

表皮生长因子通过 EGFR/AKT 信号通路对视网膜色素上皮细胞增殖和迁徙的影响

陈晓冬^{1,2}, 杨建宇³

基金项目: 中国博士后科学基金面上资助项目 (No. 2015M582044)

作者单位:¹ (710002) 中国陕西省西安市第一医院眼科;
² (361000) 中国福建省厦门市, 厦门大学附属厦门眼科中心;

³ (650000) 中国云南省昆明市, 昆明爱尔眼科医院

作者简介: 陈晓冬, 男, 毕业于中山大学, 眼科学博士, 主治医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 杨建宇, 毕业于昆明医学院, 眼科学硕士, 主治医师, 科主任, 研究方向: 白内障、眼底病. adai2y3j@126.com

收稿日期: 2017-07-21 修回日期: 2018-01-29

Effect of epidermal growth factor on proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells through EGFR/AKT signaling pathway

Xiao-Dong Chen^{1,2}, Jian-Yu Yang³

Foundation item: China Postdoctoral Science Foundation (No. 2015M582044)

¹Department of Ophthalmology, Xi'an No.1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; ²Xiamen Eye Center of Xiamen University, Xiamen 361000, Fujian Province, China; ³Aier Eye Hospital (Kunming), Kunming 650000, Yunnan Province, China.

Correspondence to: Jian - Yu Yang. Aier Eye Hospital (Kunming), Kunming 650000, Yunnan Province, China. adai2y3j@126.com

Received: 2017-07-21 Accepted: 2018-01-29

Abstract

• AIM: To investigate the effect of epidermal growth factor (EGF) on proliferation and migration of retinal pigment epithelial (RPE) cells.

• METHODS: Human RPE cell lines (ARPE-19 cell) were treated with different doses of EGF. The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect cell viability. The 5 - bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay was used to detect cell proliferation and the "scratch-wound assay" was used to detect cell migration ability. The epidermal growth factor receptor (EGFR) and protein kinase B (AKT) proteins were detected by Western blot.

• RESULTS: The MTT assay results showed that treatment with 50 and 100ng/mL EGF for 12h increased ARPE-19 cell viability. The BrdU incorporation assay and the "scratch-wound assay" showed that treatment with

100ng/mL EGF for 24h increased ARPE - 19 cell proliferation and migration. The Western blot results showed that treatment with 10-100ng/mL EGF for 12h or 100ng/mL EGF for 15-180min increased phosphorylation levels of EGFR and decreased total levels of EGFR. Similarly, treatment with 10-100ng/mL EGF for 12h or 100ng/mL EGF for 15-180min increased phosphorylation levels of AKT, but not affected total levels of AKT.

• CONCLUSION: EGF affects ARPE - 19 cell viability, proliferation and migration through inducing phosphorylation of the EGFR/AKT signaling pathway. The EGFR/AKT signaling pathway might play an important role in abnormal proliferation and migration of RPE cells in proliferative vitreoretinopathy.

• KEYWORDS: epidermal growth factor; epidermal growth factor receptor; protein kinase B; retinal pigment epithelial cell

Citation: Chen XD, Yang JY. Effect of epidermal growth factor on proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells through EGFR/AKT signaling pathway. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(3):429-433

摘要

目的: 探讨表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)对视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞增殖和迁徙的影响。

方法: 体外培养人 RPE 细胞株 (ARPE-19 细胞), 给予不同浓度 EGF 处理 ARPE-19 细胞, 通过噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 实验、5-溴脱氧尿苷 (5-bromodeoxyuridine, BrdU) 吸收实验和细胞划痕实验检测 EGF 对 ARPE-19 细胞活力、增殖和迁徙的影响; 通过 Western blot 法检测 EGF 对表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 和蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 蛋白表达的影响。

结果: MTT 实验显示 50、100ng/mL EGF 处理 12h 诱导 ARPE-19 细胞活力增加; BrdU 吸收实验显示 100ng/mL EGF 处理 24h 诱导 BrdU 染色阳性 ARPE-19 细胞数增加; 细胞划痕实验显示 100ng/mL EGF 处理 24h 可以诱导 ARPE-19 细胞迁徙能力增加。Western blot 检测显示使用 10~100ng/mL EGF 处理细胞 12h 或者 100ng/mL EGF 处理细胞 15~180min 均可以诱导磷酸化 EGFR (pEGFR) 表达升高和总 EGFR 表达降低, 同时也可以诱导磷酸化 AKT (pAKT) 表达升高, 但是对总 AKT 表达无显著影响。

