

不同光照形式对豚鼠视网膜色素上皮细胞 TGF- β_2 表达的影响

覃江圆¹, 王超英², 刘迎庆², 靳 韬², 仝春梅²

作者单位:¹(530001)中国广西壮族自治区南宁市,武警广西总队医院五官科;²(050082)中国河北省石家庄市,白求恩国际和平医院眼科

作者简介:覃江圆,硕士,住院医师,研究方向:近视。

通讯作者:王超英,硕士,主任医师,教授,主任,研究方向:高度近视的临床与基础研究、视觉电生理的临床应用. wanghc191@sina.com

收稿日期:2012-07-06 修回日期:2012-09-01

Effect of different forms of light on TGF- β_2 expression of guinea pig retinal pigment epithelial cells *in vitro*

Jiang-Yuan Qin¹, Chao-Ying Wang², Ying-Qing Liu², Tao Jin², Chun-Mei Tong²

¹Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, General Hospital of Guangxi Armed Police Corps, Nanning 530001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Department of Ophthalmology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China

Correspondence to: Chao-Ying Wang, Department of Ophthalmology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, Hebei Province, China. wanghc191@sina.com

Received: 2012-07-06 Accepted: 2012-09-01

Abstract

• AIM: To investigate the effects of different forms of light on the expression of TGF- β_2 of guinea pig retinal pigment epithelial (RPE) cells.

• METHODS: Ten two weeks old healthy guinea pigs, RPE cells were cultured conventionally and divided into four groups: focused light group, defocused light group, parallel light group and the control group. The first three groups were exposed to the focused light, defocused light (passed through lens from parallel light) and the parallel light, the control group was untreated. The level of the expression of TGF- β_2 protein and TGF- β_2 mRNA was measured by immunocytochemistry and real-time fluorescence quantitative chain reaction 24 hours after light exposure and the pattern-effect relations were explored. The data were analyzed by means of analysis of variance (ANOVA).

• RESULTS: The level of both TGF- β_2 protein and TGF- β_2 mRNA were significantly increased in the focused light exposed group compared with the other groups, followed with the defocused group ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: It was suggested that different forms of light can affect the expression of TGF- β_2 in guinea pig RPE cells, and was most obvious in the focused light exposed group.

• KEYWORDS: light exposure; focused light; defocused light; retinal pigment epithelium cells; transforming growth factor β_2 ; real-time quantitative PCR

Citation: Qin JY, Wang CY, Liu YQ, et al. Effect of different forms of light on TGF- β_2 expression of guinea pig retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012; 12 (10): 1851-1854

摘要

目的:探讨不同光照形式对豚鼠视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞表达转化生长因子- β_2 (transforming growth factor β_2 , TGF- β_2)的影响。

方法:幼年健康豚鼠(2周龄)10只,体外培养RPE细胞,传代、鉴定后,将细胞分为聚焦光组、离焦光组、平行光组和空白对照组,前3组分别接受聚焦光、离焦光(均为将平行光经透镜转化)和平行光照射,空白对照组不接受照射。于照射后24h采用免疫细胞化学法、实时荧光定量PCR法(real-time fluorescence quantitative PCR, RTFQ-PCR)检测细胞中TGF- β_2 及TGF- β_2 mRNA的表达,分析不同光照形式与效应的关系。

结果:免疫细胞化学法显示各组TGF- β_2 表达均为阳性,病理VISTA图像分析软件测量单位面积中平均光密度(optical density, OD)值进行半定量分析,聚焦光组明显高于其它各组,组间比较有统计学差异($F = 11.08, P < 0.05$); RTFQ-PCR法显示,聚焦光组TGF- β_2 mRNA表达水平较其它各组明显增加,组间比较有统计学差异($F = 133.01, P < 0.05$)。

结论:不同形式光线可影响豚鼠RPE细胞TGF- β_2 表达,以聚焦光最明显。

关键词:光照;聚焦光;离焦光;视网膜色素上皮细胞;转化生长因子- β_2 ;实时荧光定量PCR

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.10.09

引用:覃江圆,王超英,刘迎庆,等.不同光照形式对豚鼠视网膜色素上皮细胞TGF- β_2 表达的影响.国际眼科杂志2012;12(10):1851-1854

0 引言

近视是目前世界上发病率最高的眼病之一,随着人类文明的进步,近视的发病率呈不断上升的趋势,发病年龄也趋向低龄化。近视的发病机制是目前眼科领域的研

究热点。最新调查表明,中国小学生近视发生率为13.7%,中学生为42.9%,而大学生中近视发生率达69.7%^[1]。青少年近视以单纯轴性近视为主,如果能阻止眼轴延长就可以防止青少年近视的发生。

