

低表达衰老标记蛋白 30 对高钙状态下人晶状体上皮细胞增殖和氧化的影响

李松蔓, 韩子豪, Aint Thu Thu Win, 陈曦, 梁皓

引用: 李松蔓, 韩子豪, Aint Thu Thu Win, 等. 低表达衰老标记蛋白 30 对高钙状态下人晶状体上皮细胞增殖和氧化的影响. 国际眼科杂志 2020;20(2):217-223

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (No.81360146)

作者单位: (530021) 中国广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院眼科

作者简介: 李松蔓, 毕业于广西医科大学, 硕士研究生, 研究方向: 白内障的基础研究。

通讯作者: 梁皓, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 晶状体及视网膜疾病. gxn_lianghao@163.com

收稿日期: 2019-03-20 修回日期: 2020-01-04

摘要

目的: 探讨高钙状态下衰老标记蛋白 30 (SMP30) 低表达对人晶状体上皮细胞 (LECs) 系 SRA01/04 增殖、氧化应激的影响。

方法: 设计 3 条干扰 SMP30 靶向基因 RGN 表达的 RNAi 序列 (KD1~3), 以空载序列为阴性对照组 (NCKD), 构建慢病毒载体并感染 SRA01/04 细胞, 同时以未感染的 SRA01/04 细胞作空白对照组 (CON)。RT-PCR 筛选干扰效率最高的慢病毒载体用于后续实验。采用含 15mmol/L CaCl₂ 的完全培养基处理细胞 24h 模拟发生白内障时人 LECs 的病理状态, 通过 BrdU-Elisa 法检测细胞增殖活力, 并检测细胞超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及氧化型谷胱甘肽/总谷胱甘肽 (GSSG/T-GSH) 水平以评估细胞氧化应激水平。

结果: 成功构建 KD1~3 及 NCKD 慢病毒载体, 感染 SRA01/04 细胞效率约 80%。三种慢病毒载体 (KD1~3) 敲减效率分别为 93%、60%、74%, 故选择 KD1 慢病毒载体进行后续实验。高钙状态下, KD1 组细胞相对增殖活力和 SOD 活力 [(2.42±0.08) 和 (11.69±0.52U/mg)] 均低于 NCKD 组 [(2.95±0.08) 和 (31.10±2.24U/mg)] 和 CON 组 [(2.96±0.25) 和 (26.33±1.04U/mg)], GSSG/T-GSH 比值 (70.80±2.34) 高于 NCKD 组 (15.93±3.47) 和 CON 组 (20.05±2.45) (均 $P<0.05$), 而 NCKD 组与 CON 组上述指标均无差异 ($P>0.05$)。

结论: 高钙状态培养下, RGN-RNAi 慢病毒载体介导的 SMP30 低表达 SRA01/04 细胞增殖活力及抗氧化应激能力减弱, 提示 SMP30 可能具有调控细胞增殖、抗氧化应激的保护作用。

关键词: 衰老标记蛋白 30; 人晶状体上皮细胞; 高钙状态; 细胞增殖; 氧化应激; 白内障

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.2.05

Effect of low expression of senescence marker protein 30 on proliferation and oxidation of human lens epithelial cells line SRA01/04 under high calcium conditions

Song-Man Li, Zi-Hao Han, Aint Thu Thu Win, Xi Chen, Hao Liang

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No.81360146)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Hao Liang, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. gxn_lianghao@163.com

Received:2019-03-20 Accepted:2020-01-04

Abstract

• **AIM:** To explore the effect of low expression of senescence marker protein 30 (SMP30) on proliferation and oxidative stress of human lens epithelial cells (LECs) line SRA01/04 under high calcium conditions.

• **METHODS:** Three RNAi sequences were designed to knock down SMP30 target gene RGN expression (KD1-3), and the blank-load sequence was used as the negative control group (NCKD), all of which were used to construct lentiviral vectors to infect SRA01/04 cells. Meanwhile, the uninfected SRA01/04 cells was used as the blank control group (CON). After transfecting SRA01/04 cells, the lentiviral vector with the highest knockdown efficiency was selected by RT-PCR for subsequent experiments. Cells were treated with 15mmol/L CaCl₂ for 24h to simulate a high calcium conditions. BrdU-Elisa assay was used to measure cell proliferation, superoxide dismutase (SOD) assay kit and oxidized glutathione/total glutathione (GSSG/T-GSH) assay kit were used to detect the level of intracellular oxidative stress.

• **RESULTS:** KD1-3 and NCKD lentiviral vectors were successfully constructed to infect SRA01/04 cells with an infection efficiency of about 80%. The knockdown efficiency of KD1-3 group was 93%, 60% and 74%, respectively, KD1 group was selected for follow-up experiment. Under the high calcium conditions, the activity of relative cell proliferation and SOD in KD1 group [(2.42±0.08) and (11.69±0.52U/mg)] were significantly lower than that in NCKD group [(2.95±0.08) and (31.10±2.24U/mg)] and CON group [(2.96±0.25) and (26.33±

1.04U/mg)], the ratio of GSSG/T-GSH in KD1 group (70.80 ± 2.34) was significantly higher than that in NCKD group (15.93 ± 3.47) and CON group (20.05 ± 2.45) ($P < 0.05$); there was no significant difference between NCKD group and CON group ($P > 0.05$).

• CONCLUSION: Under high calcium conditions, SRA01/04 cells (HLECs) with low expression of SMP30 mediated by shRNA lentivirus resulted in the decrease of the proliferation activity and antioxidant capacity, suggesting that SMP30 may play a protective role in regulating cell proliferation and anti-oxidative stress in HLECs.

