

# Thapsigargin 对人晶状体上皮细胞系 SRA01/04 增殖抑制的作用机制

姬红培<sup>1,2</sup>, 吴明星<sup>1</sup>, 彭瑞萍<sup>1</sup>

(1. 眼科学国家重点实验室//中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060; 2. 贵州省人民医院, 贵州 贵阳 550002)

**摘要:** 【目的】研究 thapsigargin(TG) 对体外培养的人晶状体上皮细胞系 SRA01/04 增殖的影响, 并探讨其分子机制。【方法】不同浓度 TG 处理 SRA01/04 细胞 72 h, 噻唑蓝比色法(MTT) 检测细胞增殖; 流式细胞仪(PI 法) 检测细胞周期改变; 透射电镜观察细胞超微结构变化; TUNEL 法检测细胞核中 DNA 的断裂情况; 激光共焦显微镜和流式细胞仪检测 Caspase3 活性亚单位(17/19 ku) 的表达及阳性细胞表达率。【结果】MTT 法测得 TG 为 0.325~5  $\mu\text{mol/L}$  时, 细胞增殖抑制率变化显著,  $\text{IC}_{50}$  大约为 0.8  $\mu\text{mol/L}$ ; 透射电镜显示 TG 处理 SRA01/04 细胞膜皱缩, 染色体浓缩、边集、核膜裂解、凋亡小体形成; 流式细胞仪(PI 法) 及 TUNEL 法检测 TG 浓度为 0, 0.1, 0.5, 1, 10  $\mu\text{mol/L}$  分别处理 SRA01/04 细胞 72 h, 细胞凋亡率随浓度的增加而增加, 呈浓度依赖性; TG 处理后细胞 Caspase3 阳性表达率也呈浓度依赖性增加, TG 为 10  $\mu\text{mol/L}$  时, 几乎每个细胞浆内 Caspase3 都被激活。【结论】Thapsigargin 可能通过激活 Caspase3 为诱导体外培养的人晶状体上皮细胞系 SRA01/04 细胞凋亡而抑制其增殖, TG 为预防后发性白内障的药物研究提供了基础。

关键词: Thapsigargin; 晶状体上皮细胞; 细胞凋亡; Caspase3

中图分类号: R770.67

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)06-0622-05

## Effect and Mechanism of Thapsigargin on Proliferation of Human Lens Epithelial Cells Line SRA01/04

JI Hong-pei<sup>1,2</sup>, WU Ming-xing<sup>1</sup>, PENG Rui-ping<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Ophthalmology//Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2. Guizhou Provincial People Hospital, Guiyang 550002, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the effect of thapsigargin (TG) on the proliferation of human lens epithelial cells line SRA01/04 in vitro and underlay the molecular mechanism. 【Methods】SRA01/04 cells were exposed to TG for 72 h, the drug-free medium was as control. Effect of TG on cell growth was assessed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. Ultrastructure was observed by transmission electron microscopy. DNA fragmentation was measured by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-nick end-labeling (TUNEL). Cell cycle analysis was determined by flow cytometry (FCM) with propidium iodide (PI) staining. Expression of cleaved caspase 3 protein was detected by confocal microscopy and flow cytometry. 【Results】The growth of SRA01/04 cells were inhibited obviously by TG at concentration ranged from 0.325 to 5  $\mu\text{mol/L}$ . The ultrastructure of treated SRA01/04 cells showed typically apoptotic characteristics, including chromatin condensation, chromatin crescent formation, nucleus fragmentation and apoptotic body formation. Exposed to 0, 0.1, 0.5, 1.0, 10  $\mu\text{mol/L}$  TG for 72 h, the apoptotic rate by flow cytometry (PI means) and TUNEL were increased in a concentration-dependent manner. The expression of caspase3 was activated by TG, the cleaved caspase3 was expressed in a concentration dependent manner. The positive rate was about 100% at the concentration of 10  $\mu\text{mol/L}$ . 【Conclusion】The growth of SRA01/04 cells were inhibited by thapsigargin in a concentration dependent manner in vitro by inducing up-regulation of caspase 3 activation and starting apoptosis pathway. Thapsigargin may be developed as a potential therapeutic drug for posterior capsule opacification prevention.

