

蓝光对人视网膜色素上皮细胞增殖的影响和机制研究

朱红娜¹, 乔 璞¹, 苏安乐¹, 张 婷¹, 孙中洋², 梁厚成¹

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(No. 81600694)
作者单位:¹(710002) 中国陕西省西安市第一医院眼科;
²(210002) 中国江苏省南京市,解放军第四五四医院
作者简介:朱红娜,女,硕士,主治医师,研究方向:眼科临床。
通讯作者:梁厚成,男,博士,主任医师,研究方向:眼科临床。
51835050@qq.com
收稿日期:2017-02-20 修回日期:2017-07-04

Effect of blue light on proliferation of human retinal pigment epithelial cells

Hong-Na Zhu¹, Ying Qiao¹, An-Le Su¹, Ting Zhang¹, Zhong-Yang Sun², Hou-Cheng Liang¹

Foundation item: National Nature Science Foundation of China Youth Foundation (No. 81600694)

¹Department of Ophthalmology, Xi'an NO. 1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China; ² the 454 Hospital of PLA, Nanjing 221002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Hou - Cheng Liang. Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China. 51835050@qq.com

Received:2017-02-20 Accepted:2017-07-04

Abstract

• **AIM:** To investigate the influence and mechanism of blue light on the proliferation of human retinal pigment epithelial cells.

• **METHODS:** Cells were divided into two groups, including blue light group and control group. The 35W white light lamp with blue filter was used to establish damaged RPE cell model *in vitro*. Blue ray wavelength ranged between 470nm and 520nm. And the light intensity was about 2000Lx. After exposure to blue light, we tested the proliferation of human retinal pigment epithelial cells by CCK-8 kit. And then expression of miR-103 was measured by the real-time PCR.

• **RESULTS:** Exposure to blue light inhibited the proliferation of human retinal pigment epithelial cells and increased the expression of miR-103. Moreover, up-regulation of miR-103 inhibited the proliferation of human retinal pigment epithelial cells, and down-regulates miR-103 promoted the proliferation of human retinal pigment epithelial cells.

• **CONCLUSION:** Blue light inhibits the proliferation of human retinal pigment epithelial cells by the up-regulation of miR-103.

• **KEYWORDS:** blue light; human retinal pigment epithelial cells; proliferation; miR-103

Citation: Zhu HN, Qiao Y, Su AL, *et al.* Effect of blue light on proliferation of human retinal pigment epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(8):1419-1422

摘要

目的:研究蓝光对人视网膜色素上皮细胞增殖能力的影响,并初步探讨其可能机制。

方法:利用35W白色冷光灯加用蓝色滤光片建立蓝光损伤体外培养的RPE细胞模型,蓝光控制波长在470~520nm,光照强度控制为2000Lx左右,光照时间控制为24~96h,利用CCK-8法检测RPE细胞的增殖能力,利用real-time PCR技术检测RPE细胞中miR-103的含量。

结果:与对照组相比,蓝光照射组的RPE细胞的增殖能力减弱;蓝光照射组的RPE细胞内的miR-103含量较对照组增加;miR-103过表达时,RPE细胞的增殖能力减退,降低miR-103的表达时,细胞增殖能力增强;降低miR-103的表达能够减弱蓝光对RPE细胞增殖的抑制作用。

