

人视网膜色素上皮细胞诱导型一氧化氮合酶和活性氧在高糖状态下的表达*

洪瑾¹, 帅捷², 袁志兰³, 范钦华¹

Changes in inducible nitric oxide synthase and reactive oxygen species in human retinal pigment epithelial cells induced by high glucose

Hong Jin¹, Shuai Jie², Yuan Zhi-Lan³, Fan Qin-Hua¹

Abstract

BACKGROUND: High glucose-induced free radical damage is a central link to pathological mechanism underlying diabetic retinopathy.

OBJECTIVE: To investigate the effects of high glucose on growth of human retinal pigment epithelial cells and on expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and reactive oxygen species (ROS) in cells.

METHODS: Human retinal pigment epithelial cells were cultured *in vitro* and randomly divided into three groups: control, high glucose, and mannitol. In the control, high glucose, and mannitol groups, cells were cultured with DMEM solution containing 5.5 mmol/L glucose, 33 mmol/L glucose, and 55 mmol/L glucose and 27.5 mmol/L mannitol, respectively. Cell morphology was observed by phase contrast inverted microscope. Expression of iNOS and 3-nitrotyrosine was studied by immunofluorescence staining method. Changes in ROS in the human retinal pigment epithelial cells were determined by scanning laser confocal microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with control group, at 48 hours after treatment, cell body became small with various morphologies, irregular cells increased, iNOS and 3-nitrotyrosine expression increased, and ROS expression was obviously increased, in the high glucose group. These finding suggest that high glucose can damage retinal pigment epithelial cells, leading to altered cell morphology and increased intracellular 3-nitrotyrosine level.

Hong J, Shuai J, Yuan ZL, Fan QH. Changes in inducible nitric oxide synthase and reactive oxygen species in human retinal pigment epithelial cells induced by high glucose. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011;15(28):5281-5284. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 高血糖导致的自由基损伤是糖尿病视网膜病变发病机制的中心环节。

目的: 观察高糖对体外培养的人视网膜色素上皮细胞的氧化损伤作用以及高糖对人视网膜色素上皮细胞诱导型一氧化氮合酶和活性氧表达的影响。

方法: 将培养人视网膜色素上皮细胞, 分为对照组、高糖组和甘露醇组, 分别用含 5.5 mmol/L 葡萄糖, 33 mmol/L 葡萄糖及 5.5 mmol/L 葡萄糖和 27.5 mmol/L 甘露醇的 DMEM 培养液培养。采用相差倒置显微镜观察细胞生长形态, 采用免疫荧光染色研究诱导型一氧化氮合酶和 3-硝基酪氨酸蛋白表达的变化, 用氯甲基二氯二氢荧光素二乙酯荧光染色检测视网膜色素上皮细胞中活性氧的产生量。

结果与结论: 与对照组相比, 应用含 33 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养基处理视网膜色素上皮细胞 48 h 可见细胞胞体变薄, 形态表现多样, 不规则细胞增多; 高糖培养的视网膜色素上皮细胞诱导型一氧化氮合酶和 3-硝基酪氨酸蛋白表达增加, 活性氧产生明显增多。说明高浓度葡萄糖培养可造成人视网膜色素上皮细胞氧化损伤, 使细胞形态发生变化, 并导致细胞中 3-硝基酪氨酸产生增多。

关键词: 高糖; 活性氧; 诱导型一氧化氮合酶; 3-硝基酪氨酸; 视网膜色素上皮细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.28.038

洪瑾, 帅捷, 袁志兰, 范钦华. 人视网膜色素上皮细胞诱导型一氧化氮合酶和活性氧在高糖状态下的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(28):5281-5284. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