Key words: thapsigargin; lens epithelial cells; apoptosis; caspase3

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):622-626]

收稿日期: 2007-06-08

基金项目: 国家自然科学基金(30572003, 39870803); 广东省自然科学基金(031724); 广州市科技计划项目(2003Z3-E0031)

作者简介: 姬红培(1975-), 女, 河南南阳人, 硕士生, 住院医师; 吴明星, 通讯作者, 副教授, 硕士生导师, E-mail: wurmingx@mail.sysu.edu.cn

后发性白内障是白内障术后影响视功能的严重的远期并发症之一,白内障术后残留的晶状体上皮细胞增殖、迁移、化生是其发生的病理基础<sup>[1]</sup>。目前手术中技术和人工晶状体的光学部设计等方面的改进使后发性白内障的发生率有所下降<sup>[2,3]</sup>,但白内障术后残留的晶状体上皮细胞的增殖仍是眼科界亟待解决的难题。后发性白内障防治的关键是发现一种能有效抑制晶体上皮细胞增殖且无明显毒性作用的药物。Thapsigargin(TG)是上世纪70年代从草药 *Thapsia garganica* 根部所提取的一种萜半萜内酯,特异性抑制细胞内质网钙泵<sup>[4]</sup>,破坏Ca<sup>2+</sup>的动态平衡,影响晶状体上皮细胞增殖等生物学功能<sup>[5,6]</sup>。我们将TG处理体外培养的人晶状体上皮 SRA01/04 细胞,研究TG能否抑制SRA01/04细胞的增殖,并探讨其分子机制,为药物防治后发性白内障提供新途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人晶状体上皮细胞系 SRA01/04 细胞:由 Ruddy 实验室建立,美国 Tuft 大学的商福教授馈赠。主要试剂:Thapsigargin(TG)、Hoechst33342、MTT、PI、RNase A、多聚赖氨酸(均为美国 Sigma 公司产品);cleaved caspase3 抗体(cell signaling);TUNEL 试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);DMEM 培养基、新生牛血清(美国 Gibco 公司产品)。主要仪器:CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 SHELLAB 公司),CKX41 型倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司),超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),LSM510 型激光扫描共焦显微镜(德国 Zeiss 公司),荧光显微镜(德国 Axioplan2 imaging),FACS Aria 流式细胞仪(美国 BD 公司),H-600 型透射显微镜(日本日立公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含 10%新生牛血清,100 U/mL 青链毒素的低糖 DMEM 培养基,置于 5%CO<sub>2</sub>,37 的细胞培养箱内培养。每次实验均取自同一批传代细胞。

1.2.2 噻唑蓝比色法 按每孔 3×10<sup>3</sup> 细胞接种于 96 孔板,24 h 后处理,每组 5 个复孔。MTT 法检测吸光度(A 值)。细胞相对生长抑制率=1-(实验组 A 值/对照组 A 值)×100%。

1.2.3 流式细胞仪检测 对数生长期细胞用含 0.1, 0.5, 1.0, 10 μmol/L TG 培养液培养 72 h,对照组加相同浓度的溶剂 DMSO。收集细胞,70%乙醇固定,RNase A 处理后 PI 染色,流式细胞仪检测 PI 荧光强度。

1.2.4 透射电镜 细胞消化传代,24 h 后更换含 1 μmol/L TG 的完全培养液,对照组含相同浓度 DMSO。培养 72 h 后常规固定、脱水、包埋、切片后透射电子显微镜观察。

