论著

文章编号:1000-5404(2013)03-0248-03

αB-晶状体蛋白促进体外培养人RPE细胞的增殖

唐德荣,张学东,陈小丽,沈 强,李颖媛 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院眼科)

[摘要] **目的** 测定αB-晶状体蛋白在体外培养人视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelial cell, RPE)中的表达,探讨αB-晶状体蛋白对体外培养人RPE细胞增殖的影响。**方法** 传代培养人A-RPE19细胞系,免疫荧光技术检测αB-晶状体蛋白在RPE细胞中的表达。用不同稀释浓度(体积比分别为$1/10^2$、$1/10^3$、$1/10^4$、$1/10^5$、$1/10^6$)的αB-晶状体蛋白以及其抗体干预各组(对照组、蛋白组、抗体组)细胞,MTT方法检测不同时间点各组细胞光密度值,流式细胞术检测各组细胞不同时间点的周期及凋亡情况。**结果** αB-晶状体蛋白在体外培养人RPE细胞质中表达;在48 h,浓度为$1/10^4$~$1/10^2$时,3组细胞的光密度值差异有统计学意义($P<0.05$);蛋白组与对照组相比,0~48 h蛋白组的G_1期比例减小,S、G_2期比例增加,抗体组与对照组相比,G_1期比例增加,S、G_2期比例减少($P<0.05$,$P<0.01$);48 h时3组之间凋亡细胞的构成比差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** αB-晶状体蛋白在体外培养人RPE细胞质中表达,并对体外培养人RPE细胞增殖起明显促进作用。

[关键词] αB-晶状体蛋白;人视网膜色素上皮细胞;增殖
[中图法分类号] R322.91; R329.28; R341 [文献标志码] A

αB-crystallin promotes proliferation in human retinal pigment epithelial cells

Tang Derong, Zhang Xuedong, Chen Xiaoli, Shen Qiang, Li Yingyuan (Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression of αB-crystallin in human retinal pigment epithelial cells (RPEC), and to investigate the effect of αB-crystallin on RPEC proliferation *in vitro*. **Methods** A-RPE19 cells were subcultured and the expression of αB-crystallin was detected using immunofluorescence technique. αB-crystallin in different concentrations (V/V: $1/10^2$, $1/10^3$, $1/10^4$, $1/10^5$ and $1/10^6$) and its antibody were used for treating different groups of cells, and then OD values and cell cycle together with cell apoptosis at different time points were measured by MTT assay and flow cytometry, respectively. **Results** αB-crystallin was found to be expressed in the cytoplasm of human RPEC cultured *in vitro*. There were statistical significance ($P<0.05$) in cell OD values among the three groups at 48 h when the concentration was $1/10^4-1/10^2$. The proportion of cells at G_1 phase decreased while the proportion of those at S and G_2 phases increased in αB-crystallin group as compared with the control group (0-48 h). The proportion of cells at G_1 phase increased while the proportion of those at S and G_2 phases decreased in αB-crystallin antibody group as compared with the control group (0-48 h). The ratios of apoptotic cells among the three groups were significantly different at 48 h ($P<0.05$). **Conclusion** Our study verified the expression of αB-crystallin in the cytoplasm of human RPEC in vitro, and αB-crystallin plays a distinct role in promoting RPEC proliferation.

[**Key words**] αB-crystallin; human retinal pigment epithelial cells; proliferation

Supported by the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-1-029). Corresponding author: Zhang Xuedong, E-mail: zxued@sina.com

αB-晶状体蛋白属于小热休克蛋白(HSP20)家族成员,人体中αB-晶状体蛋白在晶状体中表达最高,在心脏、支气管上皮、骨骼肌以及神经系统中也有表达[1]。有研究表明,在组织、细胞经热休克、氧化应激等处理后,αB-晶状体蛋白具有分子伴侣活性,能抑制多种环境变化下的细胞凋亡,同时表达明显增加,与αB-晶状体蛋白基因敲除组相比,细胞存活率明显增高。在眼部,αB-晶状体蛋白不仅与白内障形成关系密切,而且通过抑制RPE细胞凋亡参与年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)发病,其分子伴侣活性与部分葡萄膜炎的发病有关[2-3]。增殖性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)是孔源性视网膜脱离手术失败的最主要原因,也是眼外伤、糖尿病及血管性、炎症性视网膜病变的一种

[基金项目] 重庆市卫生局资助项目(2011-1-029)
[通信作者] 张学东,E-mail:zxued@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121128.0912.009.html(2012-11-28)

