基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0051-03

肿瘤坏死因子上调人视网膜色素上皮细胞 c-jun 的表达

王静波[1],惠延年[2],关 娟[1],杨 丽[3]
(1. 解放军第 309 医院眼科,北京 100091;2. 第四军医大学西京医院眼科,西安 710032;
3. 山东省济南师范学校,济南 250031)

【摘 要】目的:检测肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor,TNF)-α 对培养人视网膜色素上皮(Retinal pigment epithelium,RPE)细胞 c-jun 表达的影响。方法:40 ng/ml TNF-α 作用于体外培养人 RPE 细胞不同时间(0、10、20、40、60 min),采用免疫荧光染色法和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)观察 c-jun 蛋白和 mRNA 的表达变化。结果:在未受刺激的 RPE 细胞中,c-jun 表达微弱或不表达,细胞浆和部分细胞核为浅黄绿色荧光。40 ng/ml TNF-α 刺激后,RPE 细胞的荧光强度逐渐增强并出现核移位。随着 TNF-α 的作用,c-jun mRNA 的表达开始逐渐增强,于 40 min 时达峰值,随后表达略有减低。结论:TNF-α 可在短期内迅速上调体外培养人 RPE 细胞 c-jun 蛋白和 mRNA 的表达,且蛋白表达出现核移位现象,提示 TNF-α 可引起 RPE 细胞 c-jun 的活化。

【关键词】视网膜色素上皮;肿瘤坏死因子;c-jun
【中国图书分类法分类号】R773 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-25

Up-regulation of tumor necrosis factor-α on c-jun in cultured human retinal pigment epithelial cells

WANG Jing-bo, et al
(*Department of Ophthalmology, the 309th Hospital of Chinese People's Liberation Army*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of tumor necrosis factor (TNF)-α on the expression of c-jun in the cultured human retinal pigment epithelial (RPE) cells. *Methods*: RPE cells were exposed to 40 ng/ml TNF-α for 0,10,20,40 and 40 minutes, respectively. Immunofluorescence staining and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the levels of c-jun protein and mRNA in RPE cells. *Results*: Untreated RPE cells revealed faint or none green fluorescence of c-jun in the cytoplasm and some nuclei. With exposure to TNF-α, c-jun increased obviously with stronger green fluorescence. With treatment of TNF-α, c-jun mRNA increased gradually and enhanced to the peak at 40 min. *Conclusion*: TNF-α can up-regulate c-jun protein and mRNA in cultured human RPE cells and induce its nuclear transposition, which suggests the activation of c-jun.

【Key words】Retinal pigment epithelium; Tumor necrosis factor; c-jun

视网膜色素上皮(Retinal pigment epithelium,RPE)细胞是参与多种眼病的重要细胞,如葡萄膜炎、增生性玻璃体视网膜病变(Proliferative vitreoretinopathy,PVR)等[1,2]。在这些眼病中,RPE 细胞所在的微环境发生很大的改变,其中,肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor,TNF)-α 在 RPE 细胞的系列变化中有着重要的作用[3]。在细胞的生物学性状变化中,早期基因的改变起着重要的作用。c-jun 是一重要的核转录因子,属于即刻早期反应基因家族[3],是与多数细胞增殖有关的原癌基因。本实验中,我们欲研究 TNF-α 在短时间内对体外培养的人 RPE 细胞 c-jun 表达的影响,从而明确 c-jun 对于 RPE 细胞的意义。

作者介绍:王静波(1978-),女,博士,
研究方向:眼内细胞的增生与调控。

1 材料和方法

1.1 材料

Dulbecco 改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified eagle media,DMEM)购自美国 Hyclone 公司,新生小牛血清购自杭州四季清公司,Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,反转录试剂盒购自美国 Promega 公司,Taq 酶购自美国 MBI 公司,兔抗人 c-jun 多克隆抗体购自武汉博士德公司,异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate,FITC)标记羊抗兔 IgG 购自北京中杉公司,TNF-α 购自北京鼎国公司,其他试剂均为国产或进口分析纯。c-jun 引物由上海生工合成。第 4~8 代 RPE 细胞用于实验。

1.2 方法

c-jun 引物，上游 5'ATGACTGCAAAGATGGAAACGAC C3'，下游 5'GATGTGCCCGTTGCTGGACTGGAT3'[264 碱基对(bp)]；甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶(GAPDH)引物，上游 5'GA AGTGAAGGTCGGAGTCA3'，下游 5' TTCACACCCATGACG AACAT 3'(402 bp)。

