

吡哆胺对 AGEs 干预的人 RPE 细胞的保护作用

周敏¹, 黄焱², 赖巧玲², 邓云平¹

基金项目:2016年福建省自然科学基金项目(No.2016J01155)
作者单位:¹(518000)中国广东省深圳市,中山大学附属第七医院眼科;²(350004)中国福建省福州市,福建医科大学医学技术与工程学院眼视光系
作者简介:周敏,硕士,住院医师,研究方向:眼科学基础与临床。
通讯作者:黄焱,教授,研究方向:眼科学基础与临床。
13960888823@139.com
收稿日期:2018-06-08 **修回日期:**2018-08-28

Protective effect of pyridoxamine on RPE cells treated with AGEs

Min Zhou¹, Yan Huang², Qiao-Ling Lai², Yun-Ping Deng¹

Foundation item: Natural Science Foundation of Fujian Province in 2016(No.2016J01155)

¹Department of Ophthalmology, The Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China; ²Department of Ophthalmology and Optometry, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian Province, China

Correspondence to: Yan Huang. Department of Ophthalmology and Optometry, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian Province, China. 13960888823@139.com

Received:2018-06-08 Accepted:2018-08-28

Abstract

• **AIM:** To observe the effects of pyridoxamine (PM) on RAGE, ROS and apoptosis in RPE cells treated with advanced glycation end products (AGEs), and to investigate the protective effect of PM on RPE cells in diabetic retinopathy.

• **METHODS:** Primary cultured human RPE cells, the third generation of cells were synchronized with serum-free Dulbecco-modified Eagle medium for 24h, and then grouped: 1) Control group: cultured with 100mg/L BSA for 48h; 2) AGEs-treated group: cultured with 200mg/L AGEs for 48h; 3) PM group: PM1 group: cultured with 16mg/L PM + 200mg/L AGEs for 48h; PM2 group: cultured with 32mg/L PM + 200mg/L AGEs for 48h. The expression of RAGE protein was detected by immunohistochemistry. The formation of ROS was observed by fluorescence microscopy. The apoptosis of cells was detected by TUNEL.

• **RESULTS:** The expression of RAGE protein, ROS and apoptosis of RPE cells in PM group were significantly lower than those in AGEs-treated group, and decreased with the increase of PM concentration.

• **CONCLUSION:** Pyridoxamine can inhibit the expression of RAGE and the production of ROS, reduce apoptosis, and have a protective effect on RPE cells.

• **KEYWORDS:** pyridoxamine; advanced glycosylation end products; RAGE; retinal pigment epithelium cells; apoptosis

Citation: Zhou M, Huang Y, Lai QL, et al. Protective effect of pyridoxamine on RPE cells treated with AGEs. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(10):1778-1781

摘要

目的:观察吡哆胺(PM)对高级糖基化终末产物(AGEs)干预的RPE细胞的影响,探讨PM对RPE细胞的保护作用。

方法:取传代至第3代的细胞进行分组:(1)对照组:含100mg/L BSA的DMEM培养基培养48h;(2)AGEs干预组:含200mg/L AGEs的DMEM培养基培养48h;(3)PM组:PM1组:含16mg/L PM+200mg/L AGEs的DMEM培养基培养48h;PM2组:含32mg/L PM+200mg/L AGEs的DMEM培养基培养48h。采用免疫组织化学法检测RAGE蛋白的表达;荧光染色法观察细胞内ROS的生成;Tunel法检测细胞凋亡情况。

结果:AGEs可明显刺激RPE细胞内RAGE蛋白的表达和ROS的生成,增加细胞凋亡情况,而PM可抑制该过程,且具有一定的浓度依赖性。

结论:PM能够抑制AGEs干预的RPE细胞内RAGE蛋白的表达和ROS生成,减少细胞凋亡,具有一定的细胞保护作用。

关键词:吡哆胺;高级糖基化终末产物;RAGE;视网膜色素上皮细胞;细胞凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.10.05

