

# 高糖条件下人视网膜色素上皮细胞的上皮-间质转化

侯定善 李睿姝 范妍 毕文娇 张晓梅

**【摘要】** 背景 研究证实,有多种细胞参与增生性玻璃体视网膜病变(PVR)的发生和发展过程,其中 RPE 细胞的上皮-间质转化(EMT)可能与 PVR 有关,其主要生物学行为是 RPE 细胞的增生和迁移。已证实高血糖是糖尿病视网膜病变(DR)发病的主要原因,而高糖条件下 RPE 细胞是否发生 EMT 鲜有报道。目的 建立体外高糖细胞培养模型,探讨高糖对人 RPE 的迁移能力及 EMT 的影响。方法 用含质量分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基对人 RPE 细胞 D407 细胞株进行体外培养和传代,取 6~8 代细胞用于实验。依据培养液中血糖浓度的不同将细胞分为 3 个组,正常对照组培养基中葡萄糖终浓度为 5.5 mmol/L,高糖培养组葡萄糖终浓度为 60.0 mmol/L,用含 5.5 mmol/L 葡萄糖和甘露醇的 DMEM 培养基培养细胞作为高渗对照组。采用细胞划痕试验法检测划痕后 0、24、48 和 72 h 时 3 个组 RPE 细胞的迁移率,用实时荧光定量 PCR (real-time PCR)检测高糖培养组在培养不同时间点 RPE 细胞间质化标志物闭锁小带蛋白-1(ZO-1)和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)mRNA 在细胞中的相对表达水平。结果 正常对照组培养的 RPE 细胞呈多角形,核仁清晰,排列致密;高糖培养组随着培养时间的延长,RPE 细胞逐渐变大、变长,细胞结构不清,排列紊乱;高渗对照组细胞结构接近正常对照组。划痕试验显示,高糖培养组在划痕后 48 h 可见细胞迁移,划痕后 72 h 划痕基本消失,而正常对照组和高渗对照组划痕仍然存在。划痕后各时间点高糖培养组细胞迁移率明显高于正常对照组和高渗对照组,组间和各时间点的差异均有统计学意义( $F_{\text{分组}} = 328.600, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 773.270, P = 0.000$ )。RT-PCR 结果显示,与正常对照组相比,高糖培养后 48 h、72 h 组细胞中 ZO-1 mRNA 的表达水平明显低于正常对照组,而  $\alpha$ -SMA mRNA 的表达水平明显高于正常对照组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。结论 高糖条件下 RPE 细胞的迁移能力增强,发生 EMT 改变,可能参与增生性糖尿病视网膜病变(PDR)的发生。

**【关键词】** 人; 视网膜色素上皮细胞; 高糖; 上皮-间质转化; 糖尿病/并发症, 视网膜病变; 细胞培养

**Epithelial-mesenchymal transition of human retinal pigment epithelial cells under the high glucose condition *in vitro*** Hou Dingshan, Li Ruishu, Fan Yan, Bi Wenjiao, Zhang Xiaomei. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Corresponding author: Zhang Xiaomei, Email: zhangxm667@163.com

**[Abstract]** **Background** Several types of cells participate in the formation of proliferative membrane in proliferative retinopathy (PVR), and the proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of retinal pigment epithelium (RPE) cells play an important role. Many studies have confirmed high blood glucose is the basic pathogenesis of diabetic retinopathy (DR). However, whether EMT could be induced in RPE cells under the high glucose condition has not been reported. **Objective** This study was to investigate the effects of high glucose on the migration and EMT of RPE cells in high glucose culture model *in vitro*. **Methods** Human RPE cell line D407 were cultured and passaged in DMEM/F12 medium with 10% fetal bovine serum, and 6-8 generations of cells were used in experiment. The cells were divided into 3 groups based on different glucose concentrations in medium. The glucose at the final concentration 5.5 mmol/L or 60.0 mmol/L was respectively used in the normal control group or high glucose group, and the DMEM with 5.5 mmol/L glucose and mannitol was used in the hypertonic control