视网膜是与近视的发生密切相关的眼组织之一,其色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞可分泌多种细胞因子和生长因子,与近视相关的有碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)和转化生长因子 β_2 (transforming growth factor- β_2 , TGF- β_2)^[2]等。对近视动物模型的研究结果显示,在近视发生时TGF- β_2 含量升高而bFGF含量下降^[3],TGF- β_2 被认为是近视信号传导途径中的启动因子。研究表明,不同波长的有色光^[4,5]、闪烁光^[6]可诱导动物近视的形成,不同波长的色光对体外培养的人胚RPE细胞的分泌功能也有影响,在不同波长的色光照射下,其分泌的bFGF和TGF- β 随时间的波动曲线不一样^[7];各种有色光线下培养24h后RPE细胞中TGF- β mRNA的表达量不同。本实验设计采用聚焦光线和离焦光线对RPE细胞进行照射,观察不同的光照形式对RPE细胞分泌产生的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 已脱离母乳喂养的健康幼年豚鼠(2周龄)10只,雌雄不限,由河北医科大学实验动物养殖场提供。取出眼球分离RPE细胞,培养、传代、鉴定。主要仪器和试剂:超净工作台,北京六一仪器厂;倒置相差显微镜(XDS-1B),重庆光学仪器厂;光学显微镜,日本Olympus公司;SD200型冷光深部手术灯,中国上海医疗器械股份有限公司;DE-3351数位式照度计,中国台北得益工业仪器有限公司;PCR System(ABI7300),美国PE公司;DMEM培养基,美国Gibco公司;小牛血清、胎牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司;II型胶原酶、胰蛋白酶,美国Sigma公司;兔抗鼠keratin(角蛋白)、Vimentin(波形蛋白)、Desmin(肌动蛋白)、S-100免疫组化试剂盒,北京博奥森生物技术有限公司;抗兔TGF- β_2 免疫组化试剂盒,北京博奥森生物技术有限公司;RTFQ-PCR试剂盒,美国Promega公司。

1.2 方法

1.2.1 豚鼠 RPE 细胞培养和传代与鉴定 采用酶消化法分离豚鼠 RPE 细胞,以 2×10^5 /mL 密度接种于6孔板,在37℃,50mL/L CO₂及饱和湿度培养箱中培养,2~3d换液一次,细胞接近融合时按1:2或1:3传代。细胞鉴定角蛋白阳性。取生长良好的第3~5代细胞,分为聚焦光组、离焦光组、平行光组和空白对照组,前三组分别接受不同形式的光线照射。

1.2.2 RPE 细胞光照模型 自制一个大小为10cm×15cm×16.7cm的长方形木盒作为光照器,顶部开3个圆孔,其中两个直径为6cm,大小与球镜片一致,另外一个圆孔直径为3cm。用SD200型冷光深部手术灯进行悬照。将屈光度分别为+3.00D,+9.00D的球镜片放置于直径6cm圆孔上,平行光通过镜片后焦点分别形成于细胞下方和细胞上方,落到细胞上的光线即为聚焦光和离焦光,其正下方分别放置聚焦光组、离焦光组细胞。直径3cm圆孔上无球镜片,下方放置平行光组细胞。空白对照组不接受光照。光线经过镜片后在细胞水平上形成的

光斑直径均为3cm,同一水平面的光照强度相同,为300Lux,照射时间均为30min。光照在暗室中进行,无自然光干扰,光照器内壁涂黑避免光线反射,光照前各组细胞吸掉大部分培养基以避免液体折光的影响。光源发出的光线色温为4000K±500K,低于自然光的4800K,不会由于产热而干扰实验结果。光照器置于敞开的水浴箱中,使光照期间同一水平温度变化在36.5℃~37.2℃之间。

