

高糖对人视网膜色素上皮细胞 syndecan-1 表达的影响

韩小霞¹, 王静波²

[摘要] **目的:**检测高糖对视网膜色素上皮(RPE)细胞 syndecan-1 表达的影响。**方法:**25 mmol/L 高糖刺激人 RPE 细胞 4 h、12 h 和 24 h, 分别采用免疫组织化学和蛋白印迹法检测细胞 syndecan-1 蛋白的表达, 采用实时定量聚合酶链反应检测 syndecan-1 mRNA 的表达。**结果:**高糖刺激后, RPE 细胞排列紊乱, 细胞体变长变大, 脱落细胞多见。正常 RPE 细胞表达 syndecan-1, 且定位于细胞质。高糖刺激 4 h, RPE 细胞 syndecan-1 的蛋白和 mRNA 表达开始下降, 12 h 时表达降至最低, 24 h 时 syndecan-1 的表达基本回复至正常水平($P < 0.01$)。**结论:**高糖可短暂下调 RPE 细胞 syndecan-1 蛋白和 mRNA 的表达。

[关键词] 视网膜色素上皮细胞; 高血糖; syndecan-1

[中图法分类号] R 771.3

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.12.004

Effect of high glucose on the expression level of syndecan-1 in human retinal pigment epithelial cells

HAN Xiao-xia¹, WANG Jing-bo²

(1. Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, The 93735th Hospital of Chinese PLA, Tianjin 301700;

2. Department of Ophthalmology, The 8th Medical Center of General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the effects of high glucose on the expression level of syndecan-1 in human retinal pigment epithelial (RPE) cells. **Methods:** The RPE cells were treated with 25 mmol/L glucose for 4 h, 12 h and 24 h, respectively. The protein and mRNA expression levels of syndecan-1 were detected using immunohistochemistry staining and Western blot, and quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR), respectively. **Results:** After exposure to high glucose, the RPE cells were arranged in disorder, the cell bodies became longer and larger, the shedding cells were easily seen. The syndecan-1 expression was detected in normal RPE cells, and located in cytoplasm. After 4 h of treatment with high glucose, the expression levels of syndecan-1 protein and mRNA decreased, decreased to the minimum at 12 h, and basically returned to the normal level at 24 h ($P < 0.01$). **Conclusions:** High glucose can transiently down-regulate the syndecan-1 protein and mRNA expression in RPE cells.

[Key words] retinal pigment epithelial cell; high glucose; syndecan-1

糖尿病视网膜病变是糖尿病最常见的微血管并发症之一, 是发达国家和部分发展中国家工作人群致盲的重要原因。2000 年, 全球糖尿病病人达 1.71 亿, 到 2030 年, 全球糖尿病病人预计达到 3.6 亿。目前, 中国糖尿病病人已达 9 240 万, 居世界之首, 而糖尿病视网膜病变患病率达 37%^[1]。因而, 糖尿病视网膜病变机制的研究及其防治是全球眼科学和内分泌专业的学者共同关注的问题。

视网膜屏障功能受损, 是糖尿病视网膜病变发生发展的重要病理基础。视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞是视网膜外屏障的重要组成部分, 其通过细胞间及细胞与基质间的黏附构成的紧密连接在维持视网膜的内环境中发挥重要作用。由于 RPE 细胞的特殊位置, 极易受到高血糖

的影响^[2-3]。syndecan-1 是一种黏附分子, 属于整联蛋白跨膜硫酸肝素蛋白多糖家族成员, 可调控细胞的黏附、移行和增生, 参与组织器官分化发育、血管形成、组织再生、组织损伤修复、炎症、脂质代谢等一系列病理生理过程^[4-6]。syndecan-1 分子可调控 RPE 细胞的黏附、增生和移行^[7], 并参与糖尿病视网膜病变的发生发展^[8-9]。目前, 国内外鲜见高糖对于 RPE 细胞 syndecan-1 表达影响的研究报道。本实验的目的是观察高糖对体外培养的人 RPE 细胞 syndecan-1 表达的影响。现作报道。