结论: EGF 通过 EGFR/AKT 信号通路增加 RPE 细胞的活力、增殖和迁徙能力, 可能对增殖性玻璃体视网膜病变中

RPE细胞的异常增殖和迁徙起到重要作用。

关键词:表皮生长因子;表皮生长因子受体;蛋白激酶B;视网膜色素上皮细胞

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.3.06

引用:陈晓冬,杨建宇.表皮生长因子通过EGFR/AKT信号通路对视网膜色素上皮细胞增殖和迁徙的影响.国际眼科杂志2018;18(3):429-433

0 引言

增殖性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)是一种严重的、威胁视力的视网膜疾病^[1]。近年来的研究显示,视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞在PVR的发生和发展过程中起到关键作用^[2-3]。在PVR的发病过程中,异常的细胞迁徙、增殖和分化在很大程度上受到细胞间传递信号的细胞生长因子的影响^[4]。表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)作为一种重要的细胞生长因子与其特异性受体EGFR(epidermal growth factor receptor)结合,激活一系列的细胞信号传导通路^[5],对RPE细胞的迁徙、增殖和分化起到重要作用^[6-8]。研究表明,EGF的激活可能在PVR的发病机制中发挥重要作用^[9]。本研究主要通过体外实验探讨EGF对RPE细胞活力、增殖和迁徙及其对EGFR和蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人视网膜色素上皮细胞株(ARPE-19细胞)购自美国ATCC(Manassas, VA);DMEM/F12培养基、胎牛血清、胰酶购自美国Gibco公司;噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)购自美国Sigma公司;5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)试剂盒购自美国Selleck公司;EGF购自美国Peprotech公司;p-EGFR和EGFR抗体购自美国CST公司;p-AKT和AKT抗体购自美国Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞活力检测(MTT实验) 将ARPE-19细胞以 1.0×10^4 个/孔接种在96孔板中,在37℃、5% CO₂的湿润环境下孵育12h,给予0、10、50、100ng/mL EGF处理12h,倒置相差显微镜观察细胞形态变化,然后加入含有50μg/mL噻唑蓝的培养液,37.5℃、5% CO₂条件下孵育4h。每孔加入150μL二甲基亚砜,置于水平摇床上,350r/min,振荡10min,使结晶物充分溶解。使用酶联免疫检测仪(POLARstar Omega, BMG LABTECH)于吸光度为570nm处测量各孔的吸光值(A),计算细胞活力,细胞活力= $A_{\text{实验组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$,实验重复3次。

1.2.2 细胞增殖的检测(BrdU吸收实验) 将ARPE-19细胞以 1.0×10^5 个/孔接种于12孔板中的玻璃片上,在37.5℃、5% CO₂的湿润环境下孵育12h至细胞全部贴壁。将细胞分为对照组和EGF处理组,给予100ng/mL EGF诱导24h后加入终浓度为30μmol/L的BrdU,37.5℃孵育4h;然后将细胞爬片用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤3次;使用4%多聚甲醛室温固定30min, PBS洗3次。将细胞在含有2mol/L盐酸的磷酸缓冲盐溶液-吐温20(phosphate buffered saline containing 0.1% Tween-20, PBST)中酸化变性30min。使

用含有5%牛血清白蛋白的PBST室温封闭非特异性抗原1h。用PBS以1:100稀释BrdU抗体,室温孵育2h。PBS洗3次,再使用PBST以1:1000稀释荧光二抗,室温孵育1h, PBS洗3次。使用含有DAPI的抗荧光封片剂封片。荧光显微镜下观察,每张玻片随机取4个视野,计数BrdU染色阳性细胞数,并摄像。细胞增殖率=BrdU染色阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.2.3 细胞迁徙实验(划痕法) 将ARPE-19细胞以 1.0×10^5 个/孔接种于12孔板中,培养24h至细胞全部融合;每组3个复孔,用10μL微量移液器吸头在12孔板内垂直划痕, PBS洗2次,将细胞分为对照组和100ng/mL EGF处理组,37.5℃、5% CO₂的湿润环境下孵育24h,倒置显微镜下观察,测量细胞迁徙距离,并摄像。实验重复3次。

