

doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2020.12.07

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1000-4432.2020.12.07>

· 论著 ·

## 玻璃膜疣主要成分胆固醇对人视网膜色素上皮细胞 金属硫蛋白表达的影响

张敏<sup>1</sup>, 张鹏<sup>2</sup>, 赵洪礼<sup>2,3</sup>

(1. 沈阳大学生命科学与工程学院, 城市有害生物治理与生态安全辽宁省重点实验室, 沈阳 110044;  
2. 辽宁何氏医学院基础医学院, 沈阳 110163; 3. 沈阳百发科技有限公司, 沈阳 110163)

**[摘要]** 目的: 研究玻璃膜疣主要成分胆固醇对人视网膜色素上皮细胞ARPE-19中金属硫蛋白表达的影响。方法: 体外培养ARPE-19细胞, 将细胞分为对照组和胆固醇处理组(2.5 mg/mL), 取样时间为0, 6, 12, 24, 48, 72 h。通过实时定量PCR检测hMT1a, hMT2a和hMT3在转录水平的表达, 用蛋白质印迹法检测总金属硫蛋白的表达。结果: 在转录水平上hMT1a, hMT2a和hMT3受到胆固醇影响mRNA表达上调, 且hMT3上调倍数最大; 总金属硫蛋白的蛋白表达随着胆固醇处理时间延长明显增多。结论: 玻璃膜疣主要成分胆固醇可以上调人视网膜色素上皮细胞中金属硫蛋白的表达, 提示金属硫蛋白表达可受到玻璃膜疣形成起始阶段的刺激, 其检测是否能用于年龄相关性黄斑变性的早期发现及早期诊断还需深入探讨。

**[关键词]** 金属硫蛋白; 胆固醇; 玻璃膜疣; 人视网膜色素上皮细胞

## Effect of cholesterol exposure on the expression of metallothionein in human retinal pigment epithelial cells

ZHANG Min<sup>1</sup>, ZHANG Peng<sup>2</sup>, ZHAO Hongli<sup>2,3</sup>

(1. Liaoning Key Laboratory of Urban Integrated Pest Management and Ecological Security, College of Life Science and Bioengineering, Shenyang University, Shenyang 110044; 2. Basic Medical School, He University, Shenyang 110163;  
3. Shenyang Baifa Technology Co., Ltd., Shenyang 110163, China)

**Abstract** **Objective:** To study the effects of cholesterol, the main component of drusen, on the expression of metallothionein of ARPE-19 cells. **Methods:** The ARPE-19 cell line was cultured in vitro, and the cells were divided into a control group and a cholesterol treatment group (2.5 mg/mL). The treatment time was 0, 6, 12, 24, 48, 72 hours. Real-time quantitative PCR was used to detect the expression of hMT1a, hMT2a and hMT3 at the mRNA level, and Western blot was used to detect the expression at the protein level. **Results:** The mRNA expression of hMT1a,

收稿日期 (Date of reception): 2020-10-14

通信作者 (Corresponding author): 赵洪礼, Email: zhaohongli221@163.com

基金项目 (Foundation item): 辽宁省自然科学基金博士科研启动基金项目 (20170520050)。This work was supported by Liaoning Natural Science Foundation Doctoral Program of Scientific Research Startup Fund, China (20170520050).

hMT2a and hMT3 were up-regulated by cholesterol and the protein expression of total MTs was increased with cholesterol treatment. **Conclusion:** Cholesterol, the main component of drusen, can up-regulate the expression of metallothionein in human retinal pigment epithelial cells, suggesting that the expression of metallothionein can be stimulated by the initial stage of drusen formation. However, whether its detection can be used for the early detection and early diagnosis of age-related macular degeneration or not still needs to be further explored.

**Keywords** metallothionein; cholesterol; retinal drusen; retinal pigment epithelial cells

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是广泛存在于动植物和微生物组织中的一类能螯合大量金属离子的小分子蛋白质, 具有极强的清除活性氧与抗氧化能力, 在体内主要具有参与微量元素代谢、重金属解毒、清除羟基自由基、拮抗电离辐射及参与机体应激反应、增强机体对抗不良状态的适应能力等多种作用<sup>[1-3]</sup>。MT可在眼睛中大量表达<sup>[4-5]</sup>。MTs(特别是MT-1, MT-2, MT-3)的积累是视网膜变性疾病的重要保护机制, 如年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)和视网膜色素变性<sup>[6-7]</sup>。氧化应激和/或锌毒性是这些疾病的一种共同途径<sup>[6]</sup>。作为抗氧化剂, MT可在防御视网膜色素上皮细胞氧化损伤和细胞凋亡中发挥重要作用, 如可保护视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelial cells, RPE)免于光辐射损伤<sup>[8-14]</sup>。研究MTs的表达模式和功能可以拓宽对这些疾病引发的内源性分子响应的理解, 并有助于开发新的治疗策略<sup>[6,12,15]</sup>。

