

# 氯化锂通过 TGFBI 促进角膜基质成纤维细胞增殖和自噬

聂丹瑶,黎明,叶琳,贺温玲,刘欣华

引用:聂丹瑶,黎明,叶琳,等. 氯化锂通过 TGFBI 促进角膜基质成纤维细胞增殖和自噬. 国际眼科杂志 2019;19(11):1840-1843

基金项目:深圳市科技计划项目(No.JCYJ20160428144605809);  
深圳市医疗卫生三名工程项目(No.SZSM201812091)

作者单位:(518040)中国广东省深圳市眼科医院 深圳眼科学重点实验室 深圳大学眼视光学院

作者简介:聂丹瑶,毕业于中山大学中山眼科中心,医学博士,副主任医师,研究方向:白内障及眼表疾病。

通讯作者:刘欣华,医学博士,主任医师,白内障科主任,研究方向:白内障.xhualiu@sohu.com

收稿日期:2019-01-26 修回日期:2019-10-11

## 摘要

**目的:**研究 TGFBI 和微管相关蛋白轻链 3 (LC3) 在角膜营养不良患者中的表达,及氯化锂 (LiCl) 通过 TGFBI 对角膜基质成纤维细胞增殖能力的影响。

**方法:**用免疫组化和 Western-blot 方法检测角膜营养不良及正常角膜组织中 TGFBI 和 LC3 的表达。实验构建了 TGFBI 过表达载体并转染角膜基质成纤维细胞,分别以 5、10、20、40mmol/L LiCl 作用于突变型 TGFBI 转染的角膜基质成纤维细胞,检测不同时间(0、1、6、12h)后,TGFBI 与 LC3 蛋白表达变化,并用 CCK-8 法检测细胞增殖活性。

**结果:**TGFBI 和 LC3 在角膜营养不良患者角膜组织中显著高表达。TGFBI 过表达抑制角膜基质成纤维细胞增殖活性 ( $P < 0.05$ )。LiCl 抑制突变型 TGFBI 转染的角膜基质成纤维细胞中 TGFBI 和 LC3 蛋白表达,并增强其细胞增殖活性 ( $P < 0.05$ )。

**结论:**LiCl 可以促进角膜基质成纤维细胞增殖活性和自噬,其作用机制与下调 TGFBI 和 LC3 的表达有关。

**关键词:**角膜营养不良;TGFBI;氯化锂;细胞增殖;自噬

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.11.05

## Lithium chloride promotes the proliferation and autophagy of corneal stromal fibroblasts by TGFBI

Dan - Yao Nie, Ming Li, Lin Ye, Wen - Ling He, Xin-Hua Liu

**Foundation items:** Shenzhen Science and Technology Project (No. JCYJ20160428144605809); Shenzhen SanMing Project (No. SZSM201812091)

Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology, Shenzhen University School of Optometry, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China

**Correspondence to:** Xin - Hua Liu. Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology, Shenzhen University

School of Optometry, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China. xhualiu@sohu.com

Received:2019-01-26 Accepted:2019-10-11

## Abstract

• **AIM:** To study the expressions of TGFBI and microtubule - associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3) in granular corneal dystrophy, and the influences of lithium chloride (LiCl) on corneal stromal fibroblast cell proliferation by TGFBI.

• **METHODS:** Immunohistochemistry and Western - blot assays were used to detect the expression levels of TGFBI and LC3 in corneal dystrophy and normal corneal tissues. TGFBI overexpression vector was transfected into corneal stromal fibroblasts, and then the cells were treated with 5, 10, 20, 40mmol/L LiCl for different times (0, 1, 6, 12h), and Western-blot assay was performed to evaluate the expression levels of TGFBI and LC3, and CCK-8 assay was carried out to assess cell proliferation activity.

