

全反式视黄酸对兔视网膜色素上皮细胞的影响

王媛 张金嵩 王艳婷 李秀娟 朱子诚

The effect of retinoic acid on rabbit RPE cells in vitro

Wang Yuan, Zhang Jinsong, Wang Yanting, Li Xiujuan, Zhu Zicheng. Department of Ophthalmology, First Teaching Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract Objective Researches showed that all-trans retinoic acid (ATRA) has an inhibitory effect on the proliferation of retinal pigment epithelium (RPE) cells, and this event is similar to the pathogenesis of myopia. Other studies also demonstrated that hepatocyte growth factor (HGF) plays an action to generation of myopia. Present study was to evaluate the role of ATRA on the morphology, vitality, hypertrophy and function in the secretion of HGF and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in cultured rabbit RPE cells. **Methods** The RPE cells were isolated from black rabbits. The cells were digested in 0.25% trypsin + 0.02% EDTA and cultured in DMEM containing 10% fetal bovine serum and then identified with CK8 and Vimentin. The fifth generation of cells were collected and treated with 5, 10, 20 nmol/mL of ATRA respectively. After 24, 48 and 72 hours, the morphology of RPE cells was studied using immunohistochemistry, and cell vitality was analyzed using the trypan blue reject test. The expression of HGF and MMP-2 in the RPE cells was detected using immunohistochemistry. The secretion of HGF by RPE was evaluated using ELISA. **Results** The flattening and splitting of cells were found from 24 through 72 hours after various concentrations of ATRA treatment. The cell vitality was gradually decreased following the increase of the time and concentration of ATRA treatment ($P < 0.01$). The expression intensity of HGF and MMP-2 in the cells was gradually enhanced with the increase of time and concentration of ATRA, and secretion of HGF by RPE cells followed the same pattern ($P < 0.05$). **Conclusion** ATRA at the concentration of ≥ 5 nmol/mL can induce the morphological change of cultured RPE cells. The expression of HGF and MMP-2 is upregulated in RPE cells stimulated by ATRA.

Key words myopia; all-trans retinoic acid; retinal pigment epithelial cell; hepatocyte growth factor; matrix metalloproteinase-2

摘要 目的 观察全反式视黄酸 (ATRA) 对培养的兔视网膜色素上皮 (RPE) 细胞的作用, 研究肝细胞生长因子 (HGF)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 在此作用下的变化情况及其关系。 **方法** 取原代兔 RPE 细胞, 传代培养至第 5 代, 加入 ATRA 后观察 RPE 细胞的形态, 用台盼蓝排斥实验测定细胞活力, 用免疫组织化学法检测 RPE 细胞 HGF、MMP-2 的表达, 并用 ELISA 法测定 RPE 细胞培养液中 HGF 的浓度。 **结果** 不同浓度、不同作用时间的 ATRA 对 RPE 细胞的形态、活力影响不同。随 ATRA 浓度增加、作用时间延长 RPE 细胞存活率下降, HGF、MMP-2 表达增加, HGF 分泌量随 ATRA 的浓度增高而增加 ($P < 0.05$)。 **结论** ATRA 的浓度 ≥ 5 nmol/mL 时可引起 RPE 细胞的生长抑制, 存活率降低, 类似于近视眼 RPE 细胞改变。ATRA 作用下 RPE 细胞中 HGF、MMP-2 表达增加, 且 HGF 的增加更明显。

关键词 近视; 全反式视黄酸; 视网膜色素上皮细胞; 肝细胞生长因子; 基质金属蛋白酶-2

分类号 R 774.01 R 778.1⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)05-0397-04

目前, 实验动物近视研究中发现诱导近视发生的物质主要来自视网膜神经上皮。视网膜神经上皮产生的一级信使首先作用于视网膜色素上皮 (retinal pigment

epithelium, RPE) 细胞和葡萄膜细胞, 使之产生下一级的生化物质 (称为二级信使), 再作用于巩膜, 进而引起巩膜的重塑以及眼轴的延长^[1]。一些自分泌或旁分泌环路涉及细胞因子、生长因子及其酪氨酸激酶受体可能对 RPE 细胞的病理学改变至关重要。研究表明全反式视黄酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 对 RPE 细胞的增生有抑制作用, 类似近视病理学改变^[2-3]。

