

缺氧条件下 Hsp90 抑制剂 17-AAG 对 RPE 细胞整联蛋白连接激酶表达的影响

王业青, 王健, 吕勇, 董丽, 穆华, 曹文萍

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(No. 12531389)
作者单位: (150001) 中国黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 王业青, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 眼底病。
通讯作者: 王业青. 1983.lv@163.com

收稿日期: 2013-12-28 修回日期: 2014-04-14

Effect of 17-AAG, a Hsp90 inhibitor, on the expression of ILK in RPE cells under hypoxic condition

Ye-Qing Wang, Jian Wang, Yong Lü, Li Dong, Hua Mu, Wen-Ping Cao

Foundation item: Heilongjiang Provincial Department of Education Science and Technology Research (No. 12531389)
Department of Ophthalmology, the 1st Affiliated Hospital, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Ye-Qing Wang. Department of Ophthalmology, the 1st Affiliated Hospital, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. 1983.lv@163.com
Received: 2013-12-28 Accepted: 2014-04-14

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of 17-allylamio-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), an heat shock protein 90(Hsp90) inhibitor, on the expression of integrin-linked kinase (ILK) induced by hypoxia in retinal pigment epithelium (RPE) cells.

• **METHODS:** RPE cells were cultured with 200 μ mol/L cobalt chloride (CoCl₂) for 12 hours to imitate chemical hypoxia. Pretreatment of 17-AAG was 1 hour prior to hypoxic insult. Experiment was divided into hypoxic control group, Dimethyl sulfoxide (DMSO) control group and 17-AAG pretreatment group (0.01, 0.10, 0.50, 1.00, 5.00 and 10.00 μ mol/L). RT-PCR and Western blot analysis were used to examine the expression of ILK in cultured RPE cells.

• **RESULTS:** The density ratios of ILK mRNA and β -actin mRNA of hypoxic control group, DMSO control group and 17-AAG pretreatment groups were 1.32 \pm 0.04, 1.29 \pm 0.03, 0.93 \pm 0.06, 0.70 \pm 0.05, 0.53 \pm 0.03, 0.44 \pm 0.04, 0.32 \pm 0.04, 0.30 \pm 0.03; and the density ratios of ILK protein and β -actin protein

were 2.16 \pm 0.04, 2.13 \pm 0.04, 1.65 \pm 0.04, 1.13 \pm 0.05, 0.74 \pm 0.03, 0.41 \pm 0.06, 0.35 \pm 0.04, 0.35 \pm 0.03. The ILK expression in 17-AAG pretreated groups were inhibited compared to hypoxic control group ($P < 0.05$), and the decrease was in concentration-dependent manner.

• **CONCLUSION:** Hsp90 inhibitor 17-AAG was effective to inhibit the expression of ILK induced by hypoxia in RPE cells.

• **KEYWORDS:** integrin-linked kinase; retinal pigment epithelium cells; hypoxia; heat shock protein 90; 17-allylamio-17-demethoxygeldanamycin

Citation: Wang YQ, Wang J, Lü Y, et al. Effect of 17-AAG, a Hsp90 inhibitor, on the expression of ILK in RPE cells under hypoxic condition. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014; 14(5): 811-814

摘要

目的: 研究热休克蛋白(heat shock protein 90, Hsp90)抑制剂 17-AAG 对缺氧诱导的视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞整联蛋白连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)表达的影响。

方法: 利用 200 μ mol/L 氯化钴(cobalt chloride, CoCl₂)建立体外 RPE 细胞的化学缺氧模型。不同浓度的 Hsp90 抑制剂 17-AAG 预处理 RPE 细胞 1h 后给予 12h 缺氧处理。实验分为缺氧对照组、二甲基亚砷(DMSO)对照组和 17-AAG 预处理组。其中 17-AAG 预处理组根据浓度不同又分为 6 组: 0.01, 0.10, 0.50, 1.00, 5.00, 10.00 μ mol/L。应用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测 ILK 表达变化情况。

