

# 白细胞介素-2 对高糖状态下人视网膜色素上皮细胞的影响

沈玺 谢冰 田洁 徐格致

**【摘要】 目的** 研究白细胞介素-2 (IL-2) 对高糖状态下人视网膜色素上皮 (RPE) 细胞的增殖及其分泌和表达血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的影响。**方法** MTT 自动比色法观察 IL-2 浓度对高糖状态下 RPE 细胞增殖的作用; ELISA 法测 RPE 细胞分泌 VEGF 的变化; 免疫组化观察 RPE 细胞表达 VEGF 的变化。**结果** 0.1 ~ 10 μg/L 的 IL-2 均能明显促进高糖状态下 RPE 细胞的增殖, 并能明显提高 RPE 细胞分泌 VEGF 的水平及提高 VEGF 在细胞中的表达。**结论** 高糖状态下, IL-2 可明显促进人 RPE 细胞的增殖并能提高 RPE 细胞分泌 VEGF 的水平和提高 VEGF 在 RPE 细胞中的表达, IL-2 可能在增殖性糖尿病视网膜病变中起一定的作用。

**【关键词】** 白细胞介素-2; 视网膜色素上皮细胞; 血管内皮细胞生长因子; 增殖性糖尿病视网膜病变

**The impact of interleukin-2 on human retinal pigment epithelial cells in high glucose** SHEN Xi, XIE Bing, Tian Jie, et al. Department of Ophthalmology, Shanghai E.E.N.T Hospital, Fudan University Shanghai 200031. Department of Ophthalmology, Ruijin Hospital, Jiaotong University Shanghai 200025

**【Abstract】 Objective** To study the effects of interleukin(IL)-2 on the proliferation of cultured human retinal pigment epithelial(CHRPE) cells in high glucose, vascular endothelial growth factor (VEGF) level and expression in CHRPE cells in high glucose. **Methods** The proliferation of CHRPE cells was determined with MTT method and the level of VEGF in culture medium or the expression of VEGF in RPE cells was measured by ELISA or immunohistochemistry. **Results** IL-2(0.1~10 μg/L) obviously stimulated the proliferation of CHRPE cells in dose-dependent manner in high glucose and the VEGF concentration was increased significantly in culture medium of CHRPE cells. The expression of VEGF in RPE cells was also increased significantly. **Conclusion** In high glucose culture medium, IL-2 can stimulate the proliferation and increase VEGF level in culture medium, as well as upregulate the expression of VEGF in CHRPE cells. IL-2 maybe play a role in proliferative diabetic retinopathy.

**【Key Words】** interleukin-2; retinal pigment epithelial cell; vascular endothelial growth factor; proliferative diabetic retinopathy

增殖性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 确切的发病机制还不明了<sup>[1]</sup>。已有文献报道在糖尿病视网膜病变中有多种免疫因子参与, 特别在增殖期, 这些免疫因子在视网膜增殖膜的形成中可能起着重要作用<sup>[2-4]</sup>。而视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞又是参与 PDR 的重要成分。糖尿病情况下免疫因子对 RPE 细胞直接影响的研究还比较少。本文探讨

白细胞介素-2 [interleukin (IL) -2] 对高糖状态下 RPE 细胞的部分影响。

## 材料与方 法

### 一、材料

1. RPE 细胞: 来源于上海复旦大学附属眼耳鼻喉科医院角膜移植的供体眼球, 12h 内取材。

2. 试剂: DMEM、F12、胎牛血清、0.25% Trypsin (胰蛋白酶)、0.02% EDTA 和谷氨酰胺均购自美国 GIBCO 公司。重组人 IL-2 购自美国 Peprotech 公司。噻唑兰 (MTT) 购自 Fluka 公司。

