

p75 NTR 受体在视网膜色素上皮细胞氧化损伤中的作用及机制

谷鑫¹, 杨欣²

作者单位:¹(710002) 中国陕西省西安市第一医院眼科;
²(710004) 中国陕西省西安市第四医院眼科

作者简介:谷鑫, 硕士, 主治医师, 研究方向:视光学、小儿眼科。
通讯作者:杨欣, 硕士, 主治医师, 研究方向:视光学. yxpower@
qq.com

收稿日期:2016-12-11 修回日期:2017-11-22

Role and mechanism of NTR p75 receptor in oxidative damage of retinal pigment epithelium cells

Xin Gu¹, Xin Yang²

¹Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; ²Department of Ophthalmology, Xi'an No. 4 Hospital, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Xin Yang. Department of Ophthalmology, Xi'an No. 4 Hospital, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. yxpower@qq.com

Received:2016-12-11 Accepted:2017-11-22

Abstract

• AIM: To study the oxidative damage and mechanism of p75 NTR receptor in retinal pigment epithelial cells (RPE).

• METHODS: The NTR p75 receptor was used to transfer the retinal pigment epithelium cells as the experimental group, and the non transfected retinal pigment epithelium cells were used as control group. The BrdU test detected the proliferation of two groups of cells. The rate of apoptosis in two sets of apoptosis was measured by PI/in the V-FITC double dye method. The laser microscope detects the ROS levels within the cell. The flow cytometer detected the levels of ROS, mitochondrial markers, cytochrome C expression in RPE cells. The Western blot method detected the expression level of Fas, Caspase-3, and VEGF165 in RPE cells.

• RESULTS: The RPE cell proliferation activity was gradually decreasing ($P<0.05$) with the extension of the p75 NTR receptor transfer time in experimental group. The RPE cell proliferation activity in each transfection point was significantly lower in experimental group than in the control group ($P<0.05$). The percentage of RPE apoptosis was gradually increased with the extension of transfection time in experimental group ($P<0.01$). The

percentage of RPE cell apoptosis in the experimental group was significantly higher than the control group ($P<0.01$). ROS fluorescence was significantly better in the experimental group than the control group. Flow cytometry instrument method, according to the results of the experimental group PRE ROS levels in the cell, cytochrome C was significantly higher than control group ($P<0.01$), RPE cell mitochondria marker levels significantly lower than the control group ($P<0.01$). The results of the Western blot method showed that the expression levels of VEGF165, Fas and Caspase-3 were significantly higher in the experimental group than in the control group ($P<0.01$).

• CONCLUSION: The over expression of p75 NTR receptor could lead to damage of mitochondria in retinal pigment epithelium cells, but it could also promote the apoptosis reaction, eventually it led to the formation of choroidal neovascularization, so it could be speculated that p75 NTR receptor is the damage factors of retinal pigment epithelium.

• KEYWORDS: retinal pigment epithelial cells; NTR p75 receptor; choroidal neovascularization; injury

Citation: Gu X, Yang X. Role and mechanism of NTR p75 receptor in oxidative damage of retinal pigment epithelium cells. *Guoji Yanke Zazhi* 2018;18(1):40-44

摘要

目的:研究 p75 NTR 受体在视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelial cells, RPE)氧化损伤过程中的作用及机制。

方法:将转染 p75 NTR 受体的 RPE 细胞作为实验组,未转染的 RPE 细胞作为对照组。BrdU 检测法检测细胞增殖活性;PI/Annexin V-FITC 双染法检测细胞凋亡率;激光显微镜观察细胞内 ROS 的表达情况;流式细胞仪检测细胞内 ROS、线粒体标志物、细胞色素 C 表达水平;Western blot 法检测细胞中 Fas 蛋白、裂解 Caspase-3、VEGF165 蛋白的表达水平。

结果:随着 p75 NTR 受体转染时间的延长,实验组 RPE 细胞的增殖活性呈逐渐降低趋势,各转染时间点的 RPE 细胞增殖活性比较,差异有统计学意义($P<0.05$);实验组各转染时间点的 RPE 细胞增殖活性均明显低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。随着转染时间的延长,实验组 RPE 细胞凋亡率呈逐渐增加趋势,各转染时间点的 RPE 细胞凋亡率比较,差异有统计学意义($P<$