结论:蓝光通过上调miR-103抑制RPE细胞的增殖,miR-103可能成为治疗年龄相关性黄斑变性等视网膜变性疾病治疗的新靶点。

关键词:蓝光;人视网膜色素上皮细胞;增殖;miR-103

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.8.07

引用:朱红娜,乔璞,苏安乐,等.蓝光对人视网膜色素上皮细胞增殖的影响和机制研究.国际眼科杂志2017;17(8):1419-1422

0 引言

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是引起中老年人发生视力缺损的主要疾病之一,AMD发病机制复杂,目前尚未完全阐明,且疗效欠佳^[1]。因此,研究AMD的发病机制具有重要意义。视网膜光损伤与AMD有着相似的病理发生过程,视网膜光损伤是研究AMD等视网膜变性疾病的良好模型^[2-3]。近年来,miRNA成为人视网膜色素上皮(human retinal pigment epithelial, hRPE)细胞功能调控的研究热点,大量文献报道,作为转录后调控的重要因子miRNA参与调控RPE细胞的增殖、分化、凋亡和自噬等过程^[4-6]。本研究通过蓝光照射体外培养的RPE细胞,检测其增殖能力的变化和miR-103的含量变化,以探究光损伤对人RPE细胞增殖的影响和可能的机制,目的在于为AMD等视网膜变性疾病的发病机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人视网膜色素上皮细胞株 (ARPE-19 细胞株) 购自美国模式菌种收集中心 (ATCC); DMEM 细胞培养基、PBS、胰蛋白酶和双抗等细胞培养试剂 (美国 hyclone 公司); 胎牛血清 (中国四季青公司); CCK-8 试剂盒 (日本同仁公司); PCR 相关试剂盒 (日本 Takara 公司); miR-103 引物 (中国锐博公司); real-time PCR 仪和酶联免疫检测仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 利用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 ARPE-19 细胞株, 取第 3~8 代的细胞用于实验。

1.2.2 人视网膜色素上皮细胞蓝光损伤模型建立 参照蔡善君等^[7] 建模方法, 取上述 ARPE-19 细胞株培养, 待细胞融合度达 70% 以上时行蓝光照射。本实验分为对照组和蓝光照射组, 蓝光照射组的处理为 35W 白色冷光灯前覆盖蓝色滤光片, 波长控制在 470~520nm, 光照强度在 2000Lx 左右, 光照时间控制在 24~96h。实验过程中保证光照在细胞培养箱内密闭进行。

1.2.3 细胞增殖能力的检测 以 10000 个细胞/孔的密度将 ARPE-19 细胞接种于 96 孔板中, 使用仅含 1% FBS 的培养液, 达到同步化。按照不同分组和处理, 分别将细胞在蓝光照射和黑暗中进行培养。相同处理因素的每组细胞每个处理时间段接种 6 孔, 培养 24、48、72、96h。在上清中加入 10% CCK-8 处理液, 37℃ 培养箱里继续孵育 3h, 随后利用酶标仪于 450nm 处测吸光度值。该部分实验至少重复 3 次^[4]。

1.2.4 real-time PCR 检测细胞 miR-103 的表达 分别在 24、48、72、96h 四个时间点, 使用 real-time PCR 实时定量检测系统检测 ARPE-19 细胞中 miR-103 的含量。按照 Takara 反转录和扩增试剂盒说明书完成反转录和扩增。miR-103 的通用引物序列为 5'-TGG TGT CGT GGA GTCG-3', miR-103 特异性引物序列为 5'-ACA CTC CAG CTG GGA GCA GCA TTG TAC-3'。

1.2.5 细胞转染 从广东锐博公司购买的 miR-103 的 mimics 和 inhibitors, 随后利用 Lipofectamine 2000 转染试剂, 将上述购买的试剂转染到 ARPE-19 细胞中以达到过表达和下调表达 miR-103 的目的。按照说明书, 吸 250μL Opti-MEM 培养液于 Ep 管中, 加入 5μL Lipofectamine 2000 充分混匀, 常温静置 5min; 吸取 5μL miRNA 溶液及阴性对照无序列的 RNA 溶液, 分别再加入 250μL 培养液充分稀释, 轻柔吹打, 使其混匀; 将上述两种所配置的溶液混合, 轻柔吹打, 室温静置 20min, 使 Lipofectamine 能够充分包裹 miRNA, 形成稳定的复合物。

统计学分析: 全部数据使用 SPSS19.0 统计软件进行分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 *t* 检验比较蓝光照射组与对照组之间的均数差异, 以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蓝光照射后 RPE 细胞增殖减弱 CCK-8 法测量的吸光度可以反映一段时间内细胞的增殖能力, 将各组实验数据根据对照组 (Con) 测量得到的吸光度进行归一化处理 (图 1), 与对照组相比, 蓝光照射组的 RPE 细胞在

