

水蛭渗滤液对酪氨酸蛋白激酶介导的牛视网膜色素上皮细胞跨膜信号转导途径的影响

吕帆 郑燕林 陈海燕 盛容

【摘要】 目的 研究水蛭渗滤液对酪氨酸蛋白激酶(PTK)介导的牛视网膜色素上皮(RPE)细胞跨膜信号转导途径的影响。方法 (1) MTT 比色法筛选促牛 RPE 细胞增殖作用最强的血小板源性生长因子(PDGF)浓度; (2) 16mg/ml 水蛭渗滤液与 0.02 μ g/ml PDGF 以 3 种加药方式分别孵育 RPE 细胞 15 分钟后, 采用免疫沉淀, SDS-PAGE 电泳, Western-blot 检测转录因子 STAT₃ 磷酸化水平。结果 (1) 0.02 μ g/ml PDGF 促 RPE 细胞增殖作用最佳 ($p < 0.05$); (2) 16mg/ml 水蛭渗滤液在 3 种加药方式下均能不同程度抑制细胞内 PTK 活性, 降低转录因子 STAT₃ 的磷酸化水平。结论 水蛭渗滤液能阻断 PTK 介导的牛 RPE 细胞内 STAT₃ 下游通路的信号传递。

【关键词】 视网膜色素上皮细胞; 水蛭; 血小板源性生长因子; 酪氨酸蛋白激酶; 信号转导

The influence of percolation filtration of hirudo on bovine retinal pigment epithelial(RPE) cells' signal transduction that is guided by protein tyrosine kinase(PTK) LU Fan, ZHENG Yan-lin, CHEN Haiyan, et al. Department of ophthalmology, the Affiliated Hospital of Chendu Traditional Chinese Medicine University, Chendu 610072, China

【Abstract】 **Objective** To research the influence of percolation filtration of Hirudo on bovine retinal pigment epithelial(RPE) cells' signal transduction that is guided by protein tyrosine kinase(PTK). **Methods** (1)The method of MTT was used to select the proper concentrations of platelet-derived growth factor(PDGF) that proliferate RPE cells greatly. (2)The choosen 16mg/ml percolation filtration of Hirudo and 0.02 ug/ml PDGF were used to incubate RPE cells for 15 minutes with three different modes. Then the bovine RPE cells were splitted. The phosphorylated level of transcription factor-STAT₃ in the cells was studied through immunoprecipiration, SDS-PAGE and Western-blot. **Results** (1)When the concentration of PDGF solution was 0.02ug/ml, the proliferation effect was the most strong ($p < 0.05$). (2) The activity of PTK in the cells was inhibited in different degrees by 16mg/ml percolation filtration of Hirudo which was added with three different modes, and the phosphorylated level of STAT₃ was reduced. **Conclusion** Percolation filtration of Hirudo can interdict the cells' signal transduction after STAT₃.

【Key words】 retinal pigment epithelial cell; Hirudo; platelet-derived growth factor; protein tyrosine kinase; signal transduction

增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是指在孔源性视网膜脱离或眼外伤等情况下, 由于视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞等在视网膜表面和玻璃体内游走、附着、增生, 形成细胞性膜, 合成

胶原和收缩, 造成牵拉性视网膜脱离, 最终导致眼球萎缩的一种严重致盲性眼病^[1]。但在细胞分子水平对其发生机理和药物作用机制的阐述尚不甚明了。我们关于 PVR 防治的前期实验发现 水蛭渗滤液能抑制体外培养的牛 RPE 细胞增殖。本实验则运用血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)诱导 RPE 细胞增殖, 进一步探讨中药水蛭对 PDGF 诱导下酪氨酸蛋白激酶 (protein tyrosine kinase, PTK) 介导的细胞跨膜信号转导通路的影响, 深入探讨水蛭抗增殖机理, 为防治 PVR 提供思路。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目, 基金编号 30371796