• KEYWORDS: senescence marker protein 30; human lens epithelial cell; high calcium conditions; cell proliferation; oxidative stress; cataract

Citation: Li SM, Han ZH, Aint TTW, et al. Effect of low expression of senescence marker protein 30 on proliferation and oxidation of human lens epithelial cells line SRA01/04 under high calcium conditions. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(2): 217-223

0 引言

衰老标记蛋白 30 (senescence marker protein 30, SMP30), 亦称 Regucalcin (RGN), 是一种与衰老相关的钙调节蛋白^[1]。研究报道, SMP30 在白内障患者晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 中的含量高于正常人, 但其在 60 岁以上白内障患者中的含量低于 60 岁及以下患者^[2], 而 SMP30 下调导致人 LECs 衰老及凋亡程度加剧^[3-4], 提示 SMP30 含量减少可能与白内障形成有关。持续高钙导致钙稳态丧失是白内障的关键致病因素^[5], 然而, SMP30 作为一种钙调节蛋白, 其在高钙/钙紊乱状态下对人 LECs 影响的文献报道较少。本研究通过体外构建高钙培养状态, 模拟发生白内障时人 LECs 的病理状态, 同时合成人 SMP30 靶向基因 RGN 的 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 序列, 下调 SMP30 在人 LECs 系 SRA01/04 中的表达, 研究细胞增殖、氧化指标的改变, 探讨 SMP30 在白内障形成中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人 LECs 系 SRA01/04 (广州吉妮欧生物科技有限公司), 慢病毒包装细胞人肾上皮细胞系 293T、病毒包装辅助质粒 pHelper1.0 质粒、pHelper2.0 质粒 (上海吉凯基因化学技术有限公司); RPMI 1640 培养基、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清 (美国 Gibco 公司), 青霉素、链霉素 (美国 Sigma 公司), 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS, 北京索莱宝科技有限公司), 总 RNA 提取试剂盒 (美国 Axyen 公司), 逆转录试剂盒 (Takara 公司, RR047A), BrdU-Elisa 试剂盒 (瑞士 Roche 公司), 总超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 测定试剂盒 (WST-1 法)、氧化型谷胱甘肽/总谷胱甘肽 (oxidized glutathione/total glutathione, GSSG/T-GSH) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 细胞培养超净台 (新加坡艺思高科技有限公司), 二氧化碳恒温培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司), 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司), Real time PCR 仪器 (Agilent 公司), 酶标仪 (瑞士 Tecan 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SRA01/04 细胞用含体积分数 10% 的胎

牛血清、100U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素 (pH 7.4) 的 RPMI 1640 培养基培养, 并置于环境为 37 $^{\circ}$ C、含体积分数 5% CO₂ 和 95% 空气的细胞培养箱中培养。

1.2.2 构建 RGN-RNAi 慢病毒表达载体

1.2.2.1 设计并合成 short hairpin RNA (shRNA) 引物 根据 NCBI Genbank 中人 RGN 基因 (NM_152869.3) mRNA 序列, 遵循 RNAi 序列设计原则, 设计 3 条 RNAi 靶点序列用于干扰 SMP30 靶向基因 RGN 的表达, 同时以 Scramble 序列作为阴性对照, BLAST 分析排除其他非同源性序列。实验分组如下: 实验组 (RGN 表达干扰组 1~3, knock down group 1~3, KD1~3), 阴性对照组 (空载体组, negative control group of knock down, NCKD), 空白对照组 (SRA01/04 细胞组, blank control group, CON)。3 条 RNAi 靶点序列分别为: KD1 (RGN - RNAi - 1): ACCTGAAGCTGGTGAATT; KD2 (RGN - RNAi - 2): TGTGAAGTTGCCCTGTGAT; KD3 (RGN - RNAi - 3): ACCGCAGAAGTGTTCACAA。Scramble 序列 (NCKD) 为: TTCTCCGAACGTGTCACGT。将上述 4 段序列分别设计合成 shRNA 寡核苷酸单链, 每对由正义链和反义链组成 (表 1), 在 5' 和 3' 端分别加入 Age I 和 EcoR I 酶切位点, 在退火后形成含短发夹结构的小片段双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA)。

1.2.2.2 RGN-RNAi 慢病毒载体的构建与鉴定 通过 T4 DNA 连接酶, 将 Age I + EcoR I 双酶切线性化成功的慢病毒载体 GV248 (框架结构: hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin) 和上述 dsDNA 混合进行连接反应。随后将连接好的重组质粒转化感受态的大肠杆菌, 用含氨苄青霉素培养基选择阳性克隆, 对单菌落进行扩增培养, 最后进行菌落 PCR 及 DNA 测序鉴定, 验证重组克隆中插入片段序列是否与设计的目标序列一致。其中, 通用引物为: 上游 5' - CCATGATTCCTTCATATTTGC - 3', 下游 5' - ATGTCCTTCTGCTGATACTGGG - 3'。

1.2.2.3 RGN-RNAi 慢病毒颗粒的包装与质检 选择测序正确的菌液转接于 10mL 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 24h, 通过天根无内毒素质粒小提中量试剂盒抽提合格的质粒。取对数生长期的慢病毒包装细胞 293T 细胞接种于 10cm 细胞培养皿中 (细胞密度: 5×10^6 个/15mL), 置于细胞培养箱中培养约 24h, 待细胞密度达 70%~80% 时用于感染。感染前用无血清的培养基培养 293T 细胞 2h。将提取合格的 GV248 载体质粒 20 μ g, pHelper1.0 质粒 15 μ g, pHelper2.0 质粒 10 μ g 及相应体积的吉凯感染试剂均匀混合, 调整使混合液总体积为 1mL, 室温孵育 15min。将混合液缓慢滴入 293T 细胞培养液中, 轻混匀避免将细胞吹起, 置于细胞培养箱培养。6h 后移除含感染混合液的培养基, 用 10mL PBS 轻洗培养皿一次, 缓慢加入 20mL 含体积分数为 10% 胎牛血清的培养基。继续培养细胞 48~72h 后收集 293T 细胞上清液, 4 $^{\circ}$ C、4000g 离心 10min, 0.45 μ m 滤器过滤、收集上清液, 再次 4 $^{\circ}$ C、8000g 离心 2h, 移除液体并保留沉淀, 加入吉凯病毒保存液重悬充分溶解沉淀, 4000g 高速离心 5min, 按要求分装上清。最后对慢病毒进行质检和病毒滴度检测。

