

转化生长因子 $\beta 1$ 对体外培养 hRPE 细胞增殖率及 I 型胶原表达的影响

李 芳¹, 李 敏^{2*}, 邢怡桥^{1*}, 吕明良², 周 舟², 钟海彬², 曾思明²

(武汉大学人民医院 眼科, 湖北 武汉 430060; 2. 广西壮族自治区人民医院 眼科, 广西 南宁 530012)

[摘 要] 目的: 探讨 TGF- $\beta 1$ 对体外培养人视网膜色素上皮(human retinal pigment epithelium, hRPE) 细胞增殖率及 I 型胶原表达的影响。方法: 实验组用 0.1、1、10 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- $\beta 1$ 对体外培养 hRPE 细胞进行干预, 对照组只加培养液培养 hRPE 细胞, 用 RT-PCR 与酶联免疫吸附法检测 I 型胶原 mRNA 和蛋白表达, 用 MTT 法检测细胞的增殖率。结果: 实验组 hRPE 细胞 I 型胶原的 mRNA 和蛋白表达量及细胞增殖率较对照组明显增高 ($P < 0.05$), 1 $\mu\text{g/L}$ 组进一步升高 ($P < 0.05$), 10 $\mu\text{g/L}$ 组达高峰 ($P < 0.05$), 呈现明显的剂量依赖性, TGF- $\beta 1$ 浓度与 I 型胶原蛋白的表达及增殖率的相关系数 r 分别为 0.863 及 0.901。结论: TGF- $\beta 1$ 能够促进 hRPE 细胞 I 型胶原的表达和细胞的增殖, 这种现象与 TGF- $\beta 1$ 的浓度成正相关。

[关键词] 胶原 I 型; 视网膜色素类; 上皮细胞; 转化生长因子 β ; 细胞培养

[中图分类号] R363.1; R774.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2013)03-0272-04

Effects of Transforming Growth Factor Beta 1 on the Proliferation of Cultured Human RPE Cells and Expression of Collagen Type I

LI Fang¹, LI Min², XING Yiqiao¹, LV Mingliang², ZHOU Zhou², ZHONG Haibin², ZENG Siming²

(1. Eye Center, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China; 2. Eye Center, People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530012, Guangxi, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta 1$) on the proliferation of cultured human retinal pigment epithelium (hRPE) cells and expression of type I collagen. **Methods:** TGF- $\beta 1$ at concentrations of 0.1, 1, and 10 $\mu\text{g/L}$ was added into cultures of hRPE cells in experimental groups respectively (groups 0.1, 1 and 10), and in the control group of hRPE cell culture, no TGF- $\beta 1$ was added. Expressions of mRNA and protein of type I collagen were detected by using RT-PCR and enzyme linked immunosorbent assay, and proliferation of hRPE cells was detected with MTT. **Results:** The proliferation and expression of mRNA and protein of type I collagen in group 0.1 were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$), and they were getting much higher in group 1 ($P < 0.05$). In group 10, they reached the peak ($P < 0.05$), and a dose-dependent increase manner displayed. The correlation coefficients of TGF- $\beta 1$ concentrations with type I collagen protein expression and proliferation rate were $r = 0.863$ and $r = 0.901$ respectively. **Conclusion:** TGF- $\beta 1$ at different concentrations can promote the expression of type I collagen protein and hRPE proliferation. There is a positive correlation between TGF- $\beta 1$ concentration and the expression of type I collagen, and between TGF- $\beta 1$ concentration and hRPE proliferation.

