

## 重楼皂苷 I 对低氧喉癌 Hep-2 细胞增殖和 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 表达的影响

邓碧凡<sup>1</sup>, 廖敏<sup>1</sup>, 邱荣敏<sup>1</sup>, 高波<sup>1</sup>, 张云桂<sup>1</sup>, 马燕<sup>1</sup>, 龙剑文<sup>2</sup>

**摘要** 目的 研究重楼皂苷 I 对低氧喉癌 Hep-2 细胞增殖及缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )、血管内皮生长因子 (VEGF) 表达的影响。方法 采用 MTT 法检测重楼皂苷 I 对细胞增殖的影响, 实时定量 PCR (RT-PCR) 法检测低氧条件下重楼皂苷 I 对 Hep-2 细胞 HIF-1 $\alpha$  mRNA、VEGF mRNA 表达的影响。采用 Western blot 法检测低氧条件下, 重楼皂苷 I 对 Hep-2 细胞 VEGF、HIF-1 $\alpha$ 、信号传导与转录激活因子 3 (STAT-3)、磷酸化信号传导与转录激活因子 3 (p-STAT-3) 蛋白表达的影响。结果 重楼皂苷 I 对低氧喉癌 Hep-2 细胞的增殖有抑制作用; 其中 1.5、3、6  $\mu\text{g/ml}$  浓度组重楼皂苷 I 可下调低氧 Hep-2 细胞 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 和蛋白的表达。同时, 重楼皂苷 I 抑制了 STAT-3、p-STAT-3 的表达。结论 重楼皂苷 I 能抑制低氧条件下喉癌 Hep-2 细胞增殖和 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 的表达, 可能与其下调 STAT-3 表达及抑制 STAT-3 的磷酸化有关。

**关键词** 重楼皂苷 I; Hep-2 细胞; 细胞增殖; HIF-1 $\alpha$ ; VEGF  
中图分类号 R 767.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)11-1613-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.013

喉鳞状细胞癌为常见头颈部恶性肿瘤, 我国喉癌发病率约占头颈部肿瘤的 13.9%, 为全身恶性肿瘤的 2.1%<sup>[1]</sup>。虽然近来喉癌治疗方式已有很大提高, 但喉癌患者总的生存率仍然很低。喉癌的综合治疗已成为一种治疗趋势。寻找高效、低毒的抗喉癌药物十分重要。低氧是实体恶性肿瘤增殖中一种常见现象<sup>[2]</sup>, 缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1- $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 是喉癌肿瘤低氧中的中枢环节, 调控相关基因的转录<sup>[3]</sup>。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是促血管生成因子, 目前是抑制肿瘤血管生成的主要靶点<sup>[4]</sup>。信号传导及转录激活因子 3 (signal transducers and ac-

tivators of transcription 3, STAT-3) 参与肿瘤细胞的增殖, 并可以调节 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的表达<sup>[5]</sup>。重楼是中医治疗肿瘤的常用药物之一, 目前研究<sup>[6]</sup>表明, 重楼有效成分重楼皂苷 I 对某些肿瘤细胞具有抑制作用, 但对喉癌肿瘤细胞作用如何, 目前暂无报道。该研究观察重楼皂苷 I 对低氧条件下喉癌 Hep-2 细胞增殖活性的影响, 以及对低氧 Hep-2 细胞 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 和 STAT-3 表达的影响, 探讨重楼皂苷 I 治疗喉癌的可能机制。

### 1 材料与方法

**1.1 主要试剂及仪器** 重楼皂苷 I 粉剂 (中国药品生物制品检定所); Hep-2 喉癌细胞株 [中国科学院 (上海)]; 100 U/L 青霉素、100  $\mu\text{g/L}$  链霉素和 MTT 试剂盒 (武汉博士德生物公司); DMEM 培养基、小牛血清和胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); TRIzol 总 RNA 提取试剂 (美国 Invitrogen 公司); Quanton-estep RT-PCR 试剂盒、SYBR green 荧光实时定量 PCR 试剂盒 (北京天根生化公司); 多克隆兔抗 VEGF、多克隆兔抗 STAT3、多克隆兔抗 HIF-1 $\alpha$ 、多克隆兔抗 p-STAT3、 $\beta$ -actin 试剂盒 (美国 Santa Cruz 公司); 辣根酶标记抗兔 IgG 抗体 (英国 Abcam 公司); 辣根酶标记的  $\beta$ -actin 抗体 (上海兴悠生物科技有限公司); ECL 试剂盒 (瑞典 Amersham Biosciences 公司)。分光光度仪 (芬兰 Multiskan MS 公司); 细胞培养箱 (美国 Thermo Electron 公司)

