

缺氧诱导体外培养人视网膜色素上皮细胞中 Toll 样受体 4 的表达

张雪,王雨生,叶子,马可

基金项目:中国国家自然科学基金资助项目(No. 30371516, 30672291)

作者单位:(710032)中国陕西省西安市,第四军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所

作者简介:张雪,女,在读硕士研究生,研究方向:脉络膜新生血管疾病。

通讯作者:王雨生,男,博士,教授,主任医师,博士生导师,主任,中华医学会眼科学会全国中青年委员,中华医学会眼科学会眼底病学组委员,全军眼科学会副主任委员,国际眼色素上皮研究协会 Society for Ocular Pigment Research(美国)会员,国家教育部学位评定委员会委员,《国际眼科杂志》副主编,研究方向:眼底病、眼外伤、糖尿病眼病的诊治、眼科激光治疗、玻璃体视网膜手术。wangysfmmu@gmail.com

收稿日期:2010-05-04 修回日期:2010-06-01

Expression of Toll-like receptor 4 in cultured human retinal pigment epithelium cells under hypoxic condition

Xue Zhang, Yu-Sheng Wang, Zi Ye, Ke Ma

Foundation item: China National Natural Science Foundation(No. 30371516, 30672291)

Department of Ophthalmology, Institute of Ophthalmology of Chinese PLA, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Yu-Sheng Wang. Department of Ophthalmology, Institute of Ophthalmology of Chinese PLA, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. wangysfmmu@gmail.com

Received: 2010-05-04 Accepted: 2010-06-01

Abstract

• AIM: To observe the effects of hypoxia on the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in cultured human retinal pigment epithelium (RPE) cells.

• METHODS: Chemical hypoxic model was established by treating the cultured human RPE cells with 200 μmol/L CoCl₂. The location of TLR4 in human RPE cells was observed by immunofluorescence assay, and RT-PCR together with Western blot were applied to detect the expression of TLR4 2, 4, 8, 12, 24 hours after the treatment.

• RESULTS: Immunofluorescence assay revealed that TLR4 was slightly expressed in human RPE cells under normoxic condition. After hypoxic treatment, there was a significant increase in green fluorescence within the cytoplasm. TLR4 expression tend to intensify over time and peaked at 12 hours, which was confirmed by RT-PCR and Western blot assay exhibiting TLR4 mRNA/protein levels ($P < 0.05$). The expression levels began to decrease at

24 hours, and there was statistical significance among the groups.

• CONCLUSION: Hypoxia can strengthen TLR4 expression in cultured human RPE cells.

• KEYWORDS: TLR4; hypoxia; retinal pigment epithelial cells

Zhang X, Wang YS, Ye Z, et al. Expression of Toll-like receptor 4 in cultured human retinal pigment epithelium cells under hypoxic condition. *Int J Ophthalmol(Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(7):1260-1262

摘要

目的:了解缺氧对人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)表达的影响。

方法:采用 200 μmol/L CoCl₂处理 RPE 细胞建立化学缺氧模型,以未处理细胞作对照,在缺氧处理后 2, 4, 8, 12 和 24h 用免疫荧光法观察 TLR4 在细胞中的定位,用 RT-PCR 和 Western blot 检测细胞中 TLR4 表达水平。

结果:共聚焦显微镜观察到正常对照组 RPE 细胞胞质内有微弱的 TLR4 荧光表达,缺氧后胞质内荧光表达明显增强,缺氧 12h 荧光强度达最强。RT-PCR 和 Western blot 结果分别提示随缺氧时间延长,RPE 细胞中 TLR4 mRNA 和蛋白表达增强水平升高,缺氧至 12h 表达高峰最强($P < 0.05$),24h 表达开始下降,各组差异有统计学意义。

结论:缺氧可诱导 RPE 细胞中 TLR4 表达增强。

关键词: Toll 样受体 4;缺氧;视网膜色素上皮细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.07.007

张雪,王雨生,叶子,等.缺氧诱导体外培养人视网膜色素上皮细胞中 Toll 样受体 4 的表达.国际眼科杂志 2010;10(7):1260-1262

0 引言

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是眼内新生血管的重要表现形式之一,常见于黄斑区,对患者中心视力造成严重损害^[1]。CNV 的病因尚未明确,缺氧诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达是 CNV 发病机制中的关键环节。近年来的研究发现,眼部的炎症反应和免疫活化在 CNV 的发生发展中起到重要作用,Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)是参与体内非特异性免疫反应的重要分子,有促进细胞因子的合成与释放、参与体内非特异性免疫反应等重要作用,在年龄相关性黄斑变性(age related macular degeneration, AMD)的发生发展中可能有重要作用,但 TLR4 是否参与了缺氧诱导的 CNV 发生发展尚不明确。我们观察了缺氧诱导体外培养人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞中 TLR4 的表达,初步探讨缺氧对人 RPE 细胞中 TLR4 表达的影响。