取意外死亡正常成人供体的眼球，于 12 h 内用于 RPE 细胞培养。具体方法：将眼球用含庆大霉素的 D-hanks 液冲洗 2 次，于锯齿缘后 360°剪开眼球，去除玻璃体和视网膜组织，剩余的眼杯用 D-hanks 液洗 2 次，加入 0.25%胰蛋白酶，37℃消化 1 h，共消化 2 次。消化结束后，用弯头吸管轻轻吹打使细胞脱落，将含有 RPE 细胞的消化液移入加有 20%新生小牛血清的 DMEM 的离心管中，离心。弃上清，加入培养液，接种于培养瓶，37℃ 5% CO_2 孵箱培养。3～5 d 换液，待细胞融合后，按 1:3 传代。3～8 代细胞用于实验。

RPE 细胞消化后，接种于培养板中，置于 5% CO_2 孵箱中培养，当细胞融合 >75%时，加入 40 ng/ml TNF-α 刺激 0、10、20、40 和 60 min。细胞刺激结束后，弃去培养液，换以 37℃预热的磷酸盐缓冲液(PBS)并轻柔晃动培养板 2 次，然后收集细胞，以备行 RNA 提取。同时设对照组，即为 RPE 细胞更换 37℃预热的含 10%新生牛血清的新鲜 DMEM 分别达 0、10、20、40 和 60 min。

RPE 细胞在刺激结束后，以台盼蓝染色计数法检测各处理组的活细胞数目。具体步骤如下：收集各孔细胞，制备成单细胞悬液，并与等体积的 0.3%的台盼蓝溶液混合，光学显微镜下计数并计算细胞存活率。

细胞爬片用 95%乙醇固定 20 min，PBS 漂洗；3%过氧化氢灭活 15 min，PBS 漂洗；羊血清室温封闭 20 min；0.5% 曲拉通 X-100 室温 10 min；兔抗人 c-jun 多克隆抗体(1:100)湿盒 4℃过夜，PBS 漂洗；FITC 标记羊抗兔 IgG(1:100)湿盒 37℃孵育 60 min，PBS 漂洗；甘油缓冲液封片，激光共聚焦显微镜观察并照相。同时设 PBS 替代第一抗体的空白对照。

收集的细胞用 Trizol 提取总 RNA，反转录合成 cDNA 第 1 链，产物进行 PCR。退火温度分别为 c-jun，53℃，30 s；GAPDH，55℃，1 min。GAPDH 反应为 30 个循环，c-jun 为 35 个循环。PCR 产物以 1%琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察照相。采用 Kodak Digital Science 1D 分析软件分别读取各片段灰度值，以 c-jun 的灰度值与 GAPDH 灰度值的比值代表 c-jun mRNA 的水平。

1.3 统计学处理

实验数据记录为($\bar{x} \pm s$)，刺激因素作用后不同时间点间的比较采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。绘图采用 Origin 7.0 软件。

2 结　果

2.1 RPE 细胞的生长特点

刚分离的 RPE 细胞呈圆形，大小均一，充满黑色素粒，看不到细胞核。2～4 d 后，大部分细胞贴壁变扁平，呈多边形；细胞伸出伪足，呈集落样生长；多数细胞显露清晰透明的细胞核，并见双核或多核细胞(图 1)。14～28 d 细胞铺满，呈致密排列的六边形或多边形。在 4 代以后细胞少有色素。

2.2 细胞活力检测结果

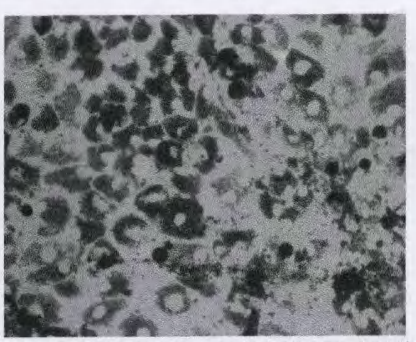
台盼蓝染色实验测得，RPE 细胞暴露于 40 ng/ml TNF-α 后，细胞的存活率在 96%以上。

2.3 免疫荧光染色结果

在未刺激的 RPE 细胞，c-jun 表达微弱或不表达，细胞浆和部分细胞核为浅黄绿色荧光(图 2)。随着 TNF-α 的刺激，c-jun 的表达逐渐增强，荧光强度增高，呈绿色或深绿色。TNF-α 刺激达 40 min 时，与未受刺激的 RPE 细胞比较，c-jun 的表达明显增强，并出现核移位，细胞核呈强绿色荧光(图 3)。对照组各时间点 RPE 细胞 c-jun 的表达无明显改变。

2.4 TNF-α 上调 c-jun mRNA 的表达

与未受刺激的 0 点 RPE 细胞相比，40 ng/ml TNF-α 作用 10 min 时，RPE 细胞 c-jun mRNA 的表达即有增强，且表达呈上升趋势，于 40 min 时达峰值，随后表达略有减低(图 4)。与未刺激的 0 点 c-jun 的水平相比，TNF-α 作用 10、20 和 40 min 3 个时间点上 RPE 细胞 c-jun mRNA 的表达差异均有统计学意义($P<0.01$，表 1)。对照组内各时间点 c-jun mRNA 的表达变化无统计学意义($F=0.360$，$P=0.866$)。