0.01);实验组各转染时间点的 RPE 细胞凋亡率均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。实验组 ROS 荧光信号明显强于对照组。流式细胞仪检测结果显示,实验组 RPE 细胞中 ROS、细胞色素 C 水平均明显高于对照组,线粒体标志物水平明显低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。Western blot 法检测结果表明,实验组细胞内 Fas 蛋白、Caspase-3、VEGF₁₆₅ 蛋白的表达水平均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.01$)。

结论:p75 NTR 受体高表达可导致 RPE 细胞线粒体发生损伤,同时促进细胞凋亡,最终导致脉络膜新生血管的形成,表明 p75 NTR 受体可能是导致 RPE 细胞发生损伤的因素之一。

关键词:视网膜色素上皮细胞;p75 NTR 受体;脉络膜新生血管;损伤

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.1.09

引用:谷鑫,杨欣. p75 NTR 受体在视网膜色素上皮细胞氧化损伤中的作用及机制. 国际眼科杂志 2018;18(1):40-44

0 引言

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是由脉络膜毛细血管分化而形成的一种血管,其常见于黄斑部,且对人体的视力可造成极大的损害,其致盲率可高达 3.4%^[1]。视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞在一定的原因下可发生变性,而这种变性是一种进行性、慢性、具有遗传性的视网膜退行性病变,且预后极差,最终可导致全盲^[2]。据范妍等^[3]的研究显示,氧化应激产生的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)具有让 RPE 细胞代谢减弱的功能,而一旦 RPE 细胞发生氧化损伤时,p75 NTR 受体就将会被激活,从而导致血管内皮细胞发生增殖反应。本研究通过体外培养 RPE 细胞来研究 p75 NTR 受体在 RPE 氧化损伤过程中的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ARPE20 细胞系(美国 ATCC 公司);p75 NTR 受体表达质粒(美国 OriGene 公司);脂质体 2000(美国 ATCC 公司);BrdU 试剂盒(瑞士 Roche 公司);PI/Annexin V-FITC 检测试剂盒(美国 ATCC 公司);活性氧(ROS)检测试剂盒(美国 ATCC 公司);线粒体标志物检测试剂盒(美国 ATCC 公司);细胞色素 C 检测试剂盒(美国 ATCC 公司);兔抗人 Fas 抗体、兔抗人 Caspase-3 抗体、兔抗人 VEGF₁₆₅ 抗体(美国 Invitrogen 公司)。CO₂ 恒温培养箱(日本三洋公司);荧光显微镜(日本 Olympus 公司);流式细胞仪(美国 Fas Calibur, Becton Dickinson 公司);电泳仪(日本 Toyobo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 RPE 细胞培养和转染 ARPE20 细胞置入含胎牛血清(体积分数为 8%)的培养基中混匀,置于细胞培养箱(37℃, 50mL/L CO₂)中培养。转染 p75 NTR 受体的 RPE 细胞为实验组,未转染的 RPE 细胞为对照组。转染过程:(1)转染溶液配制:A 液(10μg p75 NTR 受体表达质粒 DNA 加入 50μL 无血清培养液);B 液(2μL 脂质体 2000 转染液加入无血清培养液 50μL)。将 A、B 液混合