1 材料与方法

1.1 材料 主要试剂: 低糖 DMEM 培养基 (含 5.56 mmol/L 葡萄糖)、高糖 DMEM 培养基 (含 25 mmol/L 葡萄糖)、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, 实时定量聚合酶链反应 (PCR) 试剂盒购自美国 Pierce 公司, 胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司, Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司, 反转录试剂盒购自美国

[收稿日期] 2019-03-18 [修回日期] 2019-08-12

[作者单位] 1. 93735 部队医院 五官科, 天津 301700; 2. 解放军总医院第八医学中心体检中心眼科, 北京 100091

[作者简介] 韩小霞 (1976-), 女, 博士, 主治医师。

Promega 公司, syndecan-1 抗体购自美国 santa cruz 公司, β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗、免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。syndecan-1 和 GAPDH 的引物由上海生工生物公司合成。

1.2 细胞培养及刺激 ARPE-19 细胞购自美国种质保藏中心, 细胞的冻存与复苏、鉴定、培养方法见文献[10]。细胞消化后接种于细胞爬片和培养板中, 加入低糖 DMEM 培养液, 待细胞融合近 70% 时, 换为高糖 DMEM 培养液, 分别于培养 0 h、4 h、12 h 和 24 h 时收集细胞, 行 RNA 和蛋白提取。

1.3 免疫组织化学染色 细胞爬片用 95% 乙醇固定 20 min, 一抗为鼠抗人 syndecan-1 单克隆抗体, 二抗为生物素化羊抗鼠 IgG。实验步骤按试剂盒说明书进行, 采用免疫组织化学 SABC 法染色, DAB 显色。同时设 PBS 替代一抗的空白对照。结果判断: 以背景清晰、细胞质呈棕黄色为阳性, 无棕黄色为阴性。

1.4 实时定量 PCR 按 Trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA 并测定浓度, 反转录合成 cDNA。按照说明书加入 cDNA 及混合物在 PCR 仪上进行扩增, 每组设置 3 个复孔。引物序列为: syndecan-1 上游 5'-GGC TGT AGT CCT GCC AGA AG-3', 下游 5'-GTC GTT GAG GCC TGA TGA GT-3'^[4]; GAPDH 上游 5'-CAG GAG GCA TTG CTG A TGAT-3', 下游 5'-GAA GGC TGG GGC TCA TTT-3'。GAPDH 作为内参, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 syndecan-1 mRNA 的相对表达量。

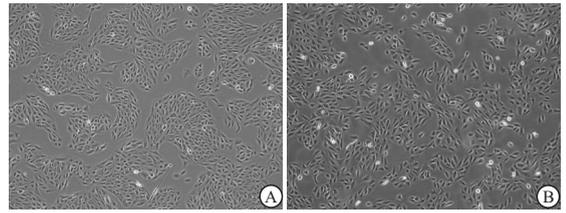
1.5 蛋白印迹法 收集的细胞加入适量的细胞裂解液于冰上反应 15 min, 提取细胞总蛋白。二巯基二喹啉蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。取 30 μ g 总蛋白样品液进行 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 30 mA 恒流转印 4 h。5% 牛血清蛋白溶液室温孵育 1 h, syndecan-1 抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜, 含 0.05% 吐温的三乙醇胺缓冲液洗膜, 辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, 含 0.05% 吐温的三乙醇胺缓冲液洗膜, 增强化学发光显影。

1.6 统计学方法 采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 高糖对 RPE 细胞的生物学性状影响 正常培养的人 RPE 细胞排列规则, 单层生长, 呈多角形, 细胞质透明, 细胞核呈圆形或卵圆形, 核仁明显, 边界清晰(见图 1A)。高糖刺激后, RPE 细胞排列紊乱, 细胞间隙增大、疏松, 细胞体变长变大, 脱落细胞多

见(见图 1B)。



A: 正常组; B: 高糖刺激 12 h

图1 RPE细胞活体照相

2.2 免疫组织化学观察正常 RPE 细胞 syndecan-1 的表达及定位 在未受高糖刺激的正常 RPE 细胞中, syndecan-1 呈阳性表达, 且定位于细胞质(见图 2)。