作者单位: 610072 成都, 成都中医药大学附属医院眼科 (吕帆, 研究生现在福建省泉州市儿童医院眼科, 陈海燕现在成都地奥集团)

通讯作者: 吕帆, E-mail: lvfine@sohu.com

实验材料与方法

1. 不同浓度 PDGF 对牛 RPE 细胞生长的影响:

采用 PDGF(R & D 公司)制造 RPE 细胞增殖的体外模型: 牛 RPE 细胞源于出生 24 小时内乳牛, 雌雄不拘, 双眼正常, 处死后 4 小时内用于培养。不同浓度 PDGF[0.08 μ g/ml、0.04 μ g/ml、0.02 μ g/ml、0.01 μ g/ml、0.005 μ g/ml 及 0 μ g/ml (空白组)]由 DMEM 液稀释, pH 值调整至 7.2 ~ 7.4, MTT 比色法测定细胞活力 (图 1)。细胞增殖率 = [(实验组 OD 值 / 空白组 OD 值) - 1] \times 100%

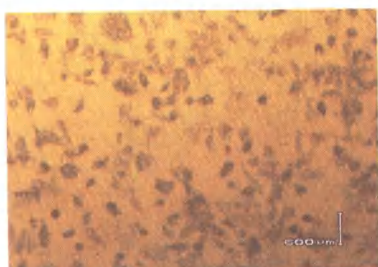


图 1 PDGF 作用下牛 RPE 细胞, MTT 比色法测定中的增殖颗粒。200 \times

2. 水蛭渗滤液对 PTK 介导的牛 RPE 细胞跨膜信号转导途径的影响:

制备细胞样本: 选择取材、传代时间接近的 2 代 RPE 细胞消化、悬浮后全部混匀, 等分, 接种于 18 个 75mm² 底面积培养瓶中培养; 融合后随机分 6 组 (3 瓶/组, 3×10^5 个细胞/瓶): A 空白组、B PDGF 组、C 水蛭组、D 先加 PDGF 后加水蛭组、E 先加水蛭后加 PDGF 组、F 两药同时加组。“水蛭”浓度为 16mg/ml 的水蛭渗滤液 (前期试验的结果), “PDGF”浓度为 0.02 μ g/ml 的 PDGF 溶液。药物作用时间为 15min, 加药结束后 D - hanks BSS 漂洗 3 次, 消化裂解。免疫沉淀, SDS-PAGE 电泳, Western-blot 检测细胞内转录因子 STAT₃ 磷酸化水平 (Rabbit Anti-mouse Immunobead 购于 Bio-Rad 公司; Mouse monoclonal Anti-phosphotyrosine Biotin Conjugate 购于 Biosource 公司; Monoclonal Anti-human/mouse/rat STAT₃ Antibody 购于 R&D 公司)。

图像处理: 免疫印迹条带采用 BI-2000 序列图像测量 / 免疫组化分析系统 (成都泰盟科技公司制作) 进行积分光密度分析。

3. 统计方法: 数据结果以 spss12.0 统计软件包进行统计学处理, PDGF 不同浓度间多组比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 LSD 检验。

实验结果

1. 不同浓度 PDGF 对牛 RPE 细胞生长的影响

表 1 PDGF 对牛 RPE 细胞生长的影响 (n=6)

Groups	Concentration (ug/ml)	OD values ($\bar{x} \pm s$)	Proliferation effect(%)
1	0.08	0.123 \pm 0.038*	72.81
2	0.04	0.092 \pm 0.052	29.30
3	0.02	0.130 \pm 0.033*	82.66
4	0.01	0.119 \pm 0.027*	66.24
5	0.005	0.071 \pm 0.053	0
6	0	0.071 \pm 0.019	—

* P<0.05 vs respective group 6

浓度为 0.08 μ g/ml, 0.02 μ g/ml, 0.01 μ g/ml 的 PDGF 与空白组比较, 差异具有统计学意义。实验选用 0.02 μ g/ml 的 PDGF。

