

高糖体外对视网膜色素上皮增生以及活性氧表达的影响

冯丽丽¹, 栾洁¹, 傅敏², 杨金凤²

作者单位:¹(210009)中国江苏省南京市,东南大学附属中大医院眼科;²(210009)中国江苏省南京市,东南大学临床医学院
作者简介:冯丽丽,女,在读硕士研究生,研究方向:糖尿病视网膜病变。

通讯作者:栾洁,女,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向:糖尿病视网膜病变. luanqiu10@163.com

收稿日期:2009-11-30 修回日期:2010-02-24

Effects of high glucose condition on the proliferation and reactive oxygen species expression cultured human retinal pigment epithelial cells *in vitro*

Li-Li Feng¹, Jie Luan¹, Min Fu², Jin-Feng Yang²

¹Department of Ophthalmology, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China; ²School of Clinical Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Jie Luan, Department of Ophthalmology, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. luanqiu10@163.com

Received: 2009-11-30 Accepted: 2010-02-24

Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of high glucose condition on the proliferation and reactive oxygen species (ROS) expression in cultured human retinal pigment epithelial (RPE) cells *in vitro*.

• **METHODS:** Human RPE cells were cultured *in vitro* and divided into four groups: control group with DMEM/F12 culture solution including 5.6mmol/L glucose; high glucose group with DMEM/F12 culture solution including 30mmol/L glucose; high glucose plus SB203580 group with DMEM/F12 culture solution including 30mmol/L glucose plus 10 μ mol/L SB203580 the specific inhibitor of p38 mitogen activated protein kinase (p38-MAPK); mannitol group with DMEM/F12 culture solution including 5.6mmol/L glucose and 24.4mmol/L mannitol. Cell viability was assessed by the MTT assay. ROS change in RPE cells in response to high glucose was detected with flow cytometry.

• **RESULTS:** Compared to controls, the treatment of RPE cells with 30mmol/L glucose caused an obvious decrease of cellular viability. After pretreated with SB203580, cell viability was elevated compared with high glucose group. The ROS increased in high glucose group.

• **CONCLUSION:** High glucose could damage RPE cells. The mechanisms may be that high glucose could evoke ROS expression via p38-MAPK pathway.

• **KEYWORDS:** high glucose; reactive oxygen species;

p38 mitogen activated protein kinase; retinal pigment epithelium cell

Feng LL, Luan J, Fu M, *et al.* Effects of high glucose condition on the proliferation and reactive oxygen species expression cultured human retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(3):453-455

摘要

目的:研究高浓度葡萄糖对体外培养的视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞增生以及活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成的影响。

方法:体外培养人 RPE (ARPE-19), 随机分成 4 组, 即正常对照组用含 5.6mmol/L 葡萄糖的 DMEM/F12 培养液, 高糖组用 30mmol/L 葡萄糖的 DMEM/F12 培养液, 高糖 + SB203580 组用 p38-MAPK 特异性阻断剂 SB203580 10 μ mol/L 预处理 30min 后, 再用含 30mmol/L 葡萄糖的 DMEM/F12 培养液, 甘露醇组 (渗透压对照组) 用含 5.6mmol/L 葡萄糖和 24.4mmol/L 甘露醇的 DMEM/F12 培养液。各组培养 48h 用 MTT 法检测各组视网膜色素上皮细胞的增生活力, 用 CM-H2DCFDA 荧光染色检测 RPE 细胞中 ROS 的产生量。

结果:与对照组相比, 高糖培养人视网膜色素上皮细胞 48h 可以导致 RPE 细胞的损伤, 抑制 RPE 细胞增殖, 并使 ROS 生成增加, 在一定程度上, 与 p38-MAPK 途径的激活有关。

结论:高糖培养 ARPE-19 可致细胞损伤, 抑制增殖, 并使 ROS 生成增加。

关键词:高浓度葡萄糖; 活性氧; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 视网膜色素上皮细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.03.016

冯丽丽, 栾洁, 傅敏, 等. 高糖体外对视网膜色素上皮增生以及活性氧表达的影响. 国际眼科杂志 2010;10(3):453-455

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病严重的并发症之一。高糖是 DR 的主要致病因素, 血糖水平的控制可以影响 DR 的发生发展已是广泛的共识。近年来的研究表明, 氧化应激作为一种病理过程参与了许多严重眼底疾病的发病机制。活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 自由基损害在氧化应激中起重要作用。视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞是血-视网膜屏障主要的组成部分, 在维护视网膜正常生理功能方面具有重要的作用^[1]。研究发现, 高糖可以造成视网膜色素上皮细胞的损伤, 影响视网膜屏障功能^[2], 但其确切的分子机制尚不清楚。p38 信号通路 (p38 mitogen activated protein kinase, p38-MAPK) 是一条应激敏感的通路, 高糖刺激可以激活 p38-MAPK, 使其磷酸化表达增加, 发挥信号转导作用。我们研究高糖对 RPE 细胞生长的影

