

## 阿柏西普对大鼠视网膜 Müller 细胞 STAT3 表达的影响

雷琦峰, 蔡 维

引用: 雷琦峰, 蔡维. 阿柏西普对大鼠视网膜 Müller 细胞 STAT3 表达的影响. 国际眼科杂志 2019; 19(3): 373-375

Received: 2018-10-25 Accepted: 2019-01-28

基金项目: 2015~2016 年度湖北省卫生计生西医美类一般项目 (No. WJ2015MB218)

作者单位: (442000) 中国湖北省十堰市, 湖北医药学院附属东风医院眼科

作者简介: 雷琦峰, 男, 毕业于武汉大学, 硕士, 主治医师, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病。

通讯作者: 蔡维, 男, 硕士, 主任医师, 副教授, 研究方向: 白内障、玻璃体视网膜疾病. caiwei384@163.com

收稿日期: 2018-10-25 修回日期: 2019-01-28

## 摘要

目的: 探讨阿柏西普对大鼠视网膜 Müller 细胞信号转导及转录活化因子 3 (STAT3) 表达的影响。

方法: 采用不同浓度的阿柏西普 100 $\mu$ L (加药浓度分别为 400、200、100pg/mL) 大鼠永生化视网膜 Müller 细胞 24、48h 后, MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞凋亡, Transwell 小室法检测细胞侵袭, Western-blot 法检测 AKT、STAT3 蛋白表达。

结果: 随着阿柏西普浓度的升高, Müller 细胞的增殖活性下降 ( $P < 0.05$ )。处理 48h 后, 随着阿柏西普浓度的升高, Müller 细胞的凋亡率逐渐上升, Müller 细胞的侵袭穿透指数逐渐降低 ( $P < 0.05$ )。转染 48h 后, 随着阿柏西普浓度的升高, Müller 细胞的 AKT 蛋白相对表达量无显著变化 ( $P > 0.05$ ), STAT3 蛋白相对表达量逐渐降低 ( $P < 0.05$ )。

结论: 阿柏西普可抑制大鼠视网膜 Müller 细胞 STAT3 蛋白表达, 从而抑制细胞增殖与侵袭性, 促进细胞凋亡。

关键词: 阿柏西普; 大鼠; 视网膜; Müller 细胞; 转录活化因子 3

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.3.05

## Effect of aflibercept on the expression of signal transducers and activators of transcription 3 in rat retinal Müller cells

Qi-Feng Lei, Wei Cai

Foundation item: Research Project of Hubei Provincial Health and Family Planning Commission in 2015-2016 (No. WJ2015MB218)

Department of Ophthalmology, Dongfeng Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Correspondence to: Wei Cai. Department of Ophthalmology, Dongfeng Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China. caiwei384@163.com

## Abstract

• AIM: To investigate the effect of aflibercept on the expression of signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) in rat retinal Müller cells.

• METHODS: The rat retinal Müller cells treated with different concentrations of Aflibercept 100  $\mu$ L (diluted concentrations of 400, 200, 100 pg/mL, respectively). MTT assay were used to detect cell proliferation, flow cytometry. Apoptosis were detected by the instrument, cell invasion were detected by transwell chamber method, and protein (AKT, STAT3, GAPDH) expression were detected by Western-blot method.

• RESULTS: The proliferation activity of Müller cells were decreased with the increased of aflibercept concentration, and compared the difference were statistically significant ( $P < 0.05$ ). After treatment for 48h, the apoptotic rate of Müller cells were gradually increased with the increased of aflibercept concentration, and the invasion and penetration index of Müller cells gradually were decreased, and compared the difference were statistically significant ( $P < 0.05$ ). After 48 h of transfection, the relative expression of AKT protein in Müller cells were not change significantly with the increased of Aflibercept concentration ( $P > 0.05$ ), and the relative expression of STAT3 protein decreased gradually, and compared the difference were statistically significant ( $P < 0.05$ ).

• CONCLUSION: Aflibercept can inhibit the expression of STAT3 protein in rat retinal Müller cells, thereby inhibit cell proliferation and invasion and promote apoptosis.