1.2.3 RGN-RNAi 慢病毒感染 SRA01/04 细胞

1.2.3.1 慢病毒感染细胞的预实验 用完全培养基制备密度为 2×10^3 个/每孔的 SRA01/04 细胞悬液, 取 100 μ L/孔加入 96 孔板, 继续培养 24h。分别制备含 50 μ g/mL Polybrene

表1 针对人 RGN 基因序列设计的寡核苷酸单链

No	5'	STEMP	LOOP	STEMP	3'
shRNA-KD1-F	Ccgg	caACCTGAAGCTGGTGAATT	CTCGAG	AATTCCACCAGCTTCAGGTg	TTTTTg
shRNA-KD1-R	aattcaaaaa	caACCTGAAGCTGGTGAATT	CTCGAG	AATTCCACCAGCTTCAGGTg	
shRNA-KD2-F	Ccgg	acTGTGAAGTTGCCTGTTGAT	CTCGAG	ATCAACAGGCAACTTCACAgt	TTTTTg
shRNA-KD2-R	aattcaaaaa	acTGTGAAGTTGCCTGTTGAT	CTCGAG	ATCAACAGGCAACTTCACAgt	
shRNA-KD3-F	Ccgg	caACCGCAGAAGTGTTFACAA	CTCGAG	TTGTAAACACTTCTGCGGTg	TTTTTg
shRNA-KD3-R	aattcaaaaa	caACCGCAGAAGTGTTFACAA	CTCGAG	TTGTAAACACTTCTGCGGTg	
shRNA-NCKD-F	Ccgg	TTCTCCGAACGTGTCACGT	TTCAAGAGA	ACGTGACACGTTCCGGAGAA	TTTTTg
shRNA-NCKD-R	aattcaaaaa	TTCTCCGAACGTGTCACGT	TCTCTTGAA	ACGTGACACGTTCCGGAGAA	

表2 感染预实验分组和感染条件

组别	病毒滴度		
	1×10 ⁸ TU/mL (MOI=100)	1×10 ⁷ TU/mL (MOI=10)	1×10 ⁶ TU/mL (MOI=1)
Control 组	培养基 100μL	培养基 100μL	培养基 100μL
A 组	培养基 90μL+Virus 10μL	培养基 90μL+Virus 10μL	培养基 90μL+Virus 10μL
B 组	培养基 80μL+Virus 10μL+P(M) 10μL	培养基 80μL+Virus 10μL+P(M) 10μL	培养基 80μL+Virus 10μL+P(M) 10μL
C 组	Eni. S. 90μL+Virus 10μL	Eni. S. 90μL+Virus 10μL	Eni. S. 90μL+Virus 10μL
D 组	Eni. S. 80μL+Virus 10μL+P(E) 10μL	Eni. S. 80μL+Virus 10μL+P(E) 10μL	Eni. S. 80μL+Virus 10μL+P(E) 10μL

(助感染剂)的完全培养基 [P(M)]; 含 50μg/mL Polybrene 的感染增强剂 (enhanced infection solution, Eni. S.) [P(E)], 各 200μL; 用 Eni. S. 将病毒稀释成三种滴度: 1×10⁸、1×10⁷、1×10⁶TU/mL, 各 50μL。在每孔细胞融合度为 20%~30%时, 根据表 2 分别更换培养液和加入病毒液进行细胞感染; A 组: 常规培养基+病毒; B 组: 常规培养基+病毒+P(M); C 组: Eni. S. +病毒; D 组: Eni. S. +P(E)+病毒。混匀后继续培养 8~12h, 观察细胞形态并更换培养基。在感染约 3~4d、细胞绿色荧光表达丰度较高、感染效率约 80%且细胞状态良好时, 所对应的感染条件及感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 可用于后续正式感染 SRA01/04 细胞的实验。由于此慢病毒含有嘌呤霉素抗性基因, 故可在感染 3~4d 后往完全培养基中加入适量嘌呤霉素以筛选目标基因稳定表达的细胞。

1.2.3.2 RT-PCR 筛选干扰效果佳的 RGN-RNAi 慢病毒载体 选取各组适量感染成功的细胞, 常规消化、离心收集细胞沉淀, 通过总 RNA 提取试剂盒收集细胞内 RNA, 用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 最后用 Real time PCR 仪器检测各组感染 SRA01/04 细胞中相对 RGN mRNA 的表达情况。内参基因和目的基因引物由吉凯基因设计合成, RGN-F: 5'-GGTCGCTAGACCACAAAATCT-3', RGN-R: 5'-CTAAACGAATCACTCTTCCTCC-3', 扩增片段大小为 210bp; 内参基因引物为 GAPDH - F: 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA - 3', GAPDH - R: 5'-CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA - 3', 扩增片段大小为 121bp。反应体系为 20μL。反应参数: 95℃ 预变性 30s, 95℃ 变性 15s, 60℃ 复性延伸 30s, 进行 40 次循环; 熔解曲线为 95℃ 5s, 60℃ 60s, 95℃ 5s continuous, 最后 50℃ 30s 结束反应。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算基因表达的相对比值。

1.2.4 RGN-RNAi 对高钙状态下细胞增殖和氧化应激的影响

1.2.4.1 构建 SRA01/04 细胞高钙培养状态 参考课题组前期研究结果^[6], 用含 15mmol/L CaCl₂ 的完全培养基处理 SRA01/04 细胞 24h 模拟白内障形成时细胞外高钙/钙

