

血小板源性生长因子-C蛋白在视网膜光感受器细胞损伤模型中的神经保护作用

张汝婷, 陈伟, 胡文婕, 唐仲书
(中山大学中山眼科中心, 广东广州 510000)

摘要:【目的】探讨血小板源性生长因子-C(PDGF-C)蛋白治疗对视网膜光感受器细胞损伤模型中的神经保护作用。【方法】①检测体外条件下PDGF-C的作用,使用光感受器细胞系661W细胞及原代培养的Pde6brd1视网膜细胞。在体外培养的661W细胞培养液中加入PDGF-C蛋白或者牛血清蛋白(BSA),分别予以同等强度相同时间长短的紫外线照射,然后做MTT检测其细胞凋亡状况,检测PDGF-C蛋白对661W细胞的保护作用。取Pde6brd1小鼠视网膜做原代细胞培养后,在培养液中分别加入PDGF-C蛋白或BSA,相同条件培养后通过免疫荧光染色检测光感受器细胞的生存情况,以检测PDGF-C蛋白对该原代细胞的保护作用。②检测在体条件下PDGF-C的作用,在Pde6brd1小鼠的视网膜下分别注射PDGF-C蛋白及BSA,然后通过组织切片后苏木精-伊红(HE)染色观察视网膜光感受器细胞数量的变化来检测PDGF-C的神经保护作用。【结果】在紫外线诱导的视网膜光感受器细胞661W损伤模型中,培养液中加入PDGF-C蛋白的实验组中,MTT实验显示490 nm吸光度(0.2857 ± 0.054)较对照组(0.1726 ± 0.005)增高, $P < 0.05$ 。在Pde6brd1原代培养的视网膜细胞中,PDGF-C蛋白组中光感受器细胞的存活率明显高于对照组, $P < 0.05$ 。在Pde6brd1小鼠的视网膜下注射PDGF-C蛋白,实验组外核层中的每100 μm 细胞计数(38.4769 ± 6.1)较对照组(27.2435 ± 5.3)增加, $P < 0.05$ 。【结论】PDGF-C蛋白在光感受器细胞损伤模型中具有较强的神经保护作用。

关键词: 血小板源性生长因子-C; rd1; 光感受器细胞; 661W细胞

中图分类号: R453.9 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2018)05-0648-06

Neuroprotective Effect of PDGF-C Protein in Retina Photoreceptor Damage Models

ZHANG Ru-ting, CHEN Wei, HU Wen-jie, TANG Zhong-shu
(Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, China)
Corresponding to: Tang Zhongshu, E-mail: tangzhs@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 We investigated the neuroprotective effect of Platelet-derived growth factor C (PDGF-C) protein in retina photoreceptor cell damage models. 【Methods】 Both in vivo and in vitro models have been tested. One is UV-lesioned photoreceptor cell line 661W. Neuroprotective effect of PDGF-C was assessed by MTT test. Another model is a typical retinitis pigmentosa model called Pde6brd1. Neuroprotective effect of PDGF-C protein was assessed by immunostaining through retina cell primary culture and HE staining through subretinal injection. 【Result】 Neuroprotective effect is detected in UV-lesioned 661W cell model. The results of MTT test showed that the absorbance values in PDGF-C groups increased obviously compared with control. Furthermore, immunostaining results showed that survival of photoreceptor cells increased in PDGF-C treated group compared with control. Moreover, subretinal injection of PDGF-C increased the cell number in outer nuclear layer. 【Conclusion】 Thus, the cell and animal models validated the neuroprotective effect of PDGF-C in photoreceptor lesions.

