

抗 PDGFR- α 抗体对铁锈诱导的人视网膜色素上皮细胞增殖过程的作用

李林林^{1,2}, 庞东渤²

作者单位:¹(121000)中国辽宁省锦州市,辽宁医学院研究生学院;²(121000)中国辽宁省锦州市,辽宁医学院附属第一医院眼科

作者简介:李林林,在读硕士研究生,研究方向:眼底病。
通讯作者:庞东渤,男,博士,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向:眼底病. pang2003@163.com

收稿日期:2013-05-14 修回日期:2013-09-16

Effect of anti-PDGFR- α antibody on the process of rust-induced human retinal pigment epithelial cell proliferation

Lin-Lin Li^{1,2}, Dong-Bo Pang²

¹Graduate School of Liaoning Medical University, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dong - Bo Pang, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. pang2003@163.com

Received:2013-05-14 Accepted:2013-09-16

Abstract

• AIM: To study the effect of platelet derived growth factor α receptor (PDGFR- α) antibody on the rust-induced human retinal pigment epithelial cell (hRPE) proliferation.

• METHODS: *In vitro* rust hRPE cells proliferation differentiation model was established. Blank control group, rust group, PDGFR- α antibody (1, 10, 50, and 100 μ g/mL) treatment group were established. The effect of anti-PDGFR- α antibody on the growth of RPE was determined by MTT colorimetric assay after 0, 12, 24, 48h, and the inhibition rates were calculated accordingly.

• RESULTS: After adding the anti-PDGFR- α antibody, hRPE cells proliferation activity was decreased at certain concentration as the antibody concentration increased, and 50 μ g/mL anti-PDGFR- α antibody was the optimum concentration to inhibit hRPE cells proliferation, the inhibitory rate of hRPE was 42.44%.

• CONCLUSION: The anti-PDGFR- α antibody shows strong inhibitory effect on the growth of cultured hRPE.

• KEYWORDS: retinal pigment epithelium cells; platelet derived growth factor α ; receptor; MTT

Citation: Li LL, Pang DB. Effect of anti-PDGFR- α antibody on the process of rust-induced human retinal pigment epithelial cell proliferation. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013;13(10):1974-1977

摘要

目的:观察抗血小板源性生长因子受体 α (PDGFR- α) 抗体对铁锈诱导的人视网膜色素上皮细胞 (hRPE) 增殖活性的影响。

方法:采用细胞体外培养技术,用铁锈建立 hRPE 细胞增殖分化模型。设置空白组、铁锈组、抗 PDGFR- α 抗体(1, 10, 50, 100 μ g/mL) 处理组,分别作用 0, 12, 24, 48h 后采用 MTT 比色法测定 hRPE 细胞的抑制率。

结果:加入抗 PDGFR- α 抗体后 hRPE 细胞增殖活性在一定浓度范围内随着抗体浓度增加而下降,而 50 μ g/mL 抗 PDGFR- α 抗体为抑制 hRPE 细胞增殖的最佳浓度,其抑制率为 42.44%。

结论:抗 PDGFR- α 抗体可以抑制 hRPE 细胞的增殖活性。

关键词:视网膜色素上皮细胞;血小板源性生长因子 α ; 受体; MTT

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.10.08

引用:李林林,庞东渤. 抗 PDGFR- α 抗体对铁锈诱导的人视网膜色素上皮细胞增殖过程的作用. 国际眼科杂志 2013; 13 (10):1974-1977

0 引言

增殖性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞和胶质细胞在细胞因子、生长因子等参与下发生增生和移行,在玻璃体内、视网膜前后表面形成增生膜,在 PVR 膜上最丰富的细胞类型是 RPE 细胞。血小板源生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 为 180kDa 分子量的单链膜糖蛋白,PDGF 配体的活化信号传导通过两个细胞表面受体酪氨酸激酶 (PTK) PDGFR- α , PDGFR- β 。PDGFR- α 在细胞的生长增殖分化中起重要的调节作用,抗 PDGFR- α 的表达可显著抑制 RPE 细胞的增殖,并能诱导其凋亡^[1,2]。PVR 合并视网膜脱离患者的玻璃体 PDGFR- α 水平较高水平表达^[3]。因此,PDGFR- α 在以 RPE 细胞增殖分化为特征的增生性玻璃体视网膜病变的治疗中可以成为新的、重要的治疗靶点。本文研究抗 PDGFR- α 抗体对人 RPE 细胞增殖的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 hRPE-19 细胞株,购自北京北纳联创生物技术有限公司,细胞传至第 3 代用于实验。DMEM/F₁₂ 培养基,