• **RESULTS:** TGFBI and LC3 were highly expressed in corneal tissues of patients with corneal dystrophy. TGFBI overexpression inhibited the proliferation ability of corneal stromal fibroblasts ( $P < 0.05$ ). LiCl inhibited the expression levels of TGFBI and LC3, and enhanced the cell proliferation activity in corneal stromal fibroblasts transfected with mutant TGFBI ( $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** LiCl promoted the proliferation and autophagy of corneal stromal fibroblasts, and its mechanism may be related to down regulated expressions of TGFBI and LC3.

• **KEYWORDS:** corneal dystrophy; TGFBI; lithium chloride; cell proliferation; autophagy

**Citation:** Nie DY, Li M, Ye L, et al. Lithium chloride promotes the proliferation and autophagy of corneal stromal fibroblasts by TGFBI. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2019;19(11):1840-1843

## 0 引言

颗粒状角膜营养不良 (granular corneal dystrophy, GCD) 是临床常见的角膜营养不良之一,属于常染色体显性遗传病,其发病率约为 5.52/10000。由于 5q31 染色体上的转化生长因子- $\beta$  (TGFBI) 基因发生突变,使得 TGFBI 蛋白 (TGFBIp) 在角膜基质层和弹力层聚集,并发生代谢障碍,导致患者双侧角膜出现混浊,最终造成视力损害<sup>[1]</sup>。在 GCD 早期,尚无有效的治疗或缓解方法<sup>[2]</sup>。随着 GCD 病情的恶化,可以采用手术方法来切除病变组织,包括板层角膜移植术和准分子激光角膜切削术<sup>[3]</sup>,但由于术后复发甚至加重的原因,其效果并不理想。因此,积极探索新

的治疗靶点将会有良好的应用前景。研究表明,TGFBI 突变与 GCD 的发生密切相关。TGFBI 在细胞增殖、分化、迁移和粘附等方面具有重要作用<sup>[4]</sup>,但 TGFBI 在 GCD 中具体的功能和机制还不完全清楚。氯化锂(lithium chloride, LiCl)作为药物广泛应用于精神和神经系统疾病的治疗<sup>[5]</sup>。研究表明, LiCl 可抑制 TGFBI 的表达,并增加角膜成纤维细胞和癌细胞中糖原合成酶激酶-3 (Glycogen synthase kinase-3, GSK-3)与微管相关蛋白轻链 3(LC3)的比例<sup>[6]</sup>。本研究进一步探讨 LiCl 在突变型 TGFBI 转染的角膜基质成纤维细胞中的功能及相关机制,期待未来可为角膜营养不良患者的药物治疗提供实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集 2017-01/12 就诊于深圳市眼科医院并接受手术治疗的颗粒样角膜营养不良病变患者 3 例,获取 3 个角膜组织。所有角膜营养不良患者均经 TGFBI 基因突变 DNA 测序分析确诊,且无遗传或全身代谢性疾病史。同时,选取来自三个不同个体捐献的正常角膜组织 3 个。角膜组织的取材及使用都经过患者知情同意,该研究经深圳市眼科医院医学伦理委员会批准。所有角膜组织在无菌条件下被切成 20mg 的组织块分装, -80℃ 保存。实验试剂: DMEM 培养基 (Sigma, D1152)、胰蛋白酶 (Gibco, 15090-046)、胎牛血清 (FBS, Gibco, 26140087)、青霉素-链霉素双抗 (Gibco, 15070-063)、DMSO (Sigma, D8418)、兔源单克隆抗 TGFBI 抗体 (Abcam, Cambridge, UK)、兔源多克隆抗 LC3 抗体 (Abcam)、兔源单克隆抗 GAPDH 抗体 (Boster, Wuhan, China)、pcDNA3.0 载体 (Invitrogen, USA)、Bestar qPCR RT Kit (DBI, USA)、Bestar® SybrGreen qPCR-master Mix (DBI, USA)、RIPA (Beyotime, China)、ECL 化学发光试剂 (Beyotime, China)。