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.01.005

基金项目:2013 年人社厅黑龙江省级领军人才梯队后备带头人后备资助(创新研发类)资金项目

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第一医院眼科医院

通信作者:张晓梅, Email: zhangxm667@163.com

group. The migration rate of the cells were detected 0, 24, 48 and 72 hours after scratching by wound-scratch test. Real-time PCR was used to detect the relative expressions of zonula occludens-1 (ZO-1) and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) in the cells. **Results** Cultured cells showed a polygon shape with the clear nucleolus and dense arrangement in the normal control group and the hypertonic control group, but the cells were larger and elongated with the lapse of culture time with the indistinct structure and loose arrangement. At 48 hours after scratching, migrating cells were seen in the scratching area, and the scratching area disappeared at 72 hours after scratching in the high glucose group, but the scratching area still was existed in the normal control group or hypertonic control group. The migrating rate of the cells was higher in the high glucose group than that in the normal control group or hypertonic control group, showing total differences among 3 groups and various time points ( $F_{\text{group}} = 328.600, P = 0.000; F_{\text{time}} = 773.270, P = 0.000$ ). Compared with the normal control group, the expression level of ZO-1 mRNA was significantly lower, and  $\alpha$ -SMA mRNA level was higher 48 hours and 72 hours in the high glucose group than those in the normal control group (all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** High glucose induce the migration and EMT of RPE cells *in vitro*, which may be associated with the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy.

[**Key words**] Human; Retinal pigment epithelium cell; High glucose; Epithelial-mesenchymal transition; Diabetes mellitus/complication, retinopathy; Cell culture

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病严重的眼部并发症之一,其病理基础主要是微血管病变,晚期主要的病理改变为增生性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR),主要标志是新生血管及纤维性增生膜的形成,是成人致盲的常见原因之一<sup>[1]</sup>。然而,DR 增生膜的形成机制尚未完全阐明。视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞是血-视网膜屏障的重要组成部分,在维持视网膜正常的生理功能方面起着重要作用<sup>[2]</sup>。研究发现,慢性高血糖可以造成 RPE 细胞的损伤,影响视网膜外屏障的完整性,是 DR 的主要致病因素,而血糖水平的控制可以影响 DR 的发生及发展。研究发现,视网膜增生膜中大多数细胞具有上皮特征,推测其来源于 RPE 细胞,并认为 RPE 细胞增生是形成增生膜的原因<sup>[3]</sup>。近年来研究证实,RPE 细胞在 PDR 的发生及发展过程中发挥重要的作用,主要表现为细胞脱落、移行和增生,并可以转化为其他细胞,如巨噬细胞、成纤维细胞等,即发生上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT),参与增生膜的形成<sup>[4-5]</sup>,但高糖条件下 RPE 是否发生 EMT 则鲜有报道。本研究中建立高糖 RPE 细胞模型来观察细胞间质化指标,旨在探讨高糖对 RPE 细胞 EMT 的影响及其在 PDR 中可能的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人 RPE 细胞株 D407 由湘雅医学院中心实验室提供。DMEM/F12 培养基、质量分数 10% 胎牛血清、青霉素及链霉素溶液(美国 Hyclone 公司);胰蛋白酶(美

国 Gibco 公司);总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链逆转录试剂盒、SYBR green 实时定量 PCR (real-time PCR) 定量试剂盒、96 孔荧光定量 PCR 板、荧光定量 PCR 封板膜、无水 RNase、TE 缓冲液、一次性移液管(哈尔滨 HaiGene 公司);D-葡萄糖粉(美国 Sigma 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 RPE 细胞的培养及实验分组** RPE 细胞用含胎牛血清及质量分数 1% 双抗的 DMEM/F12 培养基在 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养,2~3 d 换液 1 次,将细胞用质量分数 0.125% 胰蛋白酶和质量分数 0.01% EDTA 的消化液 1.5 ml(1:2)消化传代,取生长良好的同一代代对数期 RPE 细胞用于实验。依据培养细胞液中葡萄糖的浓度不同将细胞分为 3 个组。正常对照组培养液中葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L;高糖培养组培养液由葡萄糖粉与高糖型 DMEM 培养基配制,葡萄糖浓度为 60.0 mmol/L;高渗对照组渗透压浓度为 60.0 mmol/L,由 5.5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养基与甘露醇配制,与高糖组有相同的渗透压。

**1.2.2 RPE 细胞形态学观察** 将 RPE 细胞以  $1 \times 10^5$ /孔的密度接种于 24 孔细胞培养板中,待细胞生长至 80% 的融合状态时换为 0.5% 胎牛血清的培养液,继续孵育至 24 h,使细胞周期同步。各组细胞实施相应干预措施后继续培养至 72 h,并用倒置相差显微镜观察细胞形态的变化。

**1.2.3 划痕试验法检测 RPE 细胞的迁移能力** 取对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,细胞密度为  $5 \times 10^5$  个/孔,板底预先做好横向标记线。培养 24 h 待细胞生长融合后,用含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养液饥饿培养 8 h,再用 20  $\mu$ l 无菌移液器的微枪头在培养板

