

缓激肽刺激体外培养的视网膜色素上皮细胞炎症反应的作用机制

蔡雯婷,任成达,刘晴雨,危清泉,杜亚茹,王倩怡,刘俊伶,何梦梅,于靖

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81470648)

作者单位:(200072)中国上海市,同济大学附属第十人民医院眼科

作者简介:蔡雯婷,同济大学在读硕士研究生,研究方向:视网膜病。

通讯作者:于靖,毕业于上海交通大学,博士,副教授,副主任医师,博士研究生导师,上海市医学分会视光学分会委员,主持国家自然科学基金2项,获得上海市科技启明星培养计划、上海市卫生系统优秀青年人才培养计划资助,研究方向:视网膜病。

dryujing@aliyun.com

收稿日期:2016-03-01 修回日期:2016-07-05

Mechanism of bradykinin on inflammations of retinal pigment epithelium cells

Wen-Ting Cai, Cheng-Da Ren, Qing-Yu Liu, Qing-Quan Wei, Ya-Ru Du, Qian-Yi Wang, Jun-Ling Liu, Meng-Mei He, Jing Yu

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81470648)

Department of Ophthalmology, the Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China

Correspondence to: Jing Yu. Department of Ophthalmology, the Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China. dryujing@aliyun.com

Received:2016-03-01 Accepted:2016-07-05

Abstract

• AIM: To investigate mechanism of bradykinin (BK) on inflammations of retinal pigment epithelium (RPE) cells.

• METHODS: ARPE-19 cells were cultured *in vitro*, stimulated by 100nM BK for 24h. Cell morphology changes were observed by microscope, and BK receptor localization was detected through cell immunofluorescence. Changes of Ca²⁺ in BK and BR antagonist stimuli were detected by laser scanning confocal microscopy. The expressions of COX-1, COX-2, eNOS and iNOS protein in control group and BK group were detected by Western Blot.

• RESULTS: After the stimulation of BK, there was no significant changes of ARPE-19 cells in morphology. Kinin B1 receptors (B1R) and B2 receptors (B2R) could be detected in ARPE-19 cells. Compared with control group, Ca²⁺ concentrations significantly increased in BK group; in B1R antagonist group and B2R antagonist group Ca²⁺ concentrations increased less than BK group; B1R and

B2R antagonist group showed no obvious changes in Ca²⁺ concentrations. Compared with control group, COX-2 and iNOS protein concentrations were significantly increased in BK group ($P<0.001$).

• CONCLUSION: BK induces the increasing expression of COX-2 and iNOS in the cultured ARPE cells through binding with either B1R or B2R.

• KEYWORDS: bradykinin; proliferative vitreoretinopathy; cyclooxygenase; nitric oxide synthase

Citation: Cai WT, Ren CD, Liu QY, *et al.* Mechanism of bradykinin on inflammations of retinal pigment epithelium cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2016;16(8):1430-1434

摘要

目的:探讨缓激肽刺激体外培养的视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞炎症反应的作用机制。

方法:体外培养 ARPE-19 细胞,100nmol/L 缓激肽(bradykinin, BK)刺激24h后,光镜下观察细胞形态变化,细胞免疫荧光检测 BK 受体定位;共聚焦显微镜检测 BK 及其拮抗剂作用下 Ca²⁺ 变化;Western blot 检测对照组与100nmol/L BK 处理24h后(BK组)COX-1、COX-2、eNOS、iNOS 蛋白的表达量。

结果: BK 刺激后, ARPE-19 细胞形态无明显变化; ARPE-19 细胞可检测到激肽 B1、B2 受体;与对照组相比, BK 组 Ca²⁺ 浓度显著升高; B1R 拮抗组及 B2R 拮抗组的 Ca²⁺ 浓度较 BK 组升高幅度降低, B1R 及 B2R 拮抗组 Ca²⁺ 浓度较对照组无明显变化; BK 作用 ARPE-19 细胞后, COX-2 及 iNOS 蛋白含量显著增加($P<0.001$)。

结论: BK 通过与 B1R 及 B2R 结合促进体外培养的 ARPE 细胞 COX-2 及 iNOS 表达增加。

关键词: 缓激肽; 增生性视网膜病变; 环氧合酶; 一氧化氮合酶

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.8.07

引用: 蔡雯婷,任成达,刘晴雨,等. 缓激肽刺激体外培养的视网膜色素上皮细胞炎症反应的作用机制. 国际眼科杂志 2016;16(8):1430-1434

0 引言

诸多眼底病在原发或者继发病程中出现增殖性改变,统称为增生性视网膜疾病。常见的增生性视网膜疾病包括增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)、增生性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)等。目前有观点认为 PVR 是眼内一种异常的创伤愈合过程^[1],炎症反应对增生性视网膜疾病的发生具有重要作用^[2]。