作者单位: 450052 郑州大学第一附属医院眼科 [王艳婷 (现在河南省眼科研究所, 郑州 450003); 朱子诚 (现在安徽医科大学附属医院省立医院眼科, 合肥 230001)]

通讯作者: 张金嵩 (Email: ophzjs@yahoo.com.cn)

在鼠眼球生长基因研究中,发现制造 HGF 的基因可能与眼球生长密切相关,因此 HGF 也可能影响近视的发生^[4-5]。本实验从细胞的微观角度来定性定量观察 ATRA 在体外诱导 RPE 细胞近视改变中的作用,以及肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、基质金属蛋白酶-2 在此作用下(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)在此作用下的变化情况及其关系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1 周龄健康黑色家兔 12 只(郑州大学动物实验中心)。胎牛血清(FBS)(杭州四季青公司);高糖 DMEM 培养液、0.25% 胰蛋白酶/0.02% 乙二胺四乙酸(Typsin/EDTA)(美国 Gibco 公司);台盼蓝粉剂、ATRA(美国 Sigma 公司);鼠抗人多克隆细胞角蛋白(Cytokeratin8, CK8)抗体、波形蛋白(Vimentin)、肝细胞生长因子抗体、MMP-2 抗体(北京中杉公司);免疫组织化学 SABC 试剂盒(武汉博士德公司);羊抗兔 HGF-ELISA 试剂盒(美国 ADL 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 兔 RPE 细胞的原代及传代培养 将实验兔麻醉后,在无菌条件下摘除双眼眼球,距角膜缘后 2 mm 环形剪开并去除眼前段组织及玻璃体,将眼后段制成眼杯并固定,用 PBS 冲洗眼杯 2 次,加 0.25% Typsin + 0.02% EDTA 约 2 mL 消化 3 min,吸出消化下来的神经上皮层,再加入 Typsin 约 2 mL 于 37℃、5% CO₂ 消化 15~20 min,加入含 FBS 的 DMEM 终止消化,吸管轻轻吹打使 RPE 细胞脱落,收集细胞悬液于离心管中,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,加 PBS 漂洗 1 次,加含 20% FBS 的 DMEM 培养液接种于 100 mL 培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中。48 h 后观察,72 h 后换液。待原代细胞生长至接近融合,弃去培养液,用 PBS 洗 3 次,加 0.25% Typsin/0.02% EDTA 约 1 mL 消化,于显微镜下观察,待细胞变圆,加入含 FBS 的 DMEM 终止消化,轻轻吹打瓶壁,使其完全脱落成细胞悬液,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,加 PBS 漂洗 1 次,加含 20% FBS 的 DMEM 培养液培养。以此法传代至第 3~5 代可用于实验。

1.2.2 兔 RPE 细胞的鉴定 用第 3 代 RPE 细胞,CK8 免疫细胞化学染色后,细胞浆可见棕黄色的阳性反应;Vimentin 免疫细胞化学染色后,细胞浆为阴性反应(图 1,2)。

1.2.3 台盼蓝排斥实验测定不同浓度、不同时间 ATRA 作用后的 RPE 细胞存活率 RPE 细胞传至第 5

代,加入 5、10、20 nmol/mL 的 ATRA 培养,分别在 24、48、72 h 后用胰蛋白酶消化为细胞悬液。取细胞悬液 9 滴加入 0.4% 台盼蓝生理盐水溶液 1 滴,混匀后滴在有盖玻片的血细胞计数板上。计算细胞计数板中 4 个大方格的细胞数,不着色的细胞为活细胞,着淡蓝色的细胞为死细胞。细胞存活率(%)=(不着色的细胞数/细胞总数)×100%。

