

【实验研究】

司艳芳 樊旭 关娟 周历 赵娟

um, RPE) 细胞。研究发现, RPE 细胞的增生与 PVR 发病机制相关^[2-5]。非转移性黑色素瘤糖蛋白 B (glycoprotein nonmetastatic melanoma protein b, GPN-MB) 是一种 I 型跨膜糖蛋白^[6], 广泛表达于多种组

织^[7]。研究表明 GPNMB 与多种疾病的生理、病理过程相关^[8]。但尚未有文献报道 GPNMB 对 RPE 细胞生物学功能的影响。因此,本研究采用免疫荧光、酶联免疫吸附试验、MTT 等方法,检测 GPNMB 在不同病变程度 PVR 中的定量表达以及 GPNMB 对 RPE 细胞增殖、细胞周期的影响,拟在探讨 GPNMB 在 PVR 病变中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料来源 收集解放军 309 医院在 2012 年 1 月至 12 月确诊的 18 例 PVR 患者的视网膜表面增生膜。患者年龄 15~60 岁。PVR 病变程度分级标准参照 1991 年美国视网膜学会的分级方法,分为 A、B、C 3 级。

1.2 主要仪器及试剂 CO₂ 细胞培养箱 (Binder 公司,德国),酶联免疫检测仪 (Sheldon 公司,美国),流式细胞仪 (Olympus,日本),激光共聚焦显微镜 (Bio-Rad 公司,美国)。限制性内切酶 EcoRI、XhoI, T4 连接酶, RNA 酶, 胰蛋白酶 (Takara, 大连), LipofectamineTM RNAiMAX, 载体 pMD19-T、pcDNA3.1 (+) (Invitrogen, 美国), 抗 GPNMB 抗体、抗生物素标记的 Texas Red、FITC 标记的膜联蛋白 (Abcam, 美国), M254 培养基、G418、MTT、碘化吡啶 (GIBCO BRL, 美国)。

1.3 引物及 siRNA GPNMB-P₁: 5'-AACCTTGAGT-GCCTGCGTC-3', GPNMB-P₂: 5'-ACTT-CCCCAAAC-CACAATATCTA-3'; GPNMB-P₃: 5'-CCGGAATTCAT-GGAATGTCTCTACTATTTCTGCGGAT-3', 含 EcoRI 酶切位点; GPNMB-P₄: 5'-CCGCTCGAGTCATTAAGA-AACTCCTTTAAATTCCTTG-3', 含 XhoI 酶切位点。靶向 GPNMB 的 siRNA 序列: GPNMB (sense: 5'-GGGCAAUGAAAGACCUUCUTT-3', antisense: 5'-AGAAGGUCUUUCAUUGCCCTT-3')。所有引物均由上海生工合成。

1.4 方法

1.4.1 免疫荧光 石蜡标本常规脱蜡,进行如下操作:滴加正常羊血清 (1:50 稀释),室温温育 30 min;漂洗后与抗 GPNMB (1:50 稀释)一抗于 4℃ 孵育过夜;漂洗后与生物素标记的二抗 (1:50 稀释)在 37℃ 温育 30 min;最后滴加抗生物素标记的 Texas Red (1:1000 稀释),于 37℃ 放置 30 min。磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 漂洗后用甘油封片,于激光共聚焦显微镜下观察并进行定量分析。同时设有 PBS 替代一抗的空白对照。

1.4.2 酶联免疫吸附试验 于患者玻璃体切割术前抽取 3 mL 静脉血,离心取血清 -20℃ 保存。采用酶联免疫吸附试剂盒检测血清中 GPNMB 的含量。以我院检验科健康成年查体者作对照,抽血离心取血清 -20℃ 保存。

