

阿柏西普对体外培养的视网膜 Müller 细胞膜离子通道的影响

雷琦峰, 蔡 维

引用: 雷琦峰, 蔡维. 阿柏西普对体外培养的视网膜 Müller 细胞膜离子通道的影响. 国际眼科杂志 2019;19(4):547-550

基金项目: 2015~2016 年度湖北省卫生计生西医药类一般资助项目 (No. WJ2015MB218)

作者单位: (442000) 中国湖北省十堰市, 湖北医药学院附属东风医院眼科

作者简介: 雷琦峰, 男, 毕业于武汉大学, 硕士, 主治医师, 研究方向: 玻璃体视网膜病变。

通讯作者: 蔡维, 男, 硕士, 主任医师, 副教授, 研究方向: 白内障、玻璃体视网膜病变. caiwei384@163.com

收稿日期: 2018-11-08 修回日期: 2019-03-12

摘要

目的: 探讨阿柏西普对体外培养的高糖环境下视网膜 Müller 细胞膜 K⁺ 通道的影响。

方法: 人 Müller 细胞分为 3 组: 对照组 (常规 DMEM 培养基培养)、高糖组 (高糖 DMEM 培养基培养)、实验组 (高糖 DMEM 培养基和 100 μmol/L 阿柏西普处理)。采用荧光探针检测细胞 K⁺ 浓度, MTT 法检测细胞存活率, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, Western blot 法检测 Müller 细胞 caspase-3 蛋白水平。

结果: Müller 细胞培养 48h 后呈现谷氨酰胺合成酶 (GS) 阳性, 纯化度在 90% 以上。荧光检测显示对照组、高糖组、实验组 K⁺ 相对浓度分别为 (2.14 ± 0.44)%、(23.11 ± 4.39)%、(5.20 ± 0.92)%、细胞存活率分别为 (100.00 ± 0.00)%、(73.24 ± 4.13)%、(85.22 ± 5.33)%、细胞凋亡率分别为 (5.03 ± 1.91)%、(26.73 ± 3.14)%、(16.63 ± 2.73)% (均 P < 0.05)。与对照组相比, 高糖组 Müller 细胞内 caspase-3 蛋白水平显著上升 (P < 0.05); 与高糖组 Müller 细胞相比, 实验组 Müller 细胞内 caspase-3 蛋白水平显著降低 (P < 0.05)。

结论: 阿柏西普可抑制体外培养的高糖环境下视网膜 Müller 细胞膜 K⁺ 通道, 抑制高糖诱导的 Müller 细胞凋亡, 降低 caspase-3 蛋白表达水平, 促进细胞增殖。

关键词: 视网膜; Müller 细胞; 膜离子通道; 阿柏西普

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.4.04

Effects of Aflibercept on ion channel of retinal Müller cell membrane cultured *in vitro*

Qi-Feng Lei, Wei Cai

Foundation item: Research Project of Hubei Provincial Health and Family Planning Commission in 2015-2016 (No. WJ2015MB218)

Department of Ophthalmology, Dongfeng Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Correspondence to: Wei Cai. Department of Ophthalmology, Dongfeng Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China. caiwei384@163.com

Received: 2018-11-08 Accepted: 2019-03-12

Abstract

• AIM: To investigate the effects of Aflibercept on the K⁺ channel of retinal Müller cell membrane cultured *in vitro*.

• METHODS: Human Müller cells were divided into 3 groups (control group, high glucose group and experimental group). The control group were cultured in conventional DMEM medium; the high glucose group were cultured in high glucose DMEM medium; the experimental group were cultured with high glucose DMEM medium and 100 μmol/L Aflibercept, and the K⁺ concentration of the cells were detected by MQAE, and the cell survival were detected by MTT assay, the flow cytometry were used to detect apoptosis rates, Western blot analysis were used to detect the Müller cell caspase-3 protein levels.