[Key words] collagen type I; retinal pigment; epithelial cells; transforming growth factor beta; cell culture

* 通信作者 E-mail: limin00899@163.com; E-mail: xing_yiqiao@yahoo.com.cn

增殖性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是孔源性视网膜脱离和严重眼外伤的常见并发症, 是视网膜脱离复位手术失败的主要原因之一, 由于形成视网膜前或下增生膜, 膜的牵拉使视网膜结构严重扭曲、僵硬, 最终导致视网膜不可修复^[1-2]。参与 PVR 发病机制的因素很多, 转化生长因子 (transforming growth factor, TGF) 是近年的研究热点^[3]。大量研究表明视网膜色素上皮 (RPE) 细胞受到生长因子的作用后, 由静止状态开始增殖并分泌大量细胞外基质是 PVR 发生的一个关键。在视网膜表面形成的增殖膜主要细胞外成分是 I 型胶原蛋白, 而其细胞成分主要为 RPE 细胞。在正常眼玻璃体中, TGF- $\beta 1$ 很少被检测到, 而在 PVR 患者的玻璃体腔液中检测出高浓度的 TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$ 能否促进 RPE 细胞分泌 I 型胶原表达和增殖, 在国内研究报道较少。本研究用不同浓度 TGF- $\beta 1$ 干预 hRPE 细胞, 观察 TGF- $\beta 1$ 对 hRPE 细胞增殖率和 I 型胶原蛋白表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 hRPE 细胞购于中山大学实验动物中心细胞库, 高糖 DMEM (4 500 mg/L 葡萄糖) (美国 Hyclon 公司), 胎牛血清、胰蛋白酶 (美国 Gibco 生物技术公司), Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), cDNA 试剂盒、PCR 试剂盒 (北京天根有限公司), 重组人 TGF- $\beta 1$ (英国 Peprotech 公司), β -actin、I 型胶原上下游引物由上海生工生物工程技术有限公司设计并合成, ELISA 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司。

1.2 RPE 细胞培养及分组 于 5% CO_2 、37 °C 空气培养箱中行 RPE 细胞培养, 培养液为含有 10% 胎牛血清、4 500 mg/L 葡萄糖、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/L}$ 链霉素的 DMEM 完全培养液。待细胞状态良好时, 以含 0.25% 胰蛋白酶及 0.03% EDTA 的复合消化液消化, 按 $2.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于 6 孔细胞培养板内。待细胞生长融合状态 1 d 后, 只用高糖 DMEM 培养液饥饿细胞 1 d, 饥饿后, 6 孔板中 3 孔分别加 0.1、1、10 $\mu\text{g/L}$ 的重组人 TGF- $\beta 1$ 对 hRPE 细胞干预, 第 4 孔加高糖 DMEM 培养液作为对照组。

1.3 半定量 RT-PCR 检测 每组再培养 24 h 后收获细胞, 按 Trizol Regent 提取细胞总 RNA 的方法提取所收获细胞的总 RNA, 紫外分光光度计测定

RNA 浓度。A260/A280 代表 RNA 纯度, 所有 RNA 样品 A260/A280 为 1.7 ~ 1.9。按 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒的说明合成第一链 cDNA (逆转录反应体系为 20 μL , 总 RNA 量为 1 μg), -20 °C 保存备用。引物设计合成, I 型胶原上游引物为 5'-CTCCCAGAACATCACCTACCAC-3', 下游引物 5'-GAGGGAGTTTACAGGAAGCAGA-3'; 扩增片段长度为 318bp。同时设计内参照 β -actin 上游引物 5'-TGGATGATGATATCGCCGC-3', 下游引物 5'-GTAGATGGGCACAGTGTGGGT-3'。扩增片段长度为 501 bp, 取 5 μL 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。用 HPIAS 1000 型图像分析系统照相, 使用 Gel-Pro Ana-lyzer 4.0 分析软件测量目的基因 I 型胶原及内参 β -actin 的积分吸光度 (A) 值, 并分别计算各条带 I 型胶原 A 值/ β -actinA 值的比值, 即相对积分吸光度值 (relative integral absorbance, RIA), 以此作为各组 I 型胶原 mRNA 的相对表达量。