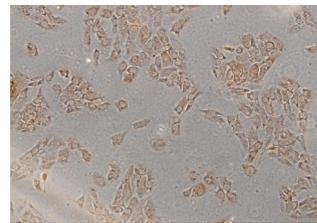


图2 正常RPE细胞syndecan-1免疫组织化学染色阳性

2.3 高糖对 syndecan-1 蛋白表达的影响 高糖刺激 0 h、4 h、12 h 和 24 h, syndecan-1 蛋白的表达水平分别为 0.76 ± 0.03 、 0.65 ± 0.03 、 0.07 ± 0.01 、 0.73 ± 0.02 ; 高糖刺激后, 细胞 syndecan-1 表达开始下降, 于刺激 12 h 时表达降至最低, 于刺激 24 h 时 syndecan-1 的表达基本恢复至正常水平 ($F = 644.31, P < 0.01$) (见图 3)。

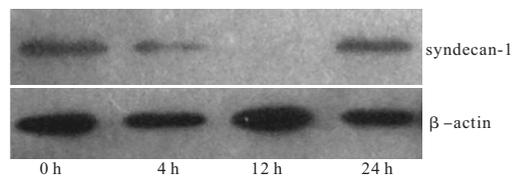


图3 RPE细胞syndecan-1蛋白的表达

2.4 高糖对细胞 syndecan-1 mRNA 表达的影响 高糖刺激 0 h、4 h、12 h 和 24 h, syndecan-1 mRNA 的表达水平分别为 0.73 ± 0.03 、 0.55 ± 0.05 、 0.06 ± 0.01 、 0.67 ± 0.07 , 高糖刺激 4 h 后, RPE 细胞 syndecan-1 mRNA 的表达开始减弱, 于 12 h 时表达降至最低, 随后开始升高并于刺激 24 h 时基本恢复至正常水平 ($F = 157.40, P < 0.01$)。

3 讨论

RPE 位于外层视网膜, 依靠细胞间的紧密连接构成视网膜屏障, 在脉络膜和视网膜细胞之间转运水、电解质和营养物质等。由于 RPE 细胞可转运

大量葡萄糖为视网膜神经感觉层提供能量,因而极易受到血糖波动的影响,发生病理和功能的改变^[11]。研究^[12-13]表明,RPE 细胞是增生性糖尿病视网膜病变增殖膜中的细胞成分之一。尽管糖尿病视网膜病变的发病机制尚未完全阐明,但持续的高血糖和缺氧造成 RPE 细胞损伤和紧密连接的破坏,进而导致视网膜屏障的崩塌是糖尿病视网膜病变发生发展的重要因素^[14]。

syndecan-1 是 syndecan 家族的重要成员,覆盖于上皮细胞和内皮细胞的表面,调控细胞的分化、黏附和移行。我们前期的研究^[7,15-16]表明,syndecan-1 参与 RPE 细胞的生理病理过程,参与糖尿病视网膜病变等眼病的发生发展^[8,9,17-18]。本研究发现,高糖可下调 RPE 细胞 syndecan-1 的表达,这与前期的增生性糖尿病视网膜病变的视网膜增殖膜的研究结果一致。syndecan-1 表达量的减少或缺失可使细胞间连接减弱,细胞形态或表型发生转变,可使上皮细胞发生间质转化,细胞的移行加速^[19-20]。我们分析,高糖下调 RPE 细胞 syndecan-1 的表达可导致细胞发生间质转化,细胞形态转变,进而细胞间及细胞与基质间的黏附力减弱,从而导致了视网膜屏障的结构破坏及功能损毁;另一方面,RPE 细胞间质变后,会迁移、增生、转化为成纤维细胞,进而参与视网膜增殖膜的形成。但本研究发现,高糖只是暂时减弱了 RPE 细胞 syndecan-1 的表达。可能因为体外 25 mmol/L 葡萄糖实验不能完全模拟糖尿病眼部的情况,因而后续需要更深入的系列研究来明确 syndecan-1、RPE 细胞及糖尿病视网膜病变的关系。

