

体外培养人眼小梁细胞 Ang II 的表达

章 艳 熊新春 郑红梅 秦 文

Expression of angiotensin II in cultured human trabecular meshwork cell

Zhang Yan, Xiong Xinchun, Zheng Hongmei, Qin Wen. Department of Ophthalmology, First People's Hospital of Yichang City, Yichang 443000, China

Abstract Objective Research showed that angiotensin converting enzyme inhibitor and angiotensin II (Ang II) receptor antagonist has good role of lowering-intraocular pressure. This study was to explore whether cultured human trabecular meshwork cells express Ang II in vitro. **Methods** The human trabecular meshwork cells strains were cultured in DMEM + F12 medium containing 25% fetal bovine serum in vitro and passaged at the proportion of 1:3. The third generation of cells were collected and cell climbing sheet was prepared. The expression of Ang II in human trabecular meshwork cells was examined by immunohistochemistry, and Ang II protein was localized by Western blot. **Results** Subcultured cells showed spindle shape. Ang II was positively expressed in human trabecular meshwork cells by immunochemistry, showing the yellow-brown granule in cellular membrane and cytoplasm. A absence of response for Ang II was found in negative control sample. The band of Ang II protein was found at the relative molecular weight of 64 000 by Western blot. **Conclusion** The result implies that human trabecular meshwork cells have the ability of synthesizing Ang II. It suggests that Ang II participates in the regulation of intraocular tension in glaucomous eye.

Key words human trabecular meshwork cells; angiotensin II; intraocular pressure

摘要 目的 探讨血管紧张素 II (Ang II) 在体外培养的人眼小梁细胞 (TMC) 中的表达情况。 **方法** 原代和传代培养人眼 TMC 株, 收集第 3 代人眼 TMC 用于制作细胞爬片。利用免疫组织化学染色法和 Western blot 法检测体外培养人眼 TMC 中 Ang II 蛋白的表达。 **结果** 传代培养的人眼 TMC 呈典型梭形, 免疫组织化学检测显示体外培养的人眼 TMC 细胞膜和细胞质中可见 Ang II 的阳性颗粒, 阴性对照片中未见有 Ang II 蛋白表达。Western blot 法在相对分子质量为 64 000 处可见一明显蛋白条带, 为 Ang II 蛋白的阳性表达。 **结论** Ang II 在体外培养的人眼 TMC 中呈阳性表达, 提示 Ang II 可能参与青光眼眼压和房水循环的调节。

关键词 人眼小梁细胞; 血管紧张素 II; 眼压

分类号 R 775 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)12-1077-03

青光眼是一组威胁和损害视神经视觉功能, 主要与病理性眼压升高有关的临床症候群或眼病^[1]。目前青光眼的主要治疗措施是降低眼压。临床发现降低眼压的大部分药物均为血管活性物质, 这些药物通过肾素 - 血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 能够引起血压的强烈变化。有研究表明, 血管紧张素转换酶抑制剂和血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 受体拮抗剂均具有良好的降眼压效应^[2]。这都提示 RAS 通过眼部自分泌和 (或) 旁分泌方式参与

了眼压的调节。Ang II 是 RAS 中最具活性的物质; 小梁细胞 (trabecular meshwork cells, TMC) 是房水外流的主要通道, 本研究以体外培养的人眼 TMC 为研究对象, 观察 Ang II 在蛋白质水平的表达情况, 初步探讨 Ang II 与青光眼眼压调节和房水循环之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

人眼 TMC 由中山眼科中心细胞中心提供。胎牛血清、DMEM/F12 培养基 (美国 Gibco 公司); 1:250 胰蛋白酶 (美国 Sigma 公司); SP 免疫组织化学试剂盒 (武汉凌飞公司); 鼠抗人 Ang II 多克隆抗体 (武汉博士德公司); 碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG (北京中山

本课题为湖北省自然科学基金资助 (2006ABA135)

作者单位: 443000 宜昌市第一人民医院 (三峡大学人民医院) 眼科 (章艳); 430022 武汉, 华中科技大学协和医院眼科 (熊新春、郑红梅、秦文)

通讯作者: 熊新春 (Email: xc_xiong@yahoo.com.cn)

公司)。

1.2 方法

1.2.1 人眼 TMC 细胞株的培养及传代 用胎牛血清、DMEM/F12 培养基进行 TMC 的培养,待 TMC 基本铺满培养皿底部时,无菌条件下吸出原有培养液,加入 0.25% 胰蛋白酶消化液,倒置相差显微镜下观察细胞收缩成圆形时终止消化,加入培养液吹打均匀后按 1:3 传代后继续培养。

1.2.2 制作细胞爬片 取第 3 代近融合的 TMC,应用 1:250 胰蛋白酶消化后传入预置消毒盖玻片的培养板内,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养至细胞生长接近融合。取出盖玻片,用 PBS 浸洗 3 遍,冷丙酮固定 30 min 后,室温下晾干。贴于载玻片上,细胞面朝上。

