

doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2021.09.06

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1000-4432.2021.09.06>

· 论著 ·

胆固醇对人视网膜色素上皮细胞钙转运通道表达的影响

张敏¹, 张朔², 张鹏³, 赵洪礼²

- (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. 沈阳百发科技有限公司, 沈阳 110163; 3. 辽宁何氏医学院基础医学院, 沈阳 110163)

[摘要] 目的: 玻璃膜疣主要成分胆固醇对人视网膜色素上皮细胞ARPE-19中细胞膜钙ATP酶1(plasma membrane Ca²⁺ ATPase 1, PMCA1)、L型电压依赖性钙离子通道(L-type voltage-dependent calcium channel, LVDCC)和细胞膜钠钙交换蛋白1(sodium calcium exchange protein 1, NCX1)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PMCA1、LVDCC和NCX1 mRNA的表达水平, 用蛋白质印迹法检测蛋白质的表达水平。结果: 主要负责细胞内钙离子外排的PMCA1的mRNA和蛋白表达水平在胆固醇处理下出现下调。在胆固醇处理下, 钙流入通道LVDCC和钙稳态调控蛋白NCX1的mRNA和蛋白表达明显增多, 并且呈现时间依赖性, 都是在24 h或48 h表达最多后出现回落。其中LVDCC表达上调倍数较大。结论: 玻璃膜疣主要成分胆固醇可以影响人视网膜色素上皮细胞中钙转运通道蛋白的表达, PMCA1的表达受到胆固醇抑制, LVDCC和NCX1的表达受到胆固醇处理上调。这可能会影响细胞内钙离子外排, 引起钙离子内流, 是否能进一步导致细胞内钙超载而引起细胞凋亡, 值得探讨。

[关键词] 钙离子通道; 视网膜色素上皮细胞; 胆固醇; 玻璃膜疣

Effect of cholesterol exposure on the expression of calcium transport channels in human retinal pigment epithelial cells

ZHANG Min¹, ZHANG Shuo², ZHANG Peng³, ZHAO Hongli²

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

Abstract Objective: To study the effects of cholesterol, the main component of drusen, on the expression plasma

收稿日期 (Date of reception): 2021-03-25

通信作者 (Corresponding author): 赵洪礼, Email: haohongli221@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).

membrane Ca^{2+} ATPase 1 (PMCA1), L-type voltage-dependent calcium channel (LVDCC) and cell membrane sodium calcium exchange protein 1 (NCX1) 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 PMCA1, LVDCC and NCX1 at the mRNA level, and western blot was used to detect the expression at the protein level. **Results:** The mRNA and protein expression levels of PMCA1 which mainly responsible for the efflux of intracellular calcium ions, was down regulated under cholesterol treatment. Meanwhile, the expression of the mRNA and protein of the calcium inflow channel LVDCC and calcium stability regulatory protein NCX1 were significantly increased, and the time-dependency was present, which was up expressed to 24 or 48 h and then fell back. Among them, the LVDCC expression had a large number of times. **Conclusion:** Cholesterol, the main component of drusen, can affect the expression of calcium channels in human retinal pigment epithelial cells. The expression of PMCA1 was suppressed by cholesterol, and expression of LVDCC and NCX1 were up-regulated with cholesterol treatment, which may affect intracellular calcium efflux then cause calcium influx. Whether it can further cause intracellular calcium overload and cell death is worth exploring.

Keywords calcium channels; retinal pigment epithelial cells; cholesterol; drusen

玻璃膜疣是黄斑老龄化的共同特征, 是其最早期的眼底表现, 是年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)的重要危险因素, 与AMD的进展密切相关^[1]。如果玻璃膜疣的形成能够被调整的话, AMD的发展进程可能延缓或者停止。已有研究^[2-4]表明玻璃膜疣形成起始阶段为在视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)下层微小羟基磷灰石球粒(不溶性碱性磷酸钙)以含胆固醇的脂滴为核心沉积, 而其外层被 $\text{A}\beta$ 、玻连蛋白、补体因子H等蛋白质包被覆盖。其中玻璃膜疣形成的起始成分为胆固醇, 钙元素在RPE下的积累特别是不溶性钙的沉积加速了玻璃膜疣的形成进程。同时在细胞内钙离子广泛参与细胞信号转导, 如果大量的钙离子内流引发钙超载可造成细胞的损伤及凋亡^[5-6]。本研究以细胞膜钙ATP酶1(plasma membrane Ca^{2+} ATPase 1, PMCA1)、L型电压依赖性钙离子通道(L-type voltage-dependent calcium channel, LVDCC)和细胞膜钠钙交换蛋白1(sodium calcium exchange protein 1, NCX1)三个钙转运通道为代表, 利用胆固醇培养人RPE细胞, 分析RPE细胞钙转运相关通道蛋白表达水平上的变化, 初步了解玻璃膜疣形成起始阶段与RPE细胞钙转运状态的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