1.4.3 人 RPE 细胞的分离及培养 摘取尸眼球,

将眼球放入含 200 mg · L⁻¹ 庆大霉素的 RPMI1640 培养液中,自角膜缘后 5 mm 环形剪开眼球壁,弃眼球前段,在解剖显微镜下切除、吸净玻璃体,用 D-Hank 液清洗眼杯 2 次,加入 215 kU · L⁻¹ 透明质酸酶和 1.25 g · L⁻¹ 胰蛋白酶混合液,置于 37℃ 孵箱中消化 3 min,弃酶混合液,仔细分离神经上皮层,于视盘周围将其剪除,继以 2.5 g · L⁻¹ 胰蛋白酶加入眼杯中,置于 37℃ 孵箱中消化 70 min,取出眼杯,用吸管轻轻吹打使细胞脱落,收集 RPE 细胞悬液;6000 r · min⁻¹ 离心 15 min,弃上清液,将细胞悬浮于培养液中,然后接种于培养瓶,于 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.4.4 真核表达载体的构建 以实验室保存的 GPNMB 序列为模板,以 GPNMB-P₁、GPNMB-P₂ 引物扩增 GPNMB 目的片段,与 pMD19-T 载体在 16℃ 条件下进行连接反应,并将连接产物转化于感受态大肠杆菌 DH5α,培养后进行筛选,挑选阳性菌落摇菌并提取质粒,电泳鉴定后获得重组质粒 pMD19T-GPNMB。以重组质粒为模板,以 GPNMB-P₃、GPNMB-P₄ 为引物,扩增 GPNMB 编码区序列,扩增产物以 EcoRI、XhoI 双酶切,并用 T4 DNA 连接酶将其与经相同酶切的真核表达载体 pcDNA3.1 (+) 连接,筛选获得重组表达载体 pcDNA3.1 (+)-GPNMB。

1.4.5 转染 按每孔 50 × 10³ 个 RPE 细胞接种至 24 孔培养板中,待其长至 50% 融合时按脂质体 L2000 的操作说明进行转染。具体方法:加入 100 μL 无血清 M254 培养基 (内含 siRNA 6 pmol, Lipofectamine 1 μL),混匀后于体积分数 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱中孵育,24 h 后经 G418 筛选,获得稳定表达 GPNMB 的 RPE 细胞。

1.4.6 细胞增殖实验 将 RPE 细胞接种于 96 孔培养板上,置于 37℃、体积分数 5% CO₂ 孵箱中培养 48 h。将实验分为对照组、GPNMB 转染组及空载体转染组,2.5 g · L⁻¹ 胰蛋白酶消化各组 RPE 细胞,吸去胰蛋白酶,加入正常培养液继续培养 60 min。每孔加入 MTT 溶液 (5 g · L⁻¹) 20 μL,继续孵育 4 h,弃上清,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min 后进行比色测定,酶联免疫检测仪在 490 nm 波长下读取 OD 值。

1.4.7 细胞周期实验 PBS 洗涤 RPE 细胞 1 次,加 FITC-Annexin-V (fluorescein isothiocyanate-Annexin-V),室温避光放置 20 min, PBS 洗涤 2 次,加 500 μL 甲醛,冰浴 25 min, PBS 洗涤 2 次,加入含有 10 mg · L⁻¹ 碘化吡啶和 1 g · L⁻¹ RNA 酶的 PBS 缓冲液,室温避光孵育 20 min,待流式细胞仪检测。空白对照组采用培养基假诱导^[9]。

1.5 统计学分析 以 SPSS 11.0 统计分析软件进行统计,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GPNMB 在 PVR 增生膜中的表达 运用计算机分析系统对 PVR 增生膜中 GPNMB 的荧光量作定量分析。结果如图 1 所示, A 级 PVR 的增生膜中 GPNMB 阳性荧光总量为 5.07, 而 B 级膜中 GPNMB 荧光总量为 11.21, C 级膜中 GPNMB 荧光总量为 19.34。该结果表明了 PVR 病变程度越高, GPNMB 的荧光强度越强, 因此, 我们推断 GPNMB 与 PVR 疾病有着密切的关系。

Figure 1 Expression of GPNMB in PRM of PVR (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) GPNMB 在 PVR 增生膜中的表达 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

2.2 GPNMB 在 PVR 患者血清中的表达 为了进一步验证免疫荧光实验的结果, 我们采用酶联免疫吸附试验法检测了 PVR 患者血清中的 GPNMB 含量。结果如图 2 所示, 与正常人血清中 GPNMB 的含量相比, PVR 患者血清中 GPNMB 的含量有显著上