**1.2 细胞培养** 将 Hep-2 细胞在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  空气, 含 100 U/ml 青霉素、100  $\mu\text{g/ml}$  链霉素和 10% 胎牛血清的培养基内培养, 在细胞聚集达 60%~70% 时, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 含 1%  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、94%  $\text{N}_2$  的低氧培养箱中继续培养 36 h, 提取细胞总 RNA 及总蛋白。

**1.3 MTT 法检测细胞增殖实验** 将 Hep-2 细胞接种于 96 孔板 (5  $\times$  10<sup>4</sup> 个/孔), 细胞生长至 60%~70% 融合状态时, 加入重楼皂苷 I, 各组终浓度分别为 0、0.75、1.5、3.0、6.0  $\mu\text{g/ml}$  (预实验显示以上浓度对人角质形成细胞无细胞毒作用), 每组 6 个平

2016-06-15 接收

基金项目: 湖北省卫生计生委中医药、中西医结合科研指导性项目 (编号: 2013Z-B05)

作者单位: <sup>1</sup>贺州市人民医院耳鼻喉头颈外科, 贺州 542899

<sup>2</sup>湖北中医药大学临床医学院, 武汉 430061

作者简介: 邓碧凡, 男, 硕士, 副主任医师, 责任作者, E-mail: ljwhbzyy@qq.com

行孔,低氧培养 36 h,加入 20 μl 5 mg/ml MTT 培养 4 h,再加入 DMSO 振荡,调零,于酶标仪 570 nm 波长处检测各组的光密度(optical density, OD)值。细胞生长抑制率(IR) = 1 - OD<sub>1</sub>/OD<sub>2</sub>, OD<sub>1</sub> 表示实验组细胞 OD 值, OD<sub>2</sub> 表示空白对照组 OD 值,实验重复 3 次。

**1.4 测定低氧条件下重楼皂苷 I 对 HIF-1α mRNA、VEGF mRNA 表达的影响** Hep-2 细胞培养同 1.3。设计相关基因上、下游引物, HIF-1α 上游引物: 5'-CAACCGGTTTAAGGACACATTCTG-3', 下游引物: 5'-TCTGGGTTGAAACTCAAGCAACTG-3' 扩增产物片段长度 150 bp; VEGF 上游引物: 5'-AAGTG-GTCCCAGGCTGCA-3', 下游引物: 5'-CTCCAGGC-CCTCGTCA-3' 扩增长度为 216 bp; GAPDH 上游引物: 5'-CCTCAAGATCATCAGCAAT-3', 下游引物: 5'-CCATCCACAGTCTTCTGGGT-3', 扩增长度为 141 bp。提取总 RNA 反转录合成 cDNA; 取 cDNA 1 μl, 加入 2.5 × RealMasterMix/20 × SYBR Solution 11.25 μl, 上下游引物各为 1 μl, 加无 Rnase 水, 反应体积共 25 μl; PCR 反应条件: 95 °C 预变性 2 min, 循环条件为 95 °C 变性 15 s, 50 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 50 s。采用 ΔCt 值法计算结果 ΔCt = 样品的 Ct 均值 - 内参的 Ct 均值 2<sup>-ΔΔCt</sup> 即为初始 cDNA 的相对含量。

**1.5 Western blot 法检测** Hep-2 细胞培养同 1.3, 收集细胞 提取细胞总蛋白, 用 BCA 法蛋白定量, 上样, SDS-PAGE 凝胶电泳后, 转膜, PBS 洗膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h; PBS 洗膜, 加一抗(兔抗 VEGF 1 : 500、兔抗 STAT3 1 : 500、兔抗 HIF-1α 1 : 500、兔抗 p-STAT3 1 : 400) 4 °C 过夜; PBS 洗膜; 加入二抗(辣根酶标记抗兔 IgG 抗体 1 : 3 000) 孵育 0.5 h, 洗膜, 采用 ECL 试剂盒检测。以 β-actin 为内参校正。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 组间均数比较采用 t 检验。