目前AMD的发病机制尚不清楚, 可能是氧化应激、炎症、基因和环境等多因素相互作用的结果<sup>[16]</sup>。AMD可分为干性(地图萎缩样, 85%~90%)和湿性(脉络膜新生血管, 10%~15%)两种。玻璃膜疣是干性AMD的主要特征, 是其最早期的眼底表现, 与AMD的进展密切相关<sup>[16-17]</sup>。研究<sup>[17-19]</sup>表明: 玻璃膜疣形成起始阶段为在RPE下层以含胆固醇的脂滴为核心, 微小羟基磷灰石球粒沉积, 而其外层被A $\beta$ 、玻连蛋白、补体因子H等蛋白质包被覆盖。有学者<sup>[18-19]</sup>在实验室培养过程中重建了仅依赖于RPE细胞的玻璃膜疣生物发生过程, 表明了RPE细胞可能是细胞外玻璃膜疣形成的起始和调控关键位置。所以RPE功能异常可能既是玻璃膜疣形成后对RPE影响的结果, 也可能是玻璃膜疣形成的主要因素。本研究利用玻璃膜疣形成起始阶段的主要成分胆固醇培养人RPE细胞, 分析RPE细胞中金属硫蛋白转录水平和蛋白水平表达上的变化, 初步探索人RPE细胞金属硫蛋白与玻璃膜疣形成的

关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人视网膜色素上皮细胞体外培养ARPE-19细胞株购自北纳生物(细胞系); 胆固醇( $\geq 99\%$ )购自美国Sigma公司; 总金属硫蛋白抗体购自美国Proteintech公司; 荧光染料使用美国Roche公司的light cycler 480 SYBR Green I Master。

### 1.2 人视网膜色素上皮细胞 ARPE-19 细胞培养

将ARPE-19细胞系解冻离心后接种于含体积分数10%胎牛血清的DMEM/F12培养液中, 置于37℃、体积分数为5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。生长至大部分细胞接近融合状态时使用0.25%胰蛋白酶消化传代。第3~5代细胞用于后续实验。

### 1.3 ARPE-19 细胞培养处理

设置正常对照组: 正常培养, 分别取培养0, 6, 12, 24, 48, 72 h不同细胞周期的ARPE-19细胞离心取细胞, 液氮速冻后做好标记-80℃保存。

胆固醇处理组: 以胆固醇浓度2.5 mg/mL培养(血液中的胆固醇浓度大约是200 mg/dL左右, 也就是2 mg/mL), 分别在培养不同时间点0, 6, 12, 24, 48, 72 h取细胞样, PBS缓冲液漂洗3次后, 液氮速冻做好标记-80℃保存。

不同处理组光学显微镜下观察取图, 记录好培养过程中细胞变化。

### 1.4 实时定量 PCR 检测转录水平的变化

吸去细胞原培养液, PBS洗1次, 用胰酶消化细胞, 1 000 r/min离心5 min, PBS重悬细胞, 1 000 r/min离心5 min弃上清。采用TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit进行RNA提取, 以gDNA Eraser与RNA溶液混合在42℃共浴

2 min去除基因组DNA, 之后反转录试剂盒反转录获得mRNA。采用荧光定量PCR(quantitative real time-PCR, qRT-PCR)技术检测mRNA转录表达水平变化, 以Tubulin为内参, 利用SYBR Green I荧光染料反应、循环数Ct值法在ABI荧光实时定量PCR仪上检测分析。内参Tubulin和3个金属硫蛋白基因hMT1a, hMT2a, hMT3的引物序列见表1。

表1 实时定量PCR引物

Table 1 Primes of quantitative real time PCR

| 基因名称                | 引物序列   | 长度/bp |
|---------------------|--|-------|
| Tubulin             | 正向引物: 5'-GGACCGCATCTCTGTGTACT-3'<br>反向引物: 5'-CCITTGGCCCAGITGTTACC-3' | 180   |
| hMT1a (NM_005946.3) | 正向引物: 5'-AGGTCTGTGATGTCTGCCA-3'<br>反向引物: 5'-GCACTGCGACCACTAAAAC-3'   | 166   |
| hMT2a (NM_005953.5) | 正向引物: 5'-GGACCCCAACTGCTCCTG-3'<br>反向引物: 5'-CTTCTCTGATGCCCTTTC-3'     | 160   |
| hMT3 (NM_005954.4)  | 正向引物: 5'-TGGATCCCAACTGCTCCTG-3'<br>反向引物: 5'-GACGCCCTTTCAGATG-3'      | 156   |