升, 该结果表明 GPNMB 可以作为 PVR 患者血清的生物标志物用于 PVR 疾病的诊断。

Figure 2 Expression of GPNMB in the serums of patients with PVR GPNMB 在 PVR 患者血清中的表达水平

2.3 GPNMB 对 RPE 细胞增殖的影响 RPE 细胞是 PVR 病理过程的关键因素之一, 因此我们研究了 GPNMB 对 RPE 细胞的作用, 这对进一步研究 PVR 的发病机制有着重要意义。通过 MTT 法测定各组反应细胞数的 OD 值, 结果如图 3 所示, 与对照组相比, 空载体转染组基本无变化, GPNMB 转染组则可以显著促进 RPE 细胞的增殖, 其 OD 值是对照组的 3.7 倍, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 然后以 GPNMB 过表达的人 RPE 细胞为研究对象, 加入 GPNMB-siRNA 观察它对 RPE 细胞增殖的影响, 结果表明 GPNMB-siRNA 转染组可以显著抑制 RPE 细胞的增殖($P < 0.05$)。该结果说明了 GPNMB 在 RPE 细胞增殖过程中起着重要作用。

Figure 3 Effects of GPNMB on proliferation of RPE cells. A: Overexpression-GPNMB could significantly promote the proliferation of RPE cells; B: GPNMB-specific siRNA could obviously inhibit the proliferation of RPE cells treated with overexpression-GPNMB GPNMB 对 RPE 细胞增殖的影响。A: GPNMB 过表达可以显著促进 RPE 细胞的增殖; B: 特异性的 GPNMB-siRNA 可以显著抑制 GPNMB 过表达处理的 RPE 细胞的增殖

2.4 GPNMB 对 RPE 细胞周期的影响 细胞周期与细胞增殖有着密切的联系, 因此我们推断 GPNMB 可能通过调控 RPE 细胞周期来促进其增殖。GPNMB 处理无血清培养的 RPE 细胞 24 h 后, 流式细胞仪检测 GPNMB 转染对细胞周期的影响。结果如图 4 所示, 与对照组相比, GPNMB 过表达及 siRNA 对细胞周期均有显著影响, 因此, GPNMB 通过细胞周

期调控途径促进 RPE 细胞的增殖。

3 讨论

PVR 是一种以细胞增生及牵拉性视网膜脱离为特征的眼部疾患; 是孔源性视网膜脱离和眼外伤最严重的并发症, 常常引起失明和眼球萎缩。它的基本病理过程是眼内细胞, 包括 RPE 细胞、神经胶质

Figure 4 Effects of GPNMB on RPE cells cycle. A: Image of RPE cells cycle; B: GPNMB-siRNA could decrease the percentage of S phase of RPE cells cycle; C: GPNMB-overexpression could increase the percentage of S phase of RPE cells cycle GPNMB 对 RPE 细胞周期的影响。A: RPE 细胞周期图; B: GPNMB-siRNA 可降低 RPE 细胞周期 S 期细胞的百分比; C: GPNMB 过表达可增加 RPE 细胞周期 S 期细胞的百分比

细胞和成纤维细胞样细胞等移行进入玻璃体内;黏附在玻璃体视网膜界面上,增生产生细胞外基质,在玻璃体内及视网膜表面形成有收缩能力的膜;膜收缩牵拉视网膜脱离,视力丧失^[10]。GPNMB 作为一种糖基化的跨膜蛋白,参与了多种细胞的生理功能。最近研究表明 GPNMB 在多种细胞的增生过程中起到重要作用^[11-13],因此,本文研究了 GPNMB 与 PVR 的关系以及 GPNMB 对 RPE 细胞的作用。