**2 结果**

**2.1 MTT 法检测 Hep-2 细胞的生长活性** 低氧条件下培养 36 h 后, 重楼皂苷 I 6 μg/ml 组 (t = 35.22, P < 0.01)、3 μg/ml 组 (t = 21.14, P < 0.01)、1.5 μg/ml 组 (t = 9.33, P < 0.01) 与空白对照组抑制率比较差异有统计学意义; 3 μg/ml 组 (t = 12.06, P < 0.01)、1.5 μg/ml 组 (t = 23.89, P < 0.01) 与 6 μg/ml 组抑制率比较差异有统计学意义。结果表明重楼皂苷 I 对低氧条件下 Hep-2 细胞的生长有抑制作用, 其作用具有浓度依赖性。见图 1。

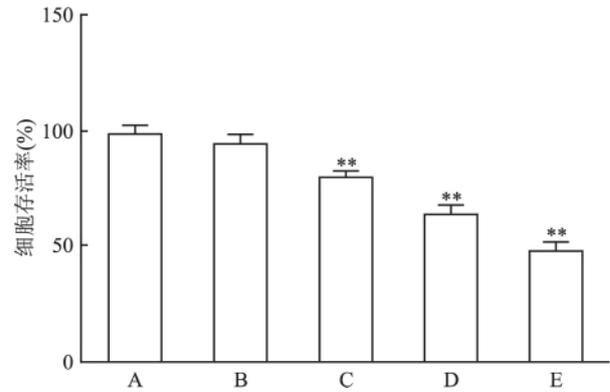
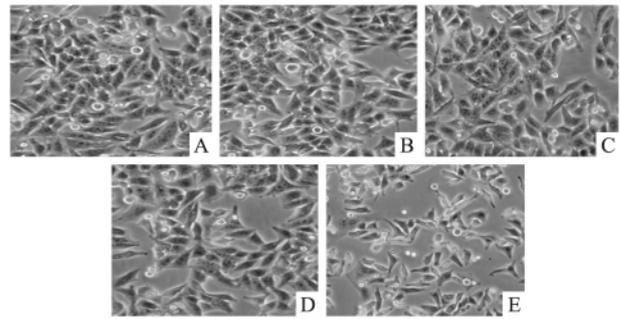


图 1 重楼皂苷 I 对低氧条件下 Hep-2 细胞增殖作用的影响 ×400

A: 空白对照组; B ~ E: 重楼皂苷 I 0.75、1.5、3.0、6.0 μg/ml 组; 与空白对照组比较: \*\* P < 0.01

**2.2 重楼皂苷 I 对低氧条件下 Hep-2 细胞 HIF-1α mRNA、VEGF mRNA 表达的影响** 与空白对照组比较, 6 μg/ml 组 (t = 14.89, P < 0.01)、3 μg/ml 组 (t = 10.65, P < 0.01) 和 1.5 μg/ml 组 (t = 7.11, P < 0.01) 重楼皂苷 I 对低氧条件下 Hep-2 细胞 HIF-1α mRNA 表达均有抑制作用。与空白对照组比较, 6 μg/ml 组 (t = 17.21, P < 0.01)、3 μg/ml 组 (t = 12.84, P < 0.01) 和 1.5 μg/ml 组 (t = 7.83, P < 0.01) 重楼皂苷 I 对低氧条件下 Hep-2 细胞 VEGF mRNA 表达均有抑制作用。见图 2。

**2.3 重楼皂苷 I 对低氧条件下 Hep-2 细胞 HIF-1α、VEGF、p-STAT3、STAT3 表达的影响** 与空白对照组比较, 6 μg/ml 组 (t = 23.97, P < 0.01)、3 μg/ml 组 (t = 14.04, P < 0.01) 和 1.5 μg/ml 组 (t = 9.51, P < 0.01) 重楼皂苷 I 对低氧条件下 Hep-2 细胞 p-STAT3 蛋白表达有明显抑制作用。与空白对照组比较, 6 μg/ml 组 (t = 8.36, P < 0.01) 和 3 μg/ml 组 (t = 4.33, P < 0.01) 重楼皂苷 I 对低氧条件下 Hep-2 细胞 STAT3 蛋白表达有明显抑制作用。与空白对照组比较, 6 μg/ml 组 (t = 23.03, P < 0.01)、3 μg/ml 组 (t = 18.58, P < 0.01) 和 1.5 μg/ml

ml 组 ( $t = 13.21, P < 0.01$ ) 重楼皂苷 I 对低氧条件下 Hep-2 细胞 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达有抑制作用。与空白对照组比较, 6  $\mu\text{g/ml}$  组 ( $t = 22.56, P < 0.01$ )、3  $\mu\text{g/ml}$  组 ( $t = 13.00, P < 0.01$ ) 和 1.5  $\mu\text{g/ml}$  组 ( $t = 9.09, P < 0.01$ ) 重楼皂苷 I 对低氧 Hep-2 细胞 VEGF 蛋白表达有抑制作用。见图 3。