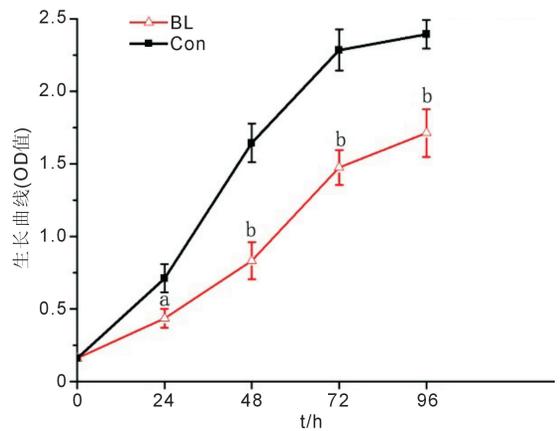


图 1 CCK-8 法检测蓝光照射对 RPE 细胞增殖的影响 Con: 对照组; BL: 蓝光照射组 (^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组)。

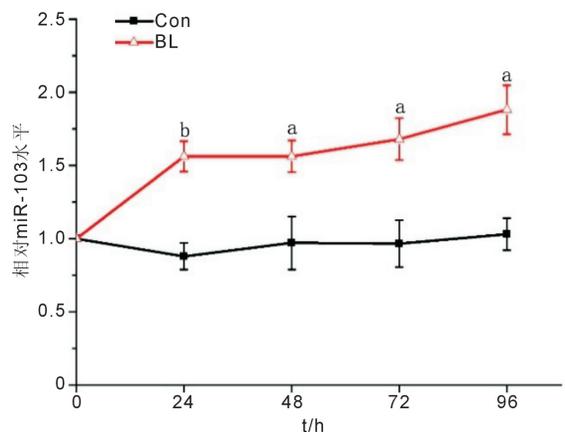


图 2 real-time PCR 检测蓝光照射对 RPE 细胞 miR-103 表达的影响 Con: 对照组; BL: 蓝光照射组 (^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组)。

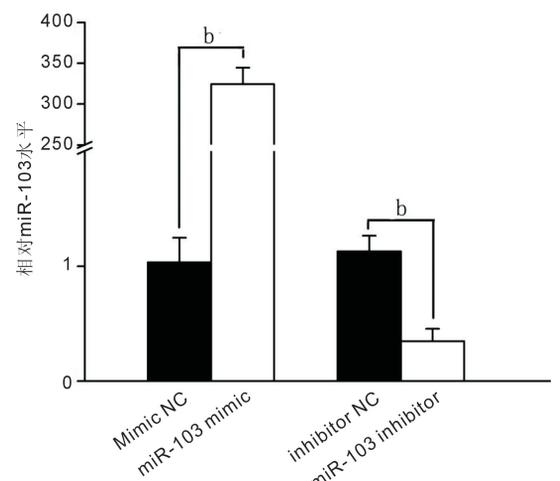


图 3 real-time PCR 检测 miR-103 的 inhibitors 的作用效果 NC: miR-103 无意对照组; miR-103 mimics or inhibitor: 有意序列组 (^b $P < 0.01$)。

24、48、72、96h 等时间点的增殖能力减弱, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 蓝光照射后 RPE 细胞中 miR-103 表达升高 利用 real-time PCR 技术检测蓝光照射组和对照组 RPE 细胞在 24、48、72、96h 等时间点 miR-103 的表达情况, 本研究组发现照射组的 RPE 细胞内表达的 miR-103 含量较对照组增加 ($P < 0.05$, 图 2)。

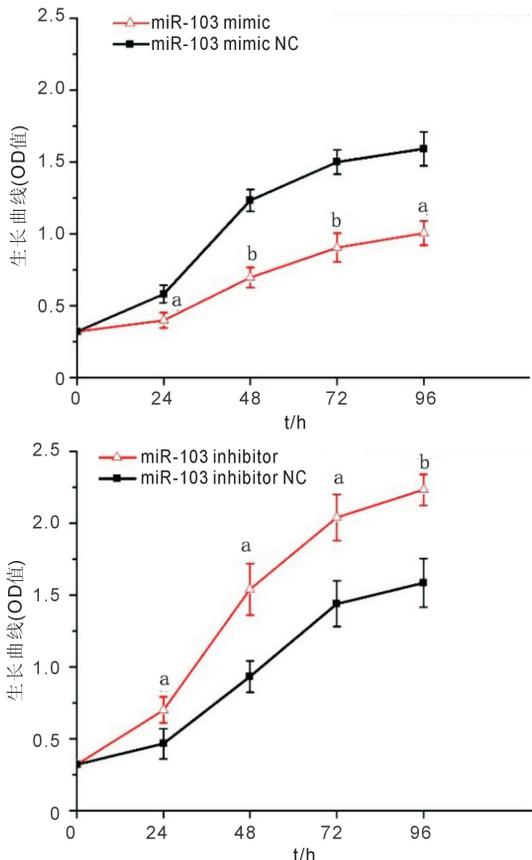


图4 CCK-8法检测miR-103对RPE细胞增殖的影响 NC;miR-103无意对照组;miR-103 mimics or inhibitor;有意对照组 (^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$)。