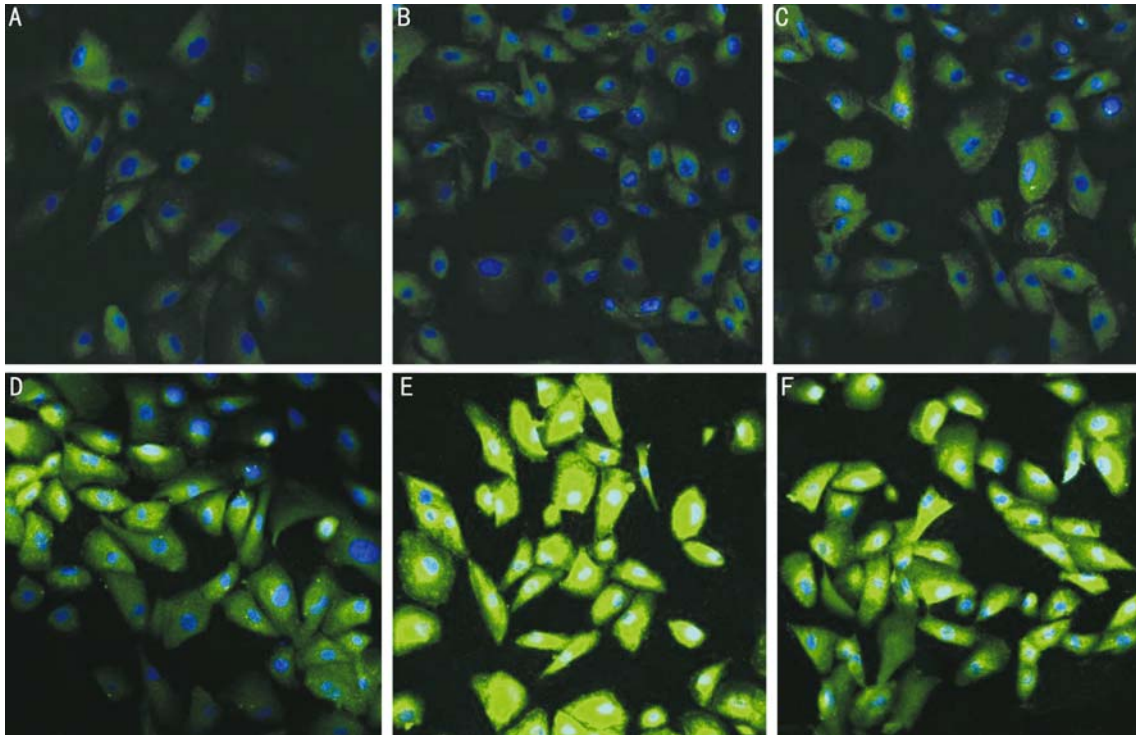


图1 缺氧 RPE 细胞中 TLR4 的表达 (bar = 50 μ m) A: 对照组; B: 缺氧 2h; C: 缺氧 4h; D: 缺氧 8h; E: 缺氧 12h; F: 缺氧 24h。

1 材料和方法

1.1 材料 人 RPE 细胞由本研究所董潇博士提供。复苏细胞,用含 100mL/L 灭活新生牛血清 (Gibco)、100kU/L 青链霉素的 DMEM/f12 (Hyclone) 培养液于 37 $^{\circ}$ C, 50mL/L CO₂ 孵箱中培养, 2d 换液 1 次, 细胞生长至占瓶壁 80% 后, 用 2.5g/L 胰酶消化传代, 选取 4~7 代对数生长期的人 RPE 细胞接种于 24 孔板每孔中预先放置的已消毒的直径 12mm 圆形盖玻片上, 放入孵箱中 12h 后观察并换液, 待细胞生长至占盖玻片 70% 时用于实验。

