

视网膜色素上皮细胞吞噬功能与 MERTK-Ras-肌球蛋白通路关系的研究

孙昱昭,张若霜,谷 峰

基金项目:沈阳市科技计划项目(No. F13-316-1-11)

作者单位:(110001)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学附属第一医院眼科

作者简介:孙昱昭,毕业于中国医科大学,眼科学博士,副教授,研究方向:视网膜变性基础研究、眼表角膜病的基础和临床研究。

通讯作者:孙昱昭. sunyz91667@sina.com

收稿日期:2015-10-16 修回日期:2015-12-20

Study on relation between the phagocytic fuction of retinal pigment epithelial cells and MERTK-Ras-myosin signal pathway

Yu-Zhao Sun, Ruo-Shuang Zhang, Feng Gu

Foundation item: Science and Technology Planning Project of Shenyang (No. F13-316-1-11)

Department of Ophthalmology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yu-Zhao Sun. Department of Ophthalmology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. sunyz91667@sina.com

Received:2015-10-16 Accepted:2015-12-20

Abstract

• **AIM:** To investigate relation between the phagocytic fuction of retinal pigment epithelial (RPE) cells and the signal transduction pathway of MERTK-Ras-extracellular signal regulated kinase kinase (MEK)-myosin light chain kinase (MLCK)-myosin.

• **METHODS:** Cultured 3~5 passage RPE cells of C57BL/6 mouse were incubated with rod outer segments (ROS) suspension (containing ROS 1×10^7 /ml) at 37°C, then cells were rinsed at different times (30, 60, 120, 180, 240min) to terminate the phagocytosis. The kinetics of phagocytosis was measured by double-fluorescent labeling. The activity levels of MERTK, Ras, MEK and MLCK at different incubation times were measured by Western Blot with antibodies of MERTK, Ras and phospho-antibodies of MEK and MLCK, respectively. To repeat the measurement of the phagocytic kinetics and activity levels of MERTK, Ras, MEK and MLCK at different incubation times after interference to Ras and MERTK gene in RPE cells by plasmid transfection.

• **RESULTS:** The phagocytic kinetics showed that the ingestion occurred at 30min of incubation. Ingested ROS by RPE cells increased until saturated at 180min. The protein levels of MERTK, Ras, MEK and MLCK in RPE

cells increased during all the incubation periods compared with control group ($P < 0.05$). After interference to Ras and MERTK gene in RPE cells by plasmid transfection, the protein levels of MERTK, Ras, MEK and MLCK and the quality of ingested ROS sustained at the lower levels during all the incubation periods, only a few ingested ROS were seen at 180 min. Compared with untransfected RPE cells, the protein levels of MERTK, Ras, MEK and MLCK and the quality of ingested ROS in siRas-RPE cells and siMERTK-RPE cells decreased distinctly at 120 min and 180 min during incubation ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Ras - MEK - MLCK - myosin signal pathway is the downstream of MERTK receptor in the phagocytic process of RPE cells from mice.

• **KEYWORDS:** retinal pigment epithelium; phagocytosis; MERTK; Ras; myosin

Citation: Sun YZ, Zhang RS, Gu F. Study on relation between the phagocytic fuction of retinal pigment epithelial cells and MERTK-Ras-myosin signal pathway. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016; 16(1):28-33

摘要

目的: 研究视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞吞噬功能与 MERTK 受体及其下游信号通路 Ras-MEK-MLCK-肌球蛋白的关系。

方法: 用视网膜外节膜盘 (rod outer segments, ROS) 于 37°C 孵育离体培养的 3~5 代 C57 小鼠 RPE 细胞, 在孵育 0、30、60、120、180、240min 终止吞噬反应。双重荧光标记法检测 RPE 细胞吞噬动力学; 以 MERTK 及 Ras 抗体、磷酸化 MEK 及 MLCK 抗体应用 Western-Blot 方法检测不同孵育时间 (30、60、120、180min) MERTK、Ras、MEK 及 MLCK 的激活状态; 以瞬时转染质粒方法抑制 Ras 及 MERTK 基因表达后, 再次以 Western-Blot 方法检测对应时间 MERTK-Ras 通路激活状态及吞噬功能的变化。