结果: 缺氧对照组、DMSO 对照组和 17-AAG 预处理组 ILK mRNA 与内参 β -actin mRNA 光密度比值分别为 1.32 \pm 0.04, 1.29 \pm 0.03, 0.93 \pm 0.06, 0.70 \pm 0.05, 0.53 \pm 0.03, 0.44 \pm 0.04, 0.32 \pm 0.04, 0.30 \pm 0.03; ILK 蛋白与内参 β -actin 蛋白光密度比值分别为 2.16 \pm 0.04, 2.13 \pm 0.04, 1.65 \pm 0.04, 1.13 \pm 0.05, 0.74 \pm 0.03, 0.41 \pm 0.06, 0.35 \pm 0.04, 0.35 \pm 0.03。与缺氧对照组比较, 17-AAG 预处理组 ILK mRNA 和蛋白的表达明显降低($P < 0.05$), 呈浓度依赖性。
结论: Hsp90 抑制剂 17-AAG 能够降低缺氧条件下 RPE 细胞 ILK 的表达。

关键词: 整联蛋白连接激酶; 视网膜色素上皮细胞; 缺氧; 热休克蛋白 90; 17-丙烯胺基-17-去甲基格尔德霉素
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.05.06

引用:王业青,王健,吕勇,等.缺氧条件下 Hsp90 抑制剂 17-AAG 对 RPE 细胞整联蛋白连接激酶表达的影响.国际眼科杂志 2014;14(5):811-814

0 引言

脉络膜视网膜新生血管性疾病,如年龄相关性黄斑变性、糖尿病视网膜病变等严重影响患者视力,所以如何防治新生血管形成成为亟待解决的问题。研究证实许多细胞因子、蛋白激酶参与新生血管的形成,如血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)^[1]、整联蛋白连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)等^[2],如何抑制其表达就成为控制新生血管形成的关键。视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞是一单层矮柱状上皮细胞,位于视网膜神经感觉层与脉络膜之间,是视网膜重要的营养、维护、代谢组织,具有多种功能^[3]。当 RPE 细胞遭受缺氧、高糖及氧化应激等刺激时能够分泌大量的细胞生长因子,如基质细胞衍生因子(stromal derived factor-1, SDF-1), VEGF 等,参与多种视网膜疾病的发生发展。本课题应用 RT-PCR 和 Western blot 方法研究 Hsp90 抑制剂 17-AAG (17-allylamino-17-desmethoxygeldanamycin)对缺氧条件下 RPE 细胞 ILK 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 4 周龄健康 C57BL/6 小鼠(吉林大学动物实验中心提供),雌雄不限,体质量 10~20g,标准化饲养房适应性饲养 1wk 后进入实验室。DMEM/F12 培养基购于美国 Gibco 公司;胎牛血清(FBS)购于杭州四季青公司;ILK 山羊多克隆抗体购自美国 Santa 公司;总 RNA 提取试剂盒购于美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒购于日本 Takara 公司;17-AAG 购于美国 InvivoGen 公司。

1.2 方法

1.2.1 RPE 细胞培养与鉴定 方法同参考文献[4]。

1.2.2 实验分组 取第 3 代细胞用于实验,利用氯化钴(cobalt chloride, CoCl₂)造成 RPE 细胞化学缺氧模型^[5],以 5×10⁷个/L 的密度将 RPE 细胞接种于培养瓶中,当细胞达到 80% 融合时弃上清,血清饥饿 24h 后,加入含 200 μmol/L CoCl₂的培养液培养 12h。实验分为缺氧对照组、二甲亚砜(DMSO)对照组和 17-AAG 预处理组。其中 17-AAG 预处理组根据浓度不同又分为 6 组:0.01, 0.10, 0.50, 1.00, 5.00, 10.00 μmol/L。缺氧对照组加入含 200 μmol/L CoCl₂的培养液培养 12h; DMSO 对照组和 17-AAG 预处理组在建立缺氧模型前 1h 分别加入 0.1g/L DMSO 或不同浓度的 17-AAG,其他处理与缺氧对照组相同。分别收集各组细胞用于 RT-PCR 和 Western blot,每个实验重复 3 次。