细胞呈多边形，大小均一，呈集落样生长，细胞浆充满黑色素粒，多数细胞显露清晰透明的细胞核

图 1　原代培养的 RPE 细胞



c-jun 表达微弱，细胞浆和部分细胞核呈淡黄绿色荧光

图 2　未受刺激的人 RPE 细胞



c-jun 表达明显增强,细胞核呈强绿色荧光

图 3 40 ng/ml TNF-α 刺激 40 min 时 RPE 细胞

表 1 40 ng/ml TNF-α 作用不同时间 RPE 细胞 c-jun mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

	c-jun/GAPDH
0 min	0.84 ± 0.09
10 min	1.18 ± 0.11**
20 min	1.37 ± 0.08**
40 min	1.43 ± 0.14**
60 min	1.41 ± 0.11**

3 讨 论

在许多眼病中,RPE 细胞暴露于细胞因子(白介素、TNF-α 等)的刺激下,如 PVR、年龄相关性黄斑变性和葡萄膜炎等[2-6]。这些刺激对于 RPE 细胞的早期基因改变及其后的生物学性状的变化起着关键作用,但目前关于 RPE 细胞的早期基因改变尚未完全阐明。如能了解这些刺激因素对于 RPE 细胞的早期影响,则有助于进一步阐明这些眼病的机制并制定防治策略。

原癌基因是一类编码关键性调控蛋白的正常细胞基因,参与调节正常细胞的生长、发育、分化和增殖过程。一般情况下在正常细胞中表达水平很低,当其受到某些因素的作用而活化或过度表达时,细胞过度增殖,可导致一些增生性疾病甚至肿瘤。其中有些原癌基因受到细胞外刺激时能快速被诱导转录,其表达产物为核内转录因子,能进一步调控其他基因的转录和表达,常称之为"即刻早期基因",主要有 fos、jun、myc、myb、ets、ski 等。

c-jun 基因定位于人染色体 1q31-q32。c-jun 的表达产物 Jun 可以形成同源二聚体, 也可以与 c-fos 的表达产物形成异二聚体,它可增强启动子区含有结构的基因转录,与细胞的生长、分化、增殖关系密切[7]。在培养的细胞中,c-jun 高表达可使细胞周期从 G_1 期进入 S 期。

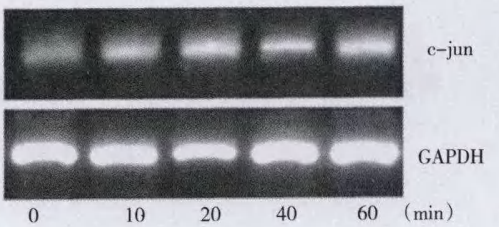


图 4 RT-PCR 检测 40 ng/ml TNF-α 作用于 RPE 细胞不同时间时 c-jun mRNA 表达的电泳图

我们的研究表明,TNF-α 可在短时间内快速增强 RPE 细胞 c-jun mRNA 和蛋白的表达,且出现核转位现象,提示 TNF-α 可快速活化 RPE 细胞中的 c-jun 基因,从而启动该基因的一系列作用。

参 考 文 献

[1] Lopez P F, Grossniklaus H E, Lambert H M, et al. Pathologic features of surgically excised subretinal neovascular membranes in age-related macular degeneration[J]. Am J Ophthalmol, 1991, 112(6): 647-656.

[2] 罗霁菡, 周希瑗. 增生性玻璃体视网膜病变治疗的研究进展[J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(s1): 55-57.

[3] Wakefield D, Lloyd A. The role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory eye disease[J]. Cytokine, 1992, 4(1): 1-5.

[4] 王静波, 惠延年, 韩泉洪, 等. 细胞因子对人视网膜色素上皮细胞 syndecan-1 表达的影响[J]. 中华眼底病杂志, 2006, 22(2): 113-116.

[5] 王静波, 张延军, 惠延年. 细胞因子对人视网膜色素上皮细胞早期生长反应基因 -1 的影响[J]. 中华眼底病杂志, 2007, 23(6): 410-413.

[6] Limb G A, Little B C, Meager A, et al. Cytokines in proliferative vitreoretinopathy[J]. Eye, 1991, 5 (Pt 6): 686-693.

[7] Cheng T H, Shih N I, Chen C H, et al. Role of mitogen-activated protein kinase pathway in reactive oxygen species-medicated endothelin-1-induced beta-myosin heavy chain gene expression and cardiomyocyte hypertrophy[J]. J Biomed Sci JT. 2005, 12(1): 123-133.

(责任编辑:冉明会)