

吞噬负荷量的感光细胞外节段对老年牛 RPE 细胞凋亡的诱导

张娟美^{1,2}, 吴建峰³, 毕宏生³

基金项目:中国山东省科技发展计划项目(No. 2011GGH21835; 2011GGB14097); 中国山东省医药卫生科技发展计划(No. 2011HD014)

作者单位:¹(250002) 中国山东省济南市, 山东中医药大学;
²(276000) 中国山东省临沂市人民医院博爱眼科;
³(250002) 中国山东省济南市, 山东中医药大学附属眼科医院 山东中医药大学眼科研究所

作者简介:张娟美, 在读博士研究生, 主治医师, 研究方向: 中西医结合眼科。

通讯作者:毕宏生, 主任医师, 研究方向: 中西医结合治疗白内障及屈光不正. hongshengbi@126.com

收稿日期: 2014-05-22 修回日期: 2014-10-28

Effect of phagocytic load on apoptosis of cultured aged bovine retinal pigment epithelium

Juan-Mei Zhang^{1,2}, Jian-Feng Wu³, Hong-Sheng Bi³

Foundation items: Shandong Province Science and Technology Development Program, China (No. 2011GGH21835; 2011GGB14097); Shandong Province Medicine and Health Science and Technology Development Plan, China (No. 2011HD014)

¹Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250002, Shandong Province, China; ²Boai Ophthalmology, Linyi People's Hospital, Linyi 276000, Shandong Province, China; ³Affiliated Eye Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250002, Shandong Province, China

Correspondence to: Hong-Sheng Bi. Affiliated Eye Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250002, Shandong Province, China. hongshengbi@126.com

Received: 2014-05-22 Accepted: 2014-10-28

Abstract

• **AIM:** To evaluate the effect of phagocytic load on apoptosis of cultured aged bovine retinal pigment epithelium (RPE) cells.

• **METHODS:** The third generation of cultured aged bovine RPE cells was cultured respectively with culture medium, containing 200 μ g/mL photoreceptor outer segment (POS) and 400 μ g/mL POS. Then the apoptosis rates of RPE cells after 24, 48 and 96h were detected with flow cytometry instrument (AnnexinV/PI double staining).

• **RESULTS:** In blank control group, the apoptosis rates were very low at different time. After RPE cells were cultured with culture medium containing 200 μ g/mL POS for 24h, the apoptosis rate including early apoptosis and late apoptosis was 1.73%. As time going, the apoptosis rate increased rapidly and reached 65.92% after 96h.

After RPE cells were cultured with culture medium containing 400 μ g/mL POS for 24h, the apoptosis rate was 4.02%. And it reached 91.34% significantly after 96h.

• **CONCLUSION:** Phagocytic loads can induce the apoptosis of RPE depending the time and dose.

• **KEYWORDS:** retinal pigment epithelium; phagocytosis load; phagocytic outer segment; apoptosis

Citation: Zhang JM, Wu JF, Bi HS. Effect of phagocytic load on apoptosis of cultured aged bovine retinal pigment epithelium. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(11):1935-1938

摘要

目的: 了解吞噬负荷下体外培养老年牛视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞的凋亡情况。

方法: 三代体外培养老年牛 RPE 中分别加入培养液、含 200 μ g/mL 感光细胞外节段 (photoreceptor outer segment, POS) 的培养液、400 μ g/mL POS 培养液, 分别于 24, 48h 和 96h 用流式细胞仪 (Annexin V/PI 双染法) 检测细胞的凋亡水平。

结果: 在各个时间点, 空白对照组的 RPE 凋亡比例极低, 200 μ g/mL POS 组 24h 凋亡比例 (包括早期凋亡和晚期凋亡) 为 1.73%; 随着时间延长, 凋亡比例增加明显, 到 96h 时达到 65.92%。而 400 μ g/mL POS 组 24h 凋亡比例为 4.02%, 到 96h 时则高达 91.34%。

结论: 吞噬负荷量的感光细胞外节段可以诱导体外培养老年牛 RPE 的凋亡, 并且呈现剂量和时间依赖方式。

关键词: 视网膜色素上皮细胞; 吞噬负荷; 感光细胞外节段; 凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.11.05