引用:周敏,黄焱,赖巧玲,等.吡哆胺对AGEs干预的人RPE细胞的保护作用.国际眼科杂志2018;18(10):1778-1781

0 引言

糖尿病视网膜病变(DR)是目前致盲的主要眼病之一。高级糖基化终末产物(AGEs)的堆积是DR的主要致病因素^[1]。AGEs通过与细胞膜上的特异性RAGE结合引起氧自由基、细胞因子、激素等物质表达水平发生改变,导致相关蛋白质表达的改变^[2]。目前的研究发现,通过AGEs-RAGE通路可触发活性氧(ROS)生成并激活下游信号通路,诱导细胞凋亡。视网膜色素上皮(RPE)细胞是视网膜外屏障的组成部分,参与维持视网膜的生理功能。因此,本研究采用AGEs干预RPE细胞,通过检测其特异性受体RAGE的表达、ROS的生成及细胞凋亡情况,探讨吡哆胺对人RPE细胞的作用,为DR的防治提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选取自愿捐献的健康人角膜移植供体眼 6 眼(意外死亡 4h 内),由福建医科大学附属第一医院眼科提供。牛血清白蛋白(BSA,美国 Sigma 公司),细胞培养液(DMEM)、0.25%胰蛋白酶、青霉素-链霉素、二甲基亚砜(DMSO)、胎牛血清(美国 Hyclone 公司),兔抗人 RAGE 抗体、Tunel 检测试剂盒(武汉博士德公司),DAB 显色试剂盒、超敏 SP(鼠/兔)试剂盒(福州迈新公司),活性氧检测试剂盒(碧云天公司)。倒置显微镜(日本 OLYMPUS CKX41)、荧光显微镜(OLYMPUS IX73)。

1.2 方法

1.2.1 AGEs 的制备 将 PMSF、D-葡萄糖、BSA 溶解于 0.2mmol/L PBS 溶液中,使其终浓度依次为 1.0mmol/L、500mmol/L、10mg/mL。灭菌过滤后,37℃避光孵育 2mo,用 PBS 溶液透析 48h 去除游离葡萄糖,采用 BCA 法测定蛋白浓度,在波长 400~700nm、缝宽 5nm 的荧光分光光度仪进行鉴定后,分装到 EP 管中,近期使用的置于 4℃避光保存,其余的置于-20℃,避光,长期保存^[3]。

1.2.2 原代人 RPE 细胞的培养和鉴定 在无菌超净工作台内,取完整的供体眼球,修剪眼球壁结缔组织,用含 0.2%青霉素-链霉素的 PBS 缓冲液冲洗干净,在角膜缘后约 3.5mm 处环形剪开眼球壁,去除眼前段和玻璃体。将眼后段放在自制的眼球托上制成眼杯,用无血清 DMEM 培养基冲洗,玻璃滴管小心吹打至黄白色的视网膜神经上皮层完全脱离,用无血清 DMEM 培养基冲洗干净。眼杯中加入 0.25%胰蛋白酶 3mL,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 10min,弃去液体。再加入 0.25%胰蛋白酶 3mL,于 37℃、5% CO₂ 培养箱消化 30min,加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化,用滴管轻轻敲打眼球内壁,使 RPE 细胞脱落。收集细胞悬液,1000r/min 离心 10min,弃上清。重悬细胞,接种至培养瓶,于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。原代 RPE 细胞 12h 内陆续贴壁,24h 或 72h 倒置显微镜下观察显示细胞的形态为不规则多角形,胞质内有大量黑色素颗粒,核大且透明;荧光显微镜下自发红色荧光;每周换液 2 次,细胞单层融合时进行传代,传代后细胞形态规则,呈六角形或梭形,呈铺路石样排列^[4]。

1.2.3 实验分组 取传代至第 3 代的细胞接种于 6 孔板中,待细胞贴壁并长满约 70% 时,用无血清的 DMEM 培养基培养 24h 后,根据以下分组条件处理细胞:(1)对照组:含 100mg/L BSA 的 DMEM 培养基培养 48h;(2)AGEs 干预组:含 200mg/L AGEs 的 DMEM 培养基培养 48h;(3)PM 组:PM1 组:含 16mg/L PM+200mg/L AGEs 的 DMEM 培养基培养 48h;PM2 组:含 32mg/L 吡哆胺(PM)+200mg/L AGEs 的 DMEM 培养基培养 48h。