1.2.3 免疫组化检测 RPE 细胞中 TGF- β_2 的表达 第3~5代RPE细胞按 1×10^5 接种于预置在培养皿中的盖玻片上,待细胞贴壁后换用含10mL/L胎牛血清的培养液。将细胞分为聚焦光组、离焦光组、平行光组和空白对照组,前三组分别接受聚焦光、离焦光和平行光照射。照射后加入培养基继续培养,24h后取出玻片4%多聚甲醛室温固定20min,冲洗、晾干。按试剂盒提供步骤进行标本染色,一抗为抗TGF- β_2 ,阴性对照组用PBS代替一抗。DAB显色,中性树脂封片,显微镜观察。胞质呈棕黄色染色者为TGF- β_2 表达阳性细胞。用病理VISTA图像分析软件测量单位面积中阳性颗粒平均光密度值(optical density, OD),OD值越大说明阳性程度越强。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 RPE 细胞 TGF- β_2 mRNA 的表达 将第3~5代RPE细胞按 1×10^9 接种于玻底直径为2cm的玻底培养皿上,照射后24h采集细胞。采用Trizol一步法提取细胞总RNA。用756型紫外分光光度计测量OD₂₆₀/OD₂₈₀比值,检测RNA的纯度。根据Genebank上查到的豚鼠TGF- β_2 基因组全序列设计引物:(1)TGF- β_2 引物序列:上游:5'-CCCAGACTGGTTGTCTTTGA-3';下游:5'-GCCGAGCGTGTATCTTTGCT-3';(2)内参GAPDH引物序列:上游:5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3';下游:5'-GCTTCACCACCTTCTTGATG-3';PCR热循环参数:96℃ 4min,然后三步反应:94℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 30s,进行40个循环,于每个循环第3步(72℃ 30s)收集荧光信号。扩增完毕后,进入结果分析界面,PCR仪自动生成荧光值曲线图。以GAPDH为内参基因,与对照组相比,将C_T值进行转换得到目的基因表达的相对定量(relative quantification, RQ)值,将RQ值用于统计分析。

统计学分析:采用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计分析。各组数据均为计量资料,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异行完全随机单因素方差分析,取检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞培养及鉴定结果 原代培养:刚分离下的豚鼠RPE细胞为圆形,胞体透亮,含一定量黑色素颗粒,镜下看不清胞核。48~72h细胞开始贴壁,伸出伪足,变成扁平不规则多角形或梭形,可见清晰透明的圆形细胞核(图1),5~6d迅速分裂增殖,约7~9d细胞基本单层融合(图2)。传代细胞生长活跃4~6d后达融合状态。RPE细胞在体外不能合成黑色素颗粒,随着传代次数的增加,胞浆内的黑色素颗粒逐渐减少,4~5代细胞内无明显色素颗粒。传代培养:传代接种细胞密度为 1×10^5 /mL,约4h左右贴壁,按1:2传代,4~6d传代一次。细胞免疫组织化学法鉴定显示,RPE细胞Keratin染色强阳性(图3),胞浆内可见棕黄色阳性反应产物。