## 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学检测** 角膜组织中 TGFBI 和 LC3 表达分别采用 4%多聚甲醛固定 GCD 患者行板层角膜移植术切除的角膜组织和捐献的正常角膜组织,石蜡包埋后切片,厚度 4μm。37℃ 干燥过夜后,于 1%过氧化氢溶液中浸泡 20min。3%牛血清白蛋白室温下孵育 1h,并于兔源单克隆抗 TGFBI 抗体和兔源多克隆抗 LC3 抗体一抗 (1:500)4℃ 孵育过夜,鼠抗兔 HRP 标记 IgG (1:1000)二抗孵育后,DAB 显色,苏木素染核后脱水封片。显微镜下观察 GCD 角膜组织和正常角膜组织中 TGFBI 和 LC3 的表达。

**1.2.2 细胞培养** 根据文献<sup>[7]</sup>提供方法,取板层角膜移植术切除下来正常角膜组织的基质层组织,生理盐水清洗 3 次,抗生素液 (100μg/mL 链霉素+100U/mL 青霉素)处理 30min。在无菌条件下,去除角膜上皮层,将角膜基质层放入 10% FBS 的 DMEM 培养液,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。7d 后,Hanks 液清洗,0.125%胰蛋白酶消化,离心后收集细胞。

**1.2.3 野生型和突变型 TGFBI 质粒构建** 采用 PCR 法扩增 TGFBI。野生型 TGFBI 引物:正向引物 5'-CCC AAG CTT ATG GCG CTC TTC GTG CG -3',反向引物:5'- CCG CTC GAG CTA ATG CTT CAT CCT CTC TAA TAA CTT TT -3'。突变型 TGFBI 引物:正向引物 5'- AGC TGT ACA CGG ACC ACA CGG AGA AGC TGA G -3',反向引物 5'- CTC AGC TTC TCC GTG TGG TCC GTG TAC AGC T -3'。

1%琼脂糖凝胶电泳 TGFBI 扩增产物。将回收的 TGFBI 扩增产物和 pcDNA3.0 质粒酶切后进行电泳回收,T4 连接酶连接后,转化并提取重组质粒。

**1.2.4 细胞转染和处理** 首先将构建的野生型和突变型 TGFBI 质粒转染正常角膜基质成纤维细胞,转染空载体作为对照组,转染后留取 0、12、24、36、48h 的细胞做活性检测并提取转染后 24h 的细胞蛋白。其次,将 LiCl 溶于 PBS 中,并采用 0、5、10、20、40mmol/L LiCl 处理正常角膜基质成纤维细胞 6h,留取处理后 24h 时的细胞做活性检测。然后,同等浓度梯度的 LiCl (KCl 作为对照)处理突变型 TGFBI 转染的角膜基质成纤维细胞 6h,留取处理后 24h 时的细胞提取蛋白。根据正常角膜基质成纤维细胞的浓度梯度处理后的细胞活性结果,后续则采用 20mmol/L LiCl 处理突变型 TGFBI 转染的角膜基质成纤维细胞,观察不同时间(0、1、6、12h)后, TGFBI 与 LC3 蛋白表达变化。最后,采用 20mmol/L LiCl 处理突变型 TGFBI 过表达载体转染的角膜基质成纤维细胞 12h,留取处理后 24h 时的细胞做活性检测,并提取蛋白备用。

**1.2.5 CCK-8 法检测细胞活力** 取上述处理后的角膜基质成纤维细胞,调整为  $1 \times 10^3$  cells/mL 浓度并铺于 96 孔板中,每孔 100μL,每组设 6 个复孔。每组细胞在特定时间加入 CCK-8 试剂,5% CO<sub>2</sub> 孵箱 37℃ 条件培养 3h 后,于酶标仪下测定 450nm 波长处吸光度值(OD 值)。

