

骨形态发生蛋白-6 对过氧化氢造成的视网膜色素上皮细胞损伤的保护作用

陈丽¹, 刘明², 刘勇³, 张德秀¹

基金项目: 中国陕西省科学技术研究发展计划项目 (No. 2012K16-11-01)

作者单位:¹(710061) 中国陕西省西安市, 西安交通大学医学院第一附属医院眼科;²(710001) 中国陕西省西安市第一医院眼科;³(710061) 中国陕西省西安市, 西安交通大学医学院神经生物研究所

作者简介: 陈丽, 女, 在读博士研究生, 研究方向: 视网膜疾病的基础研究。

通讯作者: 刘勇, 博士, 博士研究生导师, 研究方向: 脑血管病基础研究及神经干细胞应用基础研究. liuy5599@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2015-07-04 修回日期: 2015-12-15

Protective effect of bone morphogenetic protein 6 on RPE cells injury caused by H₂O₂

Li Chen¹, Ming Liu², Yong Liu³, De-Xiu Zhang¹

Foundation item: Research and Development Program of Science and Technology of Shaanxi Province of China (No. 2012K16-11-01)

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China; ²Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710001, Shaanxi Province, China; ³Institute of Neurobiology, Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Yong Liu. Institute of Neurobiology, Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. liuy5599@mail.xjtu.edu.cn

Received: 2015-07-04 Accepted: 2015-12-15

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of bone morphogenetic protein 6 (BMP-6) on cellular morphology, proliferation and apoptosis of retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) incubated in hydrogen peroxide (H₂O₂).

• **METHODS:** ARPE-19 cells were cultured conventionally and divided into four groups. One group was untreated as blank group, the other three groups were incubated in 75 μm/L H₂O₂, 150ng/mL BMP-6 or 75 μm/L H₂O₂ + 150ng/mL BMP-6. All the groups were incubated for 3h, 6h, 9h and 12h. We tested the cell viability by MTT. We used flow cytometry to test the cell cycle and cell apoptosis.

• **RESULTS:** H₂O₂ significantly decreased the cell activity in time-dependent manner. The activity of cells with BMP-6+H₂O₂ was higher H₂O₂ group, and the differences between the two groups at 3h and 6h were significant ($P < 0.05$). The observation on cellular morphology showed

that the cell number decreased and the cell detachment after 6h incubated with H₂O₂, while the cells with BMP-6 were less cell detachment and apoptosis.

• **CONCLUSION:** BMP-6 has protective effects on RPE cells from oxidative stress in certain extent.

• **KEYWORDS:** bone morphogenetic protein 6; oxidative stress; age-related macular degeneration; hydrogen peroxide

Citation: Chen L, Liu M, Liu Y, *et al.* Study of the protective effect of bone morphogenetic protein 6 on RPE cells injury caused by H₂O₂. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(1):37-40

摘要

目的: 观察骨形态发生蛋白-6 (bone morphogenetic protein, BMP-6) 对过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 作用的人视网膜色素上皮株 ARPE-19 细胞的细胞形态、增殖以及凋亡的影响。

方法: 常规培养 ARPE-19 细胞, 分为正常对照组、75 μmol/L H₂O₂ 及 150ng/mL BMP-6、75 μmol/L H₂O₂ + 150ng/mL BMP-6 环境中培养 3、6、9、12h 后, MTT 比色法检测细胞的活性; 流式细胞仪检测细胞的周期及凋亡变化。

结果: H₂O₂ 作用组的细胞活性随着作用时间的延长逐步降低; 而 BMP-6+H₂O₂ 组的细胞活性则较 H₂O₂ 组高, 在 3h 及 6h 时两组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 细胞形态观察发现: H₂O₂ 培养 6h 后, 细胞数量减少, 细胞发生脱落, 而添加 BMP-6 后细胞脱落及凋亡均要明显减少。