中央均匀划“一”字形划痕,用 PBS 轻柔洗去脱落细胞,然后各组实施相应的干预措施,每组设 3 个复孔。倒置显微镜下观察,任意选取 3 个观察区,分别在培养后 0、24、48、72 h 测量划痕愈合情况并拍照记录。细胞迁移能力用迁移率表示,细胞迁移率 = (原划痕宽度 - 现划痕宽度) / 原划痕宽度 × 100%。

**1.2.4 Real-time PCR 检测细胞中闭锁小带蛋白-1 和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 mRNA 的表达水平** 采用 real-time PCR 对 RPE 细胞中的闭锁小带蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) mRNA 的表达进行检测。正常对照组直接提取总 RNA,高糖培养组在不同时间点提取总 RNA,按 Trizol 试剂说明书流程进行,使用紫外分光光度仪测出每个样品 RNA 的浓度,然后用无水 RNase 稀释至质量浓度为 1  $\mu$ g/ $\mu$ l。在 PCR 仪上按 30  $^{\circ}$ C 反应 15 min,55  $^{\circ}$ C 反应 30 min,85  $^{\circ}$ C 反应 10 min 条件进行逆转录反应,所得 cDNA 进行逆转录 PCR。PCR 总体系为 30  $\mu$ l,包括双蒸水 9  $\mu$ l,cDNA 模板 4  $\mu$ l,2 倍 SYBR green PCR 混合染料 15  $\mu$ l,上下游引物各 1  $\mu$ l。基因序列从 Genbank 中查阅,根据引物设计原则,利用 Primers 软件设计(表 1)。反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,之后 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s,60  $^{\circ}$ C 退火并延伸 30 s,共 40 个循环。每组设 3 个复孔,重复 3 次,分别检测细胞 ZO-1 和  $\alpha$ -SMA 的表达。采用 actin 表达量作为内参进行半定量校正( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )。基因表达半定量数值再以对照组进行标准化处理。

表 1 各基因引物序列

基因	引物序列	产物大小(bp)
Actin	F:5'-TCGTGCGTGACATTAAGGAGAAG-3'	218
	R:5'-GTTGAAGGTAGTTTCCTGGATGC-3'	
hZO-1	F:5'-CCATTCCCGAAGGAGTTGAGC-3'	120
	R:5'-GACCACACATCACCAAAGGAC-3'	
h $\alpha$ -SMA	F:5'-GAAGAGTTACGAGTTGCCTGATG-3'	138
	R:5'-ATGATGCTGTGTAGTGGTTTC-3'	

注:ZO-1:闭锁小带蛋白-1;h $\alpha$ -SMA:人  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究检测指标的数据资料经 W 检验呈正态分布,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数经 Levene 检验方差齐。不同组间在不同时间点 RPE 细胞迁移率的差异比较采用重复测量两因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。高糖培养不同时间组 RPE 细胞中 ZO-1 mRNA 和  $\alpha$ -SMA mRNA 表达相对值的差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用

Dunnnett t 检验,检验水准为  $\alpha = 0.05$ 。

**2 结果**

**2.1 各组培养的 RPE 细胞形态学表现**

正常对照组细胞排列规则、紧密,呈单层生长,细胞形态为扁平多角形,细胞质透明,细胞核呈圆形或卵圆形,边界清,核仁明显(图 1A,B)。高糖培养组细胞培养后 72 h,细胞较正常对照组细胞变大,伸长,细胞间排列紊乱,少部分细胞脱落。高渗对照组细胞以 60.0 mmol/L 甘露醇干预 72 h 后,细胞形态及细胞间排列均接近正常对照组(图 1C,D)。

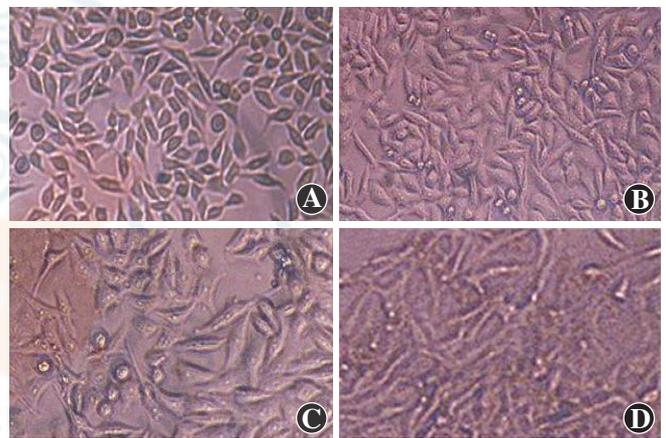


图 1 培养的人 RPE 细胞形态 A:正常对照组培养后 24 h 的 RPE 细胞呈多角形,排列紧密( $\times 100$ ) B:正常对照组培养后 72 h 的 RPE 细胞核仁明显,细胞排列规则( $\times 200$ ) C:高渗培养组培养后 72 h RPE 细胞的细胞体较大,但细胞形态接近正常对照组细胞( $\times 200$ ) D:高糖培养组培养后 72 h 的 RPE 细胞形态细长,排列紊乱( $\times 100$ )