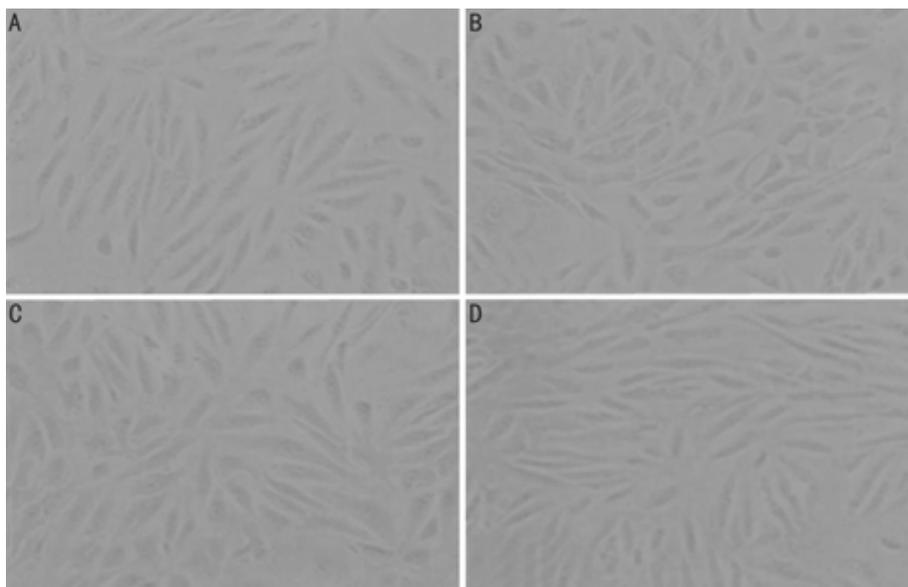


图1 培养 ARPE 的形态($\times 100$) A:对照组;B:高糖组;C:高糖 + SB203580 组;D:甘露醇组。

响以及与此相关的分子机制,尤其关注高糖对 RPE 产生 ROS 的影响,以及 p38-MARK 通路在此过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人视网膜色素上皮细胞(cultured human retinal pigment epithelial cells-19, ARPE-19)购自 ATCC 公司, DMEM/F12 培养液(Gibco 公司),胎牛血清(FCS,中美合资兰州民海生物),胰蛋白酶(Gibco 公司),二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司),四甲基偶氮唑(MTT, Sigma 公司),SB203580(碧云天生物科技),流式细胞仪(BD FACSCalibur)。

1.2 方法 ARPE-19 悬液置于含有 100mL/L FCS 的 DMEM/F12 培养液的培养瓶内,于 37°C, 50mL/L CO₂ 培养箱中培养,隔天换液,待细胞长至融合后,用 0.5g/L 胰蛋白酶-0.2g/L EDTA 消化,离心,制成单细胞悬液,按 1:4 ~ 1:6 传代。将长至融合状态的细胞以 0.5g/L 胰蛋白酶-0.2g/L EDTA 消化,离心,制成单细胞悬液,置于含 5.6mmol/L 葡萄糖的 DMEM/F12 培养液中培养 24h 后弃除培养液,用 PBS 漂洗 2 次分成 4 组,即正常对照组用含 5.6mmol/L 葡萄糖的 DMEM/F12 培养液,高糖组用 30mmol/L 葡萄糖的 DMEM/F12 培养液,高糖 + SB203580 组用 p38-MAPK 特异性阻断剂 SB203580 10 μ mol/L 预处理 30min 后,再用含 30mmol/L 葡萄糖的 DMEM/F12 培养液,甘露醇组(渗透压对照组)用含 5.6mmol/L 葡萄糖和 24.4mmol/L 甘露醇的 DMEM/F12 培养液,以上各组均培养 48h,于倒置显微镜下观察拍照。

1.2.1 增殖活性的测定 取生长状态良好的 ARPE-19 细胞,采用上述传代方法消化,制成细胞悬液,计数,以 10⁶个/L 接种于 96 孔板,每组设复孔且每孔的细胞数保持一致,加入等量培养液 200 μ L/孔,置于 37°C, 50mL/L CO₂ 培养箱中培养 48h;每孔加入 5g/L MTT 溶液 20 μ L,置于 37°C, 50mL/L CO₂ 培养箱中继续培养 4h,终止培养,小心吸弃培养液,每孔加入 DMSO 150 μ L,室温振荡 10min;在酶联免疫检测仪上测定各孔 490nm 的吸光度(A₄₉₀)值绘制生长曲线。