1.2.4 免疫组织化学法测定 RPE 细胞内 HGF、MMP-2 的表达 第 5 代 RPE 细胞以 1×10⁵/孔培养于底部置有盖玻片的 24 孔板中,用含 20% FBS 的 DMEM 培养 24 h 后转为无 FBS 的 DMEM 培养,再培养 24 h 后转为含 5、10、20 nmol/mL ATRA 的 DMEM 培养液培养。阴性对照组加入与实验组等量的无水乙醇,空白对照组加入 DMEM。分别在加 ATRA 后 24、48、72 h 弃去上清液,PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 20~30 min,PBS 再洗 3 次。3% H₂O₂ 于室温下浸泡 30 min。蒸馏水洗 3 次,滴加 5% BSA 封闭液,置于室温中 20 min。弃去残液,不洗。滴加 1:50 的兔 IgG,置于 37℃ 中 2 h。PBS 洗 2 min×3 次。滴加生物素化山羊抗兔 IgG,20~37℃ 孵育 20 min。PBS 洗 2 min×3 次。滴加 SABC 试剂,20~37℃ 下作用 20 min。PBS 洗 5 min×4 次。取 1 mL 蒸馏水,加 DAB 显色试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴,混合后加至切片,室温下显色,镜下控制反应时间。苏木素轻度复染。50% 甘油脱水并封片。用倒置相差显微镜观察。

1.2.5 ELISA 测定 RPE 细胞的 HGF 分泌量 收集 3 个浓度、3 个时间点的细胞培养上清液于无菌 EP 管中,标本储存于 -80℃ 冰箱中备用。室温下取出酶标板,依次加入 50 μL 的标准品和样品于空白微孔中,设 3 个复孔;在样品中加入 10 μL 生物素标记液;在标准品孔和样品孔中各加入 100 μL 酶标记溶液,轻轻混匀 15 s;37℃ 孵育 60 min;倒掉孵育用的混合液;用蒸馏水洗板 5 次,每次静置 10~20 s;吸水纸吸干残存的水滴;每孔加入底物 A 液、B 液各 50 μL,轻摇 5 s;37℃ 下避光孵育 15 min;每孔加入 50 μL 终止液,终止反应;立即在酶标仪上 450 nm 处读取各孔的 OD 值并绘制标准曲线。

1.3 统 计 学 方 法

采用 SPSS 10.0 统计学软件进行统计学分析,测试指标数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同浓度 ARTA 组在各时间点的 RPE 细胞存活率比较采用 χ^2 检验。不同时间点和不同 ARTA 浓度组的 RPE 细胞分泌 HGF 量的比较采用两因素方差分析,各时间点间和各浓度组间的多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察结果

5、10、20 nmol/mL 的 ATRA 均能抑制 RPE 细胞的增生,细胞增大扁平,突起减少,色素弥散。ATRA 作用 24、48、72 h 后细胞均有增大扁平、突起减少、部分裂解、活力减弱的表现。

2.2 细胞存活率

5、10、20 nmol/mL 的 ATRA 作用 24 h 后细胞存活率分别为 99.50%、91.67% 和 87.44% ($\chi^2 = 10.80$, $P = 0.002$); 48 h 后细胞存活率分别为 99.02%、88.17% 和 80.44% ($\chi^2 = 18.59$, $P < 0.01$); 72 h 后细胞存活率分别为 98.44%、86.94% 和 71.08% ($\chi^2 = 29.46$, $P < 0.01$)。

2.3 免疫组织化学方法检测 HGF 和 MMP-2 的表达

RPE 细胞中 HGF、MMP-2 的阳性表达随 ATRA 浓度的增高而增加,随其作用时间的延长亦增加。在相同浓度和相同作用时间下 HGF 的阳性表达较 MMP-2 的阳性表达更明显(图 3,4)。