• KEYWORDS: aflibercept; rat; retina; Müller cells; transcriptional activator 3

Citation: Lei QF, Cai W. Effect of aflibercept on the expression of signal transducers and activators of transcription 3 in rat retinal Müller cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019; 19(3): 373-375

## 0 引言

Müller 细胞为一种贯穿视网膜全层的放射状胶质细胞, 可与感光细胞以及其它神经元紧密相连, 可通过降解谷氨酸与摄取谷氨酸-天冬氨酸转运蛋白摄取, 从而发挥保护神经元的作用<sup>[1-2]</sup>。同时 Müller 细胞是一种损伤诱导的干细胞, 周围环境的变化亦可影响 Müller 细胞功能<sup>[3-4]</sup>。绝大多数活化的 Müller 细胞都停留在幼稚阶段, 但是当视网膜下腔胶质瘢痕一旦形成, 组织低氧压引起视网膜血管和脉络膜毛细血管灌注不足, 血-视网膜屏障被破坏, 加剧感光细胞凋亡<sup>[5]</sup>。因此研究 Müller 细胞调节机制有助于促进 Müller 细胞向神经元的分化。信号转导及转录活化因子 3 (signal transducers and activators of

transcription 3, STAT3) 是一类 DNA 结合蛋白, 广泛表达于不同类型的细胞和组织中, 可参与细胞转化、凋亡、生长、恶性转化等过程<sup>[6-8]</sup>。阿柏西普是一种融合蛋白, 其作为眼科一种新的抗血管生成物, 利于减缓湿性黄斑水肿的进展速度, 使机体中央视觉维持较长时间, 其作用效能强于雷珠单抗或贝伐单抗<sup>[9-11]</sup>。本实验探讨了阿柏西普对大鼠视网膜 Müller 细胞 STAT3 表达的影响, 希望为延缓视网膜色素变性疾病进程提供理论参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大鼠永生化视网膜 Müller 细胞系购自美国 Sigma 公司(细胞培养在含有 10% 血清的 DMEM 培养基中, 培养条件: 5% CO<sub>2</sub>、37℃); DMEM 细胞培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; Annexin V-FITC PI 细胞凋亡检测试剂盒购于美国 Invitrogen 公司; MTT 增殖检测试剂盒购于美国 Promega 公司; 兔抗人多抗[抗 AKT 抗体(68kD)、抗 STAT3 抗体(114kD)、抗 GAPDH 抗体(42kD)] 购自英国 Abcam 公司; HRP 抗兔二抗购自英国 Abcam 公司; 阿柏西普购于美国 Sigma 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 MTT 法检测细胞增殖

将对数生长期的 Müller 细胞分别接种于 96 孔培养板中, 每孔细胞密度为 1×10<sup>4</sup> 个/mL (100μL)。按实验分组, 加入不同浓度的阿柏西普 100μL (加药浓度分别为 400、200、100pg/mL), 继续培养 24、48h 后加入 MTT 10μL, 6h 后终止培养, 每孔加入 150μL DMSO, 震荡 10min 后, 使用酶标仪 540nm 波长处检测与计算增殖活性。

#### 1.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期 Müller 细胞, 调整细胞浓度至 1×10<sup>3</sup> 个/mL, 接种于 6 孔培养板。给予阿柏西普处理 48h 后收取细胞, 加入 200μL 结合缓冲液重悬细胞, 加入 10μL Annexin V-FITC 和 5μL PI 双标记后, 避光反应 15min, 采用流式细胞仪检测凋亡情况。

#### 1.2.3 Transwell 小室法检测细胞侵袭

将 5μg 基质胶铺于侵袭小室聚碳酸酯微孔膜的上表面, 37℃ 放置 30min。Müller 细胞经阿柏西普处理 48h 后, 在 Transwell 上室中分别添加细胞 100μL, 在下室加入到 600μL 培养基, 培养 48h 后将其取出, 固定并染色微孔膜下层细胞, 在 400 倍光学显微镜下任意选取 5 个视野, 对每个视野穿过微孔细胞数目进行计数, 以侵袭穿透指数判定侵袭能力。

#### 1.2.4 Western-blot 法检测蛋白表达

Müller 细胞经阿柏西普处理 48h 后, 收取细胞消化后提取细胞总蛋白, 每组取 20μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜后过夜封闭, 剪成对应大小的条带放入各含有抗 AKT 抗体、抗 STAT3 抗体、抗 GAPDH 抗体的孵育盒中(稀释比例为 1:1000), 4℃ 过夜, TBST 洗涤后, 再将膜置于相应种属的二抗中(稀释比例为 1:5000), 室温孵育 1h, TBST 洗涤后进行 ECL 显色, 检测 GAPDH、AKT、STAT3 蛋白表达水平。