• RESULTS: The Müller cells were positive for glutamine synthetase (GS) after 48h of culture, and the purification degree were above 90%. The relative concentrations of K⁺ in the control group, high glucose group and experimental group were (2.14 ± 0.44)%, (23.11 ± 4.39)%, (5.20 ± 0.92)%, and cell viability were (100.00 ± 0.00)%, respectively (73.24 ± 4.13)%, (85.22 ± 5.33)%, the apoptosis rates were (5.03 ± 1.91)%, (26.73 ± 3.14)%, (16.63 ± 2.73)%, and compared the differences between two groups were statistically significant (P < 0.05). Compared with the control group, the level of caspase-3 protein in the high glucose group Müller cells were increased significantly (P < 0.05); compared with the high glucose group Müller cells, the caspase-3 protein level in the experimental group Müller cells were decreased significantly (P < 0.05).

• CONCLUSION: Aflibercept can inhibit the K⁺ channel of retinal Müller cells *in vitro*, inhibit the apoptosis of Müller cells induced by high glucose, decrease the expression of caspase-3 protein, and promote cell proliferation.

• KEYWORDS: retina; Müller cells; membrane ion channel; Aflibercept

Citation: Lei QF, Cai W. Effects of Aflibercept on ion channel of retinal Müller cell membrane cultured *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(4):547-550

0 引言

视网膜是中枢神经系统的一部分,包括小胶质细胞、星形胶质细胞和 Müller 细胞等,其中 Müller 细胞分布在所有脊椎动物的整个视网膜组织中^[1]。有研究显示 Müller 细胞的激活是许多视网膜疾病共同的改变,包括黄斑水肿、糖尿病性视网膜病变、视网膜脱离、缺血-再灌注损伤等^[2-3]。Müller 细胞上存在多种分子可参与神经递质循环,调节离子平衡以及胶质细胞和神经元之间的联系,包括 ATP 敏感性 K⁺通道、钙激活的 K⁺通道、Ca²⁺通道、Na⁺通道等^[4-5]。其中 Müller 细胞的静息电位主要由 ATP 敏感性 K⁺通道决定,且 ATP 敏感性 K⁺通道位于 Müller 细胞的终板并参与胞外神经递质和离子的吸收^[6]。视网膜病变患者的 Müller 细胞中,内向整流 K⁺电流下调,同时伴随着静息电位的正向移动^[7-8],为此研究 Müller 细胞上 K⁺通道的调节作用,对视网膜疾病的治疗具有重要意义。阿柏西普是一种融合蛋白,是人 VEGF 受体 Flt-1、KDR 的细胞外区域部分与人 IgG 的 Fc 片段的结合体^[9-10],可抑制同源 VEGF 受体的结合和激活,具有高亲和力,低解离率,与细胞外基质的黏附力弱等特点^[11],但是对 K⁺通道的影响尚无相关报道。本实验具体探讨了阿柏西普对体外培养的视网膜 Müller 细胞膜 K⁺通道的影响,以期改善视网膜疾病的预后提供参考,现总结报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 人 Müller 细胞由本实验室保存;胎牛血清、DMEM 培养基、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)购自美国 Sigma 公司;阿柏西普购自上海生工公司;噻唑蓝 MTT 溶液购自深圳晶美公司;异硫氰酸荧光素标记的膜联素 V/碘化丙啶(annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒、胰蛋白酶、K⁺荧光探针、超氧化物阴离子荧光探针、DAPI、羊抗 caspase-3 抗体、羊抗 GAPDH 抗体、抗谷氨酰胺合成酶(GS)购自 Sigma 公司。流式细胞仪购自美国 BD 公司,型号为 XP0213。

1.2 方法

1.2.1 Müller 细胞分组与处理 将人 Müller 细胞分为 3 组:对照组、高糖组、实验组。对照组用含 100mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基培养;高糖组用含胎牛血清的高糖 DMEM 培养基(33mmol/L 葡萄糖)培养;实验组用含胎牛血清的高糖 DMEM 培养基(33mmol/L 葡萄糖)和 100μmol/L 阿柏西普处理。