**1.2.6 Western-blot 法检测 TGFBI 和 LC3 表达** RIPA 提取了角膜营养不良及正常角膜组织及上述不同处理后的细胞总蛋白,按 BCA 蛋白浓度检测试剂盒使用说明书检测各组蛋白浓度。取 40μg 各组总蛋白于 8% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白后转膜。5%脱脂牛奶封闭,兔源单克隆抗 TGFBI 抗体 (1:2000),兔源多克隆抗 LC3 抗体 (1:1000)、兔源单克隆抗抗 GAPDH 抗体 (1:5000)4℃ 孵育过夜。鼠抗兔 HRP 标记的 IgG 二抗 (1:5000)室温孵育 1h 后,ECL 显色。

统计学分析:采用 SPSS 20.0 进行统计学分析,连续变量采用均数±标准差表示,组间差异检验采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 TGFBI 和 LC3 角膜组织中的表达** 免疫组织化学检测结果显示,与正常角膜组织相比,TGFBI 和 LC3 在 GCD 患者角膜组织中呈强阳性表达 (图 1A)。Western-blot 检测结果显示,与正常角膜组织相比,TGFBI 和 LC3 在 GCD 患者角膜组织中显著高表达 (图 1B)。

**2.2 TGFBI 过表达抑制角膜基质成纤维细胞活性** 分别构建野生型和突变型 TGFBI 过表达载体,并转染角膜基质成纤维细胞。Western-blot 检测结果显示,经野生型和突变型 TGFBI 过表达载体转染的角膜基质成纤维细胞中 TGFBI 表达明显增加,提示细胞转染成功;与空载体转染组相比,LC3 在野生型 TGFBI 组细胞中的表达无明显差异,而在突变型 TGFBI 组细胞中表达显著增加,提示突变型 TGFBI 可显著上调 LC3 表达 (图 2A)。CCK-8 实验结果显示,空载体转染组、野生型 TGFBI 组、突变型 TGFBI 组细胞转染后 12、24、36h,野生型 TGFBI 组细胞活性均较空载体转染组明显减弱;突变型 TGFBI 组细胞活性较野生型 TGFBI 组显著减弱,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 2B)。

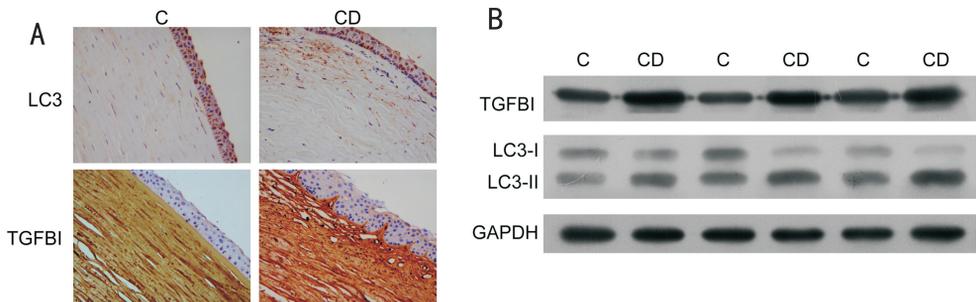


图1 TGFBI与LC3蛋白在角膜组织中的表达 A:免疫组织化学检测TGFBI与LC3蛋白的表达( $\times 100$ );B:Western-blot法检测TGFBI与LC3蛋白的表达。C:正常角膜组织;CD:GCD患者角膜组织。

**2.3 LiCl对角膜基质成纤维细胞活性的影响** 分别采用0、5、10、20、40mmol/L LiCl处理正常角膜基质成纤维细胞6h,CCK-8法检测结果显示,LiCl对正常角膜基质成纤维细胞无毒性作用(图3)。

**2.4 LiCl对突变型TGFBI转染的角膜基质成纤维细胞中TGFBI表达的影响** 分别采用5、10、20、40mmol/L LiCl处理突变型TGFBI转染的角膜基质成纤维细胞6h,Western-blot检测结果显示,LiCl可抑制TGFBI蛋白表达水平,且随着LiCl浓度的增加,TGFBI蛋白表达水平降低(图4A)。采用20mmol/L LiCl分别处理突变型TGFBI转染的角膜基质成纤维细胞0、1、6、12h,Western-blot检测结果显示,在20mmol/L LiCl作用下,随着作用时间的延长,TGFBI蛋白表达水平降低(图4B)。