1.2.4 免疫组化法检测 RAGE 蛋白的表达 根据实验条件处理各组细胞后,按照免疫组化试剂盒说明书的具体步骤操作:弃培养液,PBS 缓冲液洗涤 3 次,3min/次;用细胞固定液(100μL/孔)固定 15min,PBS 缓冲液洗涤 3 次,3min/次;每孔加入 2 滴 A 液,室温孵育 10min,PBS 缓冲液洗涤 3 次,3min/次;每孔加 2 滴 B 液,室温孵育 10min;每孔加入 100μL 一抗(1:100),阴性对照组加等体积 PBS 缓冲液,37℃孵育 2h,PBS 缓冲液洗涤 3 次,5min/次;加入二抗(C 液),室温孵育 15min,PBS 缓冲液洗涤 3 次,5min/次;每孔滴 2 滴 D 液,室温孵育 10min,PBS

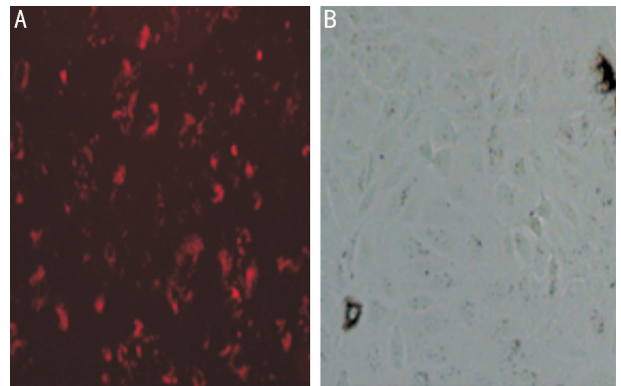


图 1 人 RPE 细胞的鉴定($\times 100$) A:原代人 RPE 细胞;B:传代后的人 RPE 细胞。

缓冲液洗涤 3 次,3min/次;每孔加 DAB 溶液显色 2min,自来水下冲洗至无浮色。苏木素复染 4min,自来水下冲洗至无浮色。脱水、透明、封片:依次经过 75%(5min)、85%(5min)、95%(5min)、100%(5min,2 次)乙醇脱水;二甲苯透明 2 次,每次 5min;中性树脂封片,显微镜下观察。阳性细胞的细胞膜或胞浆内呈棕黄色着色,抗原强度与颜色深度成正比。显微镜下($\times 200$)选取 10 个视野,设置固定的相机参数拍照,用 IPP 6.0 软件计算积分光密度(IOD)值。

1.2.5 荧光染色法观察 ROS 生成 根据实验条件处理各组细胞后,按照试剂盒说明书具体步骤操作:用无血清 DMEM 培养基稀释 DCFH-DA(1:1000)浓度为 10μL/L;弃细胞培养液,加入稀释好的 DCFH-DA 1.5mL/孔;37℃孵育 20min;用无血清 DMEM 培养基洗涤 3 次,在荧光显微镜下观察 ROS 生成情况。

1.2.6 Tunel 法检测细胞凋亡 根据实验条件处理各组细胞后,加入细胞固定液 100μL/孔,室温固定 60min,洗涤;加入新鲜配制的 3% H₂O₂,室温放置 10min,洗涤;加 0.1% Triton X-100 破膜 8min,洗涤;加标记缓冲液 20μL/片,将样品置于湿盒中,37℃放置 2h,洗涤;加封闭液 50μL/片,室温放置 30min,甩掉封闭液;滴加抗体稀释液 50μL/片至标本片上,37℃湿盒反应 30min,洗涤;用抗体稀释液 1:100 稀释 SABC 50μL/片加至切片,37℃反应 30min,洗涤;DAB 显色 5min,自来水冲洗;苏木素轻度复染 3min,洗涤;脱水、透明、封片后至显微镜下观察,凋亡细胞细胞核呈黄色。设置固定的相机参数拍照,显微镜下($\times 200$)选取 10 个视野,计数凋亡细胞数。