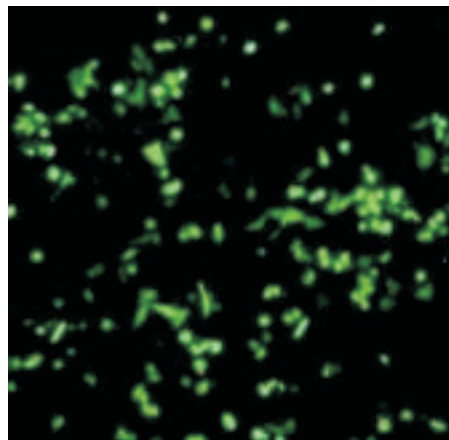


图 1 转染 p75 NTR 受体的 RPE 细胞($\times 200$)。

后,室温下静置 30min。(2)细胞转染:细胞经培养液清洗 2 次,加入 A、B 混合液,加入培养基,放入细胞培养箱中培养 6h。(3)筛选稳定表达 p75 NTR 受体的细胞:继续培养 72h 后,细胞传代,接种于培养皿中培养 14d 后,荧光显微镜下观察有明显 p75 NTR 受体表达的细胞形成,转移细胞,扩增培养,建立稳定转染的细胞系。(4)转染效率:选取稳定转染的 RPE 细胞,采用荧光显微镜检测绿色荧光蛋白表达情况,转染效率达到 80% 左右,细胞转染成功,见图 1。

1.2.2 BrdU 法检测细胞增殖活性 根据 BrdU 试剂盒操作说明书,分别将实验组和对照组的 RPE 细胞以 2.0×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板,每孔 100μL。培养 1、2、3、4d 后每孔加入 10μL BrdU 溶液,培养 3h。将各孔的液体弃掉,每孔加入 200μL 细胞固定液,固定 25 ~ 35min。弃掉各孔的固定液,每孔加入 200μL anti-BrdU-POD 工作液,培养 85 ~ 95min, PBS 缓冲液洗涤 2 ~ 4 次。每孔加入 100μL 底物显色液,测量吸光度(A)值。实验重复 3 次,取平均值。细胞活性率 = $A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.2.3 PI/Annexin V-FITC 双染法检测细胞凋亡率 根据 PI/Annexin V-FITC 检测试剂盒操作说明书,把实验组和对照组的 RPE 细胞以 2.0×10^4 个/孔接种于 6 孔板,培养 1、2、3、4d 后收集细胞,各孔加入 450μL 进样缓冲液重悬细胞,每孔再依次加入 PI 10μL 和 Annexin V-FITC 5μL,轻轻混匀,孵育 3 ~ 6min,上机检测细胞凋亡率。

1.2.4 激光显微镜观察细胞内 ROS 水平 以 1.0×10^4 个/孔把细胞接种于 Petri 培养皿(直径 60mm),培养 1.5 ~ 2d,弃掉培养基,用 PBS 缓冲液洗涤 1 ~ 3 次,3 ~ 6min/次,每孔加入 DCFH-DA 工作液 1.0mL,孵育 25 ~ 35min。弃掉液体, PBS 缓冲液洗涤 1 ~ 3 次,3 ~ 6min/次,使用激光扫描共聚焦显微镜观察细胞内 ROS 荧光染色结果,并采集阳性染色图像。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞内 ROS、线粒体标志物、细胞色素 C 表达水平 将细胞按照 2.0×10^4 个/孔接种于 6 孔板,培养 1.5 ~ 2.5d。分别根据活性氧(ROS)检测试剂盒、线粒体标志物检测试剂盒、细胞色素 C 检测试剂盒操作说明书进行操作并上机检测。实验重复 3 次,直接读值后取平均值。