**2.5 LiCl对突变型TGFBI转染的角膜基质成纤维细胞自噬和活性的影响** 采用20mmol/L LiCl处理突变型TGFBI过表达载体转染的角膜基质成纤维细胞12h,Western-blot检测结果显示,与对照组相比,TGFBI和LC3蛋白表达水平在LiCl处理组显著下调(图5A)。CCK-8检测结果显示,与对照组相比,细胞活性在LiCl处理组明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图5B)。

**3 讨论**  
 自噬(autophagy)在细胞调控中起着重要作用,负责降解细胞内损伤蛋白质及功能失调细胞器。LC3作为自噬体膜上的标志蛋白,具有以LC3-I和LC3-II两种形式存在<sup>[8]</sup>。在自噬过程中,LC3-I经过一系列过程可转变为LC3-II,LC3-II可与自噬体特异性结合,被广泛用作自噬泡标记物<sup>[9]</sup>。近年来,越来越多的研究表明,自噬与角膜营养不良的发生和发展过程密切相关<sup>[10]</sup>。此外,研究表明,LiCl可通过诱导自噬抑制TGFBI的表达<sup>[11]</sup>。然而,突变型TGFBI与角膜基质成纤维细胞功能之间的关系尚未被研究。本研究通过TGFBI(G/A 371)的转染,研究突变后角膜基质成纤维细胞对LiCl的敏感性。此外,我们发现,突变型TGFBI可促进自噬,突变型TGFBI的变化与角膜营养不良细胞的自噬增强有关。同时,我们证实,LiCl通过抑制自噬促进突变型TGFBI转染的角膜基质成纤维细胞增殖活性。

TGFBI作为一种分泌蛋白,可被TGF- $\beta$ 诱导<sup>[12]</sup>。研究表明,TGFBI蛋白在角膜营养不良病变基质细胞中高表达。TGFBI可通过MMP-1、MMP-3和TIMP-1促进细胞外基质的降解,进而参与角膜的生理病理过程<sup>[13]</sup>。也有研究表明,在角膜成纤维细胞中,LiCl抑制TGF- $\beta$ 介导的

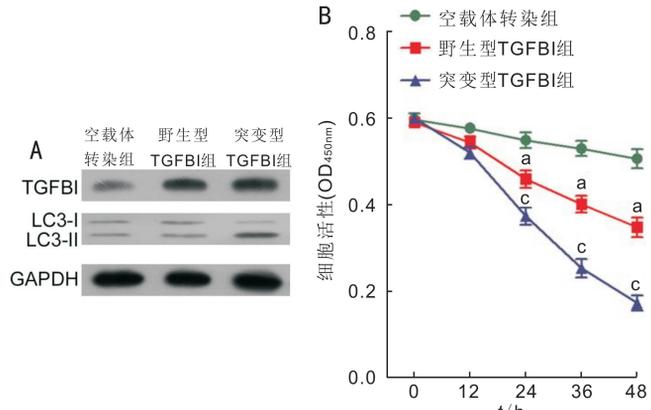


图2 TGFBI过表达抑制角膜基质成纤维细胞活性 A:Western-blot法检测TGFBI与LC3蛋白的表达;B:CCK-8法检测TGFBI过表达对角膜基质成纤维细胞活性的影响。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs空载体转染组;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs野生型TGFBI组。