1.2 方法 将 24 孔板分为 6 组 (每组 4 孔), 用含 200 μ mol/L CoCl₂ 建立细胞化学缺氧模型, 分别处理 2, 4, 8, 12 和 24h, 同时设立未处理的培养 RPE 细胞作正常对照组。将玻片取出, PBS 洗 3 次, 每次 5min, 40g/L 多聚甲醛固定 10min, PBS 洗 3 次后, 用 100g/L BSA 和 100g/L Triton 在 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中封闭 2h, 滴加 1/200 兔抗人 TLR4 多克隆抗体 (Abcam), 4 $^{\circ}$ C 冰箱内避光孵育 24h, PBST 洗玻片 3 次, 每次 5min, 滴加 1/100 山羊抗兔 IgG 抗体 (Takara) 37 $^{\circ}$ C 避光 2h, PBST 洗玻片 3 次, 每次 5min, 滴加 1/100 DAPI, 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中避光放置 5min, PBST 洗玻片 3 次, 甘油封片, 用激光共聚焦显微镜观察。另收集上述各组 RPE 细胞, 裂解细胞提取总蛋白, 配制 100g/L 的分离胶和 60g/L 的浓缩胶, 每个样本按 20 μ L 上样量进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转法将凝胶上的蛋白转移到 NC 膜, 50g/L 脱脂奶粉室温封闭 1h, 分别用 1:500 兔抗人 TLR4 多克隆抗体 (Abcam) 和 1:200 小鼠抗人 VEGF mAb (Santa cruz) 4 $^{\circ}$ C 过夜, 次日用 1:20000 的 HRP 标记山羊抗兔 Ig 抗体 (Takara) 和 1:20000 的 HRP 标记大鼠抗小鼠 IgG 抗体 (Takara) 分别室温孵育 1h, 扫描并照相。收集各组 RPE 细胞用总 RNA 提取试剂盒 (Omega) 提取总 RNA, 引物设计与合成由上海生工完成, TLR4 的上游引物序列为 5'-GTGGAAGTTGAACGAATGGA-3', 下游引物序列为 5'-TG GATGATGTTGGCAGCA-3'; VEGF 的上游为 5'-AGGAGGG CAGAATCATCACG-3', 下游为 5'-CAAGGCCACAGGGA

TTTTCT-3'; β -action 的上游引物序列为 5'-TCGACAACG GCTCCGGCAT-3', 下游为 5'-AAGGTGTGGTCCAGATTT TC-3'。用逆转录试剂盒 (Takara) 合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。制作 10g/L 的琼脂糖凝胶, 内加入终浓度为 0.5mg/L EB, 取 10 μ L PCR 扩增产物加入加样孔, 设定电压为 80V, 时间为 50min, 紫外凝胶成像仪对凝胶拍照并扫描。用 Kodak digital science ID 软件对 RT-PCR 结果进行灰度值分析, 用 TLR4 灰度值与同一样品 β -actin 的灰度值之比来反映细胞中 TLR4 mRNA 的相对表达量。用 Bandscan 5.0 软件对蛋白质免疫印记结果进行灰度值分析, 用 TLR4 的灰度值与同一样品 β -actin 的灰度值之比来反映细胞中 TLR4 蛋白的相对表达量。

统计学分析: 采用 SPSS 12.0 软件处理, 数据用“均数 \pm 标准差” ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用配对 *t* 检验和 *LSD* 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TLR4 蛋白的表达 激光共聚焦显微镜下, TLR4 呈绿色荧光, 主要表达于 RPE 细胞的胞质中, 核呈蓝色荧光 (图 1)。常氧状态下的 RPE 细胞胞质内只有微弱的绿色荧光表达。随着缺氧时间延长, 绿色荧光强度逐渐增强, 于缺氧 12h 后达到最高 (图 1E), 24h 后稍有降低 (图 1F)。提示体外培养的人 RPE 细胞在常氧状态下有 TLR4 的表达, 主要表达于胞质中, 随缺氧时间延长胞质内 TLR4 的表达逐渐增多。正常情况下, RPE 细胞中的 TLR4 蛋白低表达, 随着缺氧时间延长 TLR4 蛋白表达增强, 在缺氧后 2, 4, 8, 12 和 24h 的 TLR4 蛋白相对表达量分别为 0.3629 \pm 0.0051, 0.4028 \pm 0.0074, 0.4176 \pm 0.0025, 0.4310 \pm 0.0035, 0.4231 \pm 0.0059, 与对照组 0.3457 \pm 0.0052 相比均有统计学意义。缺氧 12h 达到峰值 ($P < 0.05$), 缺氧 24h 后仍有较高表达 (图 2)。提示缺氧可上调 TLR4 蛋白的表达。

