

PEDF 对氧化应激损伤的 RGC-5 细胞的保护作用

陈 承¹,任百超¹,何 媛²,马建梅³

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81100665);陕西省科技厅资助项目(No. 2011K14-02-07);陕西省卫生厅资助项目(No. 2010D56);陕西省教育厅资助项目(No. 2010JK807);西安医学院资助项目(No. 10FC01)

作者单位:¹(710003)中国陕西省西安市,西安交通大学第二附属医院眼科;²(710038)中国陕西省西安市,西安医学院第二附属医院眼科;³(710021)中国陕西省西安市,西安医学院临床医学院

作者简介:陈承,男,硕士,主治医师,研究方向:白内障。

通讯作者:任百超,主任医师,教授,研究方向:白内障. sxsfmb@163.com;何媛,副主任医师,副教授,研究方向:青光眼. openji7127@hotmail.com

收稿日期:2012-07-16 修回日期:2012-08-10

Neuroprotective effects of PEDF against oxidative stress-induced injury in RGC-5 cells

Cheng Chen¹, Bai-Chao Ren¹, Yuan He², Jian-Mei Ma³

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81100665); Project of Shaanxi Province Science and Technology Department (No. 2011K14-02-07); Project of Shaanxi Province Health Department (No. 2010D56); Project of Education Department of Shaanxi Provincial Government (No. 2010JK807); Xi'an Medical University Funded Project (No. 10FC01)

¹Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China; ²Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China; ³Clinical Medical College of Xi'an Medical University, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Bai-Chao Ren. Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China. sxsfmb@163.com; Yuan He. Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. openji7127@hotmail.com

Received:2012-07-16 Accepted:2012-08-10

Abstract

• **AIM:** To investigate the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) against oxidative stress-induced injury in differentiated retinal ganglion cell (RGC)-5 cells.

• **METHODS:** After differentiated with staurosporine, RGC-5 cells were divided into 4 groups. After every group cells were cultured for 24 hours, cell viability was determined by MTT assay; the apoptosis percent was tested by the Annexin V-FITC apoptosis kit.

• **RESULTS:** H₂O₂ may induce cell death of RGC-5 cells in a concentration-dependent manner. Exposure to 200 μmol/L H₂O₂ clearly induced cell death in 40% of the cells within 24 hours. The apoptosis percent (36.60% ± 2.12%) after exposure to 200 μmol/L H₂O₂ is higher than the control cells (6.03% ± 1.45%). PEDF at 100 ng/mL suppressed the cell death induced by H₂O₂ about 30% of the control cells. At the same concentration, PEDF also inhibited the cell apoptosis induced by H₂O₂ (*P* < 0.01).

• **CONCLUSION:** PEDF is able to effectively protect RGC against oxidative stressed injury and can be used as a very potential neuroprotective drug.

• **KEYWORDS:** pigment epithelium-derived factor; hydrogen peroxide; retinal ganglion cells-5

Citation: Chen C, Ren BC, He Y, *et al.* Neuroprotective effects of PEDF against oxidative stress-induced injury in RGC-5 cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(9):1633-1635

摘要

目的:研究色素上皮衍生因子(PEDF)对分化的视网膜神经节细胞(RGC-5)氧化应激损伤的防护作用。

方法:利用外源性活性氧(H₂O₂)造成分化的RGC-5细胞的氧化应激损伤,同时应用PEDF进行保护。用MTT检测其细胞活性,用Annexin V-FITC凋亡试剂盒测定凋亡。

结果:H₂O₂以浓度依赖的方式降低RGC-5细胞活性,200 μmol/L H₂O₂在24h可以导致分化的RGC-5细胞活性降低40%;细胞凋亡百分数(36.60% ± 2.12%)较空白对照组(6.03% ± 1.45%)明显增加(*P* < 0.01)。100 ng/mL PEDF使H₂O₂损伤分化后RGC-5细胞的细胞活性提高了30%,凋亡率降低为(9.36 ± 1.61)%。

结论:PEDF能够有效地防护氧化应激对视神经节细胞的损伤,是一种极具开发潜力的神经保护性药物。

关键词:色素上皮衍生因子;过氧化氢;视网膜神经节细胞系

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.09.07

引用:陈承,任百超,何媛,等. PEDF对氧化应激损伤的RGC-5细胞的保护作用. 国际眼科杂志 2012;12(9):1633-1635

0 引言

氧化应激引起视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)凋亡是青光眼视神经损害的重要原因之一。RGCs中富含线粒体,在正常生理活动中可以产生大量的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),然而在低血流或高眼压等病理状态下细胞清除ROS的能力下降,极易造成氧化应激性损伤,诱发死亡信号,最终导致细胞死亡。