结果: C57 小鼠 RPE 细胞吞入 ROS 发生在孵育 30min, 并在 3h 达到饱和。在吞噬过程中, 随着孵育时间的延长, RPE 细胞 MERTK、Ras、MEK 和 MLCK 的蛋白表达水平不断增多 (与对照组相比, $P < 0.05$)。Ras 及 MERTK 干扰后的 RPE 细胞与 ROS 共孵育 (30、60、120、180min) 的全过程中, MERTK、Ras、MEK 和 MLCK 的蛋白表达及 ROS 的吞入数量始终维持较低水平, 仅在孵育 180min 见到少量 ROS 吞入; 与未转染 RPE 细胞相比, siRas-RPE 细胞及 siMERTK-RPE 细胞与 ROS 共孵育 120、180min 时, MERTK、Ras、MEK 及 MLCK 的蛋白表达量均明显减少 ($P < 0.05$)。

结论: Ras-MEK-MLCK-肌球蛋白通路是鼠 RPE 细胞吞噬过程中 MERTK 受体激活的下游信号通路。

关键词:视网膜色素上皮;吞噬;MERTK;Ras;肌球蛋白

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.1.07

引用:孙昱昭,张若霜,谷峰. 视网膜色素上皮细胞吞噬功能与 MERTK - Ras-肌球蛋白通路关系的研究. 国际眼科杂志 2016; 16(1):28-33

0 引言

研究表明视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞吞噬功能障碍是视网膜色素变性的病因,但目前对 RPE 细胞吞噬功能的确切机制尚不清楚。以往对 RPE 细胞吞噬功能的研究表明,RPE 细胞对视细胞外节膜盘 (rod outer segments, ROS) 的吞噬是受体介导的特异性吞噬过程,分为结合、摄入及消化三个不同的时相^[1];而 MERTK 被认为是启动 RPE 细胞吞噬 ROS 过程的受体分子^[2],并可与 RPE 细胞表面唯一的整合素受体分子 $\alpha_v\beta_3$ 通过磷酸化黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 发生“crosstalk”促进吞噬^[3]。但是,RPE 细胞吞噬过程中 MERTK 所启动的确切下游信号目前仍不清楚。已知 MERTK 介导的巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬激活了蛋白激酶 C (PKC β II),并通过调节肌动蛋白 (actin) 的分布形成吞噬杯来吞噬凋亡的细胞^[4];然而 RPE 细胞吞噬 ROS 的过程中 MERTK 并不直接作用于 actin,而是通过靶向作用于非肌性肌球蛋白 myosin II 来形成吞噬杯以完成对 ROS 的吞入过程的^[5]。但是 MERTK 通过哪种信号通路来靶向作用于肌球蛋白 myosin,目前尚未见明确报道。

MERTK 受体是一种受体酪氨酸激酶^[6],具有受体和激酶的双重功能,参与细胞内信号转导。与 MERTK 相关的信号通路比较复杂,目前已知的 Ras-MAPK 途径是生长因子、细胞因子及整合素等所共有的信号通路^[7]。有研究表明,尿激酶-血纤维蛋白溶酶原激活物 (U-PA) 可以通过选择性地整合素受体分子 $\alpha_v\beta_3$,经由 Ras-MEK (extracellular signal regulated kinase kinase,胞外信号调节激酶的激酶)-ERK (extracellular signal regulated kinase,胞外信号调节激酶)-MLCK (myosin light chain kinase,肌球蛋白轻链激酶) 通路激活 myosin 来刺激细胞的迁移^[8]。也有研究表明,抗高血压药物卡托普利也通过 Ras-MEK-MLCK 通路作用于肠系膜动脉的 myosin 来降低血压^[9],这提示我们,RPE 细胞吞噬过程中 MERTK 受体后通路可能涉及 Ras-MEK-MLCK-myosin 途径。为此,本研究拟探讨 RPE 细胞是否通过 MERTK 受体介导的 Ras-MEK-MLCK 信号通路来发挥吞噬 ROS 的功能,为 RPE 细胞吞噬功能的调控及临床治疗视网膜色素变性提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/6 小鼠,7~10 周龄,体质量 20~22g,购自中国医科大学实验动物部。小鼠饲养环境:清洁级小动物实验房 (恒温:25℃;湿度:40%~50%;光照:8 h/d)。