有人提出高血糖导致的自由基损伤是糖尿病性视网膜病变发病机制的中心环节, 阻断这一环节可以阻断糖尿病性视网膜病变发生的其他病理进程^[1-2]。近年来研究发现, 高糖可以促进体外培养的人视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞的细胞表面黏附分子 1 表达^[3], 促进低氧诱导因子 1 α 及血管内皮生长因子蛋白表达增加^[4]。但是高糖能否造成 RPE 细胞氧化损伤? 在高糖培养条件下, RPE

细胞中活性氧和活性氮的表达有何变化, 国内外尚未见报道。课题设计以模拟糖尿病时的高糖状态体外培养人 RPE 细胞, 采用相差倒置显微镜观察高糖对 RPE 细胞生长的影响, 用免疫荧光染色法检测 RPE 细胞中诱导型一氧化氮合酶和 3-硝基酪氨酸 (3-nitrotyrosine, 3-NT) 蛋白表达的变化, 用激光共聚焦显微镜检测 RPE 细胞中活性氧产生量的变化。

1 材料和方法

设计: 细胞对比观察实验。

¹Department of Ophthalmology, the 81 Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China; ²Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China; ³Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Hong Jin★, Master, Attending physician, Department of Ophthalmology, the 81 Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China
hongjin314@163.com

Received: 2011-01-30
Accepted: 2011-03-23

¹解放军第 81 医院眼科, 江苏省南京市 210002;
²南通大学附属医院眼科, 江苏省南通市 226001;
³南京医科大学第一附属医院眼科, 江苏省南京市 210029

洪瑾★, 女, 1983 年生, 江苏省泗洪县人, 硕士, 主治医师, 主要从事青光眼方面的研究。
hongjin314@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)28-05281-04

收稿日期: 2011-01-30
修回日期: 2011-03-23
(20110130008/YJ·S)

时间及地点: 实验于2006-10/2007-06在南京医科大学生理实验室完成。

材料:

细胞: ARPE-19细胞, 为人视网膜色素上皮细胞系细胞, 购自美国ATCC公司。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM 培养基, 胰蛋白酶	美国 Gibco 公司
胎牛血清	美国 Hyclone 公司
D-葡萄糖, D-甘露醇	美国 Sigma 公司
荧光染料 CM-H2DCFDA	美国 Molecular Probe 公司
诱导型一氧化氮合酶单克隆抗体, 3-NT 单克隆抗体	美国 Upstate 公司
ECL 化学发光底物	美国 Bio-Rad 公司
FITC 和 Cy3 标记的二抗	武汉博士德生物工程公司
倒置显微镜	日本 Olympus 公司

方法:

细胞培养: 参考ARPE-19细胞说明书, 用培养液为含5.5 mmol/L葡萄糖、体积分数10%胎牛血清、 1×10^6 U/青霉素和100 mg/L链霉素的Dulbecco改良Eagle培养基, 置于37 °C、体积分数5%CO₂孵箱内培养。

实验分组: 细胞置于含5.5 mmol/L葡萄糖的DMEM培养液中培养后, 弃除培养液, 用PBS液漂洗2次后, 细胞分成对照组: 用含5.5 mmol/L葡萄糖的DMEM培养液; 高糖组: 用含33 mmol/L葡萄糖的DMEM培养液; 甘露醇组: 用含5.5 mmol/L葡萄糖和27.5 mmol/L甘露醇的DMEM培养液, 作为渗透压对照。各组均继续培养48 h, 于倒置显微镜下观察细胞形态。

免疫荧光染色检测诱导型一氧化氮合酶和3-NT蛋白表达: 取各组细胞爬片, 用预冷的PBS漂洗3 min×3次, 甲醇-20 °C固定20 min, PBS漂洗3 min×3次; 滴加1%牛血清清蛋白, 置湿盒内室温封闭30 min, 弃去封闭液, 不洗; 滴加诱导型一氧化氮合酶和3-NT单克隆抗体(1 : 100), 湿盒内4 °C过夜, PBS漂洗3 min×3次; 滴加生物素化的羊抗鼠IgG(1 : 200), 湿盒内37 °C孵育45 min, PBS漂洗3 min×3次; 再滴加链霉菌抗生物素蛋白标记的德克萨斯红, 37 °C避光孵育45 min, PBS漂洗3 min×3次, 缓冲甘油封固。同时设PBS替代一抗的空白对照和正常羊血清替代一抗的替代对照。免疫荧光显微镜下观察并拍照, 每组细胞取6份标本。Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件(美国Media Cybernetics公司)计算每平方毫米细胞面积平均荧光强度。