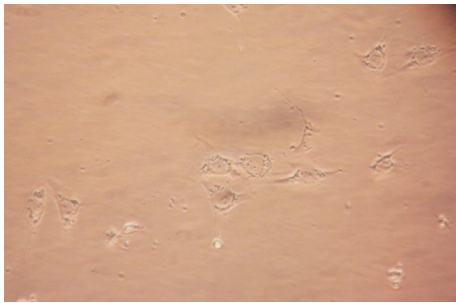


图1 刚贴壁的 RPE 细胞 ($\times 200$)。

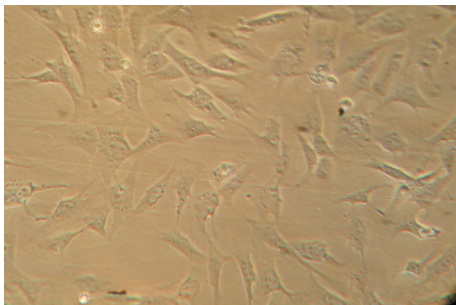


图2 融合的 RPE 细胞 ($\times 400$)。

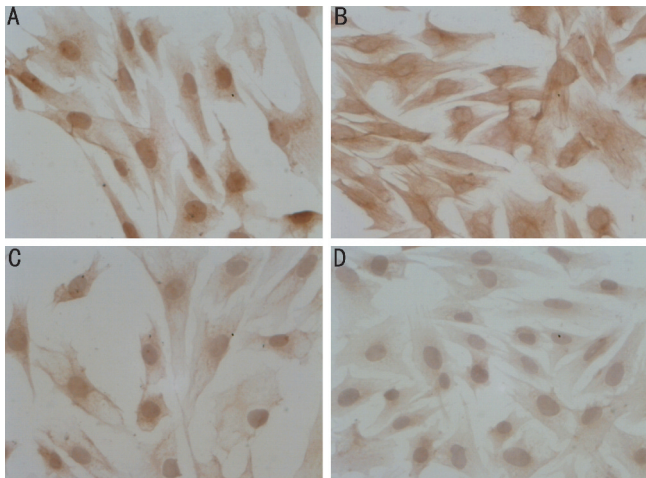


图3 免疫组化染色鉴定 RPE 细胞 ($\times 400$) A:Keratin(++) ; B:Vimentin(+); C:Desmin(-); D:S-100(-)。

2.2 免疫细胞化学测定 RPE 细胞中 TGF- β_2 的表达 RPE 细胞胞浆和胞核均有 TGF- β_2 表达 (图 4)。经图像分析, 聚焦光组、离焦光组、平行光组和空白对照组的 OD 值分别为 0.38 ± 0.01 , 0.36 ± 0.00 , 0.34 ± 0.02 和 0.34 ± 0.01 , 差异有统计学意义 ($F = 11.08$, $P < 0.05$), 光照形式对 TGF- β_2 的表达有影响, 其中聚焦光组 OD 值明显高于其它, 其次为离焦光组。多重比较结果显示, 平行光组和空白对照组 TGF- β_2 的表达变化无明显统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 RTFQ-PCR 测定 RPE 细胞 TGF- β_2 mRNA 的表达 RPE 细胞总 RNA 经 10g/L 琼脂糖凝胶电泳, 28S 和 18S 条带清晰, $28S : 18S \approx 2:1$, 5S 条带较弱、且弥散, 表明所提取的 RNA 完整, 无明显降解。OD₂₆₀/OD₂₈₀ > 1.8, 在 1.8 ~ 2.0 之间, 表明提取的 RNA 纯度较高, 污染很少, 可用于后续反转录反应 (图 5)。聚焦光组、离焦光组、平行光组和空白对照组 RPE 细胞 TGF- β_2 mRNA 表达量的 RQ 值分别是 4.58 ± 0.19 , 2.34 ± 0.16 , 1.78 ± 0.09 和 0.92 ± 0.05 , 组间比较有显著统计学差异 ($F = 133.01$, $P < 0.05$, 图 6)。