1.2.3 免疫组织化学染色法检测 Ang II 的表达 将细胞爬片置于 0.5%

H₂O₂ 中 30 min,以消除内源性过氧化物酶活性。蒸馏水洗 3 次,滴加山羊血清封闭液,室温下静置 10 min,以封闭非特异性抗原。弃去山羊血清,滴加兔抗人 Ang II 单克隆抗体,4 °C 湿盒中过夜。第 2 天取出后用 PBS 洗 3 次,滴加 supervision 过氧化物酶 - 山羊抗兔

IgG,置 37 °C 中 30 min,PBS 洗 4 次,DAB 显色,显微镜下观察至出现棕黄色阳性信号,水洗终止反应。苏木素轻度复染。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,光学树脂封片,光镜下观察并拍照。阴性对照以 PBS 代替。

1.2.4 Western blot 法测定 Ang II 蛋白 将第 3 代近融合人眼 TMC 消化收集后加入三去污裂解液(10% Triton X-100、0.1% SDS、150 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0) 80 μL 和蛋白酶抑制剂 1 mmol/L PMSF 0.8 mL;冰浴 30 min,充分裂解后 4 °C、15 000 r/min 离心 30 min;取等体积上清液行 10% SDS PAGE 凝胶电泳。经电转移将 SDS PAGE 分离的蛋白质样品转移至醋酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 30 min,TBST 清洗 3 次,加入 1:200 鼠抗人 Ang II 多克隆抗体,37 °C 孵育 1 h,TBST 清洗,加入碱性磷酸酶标记的 1:100 羊抗鼠 IgG,37 °C 孵育 1 h,TBST 清洗。化学发光试剂 ECL 反应 60 s,将膜放在 X 光胶片上曝光,常规冲片保存。

2 结果

2.1 人眼 TMC 的传代培养

人眼 TMC 的传代培养取得成功,初次传代培养的 TMC 贴壁后细胞突起呈梭形,星形或多角形向外延伸。传代培养的 TMC 融合后细胞突起消失,融合成片的细胞形态趋于一致,呈较典型的梭形,轮廓欠清晰,细胞质清亮。并取第 3 代 TMC 制备铺片(图 1)。

2.2 免疫组织化学 SP 法染色结果

免疫组织化学染色结果显示,体外培养的人眼 TMC 细胞膜和细胞浆中可见棕褐色粗大颗粒,呈强阳性染色,其中淡蓝色为衬染细胞核(图 2),说明体外培养的人眼 TMC 中可见 Ang II 的阳性表达,阴性对照未见染色(图 3)。



图 1 初次传代 TMC 融合后(×100) 图 2 免疫组织化学检测法可见 Ang II 在 TMC 细胞质中呈阳性染色(×100) 图 3 阴性对照片未见 Ang II 的阳性表达,蓝色为衬染细胞核(×200)

Fig.1 The fused first generation of human trabecular meshwork cells(×100) Fig.2 Immunohistochemistry is used to localize the Ang II in human trabecular meshwork cells, indicating the positive expression of Ang II in cellular membrane and cytoplasm(×100) Fig.3 There is no positive expression is seen in negative control(×200)

2.3 Western blot 结果

在相对分子质量为 64 000 处可见一明显蛋白条带(图 4),Western blot 证实该条带为 Ang II 蛋白,说明体外培养的人眼 TMC 可表达 Ang II 蛋白。



图 4 Western blot 检测 Ang II 在人眼 TMC 中的表达

Fig.4 Ang II protein is found in human trabecular meshwork cells at the relative molecular weight of 64 000

3 讨论

青光眼的主要危险因素为病理性的眼压增高,而眼压的高低主要取决于房水循环的动态平衡。目前,房水生成的研究取得不断的进展,而眼压是否存在调

节、如何调节,至今机制不明,这给青光眼的诊断和治疗带来一定的困难。

RAS 是由肝脏和肾脏分泌的一组相互作用而又相互调节的激素或前体。RAS 不仅是一个循环的激素系统,而且还是一个局部的内分泌系统,通过自分泌和旁分泌的形式发挥重要的生理作用。近来,已有大量研究证实,RAS 中的各种成分存在于眼局部组织。Stephen 等^[3]首次发现血管紧张素原存在于睫状体非色素上皮细胞,Danser 等^[4]经研究证实 Ang I 和 Ang II 可由眼局部组织分泌,Jiirgen 等^[5]通过 RT-PCR 法证实肾素、血管紧张素原、血管紧张素转换酶 mRNA,均可在视网膜色素上皮及脉络膜细胞中检测到。Cullinane 等^[6]发现 RAS 中活性最强的 Ang II 能够通过 Ca^{2+} 途径激活 K^+ 通道,导致睫状体上皮细胞体积的变化,从而参与房水的分泌过程。本实验从蛋白水平证明了 Ang II 在体外培养的 HTMC 中的表达,这与 Cullinane 等^[6]的研究一致。本研究据此推测眼局部组织中产生 RAS 的各种成分也可以通过自分泌或旁分泌的方式对眼房水循环和眼压进行反馈调节。