结论: BMP-6 可以一定程度上保护视网膜色素上皮受到氧化应激的损伤。

关键词: 骨形态发生蛋白-6; 氧化应激; 年龄相关性黄斑变性; 过氧化氢

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2016.1.09

引用: 陈丽, 刘明, 刘勇, 等. 骨形态发生蛋白-6 对过氧化氢造成的视网膜色素上皮细胞损伤的保护作用. 国际眼科杂志 2016;16(1):37-40

0 引言

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是一项进行性地损伤中央视力的疾病, 可以导致光感受器细胞和视网膜色素上皮的变性, 进而导致脉络膜新生血管突破 Bruch's 膜^[1]。大量研究结果提示, 氧化应激是 AMD 发生和发展的一个重要的促进因素^[2]。在 AMD 患者中, 视网膜中铁的聚集可以加剧它的病程^[3]。已有研究证实, 骨形态发生蛋白-6 (bone

morphogenetic protein-6, BMP-6)是系统性铁的主要调节因子^[4]。BMP-6 可否保护视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelial cells, RPE)使其免受氧化应激的损伤鲜见报道。本实验拟进一步研究 BMP-6 对 RPE 细胞的抗氧化作用,探讨 BMP-6 用于防治 AMD 的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

人视网膜色素上皮细胞(RPE 细胞株购自美国 ATCC 公司),DMEM 培养基(美国 Sigma),胎牛血清(FBS,美国 Hyclone, USA),胰蛋白酶(Amersco, USA),过氧化氢(远大过氧化物有限公司,上海),骨形态发生蛋白-6(BMP-6,美国 Sigma);流式细胞仪(型号 FACS Calibur, BD 公司, USA)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组

ARPE-19 细胞培养:取出装有 ARPE-19 细胞株的细胞冻存管,迅速置于 37℃ 水浴中解冻,将细胞悬液移入离心管中,加入 5mL 含 15% 新生牛血清的 DMEM/F₁₂ 培养液,1 000r/min 离心 5min,弃上清,加入 5mL 含 15% 新生牛血清的 DMEM/F₁₂ 培养液,经细胞计数,调整细胞浓度为 5×10⁴ 个/mL,接种入 50mL 细胞培养瓶中,将其置于 5% CO₂, 95% 空气、湿度 90% 的 CO₂ 培养箱中培养,24h 后观察细胞情况。取生长状态良好的细胞,常规 DMEM 培养,次日贴壁生长后更换为无血清培养液培养 24h 后,分为:(1)正常对照组;(2)H₂O₂ 75μmol/L 组;(3)H₂O₂ 75μmol/L + BMP-6 作用组(150ng/mL);(4)BMP-6(150ng/mL)作用组;各作用 0、3、6、9、12h。

1.2.2 细胞的形态学观察

RPE 细胞消化、传代后以 1×10⁴ 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板中,静置培养 24h 后吸弃上清,更换为无血清培养液,同步化处理 24h,分为正常对照组、H₂O₂ 组、BMP-6 组及 H₂O₂ + BMP-6 组作用 3、6、9、12h。在倒置相差显微镜下观察各组细胞的形态学变化,并采集图像。

1.2.3 MTT 法测定细胞的活性

将 RPE 细胞以 5×10⁴ 个/mL 细胞密度接种于 96 孔板中,次日贴壁生长后按照实验分组加入试剂:(1)氧化损伤组加入 H₂O₂ 75μmol/L,(2)H₂O₂ 75μmol/L + BMP-6(150ng/mL)作用组,(3)BMP-6(150ng/mL)作用组,各作用 0、3、6、9、12h。呈色:每孔加 MTT 溶液(5mg/mL,用 pH=7.4 的 PBS 配)20μL。继续孵育 4h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,对于悬浮细胞需要离心后再吸弃孔内培养上清液。每孔加 150μL DMSO,置于摇床上低速振荡使结晶物充分融解。比色:选择 492nm 波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔光吸收值,记录结果,以时间为横坐标、吸光值为纵坐标绘制细胞增殖曲线。

1.2.4 流式细胞仪测定细胞的周期及凋亡变化

分组:(1)正常对照组;(2)氧化损伤组加入 H₂O₂ 75μmol/L;(3)H₂O₂ 75μmol/L + BMP-6(150ng/mL)作用组;(4)BMP-6(150ng/mL)作用组,作用 12h。收集细胞,1 000r/min 离心 5min,弃上清液。用 PBS 溶液清洗 3 次,用 70% 乙醇混匀固定,4℃ 过夜,PBS 再清洗细胞 30min,在离心管中留 1mL PBS,仔细打散细胞团,加入 RNase A 5μL(1mg/mL),37℃ 温浴 30min,加入 500μL 含 50μg/mL 溴化乙锭的 PBS,室温避光 30min,流式细胞仪检测细胞周期分布情况及凋亡情况,获取软件:CellQuest Pro;分析软件:Modifit LT。重复 3 次。