引用: 张娟美, 吴建峰, 毕宏生. 吞噬负荷量的感光细胞外节段对老年牛 RPE 细胞凋亡的诱导. 国际眼科杂志 2014; 14 (11):1935-1938

0 引言

视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞位于感光细胞和 Bruch's 膜之间, 有许多重要的功能, 比如: 生理黏附作用、吞噬感光细胞外节段 (photoreceptor outer segment, POS)、物质转运、免疫功能以及参与维生素 A 的代谢等。其中最为重要的是吞噬及消化代谢 POS, 此功能对于维持感光细胞的功能及视功能具有重大意义。

在某些类型人视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 以及 RP 动物模型中发现 RPE 吞噬功能障碍, 同时伴有胞外物质的堆积或者某些脂质和蛋白水平的变化^[1,2]。还有随着年龄的增长, RPE 对 POS 的吞噬及消

化功能降低^[3,4],细胞内脂褐素、细胞外玻璃膜疣以及感光细胞外基质(interphotoreceptor matrix, IPM)的沉积,最终导致老年性黄斑病变(age-related macula degeneration, AMD)的发生及视力的损害。而目前研究发现,视网膜变性疾病与RPE凋亡关系密切。本研究主要观察吞噬负荷量的POS对RPE凋亡的影响,观察体外培养老年牛RPE在加入不同浓度的POS时,在不同时间点的凋亡情况。

1 材料和方法

1.1 材料

牛眼球来自于屠宰场新鲜屠宰的老年牛。主要的试剂包括:鼠抗牛视紫红质(rodopsin)单克隆抗体(购于Chemicon公司),F₁₂培养液、Trypsin(购于Gibco公司),胎牛血清(购于PAA),蔗糖、氨基乙磺酸、考马斯亮兰、荧光素FITC、台盼兰、PI(购于Sigma公司),鼠抗牛CK(MNF116)单克隆抗体、鼠抗牛GFAP(sc-33673)多克隆抗体以及鼠抗牛S-100(M42701R)单克隆抗体(购于Santa-Cruz公司)。荧光显微镜Leica DM3000及其软件分析系统Leica QWin Colour(德国Leica公司)。

1.2 方法

1.2.1 RPE的分离和培养

将新鲜取出的牛眼球去除筋膜组织,浸入含有80万U青霉素的生理盐水中2h,更换消毒液再浸泡30min,然后沿锯齿缘将眼球剪开,弃去前节和玻璃体,将视网膜取出之后,用D-Hanks充分冲洗眼杯,去除残留的视网膜组织。在眼杯中加入2.5g/L胰酶,常温下消化15min。加入含100mL/L胎牛血清的F₁₂培养液中和,轻轻刮取RPE细胞,收集细胞悬液,1000r/min离心5min,细胞计数,用含有200mL/L胎牛血清的F₁₂培养液调整细胞浓度为1×10⁵个/mL接种于培养瓶,置于37℃,50mL/L CO₂培养箱中。之后换液和传代用含100mL/L胎牛血清的F₁₂培养液。根据细胞的生长曲线,实验选择第3代细胞。

1.2.2 RPE的免疫组织化学鉴定

RPE细胞接种到置有10mm×10mm玻璃片的24孔板中。40g/L多聚甲醛室温下固定15~20min。然后分别用角蛋白(CK)的抗体、S-100抗体、GFAP抗体对其进行免疫组织化学鉴定。

1.2.3 POS的制备

方法参照文献[5]。将新鲜取出的视网膜组织,剪成小的组织碎片,置于含200g/L蔗糖,65mmol/L NaCl,1mmol/L MgCl₂,10mmol/L葡萄糖,5mmol/L氨基乙磺酸的20mmol/L Tris-HCl(pH=7.4)缓冲液中轻轻振荡1min,1000r/min离心5min。取上清液,置于上述的Tris-HCl(pH=7.4)缓冲液中,15000r/min离心2min,取上清,重新置于上述的缓冲液中,4℃条件下15000r/min离心30min,弃去上清,沉淀即为POS。将POS悬浮在含有0.1mmol/L NaCl和25g/L蔗糖的10mmol/L Na-磷酸盐缓冲液(pH=7.2)中,使用考马斯亮兰-标准BCA蛋白分析仪计算POS的浓度。调整浓度为500μg/mL,相当于2×10⁸个POS/mL,将其分装到1mL的EP管中,置于-80℃冰箱待用。