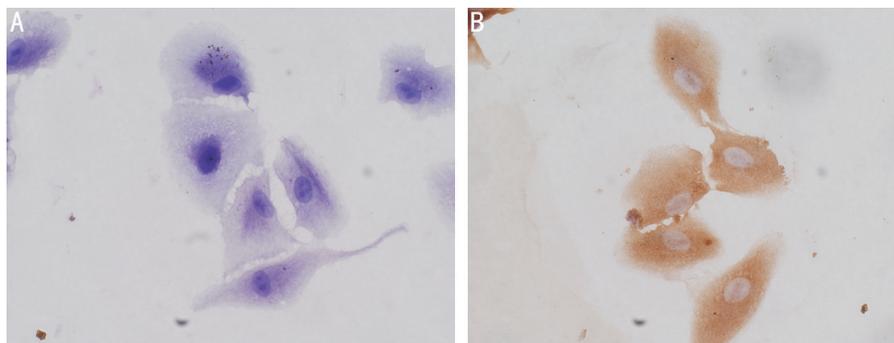


图1 免疫组织化学检测 RPE 细胞角蛋白($\times 200$) A:阴性胞浆成蓝色;B:阳性胞浆成棕黄色。

表1 各浓度抗 PDGFR- α 抗体作用不同时间后 hRPE 培养孔的 A 值

分组	0h	12h	24h	48h	$\bar{x} \pm s$
空白组	0.095 \pm 0.014	0.132 \pm 0.010	0.203 \pm 0.010	0.285 \pm 0.011	
铁锈对照组	0.124 \pm 0.006 ^a	0.193 \pm 0.012 ^a	0.247 \pm 0.013 ^a	0.377 \pm 0.013 ^a	
铁锈+1 μ g/mL 抗 PDGFR- α 抗体	0.135 \pm 0.003 ^b	0.217 \pm 0.019 ^b	0.276 \pm 0.006 ^b	0.393 \pm 0.015 ^b	
铁锈+10 μ g/mL 抗 PDGFR- α 抗体	0.120 \pm 0.002 ^b	0.164 \pm 0.005 ^b	0.206 \pm 0.011 ^b	0.263 \pm 0.011 ^b	
铁锈+50 μ g/mL 抗 PDGFR- α 抗体	0.115 \pm 0.003 ^b	0.132 \pm 0.019 ^b	0.161 \pm 0.010 ^b	0.217 \pm 0.009 ^b	
铁锈+100 μ g/mL 抗 PDGFR- α 抗体	0.116 \pm 0.003 ^{b,c}	0.133 \pm 0.014 ^{b,c}	0.161 \pm 0.011 ^{b,c}	0.217 \pm 0.009 ^{b,c}	

注:^a $P < 0.05$ vs 空白组;^b $P < 0.05$,^c $P > 0.05$ vs 铁锈对照组。

表2 各组 RPE 细胞的生长抑制率的比较

分组	0h	12h	24h	48h	($\bar{x} \pm s, \%$)
铁锈+1 μ g/mL 抗 PDGFR- α 抗体	-8.87 \pm 0.038	-12.44 \pm 0.08	-11.74 \pm 0.002	-4.24 \pm 0.038	
铁锈+10 μ g/mL 抗 PDGFR- α 抗体	3.22 \pm 0.049	15.03 \pm 0.060	16.60 \pm 0.030	0.24 \pm 0.029	
铁锈+50 μ g/mL 抗 PDGFR- α 抗体	7.25 \pm 0.090	31.61 \pm 0.092	34.82 \pm 0.008	2.44 \pm 0.012	
铁锈+100 μ g/mL 抗 PDGFR- α 抗体	6.45 \pm 0.030	31.09 \pm 0.052	34.82 \pm 0.028	2.44 \pm 0.011	

胎牛血清和 D-Hank's 液(Hyclone,美国),鼠抗人角蛋白-18 单克隆抗体(北京中杉公司),血小板源性生长因子 α 受体抗体(北京中杉公司),MTT(北京赛驰生物有限公司),二甲基亚砜(天津大茂公司),CKX41 型倒置相差显微镜(Olympus 公司产品,日本),酶联检测仪 Bio-Rad Model (日本)。

