

pEGFP/Ang-1 转染 BMSCs 对高糖环境中 RF/6A 细胞的保护作用

侯 阳¹, 李福智², 左中夫³, 刘学政³

基金项目:国家自然科学基金青年基金(No. 81300931)

作者单位:¹(121001)中国辽宁省锦州市,辽宁医学院科学实验中心;²(121001)中国辽宁省锦州市,辽宁医学院附属第三医院胸外科;³(121001)中国辽宁省锦州市,辽宁医学院解剖学教研室

作者简介:侯阳,硕士,实验师,研究方向:糖尿病视网膜病变。

通讯作者:刘学政,医学博士,解剖学教授,博士研究生导师,研究方向:糖尿病视网膜病变的发病机制和防治。liuxuezheng168@vip.sina.com

收稿日期:2013-12-25 修回日期:2014-04-01

pEGFP/Ang-1 transfected BMSCs attenuates glucose-damaged RF/6A cells

Yang Hou¹, Fu-Zhi Li², Zhong-Fu Zuo³, Xue-Zheng Liu³

Foundation item: Youth Foundation of the National Natural Science Foundation of China(No. 81300931)

¹Central Laboratory and Key Lab of Molecular Cell Biology and New Drug Development of Liaoning Education Department, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; ²Thoracic Surgery of the Third Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; ³Department of Anatomy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xue-Zheng Liu. Department of Anatomy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. liuxuezheng168@vip.sina.com

Received:2013-12-25 Accepted:2014-04-01

Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effects of pEGFP/Ang-1 transfected BMSCs on RF/6A in condition of high glucose concentration.

• **METHODS:** BMSCs were transfected pEGFP/Ang-1, confirming by observation of enhanced green fluorescent protein (EGFP) with fluorescence microscope. Rhesus chorioido-retinal endothelial cells (RF/6A) were cultured with or without pEGFP/Ang-1 transfected BMSCs in transwell under high glucose concentration. Three days after co-cultured, cell vitality and pPKB expression of RF/6A were detected with methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) methods and Western blot respectively.

• **RESULTS:** EGFP was expressed in BMSCs successfully transfected with pEGFP/Ang-1. RF/6A co-cultured with pEGFP/Ang-1 transfected BMSCs showed higher viability and pPKB expression compared with RF/6A cultured in condition of high glucose concentration

cultured with or without untransfected BMSCs ($P < 0.01$ respectively), showing no difference to control group ($P > 0.05$ respectively).

• **CONCLUSION:** pEGFP/Ang-1 transfected BMSCs showed protective effects, may via PKB, on RF/6A in condition of high glucose concentration.

• **KEYWORDS:** angiopoietin-1; bone marrow mesenchymal stem cells; Rhesus choroidal-retinal vascular endothelial cell; high glucose concentration

Citation: Hou Y, Li FZ, Zuo ZF, et al. pEGFP/Ang-1 transfected BMSCs attenuates glucose-damaged RF/6A cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2014;14(5):807-810

摘要

目的:观察血管生成素-1/重组质粒(pEGFP/Ang-1)转染的大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)对高浓度葡萄糖损伤猴脉络膜-视网膜内皮细胞(RF/6A)的保护作用。

方法:以pEGFP/Ang-1转染BMSCs,倒置荧光显微镜下观察增强型绿色荧光蛋白的表达,再利用Transwell模型,将转染的BMSCs与RF/6A共培养于高浓度葡萄糖培养基中。3d后MTT法检测RF/6A活力,Western blot检测磷酸化蛋白激酶B(phosphorylated protein kinase B,P-PKB)的表达,从而探讨转染pEGFP/Ang-1的BMSCs对高浓度葡萄糖培养中的RF/6A的保护作用。

结果:成功转染pEGFP/Ang-1的BMSCs可见增强型绿色荧光蛋白表达,与转染pEGFP/Ang-1的BMSCs共培养的RF/6A细胞活力及P-PKB的表达均高于未转染组(均 $P < 0.01$),与对照组无明显差别(均 $P > 0.05$)。