1.2.3 RT-PCR 检测目的基因表达 收集各组细胞,分别提取总 RNA, RNA 样品经逆转录反应合成 cDNA。ILK 引物序列:正义链:5'-GAAATGGGCCAGAATCTCA-3',反义链 5'-ATACCTGGTGGGACGGTAGG-3',扩增片段长度为 792bp;内参 β-actin 引物序列:正义链:5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3';反义链:5'-ACTTTGGGGGATGTTTCTC-3',扩增片段长度为 984bp。25 μL 反应体系。ILK 的 PCR 条件为 94℃ 3min, 94℃ 30s, 50℃ 1min, 72℃ 1min, 25 个循环后 72℃ 延伸 5min。β-actin 的 PCR 条件为 95℃ 5min, 94℃ 1min, 55℃ 1min, 74℃ 1min, 25 个循环

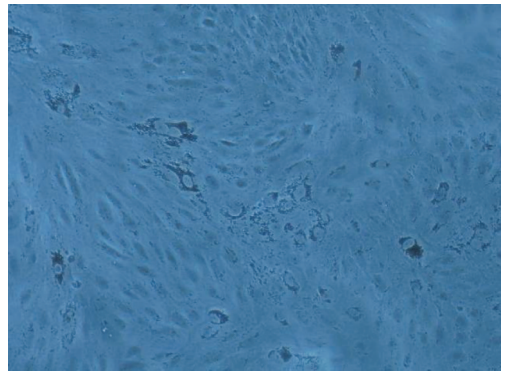


图 1 C57BL/6 小鼠原代 RPE 细胞。

后 74℃ 延伸 10min。循环结束后产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外透射灯下观察结果。用凝胶图像扫描分析系统扫描凝胶得到目的基因与内参 β-actin 的电泳条带光密度,通过目的基因/β-actin 的光密度比值做相对定量分析。

1.2.4 Western blot 分析 收集各组细胞,加入组织蛋白抽提液,匀浆 10min,置于冰上 30min。10000g, 4℃ 离心 5min,收集上清,考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量。每个样品取 30 μL 蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭后分别加入 1:1000 稀释的 ILK 多克隆抗体,室温下孵育 1h,洗膜后加入 1:1000 稀释的结合辣根过氧化物酶的二抗(Santa),室温下孵育 1h,洗膜后,应用 ECL 显色剂显影,洗片,胶片经透射扫描仪扫描后获得图像。通过目的基因蛋白与内参条带的光密度比值,作为目的蛋白的相对含量分析。

统计学分析:所有数据均采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐性检验后对数据均数采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养及鉴定 倒置相差显微镜下观察,细胞呈不规则多边形,可见清晰透明的细胞核,胞核呈圆形或椭圆形,胞质内布满黑色素颗粒,绕细胞核分布(图 1)。大约 2wk 后细胞融合、传代。免疫细胞化学染色显示 RPE 细胞角蛋白(CK18)阳性率为 90% 以上,结合取材部位细胞形态及细胞中的黑色素颗粒,可鉴定为 RPE 细胞^[4]。

2.2 RT-PCR 结果 DMSO 对照组 ILK mRNA 表达水平与缺氧对照组相 ILK mRNA 表达水平相比较无明显变化;不同浓度 17-AAG 预处理组 ILK mRNA 表达水平较缺氧对照组 ILK mRNA 表达水平明显降低 ($F = 333.273, P < 0.05$),并且随着 17-AAG 浓度的增高,ILK mRNA 表达下降越明显,当 17-AAG 浓度达到 5.0 μmol/L 后,ILK mRNA 表达无明显变化(表 1,图 2)。