作者单位: 200031 上海, 复旦大学附属眼耳鼻喉科医院眼科 (沈玺, 田洁, 徐格致); 交通大学附属瑞金医院眼科 (谢冰)  
通讯作者: 徐格致

人 VEGF ELISA 检测试剂盒为美国 R&D 公司产品。兔抗人 VEGF 多克隆抗体购自武汉博士德公司。

3. 主要器材: EL-312 酶联免疫测定仪 (Bio-Tek), 倒置显微镜 (Olympus), 超净台 (Klenzaid's Bioclean Devices), 恒温培养箱 (NAPCO), Centrifuge 5840R 和 5417C 离心机 (Eppendorf), VIDAS 全自动图像分析系统。

## 二、方法

1. 人 RPE 细胞培养: 将供体眼球, 自赤道部环形剪开眼球壁, 解剖显微镜下仔细分离视网膜神经上皮层, 于视盘周围剪除, 制成 RPE 杯。D-Hanks 液漂洗 RPE 杯 2 次, 加入 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 混合液, 37℃ 消化 1h。用吸管轻轻吹打使细胞脱落, 将消化液移入预加有 20% 胎牛血清 DMEM 培养液的离心管中, 离心 5min, 1000r/min, 弃上清, 用培养液 (DMEM/F12、20% 胎牛血清、谷氨酰胺、青、链霉素和 5400mg/L D-葡萄糖, pH7.2~7.4) 调整细胞密度至  $6 \times 10^6$ /L 后, 接种于培养瓶, 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养。RPE 传代培养同文献<sup>[1]</sup>, 培养液采用高糖 (含 5400mg/L D-葡萄糖) 和低糖 (含 900mg/L D-葡萄糖) 两种, 胎牛血清调整为 10%。3~6 代细胞用于实验。

2. MTT 法检测 IL-2 对人 RPE 细胞增殖的影响: 将 3~4 代人 RPE 细胞用培养液 (分别含高糖和低糖) 调整细胞数为  $4 \times 10^4$  个/ml, 接种于 96 孔培养板, 每孔 100ul 培养 24h 后, 换用无血清培养液培养 24h, 然后加入不同浓度的 IL-2 (0、0.1、1、5、10μg/L), 每组各 8 孔, 再培养 24h 后, 用 MTT 法检测细胞增殖。检测时, 用 PBS 将 MTT 配成 5g/L 溶液, 滤菌待用。每孔均加入 MTT 20ul, 继续于培养箱中培养 4h, 见细胞内出现蓝紫色晶体, 吸去培养液, 加入 DMSO 100ul/孔, 而后摇床摇动 15min, 在酶联免疫测定仪上测它们在 570nm 的吸光值 (A)。

3. ELISA 法检测 RPE 细胞分泌 VEGF 的变化: 将 4~5 代人 RPE 细胞用培养液 (分别含高糖和低糖) 调整细胞数为  $4 \times 10^4$  个/ml 接种于 12 孔板培养 24h, 换成无血清的 DMEM 培养液孵育 24h, 再换成含不同浓度 IL-2 (0、0.1、1、5、10μg/L) 的 DMEM 培养液, 30h 后收集培养液, 每组 4 孔, 采用 ELISA 法按试剂盒说明测定 VEGF 的含量。

4. 免疫组化染色观察 IL-2 刺激后 RPE 细胞 VEGF 表达的变化: 将 4~6 代人 RPE 细胞用培养液 (分别含高糖和低糖) 调整细胞数为  $6 \times 10^5$  个/ml 接种于 6 孔板 (孔中预先放置盖玻片) 培养 24h, 换

成无血清的 DMEM 孵育 24h, 再换成含不同浓度 IL-2 (0、0.1、1、5、10μg/L) 的 DMEM 液, 每种浓度设 4 个复孔, 培养 24h 后, 按免疫组化试剂盒要求操作。

## 三、统计学处理

应用 SPSS 9.0 软件, 组间方差分析。

## 结 果

### 一、IL-2 对人 RPE 细胞生长的影响

IL-2 (0.1、1、5、10μg/L) 在高糖和低糖状态下都以浓度依赖方式刺激人 RPE 细胞增殖, 与对照组 (0μg/L) 相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (图 1)。在不同的 IL-2 浓度下, 高糖状态下的 RPE 细胞明显比低糖状态下增殖多 ( $P < 0.05$ )。