1.2.2 细胞内 ROS 产生的检测 RPE 细胞消化后,接种细胞悬液于 25cm²的培养瓶,置于 37°C, 50mL/L CO₂ 培养箱中培养 24h 后,按以上分组予以干预,分别培养 48h。吸弃培养液,用预冷的 PBS 洗 3min, 3 次,加入现配的

表 1 RPE 细胞活力 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	A 值	t
正常对照组	0.428 \pm 0.015	-
高糖组	0.302 \pm 0.034 ^b	8.293
高糖 + SB203580 组	0.363 \pm 0.011 ^{a,b}	8.393
甘露醇组	0.416 \pm 0.022	1.046

^aP < 0.05 vs 高糖组; ^bP < 0.01 vs 正常对照组。

CM-H2DCFDA 2.0mL,置于 37°C 50mL/L CO₂ 培养箱中避光孵育 30min,吸除染液, PBS 洗 3 次,最后加入 PBS 1.0mL。流式细胞仪记录各组 ROS 水平;波长 488nm 氩离子激光,观察至少 50000 个细胞,波峰右移,表明 ROS 含量高。

统计学分析:实验重复 3 次,测到的数据采用 SPSS 17.0 统计学软件进行 ANOVA 方差分析和配对 t 检验,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 P < 0.05 为有统计学差异。

2 结果

2.1 ARPE-19 形态学变化 正常对照组 RPE 细胞在倒置显微镜下观察呈长梭形或三角形为主,胞体不透明,细胞内可见少许黑色或棕褐色色素颗粒,细胞排列规则、紧密(图 1A)。而在葡萄糖浓度为 30mmol/L 的 DMEM/F12 培养液中,细胞胞体变薄,不规则形状细胞增多,形态呈现多样性(图 1B)。加入 p38-MAPK 特异性阻断剂 SB203580 10 μ mol/L 预处理 30min 后,再置于葡萄糖浓度为 30mmol/L 的 DMEM/F12 培养液中,细胞形态也有变化,不规则细胞增多(图 1C)。甘露醇组细胞形态与正常对照组相比没有明显变化(图 1D)。

2.2 ARPE-19 增殖活力 高糖组(A₄₉₀ = 0.302 \pm 0.034)细胞活力明显低于正常对照组(0.428 \pm 0.015),差异有显著性(P < 0.01);加入 SB203580 预处理组,细胞活力(0.363 \pm 0.011, P < 0.05)比高糖组高,但仍然较正常组偏低,差异有统计学意义;与正常对照组相比,甘露醇组细胞活力无明显变化(0.416 \pm 0.022)。结合细胞形态的变化,我们发现高浓度葡萄糖抑制细胞增生,甚至引起细胞死亡(表 1)。

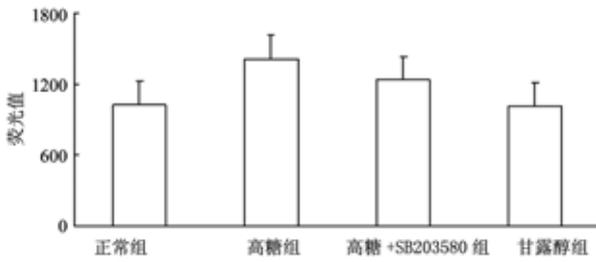


图2 RPE 细胞中 ROS 产生量。

2.3 产生活性氧的影响 与对照组相比,高糖组及加入 SB203580 预处理组 RPE 细胞内 ROS 的表达量增高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2);高糖组与加入 SB203580 预处理组 RPE 细胞内 ROS 的表达量相比,差别有统计学意义 ($P < 0.05$),其中高糖组 RPE 细胞内 ROS 的表达量均较其余组高;对照组与甘露醇处理组 RPE 细胞内 ROS 的表达量无统计学意义。高糖组及高糖 + SB203580 组与正常对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);高糖 + SB203580 组与高糖组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