2.3 Western blot 结果 ILK 蛋白表达趋势与 mRNA 表达趋势相似,DMSO 对照组 ILK 蛋白表达水平与缺氧对照组 ILK 蛋白表达水平相比较无明显差异;不同浓度 17-AAG 预处理组 ILK 蛋白表达水平与缺氧对照组 ILK 蛋白表达水平明显降低 ($F = 1136.479, P < 0.05$),并且随着 17-AAG 浓度的增高,ILK 蛋白表达下降越明显,当 17-AAG 浓度达到 5.0 μmol/L 后,5.0 μmol/L 组和 10.0 μmol/L 组 ILK 蛋白表达水平无明显区别(表 1,图 3)。

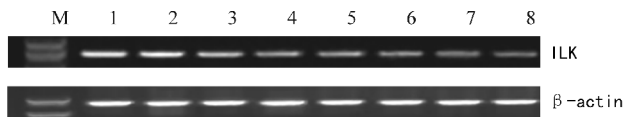


图2 不同浓度17-AAG对缺氧条件下RPE细胞ILK mRNA表达的影响 M: Marker; 1: 缺氧对照组; 2: DMSO 对照组; 3: 0.01 μmol/L17-AAG 组; 4: 0.10 μmol/L 17-AAG 组; 5: 0.50 μmol/L 17-AAG 组; 6: 1.0 μmol/L 17-AAG 组; 7: 5.0 μmol/L 17-AAG 组; 8: 10 μmol/L 17-AAG 组。

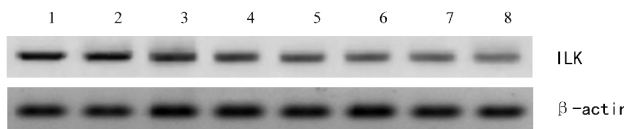


图3 不同浓度17-AAG对缺氧条件下RPE细胞ILK蛋白表达的影响 1: 缺氧对照组; 2: DMSO 对照组; 3: 0.01 μmol/L 17-AAG 组; 4: 0.10 μmol/L 17-AAG 组; 5: 0.50 μmol/L 17-AAG 组; 6: 1.0 μmol/L 17-AAG 组; 7: 5.0 μmol/L 17-AAG 组; 8: 10 μmol/L 17-AAG 组。

表1 不同浓度Hsp90抑制剂对缺氧诱导的RPE细胞ILK表达的影响 $\bar{x} \pm s$

组别	ILK mRNA	ILK 蛋白
缺氧对照组	1.32±0.04	2.16±0.04
DMSO 对照组	1.29±0.03	2.13±0.04
17-AAG 预处理 0.01 μmol/L 组	0.93±0.06 ^a	1.65±0.04 ^a
0.10 μmol/L 组	0.70±0.05 ^a	1.13±0.05 ^a
0.50 μmol/L 组	0.53±0.03 ^a	0.74±0.03 ^a
1.0 μmol/L 组	0.44±0.04 ^a	0.41±0.06 ^a
5.0 μmol/L 组	0.32±0.04 ^a	0.35±0.04 ^a
10.0 μmol/L 组	0.30±0.03 ^a	0.35±0.03 ^a

^a*P*<0.05 vs 缺氧对照组。

3 讨论

缺氧是许多眼部疾病的共同病理过程,如糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性以及早产儿视网膜病变等,这些疾病对人类视力造成严重损害甚至失明。RPE细胞具有多种生物功能:转运储存视黄醛;吞噬降解光感受器外节段;清除自由基;合成多种细胞因子;构成血-视网膜屏障等。许多研究证实RPE细胞在缺氧条件下分泌多种细胞因子和趋化因子,在眼底新生血管性疾病的发生发展过程中发挥重要的作用^[6,7]。

整联蛋白连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)是由Hannigan等于1996年确定并克隆出来的一种丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶,是一种具有多种生物学活性的信号通路中的整合素受体的细胞质效应分子,参与了生物体内多种信号通路,包括整联蛋白、生长因子和Wnt信号传导通路,在细胞外基质(extracellular matrix, ECM)介导的信号传导中发挥着关键作用。