1.2.2 Müller 细胞 K⁺浓度检测 采用荧光探针 N-甲氧喹诺基乙酰乙酯检测细胞内 K⁺浓度,将按上述方法分组的 Müller 细胞接种于 48 孔板中,处理后吸弃培养基。每孔加入 100μL 10mmol/L 荧光检测工作液,孵育 1h;PBS 洗涤 5min×5 次,倒置荧光显微镜进行荧光检测,每个样本随机选取 5 个细胞,记录与计算荧光强度,实验重复 3 次。

1.2.3 Müller 细胞存活率检测 将 Müller 细胞以 5×10⁵个/mL 接种于 96 孔板中,按照上述方法处理后,吸弃培养基。加 10μL 剂量为 5mg/mL MTT 溶液与 100μL 无血清培养基继续孵育 4h,每孔加 150μL 二甲基亚砜,振荡 10min。在酶联免疫检测仪 490nm 波长处测定各孔吸光度(A)值,计算细胞存活率,实验重复 3 次。

1.2.4 Müller 细胞凋亡率检测 细胞分组同上,采用 annexin V-FITC/PI 双染法结合流式细胞术进行检测。用

2.5g/L 胰蛋白酶消化 Müller 细胞,收集 1×10⁶个细胞, PBS 洗涤 1 次。重悬细胞后,根据试剂盒操作说明书进行 annexin V-FITC/PI 染色,采用流式细胞术检测 Müller 细胞凋亡率。

1.2.5 caspase-3 蛋白水平检测 采用 Western blot 法检测 caspase-3 表达情况,以 GAPDH 作为内参对照,用美国 BD 公司的 8721 型凝胶分析软件分析各蛋白目的条带的吸光度(A)值,以 $A_{目的蛋白}/A_{GAPDH}$ 比值表示目的蛋白的相对表达水平。

统计学分析:使用 SPSS21.0 软件进行数据处理,各结果中的计量资料均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行 3 组间的比较,若存在差异,可进一步采用 LSD-t 检验进行组间的两两比较,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Müller 细胞培养和鉴定 Müller 细胞培养 48h 后呈现谷氨酰胺合成酶(GS)阳性,纯化度在 90% 以上(图 1)。

2.2 K⁺水平对比 荧光检测显示对照组、高糖组、实验组 K⁺相对浓度分别为(2.14±0.44)%、(23.11±4.39)%、(5.20±0.92)%,组间比较差异有统计学意义($F=28.482, P<0.05$)。

2.3 细胞存活率对比 MTT 检测显示对照组、高糖组、实验组 Müller 细胞存活率分别为(100.00±0.00)%、(73.24±4.13)%、(85.22±5.33)%,组间比较差异有统计学意义($F=8.274, P<0.05$)。

2.4 细胞凋亡率对比 流式细胞术检测显示对照组、高糖组、实验组 Müller 细胞凋亡率分别为(5.03±1.91)%、(26.73±3.14)%、(16.63±2.73)%,组间比较差异有统计学意义($F=9.284, P<0.05$),见图 2。

2.5 caspase-3 蛋白表达水平对比 与对照组相比,高糖组 Müller 细胞内 caspase-3 蛋白水平显著上升,差异有统计学意义(7.28±1.38 vs 2.92±1.38, $P<0.05$);与高糖组 Müller 细胞相比,实验组 Müller 细胞内 caspase-3 蛋白水平显著降低,差异有统计学意义(7.28±1.38 vs 4.29±2.40, $P<0.05$),见图 3。

3 讨论

Müller 细胞可参与视网膜葡萄糖代谢,对神经元起着支持作用,调节视网膜血液流动,释放神经递质和其它神经兴奋性物质从而直接或间接地调节神经元兴奋性,维持血-视网膜屏障^[12]。Müller 细胞也可通过释放抗氧化物质和神经营养因子,还可以通过生成神经前体,促进视网膜重生^[13]。而 Müller 细胞胶质化也会促使神经退化,从而阻止视网膜组织的重生进程^[14]。Müller 细胞和神经元之间的功能联系需要胶质细胞维持相对负的膜电位, K⁺电流的下调将导致 Müller 细胞去极化,使其维持细胞内外 K⁺和水平衡功能障碍,从而严重影响视网膜的功能^[15]。