### 二、IL-2 对人 RPE 细胞 VEGF 分泌的作用

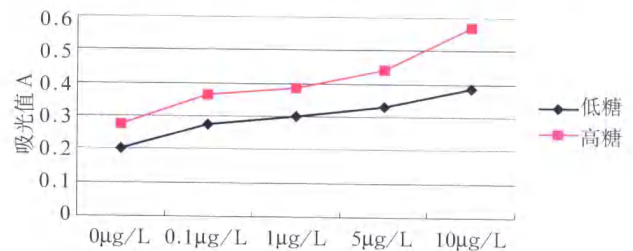


图 1 不同浓度的 IL-2 对人 RPE 细胞增殖的影响

ELISA 结果显示高糖和低糖状态下的人 RPE 细胞都可分泌一定量的 VEGF, 在受到不同浓度 IL-2 (0.1、1、5、10μg/L) 刺激 30h 后, VEGF 的含量明显升高, 与对照组 (0μg/L) 相比有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。在不同的 IL-2 浓度下, 高糖状态下的 RPE 细胞明显比低糖状态下的 RPE 细胞分泌更多的 VEGF ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ) (图 2)。

### 三、IL-2 对人 RPE 细胞 VEGF 表达的影响

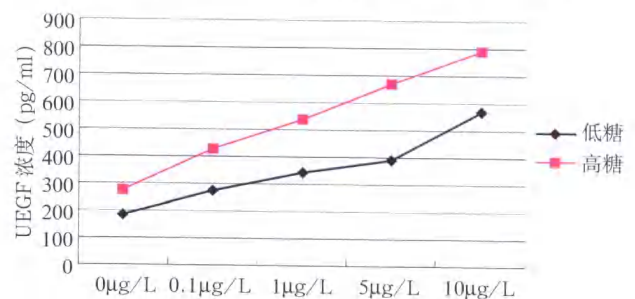


图 2 IL-2 浓度对人 RPE 细胞 VEGF 分泌的影响

对照组人 RPE 细胞在高和低糖状态下都有少量 VEGF 表达, 不同浓度刺激 24h 后, VEGF 表达明显上调 (图 3、4、5)。图像分析显示 0.1μg/L~10μg/L 浓度的 IL-2 刺激人 RPE 细胞后, 与对照组相比可

以明显提高 VEGF 的表达 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。并且高糖下的 VEGF 表达量更高 ( $P < 0.05$ )。

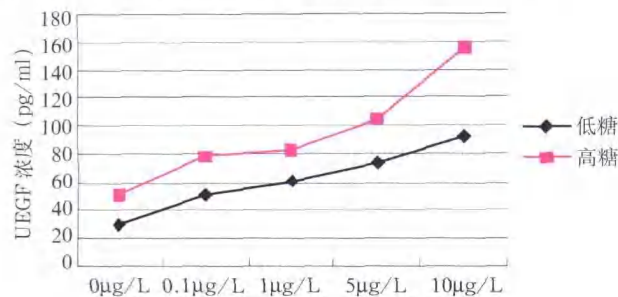


图 3 IL-2 浓度对人 RPE 细胞 VEGF 表达的影响



图 4 对照组人 RPE 细胞中 VEGF 表达少量  $\times 200$  (低糖组) 图 5 10  $\mu\text{g/L}$  IL-2 组人 RPE 细胞中 VEGF 表达明显  $\times 200$  (高糖组)

## 讨 论

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的发病机制还不完全明了,在其发生、发展中有多种因素相互作用,如:多元醇代谢通路的异常、蛋白质非酶糖基化产物的堆积、蛋白激酶 C 激活、氧化应激学说、细胞因子的作用和粘附分子的参与等等<sup>[6]</sup>。PDR 是糖尿病视网膜病变的增殖期表现,后果严重,已成为目前至盲的一个重要原因。