ARPE-19细胞株购买自北纳生物(细胞系, 中国); 胆固醇($\geq 99\%$)购自美国Sigma公司; RIPA lysis buffer和BCA蛋白定量检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; PMCA1抗体购自于英国Abcam公司, NCX1和LVDCC抗体购自于美国Proteintech公司; 荧光染料购自瑞士Roche公司的light cycler 480 SYBR Green I Master。

1.2 体外培养 ARPE-19

将ARPE-19细胞株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_2 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。继代培养3~5代细胞用于后续实验。

1.3 胆固醇处理 ARPE-19 细胞

设置正常培养对照组和胆固醇处理组。具体方法见文献[7], 对照组按上述体外培养ARPE-19的方法正常培养。血液中的胆固醇浓度约为2 mg/mL。选择以略高于血液中胆固醇的浓度培养, 给予细胞一种类似于胆固醇在胞外略有积累

的环境。正常培养条件下和胆固醇浓度2.5 mg/mL培养条件下分别取培养0、6、12、24、48、72 h不同时间的ARPE-19细胞样品,液氮速冻后-80 °C保存用于后续检测。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 检测钙转运相关蛋白 RNA 水平的变化

吸去细胞原培养液, PBS清洗一次, 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 °C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Roche light cycler 480 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。反应程序为: 95 °C 10 min, 30 cycles(95 °C 10 s, 65 °C 15 s, 72 °C 20 s), 65~95 °C 0.5°C/5 s。LVDCC退火温度为60 °C。内参Tubulin和3个钙转运通道基因引物见表1。统计学软件为Excel 17.0, 利用方差分析进行显著性检验, 分别比较2个组不同处理时间与0 h时的表达变化。

表1 实时定量PCR引物

Table 1 Primers of quantitative real time PCR

Gene name (No.)	5'-3' Sequence	Size/bp
Tubulin	Forward: GGACCGCATCTCTGTGTACT	180
	Reverse: CCTTTGGCCCAGTTGTTACC	
NCX1 (Y13032.1)	Forward: GAGCCTTGCCAGTCCATTT	250
	Reverse: TGCAGAGGTGAGAITCAGGT	
LVDCC (BC146846.1)	Forward: TCTGTGTTGTGTCGCTTGG	235
	Reverse: GCCAITTCTCGCCTAGCTTC	
PMCA1 (NM_001366531.1)	Forward: CATCGAGGGAGAAAAGTGC	167
	Reverse: CTIGTTGCCGTGTCTTGGA	

1.5 蛋白质印迹法检测

以RIPA蛋白裂解液裂解细胞提取细胞总蛋白, 以BCA试剂盒检测蛋白浓度。12%凝胶浓度进行SDS-PAGE电泳分离蛋白质, 电转PVDF膜后一抗和二抗孵育, 蛋白质印迹法检测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 结果

2.1 胆固醇对 RPE 细胞 PMCA1、LVDCC 和 CX1 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

2.5 mg/mL胆固醇暴露处理0、6、12、24、48、72 h各时间段ARPE-19细胞中PMCA1、LVDCC和NCX1 mRNA表达的情况。结果表明: 在正常培养条件下, 随着时间延长, PMCA1 mRNA表达略有升高, 在72 h时有显著升高。而胆固醇暴露的ARPE-19细胞中PMCA1 mRNA表达水平明显低于对照组, 从6 h开始到72 h PMCA1 mRNA表达显著下调, 在12 h表达水平最低, 下调了约2倍, 但未呈现时间依赖性(图1A)。在正常培养条件下LVDCC mRNA表达也在72 h显著升高; 与对照组相比, 胆固醇处理组长时间培养(24 h和48 h)LVDCC mRNA表达明显上调, 24 h时表达上调了近4倍, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图1B)。在正常培养条件下NCX1 mRNA表达