线粒体活性氧检测: 各组细胞用预冷的PBS漂洗3 min×3次, 滴加10 μmol/L的氯甲基二氯二氢荧光素二乙酯0.5 mL, 置于37 °C培养箱中避光孵育45 min, 吸除染液, PBS冲洗3遍, 最后加入0.5 mL PBS待测。激

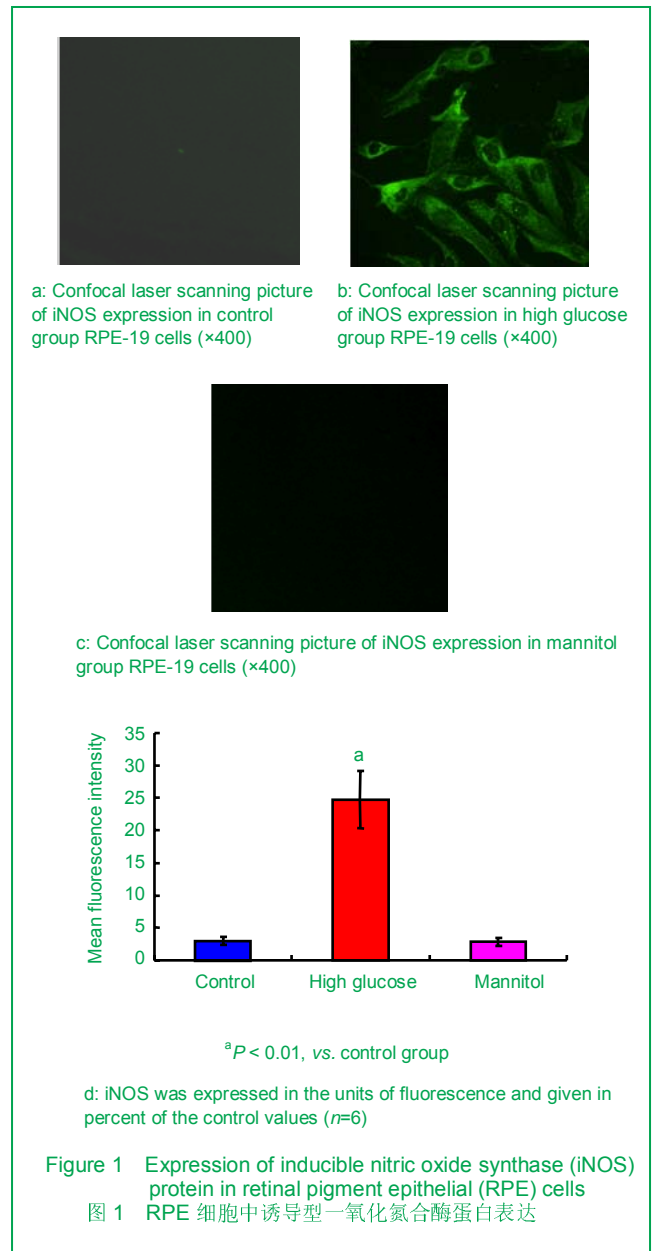
光扫描共聚焦显微镜观察记录各组细胞内活性氧水平。激发波长488 nm, 发射波长为525 nm。Image-Pro Plus 6.0图像分析软件计算每平方毫米细胞面积平均荧光强度。每组细胞取6份标本。