结论:质粒pEGFP/Ang-1转染的BMSCs对高糖环境中的RF/6A具有保护作用,其机制可能与P-PKB表达上调有关。

关键词:血管生成素-1;骨髓间充质干细胞;脉络膜-视网膜内皮细胞;高浓度葡萄糖

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.05.05

引用:侯阳,李福智,左中夫,等.pEGFP/Ang-1转染BMSCs对高糖环境中RF/6A细胞的保护作用.国际眼科杂志2014;14(5):807-810

0 引言

糖尿病及糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)在我国农村的患病也相当高,据最新统计,在我国农村30岁以上人群中糖尿病患者将近2.11千万,其中920万患者患有DR,130万人伴有视力损伤^[1]。国际糖尿病联盟的糖尿病地图(Diabetes Atlas)数据显示,2010年糖

糖尿病患者人数达到2.85亿,约占全世界成人的7%^[2]。DR的特征性病理改变是视网膜神经退行性变和微血管病变以及周细胞和内皮细胞的功能完整对维持视网膜毛细血管的稳定性具有十分重要的作用^[3]。研究表明DR早期即有周细胞水肿、毛细血管内皮细胞下水肿及毛细血管内皮细胞微绒毛形成。本实验通过血管生成素-1重组质粒(pEGFP/Ang-1)转染大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)细胞株,与恒河猴脉络膜-视网膜内皮细胞(RF/6A)共培养,观察高浓度葡萄糖对RF/6A损伤的保护作用,从而为糖尿病视网膜病变的进一步治疗提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 4周龄的雄性SD大鼠2只(体质量100~120g),用于骨髓间充质干细胞取材;由辽宁医学院动物实验中心提供。RF/6A购于中科院上海细胞库。Transwell培养板(0.4 μ m聚酯隔膜)购于Corning Incorporated公司,DMEM培养基购于GIBCO公司;FBS购于Hyclone公司;葡萄糖购于Sigma公司;FUGENE HD转染试剂购于ebiotrade公司;荧光显微镜购于Olympus公司;加样器购于GILSON公司;生物安全柜购于HEAL FORCE HFsafe-1200公司;鼠抗人P-PKB单克隆抗体购于Alexis公司。

1.2 方法

1.2.1 FuGENE HD转染试剂将重组表达质粒稳定转染至BMSCs细胞内 在无菌EP中制备。溶液A:将2 μ g质粒DNA溶于100 μ L无血清培养基中。溶液B:将8 μ L HD试剂稀释于无血清培养基中,合并溶液A和B,终体积100 μ L。加0.8mL无血清培养基至HD转染试剂-质粒DNA混合物中,放置培养箱。转染后48~72h,弃培养液,更换浓度为500 μ g/mL的G418培养液进行筛选。同时用未加转染液的细胞做对照。G418浓度可降至150~250 μ g/mL,以维持筛选作用。倒置荧光显微镜下观察增强型绿色荧光蛋白的表达情况。

1.2.2 RF/6A的培养和冻存及分组 收到邮购的猴脉络膜-视网膜内皮细胞(rhesus macaque choroids-retinal Endothelial, RF/6A)后,在倒置显微镜下观察细胞的生长情况,可见细胞贴壁,放置培养箱中静止4h,可进行传代;弃去培养液用PBS洗2次,以自制MEM完全培养基换液,加1mL消化液置培养瓶中,消化3min,在倒置显微镜下观察细胞消化情况,见胞质回缩,迅速终止消化。按6mL/瓶补充完全培养基,分到新的培养瓶中按照1:2进行传代培养。RF/6A细胞的分组:A组(正常对照组)葡萄糖浓度5.5mmol/L;B组(高糖组)葡萄糖浓度40mmol/L;C组(转pEGFP/Ang-1组)葡萄糖浓度40mmol/L+转染pEGFP/Ang-1;D组(未转pEGFP/Ang-1组)葡萄糖浓度40mmol/L+未转pEGFP/Ang-1。