水平随时间延长无明显变化, 而胆固醇处理后 NCX1 mRNA 表达水平明显高于对照组, 特别是在 24 h, 表达上调了近 6 倍(图 1C)。在胆固醇处理组 72 h 时 LVDCC 和 NCX1 mRNA 表达水平与处理 24 h、48 h 相比显著下调, 都是在处理时间超过 24 h 后表达出现回落, 表现出一定的时间效应。这些结果表明: 胆固醇处理下 PMCA1 转录水平表达显著降低, LVDCC 和 NCX1 转录水平表达上调。

2.2 胆固醇对 RPE 细胞 PMCA1、LVDCC 和 NCX1 蛋白质表达水平的影响

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 各时间段 ARPE-19 细胞中 PMCA1、LVDCC 和 NCX1 的蛋白

质表达的情况(图 2)。结果表明: 胆固醇处理 24 h 后 PMCA1 蛋白质含量明显降低, 特别是 72 h。胆固醇处理组的 LVDCC 和 NCX1 的蛋白质表达明显增多, 在 48 h 增加最明显。

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(图 3)。加入胆固醇培养的 ARPE-19 细胞中 PMCA1 蛋白质含量随时间延长不断降低, 最低在 72 h, 降低了约 2 倍(图 3A)。胆固醇处理组在 48 h LVDCC 蛋白质表达水平最高, 增高了约 4 倍(图 3B), NCX1 蛋白质含量在胆固醇暴露 48 h 增加约 1.7 倍(图 3C); 两个蛋白质的表达均是在 72 h 略低于 48 h。这些结果表明: 胆固醇处理下 PMCA1 蛋白质表达明显减少, LVDCC 和 NCX1 的蛋白质表达水平上调。

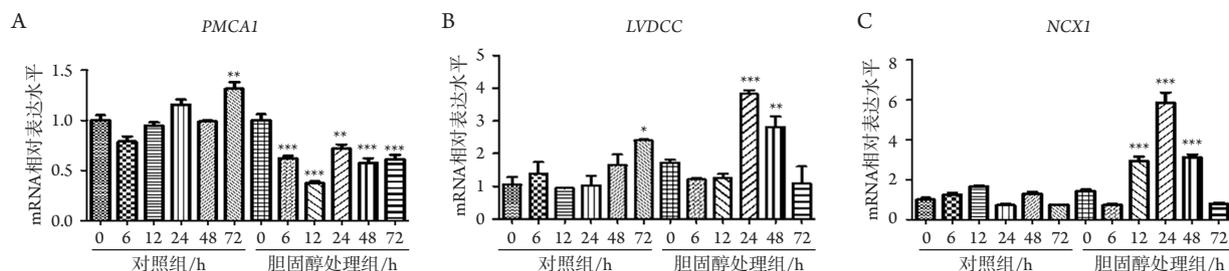


图1 胆固醇处理对PMCA1(A)、LVDCC(B)、NCX1(C)三个基因mRNA表达水平的影响

Figure 1 The effect of cholesterol treatment on the mRNA expression levels of the three genes PMCA1 (A), LVDCC (B) and NCX1 (C)

显著性检验是分别以对照组和胆固醇处理组各自的0h作差异分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

The significance test is to analyze the difference between the control group and the cholesterol-treated group at 0 h respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

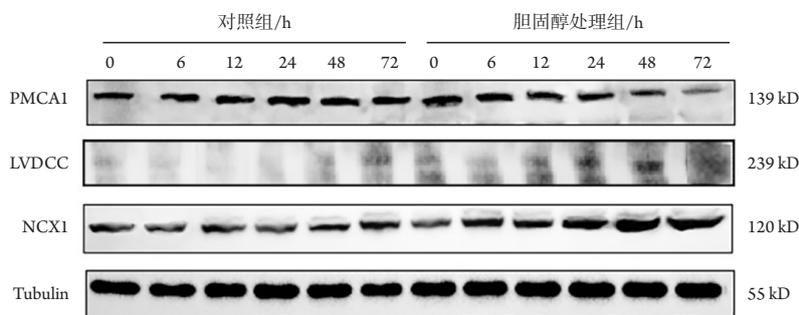


图2 蛋白质印迹法检测胆固醇处理对PMCA1、LVDCC、NCX1蛋白质表达水平的影响

Figure 2 Western blot detection of the effect of cholesterol treatment on the protein expression levels of PMCA1, LVDCC and NCX1

