

# 胰岛素对人 RPE 细胞增殖及转化生长因子- $\beta_2$ 分泌的影响

邹悦, 吴梦竹, 王丰, 樊莹

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No. 2011CB707500)

作者单位: (201600) 中国上海市, 上海交通大学附属第一人民医院眼科

作者简介: 邹悦, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 樊莹, 女, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 副主任, 上海市眼科研究所所长, 研究方向: 眼底病、病理性近视。

mdfanying@gmail.com

收稿日期: 2013-01-10 修回日期: 2013-03-28

## Effects of insulin on proliferation and secretion of transforming growth factor- $\beta_2$ of human retinal pigment epithelial cells

Yue Zou, Meng-Zhu Wu, Feng Wang, Ying Fan

Foundation item: Key Project of National Fundamental Study (973 Project), China (No. 2011CB707500)

Department of Ophthalmology, the First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201600, China

Correspondence to: Ying Fan. Department of Ophthalmology, the First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201600, China. mdfanying@gmail.com

Received: 2013-01-10 Accepted: 2013-03-28

### Abstract

• AIM: To investigate if insulin can promote retinal pigment epithelial (RPE) cell proliferation and the secretion of transforming growth factor  $\beta_2$  (TGF- $\beta_2$ ).

• METHODS: Human RPE cells were exposed to different concentrations insulin at different times (0 to 48 hours). We used the MTS method to test the proliferation of RPE cells. And we used the ELISA method to text the secretion of TGF- $\beta_2$  of RPE cells in various cases, and the Real-time PCR method to test the expressions of TGF- $\beta_2$  mRNA.

• RESULTS: The MTS results showed that after 12 hours exposure of insulin RPE cells proliferated significantly ( $P < 0.05$ ). ELISA results showed that insulin can significantly promote the secretion of TGF- $\beta_2$  of RPE cells, and this process was independent of time and dose. And Real-time PCR results showed that 24 hours after the stimulation of insulin, TGF- $\beta_2$  mRNA increased significantly ( $P < 0.01$ ), and  $10 \times 10^3$  U/mL insulin group, TGF- $\beta_2$  mRNA expression were significantly higher than the  $0.1 \times 10^3$  U/mL insulin group ( $P < 0.01$ ).

• CONCLUSION: RPE cells are important intraocular

sources of TGF- $\beta_2$ , and insulin can promote the proliferation of RPE cells and the secretion of TGF- $\beta_2$  to promote myopia.

• KEYWORDS: insulin; retinal pigment epithelial cells; proliferation; transforming growth factor- $\beta_2$

Citation: Zou Y, Wu MZ, Wang F, et al. Effects of insulin on proliferation and secretion of transforming growth factor- $\beta_2$  of human retinal pigment epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(4):663-666

### 摘要

目的: 探讨胰岛素对 RPE 细胞增殖和分泌转化生长因子- $\beta_2$  (TGF- $\beta_2$ ) 的影响。

方法: 将不同浓度的胰岛素 ( $0.1 \sim 10 \times 10^3$  U/mL) 加入培养基刺激 ARPE-19 细胞不同时间 (0 ~ 48h)。采用 MTS 法检测 RPE 细胞的增殖情况; 采用 ELISA 法检测各种处理情况下 RPE 细胞分泌 TGF- $\beta_2$  的情况, Real-time PCR 法检测 TGF- $\beta_2$  mRNA 的表达情况。

结果: MTS 结果显示, 作用 12h 后, 各实验组与对照组比较 RPE 细胞明显增殖 ( $P < 0.05$ )。ELISA 结果表明胰岛素可明显促进 RPE 细胞分泌 TGF- $\beta_2$ , 并呈时间及剂量依赖性。Real-time PCR 结果显示, 胰岛素作用 24h 后, TGF- $\beta_2$  mRNA 表达上调 ( $P < 0.01$ ), 且  $10 \times 10^3$  U/mL 胰岛素组 TGF- $\beta_2$  mRNA 表达明显高于  $0.1 \times 10^3$  U/mL 胰岛素组 ( $P < 0.01$ )。结论: RPE 细胞是眼内近视信号因子 TGF- $\beta_2$  的重要来源, 胰岛素可以通过促进 RPE 细胞增殖并分泌 TGF- $\beta_2$  进行信号传递, 促进近视发生。