2. 水蛭提取液对 PTK 介导的牛 RPE 细胞跨膜信号转导途径的影响:

表 2 免疫印迹条带 (图 2) 积分光密度分析结果

Group	Analysis results
A	25120.42
B	33313.81
C	16410.02
D	19083.12
E	3203.722
F	8582.083

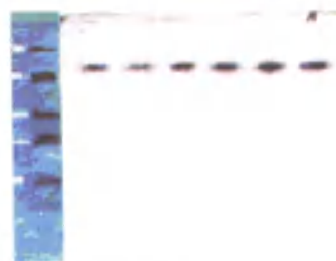


图 2 免疫印迹结果

磷酸化的 STAT₃ 分子量约为: 70kD

讨 论

近年来, 随着对胞外第一信使、受体、胞内第二信使及蛋白激酶等细胞信号转导要素的深入研究已证实细胞内存在多种信号转导方式及途径, 并构成复杂的信号转导网络。信号转导的研究和阐明对疾病的发生、药物的作用机制等具有重要意义。PVR 被认为是多种活性因子对眼内细胞增生的调控过程。多种细胞因子 (Cytokines, CKs) 如生长因子 (growth factor, GF)、白细胞介素 (interleukin, IL)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等通过作用于细胞表

面受体,启动信号通路,产生胞内信号,进行逐步放大的级联反应,引起细胞增殖、分化和移行。

PDGF 是一种重要的促细胞生长和分化的生长因子^[2],是体外 RPE 细胞的强力趋化剂和有丝分裂原^[3],参与了PVR过程中RPE细胞的增殖调控过程。大量实验表明RPE细胞具有自分泌链,能分泌刺激自身增生的PDGF,又具有PDGF受体^[4]。人们推测PVR膜上RPE细胞通过合成、分泌PDGF,使增殖膜局部产生高浓度的PDGF,刺激细胞自身的有丝分裂^[3,5,6]。从细胞增殖的内部通道考虑,PDGF它与具有PTK活性的细胞膜受体结合,催化多种底物蛋白质酪氨酸残基磷酸化,从而调节细胞的生长周期,直接刺激RPE细胞增生、移行和转化。在关于PVR的实验研究中,人们广泛采用PDGF制造PVR模型^[7-9]。本实验发现持续刺激牛RPE细胞24小时,浓度为0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的PDGF促增殖作用有统计学意义($P<0.05$),且3组间无统计差异。该结果与司艳芳等^[10]发现的0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的PDGF显著促进体外培养的人RPE细胞增殖结果基本一致。本实验选择促增殖率最高的0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PDGF作为实验用浓度。

前期研究表明16mg/ml水蛭渗滤液对牛RPE细胞增殖抑制作用有统计学意义,水蛭中重要的活性成分—水蛭素能抑制增殖细胞PDGF的分泌及其受体的活化,并降低其下游分子Ki67的产生,因而推测水蛭素可能是通过细胞外调节蛋白激酶通路,产生抑制细胞增殖的作用^[11-14]。PDGF受体是一类具有PTK^[15]活性的受体。当PDGF与受体特异性结合引起受体的PTK活化,受体自身酪氨酸残基被磷酸化,转录因子STATs的SH₂功能区可直接与受体磷酸化的酪氨酸相互作用,使二者结合,同时STATs中特定定位点的酪氨酸残基被磷酸化,STATs得以二聚化,并从受体复合物中解离,转运至胞核,作为特定细胞因子应答基因的转录激活子,调节转录。限于条件,本实验仅选择了初步探讨水蛭渗滤液对PDGF诱导下PTK介导的信号转导通路中STAT₃的磷酸化水平,该通路的探讨,亦有助于了解受体的激活情况。实验结果表明:先加水蛭后加PDGF的加药方式下(E组),水蛭渗滤液中的有效成分能明显抑制细胞内PTK活性,极大降低STAT₃上酪氨酸残基的磷酸化水平,从而阻断其下游的信号转导通路。因为在PDGF作用下,STAT₃的磷酸化水平与受体酪氨酸蛋白激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)的激活直接相关,故推测:信号通路阻断的原因为水

