

TAT 介导 PRDX5, 6 蛋白转导防止高糖视网膜周细胞毒性作用

黄韵洁¹, 黄红深²

作者单位:¹(110001)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学;
²(130031)中国吉林省长春市,长春爱尔眼科医院眼底病科
作者简介:黄韵洁,女,中国医科大学 07 级七年制在读研究生,
研究方向:白内障及眼底病。
通讯作者:黄红深,男,主任医师,主任,研究方向:眼底病及玻璃
体视网膜手术. Huanghs7706@sina. cn
收稿日期:2011-08-26 修回日期:2011-12-08

TAT-mediated peroxiredoxin 5, 6 protein transduction protects against high-glucose-induced cytotoxicity in retinal pericytes

Yun-Jie Huang¹, Hong-Shen Huang²

¹China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China;
²Department of Ocular Fundus Disease, Changchun Aier Eye Hospital, Changchun 130031, Liaoning Province, China
Correspondence to: Hong-Shen Huang. Department of Ocular Fundus Disease, Changchun Aier Eye Hospital, Changchun 130031, Liaoning Province, China. Huanghs7706@sina. cn
Received: 2011-08-26 Accepted: 2011-12-08

Abstract

• Hyperglycemia-induced oxidative stress can cause pericytes apoptosis seen in diabetic retinopathy (DR). The six mammalian peroxiredoxins 1-6 (PRDX1-6) are a new family of antioxidant proteins, which negatively regulate oxidative stress-induced apoptosis by controlling the level of reactive oxygen species (ROS). This paper reviewed the TAT-mediated PRDX5, 6 protein transduction protects against high-glucose-induced cytotoxicity in retinal pericytes.
• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; pericyte; oxidative stress; peroxiredoxin

Huang YJ, Huang HS. TAT-mediated peroxiredoxin 5, 6 protein transduction protects against high-glucose-induced cytotoxicity in retinal pericytes. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(1): 75-76

摘要

高血糖诱发氧化应激可引起糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 中的周细胞凋亡。哺乳动物 6 个过氧化物酶 (peroxiredoxin 1-6, PRDX1-6) 是一新的抗氧化蛋白家族, 通过控制活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的水平负性调节氧化应激引起的细胞凋亡。我们就 TAT 介导的 PRDX5, 6 蛋白转导防止高葡萄糖诱发视网膜周细胞的毒性作用作一综述。

关键词: 糖尿病视网膜病变; 周细胞; 氧化应激; 过氧化物酶

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2012. 01. 23

黄韵洁, 黄红深. TAT 介导 PRDX5, 6 蛋白转导防止高糖视网膜周细胞毒性作用. 国际眼科杂志 2012;12(1): 75-76

0 引言

糖尿病是一个复杂的代谢性疾病, 早期小血管受累, 逐渐引起全身许多组织器官的广泛受损^[1]。糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病患者最常见及严重的微血管并发症。糖尿病患者眼底检查发现有视网膜微动脉瘤和/或小出血点, 是最早出现并比较确切的 DR 体征^[2]。高血糖诱发氧化应激在 DR 发生发展中起关键作用。研究认为, 当视网膜周细胞遭受氧化应激时, 在高葡萄糖条件下一些分子和生物化学改变最终导致细胞凋亡并加速细胞死亡^[3]。高血糖介导 ROS 产物的产生有多种机制, 包括葡萄糖自氧化、蛋白非酶糖基化、葡萄糖诱导激活蛋白激酶 C、多元醇通路活性增加、抗氧化酶受损以及线粒体改变等^[4]。如何保护毛细血管周细胞抵抗氧化应激导致凋亡是最近研究的一个热点。我们的目的在于提供新的信息, 如有关细胞质中含量丰富的过氧化物酶 (PRDXs) 参与细胞抗氧化防御过程, 特别是 PRDX5, 6 对 DR 中视网膜周细胞氧化应激损伤的保护作用。

1 PRDXs 家族及其作用

PRDXs 是一个新的抗氧化家族, 具有使 ROS 解毒的功能, 因此能对内/外环境应激提供细胞保护^[5]。哺乳动物 PRDXs 家族由 6 个成员 (PRDX1-6) 组成, 所有 PRDXs 除了 PRDX6 是一种细胞内抗氧化蛋白、只有 1 个有催化活性的半胱氨酸外, 其余都有 2 个^[6]。PRDX5 是一种新的不常见的 PRDX, 有线粒体和过氧化物酶体靶信号^[7], 并被定性为硫氧还蛋白过氧化物酶。PRDX6 具有抑制过氧和磷脂氢过氧化物还原酶活性的作用^[8,9]。推测高血糖条件下 PRDXs 能在周细胞内除去 H₂O₂ 或捕获 ROS, 从而保护周细胞免受高血糖引起的细胞丧失。