主要观察指标: RPE细胞中诱导型一氧化氮合酶和3-NT蛋白表达及活性氧的产生量。

统计学分析: 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 12.0统计软件对数据进行统计分析, 对多组均数比较采用单因素方差分析, 并通过Student-Newman-Keuls行多个样本均数间两两比较; 对两组均数比较采用非配对t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

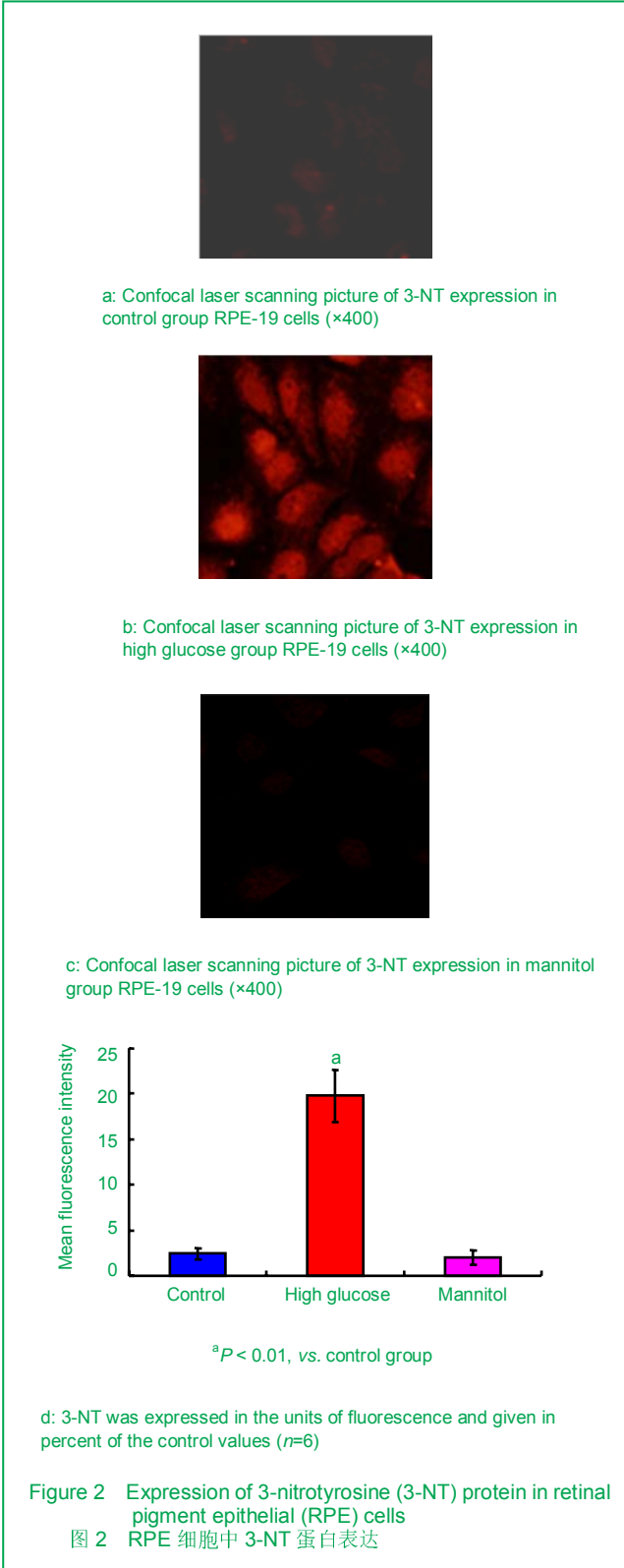
2 结果

2.1 RPE细胞中诱导型一氧化氮合酶蛋白表达免疫荧光染色结果 见图1。

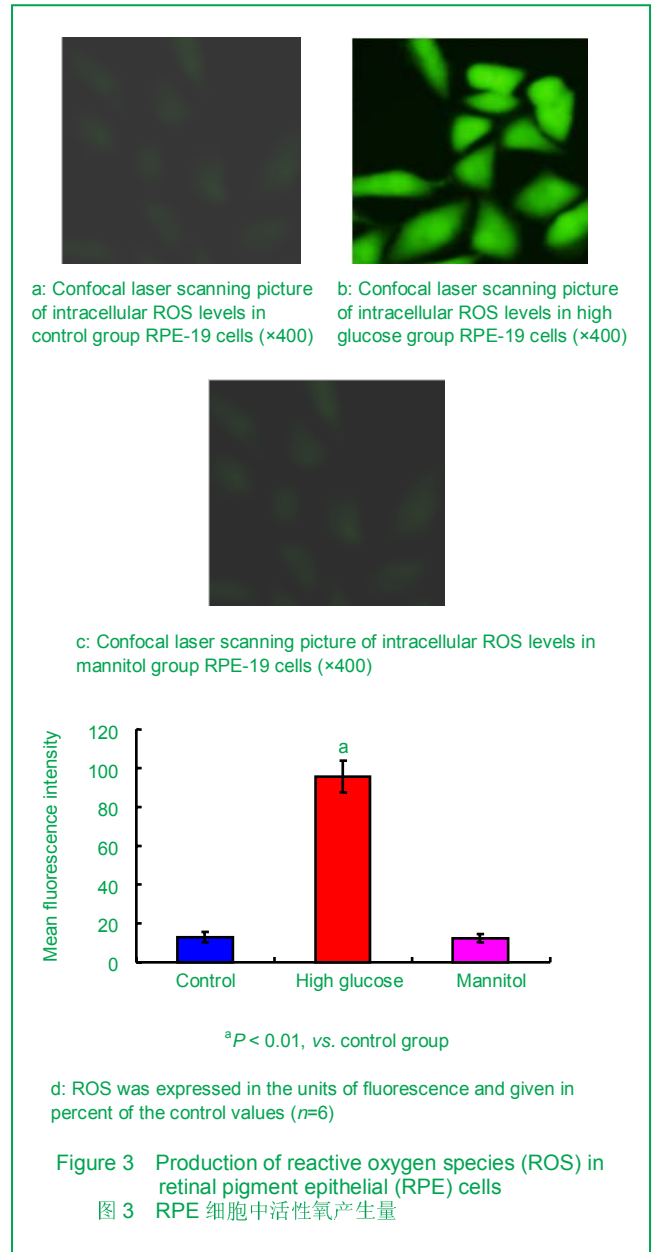


对照组和甘露醇组中均未见明显诱导型一氧化氮合酶蛋白表达; 与对照组相比, 高糖组诱导型一氧化氮合酶蛋白表达量明显增加($P < 0.01$)。

2.2 RPE 细胞中 3-NT 蛋白表达免疫荧光染色结果
对照组和甘露醇组中均未见明显 3-NT 蛋白表达; 与对照组相比, 高糖组 3-NT 蛋白表达量明显增加($P < 0.01$), 见图 2。



2.3 高糖条件下 RPE 细胞中活性氧的变化 细胞活性氧产生通过 CM-H2DCFDA 荧光标记实现。结果显示, 与对照组比较, 高糖组细胞内活性氧的产生明显增多, 为正常对照组的 7.48 倍($P < 0.01$), 见图 3。



3 讨论

高糖是糖尿病性视网膜病变的主要致病因素, 控制血糖水平可以影响糖尿病性视网膜病变的发生发展已是无可争议的^[5]。体外研究显示, 高糖具有细胞毒性, Abe 等^[6]观察到高糖可使细胞增长受到抑制, 可以促进血管内皮细胞和周细胞凋亡, 而 Lee 等^[7]进一步证实高糖作用下小鼠心脏内皮细胞间连接蛋白减少, 使细胞形状发生改变, 可造成大分子物质的渗漏。