近年来,研究发现ILK在新生血管的形成中发挥重要作用。ILK能够影响视网膜血管内皮细胞增殖、迁移以及管腔形成,并能够通过调节VEGF的表达而影响新生血管的形成^[8]。此外,有研究表明ILK能够通过NF-κB/IL-6信号通路调节血管内皮细胞管腔形成^[9]。随着对ILK研究的逐渐深入,发现ILK也参与多种视网膜疾病的发生和

发展。Li等^[10]通过对STZ诱导的糖尿病鼠动物模型的研究发现视网膜表达高水平的ILK,高糖能诱导RPE细胞中ILK的表达,且ILK siRNA抑制RPE细胞中ILK表达后,VEGF表达明显降低^[11],说明ILK能够通过调节VEGF的表达而影响视网膜脉络膜新生血管的形成。越来越多的研究表明ILK已经成为抑制新生血管形成的新靶点,所以如何抑制ILK的表达就成为我们的研究目标。

Hsp90是一种广泛表达的分子伴侣^[12],参与蛋白质的折叠、运输等过程,与ATP结合后能够调节许多信号分子的稳定性和活性,如蛋白激酶和转录因子等,Hsp90还可以通过影响一些细胞信号通路而抑制细胞凋亡。17-AAG(17-丙烯胺基-17-去甲氧基格尔德霉素)是一种Hsp90抑制剂,研究表明17-AAG通过抑制血管形成而达到抗肿瘤的作用,并且毒性较小,最近已经进入临床Ⅲ期试验。目前已有研究证实17-AAG能够抑制RPE细胞中VEGF和Akt的表达^[13,14],提示其对眼底新生血管性疾病和增殖性视网膜病变具有一定的治疗作用。

在我们的前期研究中已经发现ILK表达于RPE细胞,并且缺氧能够上调RPE细胞中ILK的表达^[4],本研究应用不同浓度17-AAG预处理RPE细胞后,建立RPE细胞缺氧模型,应用RT-PCR和Western blot方法观察RPE细胞中ILK的表达变化情况,结果发现Hsp90抑制剂17-AAG能够抑制RPE细胞中ILK的表达,提示我们可以将Hsp90作为调控ILK的新靶点,从而对新生血管的形成进行干预,达到防治新生血管性疾病的目的。有研究发现缺氧刺激不仅上调内皮细胞ILK表达,而且它能够通过NF-κB和HIF-1的介导调节SDF-1和细胞内黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达,从而诱导内皮祖细胞至缺血组织^[15]。在我们的前期研究工作中也已经证实SDF-1表达于RPE细胞,并且17-AAG能够抑制SDF-1的表达^[16],所以我们推测17-AAG可能通过抑制ILK的表达而影响SDF-1参与的新生血管形成,然而其具体机制仍需进行更深一步的研究。

参考文献

- Kim LA, D'Amore PA. A brief history of anti-VEGF for the treatment of ocular angiogenesis. *Am J Pathol* 2012;181(2):376-379
- Lu J, Tang Y, Farshidpour M, et al. JWA inhibits melanoma angiogenesis by suppressing ILK signaling and is an independent prognostic biomarker for melanoma. *Carcinogenesis* 2013;34(12):2778-2788
- Bonilha VL. Retinal pigment epithelium (RPE) cytoskeleton *in vivo* and *in vitro*. *Exp Eye Res* 2013;S0014-4835(13):281-289
- 王业青, 李霞, 吕勇, 等. 缺氧对视网膜色素上皮细胞基质细胞衍生因子-1和整联蛋白连接激酶表达的影响. *中华实验眼科杂志* 2012;30(11):1013-1017
- 赵颖, 牛膺筠, 黄琰霞, 等. 低氧诱导促红细胞生成素及其受体在人胚胎RPE细胞中的表达. *眼科研究* 2006;24(3):252-255
- Crane IJ, Wallace CA, McKillop-Smith S, et al. CXCR4 receptor expression on human retinal pigment epithelial cells from the blood-retina barrier leads to chemokine secretion and migration in response to stromal cell-derived factor 1 alpha. *J Immunol* 2000;165(8):4372-4378
- Eichler W, Reiche A, Yafai Y, et al. Growth-related effects of oxidant-induced stress on cultured RPE and choroidal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2008;87(4):342-348