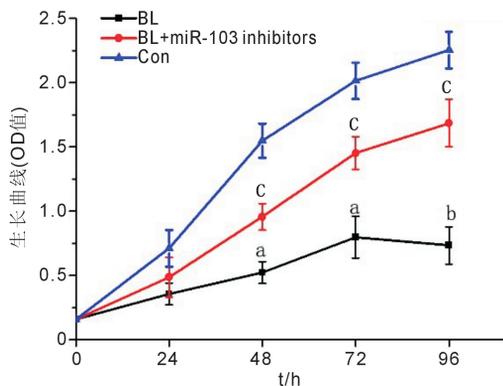


图5 蓝光条件下检测抑制miR-103的表达对RPE细胞增殖的影响 Con;对照组;BL;蓝光照射组;BL+miR-103 inhibitors;蓝光照射+抑制miR-103表达组 (^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs Con组; ^c $P < 0.05$ vs BL组)。

2.3 miR-103 mimics 和 inhibitors 的效率验证 为了验证在蓝光照射过程中表达升高的miR-103在RPE细胞增殖中的作用,本课题组首先验证miR-103 mimics 和 inhibitors 的作用效率。将从公司购得的序列分别转染到培养的RPE细胞中,24h后利用real-time PCR技术检测RPE细胞内miR-103的含量变化,发现从公司购得序列有较好的效果 ($P < 0.01$,图3)。

2.4 miR-103抑制RPE细胞增殖的影响 前部分实验结论得出,蓝光抑制RPE细胞的增殖同时上调其miR-103的表达,课题组进一步验证两者的关系。通过细胞转染技术将miR-103的mimics和inhibitors分别转染到

RPE细胞中,随后利用CCK-8法检测细胞的增殖能力变化,课题组发现,上调miR-103时,RPE细胞的增殖能力下降,下调miR-103的表达细胞增殖能力增强 ($P < 0.05$,图4)。

2.5 降低miR-103含量后蓝光照射RPE细胞增殖减弱有所恢复 为了进一步验证蓝光是通过上调miR-103抑制RPE细胞的增殖,在蓝光照射下抑制miR-103的表达,发现与单纯的蓝光组相比,下调miR-103的表达RPE细胞的增殖能力有所恢复 ($P < 0.05$,图5)。

3 讨论

AMD是引起国内外中老年人发生视力缺损的主要疾病之一,其病程的发生和发展与长期的光暴露损伤有关^[8]。视网膜光损伤与AMD有相似的病理过程。人RPE细胞具有转运、吞噬和清除等重要功能,RPE细胞的正常运转对维护视网膜正常的结构和功能有着重要意义^[9]。蔡莉等^[10]发现蓝光对RPE细胞的损伤呈光照强度和光照时间依赖性。本实验观察到蓝光照射后RPE细胞的增殖能力明显下降,且具有时间依赖型,这与之前研究相符。

近年来,miRNA成为RPE调控的研究热点,大量文献报道,作为转录后调控的重要因子miRNA参与调控细胞的增殖、分化、凋亡和自噬等过程^[5,11-14]。作为miR-107的同源miRNA,miR-103的研究范围覆盖了细胞信号通路、干细胞、肿瘤、生物发育等各个领域^[15-19]。已有文献报道miR-103能够调控多种细胞的增殖能力,Sun等^[4,15]发现miR-103通过靶向调控Cav1.2的表达抑制成骨细胞的增殖。然而在RPE细胞中,miR-103对其调控作用鲜有研究。在本实验中,课题组发现在蓝光照射后RPE细胞中的miR-103含量增加,且增加的miR-103能够抑制RPE细胞的增殖,在后续的实验中学生组发现,如果抑制了增高的miR-103表达,蓝光对RPE细胞增殖的抑制作用减弱,这又进一步证实了结论。但是本课题组同样看到,在抑制miR-103后,与正常对照组相比,蓝光照射下RPE细胞的增殖能力仍然是减弱的。这说明除了miR-103,蓝光照射调控RPE细胞增殖能力的机制是复杂多样的,由于本实验主要研究的是miR-103对RPE细胞增殖的影响,其他相关机制有待于后续研究。