**2.2 各组 RPE 细胞迁移距离的比较**

划痕后 24 h,正常对照组、高渗对照组和高糖培养组培养板的划痕宽度接近;划痕后 48 h,可见高糖培养组细胞迁移活跃,培养板划痕宽度较正常对照组和高渗对照组减小,划痕后 72 h,高糖培养组培养板的划痕基本消失,而正常对照组和高渗对照组培养板中的划痕仍清晰可见(图 2)。各组细胞不同时间点的迁移率比较,差异均有统计学意义( $F_{\text{分组}} = 328.600, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 773.270, P = 0.000$ ),高糖培养组各时间点细胞迁移率明显高于正常对照组和高渗对照组,差异均有统计学意义(24 h: $t = -15.994, P = 0.000; t = -19.934, P = 0.000; 48 h: t = -13.6653, P = 0.000; t = -15.510, P = 0.000; 72 h: t = -18.693, P = 0.000; t = -19.597, P = 0.000$ );正常对照组和高渗对照组间培养后 48 h 和 72 h 迁移率的差异均无统计学意义( $t = 1.845, 0.904$ ,均  $P > 0.05$ )(表 2)。

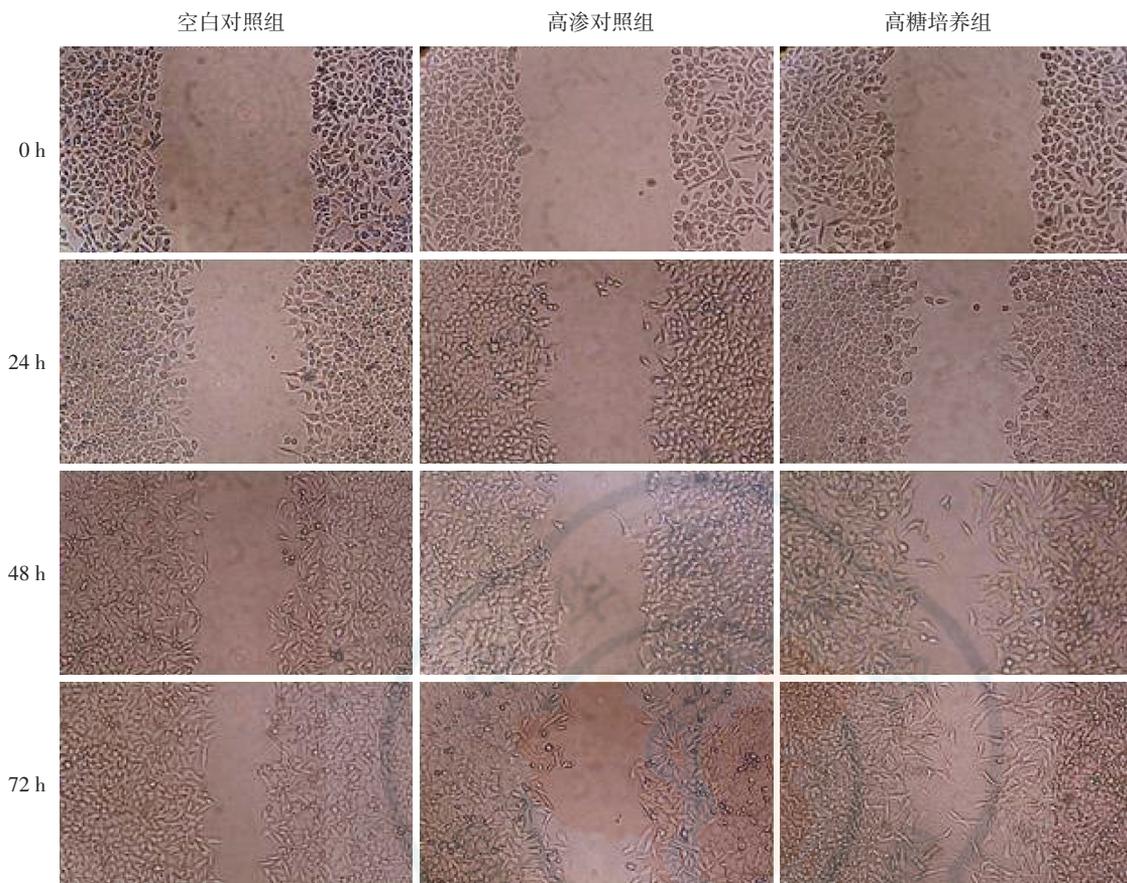


图 2 各组培养 RPE 细胞的划痕试验 (×100) 划痕试验后 24 h, 高糖培养组细胞迁移较正常对照组和高渗对照组活跃, 划痕试验后 72 h, 高糖培养组培养板划痕基本消失, 而正常对照组和高渗对照组划痕仍存在