缓激肽(bradykinin, BK)是生理条件下激肽释放酶-激肽系统(kallikrein-kinin system, KKS)的主要激肽类物质,是KKS最终发挥效应的血管活性物质。本课题组一直致力于增生性玻璃体视网膜相关疾病的研究,我们前期通过蛋白质组学分析PVR和PDR的玻璃体,结果显示补体凝血级联(complement and coagulation cascades)是最重要的KEGG通路^[3-5],此提示该通路可能是增生性视网膜病变的共同通路。补体凝血级联由KKS、凝血系统和补体系统三部分组成。其中KKS为连接补体通路及凝血酶通路的中间过程,起关键性的调节作用。尽管BK在一些疾病中起着重要作用,但BK对RPE细胞的研究尚不明确。本研究拟通过BK对RPE细胞的炎症作用,探讨BK对增生性视网膜疾病的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 原代ARPE-19细胞(同济大学眼科研究所徐国彤教授馈赠)。缓激肽、HOE-140、Leu-8(Sigma公司);B1R抗体、iNOS抗体、Western Blot相关二抗(Abcam公司);B2R抗体(BD公司);COX-1抗体、COX-2抗体、eNOS抗体(Cell Signaling Technology公司)。

1.2 方法

1.2.1 BK对体外培养ARPE-19细胞形态学变化 取冻存的原代ARPE-19细胞,37℃水浴,快速摇晃,直至冻存液完全融化,移入15mL离心管,离心(1000r/min,5min),吸除冻存液,缓慢加入5mL培养液,用培养液(含有4%胎牛血清,2mmol/L左旋谷酰胺,0.1mmol/L非必需氨基酸的DMEM/F₁₂ 1:1培养液)混悬沉淀细胞,调整细胞浓度,置于5% CO₂、37℃细胞培养箱中培养。每周1:6传代,换液2次。传代4~6次,取培养的ARPE-19细胞,光镜下(×100)观察细胞形态,100nmol/L BK刺激24h后,观察细胞形态学变化。

1.2.2 细胞免疫荧光BK受体定位 取培养的ARPE-19细胞,4%多聚甲醛4℃固定,PBS漂洗,含10%胎牛血清及0.2% Triton的0.01mol/L PBS 37℃孵育。分别加入一抗(B1R抗体、B1R抗体,1:200),37℃孵育1h,4℃冰箱中过夜,孵育二抗(1:200),染核(DAPI,1:200),封片后共聚焦显微镜下观察。

1.2.3 检测BK及其拮抗剂对细胞内Ca²⁺浓度的影响 取培养的ARPE-19细胞,计数1×10⁴个。将Fluo-3/AM配制为1mmol/L原液,-20℃避光保存。F-127用DMSO配制成20%溶液(W/V)。用无血清无酚红培养液将Fluo-3/AM稀释成终浓度10μmol/L,并加入0.1% Pluronic F-127备用。移去培养液,PBS冲洗2次,加入10μmol/L染料液1mL,置于5% CO₂、37℃培养箱避光孵育30min。将染色后的ARPE-19细胞用PBS液冲洗3次,加入1mL DMEM液后用共聚焦显微镜观察,LaserSharp 2000软件扫描记录无处理组细胞内Ca²⁺浓度,待基线稳定后,其余各组分别给予如下刺激为: BK 100nmol/L刺激(BK组)、BK刺激前预敷100nmol/L B1R拮抗剂Leu-8(B1R拮抗组)、BK刺激前预敷100nmol/L B2R拮抗剂HOE-140(B2R拮抗组)、BK刺激前预敷100nmol/L Leu-8及HOE-140(B1R及B2R拮抗组),记录刺激后图像变化。

1.2.4 Western blot检测COX-1、COX-2、eNOS及iNOS下游炎症相关蛋白的表达 取培养的ARPE-19细胞,无BK处理(对照组)与100nmol/L BK处理(BK组)24h后,加入蛋白裂解液,30min后离心(12000r/min,

