

◆ 引文格式: 司艳芳, 樊旭, 关娟, 周历, 赵娟. 非转移性黑色素瘤糖蛋白B在增生性玻璃体视网膜病变及视网膜色素上皮细胞中的作用[J]. 眼科新进展, 2014, 34 (2): 131-134. doi:10.13389/j.cnki.rao.2014.0033

【实验研究】

非转移性黑色素瘤糖蛋白B在增生性玻璃体视网膜病变及视网膜色素上皮细胞中的作用

司艳芳 樊旭 关娟 周历 赵娟

Roles of GPNMB in proliferative vitreoretinopathy and human retinal pigment epithelial cells

SI Yan-Fang, FAN Xu, GUAN Juan, ZHOU Li, ZHAO Juan

[Key words] glycoprotein nonmetastatic melanoma protein b; proliferative vitreoretinopathy; retinal pigment epithelial cell; proliferation

[Abstract] **Objective** To investigate the roles of glycoprotein nonmetastatic melanoma protein b (GPNMB) in proliferative vitreoretinopathy (PVR) and human retinal pigment epithelial (RPE) cells. **Methods** Firstly, 18 specimens of retina were obtained during vitrectomy of patients suffered with different grades of PVR. Then GPNMB expression in periretinal membrane (PRM) was quantified by immunofluorescence. GPNMB content in the serums of patients with PVR was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Then, siRNA and overexpression vectors of GPNMB were constructed, and transfected into human RPE cells. MTT assay and flow cytometry were used to determine the effects of GPNMB on RPE cell proliferation and cell cycle. **Results** Immunofluorescence showed that GPNMB fluorescence intensity increased, as the PRM progresses. The total positive fluorescent quantities of GPNMB were 5.07, 11.21 and 19.34 in membrane of PVR with stage A, B and C, respectively. The results of ELISA demonstrated that GPNMB content in the serum of patient was obviously higher than control group. MTT assay showed that GPNMB-overexpression could significantly promote the proliferation of RPE cells, and the value of OD was 3.7 times, as compared with the control group. And, GPNMB-siRNA could inhibit the proliferation of RPE cells transfected with GPNMB-overexpression. Furthermore, cell cycle was significantly influenced by GPNMB, according to flow cytometry. **Conclusion** As a crucial molecule in RPE cells, GPNMB has a dominant effect on the proliferation of RPE cells through cell cycle signaling pathway, which lay the foundation for studying the role and mechanism of GPNMB in PVR.

[*Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34 (2) :131-134*]

【关键词】 非转移性黑色素瘤糖蛋白B; 增生性玻璃体视网膜病变; 视网膜色素上皮细胞; 增殖

【摘要】 目的 研究非转移性黑色素瘤糖蛋白B(glycoprotein non-metastatic melanoma protein b, GPNMB)在增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)及视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞中的作用。方法 首先,采用免疫荧光法对18例PVR患者行玻璃体切除术时切除的视网膜进行定量分析;酶联免疫吸附试验检测PVR患者血清中GPNMB的含量;然后,以人RPE细胞为研究对象,构建GPNMB的siRNA以及过表达载体,转染入细胞后采用MTT法和流式细胞仪观察其对RPE细胞增殖、细胞周期的影响。结果 免疫荧光实验表明,随着PVR增生膜病变程度的加重,其GPNMB的荧光强度加强,A、B、C级PVR的增生膜中GPNMB阳性荧光总量分别为5.07、11.21、19.34;酶联免疫吸附试验结果显示,PVR患者血清中GPNMB的含量远高于对照组;细胞增殖实验结果表明,GPNMB过表达可以显著促进RPE细胞的增殖,其OD值是对照组的3.7倍;然后以GPNMB过表达的人RPE细胞为研究对象,结果表明GPNMB-siRNA转染组可以显著抑制RPE细胞的增殖;流式细胞仪检测发现GPNMB对RPE细胞周期有显著影响。结论 GPNMB作为RPE细胞中的一个关键分子,通过细胞周期调控途径影响其增殖,为进一步研究GPNMB在PVR中的作用及机制奠定了基础。

[*眼科新进展, 2014, 34 (2) :131-134*]

增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)是裂孔源性视网膜脱离手术失败常见的原因^[1]。在PVR膜的细胞成分中最重要的细胞之一是视网膜色素上皮(retinal pigment epitheli-

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, GPNMB)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-GCCTGGTC-3'; GPNMB-P₂: 5'-ACTT-CCCCAAAC-CACAATATCTA-3'; GPNMB-P₃: 5'-CCGGAATTCAT-GGAATGTCTACTATTCCTGGAT-3', 含 EcoRI 酶切位点; GPNMB-P₄: 5'-CCGCTCGAGTCATTAAGA-AACTCCITAAATTCTTG-3', 含 XhoI 酶切位点。靶向 GPNMB 的 siRNA 序列: GPNMB (sense: 5'-GGGCAAUGAAAGACCUUCUTT-3', antisense: 5'-AGAAGGUCUUUCAUUGCCCIT-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 °C 孵育过夜;漂洗后与生物素标记的二抗(1:50 稀释)在 37 °C 温育 30 min;最后滴加抗生物素标记的 Texas Red(1:1000 稀释),于 37 °C 放置 30 min。磷酸盐缓冲液(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 °C 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 °C 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 °C 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 °C 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 °C、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 °C 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 DH5 α ,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 °C 恒温培养箱中孵育,24 h 后经 C418 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 °C、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。

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 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

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, Ahmad 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 Tomiari 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.