## 2 结果

### 2.1 胆固醇对RPE细胞金属硫蛋白转录水平表达的影响

通过实时定量PCR检测正常培养对照组和加入玻璃膜疣主要成分胆固醇(2.5 mg/mL)处理0, 6, 12, 24, 48, 72 h不同时间段ARPE-19细胞中三个金属硫蛋白hMT1a, hMT2a, hMT3转录水平的表达情况。结果表明: 在正常培养条件下, 随着时间延长, hMT1a, hMT2a, hMT3 mRNA表达略有变化, 但变化不明显, 差异不具有统计学意义( $P>0.05$ , 图1)。加入胆固醇培养后, 与对照组相比, 随着时间延长, hMT1a, hMT2a, hMT3 mRNA表达都呈现上调的趋势, 都是在12 h明显增高, 在24 h增高达到顶峰, 48 h mRNA表达低于24 h但也是上调, 在72 h时其表达略低于对照组但变化不显著。其中hMT1a转录水平最高上调了4.9倍, hMT2a转录水平最高上调了17倍, hMT3转录水平最高上调了35倍。这些结果表明胆固醇处理下以hMT1a, hMT2a, hMT3为代表的金属硫蛋白转录水平表达上调, 并且hMT3的变化最大。

### 1.5 蛋白质印迹法检测

提取细胞总蛋白, 以BCA试剂盒检测总蛋白含量。以SDS-PAGE电泳分离蛋白质, 转PVDF膜后一抗和二抗孵育, 以蛋白质印迹法比较不同处理下的蛋白表达量变化。凝胶系统观察取图, 以Tubulin蛋白为标准参照, 用Image J软件对图片结果进行灰度扫描分析。

### 2.2 胆固醇对RPE细胞金属硫蛋白蛋白水平表达的影响

通过蛋白质印迹法检测正常培养和2.5 mg/mL胆固醇处理0, 6, 12, 24, 48, 72 h不同培养时间ARPE-19细胞中总金属硫蛋白的蛋白表达情况(图2)。结果表明: 在正常培养时随培养时间延长金属硫蛋白表达略有增多, 胆固醇处理24 h后金属硫蛋白含量明显增多(图2A)。为定量比较两组蛋白表达的变化, 对蛋白质印迹法结果进行了灰度分析。对照组金属硫蛋白的蛋白含量变化无明显趋势, 到12 h略有降低, 继续培养到48 h含量增多, 之后在72 h出现回落。加入胆固醇培养的ARPE-19细胞中金属硫蛋白的蛋白含量随时间延长不断增多, 在24 h开始增多, 48 h和72 h时增加倍数最大, 最高增多了约4倍(图2B)。与转录水平相比, 胆固醇处理组MT蛋白水平表达增多时间上略有延迟。mRNA水平是从12 h开始上调, 到24 h水平最高, 在48 h开始回落(图1)。这些结果表明: 胆固醇处理下金属硫蛋白的蛋白表达水平明显上调。

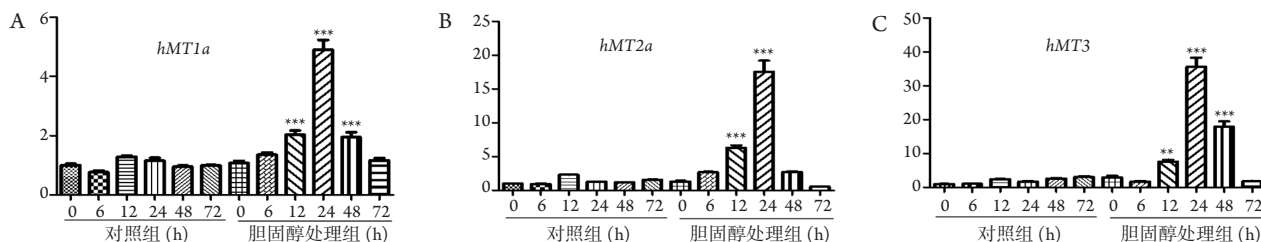


图1 胆固醇对(A) *hMT1a*, (B) *hMT2a*, (C) *hMT3* 3个基因mRNA表达水平的影响

Figure 1 The effect of cholesterol treatment on the mRNA expression levels of the three genes (A) *hMT1a*, (B) *hMT2a*, (C) *hMT3*