紊乱的病理状态。在后续实验中, 将选用 RGN-RNAi 干扰效果最佳的实验组、NCKD 组及 CON 组在此状态培养后, 进行细胞增殖活力和氧化指标的检测。

1.2.4.2 BrdU-Elisa 法检测高钙状态下的细胞增殖活力

按细胞量 2×10³ 个/孔均匀接种于 96 孔板, 在高钙培养状态下, 于细胞贴壁后第 1、4d 检测细胞增殖活力。参照 BrdU-Elisa 试剂盒操作说明, 用培养基以 1:100 稀释 BrdU 原液, 在检测前每孔加入 10μL 稀释后的 BrdU 试剂, 作用 8h。吸弃上述液体, 室温避光, 分别加入 FixDenat 试剂 (200μL/孔) 和 10% BSA (200μL/孔) 进行固定及封闭各 30min; 用 Anti-BrdU-POD 工作液 (200μL/孔) 孵育 90min。用无菌双蒸水按 1:10 稀释 washing Buffer, 每孔加入 200~300μL, 洗板 3 次, 待干。随后在空的细胞板外盒中加入无菌双蒸水, 将待测培养板放入其中, 无菌双蒸水没过培养孔, 待干。室温避光, 加入 substrate solution (100μL/孔) 作用 5~30min, 待液体变成蓝色, 加入 10% H₂SO₄ (50μL/孔), 使用酶标仪检测单波长为 450nm 时的 OD 值。

1.2.4.3 高钙状态下细胞氧化指标的检测 检测细胞内 SOD 活性及 GSSG/T-GSH 水平以反映细胞抗氧化及氧化水平的变化。SOD 活性用总 SOD 测定试剂盒 (WST-1 法) 检测, 细胞常规消化、离心收集细胞沉淀, 用 500μL PBS 轻洗细胞 2 次, 离心收集细胞沉淀, 加入 500μL PBS 轻吹匀, 在冰水浴下超声破碎细胞, 将该原液稀释成梯度浓度样本待用, 用酶标仪读取测定 OD_{450nm}, 核酸微量检测仪测定样本蛋白浓度, 计算 SOD 活力。GSSG/T-GSH 水平用 GSSG/T-GSH 试剂盒检测, 细胞处理步骤同前, 加入 500μL 试剂 4 (试剂盒自带) 混匀后在冰水浴下超声破碎细胞, 酶标仪测出 OD_{450nm} 数值, 计算 GSSG/T-GSH 比值。

统计学分析: 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。计量资料均采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 经方差齐性检验 (Levene 法) 后, 用单因素方差分析对多组间数据进行比较, 随后用 LSD-t 检验进行两两比较。P<0.05 为差异有统计学意义。

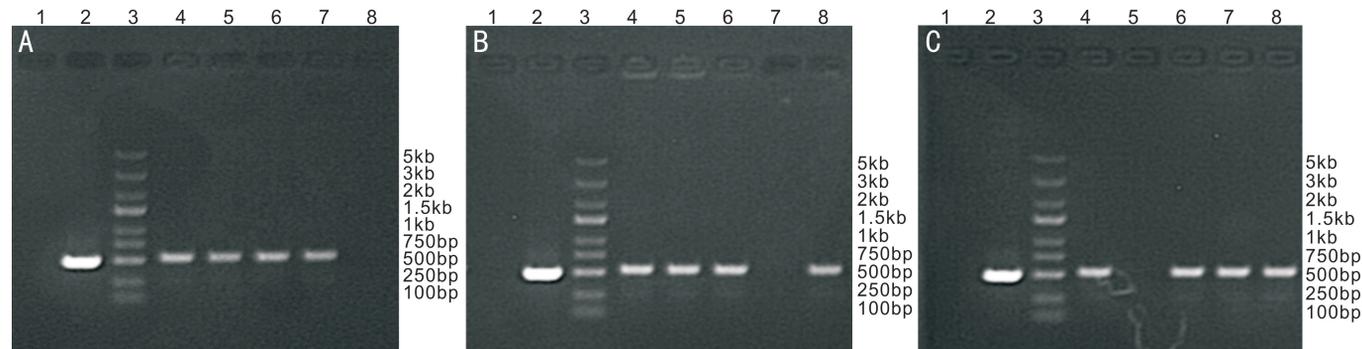


图1 RGN-RNAi 载体阳性克隆的 PCR 鉴定 A:RGN-RNAi-1;B:RGN-RNAi-2;C:RGN-RNAi-3。1;以 ddH₂O 为空白对照模板,拟鉴定体系无污染;2;以未插入靶向基因的空载体为阴性对照模板,拟证明扩增过程无假阳性现象;3;Marker;4~8:RGN-RNAi 转化子鉴定。