1.2.3 Transwell实验检测对转染BMSCs细胞与RF/6A细胞共培养 共培养模型的建立与分组:利用复合培养体系(Transwell培养板)将转染pEGFP/Ang-1重组质粒的BMSCs细胞和未转染的BMSCs细胞,分别加入Transwell系统的上层小室,下室加入含有5.5,40mmol/L的葡萄糖;在培养液以其中的大分子蛋白可以相互交流而细胞间不相互接触的培养板内培养,其间的隔膜孔径为0.4 μ m。置于孵箱中继续培养。

1.2.4 MTT比色法检测RF/6A细胞活力 测定不同条件下RF/6A细胞活力;调整RF/6A细胞浓度 1×10^4 /mL

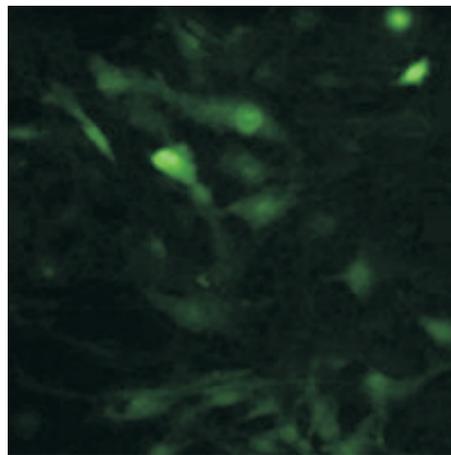


图1 荧光显微镜BMSCs转染后72h($\times 100$)。

加入96孔板内200 μ L/孔,24h后换液,分组培养至3d。检测前3h,换成相应的无血清培养基。每孔加入MTT溶液(5mg/mL)孵育3h后终止培养。每孔加入150 μ L二甲基亚砜,低速振荡15min。选择490nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值(OD值),计算不同条件作用后的细胞活力,重复5次,取其均值。计算公式:细胞活力=实验组A值/正常组A值 $\times 100\%$ 。

1.2.5 Western blot检测磷酸化蛋白激酶B 3d后对细胞进行检测去培养液,用PBS冲洗3遍,加入100 μ L含蛋白酶抑制剂的预冷裂解液吹打混匀,置于冰上裂解。采用考马斯亮蓝法,测定上清蛋白浓度,将所有蛋白样品调至等浓度上样,以80V电压转移到pvdf膜上,用封闭液(1 \times TBST,5%脱脂奶粉)室温封闭1h,再用抗体稀释液(1 \times TBST,1%脱脂奶粉)1:250稀释一抗,室温孵育2h。1 \times TBST液洗膜3次,每次10min。然后,以同样方法,1:3000稀释二抗,室温孵育1.5h,1 \times TBST液洗膜3次,将膜置于含BCIP(33 μ L)/NBL(66 μ L)的染色液10mL于室温下轻轻摇晃,使蛋白条带直接显影、定影,胶片洗涤干燥,利用kodak电泳图像分析系统对图片各电泳条带扫描, β -actin对照,对显影相对强度进行统计学分析。

统计学分析:采用SPSS 17.0统计软件,数据均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染后BMSCs形态学结果 转染后BMSCs细胞的形态学结果:在荧光显微镜下观察转染后48~72h荧光显微镜下观察可见BMSCs可见绿色荧光,细胞核及胞质均有表达。本实验中证明我们成功将pEGFP/Ang-1质粒转入BMSCs内(图1)。