1.2 方法

1.2.1 hRPE 细胞的培养和鉴定 待 hRPE 细胞生长达 80%~90% 融合状态时,用 2.5g/L 胰蛋白酶消化法进行传代,将细胞培养瓶放入条件为 50mL/L CO₂,95mL/L,37 $^{\circ}$ C 空气的细胞培养箱中,2~3d 换液一次,1:3 或 1:4 为适宜的接种密度。将细胞的第 4 代用于实验,用鼠抗人角蛋白-18 单克隆抗体进行细胞鉴定,胞浆若是棕黄色则培养的细胞为 hRPE。

1.2.2 抗 hRPE 细胞增殖的作用 用 96 孔板接种细胞,细胞的接种浓度为 2×10^4 个/孔,每四个相同浓度孔为一组,实验组加入含铁锈粉末 Fe₂O₃ 0.1mg 培养 48h 后,分别加入 1,10,50 和 100 μ g/mL 抗 PDGFR- α 抗体继续分别培养 0,12,24,48h,96 孔板每个孔滴 50 μ L DMEM/F₁₂ 培养液,在培养箱里预温;每孔加 MTT 各 20 μ L 使其浓度为 5g/L,再放于培养箱中作用 4h,弃去 DMEM/F₁₂ 培养液,每孔加入 100 μ L DMSO,常温下放置于摇床上 10min,用酶标仪进行测试,在 492nm 波长处读吸收光值(A 值)。重复测 3 次,取其平均值并作记录。无抗体干预和无铁锈粉末的一

组为空白组;含铁锈粉末和无抗体干预的一组为对照组。计算其抑制率:细胞的生长抑制率 = 1 - 实验组 A 值 / 对照组 A 值 $\times 100\%$ 。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 分析软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个组别间比较采用单因素方差分析的方法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学。

2 结果

2.1 细胞的鉴定 免疫组织化学检测 RPE 细胞角蛋白,DAB 染色用以检测其特异的角蛋白,细胞角蛋白抗体结合细胞质内角蛋白,阳性细胞胞浆成棕黄色着色,阳性率几乎达 100% (图 1),可以证明培养的细胞为 hRPE 细胞。

2.2 抗 PDGFR- α 抗体对铁锈诱导的 hRPE 细胞增殖的影响

2.2.1 不同浓度抗 PDGFR- α 抗体对 hRPE 细胞增殖的影响 抗 PDGFR- α 抗体组的 hPRE 细胞其培养孔的 A 值与铁锈诱导组比较,其差异有统计学意义($P < 0.05$)。在同一作用时间,hRPE 培养孔 A 值表现出随浓度增加而减少的趋势(表 1,2)。在一定浓度范围内抗 PDGFR- α 抗体对抑制细胞增殖作用有剂量依赖关系,1 μ g/mL 抗 PDGFR- α 抗体对细胞增殖有轻度的促进作用。抗 PDGFR- α 抗体浓度 $< 50\mu$ g/mL 的各组相邻浓度实验组组间的 hPRE 细胞培养孔 A 值比较,其差异有统计学意义($P < 0.05$),抗 PDGFR- α 抗体浓度 $> 50\mu$ g/mL 以上的相邻浓度组间的

hPRE 细胞培养孔 A 值比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。由图表可以得出 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ PDGFR- α 抗体为抑制 hRPE 细胞增殖的最为适宜浓度。

2.2.2 不同作用时间抗 PDGFR- α 抗体对 hPRE 细胞增殖的影响 各浓度抗 PDGFR- α 抗体作用不同时间细胞培养孔的 A 值(表 1,2)。所有实验组的 hPRE 培养孔的 A 值与培养 0h 的对照组相比较,其差异都有统计学意义 ($P < 0.05$)。在同一抗 PDGFR- α 抗体浓度条件,细胞培养孔 A 值随作用时间延长而增加。各浓度 PDGFR- α 抗体作用不同时间,两两组间的 hPRE 培养孔 A 值的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

一般认为 PVR 是眼组织对损伤的过度修复的反应,其血-视网膜屏障受到破坏使血小板源性生长因子、转化生长因子等血清成份侵入玻璃体腔进行移行和增殖,同时 RPE 细胞由视网膜裂孔进入玻璃体内分泌释放多种细胞因子如血小板源性生长因子、肿瘤坏死因子、成纤维细胞生长因子等这些因子,刺激活化的巨噬细胞和成纤维细胞,使之产生纤维黏连蛋白等物质组成细胞外基质^[4]。由此可见,细胞因子广泛参与了 PVR 病理过程的各个环节,为 PVR 发生发展的关键影响因素。