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

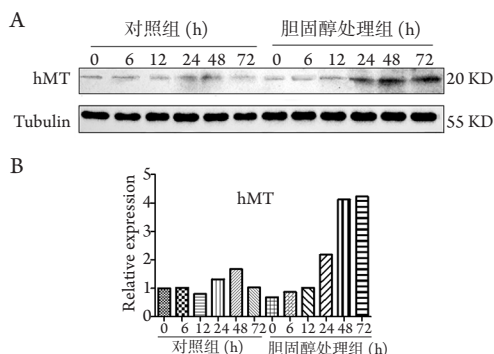


图2 蛋白质印迹法检测胆固醇对总金属硫蛋白表达水平的影响

Figure 2 Western blot detection of the effect of cholesterol treatment on the protein expression levels of total metallothionein

(A)蛋白质印迹法检测结果; (B)蛋白质印迹法检测的灰度分析结果。以Tubulin蛋白的蛋白质印迹法结果的灰度为参照。

(A) The result of Western blot detection; (B) Gray analysis results of Western blot detection. Take the grayscale of the Western blotting result of tubulin protein of each sample as a reference.

### 3 讨论

虽然MT在疾病发生的机制方面有待深入, 但其在研究疾病研究中所显现出来的重要作用得到了许多科研工作者的重视<sup>[2-3]</sup>。MT结合金属离子及清除氧自由基的功能使其在抗衰老、氧化应激及细胞凋亡等过程中发挥重要作用<sup>[1-3,12]</sup>。MT在许多疾病中的表达上调或下调可以作为疾病检测的标志蛋白, 或者可能成为新的治疗方法的靶点<sup>[6,20]</sup>。在大鼠眼部组织中, MT可明显表达于角膜上皮细胞、晶状体、视网膜色素上皮层、视神经胶质细胞等, 在神经纤维层也见表达<sup>[4]</sup>。在AMD患者的RPE细胞中检测到MT的表达, 并且过量表达MT3可能诱导血管内皮生长因子的表达来抑制激光诱

导的小鼠脉络膜新生血管的进程<sup>[5,20]</sup>。因此视网膜色素上皮细胞中MT的检测可能有利于AMD的早期发现、早期诊断及早期治疗。但是目前对于MT与AMD特别是干性AMD发展进程的关系尚不清楚。

在本研究中, 以干性AMD的标志物玻璃膜疣形成起始阶段的主要成分胆固醇作用于RPE细胞, 检测金属硫蛋白转录和蛋白表达水平的变化, 发现胆固醇暴露使*hMT1a*, *hMT2a*, *hMT3*的mRNA表达上调, 其中*hMT3*的表达上调倍数最大。在蛋白水平上, 总金属硫蛋白表达量明显增多。这些结果表明RPE细胞金属硫蛋白可能受到玻璃膜疣形成起始阶段脂质积累的刺激, 特别是*hMT3*。金属硫蛋白家族主要有4种类型, 其中MT1和MT2在所有组织大量表达, MT3主要在神经系统包括视网膜中表达, MT4在皮肤上皮细胞中特异表达<sup>[1-2,4]</sup>。在小鼠中, MT3在RPE中的表达水平可能低于MT1a和MT2a<sup>[12]</sup>。但与MT1/MT2缺失相比, MT3缺失加剧了光暴露下小鼠视网膜细胞损伤和活性氧产生, 表明MT3可能比MT1/MT2在视网膜中发挥了更大作用<sup>[13]</sup>。而在本研究中受胆固醇刺激, 金属硫蛋白表达量明显增多, 但其中*hMT3*变化最明显, 表明相比于*hMT1a*和*hMT2a*可能*hMT3*与玻璃膜疣形成起始阶段关系更加密切, 值得深入探讨。

AMD早期最显著的特征是眼底黄斑玻璃膜疣, 对早期AMD患者, 观察黄斑区玻璃疣的特征及发展, 对AMD的早期诊断和预后具有重要价值<sup>[16]</sup>。金属硫蛋白可在玻璃膜疣形成初期出现表达上的变化, 表明其可能与玻璃膜疣的发生发展密切相关, 可能成为早期AMD中玻璃膜疣生物发生新的标志物。但金属硫蛋白是否可作为AMD的早期检测的标志物或影响玻璃膜疣形成进程尚需进一步探讨。