1.2.6 Western blot 法检测 Fas、Caspase-3、VEGF₁₆₅ 蛋白的表达水平 细胞以 2.0×10^5 个/mL 接种于培养皿,培养 1.5 ~ 2.5d,提取并采用 BCA 法测定蛋白浓度。配制

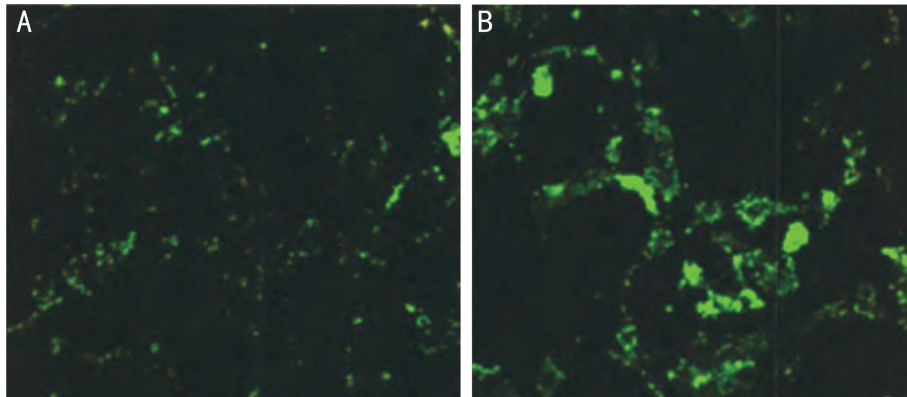


图2 激光扫描共聚焦显微镜观察 ROS 荧光染色结果($\times 400$) A:对照组;B:实验组。

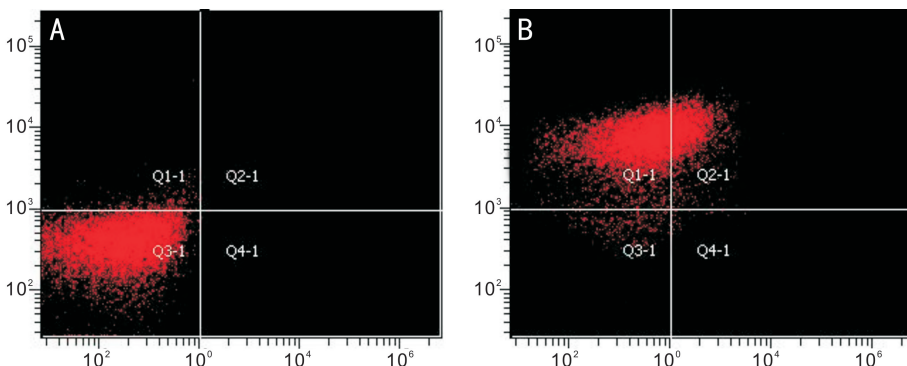


图3 流式细胞仪检测 ROS 水平 A:对照组;B:实验组。

适宜浓度的 SDS-PAGE 凝胶,每孔加入 $25\mu\text{g}$ 蛋白样品,经 SDS-PAGE凝胶电泳 2h,转膜至 PVDF 膜。使用脱脂奶粉进行封闭,4℃ 孵育一抗(兔抗人 Fas 抗体、兔抗人 Caspase-3 抗体、兔抗人 VEGF₁₆₅ 抗体)孵育过夜。TBST 漂洗 2~4 次,加相对应的二抗孵育 0.8~1.2h, TBST 漂洗 2~4 次,曝光法检测蛋白的表达,并使用 Image J 软件分析条带的灰度值。实验重复 3 次。

统计学分析:将研究数据录入 SPSS22.0 行数据分析,计数资料行 χ^2 检验,各组间均数行 Levene 检验。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,重复测量数据采用重复测量数据的方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞的增殖活性和凋亡率 BrdU 法检测结果显示,实验组随着 p75 NTR 受体转染时间的延长,RPE 细胞增殖活性逐渐降低,各转染时间点的 RPE 细胞增殖活性比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。实验组各转染时间点的 RPE 细胞增殖活性均明显低于对照组,差异有统计学意义($t=23.14, 20.42, 18.43, 17.41, P<0.05$),见表 1。Annexin V-FITC/PI 检测结果显示,随着转染时间的延长,实验组 RPE 细胞凋亡率呈逐渐增加趋势,各转染时间点的 RPE 细胞凋亡率比较差异有统计学意义($P<0.01$)。实验组各转染时间点的 RPE 细胞凋亡率均明显高于对照组,差异有统计学意义($t=22.24, 33.41, 41.25, 49.66, P<0.01$),见表 2。

2.2 细胞内 ROS、线粒体标志物、细胞色素 C 表达水平

激光扫描共聚焦显微镜观察到实验组 ROS 绿色荧光信号明显强于对照组(图 2)。流式细胞仪检测结果显示,对照组 RPE 细胞中 ROS 水平为 $100\% \pm 0.00\%$,实验组为

表 1 两组 RPE 细胞增殖活性比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	转染时间	RPE 细胞增殖活性
实验组	转染 1d	94.34 ± 0.62^e
	转染 2d	$87.41 \pm 0.71^{a,e}$
	转染 3d	$73.46 \pm 0.77^{a,c,e}$
	转染 4d	$59.42 \pm 1.34^{a,c,e,g}$
对照组		100.00 ± 0.00