1.2.4 POS的鉴定

对上述方法制备出来的POS进行免疫组织化学鉴定。将POS的悬浮液置于超速离心机,12000r/min离心25min。弃去大部分上清,将其吹打混匀,然后涂到涂有100g/L多聚赖氨酸的载玻片上,室温下晾干。40g/L多聚甲醛固定40min。PBS冲洗3遍。60℃烤5min,置于-20℃冰箱中备用。用视紫红质(Rhodopsin)、GFAP、CK以及S-100的抗体进行免疫组织化学鉴定。

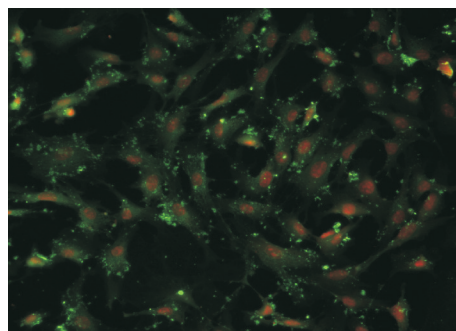


图1 在加入FITC-POS 4h后可见RPE细胞内有大量标记有FITC的POS绿色荧光颗粒。

1.2.5 POS的FITC荧光标记

将冻存的POS于4℃条件下解冻,15000r/min离心25min,弃去上清,将POS沉淀重新悬浮于0.1mol/L碳酸氢钠缓冲液(pH=9.0),加入FITC使其浓度为1mg/mL,黑暗中1h^[5]。15000r/min离心25min,弃去上清,PBS(pH=7.2)冲洗两遍,将POS重新悬浮在含50mL/L胎牛血清的F₁₂培养液中,调整浓度为50μg/mL,相当于2×10⁷个POS/mL吞噬实验备用。

1.2.6 RPE对POS的吞噬

第二代体外培养的老年牛RPE细胞接种到置有10mm×10mm玻璃片的24孔板中,待其生长至80%~90%融合状态时进行吞噬实验。方法按照文献[5]将50μL FITC-POS悬浮液加入其中。将其置于37℃,50mL/L CO₂培养箱中孵育。于第4h用PBS-CM(PBS内含2g/L MgCl₂和0.2mol/L CaCl₂)充分冲洗,将游离的POS去除,将玻璃片置于40g/L多聚甲醛中固定15min。PBS冲洗干净,加入含有2μg/mL PI的PBS 20min染核,然后采集图像。Leica DM3000荧光显微镜及其Leica PW4000软件系统进行拍摄图片。

1.2.7 吞噬负荷实验

老年牛RPE生长至80%~90%融合状态时,对照组中加入含有100mL/L胎牛血清的F₁₂培养液,实验组一组中加入内含有200μg/mL POS和100mL/L胎牛血清的F₁₂培养液,另一组中加入内含有400μg/mL POS和100mL/L胎牛血清的F₁₂培养液,将其置于37℃,50mL/L CO₂培养箱中。分别于24,48,96h将细胞消化进行流式细胞仪检测凋亡。

1.2.8 凋亡的检测

采用Annexin V/PI双染色法。细胞用含有0.2mL/L DETA的0.5g/L胰酶进行消化。镜下观察细胞的形态,当大部分细胞变成圆形时就要中止消化,尽量减少胰酶对细胞的损伤,以免影响凋亡的检测。细胞离心,计数,冷PBS冲洗一遍,离心,弃上清,加入100μL结合缓冲液调整细胞浓度为1×10⁶个/mL,再依次加入5μL FITC-Annexin V和10μL PI。避光15min后,加入400μL PBS,流式细胞仪分析。实验重复3次。

统计学分析:计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计资料采用SPSS 20.0进行分析。空白对照组、200μg/mL POS组与400μg/mL POS组之间,以及不同时间点之间的凋亡比例采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 老年牛RPE对POS的吞噬