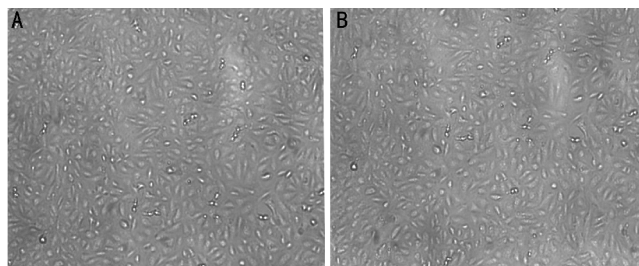


图1 100nmol/L BK刺激24h后ARPE-19细胞培养形态学变化(×100) A:无BK刺激组;B:100nmol/L BK刺激组。

15min),酶标仪定量后电泳分离,再转入硝酸纤维素膜,室温封闭1h。分别加入一抗(COX-1、COX-2、eNOS、iNOS及β-tublin,1:1000)湿盒内4℃过夜,加入二抗,37℃下孵育40min,漂洗3次,每次10min,试剂盒显色,以β-tublin为内参照,检测COX-1、COX-2、eNOS及iNOS蛋白相对表达量。

统计学分析:采用SPSS 19.0软件包进行分析,所有的数据均为三次实验后取得平均值。数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间分析采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BK对ARPE细胞形态的影响 光镜下(×100)观察ARPE-19细胞形态,贴壁生长,细胞无色透明,细胞形态呈扁平多角形。BK 100nmol/L刺激24h后,细胞形态未见明显变化(图1)。

2.2 BK受体在ARPE细胞的分布 通过细胞免疫荧光的检测显示,BK受体B1R及B2R在ARPE-19细胞上均有分布,且在细胞膜、细胞质及细胞核中均可检测到(图2)。

2.3 BK及其拮抗剂对细胞内Ca²⁺浓度的影响 无BK刺激时,细胞内Ca²⁺维持在一个相对稳定的基线水平(图3A)。给予100nmol/L的BK刺激后,细胞内Ca²⁺水平显著提高,且在随后的一段时间内维持一个较高水平,然后再逐渐回落至基线水平(图3B)。在BK刺激前分别给予B1R拮抗剂Leu-8及B2R拮抗剂HOE-140孵育,均可见峰值下降,且添加HOE-140后抑制程度更加显著(图3C、D)。同时给予Leu-8及HOE-140孵育,100nmol/L BK刺激不引起细胞内Ca²⁺水平的升高(图3E)。

2.4 BK对下游炎症相关蛋白含量的影响

2.4.1 BK对COX-1及COX-2的影响 ARPE-19细胞在无BK处理时,几乎不表达COX-1,100nmol/L BK刺激24h后检测,COX-1含量无明显改变(图4A);正常条件培养的ARPE-19细胞也很少表达COX-2,给予100nmol/L BK刺激后24h,COX-2含量显著增加(图4B, $P < 0.001$)。

2.4.2 BK对iNOS及eNOS的影响 正常条件培养的ARPE-19细胞内可检测到eNOS蛋白的表达,100nmol/L BK刺激24h后,eNOS含量无明显改变(图5A);ARPE-19细胞iNOS表达量很少,给予100nmol/L BK刺激后24h检测,iNOS含量显著增加(图5B, $P < 0.001$)。

3 讨论

近年来大量研究认为,慢性亚临床的低度炎症与PVR、PDR的发生、发展密切相关^[6]。我们前期研究结果显示,补体及凝血级联是不同增生性视网膜疾病的共同病理过程。其中BK是KKS的最终效应分子,可能在其发生发展中起重要作用,然而其具体的作用途径及效应尚不清