Ang II 是 RAS 中最具活性的代谢产物。在眼部,Ang II 被认为与糖尿病视网膜病变^[7]和新生血管性疾病有密切关系^[8-9];参与眼部炎症反应,与视网膜的血管发育有关^[10];在青光眼性视野损害中扮演较重要的角色^[11]。刘涛等^[12]发现 Ang II 能引起 TMC 的收缩,并且通过免疫组织化学法证实细胞骨架,尤其是微丝肌动蛋白和微管蛋白是其主要的效应器,其收缩效应呈现出一定范围的剂量依赖性,Ang II 还能加强 TMC 的增生和合成、分泌胶原作用,导致 EMC 的异常堆积,这种改变在共焦显微镜下表现为 TMC 纤维粘连蛋白的合成增加,且此效应可以部分被 Ang II 受体阻断剂洛沙坦阻断^[13]。小梁网是房水外流通道及眼压调节的主要部位,小梁细胞的形态、收缩特性及其与细胞外基质的相互作用决定了房水外流的难易程度。这说明 RAS 在 TMC 水平参与了房水的调节。随着研究的深入,越来越多的研究证实在眼前节存在着局部分泌的 Ang II,尤其在房水中也发现了较高浓度的 Ang II^[14],由于血-房水屏障的存在,猜测房水中的 Ang II 可能来源于局部微环境,与本研究结果一致。

人眼 TMC 是目前研究小梁细胞生物学功能的良好材料,既往的关于 Ang II 与 TMC 及房水动力学的研究都是在动物眼及外源性 Ang II 刺激人 TMC 的条件

下得出的结果,本实验在模拟生理条件下培养的人 TMC 中首次检测到 Ang II 的存在,与以往实验不同。本研究发现房水排出系统中 Ang II 的存在可能有助于解释青光眼眼压调节和房水循环的异常,并对探索 RAS 与青光眼的关系及青光眼的治疗等提供新的思路。本研究仅探讨了其中一种成分 Ang II 在 TMC 中的表达情况,对 RAS 是如何参与眼压调节及其调节的具体过程尚待进一步研究。

参考文献

- 1 葛坚. 眼科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005,1:245
- 2 Wang RF, Podos SM, Mittag TW, et al. Effect of CS-088, an angiotensin AT1 receptor antagonist, on intraocular pressure in glaucomatous monkey eyes[J]. *Exp Eye Res*, 2005, 80(5): 629-632
- 3 Stephen J, Ingolf HL, Duane A, et al. An ocular renin-angiotensin system [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992, 33: 1627-1632
- 4 Danser AH, Derkx FH, Admiraal PJ, et al. Angiotensin levels in the eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35: 1008-1018
- 5 Jiirgen W, Danser AH, Frans HM, et al. Demonstration of renin mRNA, angiotensinogen mRNA, and angiotensin converting enzyme mRNA expression in the human eye: evidence for an intraocular renin-angiotensin system [J]. *Br J Ophthalmol*, 1996, 80: 159-163
- 6 Cullinane AB, Leung PS, Ortego J, et al. Renin-angiotensin system expression and secretory function in cultured human ciliary body non-pigmented epithelium [J]. *Br J Ophthalmol*, 2002, 86: 676-683
- 7 van Buggenum IMH, Polak BC, Reichert-Thoen JW, et al. Angiotensin converting enzyme inhibiting therapy is associated with lower vitreous vascular endothelial growth factor concentrations in patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Diabetologia*, 2002, 45: 203-209
- 8 Amaral SL, Roman RJ, Greene AS. Renin gene transfer restores angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in Dahl S rats [J]. *Hypertension*, 2001, 37: 386-390
- 9 Chen P, Scicli GM, Guo M. Role of angiotensin II in retinal leukostasis in the diabetic rat [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83: 1041-1051
- 10 Sarlos S, Wilkinson-Berka JL. The renin-angiotensin system and the developing retinal vasculature [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(3): 1069-1077
- 11 Bui BV, Armitage JA, Tolcos M, et al. ACE inhibition salvages the visual loss caused by diabetes [J]. *Diabetologia*, 2003, 46: 401-408
- 12 刘涛, 张德秀, 刘勇, 等. 血管紧张素 II 对体外培养的牛眼小梁细胞微管及微丝的动力学影响 [J]. *眼科新进展*, 2001, 21(1): 24-27
- 13 沈凤梅, 张林, 刘涛, 等. 血管紧张素 II 对体外培养的牛眼小梁细胞间质合成的影响 [J]. *西安医科大学学报*, 2003, 20(10): 258-261
- 14 Susky R, Nussberger J, Amstutz C. Individual measurements of angiotensin II concentrations in aqueous humor of the eye [J]. *Eur J Ophthalmol*, 1994, 4(4): 228-233

(收稿:2009-02-18 修回:2009-10-12)

(本文编辑:尹卫靖)