结局,是眼科常见的致盲性疾病之一。近年来研究证实 PVR 的发生、发展与人视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelial cell, RPE)细胞增殖关系密切[4]。本研究对 αB-晶状体蛋白在体外培养人视网膜 RPE 细胞中的表达以及其对体外培养人视网膜 RPE 细胞增殖的影响进行研究。

1 材料与方法

1.1 主要材料

A-RPE19 细胞株(美国 ATCC 细胞库),αB-晶状体蛋白(以色列 ProSpec 公司),兔抗人 αB-晶状体蛋白单克隆抗体[台湾 EPITMICS(宜佰康)公司],山羊抗兔 FITC 荧光二抗(北京博奥森生物技术有限公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),多功能酶标仪(美国 MD 公司),共聚焦荧光显微镜(德国 Leica 公司),流式细胞分析仪[美国 BD(FACSVantage SE)]。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 参考文献[5]中的方法进行细胞培养,所用培养液为含有体积分数为 10% 的胎牛血清、100 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的低糖 DMEM 完全培养液。

1.2.2 细胞免疫荧光法检测 用免疫荧光技术检测 αB-晶状体蛋白在 A-RPE19 细胞中的表达。取第 3 ~ 6 代 A-RPE19 细胞,1×10^5/孔接种于放置有 0.8 mm × 0.8 mm 的 24 孔板板孔中,培养过夜做细胞爬片。4 g/L 多聚甲醛固定,体积分数 0.1% Triton 打孔。用体积分数 1% 的胎牛血清封闭后,实验组每孔附浓度为 1∶100 的兔抗人 αB-晶状体蛋白抗体 250 μL,对照组每孔中加入等量的 PBS,于 37 ℃孵箱中孵育 2 h;每孔中加入体积比为 1∶50 的山羊抗兔 FITC 荧光二抗,37 ℃避光条件下孵育 1 h,专用防荧光淬灭封片液封闭爬片,共聚焦显微镜下观察并照相。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖 取第 3 ~ 6 代 A-RPE19 细胞 1×10^4/孔接种于 96 孔板中,设蛋白组、抗体组,每组各设 5 个浓度梯度(体积比分别为 $1/10^2$、$1/10^3$、$1/10^4$、$1/10^5$、$1/10^6$),以不加药物的细胞孔作为对照,以不加细胞作为调零组,均设 5 个复孔。恒温孵箱中培养过夜贴壁,分别用不同稀释倍数的 αB-晶状体蛋白及 αB-晶状体蛋白抗体处理相应孔板中细胞,对照组加相应量培养液,分别在 24、48、72 h 时,向各孔中加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μL,继续培养 4 h 后,轻轻吸出孔中液体,每孔中加入 DMSO 溶解液 150 μL,至紫色结晶全部溶解,在波长 490 nm 处测定光密度值[D(490)]。

1.2.4 流式细胞法检测细胞周期及凋亡 取第 3 ~ 6 代 A-RPE19 细胞 5×10^4/孔接种于 6 孔板中,蛋白组、抗体组及对照组各设 2 个复孔,分别用稀释倍数为 1∶10 000(体积比)的 αB-晶状体蛋白及其抗体处理相应孔内细胞,对照组加等量细胞培养液,在恒温孵箱中培养,细胞过夜贴壁后,分别于 0、24、48、72 h 时经过相应处理后(根据凋亡和周期检测需要)送检。

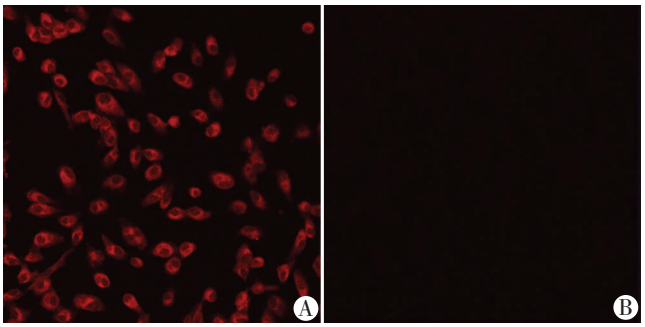
1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件,MTT 实验及细胞周期检测结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,不同浓度的各组光密度值及凋亡比例行单因素方差分析及 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 免疫荧光法检测定位 αB-晶状体蛋白

免疫荧光组织化学染色检测 A-RPE19 细胞中 αB-晶状体蛋白的表达主要在细胞质中(图 1)。



A:实验组;B:对照组

图 1 αB 晶状体蛋白在 RPE 细胞中的荧光表达 (免疫荧光 ×40)

2.2 MTT 检测细胞增殖

在 48 h 蛋白和抗体浓度为 $1/10^4$ ~ $1/10^2$ 时,3 组光密度值两两比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 不同稀释浓度 αB-晶状体蛋白及其抗体处理后细胞的光密度值结果($\bar{x}\pm s$)