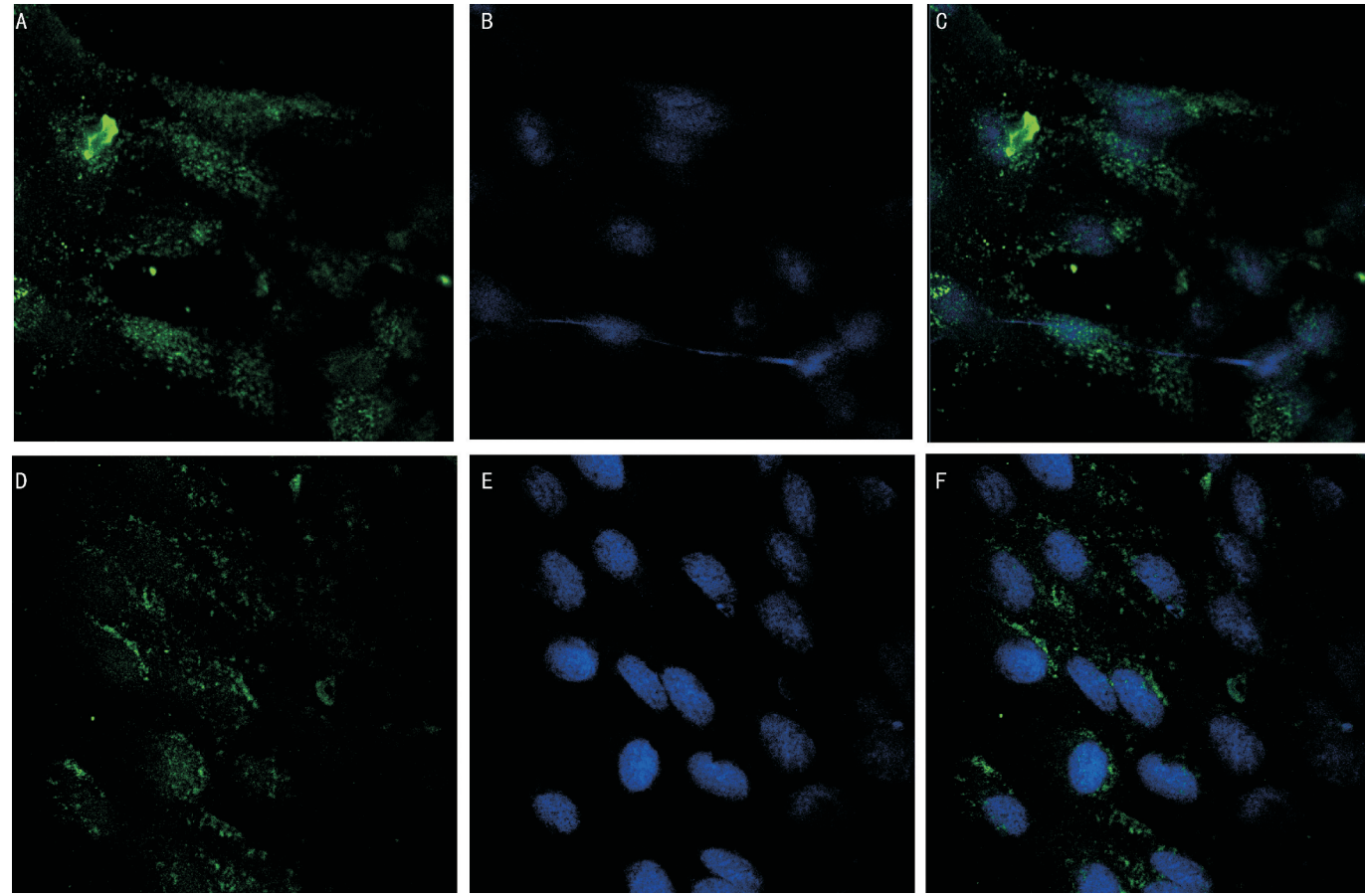


图2 细胞免疫荧光检测BK受体在ARPE细胞的分布 A: BIR在ARPE-19细胞上定位; B: DAPI细胞核染色; C: A与B融合; D: B2R在ARPE-19细胞上定位; E: DAPI细胞核染色; F: D与E融合。