阿柏西普结构为全人源化重组融合蛋白包含 VEGF 受体 1 结合域 2 及 VEGF 受体 2 结合域 3,4,其与 VEGFA 结合力均较其它 VEGF 药物高,结合能力大约是雷珠单抗的 30 倍,贝伐单抗的 50 倍^[16-17]。本研究荧光检测显示对照组、高糖组、实验组 K⁺相对浓度对比差异有统计学意义($P<0.05$),表明阿柏西普的应用能抑制 Müller 细胞 K⁺水平。从机制上分析,长期高糖刺激可通过葡萄糖对 Müller 细胞的直接或间接作用经由多种机制造成视网膜损伤,也

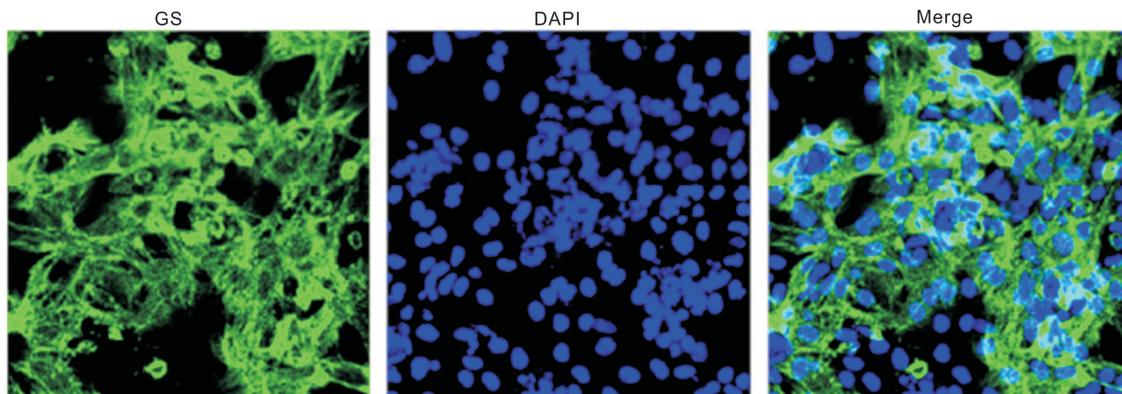


图1 Müller细胞的镜下鉴定结果($\times 400$)。

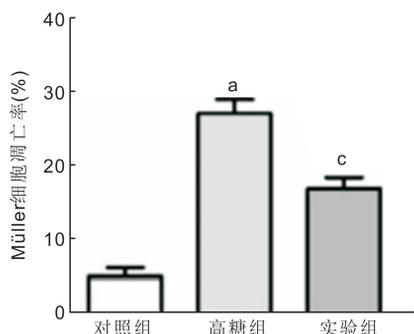


图2 流式细胞术检测 Müller 细胞凋亡情况 ^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 高糖组。

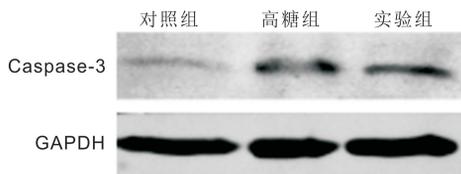


图3 Western blot 法检测 Müller 细胞 caspase-3 蛋白水平。

通过激活 Müller 的 K^+ 通道,从而导致 Müller 的活化^[18]。阿柏西普具有 VEGF 受体 2 的免疫球蛋白样区域,直接抑制 K^+ 通道,从而调节 Müller 细胞的兴奋性,从而对其他神经细胞产生调控作用^[19]。