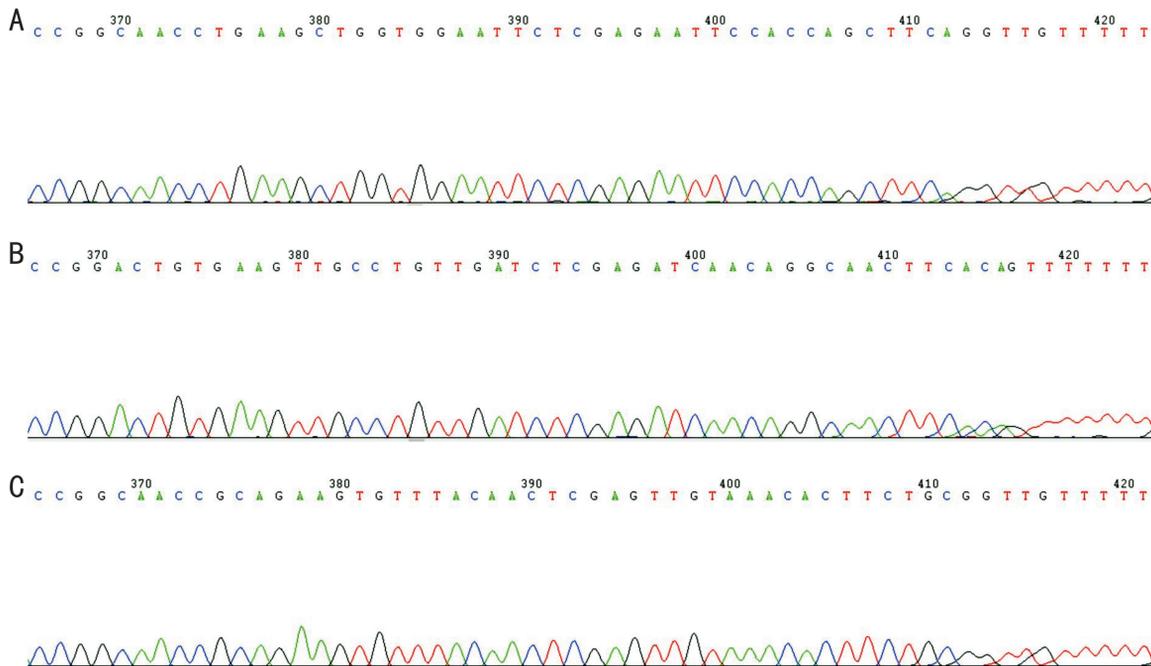


图2 RGN-RNAi 重组质粒测序结果 A:RGN-RNAi-1;B:RGN-RNAi-2;C:RGN-RNAi-3。

2 结果

2.1 RGN-RNAi 慢病毒载体的鉴定 菌落 PCR 鉴定结果显示,连接入 shRNA 片段的阳性克隆片段大小为 542bp,没有连接入 shRNA 片段的空载体克隆片段大小为 508bp,结合 PCR 电泳图初步证实阳性克隆的目的基因片段已正确插入 GV248 慢病毒载体(图 1)。选取连接成功的克隆进行测序分析,结果提示 3 组慢病毒载体均有已设计的目的基因片段,其序列和设计的人 RGN 寡核苷酸序列完全相同(图 2),再次证实目的基因片段已插入 GV248 载体中,重组 RGN-RNAi 慢病毒载体构建成功。

2.2 RGN-RNAi 慢病毒包装与滴度测定 本研究所使用的 GV248 慢病毒载体携带增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein, eGFP) 基因,是一种广泛用于细胞内靶蛋白分子定位和功能观察的报告基因,故可通过观察细胞内 GFP 的表达情况分析感染结果。将携带靶向基因的 GV248 载体质粒、病毒包装辅助质粒(pHelper1.0 载体质粒+pHelper2.0 载体质粒)同时感染 293T 细胞,收集、浓缩、纯化病毒。用荧光法测定滴度,取 10 μ L 浓缩后的病毒采用 10 倍梯度稀释后感染 293T 细胞,根据稀释倍数及 GFP 的表达情况,可见荧光细胞数随稀释倍数的增加而减少,RGN-RNAi-1、RGN-RNAi-2、RGN-RNAi-3 三种

慢病毒的滴度分别为 8×10^8 、 1×10^9 、 1×10^9 TU/mL,提示均有大量质粒转入 293T 细胞,病毒包装成功(图 3)。

2.3 RGN-RNAi 慢病毒感染 SRA01/04 细胞 预实验结果表明,细胞贴壁率达到约 20%时,以 MOI = 5 为基础,配置含适量的慢病毒及 5 μ g/mL 助感染试剂的完全培养基,培养细胞约 16h 后更换为普通完全培养基,约 72h 后荧光显微镜观察可见感染细胞有 GFP 表达,感染效率接近 80%,且细胞生长状态良好,感染细胞多次传代形态均一旦性状稳定,提示细胞感染成功。后续实验以细胞 5×10^4 个/孔均匀接种于 6 孔板进行正式感染,用于增加每次感染细胞的数量,接种体积为 2mL/孔,换液体积为 1mL/次(图 4)。

2.4 RGN-RNAi 对 SRA01/04 细胞 RGN 基因表达的影响 RGN-RNAi 慢病毒以优化条件感染 SRA01/04 细胞后,收集 RNA 样品,应用 Real time PCR 检测 SMP30 靶向基因 RGN mRNA 表达水平的变化,结果显示,CON 组、NCKD 组、实验组(KD1~3)细胞 RGN mRNA 相对表达量分别为 0.95 ± 0.08 、 1.00 ± 0.03 、 0.07 ± 0.01 、 0.40 ± 0.06 、 0.26 ± 0.04 ,差异有统计学意义($F = 191.734$, $P < 0.001$; $n = 3$);CON 组和 NCKD 组细胞 RGN mRNA 的表达水平差异无统计学意义($P = 0.26$),提示慢病毒空载质粒感染对