2.2 培养RF/6A细胞形态学观察 正常对照组细胞外观呈扁平上皮状,大多数为椭圆形,铺路石样外观,细胞界限清晰(图2A)。高糖组细胞形态开始出现变化,细胞胞体出现明显的收缩,大部分细胞呈不规则的改变,细胞胞体开始伸出细长的突起,细胞形状呈不规则改变,细胞数量明显少于对正常对照组(图2B)。转pEGFP/Ang-1组细胞基本为椭圆形少数呈梭形,细胞界限清楚,呈典型的鹅卵石样外观,细胞成簇生长(图2C)。未转pEGFP/Ang-1组细胞开始萎缩,细胞间隙逐渐增大,细胞边缘有少数突起形成,细胞数量相对减少(图2D)。

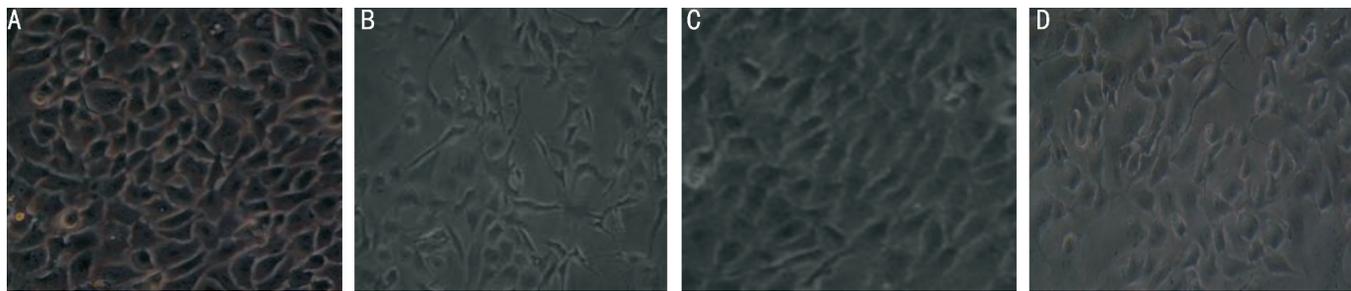


图2 RF/6A 细胞形态学观察($\times 200$) A:正常对照组;B:高糖组;C:转 pEGFP/Ang-1 组;D:未转 pEGFP/Ang-1 组。

2.3 MTT 检测共培养后 RF/6A 细胞活力 通过 MTT 检测 3d 时 RF/6A 细胞的活力结果显示:与正常对照组相比高糖组细胞活力检测明显降低(100.00 ± 0.00 vs 79.43 ± 0.15)。pEGFP/Ang-1 转染 BMSCs 组细胞存活率明显高于高糖组(86.25 ± 0.16 vs 80.52 ± 0.15)。转染 pEGFP/Ang-1 组与正常对照组、高糖组和未转染 pEGFP/Ang-1 组(80.52 ± 0.04),均有显著性差异($P < 0.01$)。高糖组与未转染 pEGFP/Ang-1 组细胞活力无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 Western blot 检测磷酸化蛋白激酶 B Western blot 检测共培养 RF/6A 细胞中 P-PKB 的蛋白含量。 β -actin 为内对照。结果显示:Western blot 检测 P-PKB 的表达,可见 PKB 的表达升高,说明对 Ang-1 对细胞有保护作用,通过 PKB 起作用(图 3)。

3 讨论

DR 的发病机制有多元醇通路激活假说:是流入多元醇通路的葡萄糖和其他糖类增多^[4]、蛋白的非酶性糖基化假说、蛋白激酶 C-甘油二酯假说、免疫/炎症学说及多种因子的作用等多种假说,但确切的发病机制、关键作用因子及作用途径不明^[5]。其病程进展始于视网膜血管变化,主要病理改变包括视网膜炎、血管渗透增加、视网膜表面异常血管新生^[6]。目前,在基因治疗的载体方面取得了很大的进展,其中病毒载体和质粒载体被广泛应用,脂质体作为基因转移的载体具有低毒、使用方便等优点,在基因治疗中采用什么方法将外源基因导入干细胞使其穿过细胞膜,进入细胞核获得表达是成败的关键。BMSCs 具有多向分化潜能,易获得,易于体外扩增,来源充足,可自体移植,并且免疫原性和抗原提呈能力都较低,既能逃避宿主的细胞免疫也能逃避宿主的体液免疫,能够被受体很好的耐受,可以自体移植。无论是体内还是体外基因转移都需要一种安全、无毒的工具来携带外源基因进入细胞。本实验研究表明,BMSCs 基因转染率较高,经转染后到达不同区域可分化为相应的组织,因而可以作为一个有效的载体进行基因治疗。