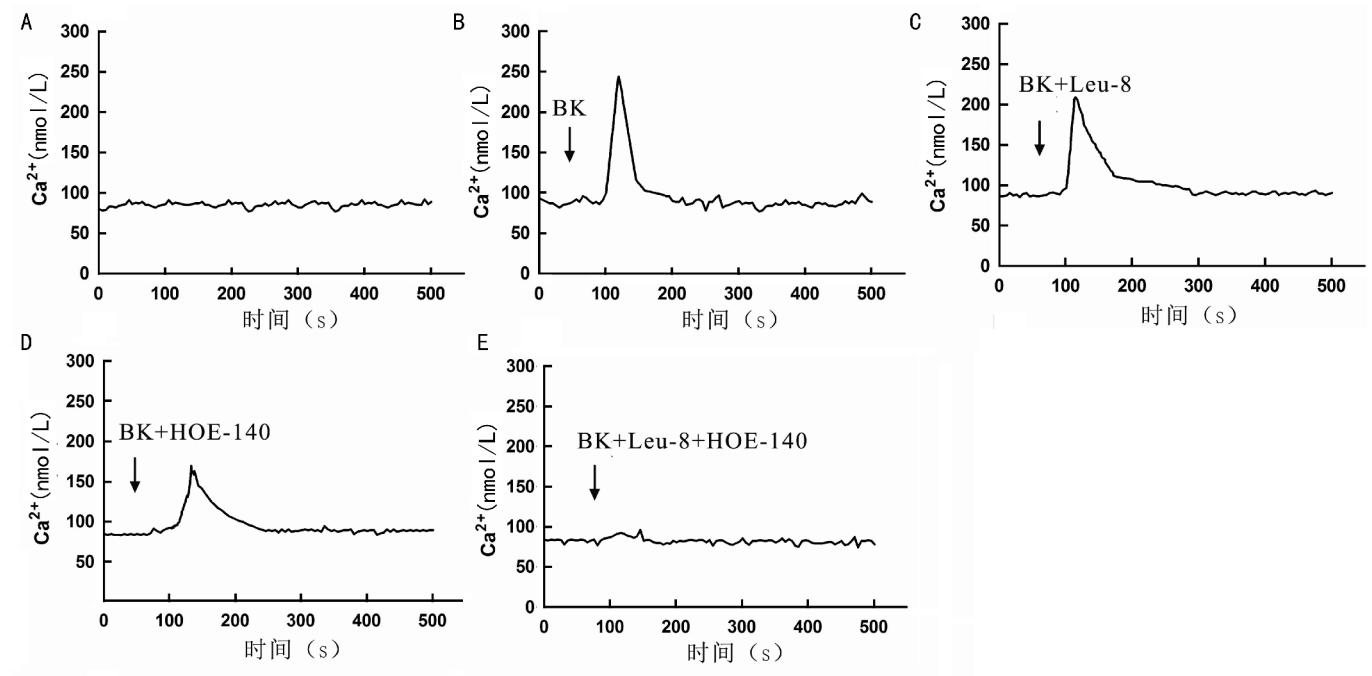


图3 不同条件下细胞内Ca²⁺浓度变化 A: 无BK刺激; B: 100nmol/L BK刺激; C: BK刺激前预敷10μmol/L B1R拮抗剂Leu-8; D: BK刺激前预敷10μmol/L B2R拮抗剂HOE-140; E: BK刺激前预敷10μmol/L Leu-8及HOE-140。

楚。本文通过体外培养ARPE,探讨BK及其受体的作用途径。
 以往有报道称BK触发了Ca²⁺诱导的Ca²⁺释放^[7-8]。在某些类型的细胞中,BK触发了Ca²⁺浓度的骤然上升,达到峰值,随着Ca²⁺的回收,浓度下降直至稳定。刚开始

Ca²⁺的骤然上升,可能是由于BK激活了受体或第二信使介导的Ca²⁺。在我们这次研究中,在BK刺激前给予BK受体拮抗剂孵育后,峰值下降,这与以往的研究结果保持一致。
 COX及NOS是重要的炎症相关蛋白,其在增生性视

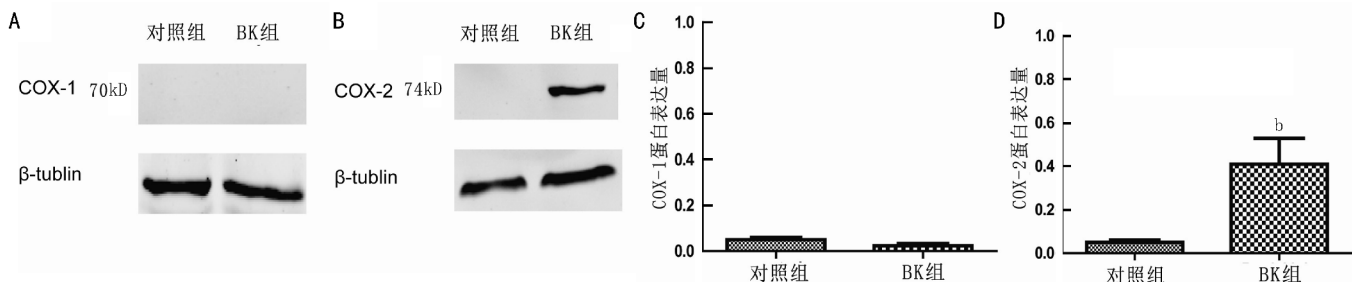


图4 BK对COX-1及COX-2的影响 A: BK对COX-1蛋白水平的影响; B: BK对COX-2蛋白水平的影响; C: COX-1蛋白表达灰度扫描经内参校正后结果; D: COX-2蛋白表达灰度扫描经内参校正后结果(对照组为无处理组, 实验组为100nmol/L BK处理24h组; ^b $P < 0.01$ vs 对照组)。