1.4 酶联免疫吸附法检测 I 型胶原 TGF- $\beta 1$ 干预后分别收集细胞培养上清液离心 (4 °C, 3 000 min, 10 min) 提纯, 并用 PBS 液稀释 5 倍。按照 I 型胶原 ELISA 试剂盒说明, 用紫外分光光度计测定 450 nm 处各孔吸光度值 (A450), 每个样本设 3 个复孔。通过绘制标准曲线求出的标本上清中 I 型胶原的浓度, 结果为各组 I 型胶原分泌水平绝对值 (ng/L)。

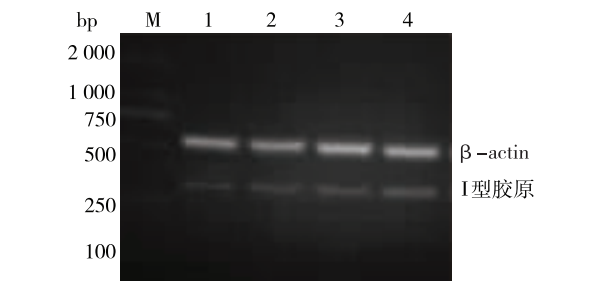
1.5 MTT 法检测 hRPE 细胞 收集状态良好的 hRPE 细胞, 接种于 96 孔培养板中, 5% CO_2 、37 °C 空气培养箱培养过夜。待细胞生长融合状态 1 d 后, 用高糖 DMEM 培养液饥饿细胞 1 d, 饥饿后分别加入 0.1、1、10 $\mu\text{g/L}$ 的 TGF- $\beta 1$ 、不含血清的高糖 DMEM 培养基孵育 20 h (弃去旧培养基), 再加入含 5 g/L MTT、不含血清的高糖 DMEM 培养基孵育 4 h, 弃尽培养基, 每孔加 150 μL DMSO, 室温下低速震荡 10 min, 于 492 nm 处测各孔吸光度值 (A492), 每孔设 5 个复孔, 计算细胞增殖率 (实验组吸光度值 - 对照组吸光度值)/对照组吸光度值。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。行正态性检验、方差齐性检验, 组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 I 型胶原表达 不同浓度的 TGF- $\beta 1$ (0.1、1、

10 $\mu\text{g/L}$)及空白对照刺激 hRPE 细胞 24 h,后 I 型胶原 mRNA 及蛋白水平变化如图 1、表 1 所示,结果显示在 24 h 后,TGF- β 1 组 I 型胶原 mRNA 及蛋白表达明显多于对照组, $P < 0.05$,差异有统计学意义,随着 TGF- β 1 浓度增加 I 型胶原 mRNA 及蛋白表达增加,各组间比较 $P < 0.05$,10 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1 干预组 I 型胶原 mRNA 及蛋白水平最高。



M 为 Marker(D2000),1 为对照组,2 为 0.1 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1, 3 为 1 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1,4 为 10 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1。
图 1 不同浓度 TGF- β 1 干预 RPE 细胞 I 型胶原 mRNA 表达

Fig. 1 The intervention of TGF- β 1 with different concentrations on expression of type I collagen mRNA in RPE cells

表 1 不同培养条件下 RPE 细胞 I 型胶原 mRNA 及蛋白表达($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	I 型胶原 mRNA(RIA)	I 型胶原蛋白(ng/L)
0.1 $\mu\text{g/L}$ 组	0.43 \pm 0.07	18.43 \pm 0.61
1 $\mu\text{g/L}$ 组	0.52 \pm 0.06	20.36 \pm 0.48
10 $\mu\text{g/L}$ 组	0.64 \pm 0.05	22.48 \pm 0.73
对照组	0.35 \pm 0.06	16.35 \pm 0.42
F 值	41.69	42.39
P 值	<0.01	<0.01

2.2 TGF- β 1 对 hRPE 细胞增殖的影响 表 2 显示不同浓度的 TGF- β 1 组细胞增殖率相对对照组增高, $P < 0.05$,TGF- β 1 能够促进细胞的增殖,其增殖水平与 TGF- β 1 浓度水平相成正变,10 $\mu\text{g/L}$ TGF- β 1 组增值率与其它组比较 $P < 0.05$,对细胞增殖率的作用最明显。