8 Xie W, Zhao M, Zhou W, *et al.* Targeting of integrin-linked kinase with small interfering RNA inhibits VEGF-induced angiogenesis in retinal endothelial cells. *Ophthalmic Res* 2013;49(3):139-149
 9 Wani AA, Jafarnejad SM, Zhou J, *et al.* Integrin-linked kinase regulates melanoma angiogenesis by activating NF- κ B/interleukin-6 signaling pathway. *Oncogene* 2011;30(24):2778-2788
 10 Li YJ, Hui YN, Yan F, *et al.* Up-regulation of integrin-linked kinase in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245(10):1523-1532
 11 Wang W, Matsukura M, Fujii I, *et al.* Inhibition of high glucose-induced VEGF and ICAM-1 expression in human retinal pigment epithelium cells by targeting ILK with small interference RNA. *Mol Biol Rep* 2012;39(1):613-620

12 Garcia-Carbonero R, Carnero A, Paz-Ares L. Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic. *Lancet Oncol* 2013;14(9):e358-369
 13 姚家奇,刘庆淮,刘肖艺,等. 体外 17-AAG 对人 RPE 细胞 VEGF 及其受体的影响. 国际眼科杂志 2009;9(5):833-835
 14 许志洋,姚家奇,刘庆淮,等. 实时荧光 PCR 检测 17-AAG 对人 RPE 细胞 Akt 等基因表达的调控. 国际眼科杂志 2008;8(9):1792-1794
 15 Lee SP, Youn SW, Cho HJ, *et al.* Integrin-Linked Kinase, a Hypoxia-Responsive Molecule, Controls Postnatal Vasculogenesis by Recruitment of Endothelial Progenitor Cells to Ischemic Tissue. *Circulation* 2006;114(2):150-159
 16 王业青,张晓梅,穆华,等. HSP90 抑制剂对缺氧诱导的 RPE 细胞 SDF-1 表达的影响. 眼科新进展 2009;29(10):748-751

2014 国际主要眼科会议一览

会议名称	地点	时间	网址
2014 年美国白内障与屈光手术协会年会(ASCRS)	美国 波士顿	4.25-4.29	http://annualmeeting.ascrs.org/
2014 年美国视觉与眼科学研究协会大会(ARVO)	美国 奥兰多	5.4-5.8	http://www.arvo.org/Annual_Meeting/Future_Annual_Meetings/
第 11 届国际眼科药理学和治疗学大会	冰岛 雷克雅未克	6.19-6.22	http://isopt.net/
2014 年欧洲白内障与屈光手术协会年会(ESCRS)	英国 伦敦	9.13-9.17	http://www.escrs.org/
2014 欧洲眼科整形和重建外科学会年会(ESOPRS)	匈牙利 布达佩斯	9.11-9.13	http://www.esoprs.eu/cms/annual_meetings
第十七届亚非眼科会议暨 第十九次全国眼科学术大会	中国 西安	9.17-9.21	http://www.aaco2014china.org/
第 2 届亚太青光眼大会暨 第 10 届国际眼科论坛	中国 香港	9.26-9.28	http://www.apgc-isohk-2014.org/2014/
2014 年欧洲视觉与眼科研究协会大会(EVER)	法国 尼斯	10.1-10.4	http://www.ever.be/c_page.php?id=277
2014 年美国眼科学会年会(AAO)	美国 芝加哥	10.18-10.21	http://www.aao.org/meetings/annual_meeting/
第 27 届亚白内障及屈光手术医师学会年会(APACRS)	印度 斋浦尔	11.13-11.16	http://www.apacrs.org/

注:具体会议时间以大会官方网站通知为准。