本研究显示对照组、高糖组、实验组 Müller 细胞存活率、凋亡率对比差异有统计学意义($P < 0.05$)。当前多种机制参与视网膜病变的过程,其中包括离子通道稳态的破坏、血管紧张素系统的上调、氧化应激水平的升高等^[20]。Müller 细胞的凋亡是视网膜病变的核心病理改变,也是视网膜病变发生的最关键的原因之一。 K^+ 是机体内最丰富的阳离子,与细胞迁移、凋亡等多种情况密切相关;阻断 K^+ 通道可显著降低 Müller 细胞的内源性容积调节性 K^+ 通道电流,也可改变容积调节性 K^+ 通道的整流特性及离子选择性^[21]。阿柏西普可以通过各种机制起着保护作用,比如抑制谷氨酸传递从而阻止兴奋性毒性、下调 K^+ 内流、抗氧化等;其可直接与 Müller 细胞上的 K^+ 通道相互作用,阻挡欲通过此通道的 K^+ ,从而调节 Müller 细胞的增殖与凋亡^[22]。

视网膜是中枢神经系统的延伸,属中枢神经系统,其组织结构类似于脑组织,视网膜 Müller 细胞对视网膜正常形态、功能的维持起着极其重要的作用^[23]。Müller 细胞可通过 K^+ 通道将胞外的 K^+ 流向胞内,为保持神经内内外

K^+ 平衡提供保证。Müller 细胞的死亡与丢失主要是通过凋亡和坏死两种方式,其中凋亡是一个受到高度调节,需要消耗能量的主动性死亡过程^[24]。Caspase 是凋亡过程的主要执行者,活化的 caspase-3 经蛋白酶解过程激活后,最终引发细胞凋亡^[25]。本研究显示与对照组相比,高糖组 Müller 细胞内 caspase-3 蛋白水平显著上升($P < 0.05$);与高糖组 Müller 细胞相比,实验组 Müller 细胞内 caspase-3 蛋白水平显著降低($P < 0.05$)。表明 K^+ 的外流在细胞凋亡中扮演了重要角色;阻断 K^+ 通道,也抑制了随后的凋亡事件。本研究也存在一定的不足,没有进行动物模型的体内分析,阿柏西普的具体作用也有待明确,且对于视网膜细胞的作用存在单一性,将在后续研究中进行深入分析。

总之,阿柏西普可抑制体外培养的高糖环境下视网膜 Müller 细胞膜 K^+ 通道,抑制高糖诱导的 Müller 细胞凋亡,降低 caspase-3 蛋白表达水平,促进细胞增殖。

参考文献

- Alrashdi SF, Deliyanti D, Wilkinson - Berka JL. Intravitreal administration of endothelin type A receptor or endothelin type B receptor antagonists attenuates hypertensive and diabetic retinopathy in rats. *Exp Eye Res* 2018;23(176):1-9
- 李贵富, 李春霞. 糖尿病早期视网膜神经元退行性病变与自噬的相关性研究现状. *中国中医眼科杂志* 2018;28(2):123-126
- Goldberg MF, McLeod S, Tso M, et al. Ocular Histopathology and Immunohistochemical Analysis in the Oldest Known Individual with Autosomal Dominant Vitreoretinopathy. *Ophthalmol Retina* 2018;2(4):360-378
- McAllister IL, Vijayasekaran S, Zhang D, et al. Neuronal degeneration and associated alterations in cytokine and protein in an experimental branch retinal venous occlusion model. *Exp Eye Res* 2018;9(174):133-146
- 田敏, 吴进川, 何薇, 等. 叔丁基对苯二酚对高糖培养视网膜 Müller 细胞核因子 E2 相关因子 2、血红素氧合酶 1 和磷脂酰肌醇-3 激酶表达的影响. *中华眼底病杂志* 2018;34(4):382-387
- Fu S, Dong S, Zhu M, et al. VEGF as a Trophic Factor for Müller Glia in Hypoxic Retinal Diseases. *Adv Exp Med Biol* 2018;9(1074):473-478
- 李赵伟, 梁汇珉, 李铮, 等. 罗格列酮对糖尿病视网膜 Müller 细胞的保护作用以及对 Müller 细胞胶质纤维酸性蛋白(GFAP)及炎症因子表达的影响. *眼科新进展* 2018;38(9):825-828
- Zhang J, Wu L, Chen J, et al. Downregulation of MicroRNA 29a/b exacerbated diabetic retinopathy by impairing the function of Müller cells via Forkhead box protein O4. *Diab Vasc Dis Res* 2018;15(3):214-222