血管生成素-1(angiotensin-1, Ang-1)为血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)特异性受体酪氨酸激酶 Tie-2 的主要生理配体,其对新生血管的形成、重塑、成熟等发挥重要作用。Ang-1 的主要功能有:募集与支持血管平滑肌细胞、周细胞等血管周围细胞的作用、诱导毛细血管发芽、ECs 趋化反应、ECs 网络形成以及抗 ECs 凋亡。Ang-1 是一种对血管起保护作用的细胞因子,在血管的重塑、稳定、成熟中起着重要的作用。Joussen 等在给予糖尿病大鼠模型球内注射不同剂量 Ang-1 后结果发现 Ang-1 可以抑制

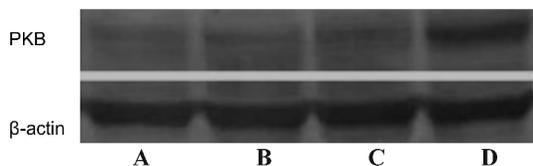


图3 Western blot 检测磷酸化蛋白激酶 B A:正常对照组; B:高糖组;C:转 pEGFP/Ang-1 组;D:未转 pEGFP/Ang-1 组。

血-视网膜屏障破坏,并呈剂量依赖性。Ang-1 可以保护血管内皮细胞免受白细胞介导的内皮细胞损伤作用并可以降低 VEGF 和 ICAM 的 mRNA 和蛋白水平,从而降低 Akt 激酶(即 PKB)活性和视网膜内皮型一氧化氮合酶(eNOS)和一氧化氮(NO)水平,P-PKB 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员,对细胞存活有重要作用^[7]。许多细胞因子,生长因子受体和抗原受体均可以诱导 P-PKB 活性,活化后的 P-PKB 在糖代谢、蛋白合成以及基因表达等过程中起着重要的调节作用。本实验以高浓度葡萄糖模拟体内糖尿病视网膜病变的微环境中 RF/6A 细胞,持续高糖条件刺激 RF/6A 细胞,可见细胞开始萎缩,细胞边缘有少数突起形成,细胞数量相对减少,大部分细胞呈不规则的改变,这是高糖对细胞的损伤使葡萄糖转化为山梨醇增加并在细胞内堆积,引起细胞的渗透性损伤。细胞内糖基化终末产物生成增多^[8],及其活化配体表达量增加^[9],由于山梨醇极性较强,不易通过细胞膜,易造成在细胞内聚集,导致细胞内渗透压升高,最终使细胞膜结构和功能受损,细胞肿胀、变性、坏死^[10]。同时山梨醇通路的激活可抑制磷酸己糖旁路,改变膜的功能,引起肌醇代谢异常,导致细胞增殖活力下降。另一方面高糖的持续刺激可引起细胞内肌醇耗竭。肌醇的耗竭使单磷酸肌醇酯、二磷酸肌醇酯、三磷酸肌醇酯的浓度下降,周细胞 DNA 合成障碍致周细胞增殖下降,同时还可使 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性下降,而后者可能与肌醇的摄取、血管内皮功能紊乱以及对血管活性物质的反应异常有关。目前,对 P-PKB 的研究已经成为细胞信号通道中起化学修饰作用的成员,参与多种细胞功能如细胞生长、分裂、分化、细胞间相互作用、细胞与细胞外基质相互作用的调控在细胞凋亡中也有特殊的作用,是细胞转导研究领域的一个新亮点。P-PKB 磷酸化的作用底物是糖原合成激酶 3 (glucocorticoid synthetase kinase 3, GSK3),该酶可以磷酸化糖原合成酶使其失活,从而抑制糖原合成。实验结果证实 P-PKB 的蛋白含量来说明,Western blot 检测 P-PKB 的表达,可见 P-PKB 的表达升高,说明 Ang-1 可以保护高糖环境下视网膜内皮细胞,这种保护作用是通过 P-PKB 途径产生。它可以有效