1.2.5 TUNEL 法标记凋亡细胞 对数生长期 SRA01/04 细胞按 8×10<sup>4</sup> 个/张种植于 22 mm×22 mm 的多聚赖氨酸处理的盖玻片上,TG 处理(方法同前)后,严格按照说明书进行操作。随机计算 6 个高倍视野中阳性细胞数及总的细胞数,核棕色为阳性结果。阴性组以 PBS 代替 TaT 酶,阳性对照以 DNA 酶 I (DNase I,10 μg/mL) 室温下处理 10 min 后再进行 TUNEL 操作,分别计算阳性率。

1.2.6 共聚焦显微镜 SRA01/04 细胞处理同前,固定后一抗、二抗孵育,Hoechst 33342 染色,激光共焦显微镜下观察。

1.2.7 流式细胞仪检测 cleaved caspase3 的表达 SRA01/04 细胞处理后收集细胞固定,一抗、二抗孵育,以无细胞标本作为阴性对照,流式细胞仪分析阳性细胞表达率。

### 1.3 统计学分析

运用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,对不同浓度 TG 作用 72 h 后各组检测结果采用非参数检验方法(Kruskal-Wallis Test)和单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用 SNK(Student-Newman-Keuls)法,取 α=0.05。

## 2 结果

### 2.1 细胞生长曲线

当 TG 浓度为 0.325~2.5 μmol/L 时,细胞增殖抑制率变化显著,且呈剂量依赖性,IC<sub>50</sub> 约为 0.8 μmol/L(图 1)。

### 2.2 细胞周期分布变化

流式细胞仪检测显示,正常组仅有正常的 G<sub>1</sub> 峰,未见亚二倍体峰;而 TG 处理组 72 h 的 G<sub>1</sub> 峰左侧出现亚二倍体峰型,且该峰在整个细胞周期中所占百分比随着 TG 浓度的增加而增加,具有浓度依赖性。统计采用 ANOVA 法, F=9412.58, P<

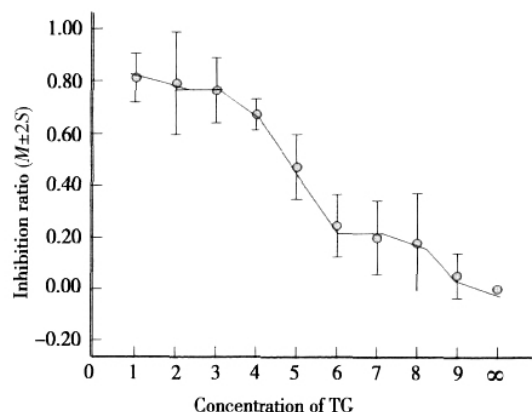


图 1 MTT 法检测不同浓度的 TG 对 SRA01/04 细胞增殖抑制率的影响

Fig.1 The inhibition ratios of SRA01/04 cell proliferation at different concentration of TG tested by MTT method

The change of inhibition ratio of SRA01/04 proliferation is significant at the concentration of TG between 0.325 ~2.5  $\mu\text{mol/L}$ ; concentration of TG: 10  $\mu\text{mol/L}$  for 1, and half of the former for 2~9, and 0 for .

0.05。各组间比较均有显著性差异( $P < 0.01$ , 图 2)。

### 2.3 细胞超微结构的改变

TG 处理组中细胞的胞浆发生浓缩, 胞核内染色质浓集、贴边聚集在核膜周围、染色质形成新月体样变化和凋亡小体等典型的细胞凋亡改变的特征(图 3)。

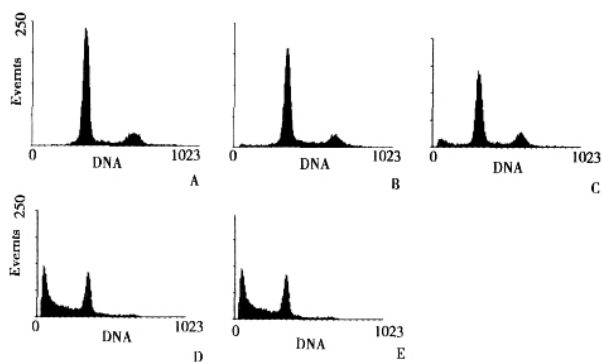


图 2 PI 法流式细胞仪检测不同浓度 TG 对 SRA01/04 细胞凋亡率(亚  $G_1$  期)的影响

Fig.2 Apoptosis ratios of at different concentration of TG tested by flow cytometry