1.1.2 试剂 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培养液及 Hanks 液 (美国 Gibco 公司),胰蛋白酶 (美国 Difco 公司),胎牛血清 (FCS,天津 TBD 公司),Fluro-3/AM (美国 Sigma 公司),fluorescein isothiocyanate (异硫氰酸荧光素, FITC) 及 sulforhodamine (硫酰罗达明, SR,美国 Invitrogen-Molecular Probe 公司),蔗糖及 Tris (氨丁三醇

(中国联星公司), SYBR Green Real-Time PCR KIT (TaKaRa 公司),RIPA 裂解液及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司),MERTK 抗体 (德国 Acris antibodies 公司),Ras、MEK、MLCK 抗体 (Cell signal technology),限制性内切酶 (加拿大 Fermetas 公司),高纯质粒制备试剂 (北京百泰克生物技术有限公司),Lipo2000 (美国 Invitrogen 公司)。Olympus-IX71 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司) 及 Diagnostic instruments - spotsingh 荧光数字图象采集摄像系统 (美国 DI 公司)。Exicycler 96 荧光定量 PCR 仪 (韩国 BIONEER)。凝胶成像分析仪 (北京六一 WD-9413B)。双垂直蛋白电泳仪 (北京六一 DYCZ-24DN)。

1.2 方法

1.2.1 RPE 细胞培养 采用胰蛋白酶消化法^[2],每次取 4 只 C57BL/6 鼠,麻醉后剜除眼球,剪除角膜、去除晶状体后将眼杯置于 0.2% 胰酶中消化 50min,吹打、离心收集后将含有 20% 小牛血清、1% 青链霉素及 1% 非必需氨基酸、1% L-谷氨酸的 DMEM 培养液中培养,融合后传代。第 3~5 代细胞用于实验。采用 Cytokeratin-8 进行 RPE 细胞鉴定,Cytokeratin-8 免疫染色阳性细胞为 RPE 细胞。

1.2.2 ROS 提取及染色 根据 Papermaster 等^[10]的方法并有所改动提取 ROS,简言之:将人视网膜神经层悬于 340g/L 蔗糖匀浆液中,剧烈摇动 1min 后,以 4 000r/min 离心 4min,收集上清,并加入二倍于其体积的 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液,然后以 4 000r/min 离心 4min,收集沉淀,加入不连续密度梯度液的顶层,27 000r/min 离心 30min。将提取的 ROS 中加入终浓度为 10mg/L FITC 液,室温下,于暗处孵育 1h 以标记 ROS。

1.2.3 吞噬检测 采用双重荧光标记法进行吞噬动力学检测及计数^[11],吞噬动力学检测的时间点设定为 0、30、60、120、180、240min。用于吞噬动力学检测的 RPE 细胞种植在 35mm 培养皿上。

1.2.4 吞噬过程中 MERTK-Ras-MEK-MLCK-myosin 通路激活状态测定 采用 Western-Blot 方法:将 RPE 细胞与 ROS 孵育不同时间后 [0min (即为对照组)、30、60、120、180min],吸出 ROS 孵育液,并用 4℃ Hanks 液冲洗细胞 2 次,终止吞噬反应,然后加入 100 μ L RIPA 裂解液裂解细胞、离心获得抽提蛋白。用 BCA 测定试剂盒测定上清蛋白浓度后,-80℃ 保存备用。各时间点蛋白样品量为 60 μ g。制备 5% 浓缩胶及浓度为 8%、10%、13% 的分离胶。加入上样液 20 μ L 及 5 μ L 蛋白 Marker,电压 80V,恒压电泳 2.5h。以电压 70V 转印 1.5h 将凝胶转印至 PVDF 膜上。将转好的 PVDF 膜放入 5% TBS+脱脂奶粉的封闭液中室温封闭 1h。分别加入稀释的 MERTK 抗体 (1:250)、Ras 抗体及磷酸化 MEK、MLCK 抗体 (1:500) 4℃ 孵育过夜,洗脱后加入 1:5000 稀释的二抗 37℃ 孵育 45min,再次洗脱,ECL 发光。以 β -actin 为内参,用 Gel-Pro Analyzer 图像分析软件对结果进行灰度分析,计算目的蛋白的相对表达量 (目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值/ β -actin 条带灰度值),明确 MERTK-Ras-MEK-MLCK-myosin 通路激活状态。