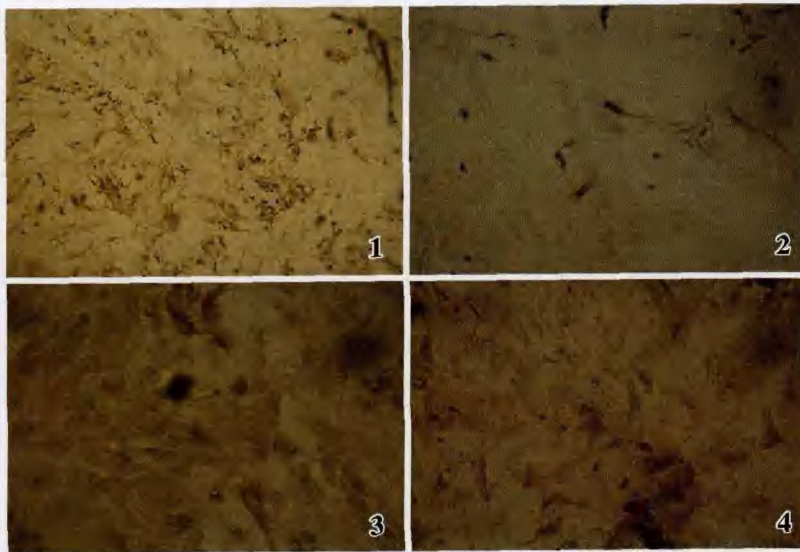


图 1 CK8 免疫细胞化学染色后,细胞浆可见棕黄色的阳性反应($\times 200$) 图 2 Vimentin 免疫细胞化学染色后,细胞浆为阴性反应($\times 400$) 图 3 培养 48 h 后 RPE 细胞中 HGF 呈阳性表达($\times 400$) 图 4 培养 48 h 后 RPE 细胞中 MMP-2 呈阳性表达($\times 400$)

Fig. 1 Cultured RPE cells show the positive reaction for CK8 in cytoplasm($\times 200$)

Fig. 2 Cultured RPE cells present the absent reaction for Vimentin($\times 400$)

Fig. 3 HGF shows the brown staining in cultured RPE cells after 48 hours($\times 400$)

Fig. 4 MMP-2 shows the brown staining in RPE cell after 48 hours($\times 400$)

2.4 ELISA 检测 HGF 的分泌量

RPE 细胞分泌 HGF 的量随 ATRA 浓度的增高而增加,任意两组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。ARTA 作用时间的长短对 RPE 细胞分泌 HGF 的量影

响不大,任意两组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 不同浓度、不同作用时间 ATRA 对 RPE 细胞分泌 HGF 量的影响($\bar{x} \pm s$, nmol/mL)

Table 1 Secretion of HGF in different concentrations of ATRA groups in different time ($\bar{x} \pm s$, nmol/mL)

ARTA (nmol/mL)	Secretion of HGF in different time after ATRA treatment		
	24 h	48 h	72 h
0	2.60 \pm 0.09	2.60 \pm 0.19	2.60 \pm 0.18
5	2.77 \pm 0.16 ^b	2.89 \pm 0.06 ^b	2.95 \pm 0.23 ^b
10	3.17 \pm 0.08 ^b	3.21 \pm 0.47 ^b	3.27 \pm 0.40 ^b
20	3.27 \pm 0.39 ^b	3.30 \pm 0.17 ^b	3.47 \pm 0.17 ^b

$F_{\text{group}} = 36.946$, $P = 0.001$; $F_{\text{time}} = 0.344$, $P = 0.625$; ^b $P < 0.05$ vs respective control group (Two-way ANOVA, LSD-*t* test)