A: 0  $\mu\text{mol/L}$  group(control group), Apo (2.1  $\pm$  0.5)%; B: 0.1  $\mu\text{mol/L}$  group, Apo 7.3%  $\pm$  0.7%; C: 0.5  $\mu\text{mol/L}$  group, a notable hypodiploid peak, Apo 18.0%  $\pm$  0.6%; D: 1 mol/L group, a notable hypodiploid peak with descent of  $G_2M$  phase peak, Apo 37.2%  $\pm$  0.3%; E: 10 mol/L group, a high hypodiploid peak, Apo 59.1%  $\pm$  0.2%

### 2.4 细胞原位凋亡标记

原位末端标记的 SRA01/04 细胞中, 细胞核内存在棕黄色/棕褐色的颗粒状沉淀, 形状不一, 有的核全染, 有的染成新月状, 有的呈点状。在正常对照组, TUNEL 阳性颗粒非常少见, 而随着 TG 浓度的增加, TUNEL 阳性细胞所占百分比随着增加, 呈浓度依赖性(图 4)。

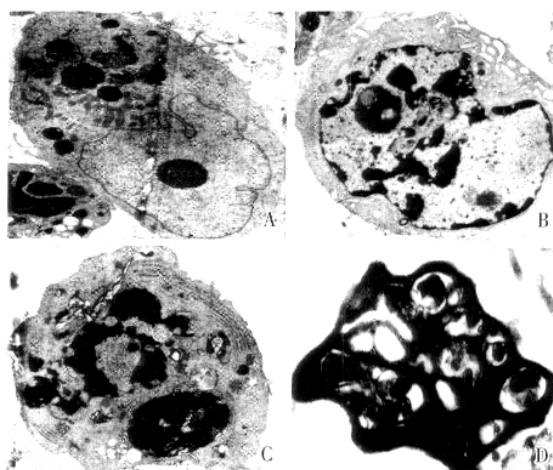


图 3 透射电镜观察 TG 对 SRA01/04 细胞超微结构的影响

Fig.3 Effect of TG on ultrastructure of SRA01/04 cell transmission electron microscope

A: 0  $\mu\text{mol/L}$  group (control group  $\times 6000$ ); B, C, D: treated group, kytoplasm shrinks, nucleus shrink and apoptotic bodies ( $\times 12000$ )

### 2.5 Caspase3 活性亚单位的阳性表达

美国 cell signaling 公司最新生产的兔抗人 cleaved Caspase3 抗体能特异性检测 Caspase3 的 17/19 ku 活性亚单位, 而对完整的 Caspase3 及其它 Caspases 的活性片段无免疫反应。细胞核 (Hoechst 33342, 蓝色荧光) 体积变小或者形成凋亡小体等具有凋亡特征的细胞的胞浆内出现点状或者弥漫性 cleaved Caspase3 免疫反应阳性荧光 (FITC, 绿色荧光), 而细胞核形态完全正常者则表现为 cleaved Caspase3 免疫反应阴性(图 5)。

该结果证实了 Caspase3 只在细胞凋亡时被激活理论, 同时也说明 TG 可能通过 Caspase 家族诱导人 SRA01/04 细胞凋亡, 区别于少数非 Caspase 家族凋亡途径。

另一方面流式细胞仪检测 cleaved Caspase3 细胞阳性表达率的结果显示: 随着 TG 浓度的增加, cleaved Caspase3 细胞阳性表达率明显增加, 且呈剂量依赖性, 当 TG 为 10  $\mu\text{mol/L}$ , 几乎为 100% (图 6)。统计分析采用 ANOVA,  $F=127.779$ ,  $P <$