1.2.4 Western blot检测 给予不同浓度的EGF处理ARPE-19细胞,处理完毕后, PBS洗两次。使用等量体积的细胞裂解液裂解细胞,100℃加热10min使蛋白质变性,8000r/min离心2min,提取样品蛋白,在每个聚丙烯酰胺凝胶加样孔加入含等量蛋白的上样缓冲液,恒定电压100V进行电泳40~50min,电泳结束后,接入电转仪将目标蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转移至聚偏氟乙稀膜(polyvinylidene difluoride, PVDF),转膜设置条件为恒定电流300mA,120min,转膜结束后取出PVDF膜浸入5%脱脂奶粉,封闭液室温封闭1~2h。相应一抗(1:1000)4℃孵育过夜;取出PVDF膜, PBST液漂洗3次;相应二抗(1:2000)室温孵育1~2h;使用PBST缓冲液洗膜3次;配制ECL发光液,在暗室中将PVDF膜在发光液中孵育1~5min;在化学发光成像系统(Bio-Rad ChemiDoc XRS system)内将PVDF膜曝光显影,进行多帧图像实时采集,使用Image J图像分析软件进行相对定量分析。β-actin为内参蛋白。实验重复3次。

统计学分析:应用GraphPad Prism 5软件进行统计分析。计量资料使用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组之间的比较使用独立样本t检验;多组之间的比较使用单因素方差分析(ANOVA),组间的两两比较采用Tukey's检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGF对ARPE-19细胞形态和活力的影响 倒置相差显微镜下观察细胞形态显示,对照组ARPE-19细胞呈不规则多边形、铺路石样,簇状分布;分别经10、50、100ng/mL EGF诱导ARPE-19细胞12h后,细胞形态均呈梭形,相比对照组细胞变小(图1A)。MTT实验结果显示,分别使用0、10、50、100ng/mL EGF诱导ARPE-19细胞12h后,细胞活力分别为 $100\% \pm 3.9\%$ 、 $104.3\% \pm 3.4\%$ 、 $106.3\% \pm 4.1\%$ 、 $108.5\% \pm 4.7\%$,差异有统计学意义($F=6.155, P < 0.01$,图1B)。

2.2 EGF对ARPE-19细胞增殖的影响 BrdU吸收实验结果显示,100ng/mL EGF处理细胞24h后, BrdU染色阳性细胞数($70.7\% \pm 3.7\%$)较对照组($49.5\% \pm 5.8\%$)增加了约21%,差异有统计学意义($t=5.578, P < 0.01$,图2)。