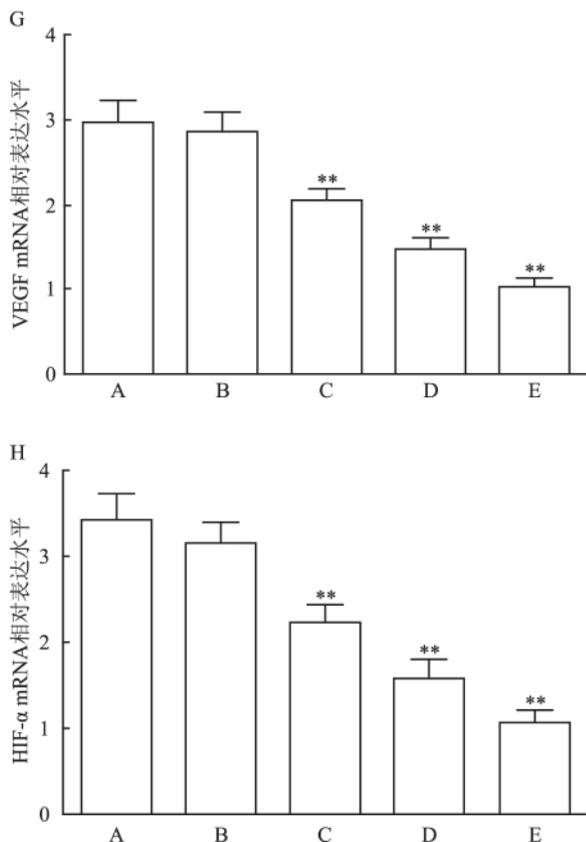


图2 重楼皂苷 I 对低氧条件下 Hep-2 细胞 HIF-1 $\alpha$  mRNA、VEGF mRNA 表达的影响

A: 空白对照组; B ~ E: 重楼皂苷 I 0.75、1.5、3.0、6.0  $\mu\text{g/ml}$  组; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

由于喉癌肿瘤组织生长过快, 肿瘤细胞往往存在低氧情况。研究<sup>[7]</sup>显示, 随着低氧时间的延长, Hep-2 细胞计数会逐渐增高。这说明一定程度的低氧会促进喉癌 Hep-2 细胞的增殖。经过重楼皂苷 I 处理后, 抑制了低氧诱导的 Hep-2 细胞的增殖, 提示重楼皂苷 I 具有抑制喉癌肿瘤细胞增殖的活性。以往研究<sup>[6]</sup>表明重楼皂苷 I 对多种肿瘤细胞具有抑制作用, 并能通过线粒体途径诱导耐药性肝癌细胞的凋亡。但在喉癌 Hep-2 细胞中, 重楼皂苷 I 是通过何种途径发挥抑制作用还需要进一步研究。

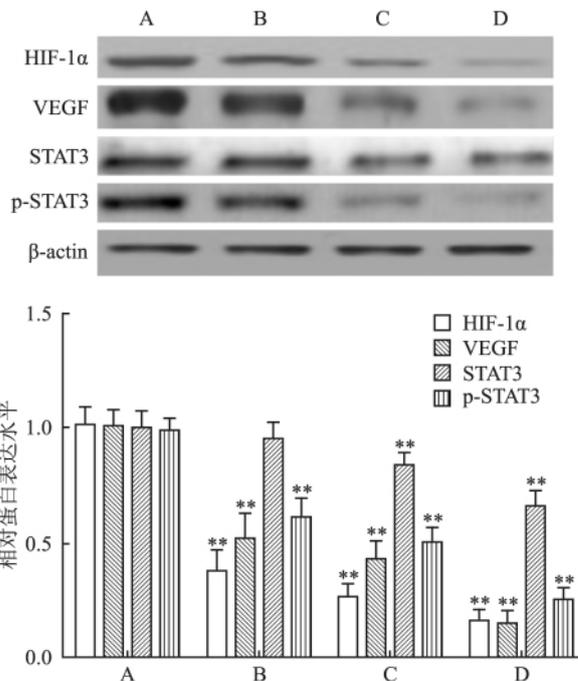


图3 重楼皂苷 I 对低氧条件下 Hep-2 细胞 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、p-STAT3、STAT3 蛋白表达的影响