注:实验组:转染 p75 NTR 受体的 RPE 细胞;对照组:未转染的 RPE 细胞。^a $P<0.05$ vs 转染 1d;^c $P<0.05$ vs 转染 2d;^e $P<0.05$ vs 转染 3d;^g $P<0.05$ vs 对照组。

表 2 两组 RPE 细胞凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	转染时间	RPE 细胞凋亡率
实验组	转染 1d	4.78 ± 0.52^b
	转染 2d	$9.26 \pm 1.15^{b,h}$
	转染 3d	$16.62 \pm 1.34^{b,d,h}$
	转染 4d	$22.45 \pm 2.41^{b,d,e,h}$
对照组		0.79 ± 0.11

注:实验组:转染 p75 NTR 受体的 RPE 细胞;对照组:未转染的 RPE 细胞。^b $P<0.01$ vs 转染 1d;^d $P<0.01$ vs 转染 2d;^e $P<0.05$ vs 转染 3d;^h $P<0.01$ vs 对照组。

$225.6\% \pm 23.50\%$,两组比较差异有统计学意义($t=37.256, P<0.01$),见图 3。流式细胞仪检测结果显示:实验组 RPE 细胞中线粒体标志物阳性率为 $36.63\% \pm 1.97\%$,对照组为 $100\% \pm 0.00\%$,两组间比较差异有统计学意义($t=45.311, P<0.01$),见图 4。实验组细胞色素 C 表达水平为 $56.45\% \pm 5.23\%$,对照组细胞色素 C 表达水平为 $15.22\% \pm 1.37\%$,两组比较差异有统计学意义($t=89.250, P<0.01$),见图 5。