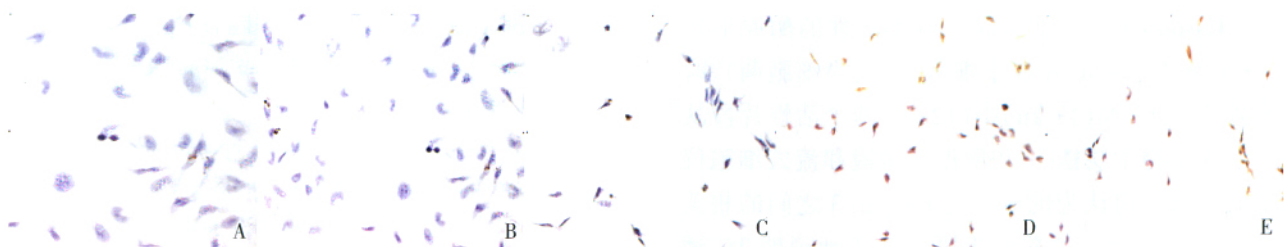


图 4 TUNEL 法检测不同浓度的 TG 对于 SRA01/04 细胞凋亡率的影响

Fig. 4 Apoptosis ratio of SRA01/04 cells at different concentration of TG tested by TUNEL method

A: Control group(x200); B: 0.1 μmol/L group(x100); C:0.5 μmol/L group(x100); D: 1 μmol/L group(x40); E: 10 μmol/L group(x40)

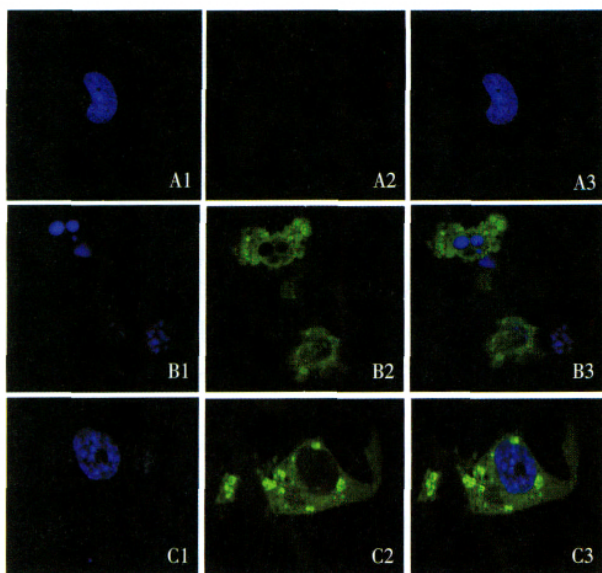


图 5 共焦显微镜观察胞内 caspase3 表达

Fig.5 Expression of caspase 3 in SRA01/04 detected by confocal microscopy

A: control group, negative expression of cleaved caspase 3 (green) in the cytoplasm, and the normal shape nucleus (blue); B: treated group, shows apoptotic bodies (blue) and positive expression of cleaved caspase 3 (green); C: treated group, cell shrinks with positive expression of cleaved caspase 3 (green) in the cytoplasm(x1 000)

0.001。除 0.1 μmol/L 及 0.5 μmol/L 组无显著性差异 (P=0.140), 其余各组间比较均有显著性差异 (P < 0.01)。

### 3 讨 论

#### 3.1 TG 诱导人晶状体上皮细胞系 SRA01/04 凋亡

TG 抑制 SRA01/04 细胞的增殖, MTT 法检测 IC<sub>50</sub> 大约为 0.8 μmol/L。流式细胞仪检测结果显示处理组在细胞周期的 G<sub>1</sub> 峰前出现亚 G<sub>1</sub> 峰, 且该峰在细胞周期中所占的百分比随着 TG 浓度的增加而增加; 透射电镜进一步地证实了细胞的超微结构发生了改变: 细胞膜皱缩; 染色体浓缩、边集, 凋