RPE 细胞在正常状态下是静止的,但在体外培养或受损伤时则发生增殖分化。RPE 细胞的移行、增殖分化是 RVR 发生的主要原因,因此早期预防 RPE 细胞增殖分化的发生是治疗 PVR 的关键。RPE 细胞有多种生物学功能,其中重要的功能之一是有异常的吞噬功能,细胞异常的吞噬常常造成各种眼底疾病,如视网膜增殖、黄斑变性等^[5]。RPE 细胞能够非特异性地吞噬碳颗粒、黑色素颗粒、乳胶颗粒等^[6]。氧化铁是铁锈的主要成分,它能够溶于组织内和组织蛋白结合,形成一种铁蛋白化合物沉积于组织内,并可产生锈染侵害。铁锈对外胚叶来源的组织有特殊的亲和力,也可见于虹膜基质层、角膜实质及内皮层、视网膜胶质组织及房角组织等。临床上常常看到眼铁锈症多数因为患者因铁异物进入眼内未能够及时取出则严重损害患者的视功能。现在已经有实验研究表明,0.01mg 的铁锈可以诱导人 RPE 细胞向巨噬细胞转化,从而引起 RPE 细胞的增殖分化,且 48h 细胞发生增殖分化的能力最强^[7]。

血小板源生长因子家族(PDGFs)为 180kDa 分子量的单链膜糖蛋白,包括 5 种二聚体蛋白 PDGF-AA,PDGF-AB,PDGF-BB,PDGF-CC,PDGF-DD。这 5 个二聚体的 PDGF 配体的活化信号传导通过两个细胞表面受体是酪氨酸激酶(PTK)PDGFR- α 和 PDGFR- β 。PDGF 以旁分泌或自分泌的方式激活血小板衍化生长因子受体而发挥作用。最早研究发现 PEGFR- α 对组织创伤修复至关重要,在应激反应中 PDGFR- α 与 PDGF 结合,进行有丝分裂趋化成巨噬细胞、中性粒细胞、纤维平滑肌细胞,刺激巨噬细胞产生许多的重要细胞生长因子,为创伤愈合各阶段中做准备,并促进细胞外基质分子的合成与分泌,从而在创面愈合中发挥重要作用。最近有研究发现,PDGFR 的过度激活能增强细胞的转化能力^[8]。

PDGFR- α 在正常胚胎发育生理过程、多种疾病发生发展及修复过程中起着非常重要的作用,它以与相应配体结合的作用方式,启动细胞内转导通路的多种信号,形成十分复杂的信号网络,产生生物学效应。血小板源生长因子的表达受体 α (PDGFR- α) 可以使成纤维细胞的能力显著地增加,进而诱导实验 PVR 的发生,研究发现抗 PDGFR- α 抗体抑制剂可显著抑制 PVR 的增殖^[9]。Lei 等^[10] 发现 PDGFR- α 能造成潜在 PVR 的发生,而且 PVR 膜上最丰富的细胞类型是 RPE 细胞,其研究表明抑制 PDGFR- α 活化信号都有可能防止发展 PVR。有研究在视网膜脱离患者玻璃体切割中发现,PVR 合并视网膜脱离患者的玻璃体内 PDGF 及 PDGFR- α 水平较不伴 PVR 的视网膜脱离患者高^[11],这也可能与 PVR 增生膜上的神经胶质细胞和 RPE 细胞是 PDGFR- α 的分泌细胞有关。因此认为视网膜增生膜中的细胞有能力合成和分泌 PDGF,而且细胞生长因子也可能通过增殖细胞的旁分泌或自分泌方式产生的^[12,13]。PDGF 能够诱导潜在的增殖和迁移的人类 RPE 细胞以及信号传导通路,PDGF 成为潜在的治疗靶点,其受体 PDGFR- α 与 PVR 密切相关^[14]。体外研究观察相关联的兔模型结果表明,PVR 的发病机制之一可能是 Müller 细胞通过上调 PDGFR- α 发挥作用,提示 PDGF 及 PDGFR- α 是发生 PVR 的重要因素^[15,16]。

我们的研究表明:抗 PDGFR- α 抗体可以抑制铁锈诱导的人 RPE 细胞的增殖,并存在剂量依赖性;低于 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 RPE 细胞的增殖有轻度的促进作用, $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上的抗 PDGFR- α 抗体对 RPE 细胞的增殖有抑制作用,当其浓度到 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 后对细胞的抑制作用不再随着浓度的增加逐渐减低而出现平台现象,所以实验的结果表明 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗 PDGFR- α 抗体对细胞的抑制效果最为明显,其抑制率为 42.44%。