统计学分析:采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。计量资料采用均数±标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 人 RPE 细胞的鉴定 荧光显微镜下观察,原代人 RPE 细胞呈六角形,略呈球形,细胞浆内有大量褐色或黑色颗粒,自发红色荧光(图 1A)。光学显微镜下观察,传代后的人 RPE 细胞形态规则,呈六角形或梭形,呈铺路石样排列(图 1B)。

2.2 免疫组化法检测 RAGE 蛋白的表达 显微镜下观察,RAGE 在胞浆内表达,呈棕黄色(图 2)。对照组、AGEs 干预组、PM1 组、PM2 组的 IOD($\times 10^3$)值依次为 5.65±0.82、13.12±1.16、8.87±0.98、6.46±0.91,差异有统计学意义($F = 118.3, P < 0.05$),表明 AGEs 可明显刺

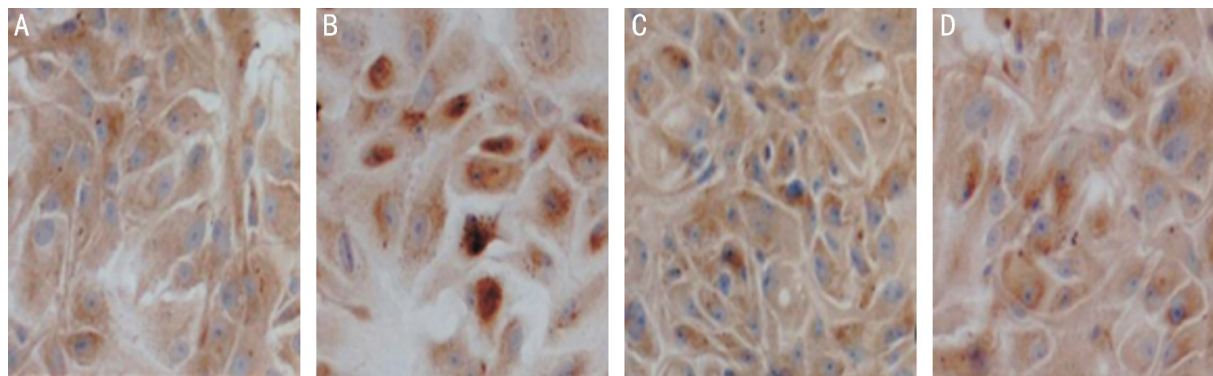


图2 各组 RPE 细胞 RAGE 蛋白的表达($\times 200$) A:对照组;B:AGEs 干预组;C:PM1 组;D:PM2 组。

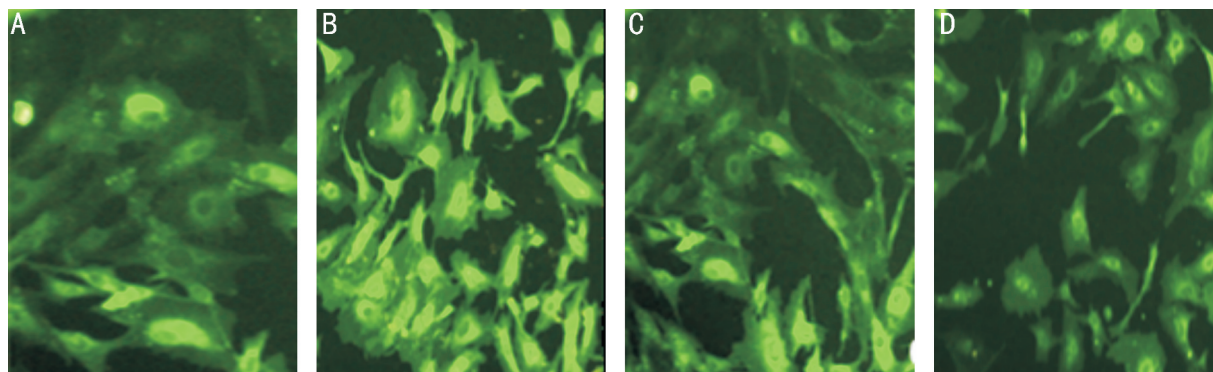


图3 各组 RPE 细胞 ROS 的生成($\times 200$) A:对照组;B:AGEs 干预组;C:PM1 组;D:PM2 组。

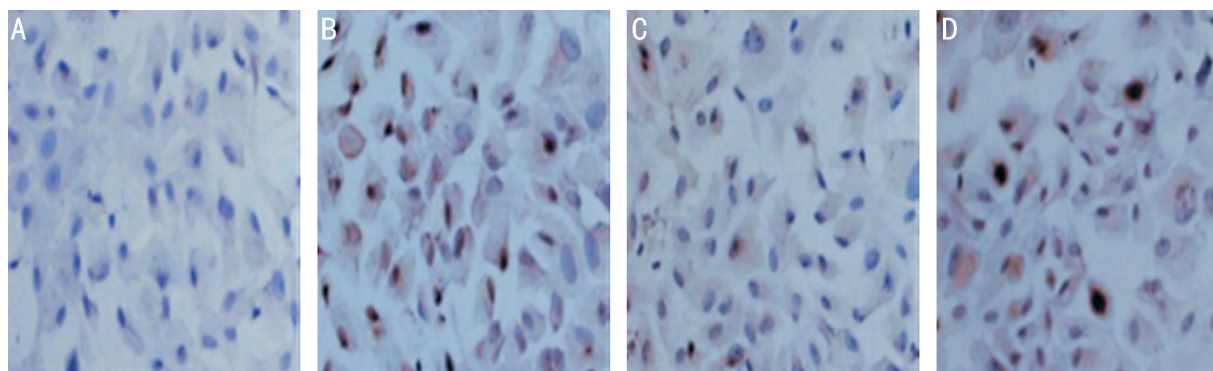


图4 各组 RPE 细胞凋亡情况($\times 200$) A:对照组;B:AGEs 干预组;C:PM1 组;D:PM2 组。

激 RAGE 蛋白的表达,PM 可抑制 RAGE 蛋白的表达,且随着 PM 浓度增加 RAGE 蛋白表达降低。

2.3 荧光染色法观察 ROS 的生成 荧光显微镜下观察,胞浆内 ROS 呈翠绿色荧光(图3)。AGEs 干预组细胞内 ROS 的生成明显增多,PM 组细胞内 ROS 的生成较 AGEs 干预组明显减少,且具有浓度依赖性。

