持整个晶体的透明性和内环境稳定上扮演重要角色,其发生异常变化会引起晶状体内环境代谢失衡、晶状体混浊,导致疾病的发生^[7]。正常的晶状体上皮细胞呈典型的多边形

形态,排列规则^[8]。

研究发现在高浓度葡萄糖作用下,体外培养的大鼠晶状体的晶状体上皮细胞发生纺锤样类似纤维细胞的变化^[9]。我们的研究显示,高浓度葡萄糖在促使晶状体上皮细胞向纤维样细胞转变的同时,晶状体上皮细胞的间充质细胞特征性蛋白 α-SMA 的表达增高,而上皮细胞特征性蛋白 E-cadherin 的表达明显减弱,这种变化提示晶状体上皮细胞发生 EMT。

上皮间质转分化是一种以上皮细胞极性的丧失和间充质细胞特性的获得为主要特征、同时伴随细胞形态和相关基因表达改变的细胞变化过程^[10,11]。在糖尿病性肾病研究中发现肾小管上皮细胞丢失原有表型,向纤维细胞形态转变^[12];同时在肝、肾、肺纤维化疾病的研究中发现,上皮细胞发生 EMT 的过程中均有肌成纤维细胞的标志物 α-SMA 的出现及表达增高^[13-18];E-cadherin 是一类细胞粘附分子,在细胞分化的早期发挥着重要作用,上皮细胞发生 EMT 最重要的指标为 E-cadherin 的减少或缺失^[19];在高浓度葡萄糖引起肾小管上皮细胞发生 EMT 的