Key words: platelet derived growth factor-C; rd1; photoreceptor; 661W

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(5): 648-653]

收稿日期: 2018-06-07

基金项目: 国家自然科学基金(81371021)

作者简介: 张汝婷, 硕士研究生, 研究方向: 眼科学神经生物学, E-mail: 179470584@qq.com; 唐仲书, 通信作者, 博士, 博士生导师, 研究方向: 眼科学神经生物学, E-mail: tangzhs@mail.sysu.edu.cn

防盲治盲是人类健康事业的重要课题。常见的致盲性疾病有白内障、青光眼、老年黄斑变性、糖尿病视网膜病变和视网膜色素变性^[1-2]。其中,老年黄斑变性和视网膜色素变性都属于视网膜退行性病变,且与视网膜中的神经细胞——光感受器细胞的损伤有关^[3-4]。因此,视网膜光感受器细胞的损伤严重威胁人类视觉健康。在多年研究中,许多具有神经保护功能的因子被发现且被先后证明对神经细胞有保护作用,如节细胞源生长因子、神经生长因子家族,胶质细胞源生长因子家族等均被证明对视网膜节细胞有一定的神经保护作用^[5-9]。但是由于目前临床上还没有能够有效阻止神经细胞死亡的药物,发现、测试并开发具有神经保护功能的因子仍然是神经科学研究的重要任务。血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是调节细胞生长和分裂的众多生长因子之一,特别是在血管形成、血管内皮细胞的生长、间充质细胞的增殖中起着重要的作用^[10-11]。血小板源性生长因子-C(platelet-derived growth factor-C, PDGF-C)属于PDGF家族,研究发现PDGF-C在胚胎发育、癌症发生等过程中均起着重要作用^[12-13]。有研究发现,PDGF-C广泛表达于视网膜,在视神经损伤时,视网膜中PDGF-C的表达显著升高^[14];提示PDGF-C可能对损伤修复起作用,本实验将进行测试。因Pde6brd1品系的小鼠具有视网膜光感受器细胞不可逆性死亡的特征^[15],因此本实验也将结合该小鼠模型以及紫外线损伤661W细胞模型来研究PDGF-C蛋白治疗在视网膜光感受器细胞损伤模型中的神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 先天性视网膜变性模型Pde6brd1品系小鼠。SPF级Pde6brd1品系小鼠,雄性,体质量20~22 g,由南京维通利华实验动物技术有限公司提供。实验动物使用许可证:SYXK(粤)2015-0058。

1.1.2 实验细胞 光感受器细胞株661W,购自上海博谷生物科技有限公司。

1.1.3 主要试剂 PDGF-C蛋白购自RD公司;BSA购自广州研信生物科技有限公司;MTT细胞

活性检测试剂盒购自Sigma公司;苏木素购自Sigma公司;伊红购自Sigma公司;光感受器细胞抗体recoverin购自sigma公司;95%酒精、无水乙醇、二甲苯、中性树脂及OCT包埋剂均购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型构建 Pde6brd1小鼠分2组,分别在P3进行视网膜下注射PDGF-C蛋白或者BSA各1 μg (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),放回鼠笼继续培养,在P24收眼球,每组6只小鼠,12只眼球。本研究所有的动物实验操作流程均严格遵守中山大学实验动物的使用指南,对动物的实验步骤已通过中山大学中山眼科中心动物伦理委员会审阅和批准,批准编号为2015-110。

1.2.2 细胞模型构建 光感受器细胞系661W细胞 将处于对数生长期的661W细胞消化后,通过细胞计数,按照每孔 1×10^5 个细胞接种在96孔板上,放入细胞培养箱24 h待细胞贴壁。24 h后取出96孔板,分两组,每组10孔加入相等量的混合PDGF-C蛋白(50 ng/mL)或BSA(50 ng/mL)的培养液,置入细胞培养箱继续培养24 h。24 h后在另一细胞培养箱中放入紫外线灯(radiant exposure = 4.3 J/cm²),将96孔板放在紫外线灯上10 cm处,照射10 min后关闭紫外灯,将96孔板移入没有紫外线灯的细胞培养箱继续培养。

取P1的Pde6brd1小鼠视网膜,经木瓜蛋白酶消化并轻柔吹打均匀后,通过细胞计数,按照每孔 1×10^7 个细胞接种在96孔板上,放入细胞培养箱48 h待细胞贴壁。取出96孔板,吸出培养液及未贴壁细胞,分2组,每组10孔,加入60 μL 混合PDGF-C蛋白(50 ng/mL)或BSA(50 ng/mL)的培养液,置入细胞培养箱继续培养7 d,中途换液一次,仍然按分组使用60 μL 混合PDGF-C蛋白(50 ng/mL)或BSA(50 ng/mL)的培养液。