从吞噬实验中可见,RPE细胞形态正常呈多边形或者梭形,细胞核呈红色,胞内可见大量绿色荧光颗粒(图1),说明正常情况下体外培养老年牛RPE细胞吞噬POS的功能比较正常。

表1 各组老年牛 RPE 在不同时间点 Annexin V/PI 流式细胞仪检测结果

 $(\bar{x} \pm s, \%)$

| 组别 | 24h | | | 48h | | | 96h | | |
|----------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Annexin V (-)/PI(+) | Annexin V (+)/PI(-) | Annexin V (+)/PI(+) | Annexin V (-)/PI(+) | Annexin V (+)/PI(-) | Annexin V (+)/PI(+) | Annexin V (-)/PI(+) | Annexin V (+)/PI(-) | Annexin V (+)/PI(+) |
| | (死亡细胞) | (早期凋亡) | (晚期凋亡) | (死亡细胞) | (早期凋亡) | (晚期凋亡) | (死亡细胞) | (早期凋亡) | (晚期凋亡) |
| 空白对照组 | 0.59±0.03 | 0.10±0.01 | 0.32±0.02 | 0.84±0.09 | 0.49±0.01 | 0.56±0.01 | 1.07±0.09 | 2.05±0.08 | 2.11±0.10 |
| 200μg/mL POS 组 | 2.19±0.08 | 0.22±0.08 | 1.51±0.05 | 8.33±0.11 | 8.80±0.10 | 3.96±0.15 | 0.99±0.08 | 60.35±3.99 | 5.57±0.06 |
| 400μg/mL POS 组 | 0.80±0.005 | 2.00±0.01 | 2.02±0.04 | 1.64±0.09 | 25.11±1.33 | 5.86±0.07 | 0.63±0.008 | 85.01±5.75 | 6.33±0.07 |