2.3 EGF对ARPE-19细胞迁徙的影响 细胞划痕实验结果显示,与对照组相比,100ng/mL EGF处理24h可以诱导ARPE-19细胞迁徙能力增加(图3A)。对照组细胞

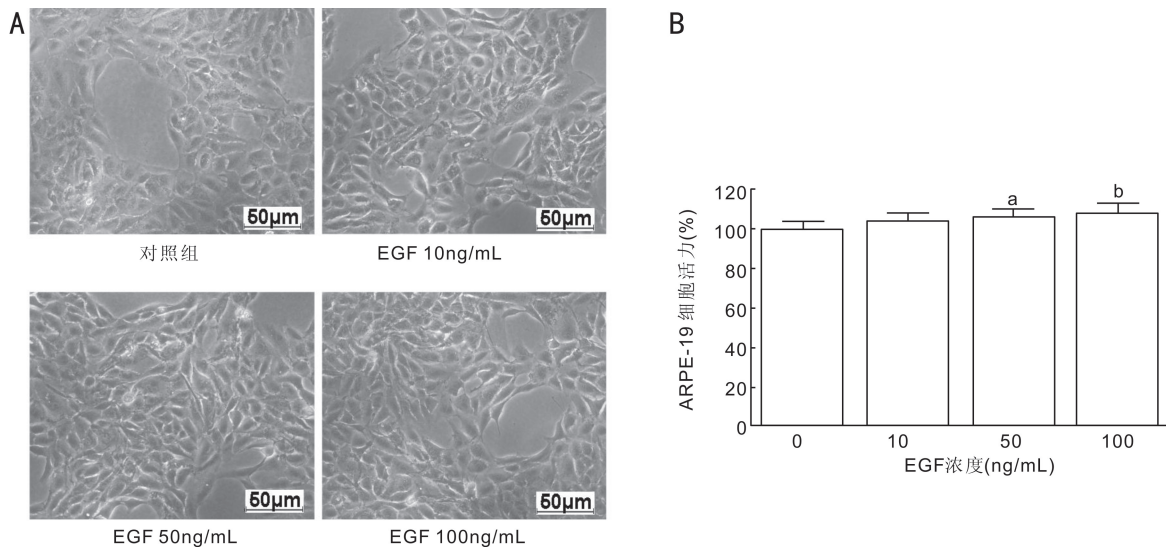


图1 EGF对ARPE-19细胞形态和活力的影响 A:光学倒置相差显微镜观察细胞形态变化;B:MTT实验检测细胞活力,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ vs EGF 0ng/mL。