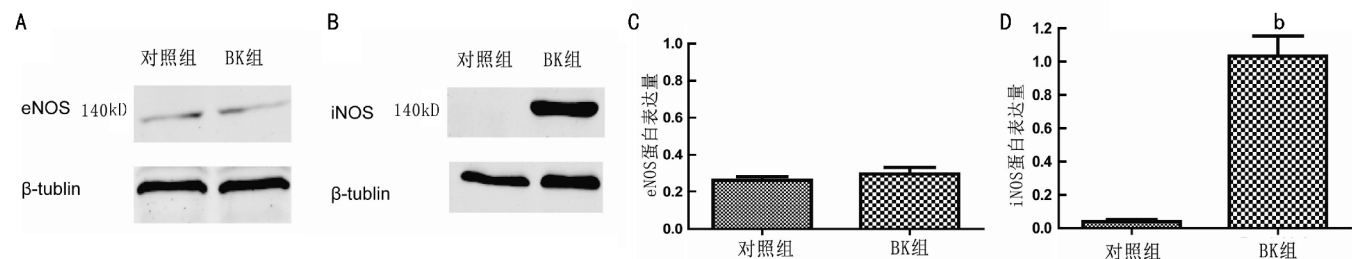


图5 BK对eNOS及iNOS的影响 A: BK对eNOS蛋白水平的影响; B: BK对iNOS蛋白水平的影响; C: eNOS蛋白表达灰度扫描经内参校正后结果; D: iNOS蛋白表达灰度扫描经内参校正后结果(对照组为无处理组, 实验组为100nmol/L BK处理24h组; ^b $P < 0.01$ vs 对照组)。

网膜疾病中的作用已有研究。有报道称, PVR及PDR中COX的表达均显著增加^[9], COX含量升高导致局部炎症反应增加, 促进了疾病进展。此外, COX抑制剂在PDR的全身治疗中有一定作用^[10]。以往的研究表明, iNOS在糖尿病患者及动物模型的视网膜中显著增加, 其能通过产生NO来发挥潜在的视网膜毒害作用^[11], 且iNOS抑制剂能显著抑制PDR中视网膜微血管的形成^[12]。本研究通过对BK刺激前后炎症相关蛋白COX-1, COX-2, iNOS及eNOS含量的分析显示, BK刺激后COX-2及iNOS含量显著增加, 提示二者可能是BK下游的效应分子。Inoue等^[13]发现BK刺激大鼠背根神经节细胞后, COX-1含量不变, COX-2含量增多, 前列腺素E₂含量也随之增加, 说明BK通过促进COX-2表达从而促进前列腺素E₂合成。然而, 对肾小叶间动脉的研究显示, BK对前列腺素的调节作用是通过COX-1而非COX-2产生的^[14]。Lim等^[15]对RPE细胞的研究显示, BK可以显著增加COX-2含量, 而不影响COX-1含量, 这与本研究结果是一致的。各研究中BK对COX-1及COX-2影响的不一致性说明BK的作用存在组织或细胞类型的差异性。BK作用于RPE细胞时, eNOS含量无明显变化, iNOS含量显著增加, 提示iNOS是BK作用的效应分子之一。本研究发现, BK通过调节炎症介质的表达, 刺激体外培养的视网膜色素上皮细胞发生炎症反应。

本研究显示, BK可以促进COX-2及iNOS表达, 二者均是重要的炎症介质。BK是体内重要的血管活性物质, 而PDR主要为微血管病变, 因此二者之间可能存在一定关联。BK一方面可以激活iNOS表达, 促进NO合成, 扩张血管, 改善缺血缺氧状况; 另一方面, BK可以使视网膜微血管通透性增大, 外渗的生长因子等将促进PDR进展^[16]。因此, BK对炎症反应的影响能够指导临床上PDR疾病的治疗, BK与PDR的关系尚需进一步的实验研究。