表 2 各组 RPE 细胞在培养后不同时间点迁移率的比较 (%)

组别	培养后不同时间细胞迁移率		
	24 h	48 h	72 h
正常对照组	27.71±0.87	42.35±2.38 <sup>a</sup>	54.57±4.01 <sup>b</sup>
高渗对照组	23.91±2.06	38.19±5.74 <sup>a</sup>	52.55±5.23 <sup>b</sup>
高糖培养组	43.12±1.83 <sup>c</sup>	72.21±2.92 <sup>ac</sup>	96.34±1.24 <sup>bc</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 328.600, P = 0.00$ ;  $F_{\text{时间}} = 773.270, P = 0.000$ . 与各自组内的 24 h 值比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各自组内 48 h 值比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与正常对照组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验) RPE: 视网膜色素上皮

### 2.3 各组 RPE 细胞中 ZO-1 及 $\alpha$ -SMA mRNA 的相对表达

Real-time PCR 检测 RPE 细胞 ZO-1 及  $\alpha$ -SMA mRNA 表达, 图 3 显示基因扩增结果良好, 熔解曲线呈单一峰型。正常对照组和高糖培养组培养后 24、48 和 72 h, 细胞中 ZO-1 mRNA 的表达量分别为  $0.946 \pm 0.155$ 、 $0.860 \pm 0.101$ 、 $0.795 \pm 0.118$  和  $0.666 \pm 0.040$ ;  $\alpha$ -SMA mRNA 的表达量分别为  $0.448 \pm 0.152$ 、 $0.615 \pm 0.045$ 、 $1.276 \pm 0.092$  和  $0.841 \pm 0.160$ 。高糖培养组 RPE 细胞中 ZO-1 mRNA 水平较正常对照组明显下降, 各组总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 7.478, P = 0.002$ ), 与正常对照组相比, 高糖作用后 48 h 和 72 h

ZO-1 mRNA 表达均明显降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 4)。高糖培养组 RPE 细胞中  $\alpha$ -SMA mRNA 水平较正常对照组逐渐升高, 各组间整体比较差异有统计学意义 ( $F = 52.075, P = 0.000$ ), 60 mmol/L 高糖作用后 48 h  $\alpha$ -SMA mRNA 表达水平最高, 72 h 时  $\alpha$ -SMA mRNA 表达水平较 48 h 下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与正常对照组相比, 高糖作用 48 h 和 72 h 时  $\alpha$ -SMA mRNA 表达升高最明显, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.000, 0.000$ ) (图 5)。

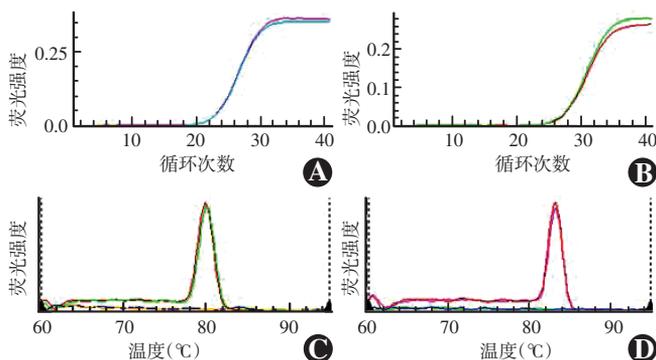


图 3 RT-PCR 扩增、熔解曲线图 A: ZO-1 扩增曲线 B:  $\alpha$ -SMA 扩增曲线 C: ZO-1 熔解曲线 D:  $\alpha$ -SMA 熔解曲线 ZO-1: 闭锁小带蛋白-1;  $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白