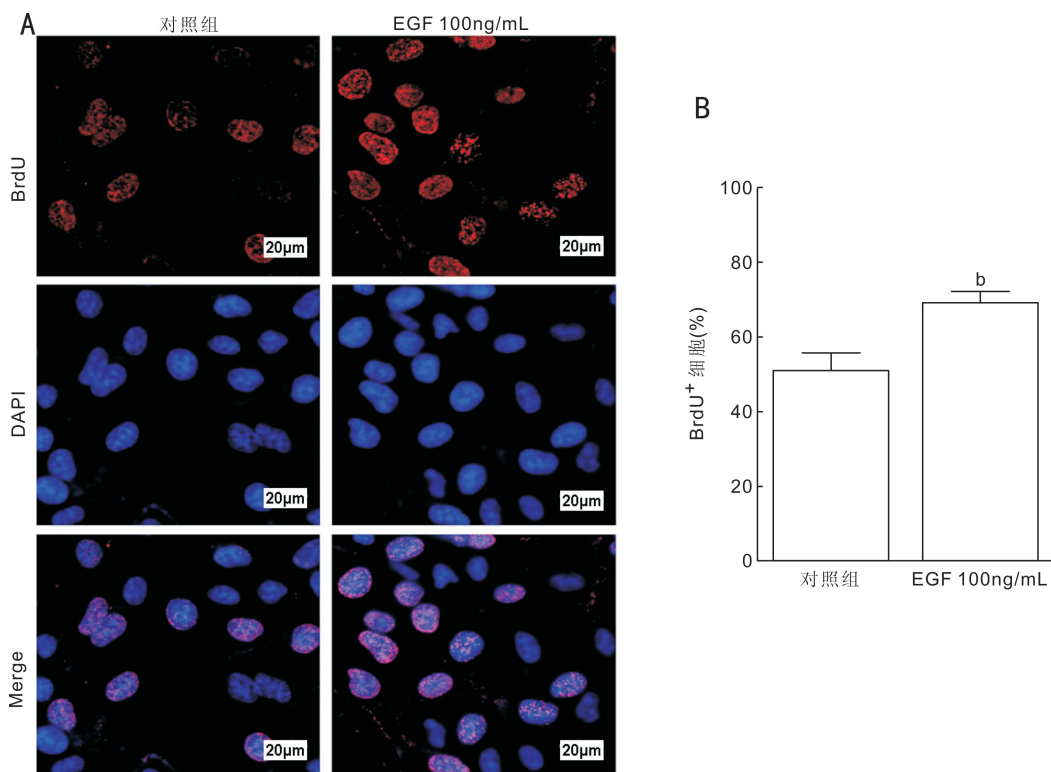


图2 EGF对ARPE-19细胞增殖的影响 A:BrdU吸收实验检测细胞增殖情况;B:BrdU染色阳性细胞计数,^b $P < 0.01$ vs 对照组。

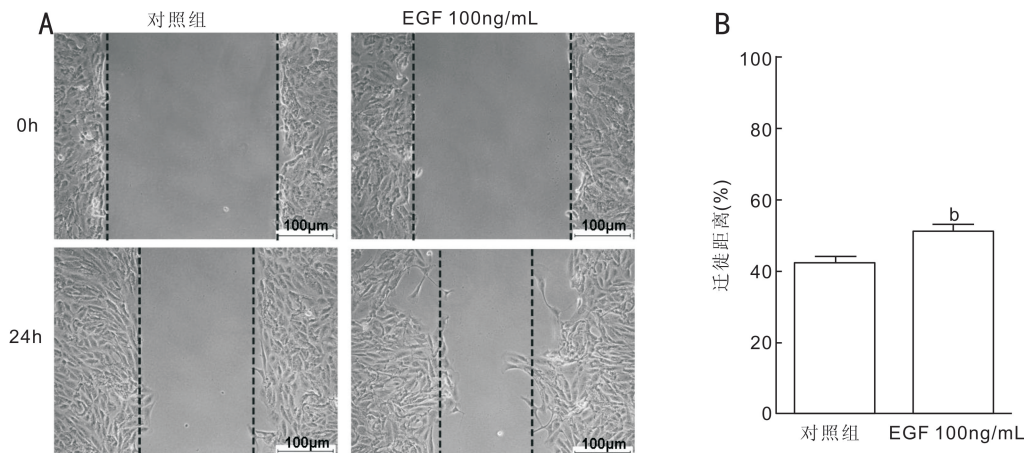


图3 EGF对ARPE-19细胞迁徙的影响 A:细胞划痕实验观察EGF对ARPE-19细胞迁徙的影响;B:EGF对ARPE细胞迁徙距离的影响,^b $P < 0.01$ vs 对照组。