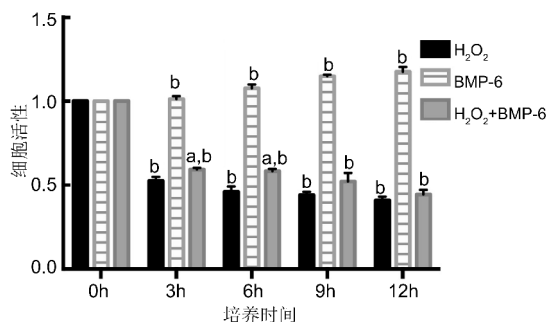


图1 H₂O₂ 及 H₂O₂ + BMP-6 不同作用时间组细胞活性的比较 ^aP<0.05 vs 同时间点 H₂O₂ 组;^bP<0.01 vs 同组 0h。

统计学分析:所有结果均采用 SPSS 22.0 统计学软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组间的比较,若存在差异,再进行组间的两两比较:如方差齐采用 LSD-t 检验,方差不齐采用 Tamhane's 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞活性分析

MTT 法检查结果(图 1)显示,在作用 3、6、12h 时方差齐性检验均为 P>0.05,表示具有方差齐性,所以多重比较采用 LSD-t 检验,在作用 3、6、12h 时组间差异均有统计学意义(P<0.05);而组内比较发现:在 3h 和 6h 时 H₂O₂ 与 H₂O₂ + BMP-6 比较差异有统计学意义(P<0.05),而在 12h 时 H₂O₂ 与 H₂O₂ + BMP-6 比较差异无统计学意义(P=0.928>0.05)。在 9h 作用组行方差齐性检验发现 P=0.01<0.05,表示不具有方差齐性,所以多重比较采用 Tamhane's 检验,结果在作用 9h 时组间差异均有统计学意义(P<0.05),在作用 9h 时 H₂O₂ 组与 H₂O₂ + BMP-6 组比较差异无统计学意义(P=0.946>0.05)。

2.2 RPE 细胞形态的变化

倒置相差显微镜下观察,正常的人 RPE 传代后 4h 开始呈贴壁生长,贴壁良好的细胞呈纺锤形或梭形,细胞内颗粒分布均匀(图 2A)。可见,H₂O₂ 作用组,RPE 细胞的细胞体皱缩、变圆,呈空泡状,部分细胞脱壁(图 2H6)。而单纯 BMP-6 作用组可看到细胞状态良好,细胞密度变大(图 2B6)。而添加 BMP-6 的 H₂O₂ 作用组可以看到细胞体皱缩,变圆空泡现象较单纯 H₂O₂ 组有所改善(图 2HB6)。

2.3 流式细胞分析细胞周期及凋亡的结果

各组作用 12h 后,用流式细胞分析细胞周期及凋亡。由表 1 及图 3 可以看出,正常对照组、H₂O₂ 组、BMP-6 组、H₂O₂ + BMP-6 组作用 12h 时凋亡率分别为 4.83%、32.63%、4.86%、23.67%;进行方差齐性检验发现具有方差齐性,组间比较采用 LSD-t 检验;BMP-6 组与正常对照组无统计学差异(P=0.97>0.05);其余两两比较均有统计学差异(均 P<0.05)。可以看出,H₂O₂ 可以加剧视网膜色素上皮细胞的凋亡,单独添加 BMP-6 作用后凋亡率与正常对照组无统计学差异,而 BMP-6 则可以对抗 H₂O₂ 促进视网膜色素上皮细胞的凋亡作用。细胞周期的分析中我们可以看出,H₂O₂ 组 G₂+S 期的细胞比例明显增加,而 G₁ 期的比例明显降低。