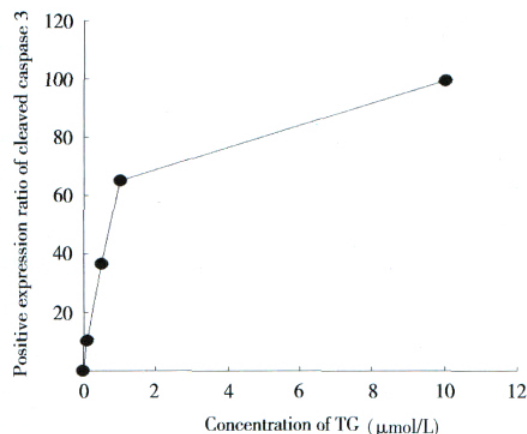


图 6 TG 诱导 SRA01/04 细胞表达 cleaved caspase 3

Fig.6 Cleaved caspase 3 expression in SRA01/04 induced by TG

the positive rate of cleaved caspase 3 for 0,0.1,0.5,1.0,10 μmol/L group is (0.1 ± 0.1),(10.3 ± 0.6), (36.5 ± 0.6), (65.0 ± 1.0),(99.2 ± 0.5), respectively, and all P < 0.01 compared with 0 μmol/L group

亡小体形成, 这些结果均表明 TG 诱导了 SRA01/04 细胞凋亡。TUNEL 法检测细胞凋亡比例也随着 TG 浓度的增加而增加, 呈浓度依赖性。因此, TG 是通过诱导细胞凋亡而抑制 SRA01/04 细胞增殖的。

#### 3.2 TG 剂量依赖性激活 Caspase3

哺乳动物细胞的程序性死亡是在一定条件下诱导的通过一系列信号级联转导的有秩序的死亡过程。除少数细胞经非 Caspase 依赖途径凋亡, 大多数细胞是经 Caspase 依赖途径凋亡。Caspase 级联系统在凋亡诱导过程中扮演了极其重要的角色, 而在 Caspase 级联信号传导过程中, Caspase3 (又称 CPP32, TAMA, apopain) 目前被普遍认为是 Caspase 家族中效应 Caspase 蛋白, 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路和关键的调节点<sup>[7]</sup>。在原核细胞中, 凋亡效应蛋白编码基因包括 CSP-1 和 CSP-2, 果蝇属则包括 DRICE, DCP-1, DECAY, DATDREAM, 它们和哺乳动物的 Caspase3 的基因编码存在极其相似的同源保守序列。

Caspase3 在正常情况下以无活性的酶原形式(分子量 31594 u)存在于细胞质内,当细胞凋亡时被激活,形成大(17 ku)小(12 ku)两个活性片段从而发挥生物学功能<sup>[7]</sup>。共聚焦显微镜和流式细胞仪的结果与目前认为的凋亡与 Caspase3 之间的相关性是一致的<sup>[8,9]</sup>。这些结果更进一步地说明 TG 诱导 SRA01/04 细胞凋亡,另一方面也说明了细胞是经 Caspases 途径凋亡。

目前普遍接受的观点认为,凋亡具有三种途径:细胞膜死亡受体途径、线粒体途径、内质网应激途径,其中内质网应激途径受到越来越多的关注。而 20 世纪 90 年代初,Thastrup 和 Sabala 就分别提出, TG 是一种内质网/肌浆网上  $Ca^{2+}$ -ATPase 的抑制剂,从而对胞内  $Ca^{2+}$  信号进行调节<sup>[10,11]</sup>。所以我们推测 Caspase3 的激活可能是由于 TG 抑制 SRA01/04 细胞内质网  $Ca^{2+}$ -ATPase,破坏内质网内  $Ca^{2+}$  动态平衡,造成内质网应激,激活上游的 Caspases,如 Caspase12 等。Caspase3 的激活导致细胞呈现典型细胞凋亡形态学改变。可以想象,如果在白内障术采用 TG 处理的人工晶体可能对超声乳化联合人工晶体植入术后晶状体上皮细胞的增殖起到抑制作用, TG 有可能成为防治后发性白内障的临床应用的药物。