2.2 TLR4 mRNA 的表达 正常情况下, RPE 细胞中的 TLR4 mRNA 低表达, 随着缺氧时间延长, TLR4 mRNA 的

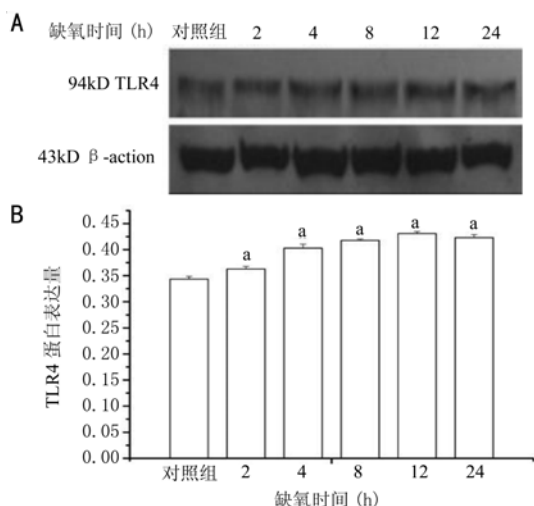


图2 缺氧 RPE 细胞中 TLR4 蛋白表达 (n=6) A: 电泳图; B: TLR4 蛋白表达量 (*P < 0.05 vs 对照组)。

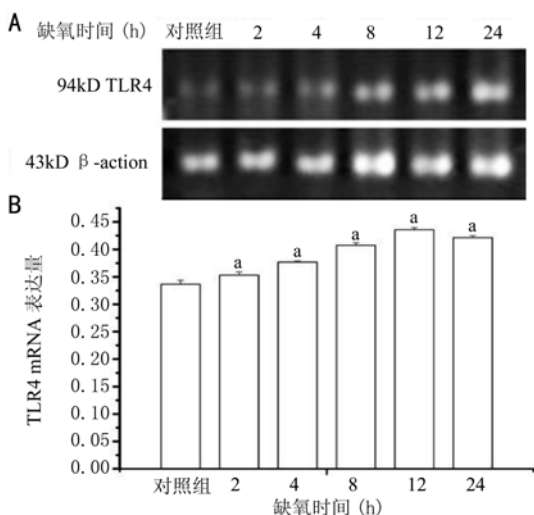


图3 缺氧 RPE 细胞中 TLR4 mRNA 的表达 (n=6) A: 电泳图; B: TLR4 mRNA 的表达量 (*P < 0.05 vs 对照组)。

表达逐渐升高,2, 4, 8, 12 和 24h 的 TLR4 mRNA 的相对表达量分别为 0.3524 ± 0.0061, 0.3770 ± 0.0019, 0.4075 ± 0.0046, 0.4359 ± 0.0037, 0.42145 ± 0.0035, 与对照组 0.3367 ± 0.0069 相比均有统计学意义,其中缺氧 12h 达到高峰 (P < 0.05), 缺氧 24h 后表达有所下降 (图 3)。提示缺氧可上调 TLR4 mRNA 的表达。

3 讨论

CNV 的形成是一个多因素共同调节的复杂过程,缺氧是目前较为明确的原因,缺氧诱导 RPE 细胞产生的 VEGF 是最重要的促血管生成因子,在 CNV 的发生发展中起到重要作用。近年来的研究发现,眼部的炎症反应和免疫活化在 CNV 的发生发展中起到重要作用,多种炎症细胞如巨噬细胞、中性粒细胞、T 细胞和 NK 细胞,部分炎症介质如 C3a 和 C5a,以及多种炎症因子如 IL-1, IL-8, TNF-α 和 MCP-1 都可以诱导 VEGF 的表达,在 CNV 的发生发展过程中起重要作用^[1], TLR4 是 TLR 家族的一员,于 1997 年被发现并命名,目前已经发现的 TLR 家族成员共有 11 个,TLR4 属于 I 型跨膜蛋白,胞外区特异性结合 LPS, TLR4 广泛分布于全身各种组织、器官和细胞,TLR4 在结膜、角膜、葡萄膜和视网膜均有表达^[2],在人 RPE 细胞中有 TLR1, TLR7, TLR 9 和 TLR10 的基因表达,TLR2, TLR3 和 TLR4 的蛋白表达。TLR4 介导的 LPS 胞内信号