统计学分析: 所有实验均独立重复 3 次, 统计学分析采用 SPSS23.0 统计学软件进行分析, 计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 首先采用单因素方差分析进行三组间的比较, 若存在差异, 两两比较采用 LSD-t 检验, 检验水准为  $\alpha = 0.05$ 。

表 1 不同浓度阿柏西普不同时间细胞增殖活性的变化

阿柏西普浓度 (pg/mL)	( $\bar{x} \pm s, \%$ )	
	24h	48h
400	28.29±6.10 <sup>a,c</sup>	45.69±5.11 <sup>a,c</sup>
200	43.22±4.19 <sup>a</sup>	66.66±6.44 <sup>a</sup>
100	72.29±5.98	90.82±4.91
F	16.498	22.777
P	<0.01	<0.01

注:<sup>a</sup>P<0.05 vs 100pg/mL 阿柏西普组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 200pg/mL 阿柏西普组。

表 2 不同浓度阿柏西普细胞凋亡率和侵袭穿透指数的变化

阿柏西普浓度 (pg/mL)	( $\bar{x} \pm s, \%$ )	
	细胞凋亡率	侵袭穿透指数
400	44.58±2.58 <sup>a,c</sup>	9.48±6.33 <sup>a,c</sup>
200	23.19±1.09 <sup>a</sup>	20.17±3.92 <sup>a</sup>
100	5.09±3.11	37.78±2.19
F	19.444	9.222
P	<0.01	<0.01

注:<sup>a</sup>P<0.05 vs 100pg/mL 阿柏西普组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 200pg/mL 阿柏西普组。

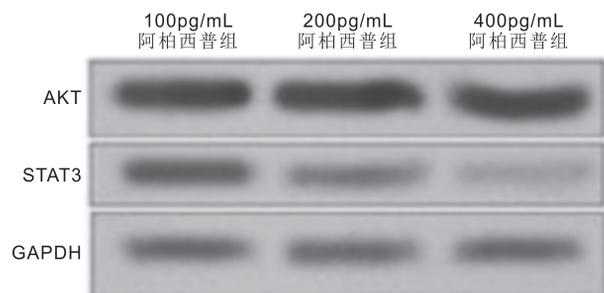


图 1 不同剂量阿柏西普作用后 AKT 和 STAT3 蛋白的表达。

## 2 结果

### 2.1 不同剂量阿柏西普作用后细胞增殖活性的变化

处理 24、48h 后, 随着阿柏西普浓度的升高, Müller 细胞的增殖活性下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 表 1)。

### 2.2 不同剂量阿柏西普作用后细胞凋亡率的变化

处理 48h 后, 随着阿柏西普浓度的升高, Müller 细胞的凋亡率逐渐上升, Müller 细胞的侵袭穿透指数逐渐降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 表 2)。

### 2.3 不同剂量阿柏西普作用后 AKT 和 STAT3 蛋白的表达

处理 48h 后, 随着阿柏西普浓度的升高, Müller 细胞的 AKT 蛋白相对表达量无显著变化 ( $F = 0.533, P = 0.333$ ); STAT3 蛋白相对表达量逐渐降低, 差异有统计学意义 ( $F = 9.30, P = 0.001$ , 图 1), 两组间比较, 200pg/mL 组和 100pg/mL 组、400pg/mL 组差异均有统计学意义 ( $t = 8.294, 10.482, P = 0.012, 0.001$ )。

## 3 讨论

Müller 细胞对视网膜发育和维持自身平衡都具有重要的作用, 当前视网膜损伤情况下, Müller 细胞可重新回到细胞周期, 能够大量活化和增殖, 逆分化为视网膜干细胞, 进而转分化为视网膜各类细胞和神经元, 完全替代损伤的细胞, 恢复视网膜功能<sup>[11]</sup>。但是在哺乳动物中, Müller 细胞的功能受限, 只有少量逆分化的 Müller 细胞分化表达视网膜神经元, 并能特异地向感光细胞分化<sup>[12-13]</sup>。