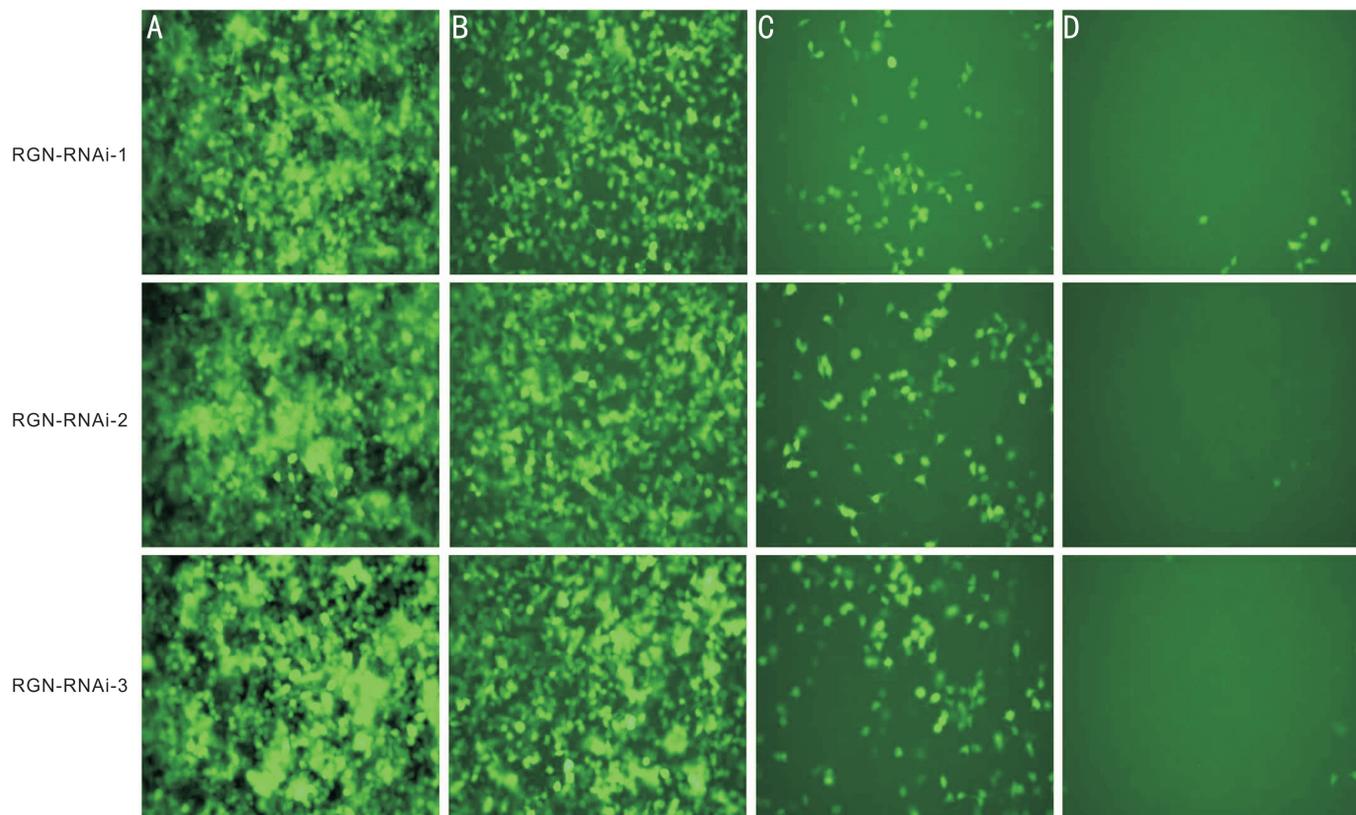


图3 RGN-RNAi 慢病毒感染 293T 细胞后的滴度测定荧光图($\times 100$) A:1 μ L 病毒原液;B:0.1 μ L 病毒原液;C:0.01 μ L 病毒原液;D:0.001 μ L 病毒原液。

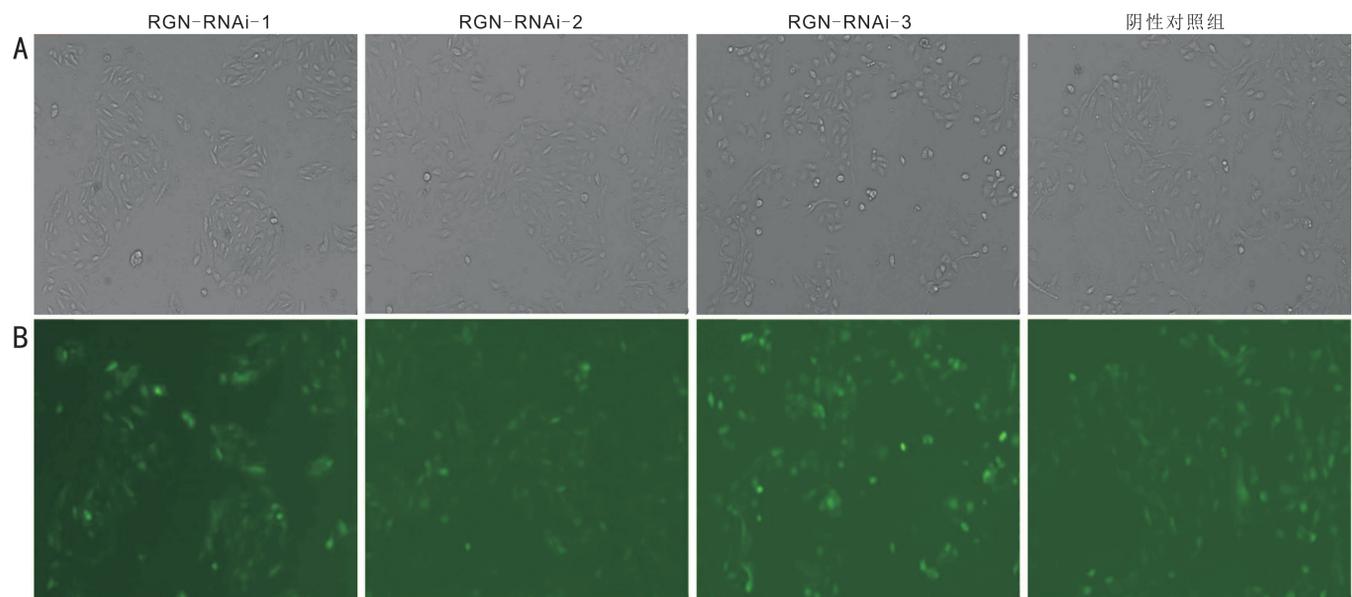


图4 RGN-RNAi 慢病毒感染 SRA01/04 细胞($\times 100$) A:光学显微镜下观察;B:荧光显微镜下观察。

SMP30 靶向基因 RGN 的表达无特异性的影响;与 NCKD 组相比,实验组(KD1~3)细胞 RGN mRNA 水平均有不同程度降低(均 $P < 0.001$),实验组(KD1~3)的敲减效率分别为 93%、60%、74%,故选择干扰效果最佳的 KD1 组 shRNA 片段进行后续实验。

2.5 RGN-RNAi 对高钙状态下 SRA01/04 细胞增殖的影响 本研究以第 4d 与第 1d OD450nm 的比值 (OD_{day4}/OD_{day1}) 表示各组细胞的相对增殖活力。BrdU-Elisa 检测结果显示,高钙状态下,CON 组、NCKD 组、实验组(KD1)细胞相对增殖活力分别为 2.96 ± 0.25 、 2.95 ± 0.08 、 2.42 ± 0.08 ,差异有统计学意义($F = 11.37$, $P = 0.01$; $n = 3$);实验