- 9 余爱华, 柯敏, 田朕, 等. P58IPK 基因在视网膜 Müller 细胞内质网应激 PERK 通道中的作用. 武汉大学学报(医学版) 2018; 39(2): 213-218
- 10 Becker S, Wang H, Simmons AB, *et al.* Targeted Knockdown of Overexpressed VEGFA or VEGF164 in Müller cells maintains retinal function by triggering different signaling mechanisms. *Sci Rep* 2018; 8(1):2003
- 11 胡欣欣, 戴毅, 孙兴怀. 大鼠青光眼模型线粒体动力学相关基因表达变化. 中华实验眼科杂志 2018; 36(7):494-499
- 12 Li Y, Busoy JM, Zaman BAA, *et al.* A novel model of persistent retinal neovascularization for the development of sustained anti-VEGF therapies. *Exp Eye Res* 2018; 9(174):98-106
- 13 Pena J, Dulger N, Singh T, *et al.* Controlled microenvironments to evaluate chemotactic properties of cultured Müller glia. *Exp Eye Res* 2018; 8(173):129-137
- 14 顾宏卫, 张少华, 张俊芳, 等. 匹格列酮对视网膜 Müller 细胞活化的影响. 南通大学学报(医学版) 2018; 38(3):187-192
- 15 Dorenkamp M, Müller JP, Shanmuganathan KS, *et al.* Hyperglycaemia-induced methylglyoxal accumulation potentiates VEGF resistance of diabetic monocytes through the aberrant activation of tyrosine phosphatase SHP-2/SRC kinase signalling axis. *Sci Rep* 2018; 8(1):14684
- 16 Müller AS, Artner M, Janjić K, *et al.* Synthetic Clay-based Hypoxia Mimetic Hydrogel for Pulp Regeneration: The Impact on Cell Activity and Release Kinetics Based on Dental Pulp-derived Cells *In Vitro*. *J Endod* 2018; 44(8):1263-1269
- 17 杨子建, 程瑜, 姚慧萍, 等. 腺苷受体拮抗剂对加压培养的视网膜 Müller 细胞钾离子通道的调控作用. 中华实验眼科杂志 2018; 36(8): 590-594
- 18 Hamed ANE, Schmitz R, Bergemann A, *et al.* Bioactive pyrrole alkaloids isolated from the Red Sea; marine sponge *Stylissacareri*. *Z Naturforsch C* 2018; 73(5-6):199-210
- 19 章淑杰, 张荣, 张雪瑾, 等. 人 Müller 细胞来源的外泌体对脂多糖刺激视网膜色素上皮细胞产生炎症因子的影响. 中国眼耳鼻喉科杂志 2017; 17(5):323-327
- 20 金妮, 卢一, 冯佳, 等. 视网膜 Müller 细胞条件性基因敲除血管内皮生长因子对氧诱导视网膜病变小鼠的影响. 中华眼底病杂志 2017; 33(5):508-512
- 21 Sandmeier N, Rothschild SI, Rothermundt C, *et al.* Pattern of Care Study in Metastatic Renal-Cell Carcinoma in the Preimmunotherapy Era in Switzerland. *Clin Genitourin Cancer* 2018; 16(4):e711-e718
- 22 丛小杰, 肖宗宇, 李文辉, 等. Müller 细胞在视网膜病变发生发展中作用的研究进展. 山东医药 2017; 57(37):107-109
- 23 Läubli H, Müller P, D'Amico L, *et al.* The multi-receptor inhibitor axitinib reverses tumor-induced immunosuppression and potentiates treatment with immune-modulatory antibodies in preclinical murine models. *Cancer Immunol Immunother* 2018; 67(5):815-824
- 24 杨雄里. 视网膜神经信号的调制和视网膜疾病. 复旦学报(医学版) 2017; 44(6):693-698
- 25 Deliyanti D, Alrashdi SF, Tan SM, *et al.* Nrf2 Activation Is a Potential Therapeutic Approach to Attenuate Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018; 59(2):815-825