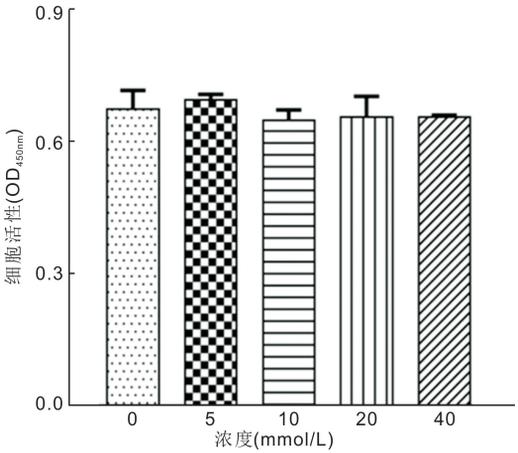


图3 LiCl对角膜基质成纤维细胞活性的影响。

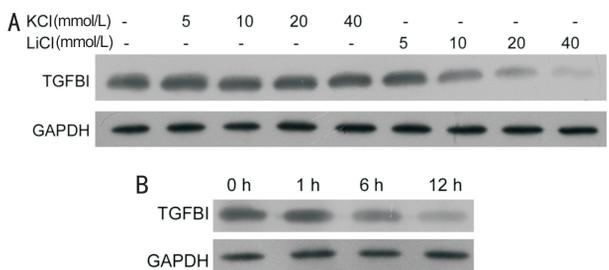


图4 LiCl对突变型TGFBI转染的角膜基质成纤维细胞中TGFBI表达的影响 A:LiCl作用浓度对突变型TGFBI转染的角膜基质成纤维细胞中TGFBI表达的影响;B:LiCl作用时间对突变型TGFBI转染的角膜基质成纤维细胞中TGFBI表达的影响。

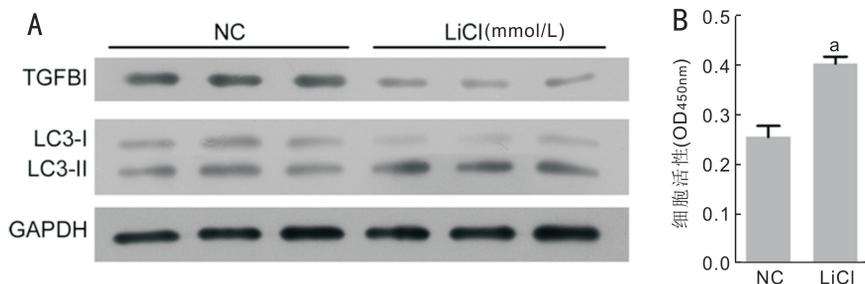


图5 LiCl对突变型TGFBI转染的角膜基质成纤维细胞自噬和活性的影响 A:LiCl对突变型TGFBI转染的角膜基质成纤维细胞LC3表达的影响;B:LiCl对突变型TGFBI转染的角膜基质成纤维细胞活性的影响。NC:未经LiCl处理的突变型细胞对照组。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 未经LiCl处理的突变型细胞对照组。

TGFBI的表达<sup>[11]</sup>。研究也发现,角膜细胞在受到损伤刺激时会产生TGFBI,此外,角膜移植术和准分子激光角膜切削术后的GCD患者中也有TGFBI产生<sup>[14]</sup>。我们的研究进一步证实,与野生型TGFBI相比,突变型TGFBI对角膜基质成纤维细胞增殖活性的抑制作用更加强。同时,我们发现,野生型TGFBI不能诱导角膜基质成纤维细胞自噬,而突变型TGFBI可显著诱导角膜基质成纤维细胞自噬。因此,这些结果表明TGFBI突变促进角膜基质成纤维细胞自噬。

LiCl作为GSK-3抑制剂,可抑制GSK-3磷酸化。研究表明,LiCl可参与多种生理调控过程,如基因表达、炎症反应、细胞凋亡及糖原合成等<sup>[15]</sup>。最近的研究也表明,LiCl下调原发性角膜成纤维细胞中TGFBI的表达水平,并促进自噬<sup>[16]</sup>。本研究进一步证明,LiCl可抑制突变型TGFBI转染的角膜基质成纤维细胞中TGFBI的表达水平,且呈剂量和时间依赖性。LiCl也可抑制突变型TGFBI转染的角膜基质成纤维细胞自噬,并促进细胞增殖活性。提示LiCl可作为治疗角膜营养不良的潜在治疗靶点。