2.3 TGF- β 1 与 hRPE 细胞 I 型胶原和增殖率的相关性 表 3 显示不同 TGF- β 1 浓度与 I 型胶原蛋白存在正相关,相关系数 $r = 0.896, P < 0.01$;不同 TGF- β 1 浓度与增殖率也存在正相关,相关系数 $r = 0.901, P < 0.01$ 。

表 2 TGF- β 1 对 RPE 细胞增殖率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)	
Tab. 2 Proliferation rates of RPE cell exposed to TGF- β 1 with different concentrations($\bar{x} \pm s, n = 6$)	
分组	RPE 细胞增殖率(%)
0.1 $\mu\text{g/L}$ 组	06.6 \pm 1.2
1 $\mu\text{g/L}$ 组	13.8 \pm 2.0
10 $\mu\text{g/L}$ 组	20.7 \pm 4.1
对照组	0
F 值	37.806
P 值	<0.05

3 讨论

PVR 为视网膜表面发生无血管的、纤维细胞性的膜增殖,是引起视网膜再脱离的主要原因。PVR 自发的吸收很罕见^[4]。

RPE 细胞正常状态下分泌很少的 I 型胶原,保持静止状态不增殖,原位 RPE 细胞间、RPE 细胞与光感受器之间相互接触,细胞间信号传导正常。而在 PVR 中,RPE 细胞自身微环境发生改变后,与细胞间相互接触信号丧失,暴露在许多生长因子下,启动 RPE 细胞分子信号,或使其对生长因子的反应性增强,导致 RPE 细胞原有生物学特性发生改变。在正常眼的玻璃体腔液中 TGF- β 1 表达很少,而在 PVR 患者的玻璃体腔中检测出高浓度的 TGF- β 1,在其他组织,如肝硬化中已经证实 TGF- β 1 能明显促进 I 型胶原的分泌,促进肝硬化的发生。故本实验用不同浓度 TGF- β 1 干预体外培养的 hRPE 细胞,改变 RPE 细胞微环境,检测不同浓度 TGF- β 1 干预下,细胞的增值率和 I 型胶原蛋白的表达。

TGF- β 根据 DNA 同源性可以分为 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3,但是 TGF- β 1 的作用是最强的,故本实验眼研究 TGF- β 1 对 hRPE 细胞的作用。大多数细胞组织中 TGF- β 以潜伏形态存在^[5-6],不与其受体发生反应。纤溶酶、活性氧、血小板反应蛋白、酸处理等可以使 TGF- β 活化,与受体结合发挥生物学作用。TGF- β 家族成员及受体在眼组织中有广泛的表达,包括角膜、角膜缘上皮细胞、结膜、结膜基质、睫状上皮、晶状体上皮、视网膜及血管。TGF- β 在 RPE 细胞的分泌和表达较少。TGF- β 参与细胞外基质的合成,损伤修复,骨的重建,炎