色素上皮衍生因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) 可由体内组织合成,在体内广泛分布。有研究表明 PEDF 具有很强的抗氧化作用,可以抑制氧化损伤诱导的培养的视网膜周细胞凋亡和功能障碍^[1];阻止 ROS 产生并保护视网膜内皮细胞在高糖环境中免受损伤^[2]。本实验利用外源性 ROS (H_2O_2) 造成经星状孢子素 (staurosporine, SS) 分化的视网膜神经节细胞 (RGC-5) 氧化应激性损伤,进而研究 PEDF 对 RGC-5 细胞的保护作用,为开发抗青光神经保护性药物提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 试剂:DMEM 及 100mL/L FBS 购于美国 Hyclone 公司;青霉素和链霉素由西安交通大学第二附属医院药剂科提供;PBS 粉剂及 300mL/L H_2O_2 购于西安化工试剂厂;星状孢子素购于美国 Alexis 公司;PEDF 购于美国 PeproTech 公司;胰酶粉剂、DMSO 和 MTT 购于 Sigma 公司;凋亡检测试剂盒购于珠海健康元生物医药有限公司。RGC-5 细胞:由中山眼科中心实验室惠赠,已经基因鉴定为小鼠源性,并且其 RGCs 特异性抗原表达阳性,鉴定结果参阅文献^[3]。

1.2 方法

1.2.1 RGC-5 细胞培养 实验所用细胞代数在 10~30 代之间。RGC-5 细胞培养应用高糖 DMEM 细胞培养液、100mL/L 胎牛血清和 100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素。细胞培养于 37 $^{\circ}$ C, 50mL/L CO_2 细胞孵箱中,每 2~3d 应用胰蛋白酶消化传代 1 次。

1.2.2 实验分组 本实验将传代的 RGC-5 细胞贴壁培养 12h 后,加入使其终浓度为 316nmol/L 的 SS 继续培养 24h,使其轴突延伸,从形态上更似 RGCs。然后将分化的 RGC-5 细胞分为 4 组,给予干预处理:空白对照组 (control group),只加 DMEM 培养液进行培养;氧化损伤组 (oxidative damage group),除了 DMEM 培养液外,加入使终浓度为 200 μ mol/L 的 H_2O_2 溶液对 SS 分化后的 RGC-5 细胞造成氧化损伤;PEDF 保护组 (PEDF protected group),除了 DMEM 培养液和 H_2O_2 外,于 H_2O_2 加入 2h 前加入 PEDF 使其终浓度为 100ng/mL,以拮抗 H_2O_2 造成的损伤作用;PEDF 组 (PEDF group),除了 DMEM 培养液外,加入使其终浓度为 100ng/mL 的 PEDF。

1.2.3 细胞活性实验 各处理组细胞培养 24h 后于 96 孔板每孔加入 20 μ L MTT 溶液 (5mg/mL),继续培养 4h。终止培养,小心吸去孔内培养液。每孔加入 150 μ L 二甲亚砜,置摇床上低速振荡 10min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪用 490nm 波长处测量各孔的吸光度 (A),重复 3 次。

1.2.4 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒测各组细胞凋亡百分数 将各处理组细胞在 6 孔板中培养并进行处理,培养 24h 后,去除培养液,收集至离心管,1500r/min 离心 5min,弃去上清,收集细胞。然后按照试剂盒操作说明进行操作。

统计学分析:所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。结果采用 SPSS 13.0 软件分析。对各个实验分组数据进行正态分布检验和方差齐性检验。根据方差齐或不齐选用 LSD-t 检验或选用 Dunnett-t 检验,取 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