关键词: 胰岛素; RPE 细胞; 增殖; 转化生长因子- $\beta_2$

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.04.05

引用: 邹悦, 吴梦竹, 王丰, 等. 胰岛素对人 RPE 细胞增殖及转化生长因子- $\beta_2$  分泌的影响. 国际眼科杂志 2013;13(4):663-666

### 0 引言

近视的发病率较高, 对其临床防治和发病机制的研究一直是各国学者研究的热点。近年来研究发现, 胰岛素对近视的发生有促进作用。Feldkaemper 等<sup>[1]</sup> 研究发现, 胰岛素能使眼轴增长, 但其作用机制尚未明确。视网膜色素上皮 (RPE) 细胞可分泌生长因子, 在视神经纤维层和脉络膜之间起物质传递的作用。其离子转运体和分泌的生长因子对调节脉络膜及下游组织、近视发生有很大的影响<sup>[2]</sup>。其中 RPE 细胞分泌的 TGF- $\beta_2$ <sup>[3]</sup> 对近视形成有明显的促进作用。为此本研究拟探讨胰岛素是否可以作用于 RPE 细胞, 并影响其分泌 TGF- $\beta_2$ , 进而探讨胰岛素促进近视形成的分子机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ARPE-19(人视网膜色素上皮)细胞购自美国 ATCC 公司(Manassas,VA)。胎牛血清、实验用胰岛素、胰蛋白酶(Gibco 公司);MTS(美国 Promega 公司);TGF- $\beta_2$  ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司);Trizol(美国 Invitrogen 公司);酶标仪(美国 BioTek 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及分组** 细胞用 DMEM/F12 和 100mL/L 胎牛血清培养液在 37℃,50mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。细胞 3~8 代用于实验。细胞铺满培养皿后,弃去培养液,用无血清的 DMEM/F12 培养基饥饿细胞 24h 后加入不同浓度实验用胰岛素(浓度分别为 0.1×10<sup>6</sup>U/L,10×10<sup>6</sup>U/L)干预不同时间(2,12,24,48h),空白对照组为 DMEM 培养基中不加入任何药物。

### 1.2.2 MTS 法检测各组胰岛素对 RPE 细胞增殖的作用

细胞按 2.5×10<sup>3</sup>个/mL 密度接种于 96 孔板,每组每时间点设置 6 个复孔。将 MTS 用 Dulbecco 磷酸缓冲液配成浓度 2g/L 的溶液,用 1mol/L 的盐酸溶液调 pH=6.5, PMS 用 Dulbecco 磷酸缓冲液配成浓度 0.82g/L(用 0.2 $\mu$ m 滤器过滤,储存于-20℃,用时按 20:1 的比例混合),每孔加入 20 $\mu$ L 混合液,继续培养 2h,震荡混匀后,测定 490nm 处的吸光值,以上实验重复 4 次,检测各组胰岛素对 RPE 细胞增殖的作用情况。

**1.2.3 ELISA 法分析 RPE 细胞分泌 TGF- $\beta_2$  的情况** 细胞按 1×10<sup>5</sup>/mL 接种于 12 孔板,每组每时间点设置 3 个复孔,收集各组细胞上清液,离心去除细胞碎片,保存于-30℃ 冰箱。并用胰蛋白酶消化细胞,进行细胞计数。严格按照人 TGF- $\beta_2$  ELISA 试剂盒说明书步骤检测 TGF- $\beta_2$  分泌量,实验重复 3 次:(1)125 $\mu$ L 样品加入 1mol/L HCl 25 $\mu$ L,混匀室温孵育 10min;(2)加入 25 $\mu$ L 1.2mol/L NaOH/0.5mol/L HEPES,混匀;(3)加入 800 $\mu$ L 校正液,混匀;(4)取出酶标板每孔加入稀释液 100 $\mu$ L;(5)每孔加入 100 $\mu$ L 样品或者标准品,室温孵育 2h;(6)洗液清洗 3 次;(7)每孔加入结合液 200 $\mu$ L,室温孵育 2h;(8)洗液清洗 3 次;(9)每孔加入底物 200 $\mu$ L,室温避光孵育 20min;(10)每孔加入终止液 50 $\mu$ L 终止反应;(11)测量波长 450nm 处各孔的 OD 值,并根据标准曲线计算出样品浓度(pg/mL)。