#### 参考文献

- 1 Taketani Y, Kitamoto K, Sakisaka T, et al. Repair of the TGFBI gene in human corneal keratocytes derived from a granular corneal dystrophy patient via CRISPR/Cas9-induced homology-directed repair. *Sci Rep* 2017; 7(1): 16713-16719
- 2 Lin ZN, Chen J, Cui HP. Characteristics of corneal dystrophies: a review from clinical, histological and genetic perspectives. *Int J Ophthalmol* 2016;9(6): 904-913
- 3 Seitz B, Langenbacher A, Hager T, et al. Penetrating Keratoplasty for Keratoconus - Excimer Versus Femtosecond Laser Trephination. *Open Ophthalmol J* 2017; 11(Suppl-1, M7): 225-240
- 4 Klamer SE, Dorland YL, Kleijer M, et al. TGFBI Expressed by Bone Marrow Niche Cells and Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Regulates Hematopoiesis. *Stem Cells Dev* 2018; 27(21): 1494-1506
- 5 Williams R, Ryves WJ, Dalton EC, et al. A molecular cell biology of lithium. *Biochem Soc Trans* 2004; 32(Pt 5): 799-802

- 6 Maeng YS, Lee R, Lee B, et al. Lithium inhibits tumor lymphangiogenesis and metastasis through the inhibition of TGFBIp expression in cancer cells. *Sci Rep* 2016; 6(1): 20739-20747
- 7 Choi SI, Kim TI, Kim KS, et al. Decreased Catalase Expression and Increased Susceptibility to Oxidative Stress in Primary Cultured Corneal Fibroblasts from Patients with Granular Corneal Dystrophy Type II. *Am J Pathol* 2009; 175(1): 248-261
- 8 Yang A, Hachaney I, Wu YWJB, et al. Semisynthesis of autophagy protein LC3. conjugates. *Bio Med Chem* 2017; 25 ( 18 ): S0968089617307083
- 9 Yin HC, Zhao LL, Li SQ, et al. Autophagy activated by duck enteritis virus infection positively affects its replication. *J General Virol* 2017;98 (3):486-495
- 10 任静, 刘静雯, 秦波. 自噬在眼部疾病中的研究进展. *国际眼科纵览* 2015;39(5):309-314
- 11 Choi SI, Kim BY, Dadakhujaev S, et al. Inhibition of TGFBIp expression by lithium; implications for TGFBI-linked corneal dystrophy therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(6): 3293-3300
- 12 Ahlfeld SK, Wang J, Gao Y, et al. Initial Suppression of Transforming Growth Factor-β Signaling and Loss of TGFBI Causes Early Alveolar Structural Defects Resulting in Bronchopulmonary Dysplasia. *Am J Patholmol* 2016; 186(4): 777-793
- 13 牛静宜, 刘婧, 李晓霞, 等. 人转化生长因子β诱导基因真核表达载体的构建及其对人角膜上皮细胞增生的影响. *中华实验眼科杂志* 2011; 29(12):1071-1076
- 14 Poulsen ET, Nielsen NS, Jensen MM, et al. LASIK surgery of granular corneal dystrophy type 2 patients leads to accumulation and differential proteolytic processing of transforming growth factor beta-induced protein (TGFBIp). *Proteomics* 2016; 16(3): 539-543
- 15 Undi RB, Gutti U, Gutti RK. LiCl regulates mitochondrial biogenesis during megakaryocyte development. *J Trace Elem Medand Bio* 2017; 39: 193-201
- 16 Khairova R, Pawar R, Salvatore G, et al. Effects of lithium on oxidative stress parameters in healthy subjects. *Mol Med Rep* 2012; 5 (3): 680-682