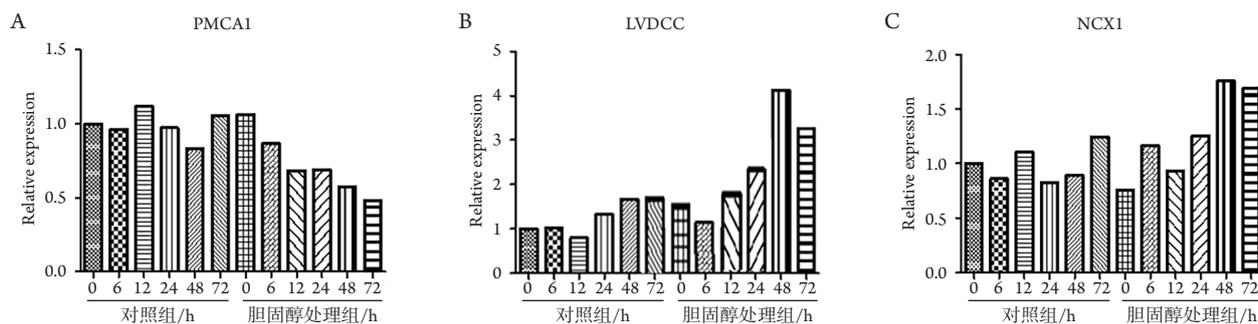


图3 蛋白质印迹法检测的灰度分析结果

Figure 3 Gray analysis results of western blotting detection

(A)PMCA1; (B)LVDCC; (C) NCX1。以蛋白质印迹法检测每个样品Tubulin蛋白结果的灰度为参照。

(A)PMCA1; (B) LVDCC; (C) NCX1. Take the grayscale of the western blotting result of tubulin protein of each sample as a reference.

3 讨论

玻璃膜疣位于RPE层及Bruch膜之间,是由RPE细胞残片、炎性因子、补体因子及补体激活物、脂褐素等堆积而成的细胞外沉积^[1,7-8]。玻璃膜疣的出现与危害视力的黄斑病变,如视网膜色素上皮脱离、萎缩和脉络膜新生血管的发生密切相关^[9]。已有研究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RPE细胞可能是细胞外玻璃膜疣形成的起始和调控的关键位置^[3-4]。RPE细胞具有转运视色素、转运营养成分和清除自由基等功能,RPE细胞功能正常对维持视网膜的功能和结构有重要意义。所以RPE功能异常可能既是玻璃膜疣形成的主要因素,也可能是玻璃膜疣形成后对RPE的影响结果,包括RPE细胞钙离子转运等功能。作为重要的第二信使,细胞内钙离子参与调控细胞的增殖、分化、自噬和凋亡等过程,对于细胞活力的维持至关重要^[6]。钙离子稳态失衡可能会引起RPE细胞功能障碍和细胞凋亡,而RPE细胞渐进性功能障碍或凋亡在AMD的发病进程中起至关重要的作用,RPE细胞凋亡也是干性AMD早期病理改变之一^[5,9-10]。起始阶段以胆固醇为核心的脂滴在细胞外不溶性钙的存在下加速滞留蛋白质,形成聚合物沉淀可能是玻璃膜疣形成的一种机制^[2]。综上所述,RPE细胞钙离子稳态可能与玻璃膜疣形成关系密切,存在互相影响。