2 TAT 的转导作用

基因/蛋白转运的进展以及一些蛋白转导域的鉴定为转运蛋白进入细胞/器官提供了可能^[10]。HIV-反式激活转导 (trans-activating transduction, TAT) 域有 11 个氨基酸 (分别为 YGRKKRRQRRR), 并对向细胞内转运蛋白时穿过质膜和血脑屏障有 100% 的潜能^[11]。研究证实连接有 TAT 的重组 PRDX6 蛋白内化进入晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells, LECs) 且具有生物活性^[12]。利用 TAT 转导域进入细胞的特性, 用猪的周细胞检测加入连接有 TAT 的 PRDX5, 6 蛋白对高葡萄糖引起的细胞死亡和氧化应激的作用, 以下实验提供新的信息, 如有关抗氧化防御抵抗 DR 中周细胞丧失, 以及 PRDX5, 6 蛋白在糖尿病周细胞损伤中的功效。

3 TAT 转导防止视网膜周细胞毒性的实验研究

Kubo 等^[13]研究表明, 与 PRDXs 家族其他成员相比

PRDX5,6 在鼠的视网膜上高表达;TAT-HA-PRDX5,6 融合蛋白能够进入培养的猪周细胞;TAT-HA-PRDX5,6 保护猪周细胞抵抗高葡萄糖引起的细胞死亡;通过 TUNEL 分析方法,发现 PRDX5,6 能明显抑制高葡萄糖暴露下周细胞的细胞凋亡和细胞死亡,说明 PRDX5,6 的抗氧化性能使其能保护视网膜周细胞抵抗高葡萄糖引起的细胞死亡;TAT-HA-PRDX5,6 保护高葡萄糖暴露下猪周细胞因氧化应激引起的 DNA 损伤;8-OHdG 是氧化应激引起 DNA 损伤的生物标志物^[14],高葡萄糖培养 10d 后,8-OHdG (+) 的周细胞显著增加,而 PRDX5,6 明显地抑制了高葡萄糖培养下氧化应激引起的 DNA 损伤。

4 PRDX5,6 保护周细胞免于凋亡及存在的问题

PRDXs 的重要性在于其在细胞质内含量丰富,并参与多种细胞进程,包括抗氧化防御、寄生虫抗药性、癌症、H₂O₂ 介导的细胞信号以及控制细胞增殖等^[15-18]。PRDXs 是众所周知的应激反应蛋白,PRDXs 的表达被 H₂O₂、糖皮质激素和紫外线照射引起的氧化应激所诱导^[19]。在鼠眼晶状体和视网膜神经节细胞中,PRDX6 表达高于 PRDX1-5,在晶状体内 PRDX5 表达高于 PRDX1-4,然而在体外培养的视网膜神经节细胞内 PRDX5 表达在 PRDXs 中是最低的。在鼠视网膜内 PRDX5,6 基因表达高于其它 PRDX 成员。既往研究也显示在具有糖尿病或半乳糖诱发白内障的鼠晶状体内 PRDX6 的 mRNA 和蛋白表达降低。高血糖引起 LECs 内这些蛋白减低,使这些细胞发生凋亡。

为研究 PRDXs 对糖尿病眼部并发症,如糖尿病性白内障、新生血管性青光眼和 DR 等的防御能力,应用 TAT 介导 PRDX5,6 蛋白转导防止高葡萄糖引起视网膜周细胞毒性作用的实验研究,证实这些蛋白确有保护周细胞免受体外高葡萄糖引起细胞死亡的作用。然而在此 TAT 介导 PRDX5,6 蛋白转导防止高糖视网膜周细胞毒性实验中应用的葡萄糖浓度是非生理性的,体外培养的周细胞对刺激原的敏感性下降。其次,PRDX5,6 在保护视网膜周细胞抵抗高葡萄糖引起的氧化应激损伤中都起作用,但是 PRDX5 的表达在高葡萄糖培养的猪周细胞中却是减少的,因为无法估计整个视网膜的视网膜周细胞中 PRDX5 的表达水平,因此存在的问题是,需要应用从胰蛋白酶消化的视网膜中获得的血管组织来进一步研究。