1.2.3 冰冻切片及苏木素伊红染色 收获眼球后用OCT包埋冰冻包埋剂包埋,放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,用冰冻切片机按水平方向切片收取靠近视神经部分的水平面切片。具体方法参考试剂盒说明,按照苏木素伊红染色步骤对冰冻切片进行染色后,在倒置显微镜下观察视网膜外核层细胞数量的变化,并在视神经处进行视网膜外核层细胞计数并记录。

1.2.4 MTT细胞活性检测 紫外灯照射处理后的

661W 细胞放入细胞培养箱继续培养 24 h。24 h 后取出 96 孔板,吸出上清,用灭菌的室温 PBS 洗涤 3 次。具体方法参考试剂盒说明,按照说明书步骤对细胞进行处理后,应用酶标仪 OD 490 nm 检测各孔的吸光度。

1.2.5 细胞免疫荧光染色 从细胞培养箱中取出细胞,去除培养液用室温 PBS 洗涤 3 次后,每孔中加入 40 μL 的 40 g/L 多聚甲醛,室温下固定 30 min,用室温的 PBS 洗涤 3 次,加入 0.5% triton+驴血清,室温下打孔和封闭 20 min,用室温的 PBS 洗涤 3 次。每孔加入 1:1 000 配制的一抗 20 μL ,放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中 12 h。取出培养皿用室温的 PBS 洗涤 3 次,每孔加入 1:5 000 配制的二抗 20 μL ,室温放置 1 h。1 h 后用室温 PBS 洗涤 3 次,每孔加入 20 μL 含 DAPI 抗荧光淬灭封片剂,启动激光共聚焦显微镜观察并拍照记录。

1.3 统计分析

采用 SPSS 16.0 统计软件包进行统计学分析。数值数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,配对资料组间应用 t 检验,选用 LSD (least significant differenced) 法进行统计学分析, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