组别		D(490)
对照组		0.44 ± 0.02
蛋白组	$1/10^2$	0.57 ± 0.05[a]
	$1/10^3$	0.55 ± 0.05[a]
	$1/10^4$	0.46 ± 0.02
	$1/10^5$	0.42 ± 0.02
	$1/10^6$	0.42 ± 0.03
抗体组	$1/10^2$	0.35 ± 0.02[ab]
	$1/10^3$	0.39 ± 0.03[ab]
	$1/10^4$	0.38 ± 0.02[b]
	$1/10^5$	0.42 ± 0.01
	$1/10^6$	0.41 ± 0.06

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与蛋白组比较

2.3 流式细胞术检测细胞周期

48 h 内 3 组均经历了完整的细胞周期,蛋白组与对照组相比,0 ~ 48 h G_1 期比例减小,S、G_2 期比例增加($P<0.05$, $P<0.01$),抗体组与对照组相比,G_1 期比例增加,S、G_2 期比例减少($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 2。

表 2 3 组不同时间 RPE 细胞各周期所占比例(%,$\bar{x}\pm s$)

时间	对照组			蛋白组			抗体组		
	G_1	G_2	S	G_1	G_2	S	G_1	G_2	S
0 h	88.15 ± 2.26	8.19 ± 0.24	4.33 ± 0.34	83.85 ± 4.94[b]	8.53 ± 0.32	7.62 ± 7.02[b]	88.36 ± 0.67	8.28 ± 1.34	4.09 ± 0.20
24 h	77.58 ± 0.76	8.08 ± 0.04	14.34 ± 0.83	73.65 ± 3.38[b]	9.15 ± 1.19[b]	17.20 ± 1.65	82.65 ± 3.0[bd]	10.17 ± 0.11	7.18 ± 3.72[b]
48 h	72.07 ± 1.55	14.33 ± 0.02	13.60 ± 1.59	56.30 ± 0.84[b]	38.93 ± 0.81[b]	4.77 ± 0.64[a]	84.73 ± 0.10[bd]	11.94 ± 0.84[bd]	2.84 ± 0.75
72 h	91.64 ± 0.44	5.25 ± 0.06	3.11 ± 0.21	86.37 ± 0.78[a]	7.95 ± 0.59[b]	5.68 ± 0.19[b]	90.44 ± 0.27[ac]	7.75 ± 0.44[bd]	1.89 ± 0.03

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与蛋白组比较

2.4 流式细胞术检测细胞不同时段凋亡

3组24 h凋亡结果无统计学差异($P>0.05$),48 h时3组细胞凋亡比例两两比较均有统计学差异[对照组(1.98±0.16)%,蛋白组(1.83±0.08)%,抗体组(4.22±0.83)%,$P<0.05$]。

3 讨论

αB-晶状体蛋白是脊柱动物眼晶状体中主要的蛋白成分之一,是α晶状体蛋白两条基因之一的αB基因的编码产物。在人眼中,除晶状体外,在视网膜色素细胞、睫状体、虹膜、角膜、视经神也有αB-晶状体蛋白存在[6]。研究表明:αB-晶状体蛋白在细胞增殖及血管形成等病理生理过程中发挥重要作用,它能通过保护某些核结构,稳定细胞骨架,增强细胞抗氧化能力等方面实现对肿瘤细胞的增殖、分化、迁移,从而在抗肿瘤细胞凋亡、肿瘤新生血管生成方面起作用[7-9]。近年来,αB-晶状体蛋白HSP活性、抗细胞凋亡作用方面日益受到人们的重视,Alge等[2]的研究表明,热休克处理及氧化应激能显著提高RPE细胞中αB-晶状体蛋白的表达,而高表达的αB-晶状体蛋白能通过抑制Caspase-3途径的激活减轻视网膜色素上皮细胞的凋亡,从而发挥保护作用。Kannan等[10]的研究显示:αB-晶状体蛋白能通过与血管内皮生长因子(VEGF)的相互作用促进视网膜和脉络膜的血管再生,并可能具有保护临近细胞的功能。