性细胞趋化,免疫反应,胚胎发育,肿瘤等多种重要生理病理过程。它是众多生长因子中与创伤愈合和纤维化关系最为密切的生长因子,对不同种类的细胞有不同的效应。

本研究显示,不同浓度的 TGF- $\beta 1$ (0.1、1、10 $\mu\text{g/L}$) 组 I 型胶原 mRNA 及蛋白表达增加,在 10 $\mu\text{g/L}$ 组, I 型胶原的 mRNA 表达升高最明显,随之 ELISA 结果显示 I 型胶原的蛋白表达亦最明显,而对照组 I 型胶原 mRNA 及蛋白表达都很少。TGF- $\beta 1$ 是目前已知体外最强的促纤维化因子之一, TGF- $\beta 1$ 与 RPE 细胞上的受体结合,通过一系列的细胞内信号转导,促进 RPE 细胞的分泌 I 型胶原,进一步促进 PVR 的形成。在 TGF- $\beta 1$ 浓度与 I 型胶原蛋白的相关性分析中,发现两者的相关系数 $r=0.863$,存在正相关关系,大量的 I 型胶原蛋白分泌,在视网膜表面形成膜,促进 PVR 的形成。同样,发现细胞的增殖率随 TGF- $\beta 1$ 浓度的增加而增加, 10 $\mu\text{g/L}$ TGF- $\beta 1$ 组细胞的增殖率最高。TGF- $\beta 1$ 浓度与增殖率的相关性的分析中,两者的相关系数 $r=0.901$,存在正相关关系,证实 RPE 细胞的增殖率随 TGF- $\beta 1$ 的升高而升高。研究发现在小鼠的口腔黏膜损伤模型中,增加 TGF- $\beta 1$ 的表达能促进伤口的愈合^[7]。

TGF- $\beta 1$ 干预条件下促进 RPE 细胞表达 I 型胶原蛋白, I 型胶原蛋白增加促进增殖膜的形成, TGF- $\beta 1$ 同时促进 RPE 细胞的增殖,增殖的 RPE 细胞会表现出成纤维细胞的特性,能具有收缩和牵拉的特性,会造成视网膜的脱离。各种内眼手术和视网膜的脱离,都会增加 TGF- $\beta 1$ 的表达,促进 RPE 细胞 I 型胶原蛋白的表达增加,同时促进 RPE 细胞的增殖,共同促进 PVR 的形成。所以有针对性的减少 TGF- $\beta 1$ 的形成及抑制在玻璃体腔形成的

TGF- $\beta 1$ 发挥作用,减少 RPE 细胞表达 I 型胶原蛋白和增殖,对 PVR 的形成有一定的抑制作用。

4 参考文献

- [1] Cunningham MA, Tarantola RM, Folk JC, Sohn EH, et al. Proliferative vitreoretinopathy may be a risk factor in combined macular hole retinal detachment cases[J]. Retina, 2013(3):579-85.
- [2] Neroev VV, Kiseleva TN, Zaitseva OV, et al. Ocular and orbital blood flow in patients with proliferative vitreoretinopathy associated with rhegmatogenous retinal detachment[J]. Vestn Oftalmol, 2012(5):6-9.
- [3] Gu Y, Gong Y, Zhang H, et al. Regulation of transforming growth factor beta 1 gene expression by dihydropteridine reductase in kidney 293T cells[J]. Biochem Cell Biol, 2013(5):187-93.
- [4] 葛坚, 赵家良, 黎晓新等. 增殖性玻璃体视网膜病变[M]. 眼科学, 2010:232-233.
- [5] Meng XM, Chung AC, Lan HY. Role of the TGF- β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases[J]. Clin Sci (Lond), 2013(4):243-54.
- [6] Ning XH, Ge XF, Cui Y, An HX. Ulinastatin inhibits unilateral ureteral obstruction-induced renal interstitial fibrosis in rats via transforming growth factor β (TGF- β)/Smad signalling pathways[J]. Int Immunopharmacol, 2013(2):406-13.
- [7] Kim YJ, Carvalho FC, Souza JA, et al. Topical application of the lectin Artin M accelerates wound healing in rat oral mucosa by enhancing TGF- β and VEGF production[J]. Wound Repair Regen, 2013(3):456-63.

(2013-05-13 收稿, 2013-06-05 修回)

编辑:周 凌

(上接第 271 页)

- [4] 钱海红, 吕凡, 拓胜军. 实时三维超声心动图评价急性下壁心肌梗死患者 PCI 前后左室节段收缩功能[J]. 心血管康复医学杂志, 2012(4):431-434.
- [5] Costantini CO, Stone GW, Mehran R, et al. Frequency, correlates, and clinical implications of myocardial perfu-

sion after primary angioplasty and stenting, with and without glycoprotein IIb/IIIa inhibition, in acute myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2004(2):305-312.

(2013-03-15 收稿, 2013-04-11 修回)

编辑:潘 娅