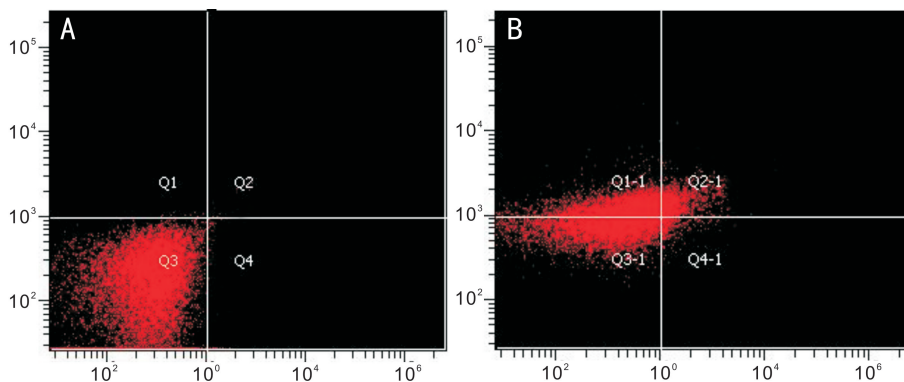


图4 流式细胞仪检测线粒体标志物水平 A:对照组;B:实验组。

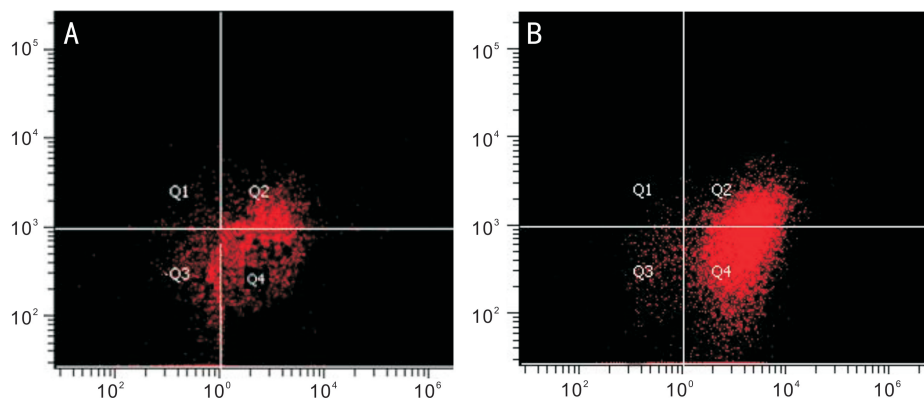


图5 流式细胞仪检测细胞色素 C 表达水平 A:对照组;B:实验组。

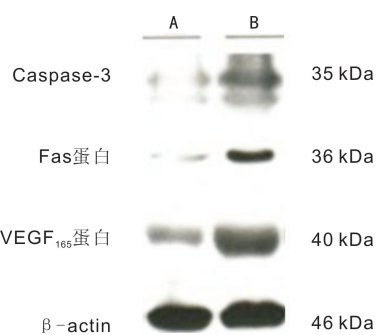


图6 Western blot 法检测 RPE 细胞中凋亡相关蛋白的表达 A:对照组;B:实验组。

表3 两组 RPE 细胞中凋亡相关蛋白条带灰度值比较 $\bar{x} \pm s$

组别	Caspase-3	Fas 蛋白	VEGF ₁₆₅ 蛋白
对照组	110.23±9.35	109.47±10.26	132.36±12.47
实验组	355.15±30.47	544.09±51.36	641.20±55.39
<i>t</i>	13.3098	14.3796	15.5230
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

注:实验组:转染 p75 NTR 受体的 RPE 细胞;对照组:未转染的 RPE 细胞。

2.3 两组 RPE 细胞中凋亡相关蛋白表达 Western blot 法检测结果显示:实验组的 VEGF₁₆₅ 蛋白、Fas 蛋白以及 Caspase-3 的表达水平均明显高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见表3,图6。

3 讨论

CNV 的形成是由多种因素相互影响的,其位置主要是处于 RPE 上皮和 Bruch 膜之间,常见在黄斑部,而 RPE

的氧化损伤是脉络膜新生血管形成的主要因素之一,由于 RPE 细胞常常与人体视网膜的生理代谢功能有关,其重要的作用是中和光子能量从而生产出 ROS^[4-6]。据 Antyborzec 等^[7]研究显示年龄越大,RPE 细胞产生的 ROS 就越多,这是因为当年龄越大的时候,RPE 的吞噬能力就越弱,当 ROS 和人体内的溶酶体相互反应合成吞噬小体之后,就极易导致脂褐素前体的产生,最终导致 ROS 产生更多。据 Ragunathan 等^[8]研究显示随着年龄的增大,人体的代谢机能必然会越来越差,而较低的代谢机能会导致基底膜排除的废物越来越多,而这些代谢废物若无法及时被清除出体外,将导致 Bruch 膜的增厚,最终导致玻璃膜疣的形成,从而促进氧化损伤反应的发生,最终导致 CNV 的形成。

生理条件下,p75 NTR 受体在人体内的 RPE 细胞中是呈现低表达状态的,但是当机体存在一定的损伤状态下,例如缺氧、缺血、各种炎症反应,p75 NTR 受体在人体内的 RPE 细胞中就会过度表达,呈现高表达水平的状态^[9]。据高小燕等研究发现,H₂O₂ 和淀粉样蛋白等相关因素也会影响 p75 NTR 受体在人体内的 RPE 细胞中的表达,因为其可以引起 RPE 细胞的氧化性损伤反应,最终导致 RPE 细胞内的线粒体膜电位的降低、损伤以及细胞凋亡的增多^[10-12]。本研究通过体外培养 RPE 细胞来研究人体内的 p75 NTR 受体和 RPE 氧化损伤之间的联系,我们发现 p75 NTR 受体转染的时间越长,细胞活性也越低,凋亡率越高;实验组的细胞 ROS 阳性百分数为对照组的 2.5 倍。实验组的细胞线粒体标志物阳性率远远低于对照组的 100%±0.00%,由于线粒体膜电位发生的变化会在细

胞凋亡早期,而如果当线粒体膜电位处于去极化状态,细胞色素 C 和 ROS 就会产生更多,而且线粒体本身也是 ROS 氧化损伤的靶点,由此而形成的恶性循环将会进一步加重氧化损伤^[13-14]。同时一旦细胞色素 C 从线粒体释放入细胞质,这将会引起 Caspase 级联反应,从而使得细胞凋亡的程度更重^[15]。实验组细胞色素 C 的表达水平远远高于对照组;实验组的 VEGF₁₆₅ 蛋白、Fas 蛋白及 Caspase-3 的表达水平相对对照组有着明显增高的现象。