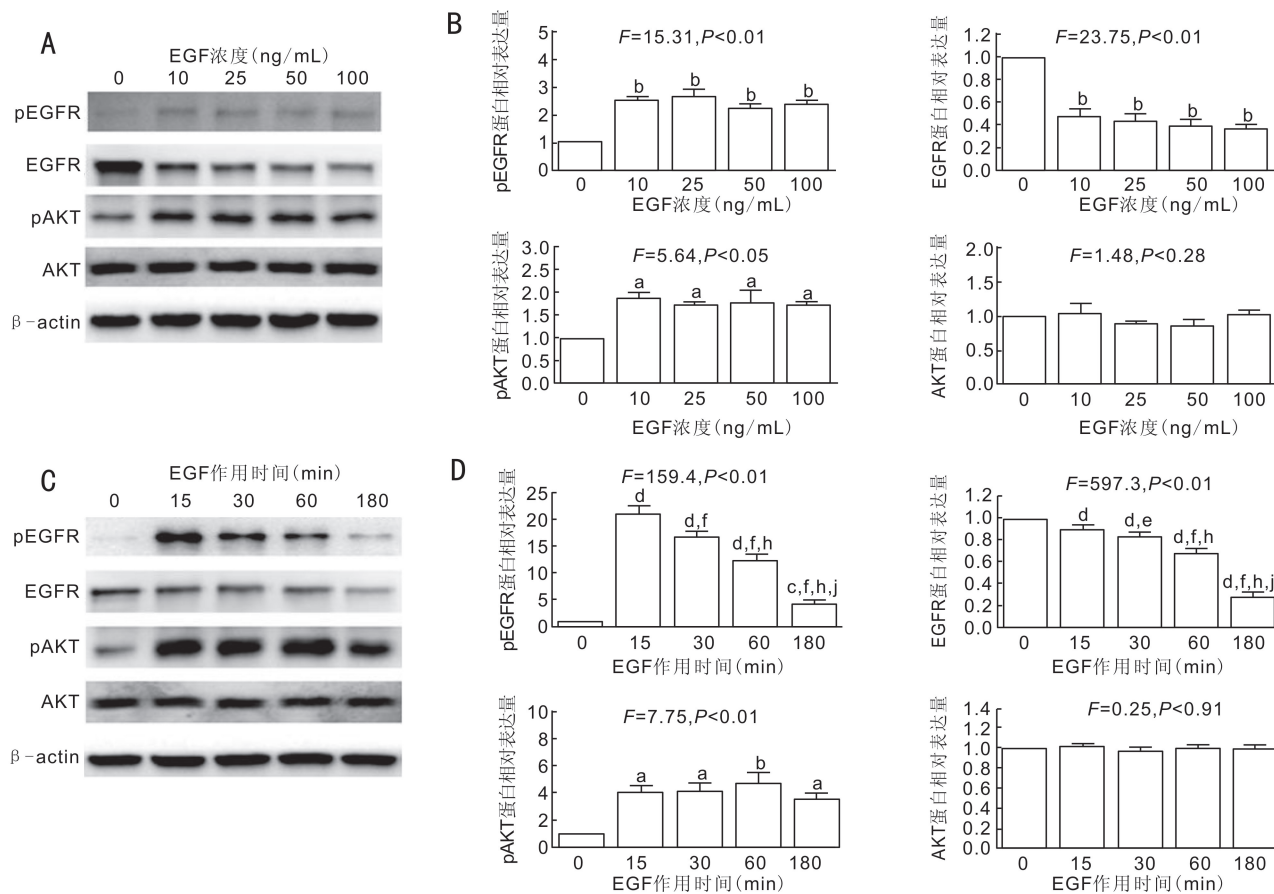


图4 EGF对ARPE-19细胞EGFR/AKT信号通路蛋白的影响 A、C:Western blot法检测EGF对EGFR/AKT信号通路蛋白表达的影响;B、D:量化分析EGF对EGFR/AKT信号通路蛋白表达的影响,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ vs EGF 0ng/mL;^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ vs EGF 0min;^e $P < 0.05$,^f $P < 0.01$ vs EGF 15min;^g $P < 0.01$ vs EGF 30min;^h $P < 0.01$ vs EGF 60min。^j $P < 0.01$ vs EGF 60min。

24h 迁徙距离为划痕的 $42.0\% \pm 2.0\%$, 100ng/mL EGF 处理组细胞 24h 迁徙距离为划痕的 $51.3\% \pm 1.9\%$, 与对照组相比约增加了 9%, 差异有统计学意义 ($t = 5.771, P < 0.01$, 图 3B)。

2.4 EGF 诱导 ARPE-19 细胞 EGFR/AKT 蛋白磷酸化

Western blot 检测结果显示, 与对照组比较, 10、25、50、100ng/mL EGF 处理细胞 12h 可以引起磷酸化 EGFR (pEGFR) 和磷酸化 AKT (pAKT) 表达增高, 总 EGFR 表达降低, 但是对总 AKT 表达无显著影响 (图 4A、B)。100ng/mL EGF 分别处理细胞 15、30、60、180min 对 EGFR/AKT 信号通路有显著影响, 结果显示, 处理 15min 时 pEGFR 表达显著升高, 然后随着时间的延长逐渐降低, 但处理 180min 时仍高于对照组; 而总 EGFR 表达水平下降; pAKT 表达显著升高, 处理 60min 达到最高值; 但是对总 AKT 表达无显著影响 (图 4C、D)。

3 讨论

RPE 细胞是位于光感受器外节和脉络膜毛细血管层之间的一层单层色素细胞, 也是构成血-视网膜屏障的一个重要组成部分, 对于维持视网膜的正常生理功能具有重要意义。成熟 RPE 细胞的有丝分裂在正常生理条件下是静止的, 但是在神经视网膜遭受损伤时, RPE 细胞开始出现增殖及分化^[10]。近年来的研究显示, RPE 细胞在 PVR 的发生和发展过程中起到关键作用^[2-3]。RPE 细胞几乎均出现在 PVR 患者的视网膜前膜中, 并且具有巨噬细胞或成纤维细胞的形态特征^[11-12]。在 PVR 的发病过程中, 异常的细胞迁徙、增殖和分化在很大程度上受到细胞间传

递信号的细胞生长因子的影响^[4]。研究发现, EGF 是引起 RPE 细胞增殖的重要因素^[6]。Defoe 等^[7]报道 EGF 通过磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路促进 RPE 细胞存活。EGF 可以诱导 EGF-EGFR-MAPK 信号通路, 促进 RPE 细胞增殖和迁徙^[8]。Zhang 等^[13]发现 EGF 诱导的 EGFR-PI3K-AKT 信号通路在 RPE 细胞迁徙过程中起显著作用。国内研究报道显示, EGF 对体外培养的人 RPE 细胞具有浓度依赖性促增生和移行的作用^[14]; 陈震等^[15-16]报道 EGF 通过激活 ERK1/2 通路刺激人 RPE 细胞整合素 $\alpha-5$ mRNA 和蛋白的表达, 进而促进人 RPE 细胞增生和迁移。此外, 已有研究显示 EGFR 在 PVR 发展过程中的视网膜前膜有阳性表达, 对视网膜前膜形成起到重要作用^[17-19]。本研究结果显示, EGF 可以增加 ARPE-19 细胞活力、增殖和迁徙能力, 促使 EGFR 和 AKT 蛋白的磷酸化水平升高, 提示 EGF 促进 RPE 细胞活力、增殖和迁徙能力可能与 EGFR/AKT 信号通路有关; 100ng/mL EGF 处理 12h 即可以诱导 ARPE-19 细胞 EGFR/AKT 蛋白磷酸化水平升高, 细胞活力增强, 而处理 24h 可以引起细胞增殖和迁徙能力增强, 这提示 EGF 对 ARPE-19 细胞的影响与其有效浓度和处理时间有关。综上所述, EGF 诱导的 EGFR/AKT 信号通路可能在 PVR 发病过程中发挥重要作用, 该通路可能是防治 PVR 中 RPE 细胞异常增殖和迁徙的重要靶点, 这些研究结果尚需通过一些体内实验或临床研究进一步验证。