RPE 细胞的增殖分化是导致 PVR 发生的主要原因,如何早期抑制 RPE 细胞的增殖是治疗 PVR 的关键。抗 PDGFR- α 抗体可能通过特异性结合 RPE 细胞表面的 PDGFR- α 受体,竞争性地抑制 PDGF 与 PDGFR- α 结合之后产生的 RPE 细胞增殖的生物学效应途径,来抑制 RPE 细胞的增殖,进而发挥对增殖 RPE 细胞的保护作用,为 PVR 的治疗提供了一定的理论基础和实验依据。

参考文献

- 1 彭燕一,邱梅园,丁芝祥,等.应用反义寡核苷酸沉默 PDGFR- α 表达对人 RPE 细胞增生和凋亡的影响.中华实验眼科杂志 2012;30(4):341-345
- 2 邱梅园,彭燕,黄岚珍,等. PDGFR- α 受体反义寡核苷酸对体外视网膜色素上皮细胞增殖和凋亡的影响.国际眼科杂志 2011;11(2):229-231
- 3 方腾,李秋明.增生性玻璃体视网膜病变的研究现状.咸宁学院学报 2006;20(3):274-276
- 4 张诚玥,李根林.增生性玻璃体视网膜病变中细胞因子的作用.国外医学眼科学分册 2005;29(6):407-411
- 5 Mclellan GJ, Bedford PG. The cytoskeletal intermediated filaments of canineretinal pigment epithelial cells *in vivo* and *in vitro*. Res Vet Sci 1997;63(3):245-251
- 6 郑江娉.眼铁锈症.眼外伤职业眼病杂志 1999;21:395-396
- 7 王祥珪.铁锈诱导视网膜色素上皮向巨噬细胞的转化分化分子表

达的实验研究. 中山大学学位论文 2008

8 Spraul CW, Kaven C, Lang GK, et al. Effect of growth factors on bovine retinal pigment epithelial cell migration and proliferation. *Ophthalmic Res* 2004;36(3):166-171

9 Zheng Y, Ikuno Y, Han M, et al. Platelet-derived growth factor receptor kinase inhibitor AG1295 and inhibition of experimental proliferative vitreoretinopathy. *Jpn J Ophthalmol* 2003;47(2):158-165

10 Lei H, Rhéaume MA, Velez G, et al. Expression of PDGFR- α is a Determinant of the PVR Potential of ARPE-19 Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(9):5016-5021

11 Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 2008;22:1276-1312

12 Johnsen EO, Froen RC, Albert R, et al. Activation of neural progenitor cells in human eyes with proliferative vitreoretinopathy. *Exp*

Eye Res 2012;98(1):28-36

13 孙蕾, 吴雅臻. 血小板源性生长因子与增生性玻璃体视网膜病变. *眼科新进展* 2008;28(1):69-72

14 Cui J, Lei H, Samad A, et al. PDGF receptors are activated in human epiretinal membranes. *Exp Eye Res* 2009;88:438-444

15 Velez G, Weingarden AR, Tucker BA, et al. Retinal pigment epithelium and muller progenitor cell interaction increase muller progenitor cell expression of PDGFR- α and ability to induce proliferative vitreoretinopathy in a rabbit model. *Stem Cell International* 2012;10:1155-1161

16 Lei H, Rheume MA, Kazlauskas A. Recent developments in our understanding of how platelet-derived growth factor (PDGF) and its receptors contribute to proliferative vitreoretinopathy. *Exp Eye Res* 2010;90(3):376-381

科技期刊对论文摘要的要求

根据有关规定,可以把摘要编写要求归纳成如下几点。

省略“我们”“作者”“本文”这样的主语。

简短精练,明确具体。简短,指篇幅短,一般要求50~300字(依摘要类型而定);精炼,指摘录出原文的精华,无多余的话;明确具体,指表意明白,不含糊,无空泛、笼统的词语,应有较多而有用的定性和定量的信息。

一般不要交代背景,更不要阐述一般性知识。

格式要规范,尽可能用规范术语,不用非共知共用的符号和术语。不得简单地重复题名中已有的信息,并切忌罗列段落标题来代替摘要。除了实在无变通办法可用以外,一般不出现插图、表格,以及参考文献序号,一般不用数学公式和化学结构式。不分段。

摘要一般置于作者及其工作单位以后,关键词之前。

摘自《科学技术期刊编辑教程》