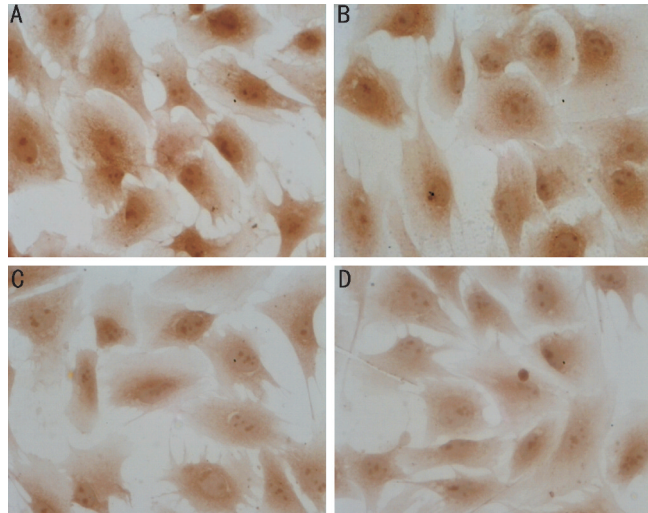


图4 各组 RPE 细胞 TGF- β_2 的表达 A:聚焦光组; B 离焦光组; C 平行光组; D 空白对照组。

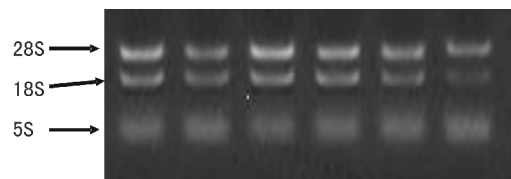


图5 RPE 细胞总 RNA 凝胶电泳图。

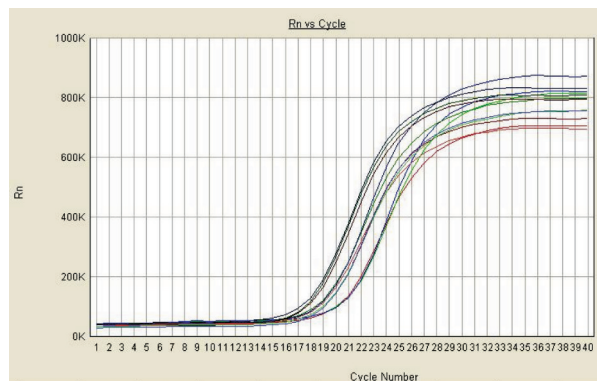


图6 各组 RPE 细胞 TGF- β_2 mRNA 表达荧光曲线图。

3 讨论

3.1 RPE 细胞及 TGF- β_2 的特性 RPE 层位于视网膜神经上皮层之后、脉络膜之前, 由胚胎视泡的神经外胚层细胞高度分化而来的单层 RPE 细胞排列组成, 在维持神经视网膜功能及保持视力方面有着至关重要的功能^[8]。RPE 细胞的主要作用有: (1) 吞噬作用: 吞噬光感受器细胞外节膜盘, 保证视觉细胞外节的更新及维持正常视觉; (2) 转运作用: 传递光感受器进行新陈代谢所需的物质, 从脉络膜毛细血管向光感受器转运液体、盐及代谢物质; (3) 保证视网膜成像: RPE 细胞中的色素颗粒可减少来自巩膜的反射光, 捕捉光传导过程中未被光感受器的光子, 防止光的散射和反射, 使视网膜成像清晰; (4) 分泌作用: 分泌多种生物活性物质, 包括神经递质、激素、生长因子^[9], 影响眼球的生长和发育、维持眼内的免疫状态。

多数学者认为, 在近视形成的过程中, 近视信号首先作用于 RPE 细胞, 产生近视相关因子, 通过与相应受体结合, 作用于视网膜、脉络膜及巩膜的效应细胞, 调控巩膜的生长代谢状态, 控制近视的发生、发展^[10]。在 RPE 细胞分泌的众多生物活性因子中, TGF- β_2 是目前研究较

多的近视相关因子之一。Seko等^[2]发现TGF- β_2 在形觉剥夺性近视眼的RPE、脉络膜和巩膜上明显增高。因此本实验以RPE细胞为实验对象,观察不同光照形式对RPE细胞分泌TGF- β_2 的影响。

3.2 光照与近视的关系 脊椎动物刚出生时,眼球处于远视状态。伴随眼球的生长,屈光状态发生改变。正视化被认为是在外界视觉环境的刺激下,角膜和晶状体的折射力及其他屈光介质积极与眼轴长度协调发展的过程。长期大量的近距离工作,神经递质如多巴胺、血管活性肠肽、胰高血糖素的异常分泌以及不正确的光刺激会干扰正视化过程,导致近视^[11]。不正确的视觉信号输入是影响眼球和视觉系统发育的关键因素^[12]。陈冬红^[7]用照度相同、波长分别为772,590和480nm的单色光照射体外培养的人胚RPE细胞24~96h,光照组RPE细胞的生长速度均较对照组缓慢,其中蓝光组细胞生长最慢,认为可能是由于不同色光的能量不同而造成的。照射后不同时间TGF- β_2 和bFGF的分泌量也是不同的,蓝光照射组TGF- β_2 和bFGF表达量最低,说明不同色光可直接影响RPE细胞的分泌。本实验设计用聚焦光线和离焦光线对RPE细胞进行照射,观察不同的光照形式是否也会对RPE细胞的分泌产生影响。

3.3 相关实验条件的选择 目前在光照体外培养RPE细胞的研究中,多是观察光照对RPE细胞的光损伤,所用光照度较大,而在不损伤RPE细胞的情况下观察光照对RPE细胞分泌影响的研究较少,且多用不同波长的有色光。本实验通过体外培养幼年豚鼠RPE细胞,采用较低照度的可见光及较短的照射时间,观察光照对体外RPE细胞的分泌影响。