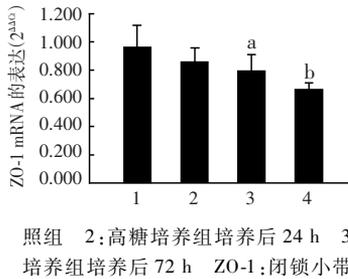


图4 各组细胞培养后不同时间 RPE 细胞中 ZO-1 mRNA 的相对表达量变化  $F = 7.478, P = 0.002$ . 与正常对照组比较, <sup>a</sup>  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>  $P < 0.01$  (单因素方差分析, Dunnett  $t$  检验) 1: 正常对照组 2: 高糖培养组培养后 24 h 3: 高糖培养组培养后 48 h 4: 高糖培养组培养后 72 h ZO-1: 闭锁小带蛋白-1

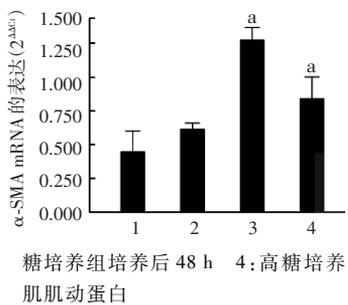


图5 各组培养后不同时间 RPE 细胞中 α-SMA mRNA 的相对表达量变化  $F = 52.075, P = 0.000$ . 与正常培养组比较, <sup>a</sup>  $P < 0.01$  (单因素方差分析, Dunnett  $t$  检验) 1: 正常对照组 2: 高糖培养组培养后 24 h 3: 高糖培养组培养后 48 h 4: 高糖培养组培养后 72 h α-SMA: α-平滑肌肌动蛋白

### 3 讨论

目前普遍认为 DR 的始动因素为高血糖、组织缺血及缺氧<sup>[6]</sup>。RPE 细胞从神经视网膜分化而来,是具有分泌功能的上皮细胞,位于视网膜感觉层和脉络膜层之间,是上皮与间充质间的联系组织,参与构成血-视网膜屏障,对维持视网膜生理功能具有极其重要的作用。生理情况下,由于视网膜神经感觉层代谢活动所需的能量在很大程度上是 RPE 细胞从脉络膜毛细血管转运的葡萄糖所提供,因此 RPE 细胞更容易受血糖水平的影响<sup>[7]</sup>。Giebel 等<sup>[8]</sup>研究证实,高血糖可以引起 RPE 细胞损伤,影响视网膜的外屏障功能,继而引发 DR。Hiscott 等<sup>[9]</sup>研究证实,RPE 细胞是 PDR 增生膜的组成部分。此外,在创伤、炎症等条件下,RPE 细胞参与增生性玻璃体视网膜病变的发生及糖尿病视网膜新生血管的形成<sup>[10]</sup>。本实验通过体外培养人 RPE 细胞,利用在细胞培养液中加入 60.0 mmol/L 高糖的方法制造体外培养细胞的高糖模型,采用划痕试验法及 real-time PCR 分别检测了高糖对体外培养 RPE 细胞的迁移能力和 EMT 相关指标 ZO-1 和 α-SMA 表达水平的变化,结果证实在体外高糖条件下,RPE 细胞表型发生改变,迁移能力增强,发生 EMT。

既往研究常用 25 ~ 30 mmol/L 葡萄糖来模拟糖尿病患者体内的高糖状态<sup>[7,11]</sup>。韩小霞等<sup>[11]</sup>研究显示,用含 30 mmol/L 葡萄糖作用 RPE 细胞 48 h,细胞间黏附分子-1 的表达增加,但对细胞增生的影响与对照组相比并无区别,推测其原因可能是 RPE 细胞对葡萄糖有较强的转运能力,使其耐受高糖刺激,30 mmol/L 葡萄糖还不足以对 RPE 细胞增生造成影响。本研究在

预实验中用 30.0、60.0、90.0 mmol/L 葡萄糖培养 RPE 细胞,证实 30.0 mmol/L 葡萄糖对 RPE 细胞增生影响不明显,而 60.0 mmol/L 葡萄糖对细胞增生影响最强,故本实验选用 60.0 mmol/L 培养细胞的葡萄糖以建立高糖 RPE 细胞模型,以 5.5 mmol/L 葡萄糖培养液模拟正常人体血糖水平。另外,本研究为排除高渗作用对 RPE 细胞的影响,用 60.0 mmol/L 高渗培养基作为对照组,排除了高浓度葡萄糖导致渗透压增高对研究结果造成的影响。