### 1.2.4 Real-time PCR 法检测 TGF- $\beta_2$ mRNA 的表达

细胞按 1×10<sup>5</sup>/mL 接种于 6cm 培养皿,每组均采用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA。以逆转录后获得的 cDNA 为模板,Real-time PCR 仪扩增目的基因。引物序列、目的基因大小、反应条件分别为:人 TGF- $\beta_2$ (Accession NM-003238),产物大小 136bp,上游引物:5'-CGGAGGTGATTTCCATCTACA-3',下游引物:5'-GGCGGCATCTCATATTTTGTA-3'。内参人 GAPDH(Accession NM-002046),产物大小 238bp,上游引物:5'-GAGTCAACGGATTTGGTCTG-3',下游引物:5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'。2 $\mu$ L cDNA 加入 20 $\mu$ L 的反应体系中。GAPDH 反应条件为:逆转录。42℃ 温育 30min,94℃ 变性 2min。PCR 反应条件为:94℃ 变性 30s,56℃ 退火 30s,72℃ 延伸 60s。TGF- $\beta_2$  PCR 反应条件:逆转录 42℃ 温育 30min,94℃ 变性 2min。PCR 反应条件为:

表 1 不同时间点不同胰岛素浓度 RPE 吸光度

时间	胰岛素浓度 (10 <sup>3</sup> U/mL)	OD490 ( $\bar{x}\pm s$ )	F	P
2h	0	0.776±0.05	-	-
	0.1	0.794±0.06	0.484	0.53
	10	0.767±0.02	0.484	0.75
12h	0	0.817±0.04	-	-
	0.1	0.917±0.02	31.349	0.00 <sup>b</sup>
	10	0.931±0.02	31.349	0.00 <sup>b</sup>
24h	0	0.855±0.02	-	-
	0.1	1.020±0.04	51.727	0.00 <sup>b</sup>
	10	0.982±0.03	51.727	0.00 <sup>b</sup>
48h	0	0.899±0.09	-	-
	0.1	0.994±0.05	3.839	0.02 <sup>a</sup>
	10	0.982±0.04	3.839	0.04 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 0U/mL 胰岛素组。

94℃ 变性 30s,58℃ 退火 30s,72℃ 延伸 60s。两体系均取 18 个循环进行反应。各样品的目的基因和管家基因分别进行 Real-time PCR 反应。每个样品的目的基因浓度除以其管家基因的浓度,即为该样品基因的校正后相对含量。

统计学分析:所有数据均输入 SPSS for Windows 18.0 软件包,以  $\bar{x}\pm s$  表示,应用单因素方差分析及 Dunnett'-t 检验法分析数据,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 胰岛素对 RPE 细胞增殖的作用** 各胰岛素组作用于 RPE 细胞后 OD 值见表 1。随着胰岛素刺激时间延长,各实验组与对照组相比 RPE 细胞明显增殖(P<0.05)。2h 后胰岛素组对 RPE 细胞增殖的促进作用尚不明显(F=0.484, P>0.05),刺激 12h 后胰岛素组对比空白对照组可明显促进 RPE 细胞增殖(F=31.349, P<0.05),其中胰岛素作用 12h 和 24h 后 RPE 细胞增殖最为明显(F=31.349, F=51.727, P<0.01)。胰岛素作用 RPE 细胞 48h 后,细胞不再有明显的增殖(F=3.839, P>0.05),且两种胰岛素浓度组各时间点之间 RPE 细胞增殖水平均没有明显差异(F=4.140, P>0.05)。

**2.2 各组 RPE 细胞分泌 TGF- $\beta_2$  的变化** 各组胰岛素促进 RPE 细胞分泌 TGF- $\beta_2$  的作用见图 1。胰岛素作用 2h 后与空白对照组比较 TGF- $\beta_2$  分泌量即明显增加(F=186.409, P<0.01),随着时间的延长至胰岛素作用 48h 后分泌量持续增加(F=913946.3, P<0.01)。并且发现,高浓度的胰岛素促进 RPE 细胞分泌 TGF- $\beta_2$  的能力与低浓度胰岛素之间的差异有统计学意义(F=861517.2, P<0.01),即胰岛素可以促进 RPE 细胞分泌 TGF- $\beta_2$ ,并且有时间及浓度依赖性。