组(KD1)细胞相对增殖活力低于 CON 组和 NCKD 组(均 $P = 0.01$),但 CON 组和 NCKD 组之间差异无统计学意义($P = 0.97$)。

2.6 RGN-RNAi 对高钙状态下 SRA01/04 细胞氧化应激的影响 SOD 活性检测结果显示,高钙状态下,CON 组、NCKD 组、实验组(KD1)细胞 SOD 活力分别为 26.33 ± 1.04 、 31.10 ± 2.24 、 11.69 ± 0.52 U/mg,差异有统计学意义($F = 57.81$, $P = 0.01$; $n = 3$);实验组(KD1)细胞 SOD 活力低于 CON 组和 NCKD 组(均 $P < 0.001$),但 CON 组和 NCKD 组之间差异无统计学意义($P = 0.07$)。

GSSG/T-GSH 水平检测结果显示,高钙状态下,CON

组、NCKD组、实验组(KD1)细胞GSSG/T-GSH水平分别为 20.05 ± 2.45 、 15.93 ± 3.47 、 70.80 ± 2.34 ,差异有统计学意义($F = 357.63$, $P < 0.001$; $n = 3$);实验组(KD1)细胞GSSG/T-GSH水平高于CON组和NCKD组(均 $P < 0.001$),但CON组和NCKD组之间差异无统计学意义($P = 0.12$)。

3 讨论

SMP30基因定位于X染色体的11.3~11.23区域,由7个外显子和6个内含子组成,有研究发现,SMP30与一种编码Regucalcin蛋白的cDNA相同,两者均随机体衰老而逐渐减少,不受性别因素影响,故认为两者为同一种蛋白,其靶向基因符号为RGN。SMP30每分子蛋白质存在6~7个 Ca^{2+} 高亲和结合位点,其在肝、肾等组织细胞内钙稳态、细胞增殖、氧化应激、凋亡等方面发挥调控作用,故SMP30是一种具备多重保护作用的钙结合蛋白及钙信号转导蛋白,提示其在机体内的表达水平可能与衰老相关性疾病的分期相关,SMP30或许可作为机体衰老、疾病发生和进展的潜在性标记物^[7-10]。

近年研究发现,SMP30与白内障密切相关。在临床研究中,SMP30在年龄相关性白内障患者晶状体前囊膜周边部的LECs表达强,中央部表达弱,SMP30低表达区域出现人LECs衰老及凋亡程度加剧^[3-4]。在体外正常培养状态下,下调SMP30可使人LECs系SRA01/04细胞增殖活性下降、凋亡率增加^[11]。动物模型研究,在紫外线B照射诱导下,SMP30基因敲除小鼠由于内源性维生素C生成障碍而较野生型小鼠及维生素C喂养型KO小鼠更易出现晶状体混浊^[12]。提示SMP30可能是LECs内的一种保护性蛋白,其含量下降可能诱导/加速白内障的形成。

RNAi是一种广泛应用于基因功能研究的基因阻断技术,构建shRNA载体是目前RNAi最常用的方法之一,慢病毒载体能够产生表达高滴度shRNA的慢病毒,通过慢病毒载体介导RNAi,即结合慢病毒载体高效、整合的优点与RNAi的特性,可长期、稳定地抑制靶向基因的表达,并传代到子代细胞中,是构建理想的实验细胞模型的常见技术,其在白内障基础研究中的应用也愈加广泛^[13-14]。故本研究以慢病毒为载体,利用shRNA抑制人SMP30靶向基因RGN的表达,最终成功构建干扰SMP30表达效果佳、感染SRA01/04效率高的shRNA慢病毒载体,以SMP30低表达人LECs系SRA01/04细胞为基础开展系列研究。

关于白内障病因学的基础研究表明,持续高钙和氧化损伤状态是白内障重要的发病因素。既往国内外学者通过含高浓度 Ca^{2+} 的培养液培养透明晶状体和LECs发现,晶状体混浊与体外 Ca^{2+} 浓度的增加相关,细胞外异常的高钙浓度可使LECs钙稳态丧失,最终导致白内障^[15-16]。此外, Ca^{2+} 超载又可破坏线粒体、内质网等钙、氧化调节相关细胞器结构,加聚钙紊乱及氧化应激程度,并形成恶性循环^[17-18]。SOD活力和GSSG/T-GSH水平能间接反映细胞抗氧化损伤能力和氧化应激程度。故本研究结合前期研究结果,选用15mmol/L $CaCl_2$ 配制高钙培养基,培养SRA01/04细胞24h,通过体外构建高钙培养状态,用于模拟白内障形成过程中人LECs出现高钙/钙紊乱的病理状态。我们发现,在高钙培养状态下,下调SMP30的表达,

可导致SRA01/04细胞增殖活力及抗氧化能力减弱,细胞内氧化应激程度加剧。有文献报道,SMP30/Regucalcin作为一种钙调节蛋白,可通过增加细胞肌浆网 Ca^{2+} -ATP酶(SERCA)活性、线粒体 Ca^{2+} -ATP酶活性和ATP依赖性 Ca^{2+} 摄取加速肌质网和线粒体中 Ca^{2+} 的摄取,以维持细胞内钙稳态和增加细胞存活率的作用^[19-21]。由此我们分析,在高钙诱导细胞损伤的状态下,SMP30在SRA01/04细胞中可能也具有调节 Ca^{2+} 信号转导有关的酶活性、维持细胞钙稳态的作用,当SMP30含量减少,其对SRA01/04细胞的保护作用减弱,使细胞易处于各种损伤因素所致的 Ca^{2+} 异常波动的环境,加剧细胞内钙紊乱及氧化损伤的程度,导致细胞增殖活力下降或细胞死亡,最终诱导白内障的形成或发展。