1.2.5 Ras 及 MERTK 干扰及干扰后 MERTK-Ras-MEK-MLCK-myosin 通路激活状态测定 构建高纯度质粒后行细胞转染以干扰 Ras/MERTK 基因表达。

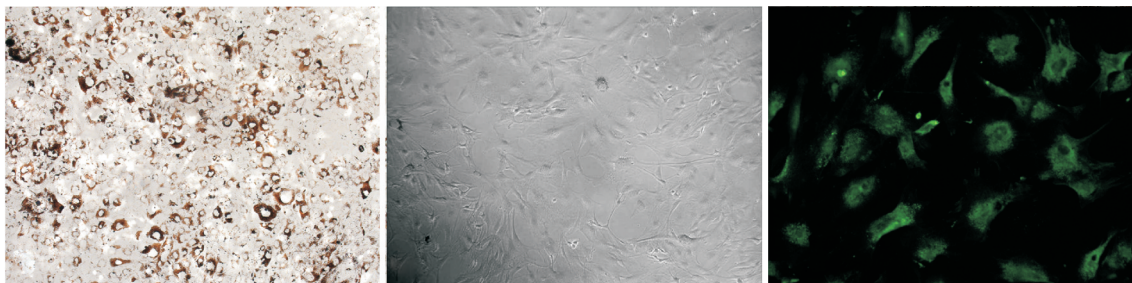


图1 RPE细胞形态及鉴定 A:原代RPE细胞的融合图像(倒置显微镜,×100);B:3~5代RPE细胞的80%融合图像(倒置显微镜,×100);C:细胞RPE细胞均表现为Cytokeratin-8免疫染色阳性(倒置荧光显微镜,×400)。

1.2.5.1 质粒构建 分别设计3个干扰片段,位点分别为 Ras-245、Ras-509、Ras-601,对应序列分别为 245-GAGCGCCTTGACGATACAG,509-GGACTCTGAAGATGTGCCT,601-GGAGTTACGGGATTCCGTT及Mertk-431,Mertk-1316,Mertk-1528,对应序列分别为 431-GATGGAAAGGAATTGCTCG,1316-ACCGCAGGACTTACAAAG,1528-CACCGACTCTATGTTTCATC。对pRNA-H1.1质粒进行双酶切并与目的基因连接后加入至100μL JM109感受态细胞中培养、提取质粒,鉴定及筛选阳性克隆,标记为 Ras-sh1,Ras-sh2,Ras-sh3,MERTK-sh1,MERTK-sh2,MERTK-sh3,测序。

1.2.5.2 细胞转染 配制转染试剂:溶液1:100μL优化液+8μL脂质体2000;溶液2:100μL优化液+2μg质粒,将溶液1与溶液2混匀,室温下放置20min后缓慢加入RPE细胞培养板中,摇动培养板混匀,37℃、5% CO₂培养6h。弃去转染培养基上清,更换为细胞完全培养液,37℃、5% CO₂继续培养24h后收集细胞以SYBR Green Real-Time PCR KIT检测Ras/MERTK基因表达情况,Ras基因引物分别为:5'-TTGTGGATGAGTATGACCCTA-3'及5'-CTCCTCTTGACCTGCTGTGT-3',MERTK基因引物分别为:5'-CCTGGCAACACCGACTCTA-3'及5'-TTTACGACCAGTTGGGAATC-3',内参β-actin基因引物分别为5'-CTGTGCCATCTACGAGGGCTAT-3'及5'-TTTGATGTCACGCACGATTTCC-3'。选择干扰效果最佳的片段进行正式实验。