本研究以玻璃膜疣形成起始阶段主要成分胆固醇作用于RPE细胞。通过检测三个钙离子相关转

运通道转录水平和蛋白质表达水平的变化,发现胆固醇使PMCA1表达减少,LVDCC和NCX1表达上调,且LVDCC表达上调倍数最大。其中PMCA1为细胞膜上将细胞内高浓度的钙离子转运至细胞外的钙泵,而通过LVDCC进入细胞是细胞外钙离子进入RPE细胞的主要方式,NCX1作为调控细胞内外钙离子稳态重要的跨膜转运蛋白,也是细胞内钙变化的关键钙通道^[11-13]。LVDCC在胆固醇处理下明显上调,可能促进细胞外钙离子进入细胞。而PMCA1和NCX1的下调,则有可能引起细胞内钙离子外排受阻。所以胆固醇暴露可能使RPE细胞的钙离子外排受到抑制,引进钙离子内流。胆固醇处理下NCX1和LVDCC的转录水平表达在24 h最高,之后48 h和72 h出现回落;其蛋白质水平表达在胆固醇处理48 h最多,在72 h略有降低,比转录水平表达增多的时间上略有延迟。这可能受处理时间延长导致死亡细胞增多的影响。玻璃膜疣形成起始阶段脂质积累的刺激,可能引起RPE细胞钙超载,从而导致细胞的凋亡。而死亡RPE细胞的碎片及钙离子的释放可能会继续促进玻璃膜疣聚合体的形成。本研究探讨了胆固醇对RPE细胞钙离子转运通道的影响,但胆固醇对RPE细胞凋亡的影响及此影响是否参与玻璃膜疣的形成过程尚需进一步探讨。

开放获取声明

本文适用于知识共享许可协议(Creative Commons),允许第三方用户按照署名(BY)-非商业

性使用(NC)-禁止演绎(ND)(CC BY-NC-ND)的方式共享,即允许第三方对本刊发表的文章进行复制、发行、展览、表演、放映、广播或通过信息网络向公众传播,但在这些过程中必须保留作者署名、仅限于非商业性目的、不得进行演绎创作。详情请访问:<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>。

参考文献

1. Hartmann KI, Gomez ML, Bartsch DU, et al. Effect of change in drusen evolution on photoreceptor inner segment/outer segment junction[J]. *Retina*, 2012, 32(8): 1492-1499.
2. 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.
3. 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*, 2018, 132(4): jcs215798.
4. 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.
5. 朱红娜, 乔瑛, 苏安乐, 等. 蓝光照射人视网膜色素上皮细胞后通过增加细胞内钙离子浓度促进凋亡的机制[J]. *中国医药导报*, 2016, 13(17): 4-7.
ZHU Hongna, QIAO Ying, SU Anle, et al. Blue light promotes apoptosis of human retinal pigment epithelial cells by up-regulation of intracellular calcium concentration[J]. *China Medical Herald*, 2016, 13(17): 4-7.
6. Bhosale G, Sharpe JA, Sundier SY, et al. Calcium signaling as a mediator of cell energy demand and a trigger to cell death[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2015, 1350(1): 107-116.
7. 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.
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.
8. de Jong PT. Drusen, AMD, and history[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2015, 253(12): 2061-2062.
9. Fernandez-Godino R, Pierce EA, Garland DL. Extracellular matrix alterations and deposit formation in AMD[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 854: 53-58.
10. Folgar FA, Yuan EL, Sevilla MB, et al. Drusen volume and retinal pigment epithelium abnormal thinning volume predict 2-year progression of age-related macular degeneration[J]. *Ophthalmology*, 2016, 123(1): 39-50.
11. Blaustein MP, Juhaszova M, Golovina VA, et al. Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 976(1): 356-366.
12. 孙中洋, 李东韬. 成骨细胞钾、钙离子通道的研究进展[J]. *解放军医学院学报*, 2014, 35(02), 186-189.
SUN Zhongyang, LI Dongtao. Advances in research on osteoblast potassium and calcium ion channels[J]. *Academic Journal of Chinese PLA Medical School*, 2014, 35(2): 186-189.
13. 黄邵洪, 荣健, 刘子由, 等. 大鼠在体心肌缺血再灌注损伤细胞膜钙转运通道蛋白mRNA的表达变化[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2011, 17(4): 295-298.
HUANG Shaohong, RONG Jian, LIU Ziyou, et al. Altered mRNA expression of sarcolemmal calcium transporting channel proteins in rat myocardial ischemia reperfusion injury in vivo[J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2011, 17(4): 295-298.

本文引用: 张敏, 张朔, 张鹏, 赵洪礼. 胆固醇对人视网膜色素上皮细胞钙转运通道表达的影响[J]. *眼科学报*, 2021, 36(10): 770-775. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2021.09.06

Cite this article as: ZHANG Min, ZHANG Shuo, ZHANG Peng, ZHAO Hongli. Effect of cholesterol exposure on the expression of calcium transport channels in human retinal pigment epithelial cells[J]. *Yan Ke Xue Bao*, 2021, 36(10): 770-775. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2021.09.06