蛭渗滤液中有有效成分能与细胞表面RTK(尤其是PDGF受体)紧密结合,从而阻断配体与受体的结合,影响RTK活化。该加药方式亦提示预防用药的重要性。另外两种加药方式(D、F组)亦部分降低细胞内PTK活性,推测与渗滤液中有有效成分和PDGF发生竞争性占位,减少PDGF结合的受体数量有关。实验还发现单加水蛭的C组STAT₃的磷酸化水平虽亦降低,但高于E、F两组,推测水蛭渗滤液对STAT₃通路的阻断作用是在PDGF诱导细胞增殖的情况下发生,即对正常生长的RPE细胞该通路阻断作用相对较弱,具体机理有待进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 李凤鸣,主编.眼科全书.第1版.北京:人民卫生出版社,1996.2424
- 2 Glaser BM, Lem or M. Pathobiology of proliferative vitreoretinopathy In Ryan S. Ed: RETINA volIII st Louis:C. V. Morsby, 1994. 2249-2263
- 3 Leschey KH, Hackett SF, Singer JH, et al. Growth factor responsiveness of human retinal pigment epithelial cells. Invest OpHthalmol Vis Sci, 1990, 31: 839-846
- 4 Campochiaro PA, Hackett SF, Vinocor SA. Growth factor in the retina and retinal pigmented epithium. Prog Ret Eye Res, 1996, 15: 547-567
- 5 Noji s, Matsuo T, Koyam a E, et al. Expression pattern of acidic and basic fibroblast growth factor genes in adult rat eyes. Biochem BiopHys Res Commun, 1990, 168: 343-349
- 6 梁小玲,李绍珍,高汝龙,等.玻璃体中碱性成纤维细胞生长因子的定量研究,中山医科大学学报,1998,19(3):183
- 7 Yeo JH, Sadeghi J, Campochiaro PA, et al. Intravitreal fibronectin and platelet-derived growth factor new model for traction retinal detachment. Arch opHthalmol, 1986, 102: 417
- 8 Baudouin C, Ettaiche M, Imbert F, et al. Inhibition of preretinal proliferation by free radical scavengers in an experimental model of traction retinal detachment. Exp Eye Res, 1994, 59: 697
- 9 Pisella PJ, Bandouin E. Stages of cell proliferation in an experimental model of vitreoretinal proliferation following injection of platelet-rich plasma. J Fr OpHthalmol, 1996, 96: 576
- 10 司艳芳,惠延年,韩泉洪,等.血小板源性生长因子对人视网膜色素上皮细胞的作用.第四军医大学学报,2001,22(15):1405-1409
- 11 郑燕林,王毅,蒋纪恺,等.增生性玻璃体视网膜病变的免疫组化研究及水蛭素的影响.眼科,2000,9(2):100-103
- 12 郑燕林,王毅,蒋纪恺,等.水蛭素对外伤性增生性玻璃体视网膜病变细胞外基质的影响.中国中医眼科杂志,2001,11(1):5-6
- 13 王毅,郑燕林,仝崇毅,等.水蛭素对外伤性增生性玻璃体视网膜病变增殖膜抑制机制的探讨.中国中医眼科杂志,2002,12(4):187-191
- 14 郑燕林,王毅,武文忠,等.水蛭素对血小板源性生长因子及受体的影响.中国中医眼科杂志,2003,21(5):476-478
- 15 宋今丹,主编.医学细胞生物学.第3版.北京:人民卫生出版社,2004.244-255

(收稿时间:2006-10)