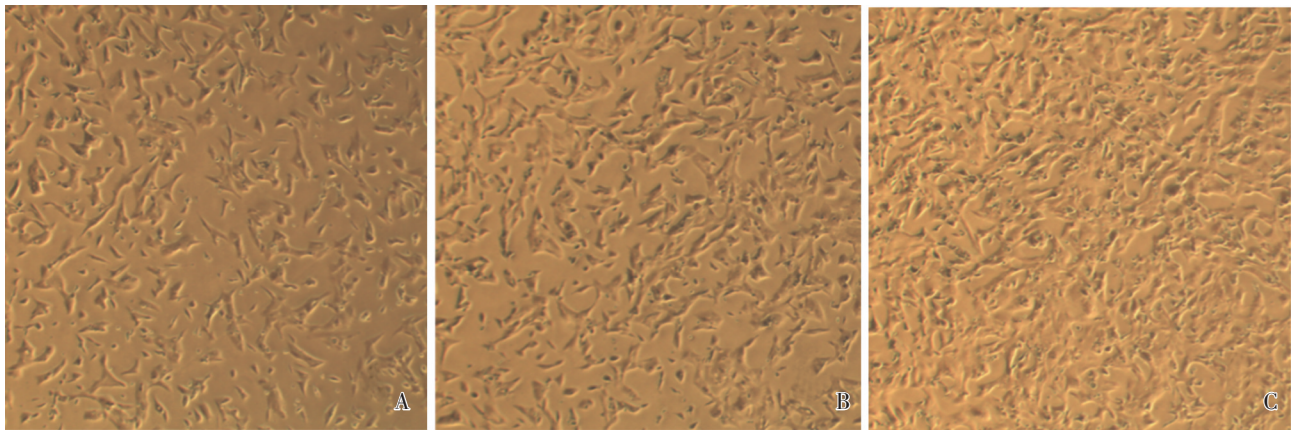
2 结果

2.1 PDGF-C 蛋白治疗对紫外线诱导 661W 细胞损伤模型的作用

按照实验安排在培养基中分别加入 50 ng/mL 的 PDGF-C 蛋白或 BSA,并照射 10 min 的紫外灯。显微镜下可见细胞均有不同程度皱缩,PDGF-C 组较对照组轻微,BSA 组可见细胞碎片及部分细胞漂浮。根据 MTT 结果分析显示,在紫外灯照射 10 min 后,加入 PDGF-C 蛋白的实验组中,490 nm 吸光度(0.285 ± 0.054)较对照组(0.1725 ± 0.0055)明显增高(表 1,图 1 A~C),组间差异有统计学意义(图 1D)。

2.2 PDGF-C 蛋白治疗对体外培养 Pde6brd1 小鼠视网膜原代细胞的作用

Pde6brd1 小鼠 P1 时收取视网膜,经木瓜蛋白酶消化后分两组按 1×10^7 个每孔接种在 96 孔板,待细胞贴壁后在培养基中分别加入 PDGF-C 蛋白或者 BSA,7 d 后收取细胞并进行免疫荧光染色。recoverin/DAPI 双染结果显示,相同培养环境下,在加入 PDGF-C 蛋白培养的实验组内 recoverin 阳



A: 661W cell from BSA treated group, $\times 10$; B: 661W cell from PDGF-C protein treated group, $\times 10$; C: 661W cell from untreated group; D: Analysis of OD490 nm absorbance of 661W cell after interfering BSA and PDGF-C. 1) $P < 0.05$ vs control group, $n = 10$.

图 1 PDGF-C 蛋白治疗对紫外线诱导 661W 细胞损伤模型的作用
Fig.1 PDGF-C protein and BSA treatment effect for UV-lesioned 661W cell

表1 PDGF-C蛋白治疗对紫外线诱导661W细胞损伤模型的作用

Table 1 PDGF-C protein and BSA treatment effect for UV-lesioned 661W cell ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	490 nm Absorbance
PDGF-C	10	0.285 ± 0.054
BSA	10	0.173 ± 0.006

Group PDGF-C compared with group BSA, $P = 0.012$

表2 PDGF-C蛋白对体外培养Pde6brd1视网膜原代细胞的作用

Table 2 PDGF-C protein and BSA treatment effect for primary cell culture of Pde6brd1 mouse retina ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	recoverin/DAPI
PDGF-C	10	0.101 ± 0.011
BSA	10	0.075 ± 0.006

Group PDGF-C compared with group BSA, $P = 0.000$

表3 PDGF-C蛋白治疗对Pde6brd1视网膜的作用

Table 3 PDGF-C protein and BSA treatment effect for Pde6brd1 mouse ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	ONL Nuclear/100 μm
PDGF-C	12	38.4 ± 6.1
BSA	12	27.2 ± 5.3

Group PDGF-C compared with group BSA, $P = 0.023$

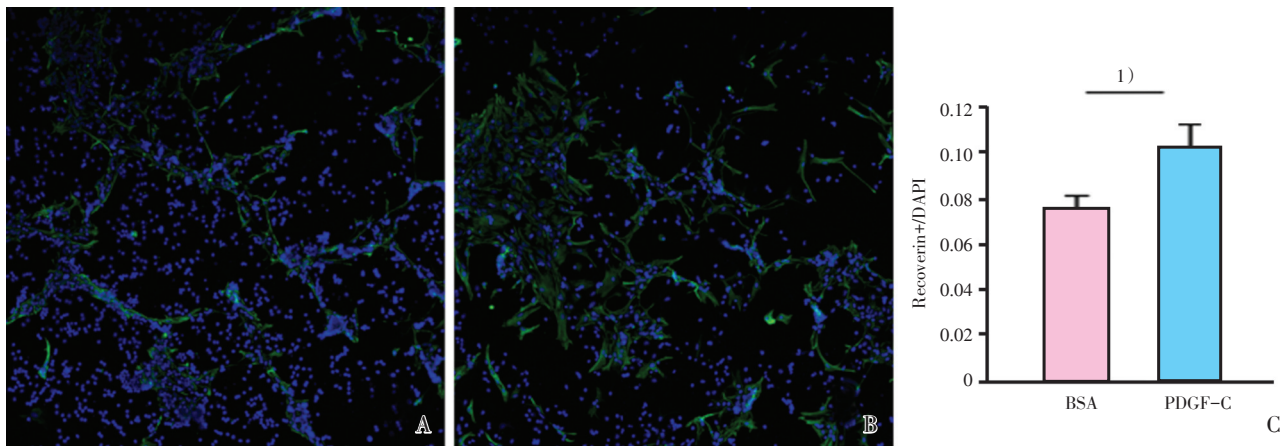
性细胞占视网膜混合细胞比例多于加入BSA培养的对照组(表2,图2A、B),即实验组中光感受器细胞存活率高于对照组。PDGF-C蛋白组与BSA组光感受器细胞存活率比较,组间差异有统计学意义(图2C)。