2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡 光学显微镜下观察,凋亡细胞细胞核呈棕黄色,阴性细胞细胞核呈蓝色,对照组几乎未见凋亡细胞,AGEs 干预组细胞凋亡明显增加,PM 组较 AGEs 干预组减少,且随着 PM 浓度增加细胞凋亡减少(图4)。对照组、AGEs 干预组、PM1 组、PM2 组的阳性细胞数依次为 0.40 ± 0.54 、 10.60 ± 1.14 、 5.40 ± 0.55 、 3.00 ± 0.71 个,差异有统计学意义($F=314.7, P<0.05$)。

3 讨论

DR 是糖尿病最常见的微血管并发症之一。据估计,至 2030 年全球 DR 患者人数将增至 1.9 亿,是劳动人群致盲的首要原因^[5]。目前,DR 的治疗效果仍不理想,是眼科临床研究的热点和难点。DR 的发病机制极其复杂,至今仍未完全阐明,尽管涉及许多途径,但已经证实,AGEs-

RAGE 在糖尿病患者的视网膜中上调,通过激活促氧化剂和促炎信号传导途径,在持续性炎症、神经变性和视网膜微血管功能障碍中发挥重要作用,导致 DR 的发生。RAGE 在视网膜的所有细胞中均可表达,AGEs 通过上调 RAGE mRNA 表达,与 RAGE 相互作用,激活还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶^[6],促进 ROS 生成,诱导细胞凋亡,促进 AGEs 破坏视网膜,导致 DR 的发生^[7]。本研究采用 AGEs 直接作用于 RPE 细胞,检测细胞内 RAGE 蛋白的表达,结果表明 AGEs 可上调 RAGE 蛋白的表达,且经 AGEs 干预的 RPE 细胞内 ROS 生成和细胞凋亡明显高于对照组。本研究证实,AGEs-RAGE 通路激活后,可激活促氧化剂 ROS 的生成,造成细胞损伤,导致细胞凋亡,但 AGEs-RAGE 通路是通过激活 ROS 诱导细胞凋亡还是直接诱导细胞凋亡尚不明确,仍需进一步研究。