**2.3 胰岛素促进 TGF- $\beta_2$  mRNA 表达的变化** TGF- $\beta_2$  mRNA 表达在胰岛素的作用见图 2,2h 后对比空白对照组开始上调(F=222.324, P<0.01),并随时间延长表达上调,在 24h 时 TGF- $\beta_2$  mRNA 表达量达到最大(F=18802.949,

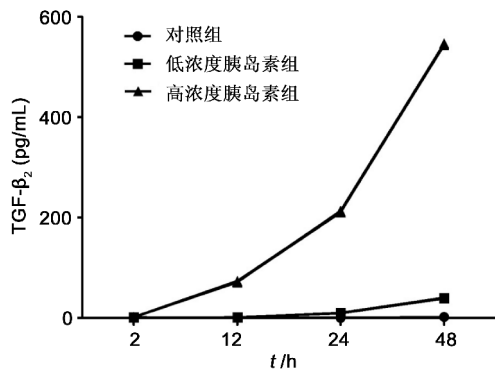


图1 胰岛素可明显促进 RPE 细胞分泌 TGF- $\beta_2$ , 并有时间及剂量依赖性。

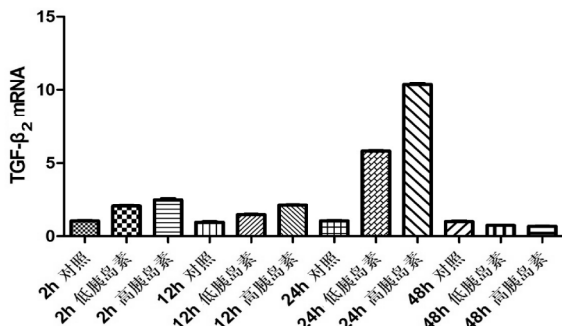


图2 不同胰岛素浓度不同时间点对 TGF- $\beta_2$  mRNA 表达的影响。

$P < 0.01$ ); 不同浓度胰岛素对 TGF- $\beta_2$  mRNA 表达的促进有明显差异, 高浓度胰岛素对其促进作用更为显著 ( $F = 7851.634$ ,  $P < 0.01$ ); 之后刺激 48h 后各实验组 TGF- $\beta_2$  mRNA 表达对比空白对照组开始下调 ( $F = 93.045$ ,  $P < 0.01$ )。胰岛素作用早期可促进 TGF- $\beta_2$  mRNA 表达, 并呈浓度依赖性, 刺激 48h 后开始抑制 TGF- $\beta_2$  mRNA 表达。

### 3 讨论

有研究表明, 糖尿病人群中的近视发病率明显增高, 血糖控制不好是近视的危险因素之一<sup>[4]</sup>。这可能与经常伴随高血糖发生的胰岛素抵抗及高胰岛素血症有关<sup>[5]</sup>。患 Syndrome X 的患者, 因为有胰岛素抵抗引起的高胰岛素血症, 其近视的发病率比正常人群高<sup>[6]</sup>。这些发现揭示了体内胰岛素浓度升高与近视发生有密切的关系。

在动物实验及体外细胞实验中, 也证实了胰岛素对眼轴增长近视发生有着强有力的促进作用。高前庭等<sup>[7]</sup>发现, 胰岛素不能阻止兔眼形觉剥夺引起的近视。Feldkaemper 等<sup>[1]</sup>研究又发现, 小鸡眼内注射胰岛素能使眼轴增长。不仅如此, 眼内注射胰岛素还可以阻止小鸡因佩戴正焦镜片而形成的远视, 甚至发展为严重的轴性近视, 而佩戴负焦镜片的小鸡眼, 眼内注射胰岛素则可加剧轴性近视的发生。胰岛素促眼轴生长的作用机制虽尚未明确, 但 Penha 等<sup>[8]</sup>研究显示, 小鸡眼 RPE 细胞上表达胰岛素受体水平较高, 其表达水平受到屈光状态的调节, 并在近视或者远视的形成过程中参与了信号的级联反应。这提示了 RPE 细胞可能是胰岛素促近视作用的靶细胞。但胰岛素是否能对 RPE 细胞产生影响, 促进其分泌下游的信号分子, 尚无研究。