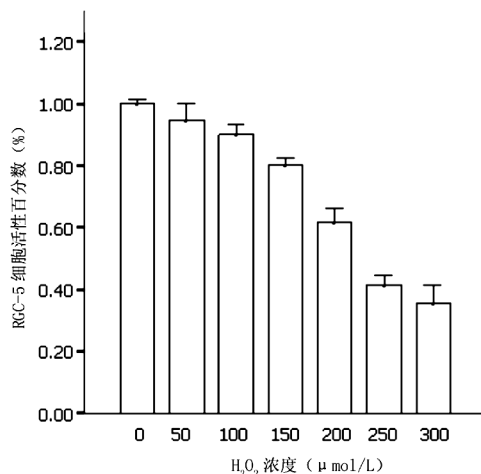


图 1 不同浓度 H_2O_2 对 SS 分化后 RGC-5 细胞的活性影响。

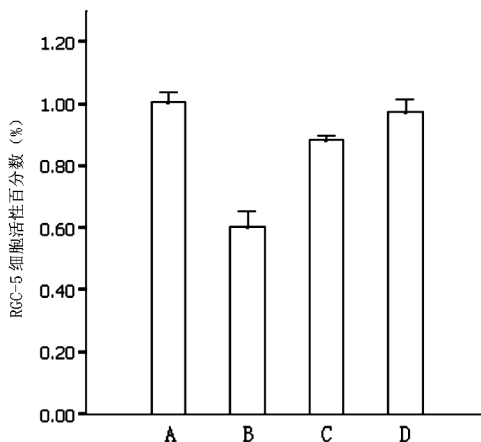


图 2 PEDF 对 H_2O_2 损伤的分化 RGC-5 细胞的活性影响 A:空白对照组;B:氧化损伤组;C:PEDF 保护组;D:PEDF 组。

2 结果

2.1 H_2O_2 对经 SS 分化的 RGC-5 细胞的活性影响 以经 SS 分化的 RGC-5 细胞为空白对照组,分别用终浓度为 50, 100, 150, 200, 250, 300 μ mol/L 的 H_2O_2 处理分化后的 RGC-5 细胞为实验组,结果发现 H_2O_2 明显降低分化后 RGC-5 细胞的活性,并且呈浓度依赖性 (图 1)。200 μ mol/L H_2O_2 使分化后 RGC-5 细胞的活性较空白对照组下降了 40%,本实验选择此浓度 H_2O_2 建立氧化应激损伤模型。经 H_2O_2 处理各组比空白对照组细胞活性降低,除了 50 μ mol/L H_2O_2 处理组与空白对照组无统计学差异外,其它各组与空白对照组比较均有统计学差异 ($P < 0.05$)。

2.2 PEDF 对 H_2O_2 处理的经 SS 分化的 RGC-5 细胞的活性影响 氧化损伤组 RGC-5 细胞活性较空白对照组降低 40% (图 2),有显著差异 ($P < 0.05$)。而 PEDF 保护组较氧化损伤组细胞活性增高 ($P < 0.05$),活性增高了约 30%。PEDF 组与空白对照组细胞活性在统计学上无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.3 PEDF 对 H_2O_2 处理的经 SS 分化的 RGC-5 细胞凋亡的影响 流式细胞术检测结果 (图 3) 表明:氧化损伤组 RGC-5 细胞凋亡百分数 (36.60% \pm 2.12%) 较空白对照组 (6.03% \pm 1.45%) 明显增加 ($P < 0.01$)。PEDF 保护组细胞凋亡百分数降低为 (9.36 \pm 1.61)%,与氧化损伤组比较差异具有显著性 ($P < 0.01$)。而 PEDF 组细胞凋亡百