2.3 PDGF-C蛋白治疗对Pde6brd1小鼠视网膜的作用

Pde6brd1小鼠P3时进行视网膜下注射PDGF-C蛋白或者BSA,P24收眼球切片、染色结果显示,镜下显示视网膜整体厚度变薄,以外核层变薄为主,内核层及节细胞层暂未见明显异常。注射BSA的对照组中rd1的外核层仅可见1~2层细胞,注射PDGF-C蛋白的实验组中Pde6brd1的外核层细胞层数较对照组多,可见约3~4层细胞(表3,图3A、B)。统计显示,注射PDGF-C蛋白的实验组外核层中的每100 μm 细胞计数(38.4 ± 6.1)较对照组(27.2 ± 5.3)增加,组间差异有统计学意义(图3C)。

3 讨论

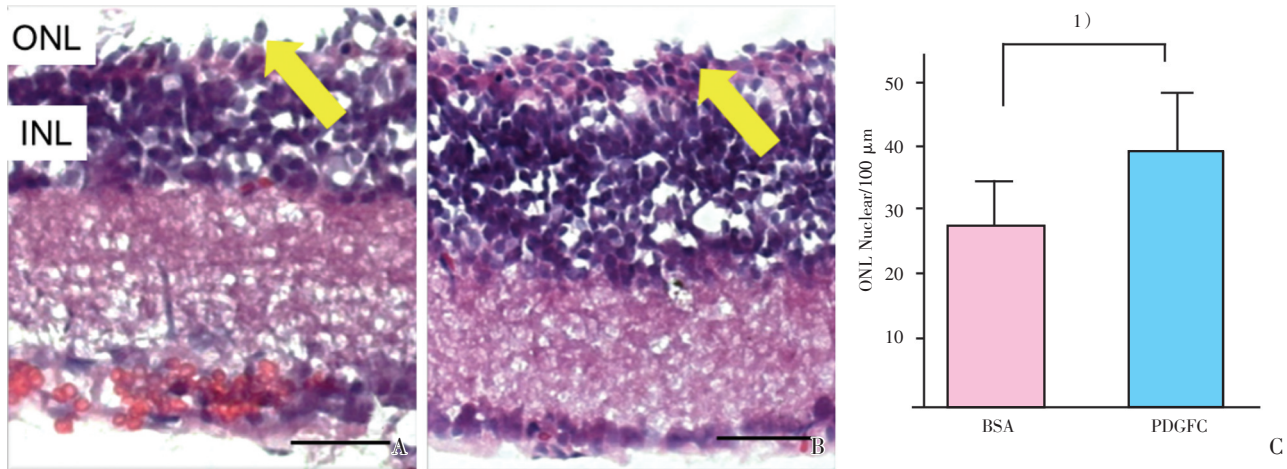
视网膜退行性病变目前作为一类主要的致盲性眼病,其患病率逐年提升。而该退行性疾病与视神经细胞、感光细胞及视网膜色素细胞的病变密不可分。以往基础研究中,许多具有神经保护功能的因子或功能蛋白都曾被应用于探究对视神经细胞及视网膜色素细胞损伤的疗效,并取得较



A: BSA treated group, $\times 10$; B: PDGF-C treated group, $\times 10$; C: Analysis of ratio of photoreceptor cells and retina mix cells after interfering PDGF-C protein and BSA. Green: recoverin, blue: DAPI. $P < 0.001$ vs control group, $n = 10$.