1.2.5.3 干扰后MERTK-Ras-MEK-MLCK-myosin通路激活状态测定及吞噬功能检测 将siRas-RPE细胞及si-MERTK-RPE细胞与ROS孵育不同时间后[0min(即为对照组)、30、60、120、180min]采用Western-Blot方法检测MERTK、Ras、MEK及MLCK的蛋白表达情况,并比较孵育120min及180min时未转染RPE细胞、siRas-RPE细胞及si-MERTK-RPE细胞中MERTK、Ras、MEK及MLCK的蛋白表达;采用双重荧光标记法测定siRas-RPE细胞及siMERTK-RPE细胞的吞噬功能的变化。

统计学分析:每步实验重复3次,结果以SPSS 17.0软件进行重复测量方差分析及单因素方差分析进行统计,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 C57BL/6小鼠RPE细胞的培养及鉴定 原代RPE细胞胞浆内可见棕褐色色素颗粒,细胞呈多边形,3~5代RPE细胞透明,无色素,呈梭形。Cytokeratin-8免疫染色后可见全部RPE细胞均呈现阳性绿色荧光,提示培养细胞为RPE细胞(图1)。

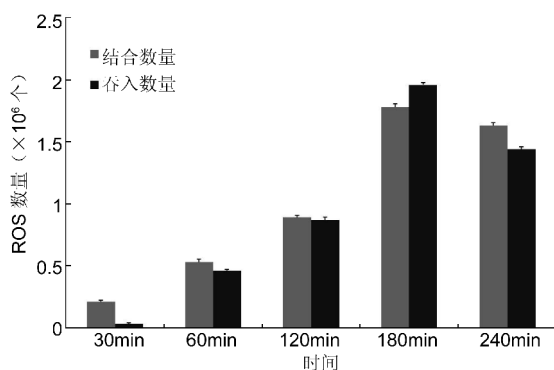


图2 不同孵育时间RPE细胞结合及吞入ROS数量。

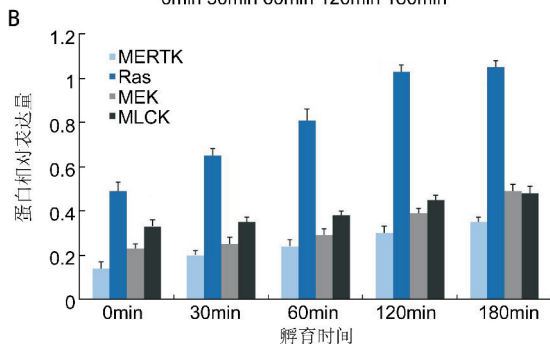
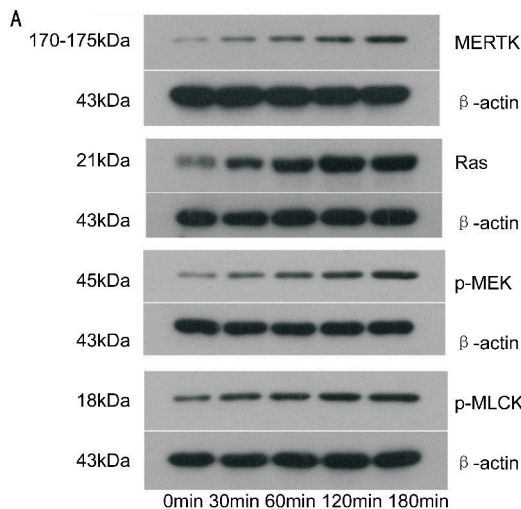


图3 Western-Blot检测RPE细胞与ROS孵育不同时间MERTK、Ras、MEK、MLCK表达的变化 A:PVDF膜扫描图像显示孵育不同时间MERTK、Ras、MEK、MLCK蛋白的表达;B:孵育不同时间MERTK、Ras、MEK、MLCK蛋白相对表达量的比较。