3 讨论

实验性近视眼球生长的始发因素及其后的控制因素均位于视网膜的特定部位。视网膜自身能够识别外界物体成像在其平面上^[6],继而释放信使分子控制其下方组织的生长速率^[7]。促进近视发生的二级信使是抑制巩膜成纤维细胞生长与细胞外基质的合成,或是能降解细胞外基质,引起巩膜薄弱和近视眼的发生^[8]。已发现的二级信使有各种生长因子(TGF- β 、HGF、bFGF、INF、PDGF、EGF、MMP_s等)、多巴胺、乙酰胆碱和 ATRA 等。在已知的近视信使中 bFGF 与 TGF- β 近年来研究较多,而能影响眼球生长的 HGF 则较少。本实验发现,在 ATRA 诱导 RPE 细胞近视性病理改变的基础上,HGF 和 MMP-2 的表达均增加,且 HGF 的增加更明显,以此推测 HGF 可能影响 MMP-2 的变化。

在视网膜细胞内合成的 ATRA 又称维 A 酸,是维生素 A 最具活性的代谢产物。ATRA 不仅与视网膜的视觉生理有关,能调节视网膜的光反应,同时也可直接与核受体结合来参与不同目标基因的转录,诱导一些生长因子及其受体的表达,进而诱导特异环境下的细胞分化过程^[9]。视觉环境的改变引起视网膜上的信使物质如多巴胺、乙酰胆碱和视黄酸 (retinoic acid, RA) 等的改变,这些信使物质的改变作为信号调节脉络膜 RA 的分泌^[10],脉络膜 RA 再进一步作用于巩膜,控制巩膜的生长。吕勇等的研究证实^[11],形觉剥夺产生视网膜 RAR β 的变化早于屈光度和眼轴的变化。在近视眼球生长加速时视网膜 RA 含量增加,眼球生长受

抑制视网膜 RA 含量降低。本实验也证实 ATRA 的浓度 ≥ 5 nmol/mL 时可引起 RPE 细胞的生长抑制,存活率降低,类似于近视眼 RPE 细胞的改变。

HGF 是一种有多种生物活性的细胞因子,能促进细胞的分裂、迁移和分化,对于眼组织的生理平衡,损伤修复和相关疾病有重要关系,如能够促进角膜上皮细胞和内皮细胞、晶状体上皮细胞的增生,泪腺的 HGF 能够促进角膜上皮细胞的分裂和分化^[12]。HGF 正常情况下由间充质细胞产生,而其受体 Met 在上皮细胞中表达, HGF 参与了上皮-间充质转化的过程^[13],而这种转化过程对近视的发生发展起重要作用。RPE 细胞位于感觉视网膜层和血管脉络膜层之间,是上皮-间充质间的联系,可分泌多种细胞因子,对视网膜的自稳和视功能有重要作用;眼内多种疾病的发生发展过程均与 RPE 细胞相关。目前研究认为 RPE 细胞可同时表达 HGF 并分泌其受体 c-Met^[14],本研究也证实在体外培养的兔 RPE 细胞中 HGF 在蛋白水平有表达,说明 HGF 可以通过旁分泌和(或)自分泌方式来调控 RPE 细胞的功能。

在 RPE-脉络膜中 MMPs 和 TIMPs 广泛存在,它们在玻璃体视网膜病变的视网膜细胞外基质破坏、新生血管生成和纤维化等中发挥重要作用^[15]。形觉剥夺性近视中引起后极部巩膜 MMP-2/TIMP-2 的表达失衡^[16],促使巩膜细胞外基质重新塑形,进而引起眼轴的过度延长,形成轴性近视^[17]。本研究证实兔 RPE 细胞中 MMP-2 表达与 HGF 表达呈正相关,与报道的 HGF 对 MMPs 和 TIMPs 起着调控作用相符,说明 MMP-2 在近视 RPE 细胞的研究中也有重要的地位。

综上所述,浓度 ≥ 5 nmol/mL 的 ATRA 对 RPE 细胞有抑制作用,可导致细胞增大扁平、突起减少、色素弥散、部分裂解、活力减弱,为近视发生主动代偿的 RPE 细胞改变提供模型。一定浓度的 ATRA 可诱导近视相关因子 HGF、MMP-2 在 RPE 细胞中的表达增加,且 HGF 的增加更明显,由此推断 HGF 增加可能促使 MMP-2 的增加,使后者进一步促进近视的发生发展。