综上所述,蓝光可通过上调RPE细胞miR-103的含量抑制其增殖,本实验从光化学损伤抑制RPE细胞增殖的角度,探讨了光暴露对RPE细胞增殖的影响,一定程度上对治疗蓝光损害视网膜眼病提供了指导意义,但miR-103通过何种作用机制抑制RPE细胞的增殖仍有待进一步研究与探索。

参考文献

- 1 Klettner A. Age-related macular degeneration—biology and treatment. *Med Monatsschr Pharm* 2015;38(7): 258-264
- 2 Yam JC, Kwok AK. Ultraviolet light and ocular diseases. *Int Ophthalmol* 2014;34(2): 383-400
- 3 董卫红,杜秀娟,郭大东,等. 枸杞多糖对蓝光损伤的视网膜色素上皮细胞的保护作用. *国际眼科杂志* 2013;13(12): 2381-2384
- 4 Sun Z, Cao X, Hu Z, et al. MiR-103 inhibits osteoblast proliferation mainly through suppressing Cav1. 2 expression in simulated microgravity. *Bone* 2015;76: 121-128

5 Wang H, Sun Z, Wang Y, *et al.* miR-33-5p, a novel mechano-sensitive microRNA promotes osteoblast differentiation by targeting Hmga2. *Scientific Reports* 2016;6:23170

6 Wang X, Guo B, Li Q, *et al.* miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat Med* 2013;19(1):93-100

7 蔡善君, 严密, 张军军. 蓝光诱导体外培养的人视网膜色素上皮细胞凋亡. *中华眼底病杂志* 2005;21(6):384-387

8 Zarbin M. Cell-Based Therapy for Degenerative Retinal Disease. *Trends Mol Med* 2016;22(2):115-134

9 Geneva II. Photobiomodulation for the treatment of retinal diseases: a review. *Int J Ophthalmol* 2016;9(1):145-152

10 蔡莉, 易敬林. 视网膜色素上皮细胞损伤机制研究进展. *眼科新进展* 2012;32(9):898-900

11 Hu Z, Wang Y, Sun Z, *et al.* miRNA-132-3p inhibits osteoblast differentiation by targeting Ep300 in simulated microgravity. *Scientific Reports* 2015;5:18655

12 Liao Y, Lonnerdal B. Global microRNA characterization reveals that miR-103 is involved in IGF-1 stimulated mouse intestinal cell proliferation. *PLoS One* 2010;5(9):e12976

13 Han S, Lu Q, Wang N. Apr3 accelerates the senescence of human retinal pigment epithelial cells. *Mol Med Rep* 2016;13(4):3121-3126

14 Tian Y, Xue Y, Ruan G, *et al.* Interaction of Serum microRNAs and Serum Folate With the Susceptibility to Pancreatic Cancer. *Pancreas* 2015;44(1):23-30

15 Sun Z, Cao X, Zhang Z, *et al.* Simulated microgravity inhibits L-type calcium channel currents partially by the up-regulation of miR-103 in MC3T3-E1 osteoblasts. *Sci Rep* 2015;5: 8077

16 Clancy C, Joyce MR, Kerin MJ. The use of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomark* 2015;15(2):103-113

17 Bork-Jensen J, Thuesen AC, Bang-Bertelsen CH, *et al.* Genetic versus Non-Genetic Regulation of miR-103, miR-143 and miR-483-3p Expression in Adipose Tissue and Their Metabolic Implications - A Twin Study. *Genes* 2014;5(3):508-517

18 Zhang Y, Qu X, Li C, *et al.* miR-103/107 modulates multidrug resistance in human gastric carcinoma by downregulating Cav-1. *Tumour Biol* 2015;36(4):2277-2285

19 Hong Z, Feng Z, Sai Z, *et al.* PER3, a novel target of miR-103, plays a suppressive role in colorectal cancer *in vitro*. *BMB Rep* 2014;47(9):500-505