A: 空白对照组; B ~ D: 重楼皂苷 I 1.5、3.0、6.0  $\mu\text{g/ml}$  组; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

研究<sup>[8]</sup>表明 HIF-1 $\alpha$  在细胞低氧中发挥重要作用, HIF-1 是一种由 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  组成的异源二聚体。在正常情况下, HIF-1 $\alpha$  通过羟基化而降解, 低氧条件下, HIF-1 $\alpha$  羟基化降解被抑制, 与 HIF-1 $\beta$  组成异源二聚体, 转入核内调节靶基因的转录<sup>[8]</sup>。靶基因包括 VEGF、促红细胞生成素、转铁蛋白、内皮素 1、诱导型一氧化氮合酶和胰岛素样生长因子等<sup>[9]</sup>, 从而促进肿瘤细胞的生长。VEGF 是血管内皮细胞的特异性丝裂原, 能够介导新生血管的形成, 在喉癌的生长、侵袭中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。且与喉癌的分化程度、淋巴结有无转移和 TNM 分期有关<sup>[11]</sup>。研究<sup>[12]</sup>表明重楼皂苷 I 能够抑制低氧情况下 Lewis 肿瘤细胞 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF mRNA 和蛋白的表达。本研究也表明重楼皂苷 I 对低氧 Hep-2 细胞 HIF-1 $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达均有抑制作用。

在肿瘤中, 各种蛋白激酶的活化已被证实, 虽然不同的激酶转导途径不同, 但 STAT3 在多数信号通路中发挥重要作用<sup>[13]</sup>, STAT3 蛋白通过上调细胞凋亡抑制基因(如 MCL1 等)的转录和细胞周期调节蛋白(如 MYC 等)的表达, 参与和促进肿瘤的发生<sup>[14]</sup>。STAT3 的活化是许多恶性肿瘤的重要特征<sup>[15]</sup>。先前的一些研究<sup>[5]</sup>表明, STAT3 对于 HIF-

1 $\alpha$  表达是非常重要的, STAT3 抑制剂能下调 HIF-1 $\alpha$  表达。STAT3 也可通过诱导 VEGF 的产生参与肿瘤进展<sup>[16]</sup>。STAT3 抑制剂能有效抑制 VEGF 生产与肿瘤血管的形成<sup>[5]</sup>。Zhang et al<sup>[17]</sup> 发现 STAT3 抑制剂 AG490 能明显抑制喉癌 Hep-2 细胞的增殖。本研究结果表明重楼皂苷 I 能够下调低氧状态下喉癌 Hep-2 细胞 STAT3 的表达, 并抑制 STAT3 的磷酸化。这可能是重楼皂苷 I 抑制低氧喉癌 Hep-2 细胞增殖和 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 表达的原因之一。

综上所述, 重楼皂苷 I 能够抑制低氧喉癌 Hep-2 细胞增殖和 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 表达, 这可能与其下调 Hep-2 细胞 STAT3 的表达, 并抑制 STAT3 的磷酸化有关。