糖尿病患者应激反应的增加被认为是发生糖尿病并发症包括 DR 的促进因素,在糖尿病患者视网膜内或高葡萄糖诱发的鼠或猪周细胞内超氧化物歧化酶(SOD)水平增高,而 SOD 的 mRNA 水平下调以及谷胱甘肽水平下降,提示绝大部分是由内源性防御系统所引起的。研究发现氧化应激引起的 DNA 损伤使高葡萄糖培养的猪周细胞凋亡增多,添加 PRDX5 和/或 PRDX6 于培养基内可增加细胞的存活数,提示 PRDX5,6 确有抗氧化效能。TUNEL 和 DAPI 方法证明周细胞经高浓度葡萄糖处理后会遭受细胞凋亡,加入 PRDX5,6 能减缓这一进程,说明 PRDX5,6 通过减慢细胞凋亡通路来保护细胞。研究提示 PRDX5,6 是高葡萄糖引起周细胞死亡途径的负调控,PRDX5,6 通过控制 ROS 水平负性调控氧化应激诱发的细胞死亡。具有生物活性的重组 PRDX5,6 蛋白由蛋白转导结构域 TAT 介导进入细胞,保护细胞免受高葡萄糖引起的细胞凋亡和 ROS 升高。另外,注射 TAT-HA-PRDX5,6 蛋白可转导进入兔眼视网膜,抑制其在 DR 中周细胞的丧失。近期发现,PRDX6 具有抗坏死性能^[20],PRDX6 抑制葡萄糖引起的周细胞毒性可能与其抗细胞凋亡和抗坏死性能有关,但

我们不知道周细胞葡萄糖治疗是否会引起坏死,这也是在 TAT 转导防止视网膜周细胞毒性作用研究中存在的问题。
5 展望

DR 主要损害视网膜的微小血管,最早期的病理改变是视网膜毛细血管内皮细胞的基底膜增厚及管壁周细胞的丧失。目前研究显示应用 PRDX5,6 能抑制高葡萄糖培养的猪周细胞凋亡和氧化应激对 DNA 的损伤,因此补充 PRDX5,6 可作为一种辅助治疗,有助于抑制或延缓早期 DR 的产生和进展。而临床应用玻璃体内注射 TAT 连接的 PRDX5,6 蛋白对早期 DR 可能是一种有益的治疗方法。

参考文献

- 1 李凤鸣. 眼科全书. 北京:人民卫生出版社 1996;2320
- 2 何守志. 临床眼科学. 天津:天津科技出版社 2002;707
- 3 Amano S, Yamaqishi S, Inaqaki Y, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits oxidative stress-induced apoptosis and dysfunction of cultured retinal pericytes. *Microvasc Res* 2005;69(1-2):45-55
- 4 Chung SS, Ho EC, Lam KS, et al. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(8Suppl 3):S233-236
- 5 Wood ZA, Schroder E, Harris JR, et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences* 2003;28(1):32-40
- 6 Fatma N, Singh DP, Shinohara T, et al. Transcriptional regulation of the antioxidant protein 2 gene, a thiol-specific antioxidant, by lens epithelium-derived growth factor to protect cells from oxidative stress. *J Biol Chem* 2001;276(52):48899-48907
- 7 Verdoucq L, Vignols F, Jacquot JP, et al. In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *J Biol Chem* 1999;274(28):19714-19722
- 8 Peshenko IV, Shichi H. Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxy nitrite. *Free Radical Bio Med* 2001;31(3):292-303
- 9 Chen JW. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem* 2000;275(37):28421-28427
- 10 Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 1988;55(6):1189-1193
- 11 Becker-Hapak M. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods* 2001;24(3):247-256
- 12 Kubo E. TAT-mediated PRDX6 protein transduction protects against eye lens epithelial cell death and delays lens opacity. *Am J Physiol Cell* 2008;294(3):C842-C855
- 13 Kubo E, Singh DP, Fatma N, et al. TAT-mediated peroxiredoxin 5 and 6 protein transduction protects against high-glucose-induced cytotoxicity in retinal pericytes. *Life Sci* 2009;84(23-24):857-864
- 14 Morita T. Heme oxygenase-1 in vascular smooth muscle cells counteracts cardiovascular damage induced by angiotensin II. *Curr NVR* 2005;2(2):113-120
- 15 Kim H. Role of peroxiredoxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-induced apoptosis in thyroid cells. *J Biol Chem* 2000;275(24):18266-18270
- 16 Sherman DR. Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1996;272(5268):1641-1643
- 17 Chung YM. Increased expression of peroxiredoxin II confers resistance to cisplatin. *Anti CR* 2001;21(2A):1129-1133
- 18 Choi MH. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature* 2005;435(7040):347-353
- 19 Kubo E. Development- and age-associated expression pattern of peroxiredoxin 6, and its regulation in murine ocular lens. *Mechan Age & devel* 2006;127(3):249-256
- 20 Fatma N. Peroxiredoxin 6 delivery attenuates TNF-alpha- and glutamate-induced retinal ganglion cell death by limiting ROS levels and maintaining Ca²⁺ homeostasis. *Brain Research* 2008;1233:63-78