2.2 吞噬检测结果 双重荧光标记方法检测RPE吞噬ROS的结果显示,在孵育30min时可见ROS被RPE吞入胞浆内,随着孵育时间的延长结合及吞入的ROS数量不

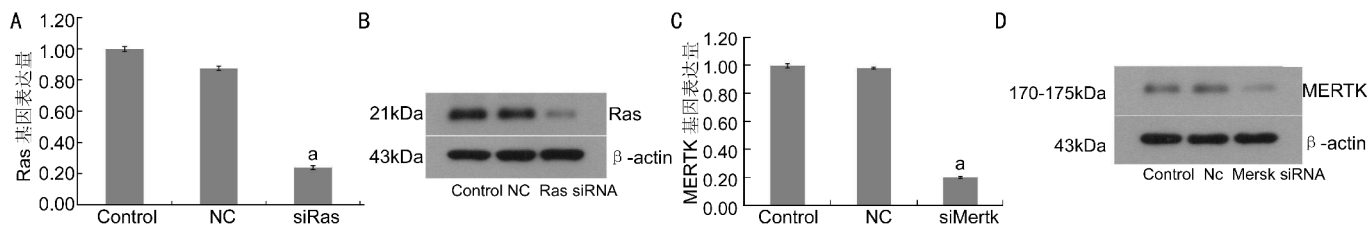


图4 Ras 基因干扰后 RPE 细胞 Ras 基因及蛋白表达的变化 A:Real-time PCR 检测 Ras 基因干扰后 RPE 细胞 Ras 基因表达的变化(以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 均值表示);B:Western-Blot 检测 Ras 基因干扰后 RPE 细胞 Ras 蛋白表达的变化;C:Real-time PCR 检测 MERTK 基因干扰后 RPE 细胞 MERTK 基因表达的变化(以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 均值表示);D:Western-Blot 检测 MERTK 基因干扰后 RPE 细胞 MERTK 蛋白表达的变化;Control:正常 REP 细胞;NC:空载体转染组;siRAS:Ras 基因干扰组;siMERTK:MERTK 基因干扰组;^a $P<0.05$ vs Control 组、NC 组。

断增加,至孵育 3h 时,结合及吞入的 ROS 数量达到饱和(图 2)。

2.3 吞噬过程中 MERTK-Ras-MEK-MLCK-myosin 通路激活状态测定 将 3~5 代 RPE 细胞与 ROS 共同孵育不同时间(30、60、120、180min)后,Western-Blot 检测相关蛋白的表达变化,结果显示 RPE 细胞与 ROS 共同孵育 30min 时,与对照组(0min)相比,MERTK、MEK 和 MLCK 的磷酸化水平升高,Ras 蛋白表达量增加,并且随着孵育时间的延长 MERTK、MEK 和 MLCK 的磷酸化水平与 Ras 表达量均不断增多($P<0.05$,图 3)。

2.4 Ras/MERTK 干扰及干扰后 MERTK-Ras-MEK-MLCK-myosin 通路激活状态测定 三个不同片段构建的质粒进行小鼠 RPE 细胞瞬时转染 Ras/MERTK 后,Real-time PCR 检测结果显示 Ras-sh3(即 Ras-601)及 MERTK-sh3(即 MERTK-1528)干扰效果最佳。以 Ras-sh3 及 MERTK-sh3 瞬时转染后测定 RPE 细胞 Ras 及 MERTK 基因及蛋白表达均较未转染组明显降低($P<0.05$,图 4)。

以 Ras-sh3 片段构建的质粒重新进行小鼠 RPE 细胞瞬时转染 Ras 后,将 siRNA-Ras 的 RPE 细胞与 ROS 孵育不同时间[0min(即为对照组)、30、60、120、180min],再次采用 Western-Blot 方法检测 MERTK、Ras、MEK 及 MLCK 的蛋白表达,结果显示 MERTK、Ras、MEK、MLCK 蛋白的表达水平均与对照组(0min)无显著差异($P>0.05$),即在全部分孵育过程中 MERTK、Ras、MEK、MLCK 的蛋白始终维持在较低的表达水平(图 5A 第 1~5 条带);同时,与未转染的 RPE 细胞相比,siRas-RPE 细胞与 ROS 共孵育 120、180min 时,MERTK、MEK、MLCK 的磷酸化水平及 Ras 蛋白表达量均明显下调($P<0.05$,图 5A 第 6~9 条带)。