参考文献

- 1 Tosi GM, Marigliani D, Romeo N, *et al.* Disease pathways in proliferative vitreoretinopathy: an ongoing challenge. *J Cell Physiol* 2014; 229(11):1577-1583
- 2 Pastor JC, de la Rúa ER, Martín F. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Prog Retin Eye Res* 2002;21(1):127-144
- 3 Pastor JC, Rojas J, Pastor - Idoate S, *et al.* Proliferative vitreoretinopathy: A new concept of disease pathogenesis and practical consequences. *Prog Retin Eye Res* 2016;51:125-155
- 4 Morescalchi F, Duse S, Gambicorti E, *et al.* Proliferative vitreoretinopathy after eye injuries: an overexpression of growth factors and cytokines leading to a retinal keloid. *Mediators Inflamm* 2013; 2013:269787
- 5 Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141(7):1117-1134
- 6 Steindl - Kuscher K, Boulton ME, Haas P, *et al.* Epidermal growth factor; the driving force in initiation of RPE cell proliferation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249(8):1195-1200
- 7 Defoe DM, Grindstaff RD. Epidermal growth factor stimulation of RPE cell survival; contribution of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *Exp Eye Res* 2004;79(1):51-59
- 8 Yan F, Hui YN, Li YJ, *et al.* Epidermal growth factor receptor in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmologica* 2007; 221(4):244-250
- 9 Baudouin C, Fredj-Reygrobelle D, Brignole F, *et al.* Growth factors in vitreous and subretinal fluid cells from patients with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res* 1993;25(1):52-59
- 10 Chiba C. The retinal pigment epithelium; an important player of retinal disorders and regeneration. *Exp Eye Res* 2014;123:107-114
- 11 Charteris DG. Proliferative vitreoretinopathy: pathobiology, surgical management, and adjunctive treatment. *Br J Ophthalmol* 1995;79(10): 953-960
- 12 Casaroli - Marano RP, Pagan R, Vilaró S. Epithelial - mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy: intermediate filament protein expression in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(9):2062-2072
- 13 Zhang L, Wang F, Jiang Y, *et al.* Migration of retinal pigment epithelial cells is EGFR/PI3K/AKT dependent. *Front Biosci (Schol Ed)* 2013;5:661-671
- 14 闫峰, 惠延年, 王雨生, 等. 表皮生长因子对人视网膜色素上皮细胞增生及移行的影响. *眼科新进展* 2004;24(6):417-421
- 15 陈震, 邢怡桥, 陈长征. EGF 诱导人 RPE 细胞表达整合素 α -5 过程中丝裂原激活的蛋白激酶的作用. *眼科研究* 2010;28(1):62-65
- 16 陈震, 邢怡桥, 陈长征. 表皮生长因子诱导人视网膜色素上皮细胞整合素 α -5 表达对细胞增生和迁移的影响. *中华眼底病杂志* 2010; 23(3):267-270
- 17 Heidenkummer HP, Kampik A. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor receptor in a human epiretinal membrane. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1991;229(5):492-496
- 18 Ducourmau Y, Boscher C, Adelman RA, *et al.* Proliferation of the ciliary epithelium with retinal neuronal and photoreceptor cell differentiation in human eyes with retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012; 250(3): 409-423
- 19 Yan F, Hui Y. Epidermal growth factor receptor exists in the early stage of proliferative vitreoretinopathy. *Can J Ophthalmol* 2012;47(5): e24-25