RPE 细胞在近视, 特别是病理性近视发病过程中发挥的作用近年来受到了广泛的关注。研究认为, 病理性近视发生过程中出现的眼轴增长、眼球变形是因为眼球生长稳态改变造成的, 而眼球生长受到光学信号控制<sup>[9]</sup>。局部视网膜接受光学信号后可控制局部眼球生长及眼球屈光状态<sup>[10]</sup>。目前研究普遍认为, 眼球生长源于视网膜, 视网膜感受光学信号后可释放多种信号分子控制下方组织的生长速率, 影响近视发生过程。在这个信号传递系统中, RPE 细胞是最重要的细胞之一, 与眼球生长近视发生的关系非常密切。其位于视网膜最外层, 把视网膜与脉络膜及巩膜分隔开, 并且有分泌 TGF- $\beta_2$ <sup>[11]</sup>等各种细胞因子及进行离子转运的功能, 反过来 RPE 细胞类似屏障的功能, 又会阻止视网膜的活性物质到达下游组织, 从而阻止下游组织形态功能的变化, 所以 RPE 细胞分泌功能的改变是引起眼轴改变的重要原因。故研究认为视网膜的活性物质作为一级信号先作用于 RPE 细胞, 引起 RPE 细胞功能变换, 产生二级信号继续向下游传导。

RPE 细胞分泌的多种细胞因子中, TGF- $\beta_2$  是一类多功能的细胞因子, 调节细胞生长和分化, 在眼内有广泛的表达, 是眼内调节眼球生长的关键信号分子之一<sup>[11]</sup>, 可以促进巩膜细胞的增殖, 调节巩膜细胞外基质 (ECM) 合成与降解<sup>[12,13]</sup>。不仅是动物实验研究, 在人类高度近视的基因多态性研究中, TGF- $\beta_2$  的基因多态性与正视眼人群比较有显著差异<sup>[14]</sup>。RPE 细胞作为其主要的分泌细胞之一<sup>[15]</sup>, 分泌的 TGF- $\beta_2$  对近视有明显的促进作用, 是重要的二级近视信号分子, 其分泌水平升高与近视形成有着明显的作用。

本研究中, RPE 细胞可少量分泌 TGF- $\beta_2$  及表达其 mRNA, 证明 RPE 细胞是 TGF- $\beta_2$  眼内主要来源之一, 并且胰岛素可以作用于 RPE 细胞, 引起 RPE 细胞增殖, 并可以明显促进 RPE 细胞分泌 TGF- $\beta_2$  及 TGF- $\beta_2$  mRNA 的表达。并且随着胰岛素浓度增加及作用时间延长, 促进作用更为明显。胰岛素对 RPE 细胞的这一作用进一步证明了胰岛素促近视作用很可能是通过影响 RPE 细胞, 促使 RPE 细胞分泌的二级近视信号分子 TGF- $\beta_2$  增多, 进而作用于脉络膜巩膜等下游组织, 引起眼轴增长, 促使近视发生。

总之, 血浆及玻璃体液中胰岛素浓度升高与近视形成之间的密切关系正在日渐引起重视, 但其作用机制则尚未见报道。本研究提示外源性胰岛素能作为一级信号分子作用于 RPE 细胞, 引起细胞增殖并促进其分泌 TGF- $\beta_2$ , 引发信号级联反应, 并且这一作用与胰岛素有明显的量效关系, 为胰岛素促近视作用机制提供了一些证据, 为近视的发病机制探讨及临床治疗提供了思路。但胰岛素通过何种途径及信号通路作用于 RPE 细胞, 以及还会引起哪些二级信号分子的变化尚需进一步研究。