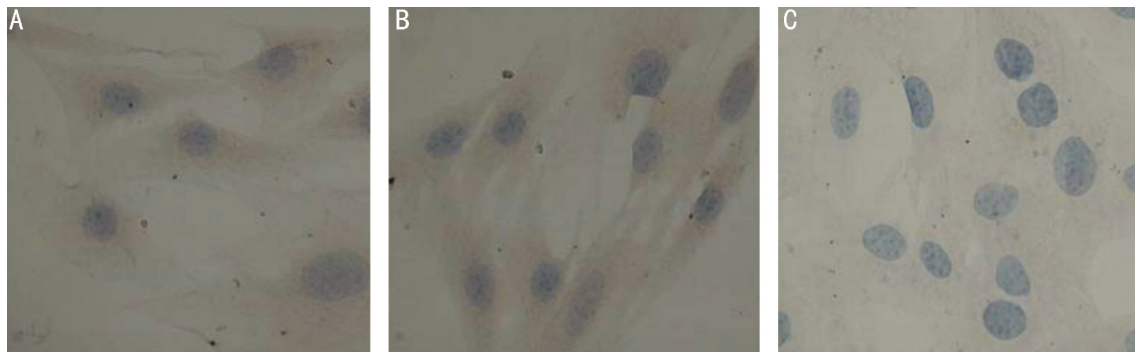
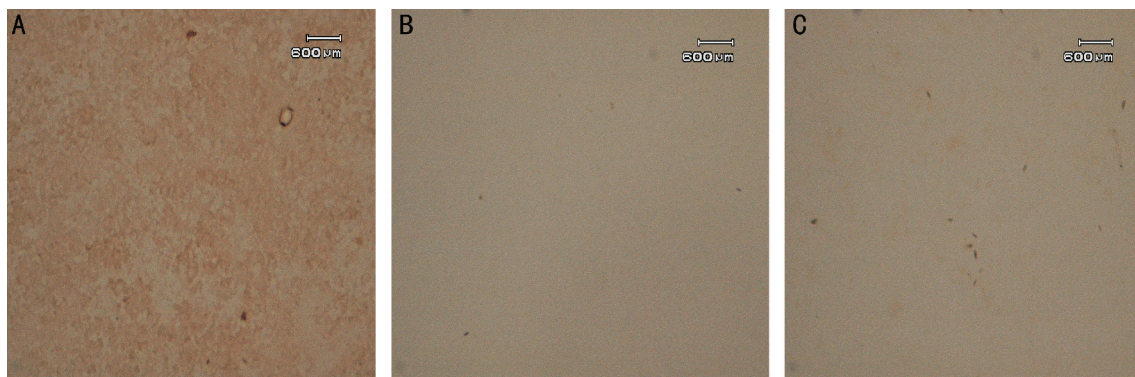
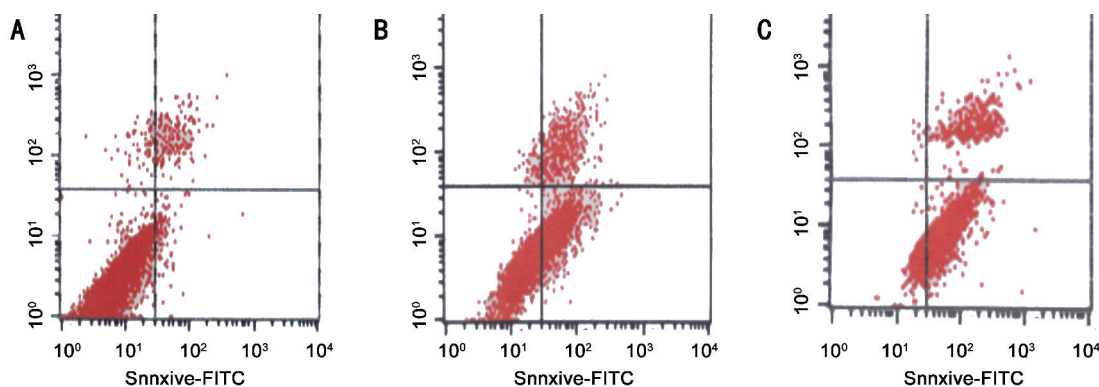
图2 免疫组织化学鉴定 RPE 结果($\times 400$) A:抗 CK 阳性;B:抗 S-100 阳性;C:抗 GFAP 阴性。图3 POS 碎片免疫组织化学鉴定($\times 400$) A:抗视紫红质阳性;B:抗 GFAP 阴性;C:抗 S-100 阴性。

图4 各组老年牛 RPE 在不同时间点的凋亡情况 A: 24h; B: 48h; C:96h。

2.2 RPE 细胞的免疫组织化学鉴定结果 从免疫组织化学结果可以看出,所培养的 RPE 角蛋白染色(图 2A)及 S-100 染色均为阳性(图 2B),GFAP 染色为阴性(图 2C)。说明体外培养的 RPE 纯度高。

2.3 POS 的免疫组织化学鉴定结果 新鲜制备的 POS 在光镜下为细小杆状,经高速离心制备后变为碎片状物质,用抗 Rhodopsin 抗体染色,碎片均为阳性(图 3A),但抗 GFAP(图 3B)和抗 S-100 染色(图 3C)均为阴性,说明制备的 POS 纯度较好。

2.4 各组不同时间点的凋亡情况 空白对照组、200μg/mL POS 及 400μg/mL POS 组在 24,48,96h 时的凋

亡情况见表 1 和图 4。在空白对照组,随着时间的延长凋亡比例极低。在加入 200μg/mL POS 时,随着吞噬物 POS 蓄积时间的延长,RPE 的凋亡比例明显增加,24h 凋亡比例(包括早期凋亡和晚期凋亡)为 1.73%;随着时间延长,凋亡比例增加明显,到 96h 时达到 65.92%。当加入 400μg/mL POS 时,凋亡的比例继续增加(图 5),24h 凋亡比例为 4.02%,到 96h 时则高达 91.34%。这说明吞噬负荷量的 POS,可以明显诱导 RPE 的凋亡,并且随着时间的延长和浓度的增加,凋亡比例明显增加。统计学分析显示,三个组之间以及不同的时间点之间的凋亡比例存在差异,差异有统计学意义(空白组各个时间点 $F=1565.687, P=0.000$;