无论在生理状态、白内障试验模型以及白内障患者,中央与周边区域的晶状体上皮细胞生长特性都存在差异,因此相应的增殖能力不同<sup>[12]</sup>。在高糖环境下 LEC 增殖能力不同程度的受到影响,可能与糖性白内障的发生有一定的关系<sup>[13]</sup>。然而有关晶体上皮细胞的一系列研究都最终指向了如何抑制其增殖活性这一方向。本研究发现, TG 明显抑制晶状体上皮细胞系 SRA01/04 细胞的增殖,且其抑制增殖机制有可能是激活 Caspase3,通过 Caspase 家族级联系统诱导体外培养的人晶状体上皮细胞系 SRA01/04 细胞凋亡而产生的。本研究结果为进一步应用 TG 进行后发性白内障药物防治的动物实验研究提供依据。

参考文献:

[1] PANDEY S K, APPLE D J, WERNER L, et al. Posterior capsule opacification: A review of the

aetiopathogenesis, experimental and clinical studies and factors for prevention [J]. *Indian J Ophthalmol*, 2004, 52 (2):99-112.

- [2] DEWEY S. Posterior capsule opacification [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2006, 17(1): 45-53.
- [3] AUFFARTH G U, RABSILBER T M, REULAND A J. New method for the prevention of posterior capsule opacification [J]. *Ophthalmologie*, 2005, 102(6): 579-586.
- [4] OHATA H, TANAKA K, AIZAWA H, et al. Lysophosphatidic acid sensitises  $Ca^{2+}$  influx through mechanosensitive ion channels in cultured lens epithelial cells [J]. *Cell Signal*, 1997, 9: 609-616.
- [5] WILLIAMS M R, et al. Calcium mobilisation modulates growth of lens cells [J]. *Cell Calcium*, 1996, 19(8):83-89.
- [6] KARLSSON J O, ANDERSSON M, KLING-PETERSEN A, et al. Proteolysis in human lens epithelium determined by a cell-permeable substrate [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(9): 261-264.
- [7] GUPTA S, KNOWLTON A A. HSP 60, Bax, Apoptosis and the Heart [J]. *J. Cell Mol Med*, 2005, 9(3): 51-58.
- [8] YANG L Q, FANG D C, WANG R Q. Effect of NF- $\kappa$ B, survivin, Bcl-2 and Caspase3 on apoptosis of gastric cancer cells induced by tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(1): 22-25.
- [9] 张振雨,叶伟,黄东生,等.兔软骨终板细胞凋亡与 Caspase-3 和 Fas 表达的实验研究 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2006, 24(5): 553-556.
- [10] THASTRUP O. Role of  $Ca^{2+}$ -ATPases in regulation of cellular  $Ca^{2+}$  signaling, as studied with the selective microsomal  $Ca^{2+}$ -ATPase inhibitor, thapsigargin [J]. *Agents Actions*, 1990, 29(1-2): 8-15.
- [11] SABALA P, CZATNY M, WORONCZAK J P, WORONCZAK J P. Thapsigargin: potent inhibitor of  $Ca^{2+}$  transport ATP-ases of endoplasmic and sarcoplasmic reticulum [J]. *Acta Biochim Pol*, 1993, 40(3): 309-19.
- [12] 马璇,吴明星,张艳丽.不同区域晶状体上皮细胞基因表达差异分析 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(5):553-561.
- [13] 李霞,刘奕志,吴明星.高糖对人晶状体上皮细胞缝隙连接细胞间通讯的影响 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(3):257-259.

(编辑 刘清海)