以 MERTK-sh3 片段构建的质粒重新进行小鼠 RPE 细胞瞬时转染 Ras 后,将 siMERTK-RPE 细胞与 ROS 孵育不同时间[0min(即为对照组)、30、60、120、180min],再次采用 Western-Blot 方法检测 MERTK、Ras、MEK 及 MLCK 的蛋白表达,结果显示在全部分孵育过程中 MERTK、Ras、MEK、MLCK 的蛋白始终维持在较低的表达水平($P>0.01$,图 6 第 1~5 条带);同时,与未转染的 RPE 细胞相比,siMERTK-RPE 细胞与 ROS 共孵育 120、180min 时,MERTK 及 Ras、MEK、MLCK 的蛋白表达量均减少(图 6A 第 6~9 条带, $P<0.05$),但其蛋白表达的下降幅度并没有 siRas-RPE 细胞大。

siRas-RPE 细胞及 siMERTK-RPE 细胞的吞噬数量的变化:分别将 siRas-RPE 细胞及 siMERTK-RPE 细胞与 ROS 孵育不同时间(30、60、120、180、240min)后,再次进行吞噬数量测定,结果显示 siRas-RPE 细胞结合 ROS 的数

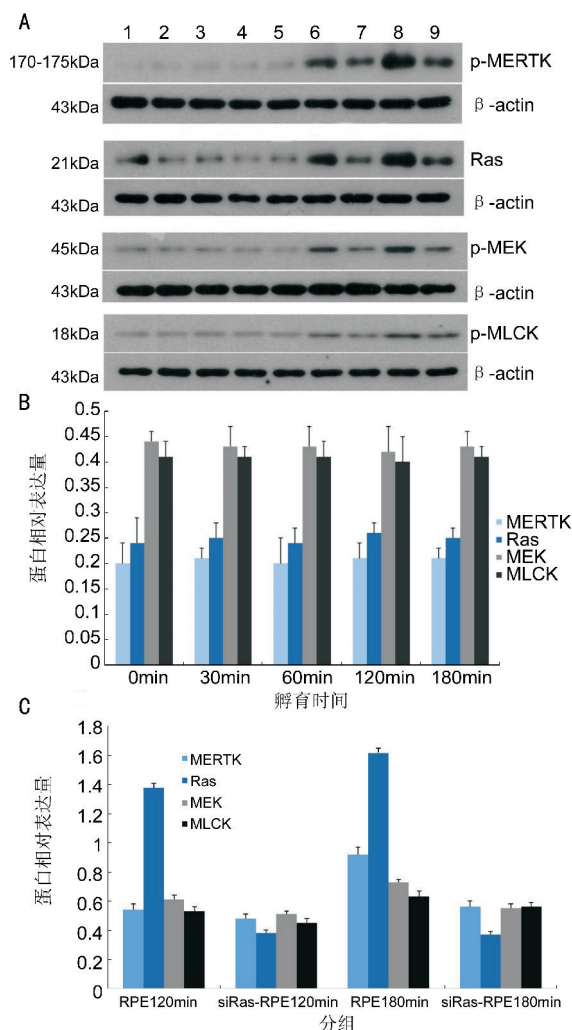


图5 Western-Blot 检测 siRas-RPE 细胞与 ROS 孵育不同时间 MERTK、Ras、MEK、MLCK 蛋白表达的变化 A:Western-Blot 检测扫描图像,从左至右:1~5 显示对照组及 siRas-RPE 细胞与 ROS 孵育 30、60、120、180min MERTK、Ras、MEK、MLCK 蛋白表达的变化;6、7 分别为未转染 RPE 细胞及 siRas-RPE 细胞与 ROS 孵育 120min MERTK、Ras、MEK、MLCK 蛋白表达的变化;8、9 分别为未转染 RPE 细胞及 siRas-RPE 细胞与 ROS 孵育 180min MERTK、Ras、MEK、MLCK 蛋白表达的变化; β -actin 基因为内参;B:siRas-RPE 细胞与 ROS 孵育不同时间 MERTK、Ras、MEK、MLCK 蛋白相对表达量的变化;C:RPE 细胞及 siRas-RPE 细胞与 ROS 孵育 120min 及 180min MERTK、Ras、MEK、MLCK 蛋白相对表达量的比较。