总之,我们的结果表明高糖可暂时下调体外培养的人 RPE 细胞 syndecan-1 的表达,但 syndecan-1 在其中的确切作用及其与其他因素之间的相互作用等都有待于进一步研究。通过这些机制的研究,将会对糖尿病视网膜病变的防治提供新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] 王素常,李魁雁.增生型糖尿病视网膜病变病人泪液分泌的研究[J].徐州医学院学报,2017,37(5):315.
- [2] 韩小霞,惠延年,宋虎平,等.曲安奈德对高糖培养人视网膜色素上皮细胞细胞间黏附分子-1 表达的影响[J].国际眼科杂志,2006,6(3):596.
- [3] 姚毅,姜明,赵秀琴,等.缺氧和高浓度葡萄糖对体外培养人视网膜色素上皮衍生因子表达的影响[J].中华医学杂志,2003,83(22):1989.
- [4] WANG JB,ZHANG YJ,GUAN J, *et al.* Enhanced syndecan-1

expression on neutrophils in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Acta Diabetol*,2012,49(1):41.

- [5] WANG JB,ZHANG YJ,ZHANG Y, *et al.* Negative correlation between serum syndecan-1 and apolipoprotein A1 in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Acta Diabetol*,2013,50(2):111.
- [6] WANG JB,GUAN J,SHEN J, *et al.* Insulin increases shedding of syndecan-1 in the serum of patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabetes Res Clin Pract*,2009,86(2):83.
- [7] 王静波,惠延年,韩泉洪,等.细胞因子对人视网膜色素上皮细胞 syndecan-1 的影响[J].中华眼底病杂志,2006,22(2):113.
- [8] 王静波,宋宗明,孙吉君.糖尿病视网膜病变病人玻璃体液中 syndecan-1 及上皮中性粒细胞活化肽 78 的表达[J].临床眼科杂志,2013,21(6):481.
- [9] 王静波,余欢龙. syndecan-1 在糖尿病视网膜膜中的表达[J].国际眼科杂志,2013,13(4):660.
- [10] 王雨生,严密,扬扶华.视网膜色素上皮细胞培养技术及其应用[J].中华眼底病杂志,1994,10(2):124.
- [11] 韩小霞,郭长梅,惠延年,等.曲安奈德对高糖培养 RPE 细胞 ICAM-1 和 ILK 表达的影响[J].眼科新进展,2010,30(12):1111.
- [12] 毕文娇,李睿姝,侯定善,等.高糖对人视网膜色素上皮细胞神经钙黏连蛋白和纤维连接蛋白表达的影响[J].国际眼科杂志,2014,14(9):1578.
- [13] 许艺民,冯云,马志中.PDR、PVR 增生膜组织超微结构及生长因子受体表达生物学特点的比较研究[J].眼科研究,2005,23(2):147.
- [14] 蔡莉,易敬林.视网膜色素上皮细胞损伤机制研究进展[J].眼科新进展,2012,32(9):898.
- [15] 王静波,惠延年,韩泉洪,等.细胞因子对人视网膜色素上皮细胞 syndecan-1 表达的影响[J].中华眼底病杂志,2006,22(2):113.
- [16] 王静波,惠延年,马吉献,等. syndecan-1 在增生性玻璃体视网膜病变增殖膜中的表达[J].眼科研究,2004,22:474.
- [17] WANG JB,TIAN CW,GUO CM, *et al.* Increased levels of soluble syndecan-1 in the subretinal fluid and the vitreous of eyes with rhegmatogenous retinal detachment [J]. *Curr Eye Res*,2008,33(1):101.
- [18] 胡永亮,王静波,周厉,等.胰岛素对人视网膜微血管内皮细胞 syndecan-1 的表达及细胞通透性和增殖的影响[J].国际眼科杂志,2018,18(8):1381.
- [19] ALEXOPOULOU AN, MULTHAAPT HA, COUCHMAN JR. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology [J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2007,39(3):505.
- [20] KATO M,SAUNDERS S,NGUYEN H, *et al.* Loss of cell surface syndecan-1 causes epithelial cells to transform into anchorage-independent mesenchyme-like cells [J]. *Mol Biol Cell*,1995,6:559.

(本文编辑 刘梦楠)