综上所述,过度表达的 p75 NTR 受体可导致视网膜色素上皮细胞的细胞线粒体发生损伤,同时还会促进其细胞发生凋亡反应,最终导致脉络膜新生血管的形成,由此可以推测 p75 NTR 受体是导致视网膜色素上皮细胞发生损伤的因素之一。

参考文献

- 1 宋雪,韩勇,籍保平,等. 笃斯越橘花色苷提取物对光损伤人视网膜色素上皮细胞的保护作用. *食品科学* 2012;31(21):324-328
- 2 李静,马勇,王红美,等. 内皮抑素和 avastin 对小鼠脉络膜新生血管抑制作用的比较观察. *国际眼科杂志* 2014;14(6):996-999
- 3 范妍,路宏,侯定善,等. 缺氧条件下 1-磷酸鞘氨醇对人视网膜色素上皮细胞的促增生和抗凋亡作用. *中华实验眼科杂志* 2015;33(1):33-37
- 4 陈秀萍,袁源智,王历阳,等. 中胚层分化蛋白 2 对视网膜色素上皮细胞吞噬功能的影响. *中国病理生理杂志* 2016;32(6):1084-1090
- 5 洪瑾,帅捷,袁志兰,等. 人视网膜色素上皮细胞诱导型一氧化氮合酶和活性氧在高糖状态下的表达. *中国组织工程研究与临床康复* 2011;15(28):5281-5284
- 6 王玲,陈超,刘筠,等. 银杏叶提取物对激光诱导的大鼠脉络膜新生血管的疗效. *国际眼科杂志* 2013;13(11):2179-2181
- 7 Antyborzec I, O'Leary VB, Dolly JO, et al. Low-affinity neurotrophin

receptor p75 promotes the transduction of targeted lentiviral vectors to cholinergic neurons of rat basal forebrain. *Neurotherapeutics* 2016;13(4):859-870

- 8 Ragunathan YT, Madhavan NR, Mohan SP, et al. Immunohistochemical detection of p75 neurotrophin receptor (p75-NTR) in follicular and plexiform melanoblastoma. *J Clin Diagn Res* 2016;10(8):63-66
- 9 Simmons DA, Belichenko NP, Ford EC, et al. A small molecule p75NTR ligand normalizes signalling and reduces Huntington's disease phenotypes in R6/2 and BACHD mice. *Hum Mol Genet* 2016;25(134):41-42
- 10 高小燕,何守志. 细胞间黏附分子-1 在氩激光诱发的大鼠脉络膜新生血管中的动态表达变化. *中华实验眼科杂志* 2015;33(12):1103-1107
- 11 梁超群,陈长征,易佐慧子,等. 玻璃体腔注射 ranibizumab 治疗特发性脉络膜新生血管疗效观察. *中国实用眼科杂志* 2015;33(5):498-501
- 12 刘洪安,曲景灏,张绍丹,等. 纳米级 siRNA 与壳寡糖复合物体内抗脉络膜新生血管作用研究. *中国实用眼科杂志* 2015;33(3):311-315
- 13 Chakravarthy R, Mnich K, Gorman AM. Nerve growth factor (NGF)-mediated regulation of p75 (NTR) expression contributes to chemotherapeutic resistance in triple negative breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;478(4):1541-1547
- 14 Gibon J, Kang MS, Aliaga A, et al. Towards the PET radiotracer for p75 neurotrophin receptor; [(11)C] LM11A-24 shows biological activity *in vitro*, but unfavorable *ex vivo* and *in vivo* profile. *Bioorg Med Chem* 2016;24(19):4759-4765
- 15 Khodorova A, Nicol GD, Strichartz G. The TrkA receptor mediates experimental thermal hyperalgesia produced by nerve growth factor: Modulation by the p75 neurotrophin receptor. *Neuroscience* 2016;25(187):47-49