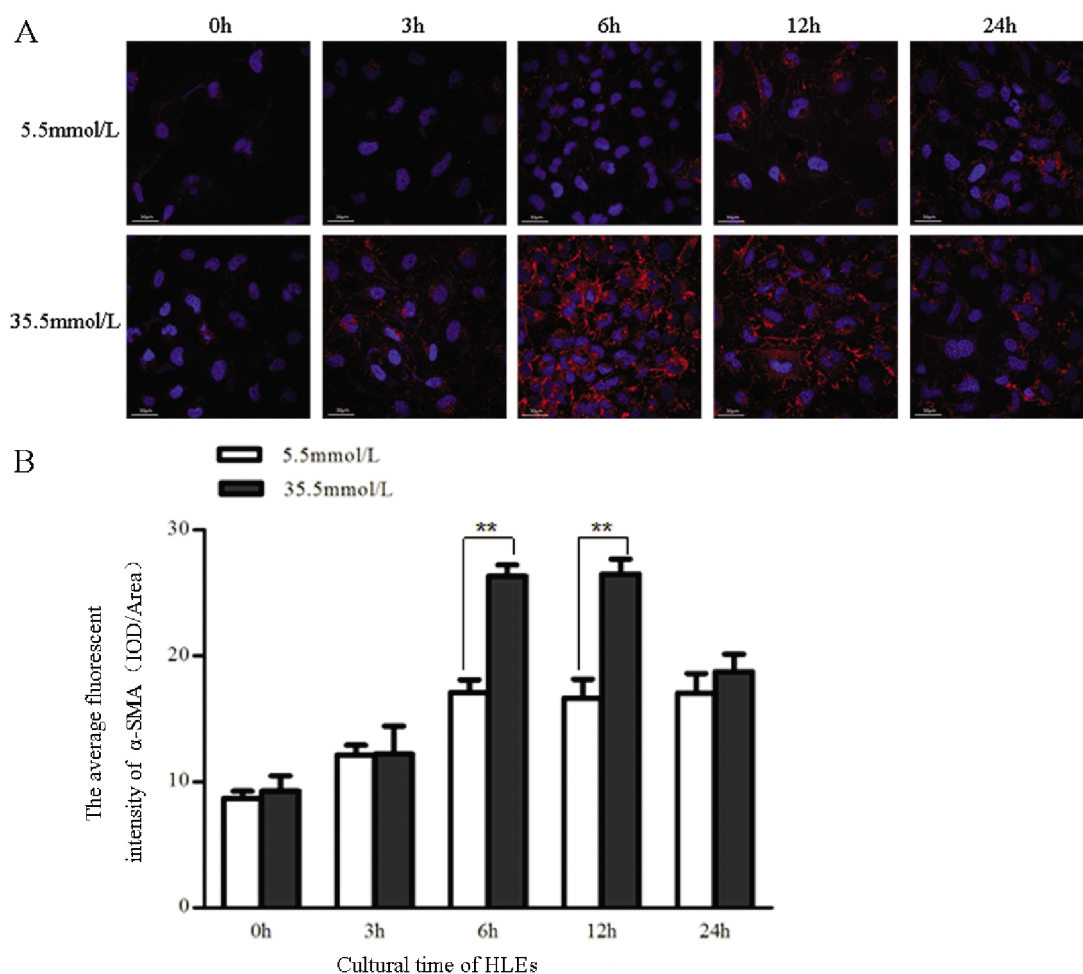


图3 高浓度葡萄糖对人晶状体上皮细胞 α -SMA 表达的影响

A. 晶状体上皮细胞的 α -SMA 免疫荧光染色 红色荧光为 α -SMA 的标记,蓝色荧光为细胞核标记;
($\times 60$,标尺=30 μ m)B. α -SMA 平均荧光强度的量化分析 **, $P < 0.01$

Fig. 3 The effects of high glucose on expression of α -SMA in HLEs

A. Immunostaining of α -SMA in HLEs The red fluorescence indicates the distribution of α -SMA, and the blue DAPI staining labels nuclei.
($\times 60$, bar=30 μ m)B. The variation analysis of average fluorescent intensity of α -SMA in figure3 A **, $P < 0.01$

过程中也已证实 E-cadherin 表达的减弱,而 α -SMA 的表达显著增高^[20,21];这些结果与本研究结果一致。

在本研究中,我们发现当高浓度葡萄糖作用 24 h 时,晶状体上皮细胞 E-cadherin 的表达较 6 h 和 12 h 相比稍有增高,而 α -SMA 的表达有所降低,这可能与高糖作用时间延长、糖逐渐被消耗、浓度降低,致使对细胞的刺激减弱有关。这种在 48h 内葡萄糖浓度降低、刺激减弱而使 EMT 出现逆转,表现出 E-cadherin 表达回升而 α -SMA 表达减弱的现象在高浓度葡萄糖对腹膜细胞发生 EMT 的研究中也曾得到证实^[22]。

综上所述,我们的初步研究表明高浓度葡萄糖可以诱导晶状体上皮细胞发生 EMT;这一过程可能在糖尿病性后囊膜下白内障的发生中起重要作用。早期阻断这一过程可能预防或延缓白内障的发生。

参考文献(References)

[1] Ivers RQ, Cumming RG, Mitchell P, et al. Diabetic and risk of fracture the blue mountains eye study [J]. Diabetes Care, 2001, 24(7): 1198-1203

[2] Creighton MO, Trevithick JR, Mousa GY, et al. Globular bodies: a primary cause of the opacity in senile and diabetic posterior cortical subcapsular cataracts?[J]. Can J Ophthalmol, 1978, 13(3): 166-181
[3] Eshagian J. Human posterior subcapsular cataract [J]. Trans Ophthalmol Soc UK, 1982, 102(3): 364-368
[4] Hales AM, Chamberlain CG, Mcavoy JW. Cataract induction in lenses cultured with transforming growth factor-beta [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36(8): 1709-1713
[5] Zablocki GJ, Ruzycki PA, Overturf MA, et al. Aldose reductase-mediated induction of epithelium-to-mesenchymal transition (EMT) in lens[J]. Chem Biol Interact, 2011, 191(1-3): 351-356
[6] Shirai K, Okada Y, Saika S. Immunohistochemical observation of anterior subcapsular cataract in eye with spontaneously regressed retinoblastoma[J]. J Cataract Refract Surg, 2010, 36(3): 503-507
[7] Struck HG, Heider C, Lautenschlager C. Changes in the lens epithelium of diabetic and non-diabetic patients with various forms of opacities in senile cataract[J]. Klin Monbl Augenheilkd, 2000, 216(4): 204-209