3 讨论

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是与年龄相关的视网膜脉络膜中心区

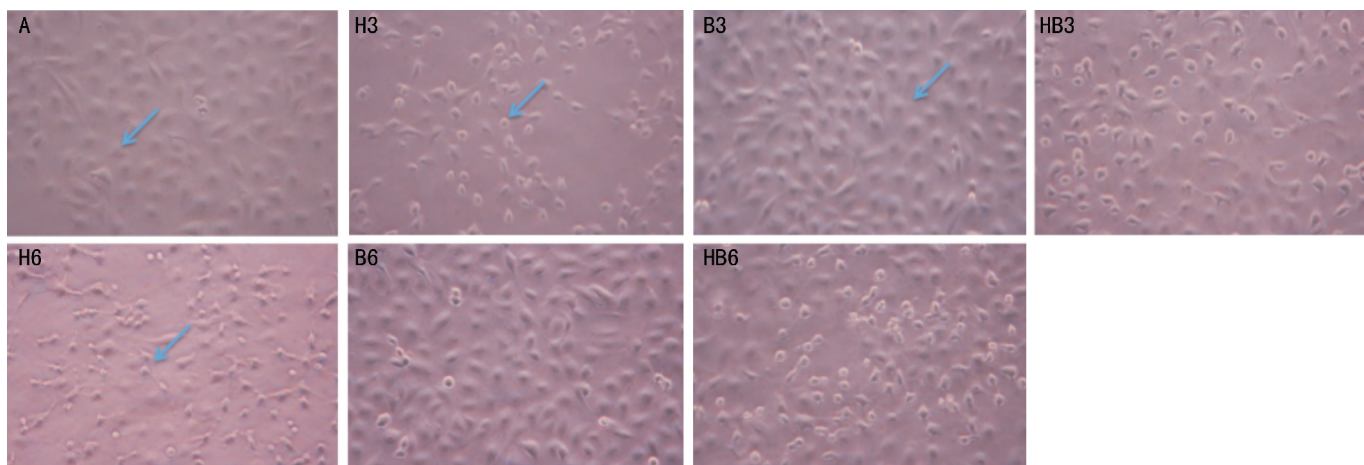


图2 RPE细胞形态的变化($\times 200$) A:正常对照;H3:H₂O₂组3h;H6:H₂O₂组6h;B3:BMP-6组3h;B6:BMP-6组6h;H3B:H₂O₂+BMP-6组3h;HB6:H₂O₂+BMP-6组6h。

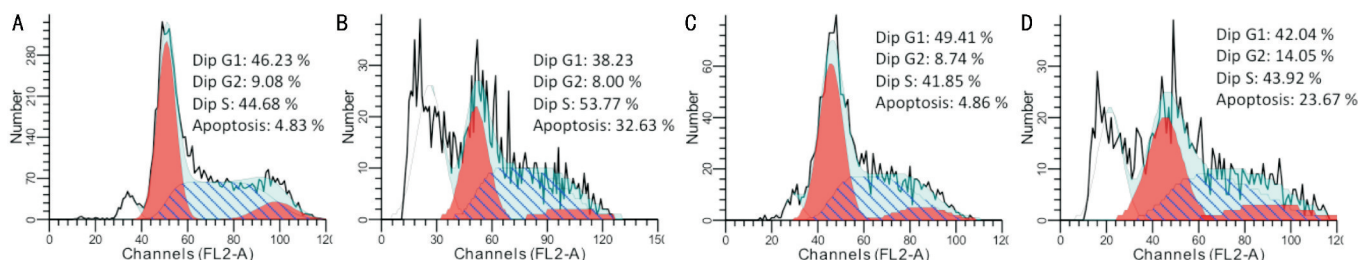


图3 培养12h后各组细胞周期及凋亡的检测结果 A:对照组;B:H₂O₂组;C:BMP-6组;D:H₂O₂+BMP-6组。

表1 各组作用12h后RPE细胞周期各时期比例的变化 ($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

细胞周期	正常对照组	H ₂ O ₂ 组	BMP-6组	H ₂ O ₂ +BMP-6组
G ₁	46.72±0.48	38.55±0.87 ^a	49.42±0.87 ^a	42.10±0.87 ^a
G ₂	9.05±0.19	8.01±0.13 ^a	8.74±0.17	14.07±0.19 ^a
S	44.22±0.40	53.44±0.76 ^a	41.83±0.28 ^a	43.84±0.09
G ₂ +S	53.07±0.22	61.45±0.87 ^a	50.58±0.44 ^a	57.91±0.25 ^a
凋亡率	4.83±1.20	33.28±1.90 ^a	4.80±0.50 ^a	23.67±4.25 ^a