人体内的一氧化氮合酶目前发现并定名的有 3 类,

神经型一氧化氮合酶, 内皮型一氧化氮合酶和诱导型一氧化氮合酶^[8-10]。其中, 诱导型一氧化氮合酶存在于Muller细胞及RPE细胞, 产生的一氧化氮长期大量释放则参与病理生理中的细胞毒作用^[11-14]。本实验结果显示, 在正常培养条件下, RPE细胞中诱导型一氧化氮合酶几乎不表达; 而在高糖培养条件下, RPE细胞中诱导型一氧化氮合酶表达显著升高, 从而可生成过量的一氧化氮。

3-NT是目前公认的组织中过氧亚硝基阴离子生成的一个稳定的生物学标识物及酪氨酸硝基化的标志, 3-NT可作为这种过度氧化活动的化学标记物, 应用免疫荧光方法检测RPE细胞中3-NT的含量可以间接反映组织中一氧化氮和超氧阴离子的含量, 反应细胞氧化损伤的程度和状态^[15-16]。本文结果显示, 在正常培养条件下, RPE细胞中几乎没有3-NT表达; 而在高糖培养条件下, RPE细胞中3-NT表达量显著升高, 显示此时RPE细胞已经受到了氧化损伤。据此, 推测RPE细胞损伤的机制可能为高糖刺激RPE细胞产生过量的一氧化氮和活性氧, 二者可快速反应生成过氧亚硝基阴离子, 造成细胞氧化损伤。

活性氧是一种化学性质较氧分子更活泼的小分子物质^[17], 过多的活性氧自由基一方面可以和一氧化氮反应生成过氧亚硝基阴离子, 另一方面也可以直接攻击靶器官造成组织器官损伤以及生物大分子如DNA、RNA、蛋白质和脂肪的结构破坏^[18]。本实验中, 细胞内活性氧检测通过氯甲基二氯二氢荧光素二乙酯荧光标记实现, 氯甲基二氯二氢荧光素二乙酯可以通过细胞膜快速进入细胞, 当细胞内存在活性氧时, 无荧光的氯甲基二氯二氢荧光素二乙酯可立即被氧化成有荧光的二氯二氢荧光素, 其荧光强度与细胞内的活性氧生成量成正比, 因此用于检测活性氧的产生。本次实验表明, 高糖培养的RPE细胞内活性氧产生明显增多。有研究发现, RPE细胞氧化损伤的主要靶细胞器是线粒体, 其损伤水平取决于活性氧的量^[19-20]。RPE细胞线粒体DNA对活性氧介导的损伤非常敏感, 而RPE细胞中线粒体DNA的损伤又可以使活性氧的产生增加及电子转运减少, 如此循环进一步加重了RPE细胞功能障碍^[21-22]。据此, 高糖刺激RPE细胞产生大量活性氧, 同时使其抗氧化能力下降, 除了与一氧化氮反应生成ONOO⁻造成细胞损伤外, 还可能直接通过损伤线粒体造成细胞损伤。这种改变有可能是一种始动因素继而通过多种途径导致糖尿病性视网膜病变的发生。

综上所述, 高浓度葡萄糖培养可造成人RPE细胞氧化损伤, 使细胞形态和活力发生变化, 并导致细胞中3-NT产生增多。损伤的机制可能为高糖刺激RPE细胞产生大量活性氧, 并使诱导型一氧化氮合酶的表达增加, 生成过量的一氧化氮, 过量的活性氧和一氧化氮可以通过细胞毒作用和细胞抑制作用造成细胞损伤, 参与糖尿病性视网膜病变的发生发展。因此, 通过针对自由基的靶向性抗氧化剂对抗活性氧上述自由基的作用有可能成为糖尿病性视网