### 参考文献

- Feldkaemper MP, Neacsu I, Schaeffel F. Insulin acts as a powerful stimulator of axial myopia in chicks. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50 (1): 13-23
- Rymer J, Wildsoet CF. The role of the retinal pigment epithelium in



eye growth regulation and myopia: a review. *Vis Neurosci* 2005;22(3):251-261  
3 Seko Y, Tanaka Y, Tokoro T. Influence of bFGF as a potent growth stimulator and TGF- $\beta$  as a growth regulator on scleral chondrocytes and scleral fibroblasts *in vitro*. *Ophthalmic Res* 1995;27:144-152  
4 Cordain L, Eaton SB, Brand Miller J, *et al*. An evolutionary analysis of the aetiology and pathogenesis of juvenile-onset myopia. *Acta Ophthalmol Scand* 2002;80(2):125-135  
5 Cordain L, Eades MR, Eades MD. Hyperinsulinemic diseases of civilization: more than just Syndrome X. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2003;136(1):95-112  
6 高前应,高如尧,王培杰,等.胰岛素对兔形觉剥夺性近视眼光学参数及组织病理学的影响. *眼视光学杂志* 1999;1(2):77-79  
7 Penha AM, Schaeffel F, Feldkaemper M. Insulin, insulin-like growth factor-1, insulin receptor, and insulin-like growth factor-1 receptor expression in the chick eye and their regulation with imposed myopic or hyperopic defocus. *Mol Vis* 2011;17:1436-1448  
8 Wallman J, Winawer J. Homeostasis of eye growth and the question of myopia. *Neuron* 2004;43(4):447-468

9 Wallman J, Gottlieb MD, Rajaram V, *et al*. Local retinal regions control local eye growth and myopia. *Science* 1987;237(4810):73-77  
10 胡延宁, Steven A. McCormick. 视网膜色素上皮-脉络膜在近视发病中的作用. *眼视光学杂志* 2000;2(4):197-200  
11 Jobling AI, Gentle A, Metlapally R, *et al*. Regulation of scleral cell contraction by transforming growth factor- $\beta$  and stress: competing roles in myopic eye growth. *J Biol Chem* 2009;284(4):2072-2079  
12 毛俊峰,刘霜珍,秦文娟,等.豚鼠近视眼视网膜Müller细胞中TGF $\beta$ 2、VIP、DA的表达. *眼科研究* 2008;26(11):801-804  
13 Lin HJ, Wan L, Tsai Y, *et al*. Sclera-related gene polymorphisms in high myopia. *Mol Vis* 2009;15:1655-1663  
14 郑晓汾,康玉国,褚仁远.不同波长的光照射对视网膜色素上皮细胞生长及其分泌生长因子的影响. *中华实验眼科杂志* 2011;29(9):774-779  
15 Rohrer B, Stell WK. Basic fibroblast growth factor (bFGF) and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) act as stop and go signals to modulate postnatal ocular growth in the chick. *Exp Eye Res* 1994;58(5):553-561

## 中华医学会第十八次全国眼科学术大会征文通知

中华医学会定于2013年9月13-17日在厦门举办第十八次全国眼科学术大会。本次是继2012年中华医学会第十七次全国眼科学术大会之后在中国举办的又一次大型的眼科学盛会,预计参会的代表将达5000人,届时将有1000多名国际、国内的著名眼科学专家就眼科发展的新技术、新知识以及新的经验做专题报告。来自全国各地的眼科医师将云集本次盛会,与国内同道交流和分享眼科和视觉科学方面最新的研究成果。会议还将举办大规模的眼科医疗器械药品展览会。大会组委会欢迎全国的眼科医生踊跃投稿参会,现将有关事项通知如下:

会议时间:2013年9月13-17日

9月13-14日 注册

9月14-17日 学组会、大会、继教学习班等学术活动

会议地点:厦门国际会展中心

大会语言:中文

会议征文的主要内容范围:

眼科相关的基础及临床研究、眼科管理、科研方法和教学方面的研究论文或经验体会以及眼科的录像、图片及绘图资料等。

征文要求:

稿件要求提供600字摘要一份,注明文题、作者单位、邮编、姓名,正文包括目的、方法、结果和结论,论文要求未在国内公开发行的刊物上发表,文责自负,概不退稿。

本次大会只通过网上投稿,不接受邮寄投稿,请登录大会投稿网站:<http://www.coschina.org>

大会接受中文及英文投稿,但是一篇论文不得同时递交中文和英文稿件。

投稿截止日期为2013年5月20日

联系人:黄莉 孟菁 中华医学会学术会务部 北京东四西大街42号100710

联系电话:86-10-85158141(黄莉) 13661371818(孟菁)

电子邮箱:cosabstract@163.com

全体参会者可获国家级医学继续教育学分。

中华医学会眼科学分会  
中华医学会学术会务部