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组。

域(黄斑区)的光感受器-视网膜色素上皮(RPE)-Bruch膜-脉络膜毛细血管复合体的进展性病变,可导致中心视力的丧失。AMD严重影响生活质量,由于中心视力丧失,患者生活不能自理,同时造成沉重的社会经济负担。目前AMD的病理过程并不是很清楚,认为与氧化应激及炎症有关。视网膜组织由于耗氧量高、富含多不饱和脂肪酸、且暴露于光照,成为氧化应激的高度易感部位^[5]。

过氧化氢是一种重要的活性氧,外源性过氧化氢极易通过细胞膜进入细胞,在细胞内过渡金属存在时通过Fenton反应,形成高活性的自由基,如单态氧、羟自由基等,进一步造成细胞损伤。因其操作简单,容易控制,现广泛用于体外模拟细胞的过氧化损伤实验^[6]。铁是一种潜在的氧化剂,过量的铁可以启动Fenton反应,催化H₂O₂形成羟自由基,进而导致脂质过氧化、DNA键断裂、细胞降解,导致组织破坏^[7]。

在视网膜中,光传导级联反应中涉及多种铁相关蛋白。RPE65,在RPE中表达的与铁相关的蛋白,在视觉循环中负责所有酯转化为11顺式视黄醇。光感受器细胞不断地流出及合成它们的外节盘,因而很大程度依赖于脂肪酸去饱和酶(一种膜脂质合成所必须的铁相关蛋白)。同

其他细胞一样,视网膜细胞容易受到过量铁导致的氧化应激的损害。过量铁可以损害RPE的吞噬作用。铁是鸟苷酸合成cGMP(光传导途径的二级信使)所必须的。长期暴露于光线,光致氧化作用在视网膜中产生了超过正常水平的反应氧化产物。二十二碳六烯酸,这种组织丰富的多元不饱和脂肪酸,易受脂质过氧化反应的影响在自由基之前,进而影响视网膜的功能。基于这些原因,铁平衡的调节在视网膜中有很重要的作用,铁平衡的破坏将产生严重的生物及临床后果^[8]。

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是一组具有类似结构的高度保守的功能蛋白,它们最初是作为能够在体内诱导骨和软骨形成的因子为人们所认识的。但随着分子生物学研究的深入,对BMPs家族成员的研究日益深入和扩展,已发现BMPs广泛分布于人体多种组织和细胞,对靶细胞的生长、分化以及凋亡具有调控作用,在机体胚胎生长发育、创伤愈合、机体肿瘤的发生发展等过程中起重要作用^[9]。有研究表明,BMPs在眼的发育和眼疾病中发挥着重要作用,参与视觉系统发生、发展的各个阶段。BMP-6具有独特的结构及功能特征,其作用复杂,参与调节体内多种代谢过程,不仅在维持生理功能

上具有重要作用,而且还介导了许多疾病的发生,因此对BMP-6的研究越来越受人们的重视^[10]。

新近研究发现,BMP-6是影响机体铁代谢的重要调节因素。这一发现不仅丰富了机体铁代谢及其调控的理论知识,还可尝试运用BMP-6的调控作用治疗铁代谢相关疾病^[11]。在鼠眼内进行BMP-6蛋白注射,可以上调铁调素进而改变视网膜铁的水平。BMP-6敲除小鼠会产生剂量依赖性的视网膜内铁的积聚和变性^[12]。尸检发现,早期黄斑变性患者视网膜色素上皮细胞中BMP-6的水平明显下降。早期AMD中BMP-6水平的降低可以导致在AMD中铁离子的集聚^[13]。Majda等^[14]研究发现,在体内及体外,氧化应激可以下调BMP-6 mRNA的表达。运用H₂O₂作用于体外培养的RPE后,BMP-6 mRNA的表达明显下降。