膜病变治疗的靶点, 有待于今后进一步研究。

4 参考文献

- [1] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-820.
- [2] Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000;404(6779):787-790.
- [3] Han XX, Hui YN, Song HP, et al. Guoji Yanke Zazhi. 2006;6(2):317-321.
韩小霞, 惠延年, 宋虎平, 等. 高浓度葡萄糖对培养的人视网膜色素上皮细胞细胞表面黏附分子-1的影响[J]. 国际眼科杂志, 2006, 6(2):317-321.
- [4] Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 2001;276(47):43836-43841.
- [5] Kerner W. The UK Prospective Diabetes Study. *Lancet*. 1998;352(9144):1934.
- [6] Abe M, Ono J, Sato Y, et al. Effects of glucose and insulin on cultured human microvascular endothelial cells. *Diabetes Res Clin Pract*. 1990;9(3):287-295.
- [7] Lee HZ, Yeh FT, Wu CH. The effect of elevated extracellular glucose on adherens junction proteins in cultured rat heart endothelial cells. *Life Sci*. 2004;74(17):2085-2096.
- [8] Hall AV, Antoniou H, Wang Y, et al. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *J Biol Chem*. 1994;269(52):33082-33090.
- [9] Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, et al. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;198(3):1027-1033.
- [10] Marsden PA, Heng HH, Duff CL, et al. Localization of the human gene for inducible nitric oxide synthase (NOS2) to chromosome 17q11.2-q12. *Genomics*. 1994;19(1):183-185.
- [11] Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection—how, why, when, and where? *Nitric Oxide*. 1997;1(2):107-120.
- [12] Berkowitz BA, Luan H, Gupta RR, et al. Regulation of the early subnormal retinal oxygenation response in experimental diabetes by inducible nitric oxide synthase. *Diabetes*. 2004;53(1):173-178.
- [13] Carmo A, Cunha-Vaz JG, Carvalho AP, et al. Nitric oxide synthase activity in retinas from non-insulin-dependent diabetic Goto-Kakizaki rats: correlation with blood-retinal barrier permeability. *Nitric Oxide*. 2000;4(6):590-596.
- [14] Takeda M, Mori F, Yoshida A, et al. Constitutive nitric oxide synthase is associated with retinal vascular permeability in early diabetic rats. *Diabetologia*. 2001;44(8):1043-1050.
- [15] Ceriello A. Nitrotyrosine: new findings as a marker of postprandial oxidative stress. *Int J Clin Pract Suppl*. 2002;(129):51-58.
- [16] Yuan Z, Feng W, Hong J, et al. p38MAPK and ERK promote nitric oxide production in cultured human retinal pigmented epithelial cells induced by high concentration glucose. *Nitric Oxide*. 2009;20(1):9-15.
- [17] Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care*. 2003;26(5):1589-1596.
- [18] Swindle EJ, Metcalfe DD. The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes. *Immunol Rev*. 2007;217:186-205.
- [19] Ballinger SW, Van Houten B, Jin GF, et al. Hydrogen peroxide causes significant mitochondrial DNA damage in human RPE cells. *Exp Eye Res*. 1999;68(6):765-772.
- [20] Cui Y, Xu X, Bi HS. *Zhonghua Yanke Zazhi*. 2006;42(2):131-138.
崔彦, 许讯, 毕宏生. 高糖对牛视网膜微血管内皮细胞和周细胞线粒体活性氧的影响[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(2):131-138.
- [21] Liang FQ, Godley BF. Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. 2003;76(4):397-403.
- [22] Yu T, Jhun BS, Yoon Y. High-glucose stimulation increases reactive oxygen species production through the calcium and mitogen-activated protein kinase-mediated activation of mitochondrial fission. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(3):425-437.

来自本文课题的更多信息—

作者贡献: 洪瑾进行实验设计, 实施为洪瑾、帅捷, 实验评估为洪瑾、袁志兰, 资料收集为洪瑾、帅捷, 洪瑾成文, 袁志兰、范钦华审核, 洪瑾对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。