综上所述,高钙培养状态下,shRNA慢病毒载体介导的SMP30低表达SRA01/04(人LECs)细胞增殖活力及抗氧化应激能力减弱,提示增加细胞外 Ca^{2+} 浓度模拟人LECs在白内障形成的病理状态条件,SMP30的存在可能在一定程度上延缓了SRA01/04细胞应激损伤进程,具有调控细胞增殖和抗氧化损伤的保护作用。虽已有研究报道高表达SMP30在人LECs系中具有增加细胞生存率、抗凋亡、抑制活性氧、延缓紫外线损伤等作用^[11,22],但本实验从另一角度开展低表达SMP30对人LECs作用的初步研究,为未来探索SMP30在人LECs和晶状体中的作用提供了新的实验基础。然而,关于SMP30在人LECs内可能参与钙调控信号通路的具体机制等内容尚未明确,有待后期进一步研究。

参考文献

- 1 Pillai H, Parmar MS, Shende AM, et al. Effect of supplementation of recombinant Regucalcin in extender on cryopreservation of spermatozoa of water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Mol Reprod Dev* 2017; 84(11): 1133-1139
- 2 赖伟霞, 谭少健, 李霞, 等. 衰老标记蛋白30在不同年龄白内障患者晶状体上皮细胞中的表达变化. *中华实验眼科杂志* 2014; 32(6): 521-524
- 3 刘兰, 蔡小军, 余爱华, 等. 不同类型年龄相关性白内障晶状体上皮细胞衰老标记蛋白30的表达及与细胞凋亡的关系. *中华实验眼科杂志* 2012; 30(6): 529-533
- 4 Zhou D, Yin D, Xiao F, et al. Expressions of senescence-associated β -galactosidase and senescence marker protein-30 are associated with lens epithelial cell apoptosis. *Med Sci Monit* 2015; 21: 3728-3735
- 5 Periyasamy P, Shinohara T. Age-related cataracts: Role of unfolded protein response, Ca^{2+} mobilization, epigenetic DNA modifications, and loss of Nrf2/Keap1 dependent cytoprotection. *Prog Retin Eye Res* 2017; 60: 1-19
- 6 陈曦, 韩子豪, 李舒凝, 等. 高钙状态对人晶状体上皮细胞株SRA01/04氧化应激水平的影响. *眼科新进展* 2017; 37(10): 906-910
- 7 Yamaguchi M, Sakurai T. Inhibitory effect of calcium-binding protein regucalcin on Ca^{2+} -activated DNA fragmentation in rat liver nuclei. *FEBS Lett* 1991; 279(2): 281-284
- 8 Choo J, Heo G, Jin Kim S, et al. Senescence marker protein 30 protects intestinal epithelial cells against inflammation-induced cell death by enhancing Nrf2 activity. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018; 1864(12): 3668-3678
- 9 Yamaguchi M, Osuka S, Murata T. Prolonged survival of patients with colorectal cancer is associated with a higher regucalcin gene expression: Overexpression of regucalcin suppresses the growth of human colorectal

carcinoma cells *in vitro*. *Int J Oncol* 2018; 53(3): 1313–1322

10 Shimokawa N, Yamaguchi M. Molecular cloning and sequencing of the cDNA coding for a calcium-binding protein regucalcin from rat liver. *FEBS Lett* 1993; 327(3): 251–255

11 Chen X, Li SM, Li YW, *et al*. Effect of senescence marker protein 30 on the proliferation and apoptosis of human lens epithelial cells SRA01/04. *Int J Ophthalmol* 2018; 11(4): 553–558

12 Ishikawa Y, Hashizume K, Kishimoto S, *et al*. Effect of vitamin C depletion on UVR-B induced cataract in SMP30/GNL knockout mice. *Exp Eye Res* 2012; 94(1): 85–89

13 王逸涵, 柳林. 慢病毒载体介导雷帕霉素靶蛋白沉默对体外人晶状体上皮细胞增生的抑制作用. *中华实验眼科杂志* 2015; 33(4): 328–332

14 李贞, 徐庆, 张慧. 慢病毒介导的 TGFβ-R2 shRNA 抑制人 LECs 细胞 TGFβ-R2 的表达. *国际眼科杂志* 2014; 14(1): 9–12

15 Matsushima H, Mukai K, Yoshida S, *et al*. Effects of calcium on human lens epithelial cells *in vitro*. *Jpn J Ophthalmol* 2004; 48(2): 97–100

16 杨义, 鲁建华, 张文芳, 等. 钙蛋白酶抑制剂 E-64d 对高钙诱导的白内障的保护作用. *国际眼科杂志* 2015; 15(6): 972–975

17 Chan CM, Huang DY, Huang YP, *et al*. Methylglyoxal induces cell death through endoplasmic reticulum stress-associated ROS production and mitochondrial dysfunction. *J Cell Mol Med* 2016; 20(9): 1749–1760

18 Krebs J, Agellon LB, Michalak M. Ca²⁺ homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 460(1): 114–121

19 Son TG, Kim SJ, Kim K, *et al*. Cytoprotective roles of senescence marker protein 30 against intracellular calcium elevation and oxidative stress. *Arch Pharm Res* 2008; 31(7): 872–877

20 Lai P, Yip NC, Michelangeli F. Regucalcin (RGN/SMP30) alters agonist- and thapsigargin-induced cytosolic [Ca²⁺] transients in cells by increasing SERCA Ca²⁺-ATPase levels. *FEBS Lett* 2011; 585(14): 2291–2294

21 Ricardo M, Maia CJ, Cátia V, *et al*. The diverse roles of calcium-binding protein regucalcin in cell biology: from tissue expression and signalling to disease. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(1): 93–111

22 滕贺, 黄亮瑜, 田芳, 等. 衰老标记蛋白 30 高表达对紫外线诱导人晶状体上皮细胞凋亡的影响. *中华眼科杂志* 2017; 53(11): 835–841