免疫荧光结果显示,PVR 增生膜的病变程度越高,GPNMB 的荧光强度越强,该结果表明了 GPNMB 与 PVR 疾病的发展过程可能有着密切的联系。为了验证 GPNMB 与 PVR 疾病有关系,我们采用酶联免疫吸附试验比较了正常人与 PVR 患者血清中 GPNMB 的含量,结果表明 PVR 患者血清中 GPNMB 的含量远高于对照组,由此我们推测 GPNMB 可以作为 PVR 患者血清的生物标志,用于 PVR 疾病的诊断。PVR 的发病机制主要是与 RPE 细胞的病理性增生相关,结合 GPNMB 在 RPE 细胞中有表达,我们推测 GPNMB 对 RPE 细胞的增生可能起着一定的作用。本实验我们构建了 GPNMB 的 siRNA 以及过表达载体,采用转染的方法将其转入 RPE 细胞,然后采用 MTT 法检测 GPNMB 对 RPE 细胞增殖的影响。结果表明 GPNMB-siRNA 可以显著抑制 RPE 细胞的增殖,而 GPNMB 过表达则会显著促进其增殖,由此我们推测 GPNMB 可能是 RPE 细胞的一个调控分子,影响着它的增生,进而导致 PVR 的发展。流式细胞仪测定 RPE 细胞周期结果显示,GPNMB 转染组的 S 期细胞比例与无血清培养的对照组相比有明显的增加,而 GPNMB-siRNA 转染组则显著减少,进一步印证了 MTT 的实验结果。

综上所述,GPNMB 作为 PVR 中的一个关键分子,通过细胞周期调控途径影响 RPE 细胞的增殖,但其具体作用机制还有待于进一步研究,这为 PVR 的预防及治疗提供了有益的思路。

参考文献

- 1 惠延年.增生性玻璃体视网膜病变:带入 21 世纪的课题[J].中华眼底病杂志,1999,15(2):67-68.
- 2 Lu B, Malcuit C, Wang S, Girman S, Francis P, Lemieux L, et al. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration [J]. *Stem Cells*, 2009, 27 (9): 2126-2135.
- 3 Carr AJ, Vugler A, Lawrence J, Chen LL, Ahmado A, Chen FK, et al. Molecular characterization and functional analysis of phagocytosis by human embryonic stem cell-derived RPE cells using a novel human retinal assay [J]. *Mol Vis*, 2009, 15 (3): 283-295.
- 4 Chuang JZ, Chou SY, Sung CH. Chloride intracellular channel 4 is critical for the epithelial morphogenesis of RPE cells and retinal attachment [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21 (17): 3017-3028.
- 5 Lewis GP, Matsumoto B, Fisher SK. Changes in the organization and expression of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachment [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995, 36 (12): 2404-2416.
- 6 Rose AAN, Grosset AA, Dong Z, Russo C, MacDonald PA, Bertos NR, et al. Glycoprotein nonmetastatic B is an independent prognostic indicator of recurrence and a novel therapeutic target in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16 (7): 2147-2156.
- 7 Hoashi T, Sato S, Yamaguchi Y, Passeron T, Tamaki K, Hearing VJ. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein b, a melanocytic cell marker, is a melanosome-specific and proteolytically released protein [J]. *FASEB J*, 2010, 24 (5): 1616-1629.
- 8 Tomihari M, Hwang SH, Chung JS, Cruz Jr PD, Ariizumi K. Gpnmb is a melanosome-associated glycoprotein that contributes to melanocyte/keratinocyte adhesion in a RGD-dependent fashion [J]. *Exp Dermatol*, 2009, 18 (7): 586-595.
- 9 Okazawa M, Shiraki T, Ninomiya H, Kobayashi S, Masaki T. Endothelin-induced apoptosis of A375 human melanoma cells [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (20): 12584-12592.
- 10 Wang C, Cao GF, Jiang Q, Yao J. TNF- α promotes human retinal pigment epithelial (RPE) cell migration by inducing matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression through activation of Akt/mTORC1 signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 425 (1): 33-38.
- 11 Rose AAN, Siegel PM. Emerging therapeutic targets in breast cancer bone metastasis [J]. *Future Oncol*, 2010, 6 (1): 55-74.
- 12 Xiao Y, Qiao Z, Zhang X, Liu Z, Xie J, Hao Y, et al. Expression of glycoprotein non-metastatic melanoma protein B in prostate cancer and its significance [J]. *Health Sci*, 2011, 43 (4): 496-499.
- 13 Zhang P, Liu W, Zhu C, Yuan X, Liu D, Gu W, et al. Silencing of GPNMB by siRNA inhibits the formation of melanosomes in melanocytes in a MITF-independent fashion [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (8): e42955.