20 世纪 80 年代, Hay<sup>[12]</sup> 研究发现, EMT 是上皮细胞失去上皮特性而获得间质细胞表型的一种生物现象,是在组织胚胎学及器官形成学中的一种重要机制。EMT 在形态学上表现为细胞从具有顶-底极性、细胞连接紧密的上皮细胞变成无顶-底极性、细胞连接疏松的成纤维细胞或成肌纤维细胞,分子生物学上表现为上皮标志物表达下调,出现间质标记物的表达,细胞迁移侵袭性提高。本实验结果显示,随着培养时间的增加,高糖培养组的细胞逐渐变大变长,形态发生改变,细胞排列紊乱,细胞表型发生明显改变。细胞划痕试验显示,随细胞培养时间的增加,高糖培养组细胞迁移率比对照组提高,说明在高糖条件下,细胞迁移能力增强。正常分化成熟的 RPE 细胞是静止的细胞,当视网膜或血-视网膜屏障被破坏时,在各种细胞因子的作用下,RPE 细胞迁移能力增强,发生 EMT 并形成成纤维样细胞,同时产生细胞外基质成分,参与视网膜脱离处的纤维组织形成<sup>[13]</sup>。Bailey 等<sup>[14]</sup>研究证明,在氧化应激条件下,不仅 ARPE-19 细胞中热休克蛋白的表达量升高,同时细胞间连接破坏, N-cadherin 和 ZO-1 表达下调,上皮屏障功能丧失。本实验证实,高糖培养的 RPE 细胞中 ZO-1 mRNA 水平下降,而 α-SMA mRNA 水平升高,其作用均呈时间依赖性。ZO-1 表达的减弱及 α-SMA 表达的增强破坏细胞间紧密连接,重建细胞质内细胞骨架,是 EMT 发生的早期改变,继而证实,在体外高糖环境下,RPE 细胞发生了 EMT。Parapuram 等<sup>[15]</sup>研究发现,转化生长因子 β、表皮生长因子或结缔组织生长因子作用下 RPE 细胞中 N-cadherin 及 ZO-1 表达下调,而 α-SMA、vimentin 开始表达,RPE 细胞发生 EMT,这与本研究的结论一致。

上皮细胞间紧密连接的破坏和功能的改变及细胞顶-底极性消失是 EMT 的早期事件之一。紧密连接是维持上皮细胞完整性、调节屏障功能以及相邻细胞间信号转导的基础,它维持细胞极性主要是通过抑制脂质和蛋白质在上皮细胞顶端膜和基侧膜之间的弥散来实现。主要的紧密连接蛋白有 claudins、occludin 和

ZO-1,其中 ZO-1 是构成紧密连接的重要蛋白之一。研究发现,ZO-1 在维持上皮极性及其屏障功能的完整性中发挥重要作用,此外,还参与调节细胞物质转运、细胞增生分化、癌细胞转移及信号转导等重要过程,由于 ZO-1 结构和功能的重要性,故多数情况下只要 ZO-1 受到破坏,紧密连接的功能多随之发生变化<sup>[16]</sup>。Georgiadis 等<sup>[17]</sup>研究发现,敲除 ZO-1 基因的 RPE 细胞增生能力增强,并且在超微结构上发生了 EMT。故本实验中,选用 ZO-1 作为观察 RPE 细胞紧密连接屏障功能和通透性功能的指标。Real-time PCR 显示,与对照组相比,高糖培养组 ZO-1 mRNA 表达水平呈时间依赖性下调,提示高糖诱导了 RPE 细胞紧密连接蛋白解聚,证实了 EMT 发生。

$\alpha$ -SMA 是一种高度保守的、表达在多种细胞的细胞质中的具有收缩功能的细胞骨架微丝结构蛋白,是细胞移行和收缩功能的基础,是具有收缩性能的成肌纤维细胞的标志物<sup>[18]</sup>。 $\alpha$ -SMA 在正常 RPE 细胞中不表达,但在体外培养及在一些病理状态下转分化的 RPE 细胞则有表达,是 RPE 细胞去分化和收缩能力的标志,可作为 RPE 细胞具有转分化为间质样细胞特征的指标<sup>[19]</sup>。本实验结果显示,RPE 细胞在体外高糖作用下, $\alpha$ -SMA 表达量升高,与正常对照组相比,60.0 mmol/L 葡萄糖作用 48 h 和 72 h 时  $\alpha$ -SMA mRNA 表达明显升高,其中作用 48 h 时  $\alpha$ -SMA mRNA 表达水平最高,72 h 时  $\alpha$ -SMA mRNA 表达水平较 48 h 下降,提示 RPE 细胞逐渐获得了收缩力。72 h 时  $\alpha$ -SMA mRNA 表达水平较 48 h 下降,推测可能与长时间高糖培养下的细胞毒性有关。