本文以 IL-2 和高糖状态下的 RPE 细胞为研究对象,初步探讨 RPE 细胞在 PDR 形成中的可能作用。IL-2 是由 T 淋巴细胞产生的一种细胞因子,强有力地参与免疫和炎症反应的调节;它还可激活 JAK/Stat 细胞内信号传导通路,刺激细胞增殖<sup>[8]</sup>。Tang S<sup>[4]</sup>报道在 PDR 患者的视网膜前增殖膜中,IL-2 表达的检出率高达 67%。有研究表明 IL-2 在眼内的含量与眼内的炎症反应的强度有明显的相关性<sup>[8]</sup>。但 IL-2 如何在 PDR 患者中发挥作用,其致病机制还不明确。本研究以高糖状态下的 RPE 细胞为研究对象,模拟糖尿病环境,以不同浓度的 IL-2 对其刺激,发现 0.1 ~ 10  $\mu\text{g/L}$  的 IL-2 可以明显地刺激 RPE 细胞的增殖,并呈剂量依赖性。

VEGF 是一种分泌型碱性蛋白分子,分子量为 34~42kd。它的产生主要是由于视网膜缺氧造成的,它可使新生血管形成,并且是已知的最强的促血管生成因子,而其他一些细胞因子也可使其表达上调。研究

发现 RPE 是产生 VEGF 的主要细胞之一,还发现 RPE 不仅能产生 VEGF,其表面也有 VEGF 的两种受体,并证实一为 FLK(Fms-like tyrosine kinase),另一为 KDR(Kinase insert domain containing receptor)<sup>[9]</sup>。VEGF 在正常人眼玻璃体中由于浓度太低,无促增殖作用<sup>[10]</sup>。在本研究中,高糖状态下,RPE 细胞可分泌一定量的 VEGF (253pg/mL),加入不同浓度的 IL-2 (0.1 ~ 10  $\mu\text{g/L}$ ) 刺激后,VEGF 的含量明显升高 (426 ~ 759 pg/mL;  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。通过免疫组化方法又发现 IL-2 (0.1 ~ 10  $\mu\text{g/L}$ ) 刺激后,RPE 细胞 VEGF 的表达与对照组相比明显上调 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

本研究表明,在高糖状态下,IL-2 可明显地促进 RPE 细胞的增殖并能提高 RPE 细胞分泌 VEGF 的水平和提高 VEGF 在细胞中的表达。由于 VEGF 通过其在 RPE 细胞上的受体,可增进 RPE 细胞的增殖,RPE 细胞增殖后又可分泌更多的 VEGF,从而形成一种恶性循环。因此阻断 IL-2 对 RPE 细胞的作用,仍不失为一种可寻求的治疗手段。

## 参 考 文 献

- Doganay S, Evereklioglu C, Er H, et al. Comparison of serum NO, TNF-alpha, IL-1beta, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Eye*, 2002,16(2): 163-170
- Canataroglu H, Varinli I, Ozcan AA, et al. Interleukin (IL)-6, interleukin (IL)-8 levels and cellular composition of the vitreous humor in proliferative diabetic retinopathy, proliferative vitreoretinopathy, and traumatic proliferative vitreoretinopathy. *Ocul Immunol Inflamm*, 2005,13(5):375-381
- Meleth AD, Agron E, Chan CC, et al. Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005,46(11): 4295-4301
- Hernandez C, Segura RM, Fonollosa A, et al. Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabet Med*, 2005, 22(6):719-722
- 王琳,惠延年,王雨生.人视网膜色素上皮细胞的冻存与复苏培养. *中华眼底病杂志*,1997,13(3):157-159
- Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Retin Eye Res*,2003,27:283-290
- Ellery JM, Nicholls PJ. Alternate signaling pathways from the interleukin-2 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev*,2002,13:27-40
- 黄秀榕,祁明信,沈世仁,等.人工晶体植入术后房水白介素-2 和肿瘤坏死因子-(水平及其与一氧化氮的关系. *中国病理生理杂志*,2001,17:1196-1198
- 沈玺(综述).非手术方法治疗增生性玻璃体视网膜病变. *国外医学.眼科学分册*,2000, 1: 42-48
- Ferrara N, Houck KA, Jakeman JB, et al. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem*,1991,47: 211-218

(收稿时间: 2006-01)