### 参考文献

- [1] 孔维佳. 耳鼻咽喉头颈外科学 [M]. 2 版. 人民卫生出版社, 2010: 460.
- [2] Weljie A M, Jirik F R. Hypoxia induced metabolic shifts in cancer cells: moving beyond the Warburg effect [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(7): 981-9.
- [3] Yu L, Liu Y, Cui Y. Expression of hypoxia inducible factor-1 alpha and its relationship to apoptosis and proliferation in human laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2004, 24(6): 636-8.
- [4] Grunstein J, Roberts W G, Mathieu-Costello O, et al. Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(7): 1592-8.
- [5] Xu Q, Briggs J, Park S, et al. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways [J]. *Oncogene* 2005 24(36): 5552-60.
- [6] Cheung J Y, Ong R C, Suen Y K, et al. Polyphyllin D is a potent apoptosis inducer in drug-resistant HepG2 cells [J]. *Cancer Lett*, 2005, 217(2): 203-11.
- [7] Xu O, Li X M, Qu Y T, et al. Regulation of glucose transporter protein-1 and vascular endothelial growth factor by hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  under hypoxic conditions in Hep-2 human cells [J]. *Mol Med Rep* 2012 6(6): 1418-22.
- [8] Wang G L, Jiang B H, Rue E A, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1995 92(12): 5510-4.
- [9] Elson D A, Ryan H E, Snow J W, et al. Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing [J]. *Cancer Res* 2000 60(21): 6189-95.
- [10] Bonhin R G, Rocha V B, de Carvalho G M, et al. Correlation between vascular endothelial growth factor expression and presence of lymph node metastasis in advanced squamous cell carcinoma of the larynx [J]. *Braz J Otorhinolaryngol* 2015 81(1): 58-62.
- [11] 瞿帅, 宋杨, 梅金玉, 等. IL-17 及其受体调控 JAK/STAT3 信号通路促进喉癌血管生成的作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015 50(10): 1464-7.
- [12] Ma D D, Lu H X, Xu L S, et al. Polyphyllin D exerts potent anti-tumour effects on Lewis cancer cells under hypoxic conditions [J]. *J Int Med Res* 2009 37(3): 631-40.
- [13] Bowman T, Garcia R, Turkson J, et al. STATs in oncogenesis [J]. *Oncogene*, 2000, 19(21): 2474-88.
- [14] Darnell J E Jr. STATs and gene regulation [J]. *Science*, 1997 277(5332): 1630-5.
- [15] Catlett-Falcone R, Dalton W S, et al. STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer an activator of transcription [J]. *Curr Opin Oncol* 1999 11(6): 490-6.
- [16] Niu G, Wright K L, Huang M, et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis [J]. *Oncogene* 2002 21(13): 2000-8.
- [17] Zhang H, Zhang D, Luan X, et al. Inhibition of the signal transducers and activators of transcription (STAT) 3 signaling pathway by AG490 in laryngeal carcinoma cells [J]. *J Int Med Res* 2010, 38(5): 1673-81.

## Effect of Polyphyllin I on proliferation and expressions of HIF-1 $\alpha$ , VEGF in laryngeal carcinoma cell line Hep-2 under hypoxia

Deng Bifan, Liao Min, Qiu Rongmin, et al

(Dept of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Hezhou People's Hospital, Hezhou 542899)

**Abstract Objective** To investigate the effects of Polyphyllin I on proliferation and expressions of HIF-1 $\alpha$ , VEGF in laryngeal carcinoma cell line Hep-2 under hypoxia. **Methods** MTT assay was performed to investigate the effect of Polyphyllin I on the proliferation of Hep-2 cells under hypoxic conditions. Real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction was used to detect the effect of Polyphyllin I on the expressions of HIF-1 $\alpha$  mRNA and VEGF mRNA. Western blot was used to detect the effect of Polyphyllin I on the expressions of VEGF, HIF-1 $\alpha$ , STAT-3 and p-STAT-3. **Results** Polyphyllin I inhibited Hep-2 cells proliferation under hypoxia condi-

网络出版时间: 2016-10-12 13:23:00 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161012.1323.014.html

## ILK 介导 Akt 信号通路诱导人晶状体上皮细胞转分化的研究

朱玉广 朱 艳 孙宝琪 陈 晨 李 珺 李 霞

**摘要** 目的 研究 ILK 抑制剂 QLT0267 对转分化人晶状体上皮细胞 (HLECs) E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)、磷酸化 Akt (p-Akt) 和磷酸化糖原合酶激酶-3 $\beta$  (p-GSK3 $\beta$ ) 的影响, 探讨 ILK 介导 Akt 信号通路在 HLECs 转分化的作用。方法 选择传 3 代 HLECs 进行实验, 实验分三组: TGF- $\beta$ 2 组加入含有浓度为 100 ng/L 的 TGF- $\beta$ 2 培养基, ILK 抑制剂组加入 10 nmol/L QLT0267 预处理 1 h 后, 再加入浓度为 100 ng/L TGF- $\beta$ 2 培养基培养 48 h, 对照组加入无血清培养基。Western blot 法检测 HLECs E-cadherin、 $\alpha$ -SMA、p-Akt 和 p-GSK3 $\beta$  的变化。采用免疫荧光技术检测 HLECs E-cadherin、 $\alpha$ -SMA、p-Akt、p-GSK3 $\beta$  的表达。结果 与对照组比较, TGF- $\beta$  组 E-cadherin 表达减弱,  $\alpha$ -SMA、p-Akt 和 p-GSK3 $\beta$  的表达增强, 差异有统计学意义。与 TGF- $\beta$  组比较, ILK 抑制剂组  $\alpha$ -SMA、p-Akt 和 p-GSK3 $\beta$  表达明显减弱, E-cadherin 的表达明显增强, 差异有统计学意义 ( $F = 12.325, 17.686, 8.547, 6.812, P < 0.001$ ), QLT0267 部分逆转 TGF- $\beta$  诱导的 HLECs  $\alpha$ -SMA、p-Akt、p-GSK3 $\beta$  和 E-cadherin 的表达。结论 ILK 介导 Akt 信号通路参与 TGF- $\beta$ 2 诱导的 HLECs 转分化过程, QLT0267 通过特异性结合 ILK, 影响下游信号的传导, 降低了 HLECs 的转分化。ILK 介导 Akt 信号通路可能在后囊膜混浊过程中发挥重要作用。