## 参考文献

1. 宁凤, 傅俊江, 陈汉春. 金属硫蛋白及其生物学功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(9): 46-52.  
NING Feng, FU Junjiang, CHEN Hanchun. Metallothionein and their biological functions[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 33(9): 46-52.
2. 蒋仕秋, 曾江华, 刘海荣, 等. 金属硫蛋白2A生物学功能及其在临床中的作用研究[J]. 成都医学院学报, 2019, 14(6): 823-826.  
JIANG Shiqiu, CENG Jianghua, LIU Hairong, et al. Study on biological function of metallothionein 2a and its clinical role[J]. Journal of Chengdu Medical College, 2019, 14(6): 823-826.
3. Lindeque JZ, Levanets O, Louw R, et al. The involvement of metallothioneins in mitochondrial function and disease[J]. Curr Protein Pept Sci, 2010, 11(4): 292-309.
4. Nishimura H, Nishimura N, Kobayashi S, et al. Immunohistochemical localization of metallothionein in the eye of rats[J]. Histochemistry, 1991, 95(6): 535-539.
5. Sato M, Abe T, Tamai M. Analysis of the metallothionein gene in age-related macular degeneration[J]. Jpn J Ophthalmol, 2000, 44(2): 115-121.
6. Ito Y, Tanaka H, Hara H. The potential roles of metallothionein as a therapeutic target for cerebral ischemia and retinal diseases[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2013, 14(4): 400-407.
7. Tate DJ, Miceli MV, Newsome DA. Phagocytosis and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995, 36(7): 1271-1279.
8. Karlsson M, Kurz T. Attenuation of iron-binding proteins in ARPE-19 cells reduces their resistance to oxidative stress[J]. Acta Ophthalmol, 2016, 94(6): 556-564.
9. Karlsson M, Frennesson C, Gustafsson T, et al. Autophagy of iron-binding proteins may contribute to the oxidative stress resistance of ARPE-19 cells[J]. Exp Eye Res, 2013, 116: 359-365.
10. Alvarez L, Garcia M, Rodriguez SM, et al. The zinc-metallothionein redox system in human retina and RPE[J]. Acta Ophthalmol, 2016, 94: S256.
11. Gonzalez-Iglesias H, Alvarez L, Garcia M, et al. Metallothioneins (MTs) in the human eye: a perspective article on the zinc-MT redox cycle[J]. Metallomics, 2014, 6(2): 201-208.
12. Lu H, Hunt DM, Ganti R, et al. Metallothionein protects retinal pigment epithelial cells against apoptosis and oxidative stress[J]. Exp Eye Res, 2002, 74(1): 83-92.
13. Tsuruma K, Shimazaki H, Ohno Y, et al. Metallothionein-III deficiency exacerbates light-induced retinal degeneration[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(12): 7896-7903.
14. Chen L, Wu W, Dentchev T, et al. Increased metallothionein in light damaged mouse retinas[J]. Exp Eye Res, 2004, 79(2): 287-293.
15. Suemori S, Shimazawa M, Kawase K, et al. Metallothionein, an endogenous antioxidant, protects against retinal neuron damage in mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(9): 3975-3982.
16. Zajac-Pytrus HM, Pilecka A, Turno-Kręcicka A, et al. The dry form of age-related macular degeneration (AMD): the current concepts of pathogenesis and prospects for treatment[J]. Adv Clin Exp Med, 2015, 24(6): 1099-1104.
17. Thompson RB, Reffatto V, Bundy JG, et al. Identification of hydroxyapatite spherules provides new insight into subretinal pigment epithelial deposit formation in the aging eye[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(5): 1565-1570.
18. Usui H, Nishiwaki A, Landiev L, et al. In vitro drusen model-three-dimensional spheroid culture of retinal pigment epithelial cells[J]. J Cell Sci, 2019, 132(4): jcs215798.
19. Pilgrim MG, Lengyel I, Lanzirotti A, et al. Subretinal pigment epithelial deposition of drusen components including hydroxyapatite in a primary cell culture model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(2): 708-719.
20. Choi JA, Hwang JU, Yoon YH, et al. Metallothionein-3 contributes to vascular endothelial growth factor induction in a mouse model of choroidal neovascularization[J]. Metallomics, 2013, 5(10): 1387-1396.

本文引用: 张敏, 张鹏, 赵洪礼. 玻璃膜疣主要成分胆固醇对人视网膜色素上皮细胞金属硫蛋白表达的影响[J]. 眼科学报, 2021, 36(2): 128-132. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2020.12.07

**Cite this article as:** ZHANG Min, ZHANG Peng, ZHAO Hongli. Effect of cholesterol exposure on the expression of metallothionein in human retinal pigment epithelial cells[J]. Yan Ke Xue Bao, 2021, 36(2): 128-132. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2020.12.07