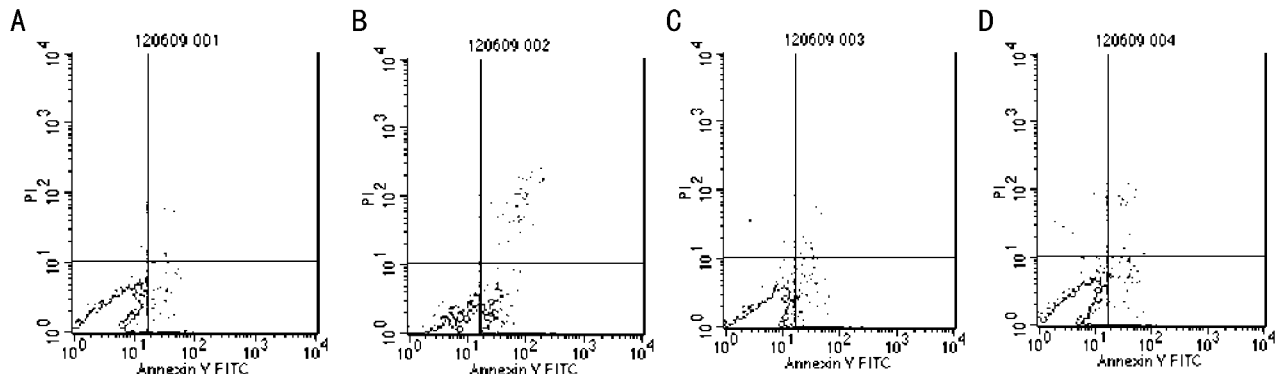


图3 PEDF对 H_2O_2 处理分化的RGC-5细胞凋亡的影响 A:空白对照组;B:氧化损伤组;C:PEDF保护组;D:PEDF组。

分数($6.11\% \pm 2.18\%$)与空白对照组比较,无统计学差异($P>0.05$),这说明单用PEDF对分化后RGC-5细胞凋亡无影响。

3 讨论

氧化应激能够诱导RGCs的死亡已经被很多实验所证明^[4,5]。本实验用不同浓度 H_2O_2 处理经过SS分化的RGC-5细胞,发现 H_2O_2 可造成该细胞的死亡,MTT结果显示RGC-5细胞活性随着 H_2O_2 浓度增高而降低,当 H_2O_2 浓度达到 $200\mu\text{mol/L}$ 时,细胞死亡达到正常组的40%。当 H_2O_2 浓度在 $50\mu\text{mol/L}$ 时,对RGC-5细胞损伤与正常对照组比较在统计学上无显著性差异。这可能由于生理条件下RGCs细胞内的 H_2O_2 浓度在 $0\sim 100\mu\text{mol/L}$ 。

对青光眼患者和正常对照组的视网膜组织切片,以DNA断裂的原位末端标记法染色发现青光眼患者中RGCs的死亡具有凋亡细胞的特征,同时染色阳性细胞数明显增多。本实验通过该探针对 H_2O_2 处理的经过分化的RGC-5细胞染色,进行流式检测发现RGC-5细胞死亡以凋亡为主,并且凋亡细胞数目比空白对照组明显增多。

Cao等^[6]发现PEDF可能保护视网膜神经元免受 H_2O_2 诱导的视网膜神经元损伤。Pang等^[7]发现PEDF能够减弱谷氨酸盐和血清剥夺所造成的RGCs凋亡。上述研究表明,PEDF可能对损伤所致的RGCs具有保护作用。然而PEDF是否能保护RGCs细胞免受 H_2O_2 诱导的细胞损伤并未被研究。本实验通过PEDF对 H_2O_2 诱导的经过SS分化的RGC-5细胞损伤的影响进行了初步研究。MTT及凋亡结果显示:PEDF对 H_2O_2 损伤分化后的RGC-5细胞具有保护作用,能增加细胞存活数量,减少细胞凋亡。

PEDF可由RPE细胞等多种细胞合成,并且广泛分布

于大脑、脊髓和眼睛,属于内源性神经营养因子,PEDF的减少可能和很多疾病的发生及发展有关。PEDF在人体内血清的浓度是 100ng/mL 。本实验的结果表明 100ng/mL PEDF对 H_2O_2 损伤的RGC-5细胞有明显的保护作用。这些结果说明PEDF不但作为一种内源性的神经保护剂,而且使用剂量在生理范围之内,相比其它神经保护剂安全性很高,与临床实验证实无效的外源性抗氧化剂相比,在治疗RGCs损伤性疾病中具有广阔的应用前景。

参考文献

- 1 Amano S, Yamagishi S, Inagaki Y, *et al.* Pigment epithelium-derived factor inhibits oxidative stress-induced apoptosis and dysfunction of cultured retinal pericytes. *Microvasc Res* 2005;69(1-2):45-55
- 2 Banumathi E, Sheikpranbabu S, Haribalaganesh R, *et al.* PEDF prevents reactive oxygen species generation and retinal endothelial cell damage at high glucose levels. *Exp Eye Res* 2010; 90(1): 89-96
- 3 Li J, Dong Z, Liu B, *et al.* Hypoxia induces beta-amyloid in association with death of RGC-5 cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;410(1):40-44
- 4 Maher P, Hanneken A. Flavonoids protect retinal ganglion cells from oxidative stress-induced death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(12): 4796-4803
- 5 Maher P, Hanneken A. The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(2):749-757
- 6 Cao W, Tombran-Tink J, Chen W, *et al.* Pigment Epithelium-Derived Factor Protects Cultured Retinal Neurons Against Hydrogen Peroxide-Induced Cell Death. *J Neurosci Res* 1999;57(6):789-800
- 7 Pang IH, Zeng H, Fleenor DL. Pigment epithelium-derived factor protects retinal ganglion cells. *BMC Neurosci* 2007;8(1):11