糖尿病视网膜病变 (DR) 是糖尿病的严重并发症,严重者甚至导致视力丧失。高糖是 DR 的主要致病因素,控制血糖可以影响 DR 的发生发展。我们的研究结果显示,高浓度葡萄糖可以抑制 RPE 细胞的增殖,高糖组细胞增殖活力受到明显的抑制,RPE 细胞内 ROS 的表达量增高,其中高糖组的 RPE 细胞内 ROS 的表达量均较其余组高,提示高糖能够促进 RPE 细胞 ROS 的产生同时抑制培养的 RPE 细胞增生。Mayumi 等观察到高糖可使细胞增长受到抑制^[3],可以促进血管内皮细胞和周细胞凋亡,而 Lee 等进一步证实,高糖作用下小鼠心脏内皮细胞间连接蛋白减少,使细胞形状发生改变,可以造成大分子物质的渗漏^[4]。我们用含 30mmol/L 葡萄糖的 DMEM/F12 培养液处理 RPE 细胞 48h,倒置显微镜下观察,细胞胞体变薄,不规则形状细胞增多,形态呈现多样性。用 MTT 法检测细胞活力结果显示,高糖组细胞活力明显低于正常对照组 ($P < 0.01$);而与高糖相同渗透浓度的甘露醇组对 RPE 细胞的形态和活力并不产生明显的影响。以上结果显示,高糖刺激可以抑制视网膜色素上皮细胞的增殖,且此抑制作用与高浓度葡萄糖造成的高渗透压无关。

活性氧是一种化学性质比氧分子更加活泼的小分子物质,细胞内 ROS 主要是在细胞能量代谢过程中产生的超氧阴离子、少量过氧化氢以及它们的转化产物羟自由基等,细胞在生理状态下不断产生 ROS,同时机体存在清除和抑制自由基产生的系统,一旦平衡被打破,过多的 ROS 自由基可以直接攻击靶器官造成组织器官损伤,以及生物大分子如 DNA, RNA, 氨基酸等的结构破坏^[5]。CM-H2DCFDA 作为一种荧光染色剂可以通过细胞膜快速进入

细胞,当细胞内存在 ROS 时,CM-H2DCFDA 可以被氧化为发出荧光的 DCF,其荧光强度与细胞内 ROS 成正比,我们通过 CM-H2DCFDA 荧光标记检测细胞内 ROS。结果表明,高糖可以明显增加 RPE 细胞内 ROS 的产生。RPE 细胞含有丰富的线粒体,代谢旺盛,对氧需求量大。有研究发现,RPE 细胞氧化损伤的主要靶细胞器是线粒体,损伤水平取决于活性氧的量,RPE 细胞线粒体 DNA 对 ROS 介导的损伤非常敏感,而 RPE 细胞中线粒体 DNA 的损伤又可以使 ROS 的产生增加、电子转运减少,进一步加重 RPE 细胞功能障碍^[6]。在高糖状态下产生的 ROS 不仅可以造成细胞氧化损伤,还是高糖的信号转导分子。MAPK 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它存在于大多数细胞内,是真核细胞转导细胞外信号到细胞内引起细胞反应的一类重要信号系统。其中的 p38MAPK 通路参与了细胞的生长发育及细胞间功能同步等多种生理过程,并与炎症、应激反应的调控密切相关,被认为是细胞信息传递的交汇点和共同通路^[7]。本实验以 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 预处理 RPE 细胞,研究了 p38 信号通路在高糖诱导的 RPE 细胞氧化损伤过程中的作用。结果显示,以 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 预处理 RPE 细胞,再给予高糖刺激,ROS 的表达量有所减少,与单独高糖干预组相比差别有统计学意义 ($P < 0.05$)。

综上所述,高浓度葡萄糖可以引起培养的人 RPE 细胞氧化损伤,使细胞形态和活力发生变化,损伤的机制可能是高糖诱导 RPE 细胞产生大量 ROS,同时使细胞抗氧化能力下降,激活 RPE 细胞 p38MAPK,经过细胞内信号转导,过量的 ROS 可以通过细胞毒作用和细胞抑制作用造成 RPE 细胞损伤,参与 DR 的发生、发展。

参考文献

- 1 Naggar H, Oia MS, Moore P, et al. Down regulation of reduced-folate transporter by glucose in cultured RPE cells and in RPE of diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(2):556
- 2 Cai J, Wu M, Nelson KC, et al. Oxidant-induced apoptosis in cultured human retina pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(5):959-966
- 3 Jin GF, Hurst JS, Godley BF. Hydrogen Peroxide stimulates apoptosis in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Cur Eye Res* 2001;22(3):165-173
- 4 Seko Y, Pang J, Tokoro T, et al. Blue light-induced apoptosis in cultured retinal pigment epithelium cells of the rat. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239(1):47-52
- 5 Lu H, Hunt DM, Ganti R, et al. Metallothionein protects retinal pigment epithelial cells against apoptosis and oxidative stress. *Exp Eye Res* 2002;74(1):83-92
- 6 Siu AW, Reiterv RJ, To CH. Pineal indoleamines and vitamin E reduce nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat retina homogenates. *Pineal Res* 1999;27:122-128
- 7 Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001;410(6824):37-40