VEGF 及其受体(VEGFR)的生成过度表达参与视网膜的损伤过程,严重影响患者视力<sup>[14]</sup>。VEGF 为血小板衍生生长因子(PDGF)家族的重要一员,可增加血管通透性与促进血管和淋巴管的生成,是血管内皮细胞内高度特异性的血管生长和渗透因子<sup>[15]</sup>。VEGF 的类型包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 等,其是由七个免疫球蛋白样的结构域串联而形成的膜外部分,膜内部组成具有酪氨酸激酶活性<sup>[16]</sup>。VEGF 是参与糖尿病黄斑水肿病理生理过程的重要因子,高血糖、缺氧、外在损伤等病理条件可导致 VEGF 的上调,从而引起血管增生、血管渗漏等一系列病理过程<sup>[17]</sup>。阿柏西普的配体结合域融合了来自 VEGF 受体 1、2 及 IgG<sub>1</sub> 的 Fc 部分,其作为一种可溶性诱导受体来结合 VEGF-A 和胎盘生长因子,抑制同源 VEGF 受体的结合和激活,且阿柏西普与 VEGF 的亲合力高,中和 VEGF-A 的效能强于雷珠单抗或贝伐单抗<sup>[18-19]</sup>。本研究显示细胞处理 24、48h 后,随着阿柏西普浓度的升高,Müller 细胞的增殖活性下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。处理 48h 后,随着阿柏西普浓度的升高,Müller 细胞的凋亡率逐渐上升,Müller 细胞的侵袭穿透指数逐渐降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明阿柏西普的应用能降低 Müller 细胞增殖与侵袭性,提高细胞凋亡率。

当前研究表明,微环境中的细胞可通过分泌信号分子或者影响细胞间接触影响干细胞/祖细胞的存活、自我更新、迁移、粘附<sup>[20]</sup>。STAT3 由 750~850 个氨基酸组成,分子量为 84~113kDa。编码 STAT3 的基因在人类定位于第 12 号染色体,在鼠科动物定位于第 11 号染色体。STAT3 mRNA 在肝脏、睾丸、大脑、心脏和胸腺中含量较高,广泛表达于不同类型的细胞和组织中<sup>[21-22]</sup>。STAT3 具有亮氨酸拉链结构(bZIP),其与中枢神经系统疾病、眼科疾病等多种病理生理过程有着密切的关系<sup>[23-24]</sup>。STAT3 既可抑制转录,也可活化转录,其在调控细胞增殖、凋亡、免疫稳态、炎症以及器官和组织的分化等方面具有重要功能。研究表明,当 Müller 细胞受损时细胞凋亡增加,凋亡相关标记物上调<sup>[25]</sup>。本研究显示处理 48h 后,随着阿柏西普浓度的升高,Müller 细胞的 AKT 蛋白相对表达量无显著变化( $P > 0.05$ ),STAT3 蛋白相对表达量逐渐降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明阿柏西普的应用可影响 STAT3 蛋白的表达。从机制上分析,阿柏西普可阻止 VEGF 与 Fit-1 的结合,抑制同源 VEGF 受体的结合和激活,从而抑制 STAT3 蛋白的表达。本研究也有一定的不足,没有对阿柏西普的空白对照进行分析,也没有明确阿柏西普的作用位点,将在下一步的实验中进行深入分析。

总之,阿柏西普可抑制大鼠视网膜 Müller 细胞 STAT3 蛋白表达,从而抑制细胞增殖与侵袭性,促进细胞凋亡。

#### 参考文献

- Müller A, Hennig A, Lorscheid S, et al. IκBζ is a key transcriptional regulator of IL-36-driven psoriasis-related gene expression in keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(40):10088-10093
- 金姬,卢一,冯佳,等.视网膜 Müller 细胞条件性基因敲除血管内皮生长因子对氧诱导视网膜病变小鼠的影响. *中华眼底病杂志* 2017; 33(5):508-512
- Ranski AH, Kramer AC, Morgan GW, et al. Characterization of retinal regeneration in adult zebrafish following multiple rounds of phototoxic lesion. *Peer J* 2018; 20(6):e5646
- Pozios I, Knösel T, Zhao Y, et al. Expression of phosphorylated estrogen receptor beta is an independent negative prognostic factor for

- pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018; 144(10):1887-1897
- 姚晓倩,方媛,陈君毅.调控 Müller 细胞增殖分化的因子及信号通路的研究. *中国眼耳鼻喉科杂志* 2017; 17(6):431-435
- Löcken H, Clamor C, Müller K. Napabucasin and Related Heterocycle-Fused Naphthoquinones as STAT3 Inhibitors with Antiproliferative Activity against Cancer Cells. *J Nat Prod* 2018; 81(7):1636-1644
- Shin SY, Müller AK, Verma N, et al. Systems modelling of the EGFR-PYK2-c-Met interaction network predicts and prioritizes synergistic drug combinations for triple-negative breast cancer. *PLoS Comput Biol* 2018; 14(6):e1006192
- 杨雄里.视网膜神经信号的调制和视网膜疾病. *复旦学报(医学版)* 2017; 44(6):693-698
- 章淑杰,张荣,张雪瑾,等.人 Müller 细胞来源的外泌体对脂多糖刺激视网膜色素上皮细胞产生炎症因子的影响. *中国眼耳鼻喉科杂志* 2017; 17(5):323-327
- Ziegler PK, Bollrath J, Pallangyo CK, et al. Mitophagy in Intestinal Epithelial Cells Triggers Adaptive Immunity during Tumorigenesis. *Cell* 2018; 174(1):88-101
- Arndt L, Dokas J, Gericke M, et al. Tribbles homolog 1 deficiency modulates function and polarization of murine bone marrow-derived macrophages. *J Biol Chem* 2018; 293(29):11527-11536
- 丛小杰,肖宗宇,李文辉,等.Müller 细胞在视网膜病变发生发展中作用的研究进展. *山东医药* 2017; 57(37):107-109
- Ham S, Lima LG, Chai EPZ, et al. Breast Cancer-Derived Exosomes Alter Macrophage Polarization via gp130/STAT3 Signaling. *Front Immunol* 2018; 8(9):871
- Ren JL, Yu QX, Liang WC, et al. Green tea extract attenuates LPS-induced retinal inflammation in rats. *Sci Rep* 2018; 8(1):429
- 汪晓磊,马建民,孟照洋,等.急性高血压模型中 p75NTR 抑制剂对视网膜神经节细胞作用的研究. *首都医科大学学报* 2017; 38(1):24-28
- Eichler W, Savković-Cvijić H, Bürger S, et al. Müller Cell-Derived PEDF Mediates Neuroprotection via STAT3 Activation. *Cell Physiol Biochem* 2017; 44(4):1411-1424
- Ahmad R, Kumar B, Chen Z, et al. Loss of claudin-3 expression induces IL6/gp130/Stat3 signaling to promote colon cancer malignancy by hyperactivating Wnt/β-catenin signaling. *Oncogene* 2017; 36(47):6592-6604
- 田敏,吴进川,何薇,等.叔丁基对苯二酚对高糖培养视网膜 Müller 细胞核因子 E2 相关因子 2、血红素氧合酶 1 和磷脂酰肌醇-3 激酶表达的影响. *中华眼底病杂志* 2018; 34(4):382-387
- Vargas A, Kim HS, Baral E, et al. Protective effect of clusterin on rod photoreceptor in rat model of retinitis pigmentosa. *PLoS One* 2017; 12(8):e0182389
- 梁汇珉,刘学政.脑源性神经营养因子(BDNF)对高糖环境下视网膜 Müller 细胞的保护作用. *眼科新进展* 2018; 38(8):714-718
- Schwerdt T, Twigg SRF, Aschenbrenner D, et al. A biallelic mutation in IL6ST encoding the GP130 co-receptor causes immunodeficiency and craniosynostosis. *J Exp Med* 2017; 214(9):2547-2562
- 余爱华,柯敏,田朕,等.P58IPK 基因在视网膜 Müller 细胞内质网应激 PERK 通道中的作用. *武汉大学学报(医学版)* 2018; 39(2):213-218
- Zhu S, Luo H, Liu H, et al. p38MAPK plays a critical role in induction of a pro-inflammatory phenotype of retinal Müller cells following Zika virus infection. *Antiviral Res* 2017; 9(145):70-81
- 杨子建,程瑜,姚慧萍,等.腺苷受体拮抗剂对加压培养的视网膜 Müller 细胞钾离子通道的调控作用. *中华实验眼科杂志* 2018; 36(8):590-594
- Armento A, Ilina EI, Kaoma T, et al. Carboxypeptidase E transmits its anti-migratory function in glioma cells via transcriptional regulation of cell architecture and motility regulating factors. *Int J Oncol* 2017; 51(2):702-714