的抑制糖原的合成,减少高糖对 RF/6A 细胞损伤。

总之,DR 的发病机制十分复杂,上述各项发病机制相互渗透、共同参与 DR 病程发展,随着对 DR 发病机制认识的不断深入,单纯应用药物治疗已经不是理想的治疗手段,得不到好的预期结果,因此 DR 的防治工作也必然是艰巨和复杂的。目前,在基因治疗的载体方面取得了很大的进展,其中病毒载体和质粒载体被广泛应用,脂质体作为基因转移的载体具有低毒、使用方便等优点,而且具有一定的转染效率^[11],该转染技术近年来发展较快,试剂商品化和安全性好,因而目前广泛应用于细胞基因转染^[12,13]。因此,本实验选用的含绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)的 pEGFP-N1 作为报告基因,可使目的基因在哺乳动物的细胞内持续、高效地表达并具有对细胞无毒性无损伤的优点。实验证实通过 pEGFP/Ang-1 转染 BMSCs 细胞株,与 RF/6A 细胞共培养,观察高浓度葡萄糖对 RF/6A 损伤的保护作用,从而为糖尿病视网膜病变的进一步治疗提供理论基础。

参考文献

- 1 Wang FH, Liang YB, Zhang F, et al. Prevalence of diabetic retinopathy in rural China: the handan eye Study. *Ophthalmology* 2009; 116(3):461-467
- 2 Unwin N, Gan D, Whiting D. The IDF Diabetes Atlas: Providing evidence,raising awareness and promoting action. *Diabetes Res Clin Pr* 2010;87:2-3
- 3 Hirschi KK, Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 1996;32(4):687-698
- 4 Huang SP, Palla S, Ruzyczki P, et al. Aldo-keto reductases in the eye. *J*

Ophthalmol 2010;2010:521204

- 5 Park K, Chen Y, Hu Y, et al. Nanoparticle-mediated expression of an angiogenic inhibitor ameliorates ischemia-induced retinal neovascularization and diabetes-induced retinal vascular leakage. *Diabetes* 2009;58:1902-1913
- 6 唐仁波,李斌. 应努力推动我圈糖尿病视网膜病变临床基础研究. *中华眼底病杂志* 2006;22(1):1-3
- 7 Cantley LC. The phosphoinositide 3kinase pathway. *Science* 2002;296:1655-1657
- 8 Sourris KC, Harcourt BE, Penfold SA, et al. Modulation of the cellular expression of circulating advanced glycation end-product receptors in type 2 diabetic nephropathy. *Exp Diabetes Res* 2010;2010: 974681
- 9 El-Asrar AM, Missotten L, Geboes K. Expression of high-mobility groups box-1/receptor for advanced glycation end products/osteopontin/early growth response-1 pathway in proliferative vitreoretinal epiretinal membranes. *Mol Vis* 2011;17:508-518
- 10 Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr Rev* 2005;26:380-392
- 11 Hammes HP, Lin J, Wagner P, et al. Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes* 2004;53(4): 1104-1110
- 12 Davis B, Dei Cas A, Long DA, et al. Podocyte-specific expression of angiopoietin-2 causes proteinuria and apoptosis of glomerular endothelia. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(8): 2320-2329
- 13 Satchell SC, Harper SJ, Tooke JE, et al. Human podocytes express angiopoietin1, a potential regulator of glomerular vascular endothelial growth factor. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(2): 544-550