传导主要有 MyD88 依赖途径和 MyD88 非依赖途径^[3], MyD88 依赖途径主要作用是通过激活 NF-κB 通路产生大量炎症因子如 IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 和 TNF,诱导炎症发生。MyD88 非依赖途径的主要作用是在 TLR4 于 LPS 结合后,诱导干扰素的产生和树突状细胞的成熟。用 TLR4 的促进剂 LPS 刺激人前列腺上皮细胞、单核细胞、血管平滑肌细胞和成齿质细胞,均可以观察到 TLR4 对 VEGF 的上调作用^[4-7]。TLR4 诱导的炎症反应中大量炎症因子及干扰素的释放均可以诱导 VEGF 的表达,可能对 CNV 发生发展起到重要作用。有研究表明,AMD 产生过程中伴随有慢性炎症反应,TLR4 在这种慢性炎症反应中起到很重要的作用,TLR4 的基因突变可能造成对微生物清除作用的损坏,从而引起长期的低度的炎性反应导致 AMD 发生,TLR4 参与 RPE 细胞对光感受器细胞外节的吞噬作用,当这一功能被破坏时,会导致光感受器外节的堆积,使病变区域代谢物沉积和营养缺乏,并可加重缺氧,导致 AMD 发生^[8]。在缺氧诱导 CNV 的发生发展过程中是否有 TLR4 的参与还未有研究。

我们采用化学缺氧的方法建立人 RPE 细胞体外缺氧模型,通过激光共聚焦显微镜观察了 TLR4 在人 RPE 细胞的表达,并通过 RT-PCR 和 Western blot 观察了缺氧对 TLR4 mRNA 和蛋白表达的上调作用,提示缺氧可上调 TLR4 的表达。缺氧诱导 VEGF 表达是 CNV 发病机制中的关键环节。缺氧能够增加 VEGF 基因转录和 VEGF mRNA 的稳定性^[9],诱导 VEGF 在 RPE 细胞中的表达。在其他细胞中可以观察到 TLR4 上调 VEGF 的表达,有研究表明在 RPE 细胞中 TLR4 可上调一系列炎症因子如 IL-1, IL-6, IL-8, INF 和 IFN 等^[10],这些炎症因子如 IL-1, INF 和 IFN 可以上调 VEGF^[11],但目前尚未有 RPE 细胞中 TLR4 与 VEGF 相关性的研究。由于 VEGF 对 CNV 的发生发展有很关键的作用,进一步研究 RPE 细胞中 TLR4 与 VEGF 的关系可能对于揭示 CNV 的发生机制有重要意义。

参考文献

- 1 石圆圆,王雨生. 炎症与脉络膜新生血管. 中华眼底病杂志 2007; 23(1):71-74
- 2 Chung SH, Kweon MN, Lee HK, et al. Toll-like receptor 4 initiates an innate immune response to lipopolysaccharide in human conjunctival epithelial cells. *Experimental Eye Research* 2009;88(1): 49-56
- 3 Lee JY, Lowell CA, Lemay DG, et al. The regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase by Src-family tyrosine kinases mediated through MyD88-independent signaling pathways of Toll-like receptor 4. *Biochem Pharmacol* 2005;70(8): 1231-1240
- 4 Heoa SK, Yuna HJ, Nohh EK. LPS induces inflammatory responses in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4 expression and nitric oxide production. *Immunol Lett* 2008;120(1-2):64-67
- 5 Botero TM, Shelburne CE, Holland GR, et al. Nor. TLR4 mediates LPS-induced VEGF expression in odontoblasts. *J Endod* 2006;32(10): 951-955
- 6 Pei ZY, Li H, Guo Y, et al. Sodium selenite inhibits the expression of VEGF, TGFβ, and IL-6 induced by LPS in human PC3 cells via TLR4-NF-κB signaling blockage. *Int Immunopharmacol* 2010;10(1):50-56
- 7 Malaguamera L, Imbesi R, DiRosa M, et al. Action of prolactin, IFN-g, TNF-a and LPS on heme oxygenase-1 expression and VEGF release in human monocytes/macrophages. *Int Immunopharmacol* 2005;5(9):1458-1469
- 8 Ding X, Patel M, Chan CC. Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Progr Retinal Eye Res* 2009;28(1):1-18
- 9 张鹏,王雨生,惠延年. 缺氧诱导因子-1 与眼内新生血管. 眼科新进展 2004;24(3):224-226
- 10 Leung KW, Barnstable CJ, Tombran-Tink J. Bacterial endotoxin activates retinal pigment epithelial cells and induces their degeneration through IL-6 and IL-8 autocrine signaling. *Mol Immunol* 2009;46(7): 1374-1386