- [6] Anderson CM, Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions [J]. *Glia*, 2000, 32(1): 11-14
- [7] Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, et al. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation [J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6(1): 43-50
- [8] Seifert G, Steinhauser C. Neuron-astrocyte signaling and epilepsy[J]. *Exp Neurol*, 2013, 244: 4-10
- [9] Boison D. Adenosine augmentation therapies (AATs) for epilepsy: prospect of cell and gene therapies [J]. *Epilepsy Res*, 2009, 85(2-3): 131-141
- [10] Boison D. Adenosine dysfunction in epilepsy [J]. *Glia*, 2012, 60(8): 1234-1243
- [11] Lusardi TA. Adenosine neuromodulation and traumatic brain injury [J]. *Curr Neuroparmacol*, 2009, 7(3): 228-237
- [12] Kumaria A, Tolias CM, Burnstock G. ATP signalling in epilepsy[J]. *Purinergic Signal*, 2008, 4(4): 339-346
- [13] de Lanerolle NC, Lee TS, Spencer DD. Astrocytes and epilepsy[J]. *Neurotherapeutics*, 2010, 7(4): 424-438
- [14] Gomes CV, Kaster MP, Tome AR, et al. Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1808(5): 1380-1399
- [15] Sheth S, Brito R, Mukherjee D, et al. Adenosine receptors: expression, function and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(2): 2024-2052
- [16] Muzzi M, Coppi E, Pugliese AM, et al. Anticonvulsant effect of AMP by direct activation of adenosine A1 receptor [J]. *Exp Neurol*, 2013, 250: 189-193
- [17] Beraudi A, Traversa U, Villani L, et al. Distribution and expression of A1 adenosine receptors, adenosine deaminase and adenosine deaminase-binding protein (CD26) in goldfish brain [J]. *Neurochem Int*, 2003, 42(6): 455-464
- [18] Dixon AK, Gubitz AK, Sirinathsinghji DJ, et al. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat[J]. *Br J Pharmacol*, 1996, 118(6): 1461-1468
- [19] Cunha RA. Different cellular sources and different roles of adenosine: A1 receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volume transmission and synapse-restricted A2A receptor-mediated facilitation of plasticity[J]. *Neurochem Int*, 2008, 52(1-2): 65-72
- [20] Fragata IR, Ribeiro JA, Sebastiao AM. Nitric oxide mediates interactions between GABAA receptors and adenosine A1 receptors in the rat hippocampus[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 543(1-3): 32-39
- [21] Lohse MJ, Klotz KN, Schwabe U, et al. 2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine: a highly selective agonist at A1 adenosine receptors [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1988, 337(6): 687-689
- [22] Kitta T, Chancellor MB, de Groat WC, et al. Roles of adenosine A1 and A2A receptors in the control of micturition in rats [J]. *NeuroUrol Urodyn*, 2014, 33(8): 1259-1265

(上接第 3215 页)

- [8] Martinez G, de longh RU. The lens epithelial in ocular health and disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(12): 1945-1963
- [9] Lu Q, Yang T, Zhang M, et al. Preventative effect of Ginkgo biloba extract (EGb671) on high glucose-cultured opacity of rat lens[J]. *Phytother Res*, 2014, 28(5): 767-773
- [10] Their JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal-transitions in development and disease [J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890
- [11] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Clinical Invest*, 2009, 119(6): 1420-1428
- [12] Hills CE, Squires PE. The role of TGF- β and epithelial-to mesenchymal transition in Diabetic nephropathy[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(3): 131-139
- [13] Xiao Y, Zhou Y, Chen Y, et al. The expression of epithelial-mesenchymal transition-related protein in biliary epithelial cells is associated with liver fibrosis in biliary atresia [J]. *Pediatr Res*, 2015, 77(2): 310-315
- [14] Bi WR, Xu GT, Lv LX, et al. The ratio of transforming growth factor- β 1/bone morphogenetic protein-7 in the progression of the epithelial-mesenchymal transition contributes to rat liver fibrosis[J]. *Genet Res*, 2014, 13(1): 1005-1014
- [15] Yang Z, Sun L, Nie H, et al. Connective tissue growth factor induce tubular epithelial to mesenchymal transition through the activation of canonical Wnt signaling in vitro[J]. *Ren Fail*, 2015, 37(1): 129-135
- [16] Hong F, Hong J, Wang L, et al. Chronic Exposure to Nanoparticulate TiO₂ Causes Renal Fibrosis Involving Activation of the Wnt pathway in Mouse Kidney[J]. *J Agric Food Chem*, 2015, [Epub ahead of print]
- [17] Song P, Zheng JX, Xu J, et al. β -catenin induces A549 alveolar epithelial cell mesenchymal transition during pulmonary fibrosis[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4): 2703-2710
- [18] Zhang L, Ji Y, Kang Z, et al. Protocatechuic aldehyde ameliorates experimental pulmonary fibrosis by modulating HMGB1/RAGE pathway[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 283(1): 50-56
- [19] Cannito S, Novo E, di Bonzo LV, et al. Epithelial-mesenchymal transition: from molecular mechanisms, dedox regulations in human health and disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(12): 1383-1430
- [20] Xu Y, Huang J, Xin W, et al. Liquid accumulation is ahead of epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic intervention by acetyl-CoA carboxylase 2 silence in Diabetic nephropathy [J]. *Metabolism*, 2014, 63(5): 716-726
- [21] Tang L, Li H, Guo R, et al. Endothelin-1 mediated high glucose-induce epithelial-to mesenchymal transition in renal tubular cells[J]. *Diabetic Res Clin Pract*, 2014, 104(1): 176-182
- [22] Yu MA, Shin KS, Kim JH, et al. HGF and BMP-7 Ameliorate High Glucose-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Peritoneal Mesothelium[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(3): 567-581