PM 是维生素 B6 的一种天然形式,作为 AGEs 的抑制剂最早由 Hudson 发现,在高糖条件下能够抑制 post-Amadori 反应,清除活性羰基中间产物。生理条件下,在核

糖核酸酶(RNase)和乙二醛/羟乙醛的反应中,PM可抑制赖氨酸残基的修饰、保护RNase活性。郑炜平等^[8]研究发现,PM能降低血清AGEs和心肌RAGE mRNA的表达。本课题组前期研究发现吡哆胺可减少糖尿病大鼠视皮质中AGEs的堆积和RAGE的表达,减轻AGEs-RAGE通路引起的组织损伤,保护视皮质^[9]。研究发现,PM能够降低糖尿病大鼠视网膜中AGEs的含量,可用于治疗DR^[10]。关于PM作用机制的研究表明其能清除糖和脂质氧化引起的活性羰基物质(RCS)和ROS生成。Thotala等^[11]研究证明,PM通过清除或抑制大鼠小肠上皮细胞内的ROS和活性羰基物质(RCE),抑制细胞凋亡。本研究结果显示,PM组的人RPE细胞中RAGE蛋白的表达、ROS的生成和细胞凋亡明显低于AGEs干预组,且呈浓度依赖性,表明PM可以阻断AGEs-RAGE通路,直接抑制细胞内RAGE的表达,从而阻止AGEs-RAGE通路介导的氧化应激和组织损伤,对细胞具有一定的保护作用。此外,PM组细胞内ROS的生成和细胞凋亡减少表明PM可以抑制AGEs对人RPE细胞的损伤,但PM抑制ROS的生成和细胞凋亡的具体作用机制并不明确,仍需进行大量研究以进一步明确。

综上所述,本研究结果表明,PM可能通过降低细胞内RAGE的表达,抑制AGEs与RAGE结合及ROS的生成,减少细胞凋亡,其也可直接清除或抑制细胞内ROS的生成,发挥细胞保护作用,延缓DR的发生发展。

参考文献

- 1 Stitt AW. AGEs and diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(10):4867-4874
- 2 Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T. Advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) system in diabetic retinopathy. *Curr Drug Discov Technol* 2006;3(1):83-88
- 3 黄焱,周敏,郑卫东,等.高级糖基化终末产物对人视网膜色素上皮细胞的作用机制研究. *中华眼底病杂志* 2013;29(5):510-513
- 4 Huang Y, Xu G, Peng Y, et al. Photodynamic effects of ZnPcS(4)-BSA in human retinal pigment epithelium cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009;25(3):231-238
- 5 Zheng Y, He M, Congdon N. The worldwide epidemic of diabetic retinopathy. *Indian J Ophthalmol* 2012;60(5):428-431
- 6 Thomas MC, Forbes JM, Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic nephropathy. *Am J Ther* 2005;12(6):562-572
- 7 Zong H, Ward M, Stitt AW. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep* 2011;11(4):244-252
- 8 郑炜平,朱鹏立,李峰,等.吡哆胺和替米沙坦对自发性高血压大鼠心肌重塑相关指标的影响. *中国循环杂志* 2015;30(7):689-693
- 9 黄焱,郑卫东,修惠平,等.吡哆胺对糖尿病大鼠视皮质AGE-RAGE系统的影响. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2014;23(1):55-59
- 10 Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, et al. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes* 2002;51(9):2826-2832
- 11 Thotala D, Cheytrkin S, Hudson D, et al. Pyridoxamine protects intestinal epithelium from ionizing radiation-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2009;47(6):779-785