图2 PDGF-C蛋白对体外培养Pde6brd1视网膜原代细胞的作用

Fig.2 PDGF-C protein and BSA treatment effect for primary cell culture of Pde6brd1 mouse retina



A: PDGF-C protein injection group, $\times 20$; B: BSA injection group, $\times 20$; C: Analysis of ONL cell number. Yellow arrows show photoreceptor cells remain in ONL. ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer. $P < 0.05$ vs control group, $n = 12$, Bar = 50 μm .

图3 PDGF-C蛋白治疗对Pde6brd1视网膜的作用

Fig.3 PDGF-C protein and BSA treatment effect for Pde6brd1 mouse

好的结果,如神经生长因子家族、胶质细胞源生长因子家族、节细胞源生长因子等。而对于疾病原因中的重要一环的光感受器细胞的保护则一直未有较大进展。

以往研究发现 PDGF-C 可能对损伤修复起作用^[14],前期实验中发现搭载了腺相关病毒的 PDGF-C 也对视网膜中的光感受器细胞有保护作用^[16]。由于该腺相关病毒中蛋白的表达需要 4-5 天,而在急性视网膜退行性病变中神经保护问题急需解决,与此同时腺相关病毒成本高,为了探寻在腺相关病毒蛋白表达前,单独使用 PDGF-C 蛋白对视网膜光感受器细胞早期的保护作用,两者疗效对比及后续进一步 PDGF-C 蛋白联合基因治疗的可能性及疗效,本实验使用 PDGF-C 蛋白,并通过体外及体内两方面实验验证 PDGF-C 的疗效。

本实验采用体外培养的紫外线诱导 661W 细胞损伤模型。661W 细胞是视网膜光感受器细胞系^[17],已有研究表明紫外线对细胞 DNA 有损伤,从而导致细胞凋亡。实验发现,在紫外线照射培养的 661W 细胞 10 min 后,PDGF-C 蛋白处理组较 BSA 对照组的细胞存活率明显提高,证明 PDGF-C 蛋白对紫外线照射诱导 661W 细胞损伤模型有神经保护作用。

为了进一步验证 PDGF-C 的神经保护作用,

本实验还选取了 Pde6brd1 小鼠作为光感受器细胞损伤的动物模型。与以往研究中常作为视网膜色素变性模型的 Pde6brd0 不同的是, Pde6brd1 小鼠是一个经典的急性视网膜色素变性的动物模型^[18]。在 P3 时检测视网膜,可见生化指标的改变,在 P10 视网膜的外核层开始出现变化,细胞出现凋亡,在 P24 时外核层仅剩 1-2 层细胞。本实验通过使用该急性病变模型,能更好验证 PDGF-C 的神经保护作用的有效性及其高效性。在该急性病变模型的体外培养的视网膜原代细胞以及在体实验中,PDGF-C 蛋白处理组较 BSA 对照组的光感受器细胞存活率都明显提高,证明了 PDGF-C 在急性视网膜色素变性的动物模型中较强及高效的神经保护作用。然而与前期实验中使用的腺相关病毒搭载的 PDGF-C 相比^[18],PDGF-C 蛋白的神经保护作用稍弱,考虑与蛋白的代谢耗尽有关,提示单纯蛋白治疗虽有高效性但持续性不足,并为后续蛋白联合基因治疗提供了思路。

综上所述,目前临床上对光感受器细胞损伤的治疗并不理想。本实验通过体外及在体实验均证明 PDGF-C 蛋白对视网膜外核层细胞即光感受器细胞起到了有效的保护作用,与前期实验中的结果相结合,提示 PDGF-C 蛋白联合基因治疗视网膜变性疾病具有良好的潜在临床应用前景。