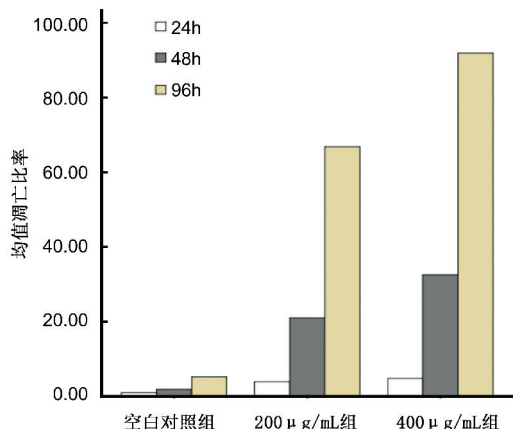


图5 加入400μg/mL POS后不同时间点体外培养牛RPE细胞的凋亡情况 A:24h;B:48h;C:96h。

200μg/mL POS组各个时间点 $F = 724.988, P = 0.000$;
400μg/mL POS组各个时间点 $F = 1271.767, P = 0.000$ 。

3 讨论

RPE位于视网膜感光细胞和脉络膜之间,紧靠感光细胞外节段,其吞噬POS对于维持感光细胞的功能以及促进RPE及感光细胞的存活起着举足轻重的作用。视网膜下腔是由POS、Müller细胞和RPE共同组成的,POS脱落于视网膜下腔中,是感光细胞间基质(interphotoreceptor matrix, IPM)的重要组成部分。RPE的损伤对自身的吞噬功能以及视网膜的正常功能产生影响,从而影响视功能。研究表明,RP、年龄相关性黄斑变性等视网膜变性疾病都与RPE凋亡有关。目前人们越来越重视RPE凋亡在视网膜变性疾病中的作用及病理机制。广泛的研究显示^[6],缺氧可以导致RPE的凋亡,但目前为止,还没有POS吞噬负荷下RPE凋亡情况的研究。

本研究发现,正常体外培养RPE细胞凋亡很少,在加入吞噬负荷量的POS会出现凋亡比例的明显增加,吞噬负荷量增加凋亡比例也增加。在吞噬负荷下,24h时RPE细胞出现少量凋亡,48h时凋亡增加明显,96h时的凋亡比例甚至高达90%。这说明当POS等吞噬物聚集于细胞外,会以浓度和时间依赖性的方式诱导RPE细胞的凋亡,并且老年性RPE细胞可能对此更为敏感。

RCS大鼠是一种RP动物模型^[7],其病理机制主要是参与RPE细胞内吞POS的MERTK基因突变,大量的POS碎片堆积在视网膜下腔中,发生氧化变性,最终引起RPE细胞凋亡和感光细胞的变性。同时研究还发现,该Merk信号分子有利于吞噬细胞抵抗氧化损伤,以及促进吞噬细胞的存活^[7,8]。

AMD是目前发达国家老年人主要致盲性眼病,AMD分为干性和湿性两种临床类型。其中干性AMD占其中大部分,并且没有有效的治疗方法。随着研究的深入,人们逐渐认识到RPE细胞吞噬及降解POS功能的异常在AMD的发病中起着重要的作用。AMD的一个显著特征是细胞内脂褐素和细胞外玻璃膜疣的沉积,随后出现RPE细胞的缺失、感光细胞的损伤及Bruch's膜的改变、新生血管长入等病理改变。诸多研究均发现,随着年龄的增长会出现RPE细胞吞噬POS功能下降。在老年小鼠RPE中脂褐素的含量约为刚出生时的20倍,并且脂褐素的蓄积阻碍RPE吞噬POS^[9]。目前研究最多的脂褐素中的成分是N-retinylidene-N'-retinylethanolamine (A2E)。随着年龄的增长,线粒体的突变逐渐增加,逐渐出现功能障碍。

研究发现,胞内线粒体功能障碍的RPE细胞吞噬功能降低,而A2E聚集可加剧此吞噬障碍^[10,11]。还有研究发现,未吞噬的POS碎片由RPE细胞顶端转移到RPE下,参与形成玻璃膜疣^[12]。随着年龄的增长还会出现RPE和脉络膜中的铁离子聚集增多,ARPE-19暴露于高铁离子的环境中,其吞噬功能降低,并且降低RPE中组织蛋白酶的活性^[4]。