尽管我们在BK对体外培养RPE细胞的作用上有所发现, 但本研究仍存在一些不足之处。首先, KKS成分复杂, 尽管BK是KKS最主要的效应分子, 但系统内其他物质可能对RPE细胞的炎症反应有影响, 这需要进一步研究。其次, 本研究是基于体外正常培养的RPE细胞, 未能在动物疾病模型上验证, 以上我们将在后续研究中继续完善。

参考文献

- Gamulescu MA, Chen Y, He S, *et al.* Transforming growth factor beta2-induced myofibroblastic differentiation of human retinal pigment epithelial cells: regulation by ECM proteins and hepatocyte growth factor. *Exp Eye Res* 2006;83(1):212-222
- Yu J, Liu F, Cui SJ, *et al.* Vitreous proteomic analysis of proliferative vitreoretinopathy. *Proteomics* 2008;8(17):3667-3678
- Yu J, Peng R, Chen H, *et al.* Elucidation of the pathogenic mechanism of rhegmatogenous retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy by proteomic analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(13):8146-8153
- Wang H, Feng L, Hu J, *et al.* Differentiating vitreous proteomes in proliferative diabetic retinopathy using high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Exp Eye Res* 2013;108:110-119
- Yu J, Feng L, Wu Y, *et al.* Vitreous proteomic analysis of idiopathic epiretinal membranes. *Mol Biosyst* 2014;10(10):2558-2566
- Tomic M, Ljubic S, Kastelan S. The role of inflammation and endothelial dysfunction in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Coll Antropol* 2013;37(Suppl 1):51-57
- Zhou L, Yang B, Wang Y, *et al.* Bradykinin regulates the expression of claudin-5 in brain microvascular endothelial cells via calcium-induced calcium release. *J Neurosci Res* 2014;92(5):597-606
- Pinheiro AR, Paramos-de-Carvalho D, Certal M, *et al.* Bradykinin-induced Ca²⁺ signaling in human subcutaneous fibroblasts involves ATP release via hemichannels leading to P2Y₁₂ receptors activation. *Cell Commun Signal* 2013;11:70
- Lupo G, Motta C, Giurdanella G, *et al.* Role of phospholipases A2 in

diabetic retinopathy: *in vitro* and *in vivo* studies. *Biochem Pharmacol* 2013;86(11):1603-1613

10 Lingam G, Wong TY. Systemic medical management of diabetic retinopathy. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2013;20(4):301-308

11 Tiribuzi R, Crispolti L, Tartacca F, *et al*. Nitric oxide depletion alters hematopoietic stem cell commitment toward immunogenic dendritic cells. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(3):2830-2838

12 Pearson ER. Pharmacogenetics and future strategies in treating hyperglycaemia in diabetes. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009;14:4348-4362

13 Inoue A, Iwasa M, Nishikura Y, *et al*. The long-term exposure of rat cultured dorsal root ganglion cells to bradykinin induced the release of

prostaglandin E2 by the activation of cyclooxygenase-2. *Neurosci Lett* 2006;401(3):242-247

14 Liu B, Luo W, Zhang Y, *et al*. Role of cyclooxygenase-1-mediated prostacyclin synthesis in endothelium-dependent vasoconstrictor activity of porcine interlobular renal arteries. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;302(9):F1133-1140

15 Lim SK, Park MJ, Jung HK, *et al*. Bradykinin stimulates glutamate uptake via both B1R and B2R activation in a human retinal pigment epithelial cells. *Life Sci* 2008;83(23-24):761-770

16 Liu J, Feener EP. Plasma kallikrein-kinin system and diabetic retinopathy. *Biol Chem* 2013;394(3):319-328

科技期刊对论文关键词的要求

关键词是论文的检索标志,是表达文献主题概念的自然语言词汇,一般是词和词组。

科技论文的关键词是从其题名、摘要和正文中选出来的。

发表的论文不标注关键词,读者就检索不到,文献数据库也不会收录;关键词选用不当,就会降低论文的被检率,甚至检索不到。

关键词包括3部分:1)叙词(正式主题词),经过规范化的并收入主题词表中的词或词组;2)非正式主题词(词表中的上位词+下位词+替代词);3)自由词(标引需要但主题词表中找不到的词)。

每篇论文中应列出3~8个关键词,其中叙词应尽可能多一些。

关键词作为论文的组成部分,置于摘要段之后。

摘自《科学技术期刊编辑教程》