RPE细胞是眼内胚胎学上从神经视网膜上分化出成的具有分泌功能的上皮细胞,在创伤、炎症及缺氧等条件下参与PVR发生及糖尿病视网膜新生血管的形成[11]。实验和临床研究证明,PVR属于眼内发生的过度修复反应,其主要病理过程是在包括VEGF、血小板衍生生长因子(PDGF)等多种因子参与下[12],受到损伤刺激后的RPE细胞向视网膜下及玻璃体腔游走、增殖而发展成膜,最终导致PVR发生。因此研究RPE细胞的增殖机制则成为研究上述疾病发病机制的关键所在。以往研究证明细胞增殖的调控主要在于细胞周期和凋亡的调控上,故研究如何通过调控RPE细胞周期和凋亡来抑制细胞增殖将是研究上述疾病发病机制的一种新思路。围绕这一思路,我们应用免疫荧光实验证实了αB-晶状体蛋白在RPE细胞的细胞质中表达;分别使用不同浓度的αB-晶状体蛋白及αB-晶状体蛋白抗体对体外培养的人RPE细胞进行干预,MTT检测结果发现:48 h时,在浓度为$1/10^4$至$1/10^2$(体积比)时,αB-晶状体蛋白和αB-晶状体蛋白抗体对体外培养人RPE细胞的增殖分别有促进和抑制作用,在浓度低于$1/10^5$时,其促进和抑制作用不明显,72 h时检测结果与48 h基本一致;流式细胞周期检测发现:48 h内3组均经历了完整的细胞周期,αB-晶状体蛋白可以促进细胞G_1期进入S期,αB-晶状体蛋白抗体抑制细胞G_1期进入S期;流式细胞凋亡检测结果显示:48 h时3组细胞凋亡比例差异有统计学意义($P<0.05$);以上实验表明:αB-晶状体蛋白在体外培养的人RPE细胞质中存在,对RPE细胞的增殖有明显的促进作用,且具有时间和浓度依赖性,在其作用浓度时,αB-晶状体蛋白促进RPE细胞从G_1期进入S期,当间接抑制αB-晶状体蛋白对细胞作用时,RPE细胞从G_1期进入S期受到抑制,从而细胞增殖被抑制。本实验通过外源性αB-晶状体蛋和αB-晶状体蛋白抗体对体外培养RPE细胞的刺激,对以往研究进行了验证和补充,与文献[13]报道一致。细胞离体后独立生存在人工的培养环境中,与体内环境仍有很大差异,因而利用培养细胞做实验时,不应视为体内细胞完全相同,对αB-晶状体蛋白与PVR形成方面的关系仍有待于更深入的研究。

参考文献:

[1] 汪腊一, 侯世科, 吴志鸿. αB晶状体蛋白在晶状体外的研究概况[J]. 东南大学学报: 医学版, 2010, 29(5): 592-595.

[2] Alge C S, Priglinger S G, Neubauer A S, *et al*. Retinal pigment epithelium is protected against apoptosis by alphaB-crystallin[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(11): 3575-3582.

[3] Verma A, Kumar P, Babb K, *et al*. Cross-reactivity of antibodies against leptospiral recurrent uveitis-associated proteins A and B (LruA and LruB) with eye proteins[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(8): e778.

[4] Nagineni C N, Kutty V, Detrick B, *et al*. Expression of PDGF and their receptors in human retinal pigment epithelial cells and fibroblasts: regulation by TGF-beta[J]. J Cell Physiol, 2005, 203(1): 35-43.

[5] 王雨生, 严密. 可见光对原代培养人视网膜色素上皮细胞的光化学损伤[J]. 中华眼底病杂志, 1996, 12(3): 174-176.

[6] 刘康, 王一. α晶状体蛋白的研究进展[J]. 眼科新进展, 2005, 25(2): 171-173.

[7] Bosman J D, Yehiely F, Evans J R, *et al*. Regulation of alphaB-crystallin gene expression by the transcription factor Ets1 in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 119(1): 63-70.

[8] Dimberg A, Rylova S, Dieterich L C, *et al*. alphaB-crystallin promotes tumor angiogenesis by increasing vascular survival during tube morphogenesis[J]. Blood, 2008, 111(4): 2015-2023.

[9] Kase S, He S, Sonoda S, *et al*. alphaB-crystallin regulation of angiogenesis by modulation of VEGF[J]. Blood, 2010, 115(16): 3398-3406.

[10] Kannan R, Sreekumar P G, Hinton D R. Novel roles for α-crystallins in retinal function and disease[J]. Prog Retin Eye Res, 2012, 31(6): 576-604..

[11] 张承芬. 视网膜色素上皮相关基础研究[M]//张承芬. 眼底病学. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1-9.

[12] Lei H, Rheaume M A, Kazlauskas A. Recent developments in our understanding of how platelet-derived growth factor (PDGF) and its receptors contribute to proliferative vitreoretinopathy[J]. Exp Eye Res, 2010, 90(3): 376-381.

[13] Liu B, Bhat M, Nagaraj R H. AlphaB-crystallin inhibits glucose-induced apoptosis in vascular endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 321(1): 254-258.

(**收稿**:2012-07-24;**修回**:2012-09-18)

(编辑 张 维)