由此可以推断,由于体内基因突变等导致RPE细胞吞噬功能降低,或者由于年龄增长导致RPE的吞噬功能降低、POS等感光细胞外基质堆积,随着时间延长和浓度增加,引起氧化应激的进一步加剧,氧化应激诱导凋亡,使Fas和FasL激活^[13,14],细胞色素C从线粒体中释放以及Caspase-3的激活^[14],同时还会有胞内Ca²⁺浓度变化^[15],最终导致RPE细胞的凋亡和感光细胞的变性,损害视功能。本研究利用吞噬负荷量的POS可以明显诱导RPE的凋亡,为进一步研究与吞噬功能障碍导致的RPE凋亡相关的某些临床疾病奠定基础,进一步解释其病理改变及发病机制,为最终的防治提供科学依据。

参考文献

- 1 LaVail MM, White MP, Gorris GM, et al. Retinal degeneration in the nervous mutant mouse. I. Light microscopic cytopathology and changes in the interphotoreceptor matrix. *J Comp Neurol* 1993;333(2): 168-181
- 2 Feng W, Jing J, Zheng DA, et al. Loss of RPE phenotype affects phagocytic function. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241(3): 232-240
- 3 Finnemann SC, Leung LW, Rodriguez-Boulan E. The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(6): 3842-3847
- 4 Chen H, Lukas TJ, Du N, et al. Dysfunction of the retinal pigment epithelium with age: increased iron decreases phagocytosis and lysosomal Activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(4): 1895-1902
- 5 张娟美, 林丹樱, 刘月月, 等. 新生期视网膜色素上皮细胞动态吞噬功能及α₂β₁受体表达的研究. *眼科新进展* 2007;27(5): 327-332
- 6 刘敏, 王雨生, 赵炜, 等. 缺氧诱导体外培养人视网膜色素上皮细胞凋亡. *国际眼科杂志* 2008;8(4): 679-682
- 7 Anwar A, Keating AK, Joung D, et al. Mer tyrosine kinase (MerTK) promotes macrophage survival following exposure to oxidative stress. *J Leukoc Biol* 2009;86(1): 73-79
- 8 Wang Y, Moncayo G, Morin Jr, et al. Mer receptor tyrosine kinase promotes invasion and survival in glioblastoma multiforme. *Oncogene* 2013;32(7): 872-882
- 9 Mukherjee P, Bose S, Hurd AA, et al. Monitoring the accumulation of lipofuscin in aging murine eyes by fluorescence spectroscopy. *Photochem Photobiol* 2009;85(1): 234-238
- 10 Vives-Bauza C, Anand M, Shiraz AK, et al. The age lipid A2E and mitochondrial dysfunction synergistically impair phagocytosis by retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* 2008;283(36): 24770-24780
- 11 Olchawa MM, Herrmreiter AM, Skumatz CM, et al. Photosensitized oxidative stress to ARPE-19 cells decreases protein receptors that mediate photoreceptor outer segment phagocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(3): 2276-2287
- 12 Zhao L, Wang Z, Liu Y, et al. Translocation of the retinal pigment epithelium and formation of subretinal pigment epithelium deposit induced by subretinal deposit. *Mol Vis* 2007;13(14): 873-880
- 13 Lin WW, Hsieh SL. Decoy receptor 3: a pleiotropic immunomodulator and biomarker for inflammatory diseases, autoimmune diseases and cancer. *Biochem Pharmacol* 2011;81(7): 838-847
- 14 Wang Y, Shen D, Wang VM, et al. Enhanced apoptosis in retinal pigment epithelium under inflammatory stimuli and oxidative stress. *Apoptosis* 2012;17(11): 1144-1155
- 15 庞东渤, 洪晶. 视网膜色素上皮细胞体外凋亡过程中钙离子平衡与caspase-3基因表达(英文). *国际眼科杂志* 2011;11(1): 1-3