周咏东等^[13]发现照度为500Lux的可见光已经可以造成RPE细胞的轻度损伤,超过500Lux后,RPE细胞的凋亡和坏死显著增加,因此本实验的照度至少应该是在500Lux以下。而国家规定,书写、阅读时写字台台面的照度应在300~500Lux,说明人类在近距离用眼时局部环境照度是300~500Lux,那么进入人眼的照度会是多少?崔浩等^[14]以照度计评测兔眼组织的透光性能,结果表明新鲜离体角膜和晶状体的光衰减率加起来平均约为40%。如果以这一衰减率计算的话,300~500Lux的光照透过眼组织进入眼内,落到视网膜上至少是180~300Lux。因此本实验将300Lux作为光照度水平,更接近活体RPE细胞在近距离用眼时所接受的照度,又能保证不会损伤RPE细胞。光照是在培养箱外进行,由于还要继续培养,离开培养箱的时间不宜过长,因此本实验将光照时间定为30min。

3.4 本实验的发现 免疫细胞化学结果显示,空白对照组RPE细胞的胞核和胞浆均有TGF- β_2 表达,RT-PCR结果中,空白对照组也检测到TGF- β_2 mRNA的表达,再次证实RPE细胞能分泌TGF- β_2 。接受不同形式光照后,免疫细胞化学发现,TGF- β_2 的表达是聚焦光组>离焦光

组>平行光组=空白对照组,而RTFQ-PCR检测TGF- β_2 mRNA的表达是聚焦光组>离焦光组>平行光组>空白对照组,两种检测方法的结果具有一致性,均表明聚焦光组和离焦光组的促进作用较其它各组明显,说明光线在RPE细胞上的不同聚焦状态能对其分泌产生影响。

近视相关因子已经发现了若干种,得到诸多研究证实的主要有TGF- β_2 ,bFGF和HGF,而远视相关因子目前尚未见报道。我们推测,光学离焦在影响屈光状态发展时,是否具有相同的启动因子,只是由于其浓度变化的不同而信号传导通路不同,从而对眼球的生长发育产生了截然相反的影响。另外,光线在RPE细胞上的聚焦形式对其分泌活动产生影响,是否说明RPE细胞对光线的入射角度很敏感,这些推测都有待于进一步研究证实。本实验初步探讨了不同光照形式对体外培养豚鼠RPE细胞的分泌影响,只对TGF- β_2 进行了研究,对其它近视相关因子是否也会产生影响,还有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Xie HL, Xie ZK, Ye J, et al. Analysis of correlative factors and prevalence on China's youth myopia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2010;90(7): 439-442
- 2 Seko Y, Tanaka Y, Tokoro T. Apomorphine inhibits the growth-stimulating effect of retinal pigment epithelium on scleral cells *in vitro*. *Cell Biochem Func* 1997;15(3): 191-196
- 3 Rohere B, Stell WK. Basic fibroblast growth factor (bFGF) and transforming growth factor beta (TGF-beta) act as stop and go to modulate postnatal ocular growth in the chick. *Exp Eye Res* 1994;58(5): 553-562
- 4 胡敏.长波长单色光诱导豚鼠近视模型的建立及视网膜视蛋白表达研究.复旦大学博士学位论文 2007
- 5 钱一峰,戴锦晖,刘睿,等.530nm单色光诱导豚鼠近视眼模型的建立.中国实验动物学报 2009;17(6): 401-405
- 6 王红,庄康,陶远,等.频闪光对发育期豚鼠近视的影响.环境与健康杂志 2007;24(6): 388-390
- 7 陈冬红.视网膜色素上皮细胞在有色光信号传导中的作用.复旦大学博士学位论文 2003
- 8 Bharti K, Nguyen MT, Skuntz S, et al. The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye. *Pigment Cell Res* 2006;19: 380-394
- 9 Hollborn M, Tenckhoff S, Seifert M, et al. Human retinal epithelium produces and responds to placenta growth factor. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244(6): 732-741
- 10 胡诞宁, McCormick SA. 视网膜色素上皮--脉络膜在近视发病中的作用. 眼视光学杂志 2000;2(4): 197-200
- 11 Choo V. A look at slowing progression of myopia. *Lancet* 2003;361(9369): 1622-1623
- 12 Wallman J, Winawer J. Homeostasis of eye growth and the question of myopia. *Neuron* 2004;43(4): 447-468
- 13 周咏东,严密,张军军.可见光照对培养的人视网膜色素上皮细胞凋亡的影响.中华眼底病杂志 2002; 18(3):227-230
- 14 崔浩,张丽琼,张威.照度计在眼部组织透光性测量中应用的初步研究.伤残医学 2005;13(4):31