既然氧化应激导致的BMP-6的下调已被证实与AMD有关。那么体外添加BMP-6可否保护RPE细胞受到氧化应激的损伤,我们实验观察75 μmol/L H₂O₂对体外培养的RPE的增殖抑制作用及促进凋亡的作用,且这种作用具有时间依赖性。单纯150 ng/mL BMP-6可以呈时间依赖性地对RPE细胞有轻微的促增殖作用。添加BMP-6可以阻止H₂O₂对RPE细胞的氧化损伤。在作用3h和6h时,H₂O₂+BMP-6组与H₂O₂组相比较差异有统计学意义,可以看出,BMP-6早期是可以阻止H₂O₂对RPE细胞的氧化损伤。在随后的细胞形态观察中发现,作用3h和6h时,H₂O₂组细胞明显皱缩及脱落,H₂O₂+BMP-6组细胞脱落及皱缩现象有所减少。在流式细胞仪检查中发现,作用3h和6h时,H₂O₂+BMP-6组的凋亡率均较H₂O₂有所降低。在本实验中发现,75 μmol/L H₂O₂可以缩短G₁期时相,加快细胞周期的进程。既往研究氧化应激对细胞周期的影响表明,根据细胞类型的不同、细胞培养条件的不同及氧化应激水平的不同,细胞周期的阻滞是多向的^[15]:有的是阻滞于G₁期,有的是G₂期^[16]。我们研究发现,H₂O₂可以促进细胞的凋亡,可以使细胞阻滞于G₂+S期,而BMP-6可以逆转这种阻滞。

综上所述,体外培养的RPE细胞中,BMP-6对RPE细胞无明显的毒性作用,可以轻微促进RPE细胞的增殖。BMP-6可以一定程度上保护视网膜色素上皮受到氧化应激的损伤,但是它的具体作用机制有待进一步的探讨研究,本研究为探讨治疗AMD新方法奠定了一定的基础。

参考文献

1 Gu J, Pauer GJT, Yue X, *et al.* Assessing susceptibility to age-related macular degeneration with proteomic and genomic biomarkers. *Mol Cell* 2009;8(6):1338-1349

- 2 Wankun X, Wenzhen Y, Min Z, *et al.* Protective effect of paeoniflorin against oxidative stress in human retinal pigment epithelium *in vitro*. *Mol Vis* 2011;17:3512-3522
- 3 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
- 4 Andriopoulos B Jr, Corradini E, Xia Y, *et al.* BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet* 2009;41(4):482-487
- 5 Bhutto I, Luttu G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med* 2012;33(4):295-317
- 6 Haudek VJ, Gundacker NC, Slany A, *et al.* Consequences of acute and chronic oxidative stress upon the expression pattern of proteins in peripheral blood mononuclear cells. *J Proteome Res* 2008;7(12):5138-5147
- 7 Gnana-Prakasam JP, Martin PM, Smith SB, *et al.* Expression and Function of Iron-Regulatory Proteins in Retina. *IUBMB Life* 2010;62(5):363-370
- 8 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
- 9 Wu WK, Sung JJ, Wu YC, *et al.* Bone morphogenetic protein signaling is required for the anti-mitogenic effect of the Proteasome inhibitor MG-132 on colon cancer cells. *Br J Pharmacol* 2008;154(3):632-638
- 10 Babitt JL, Huang FW, Xia Y, *et al.* Modulation of bone morphogenetic protein signaling *in vivo* regulates systemic iron balance. *J Clin Invest* 2007;117(7):1933-1939
- 11 Haynes T, Gutierrez C, Aycinena JC, *et al.* BMP signaling mediates stem/progenitor cell-induced retina regeneration. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104(51):20380-20385
- 12 Meynard D, Kautz L, Darnaud V, *et al.* Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat Genet* 2009;41(4):478-481
- 13 Hollyfield JG, Bonilha VL, Rayborn ME, *et al.* Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nat Med* 2008;14(2):194-198
- 14 Hadziahmetovic M, Song Y, Wolkow N, *et al.* Bmp6 Regulates Retinal Iron Homeostasis and Has Altered Expression in Age-Related Macular Degeneration. *Am J Pathol* 2011;179(1):335-348
- 15 Barnouin K, Dubuisson ML, Child ES, *et al.* H₂O₂ induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *J Biol Chem* 2002;277(16):13761-13770
- 16 Chaudhary P, Sharma R, Sahu M, *et al.* 4-Hydroxynonenal Induces G2/M Phase Cell Cycle Arrest by Activation of the Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-related Protein (ATR)/Checkpoint Kinase 1 (Chk1) Signaling Pathway. *J Biol Chem* 2013;288(28):20532-20546