参考文献

- [1] Lewallen S, Lansingh V, Thulasiraj RD. Vision 2020: moving beyond blindness[J]. Intern Health, 2014, 6(3):158-159.
- [2] Wang B, Congdon N, Bourne R, et al. Burden of vision loss associated with eye disease in China 1990-2020: findings from the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. Br J Ophthalmology, 2018, 102(2): 220-224.
- [3] Anil K, Garip G. Coping strategies, vision-related quality of life, and emotional health in managing retinitis pigmentosa: a survey study[J]. BMC ophthalmology, 2018, 18(1): 21-25.
- [4] García-Layana A, Cabrera-López F, García-Arumí J, et al. Early and intermediate age-related macular degeneration: update and clinical review [J]. Clin Inter Aging, 2017, 12(7): 1579-1587.
- [5] Huang F, Dong X, Zhang L, et al. The neuroprotective effects of NGF combined with GM1 on injured spinal cord neurons in vitro [J]. Brain Res Bulletin, 2009, 79(1):85-88.
- [6] Anton S, Tsybko, Tatiana V. Ilchibaeva, Nina K. Popova. Role of glial cell line-derived neurotrophic factor in the pathogenesis and treatment of mood disorders[J]. Reviews in the Neurosciences, 2017, 28(3): 219-233.
- [7] Johnson TV, Bull ND, Martin KR. Neurotrophic factor delivery as a protective treatment for glaucoma [J]. Experimental eye research, 2011, 93(2): 196-203.
- [8] Wen R, Tao W, Li Y. CNTF and retina [J]. Progress in retinal and eye research, 2012, 31(2): 136-151.
- [9] Ying G, Guan G, Ning M, et al. CNTF protects neurons from hypoxic injury through the activation of STAT3pTyr705 [J]. Inter J Mole Med, 2016, 38(6):1915-1921.
- [10] Ouyang L, Zhang K, Chen J, et al. Roles of platelet-derived growth factor in vascular calcification [J]. J Cell Phys, 2018, 233(4):2804-2814.
- [11] Son D, Na Y, Hwang E, et al. Platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) induces anti-apoptotic effects on macrophages through Akt and Bad phosphorylation [J]. J Bio Chemistry, 2014, 289(9): 6225-6235.
- [12] Wang Y. Platelet-derived growth factor (PDGF)-C inhibits neuroretinal apoptosis in a murine model of focal retinal degeneration [J]. Lab Invest, 2014, 94(6):674-682.
- [13] Hurst NJ, Najy AJ, Ustach CV, et al. Platelet-derived growth factor-C (PDGF-C) activation by serine proteases: implications for breast cancer progression [J]. Biochemical J, 2012, 441(3):909-918.
- [14] He C, Zhao C, Kumar A, et al. Vasoprotective effect of PDGF-CC mediated by HMOX1 rescues retinal degeneration [J]. PNAS, 2014, 111(41): 14806-14811.
- [15] Han J, et al. Review: the history and role of naturally occurring mouse models with Pde6b mutations [J]. Mole Vision, 2013, 19(9):2579-2589.
- [16] Matthew R, Grace W, Muayyad R, et al. Pigment epithelium-derived factor protects cone photoreceptor-derived 661w cells from light damage through akt activation [M]. Springer New York: 2014, 801(9): 813-820.
- [17] Chang B, Hawes NL, Pardue MT, et al. Two mouse retinal degenerations caused by missense mutations in the β -subunit of rod cGMP phosphodiesterase gene [J]. Vision Research, 2007, 47(5): 624-633.
- [18] 张汝婷,陈伟,唐仲书. PDGF-C在退行性视网膜病变模型中的神经保护作用[J]. 热带医学杂志, 2018, 18(4):432-434,555.
- Zhang R, Chen W, Tang Z. Neuroprotective effect of PDGF-C in retina degeneration models [J]. J Trop Med, 2018, 18(4):432-434,555.

(编辑 徐杰)