参考文献

- 1 Rymer J, Wildsoet CF. The role of the retinal pigment epithelium in eye growth regulation and myopia[J]. *Vis Neurosci*, 2005, 22(3): 251-261
- 2 Kishi H, Mishima HK, Yamashita U. Growth regulation of retinal pigment epithelial cell in vitro[J]. *Curr Eye Res*, 1994, 13(9): 661-668
- 3 McFadden SA, Howlett MH, Mertz JR. Retinoic acid signals the direction of ocular elongation in the guinea pig eye[J]. *Vision Res*, 2004, 44(7): 643-653
- 4 Zhou G, Williams RW. Eye 1 and eye 2: Gene loci that modulate eye size, lens weight, and retinal area in the mouse[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(5): 817-825
- 5 Han W, Yap MK, Wang J, et al. Family-based association analysis of hepatocyte growth factor (HGF) gene polymorphisms in high myopia[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(6): 2291-2299
- 6 Schaeffel F, Diether S. The growing eye: an autofocus system that works on very poor images[J]. *Vision Res*, 1999, 39(9): 1585-1589
- 7 胡延宁, McCormick SA. 视网膜色素上皮-脉络膜在近视发病中的作用[J]. *眼视光学杂志*, 2000, 2(4): 197-200
- 8 Troilo D, Nickla DL, Mertz JR, et al. Change in the synthesis rates of ocular retinoic acid and scleral glycosaminoglycan during experimentally altered eye growth in marmosets[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(5): 1768-1777
- 9 Dawson MI, Zhang XK. Discovery and design of retinoic acid receptor and retinoid X receptor class-and subtype-selective synthetic analogs of all-trans-retinoic acid and 9-cis-retinoic acid[J]. *Curr Med Chem*, 2002, 9(6): 623-637
- 10 McFadden SA, Howlett MH, Mertz JR, et al. Acute effects of dietary retinoic acid on ocular components in the growing chick[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83(4): 949-961
- 11 吕勇, 张金嵩, 闫磐石, 等. RAR β 在豚鼠形觉剥夺性近视眼中的表达[J]. *眼科研究*, 2006, 24(4): 411-414
- 12 黄玲, 惠延年. 肝细胞生长因子的眼组织表达及作用[J]. *国外医学·眼科学分册*, 2000, 24(4): 236-240
- 13 He PM, He S, Garner JA, et al. Retinal pigment epithelial cells secrete and respond to hepatocyte growth factor[J]. *Biol Biop Res Comm*, 1998, 249(1): 253-257
- 14 Lashkari K, Rabimi N, Kazlauskas A. Hepatocyte growth factor receptor in human RPE cells: implication in proliferative vitreoretinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(1): 149-156
- 15 Leu ST, Batni S, Radeke MJ, et al. Drusen are cold spots for proteolysis: Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor proteins in age-related macular degeneration[J]. *Exp Eye Res*, 2002, 74(1): 141-154
- 16 Schippert R, Brand C, Schaeffel F, et al. Changes in scleral MMP-2, TIMP-2 and TGF β 2 mRNA expression after imposed myopic and hyperopic defocus in chickens[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82(4): 710-719
- 17 Rada JA, Shelton S, Norton TT. The sclera and myopia[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82(2): 185-200

(收稿:2008-08-27 修回:2009-03-15)

(本文编辑:高红)

读者·作者·编者

本刊对作者署名的要求

作者署名应符合 5 个条件:参与论证、参与研究、参与写作、能够答辩、承担责任。作者名次按对论文贡献的大小排序列于文题下方,并应在投稿时确定,在编排过程中不应再做变更或增减。有英文文题的论著和综述,应有作者姓名的汉语拼音,列于英文文题之下。作者中如有外籍作者,应征得本人同意,并附外籍作者同意刊登的信件。文章如果在国外完成,应提供国外作者(单位)同意以国内作者为第一作者在国内发表的证明信。

(本刊编辑部)