**关键词** ILK; Akt 信号通路; 晶状体上皮细胞; 转分化; 转化生长因子- $\beta$ 2

中图分类号 R 776.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)11-1617-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.014

2016-06-27 接收

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金计划 (编号: BS2009SW016); 山东省医药卫生科技发展计划项目 (编号: 2015WS0047)

作者单位: 潍坊医学院附属医院眼科中心, 潍坊 261031

作者简介: 朱玉广, 男, 副教授, 博士;

朱 艳, 女, 讲师, 责任作者, E-mail: azhu1975@sina.com

白内障是常见的致盲性眼病, 后囊膜混浊 (posterior capsular opacification, PCO) 是现代白内障术后影响视力提高的主要因素<sup>[1]</sup>。人晶状体上皮细胞 (human lens epithelial cells, HLECs) 的转分化是 PCO 的主要病理改变, 转化生长因子- $\beta$ 2 (transforming growth factor- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 2) 以诱导 HLECs 的转分化<sup>[1-2]</sup>。前期研究<sup>[3-4]</sup>显示整合素  $\beta$ 1 参与 TGF- $\beta$ 2 诱导 HLECs 转分化, 并且抑制整合素  $\beta$ 1 的表达可以抑制 HLECs 转分化。整合素激活后主要通过整合素连接激酶 (integrin-linked kinase, ILK) 发挥核心作用, ILK 参与体内多个信号传导通路, ILK 及其信号通路在 HLECs 转分化中的作用还未见报道。该研究利用 HLECs 转分化细胞模型, 探讨 Akt 信号通路在 HLECs 转分化中的作用。

### 1 材料与方法

**1.1 细胞株** 人晶状体上皮细胞 HLEC-h3 细胞株 (上海复蒙基因生物科技有限公司)。

**1.2 主要试剂** 兔抗人  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 单克隆抗体 (美国 Sigma 公司); 兔抗人磷酸化 Akt (p-Akt) 多克隆抗体、兔抗人磷酸化糖原合酶激酶-3 $\beta$  (p-GSK-3 $\beta$ ) 单克隆抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); 兔抗人 E-钙黏素 (E-cadherin) 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司); Recombinant Human TGF- $\beta$ 2 (美国 R&D Systems 公司); FITC-标记羊抗兔二抗 (美国 BETHYL 公司); DMEM 细胞培养液、胎牛血清 (美国 GIBCO 公司); ILK 抑制剂 QLT0267 (加拿大 QLT 公司)。

**1.3 HLECs 的复苏、培养与传代** 取液氮冻存的 HLEC-h3 细胞株, 放置于 37 °C 水浴箱快速解冻, 将细胞悬液移到离心管, 加入 DMEM 细胞培养液 (含

tion. Polyphyllin I treatment (1.5, 3, 6  $\mu$ g/ml) down-regulated the mRNA and protein expressions of HIF-1 $\alpha$ , VEGF in Hep-2 cells under hypoxia. Meanwhile, Polyphyllin I treatment inhibited the protein expressions of STAT-3 and p-STAT-3 in Hep-2 cells under hypoxia. **Conclusion** Polyphyllin I inhibits Hep-2 cells proliferation and down-regulates the expressions of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in Hep-2 cells under hypoxia. It may be related to reduced STAT-3 expression and inhibition of the phosphorylation of STAT-3 in Hep-2 cells under hypoxia.

**Key words** Polyphyllin I; Hep-2 cell; cell proliferation; HIF-1 $\alpha$ ; VEGF