DR 的发病机制是近年来研究的热点,其复杂的病因及病理机制给 DR 的预防和治疗带来了困难。本实验用体外高糖模型证明,高糖可以诱导 RPE 细胞发生 EMT,可能与 DR 的发生和发展有一定关联,但具体机制仍需进一步验证。本研究虽然提示高糖导致的 RPE 发生 EMT 可能与 DR 有关,但需要提出的是,体外的细胞培养条件并不能完全模拟体内的生理环境,要验证体内高血糖是否可以直接作用于 RPE 细胞并引起类似体外研究的病理改变,还需要进一步的动物实验予以证实。

### 参考文献

- [1] Li Calzi S, Neu MB, Shaw LC, et al. Endothelial progenitor dysfunction in the pathogenesis of diabetic retinopathy; treatment concept to correct diabetes-associated deficits[J]. EPMA J, 2010, 1(1): 88-100.
- [2] Naggar H, Ola MS, Moore P, et al. Downregulation of reduced-folate transporter by glucose in cultured RPE cells and in RPE of diabetic mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(2): 556-563.
- [3] Macherer R, Van Horn D, Aberg TM. Pigment epithelial proliferation in human retinal detachment with massive preretinal proliferation[J]. Am J Ophthalmol, 1978, 85(2): 181-191.
- [4] Leiderman YI, Miller JW. Proliferative vitreoretinopathy: pathobiology and therapeutic targets[J]. Semin Ophthalmol, 2009, 24(2): 62-69. doi:10.1080/08820530902800082.
- [5] Karthikeyan B, Kalishwaralal K, Sheikpanbabu S, et al. Gold nanoparticles downregulate VEGF-and IL-1 $\beta$ -induced cell proliferation through Src kinase in retinal pigment epithelial cells[J]. Exp Eye Res, 2010, 91(5): 769-778. doi:10.1016/j.exer.2010.09.003.
- [6] Abu-El-Asrar AM, Dralands L, Missotten L, et al. Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(8): 2760-2766. doi:10.1167/iovs.03-1392.
- [7] 姚毅, 关明, 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): 1989-1992. doi:10.3760/j.issn.0376-2491.2003.22.015.
- [8] Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, et al. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier[J]. Lab Invest, 2005, 85(5): 597-607. doi:10.1038/labinvest.3700251.
- [9] Hiscott P, Gray R, Grierson I, et al. Cytokeratin-containing cells in proliferative diabetic retinopathy membranes[J]. Br J Ophthalmol, 1994, 78(3): 219-222. doi:10.1136/bjo.78.3.219.
- [10] 张承芬. 眼底病学[M]. 2 版. 视网膜色素上皮相关基础研究. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1-9.
- [11] 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表面黏附分子-1 的影响[J]. 国际眼科杂志, 2006, 6(2): 317-320. doi:10.3969/j.issn.1672-5123.2006.02.015.
- [12] Hay ED. Interaction of embryonic cell surface and cytoskeleton with extracellular matrix[J]. Am J Anat, 1982, 165(1): 1-12.
- [13] Saika S, Yamanaka O, Flanders KC, et al. Epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target for prevention of ocular tissue fibrosis[J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2008, 8(1): 69-76.
- [14] Bailey TA, Kanuga N, Romero IA, et al. Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(2): 675-684. doi:10.1167/iovs.03-0351.
- [15] Parapuram SK, Chang B, Li L, et al. Differential effects of TGF and vitreous on the transformation of retinal pigment epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(12): 5965-5974. doi:10.1167/iovs.09-3621.
- [16] 张文一, 白海青, 王铮华. 视网膜色素上皮细胞中诱导型一氧化氮合酶、精氨酸代谢相关酶的表达及一氧化氮对细胞紧密连接的影响[J]. 中华眼底病杂志, 2005, 21(1): 32-36.
- [17] Georgiadis A, Tschernutter M, Bainbridge JW, et al. The tight junction associated signalling proteins ZO-1 and ZONAB regulate retinal pigment epithelium homeostasis in mice[J/OL]. PLoS One, 2010, 5: e15730 [2014-06-09]. http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0015730. doi:10.1371/journal.pone.0015730.
- [18] Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, et al. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity[J]. Mol Biol Cell, 2001, 12(9): 2730-2741. doi:10.1091/mbc.12.9.2730.
- [19] Ando A, Ueda M, Uyama M. Enhancement of dedifferentiation and myoid differentiation of retinal pigment epithelium by platelet derived growth factor[J]. Br J Ophthalmol, 2000, 84(11): 1306-1311. doi:10.1136/bjo.84.11.1306.

(收稿日期:2014-07-02)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)

读者 · 作者 · 编者

### 常用英文缩略语名词解释

VEGFR: 血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor)

Cdk5: 细胞周期依赖性蛋白激酶 5 (cyclin-dependent kinase 5)

(本刊编辑部)