量随孵育时间延长逐渐增加,而吞入 ROS 的数量极少,仅在孵育 180min 时可观察到少量 ROS 吞入了 RPE 细胞内。

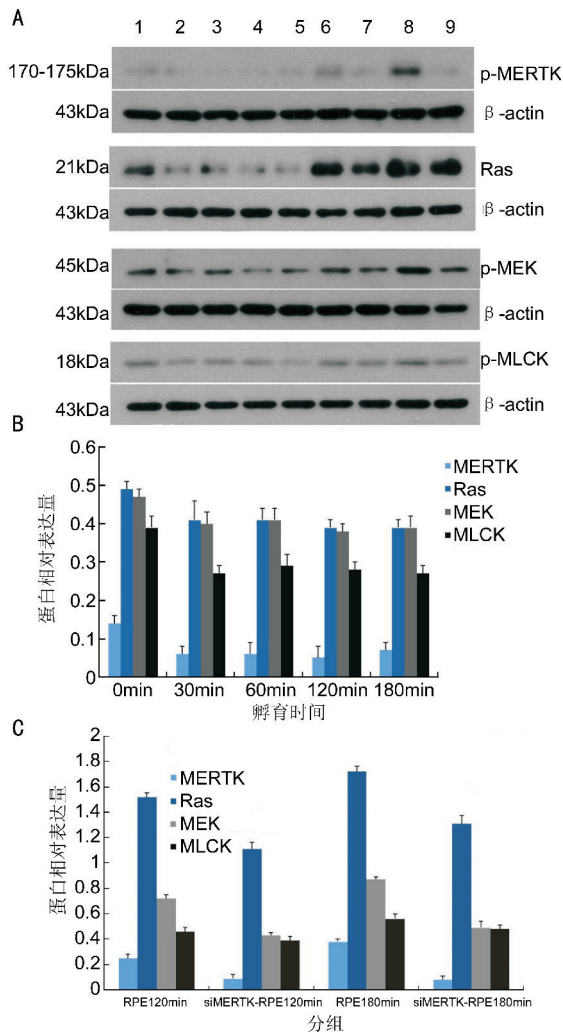


图6 Western-blot检测 siMERTK-RPE 细胞与 ROS 孵育不同时间 MERTK、Ras、MEK、MLCK 蛋白表达的变化 A: Western-Blot 检测扫描图像,从左至右:1~5 显示对照组及 siMERTK-RPE 细胞与 ROS 孵育 30、60、120、180min MERTK、Ras、MEK、MLCK 蛋白表达的变化;6、7 分别为未转染 RPE 细胞及 siMERTK-RPE 细胞与 ROS 孵育 120min MERTK、Ras、MEK、MLCK 蛋白表达的变化;8、9 分别为未转染 RPE 细胞及 siMERTK-RPE 细胞与 ROS 孵育 180min MERTK、Ras、MEK、MLCK 蛋白表达的变化; β -actin 基因为内参;B: siMERTK-RPE 细胞与 ROS 孵育不同时间 MERTK、Ras、MEK、MLCK 蛋白相对表达量的变化;C: RPE 细胞及 siMERTK-RPE 细胞与 ROS 孵育 120min 及 180min MERTK、Ras、MEK、MLCK 蛋白相对表达量的比较。

比较 RPE 细胞和 siRas-RPE 细胞与 ROS 结合与吞入 ROS 的数量,可见孵育各时间点结合数量无明显变化,而吞入 ROS 的数量减少了 97% (孵育 180min 时,图 7)。siMERTK-RPE 细胞结合 ROS 的数量随孵育时间延长逐渐增加,而未见吞入 ROS (图 7)。

3 讨论

与受体酪氨酸激酶(RTK)相关的信号通路比较复杂,目前已知的下游信号通路分为 Ras-MAPK、PI3K-Akt、PLC γ -IP3/DG 三种,这三条通路涉及了许多的细胞功能,如增殖、分化、迁移以及凋亡功能^[12-13],其中的 Ras-MAPK 途径是生长因子、细胞因子及整合素等所共有的信号通路。RTK 与腺体结合后激活,激活的 RTK 与生长因子结

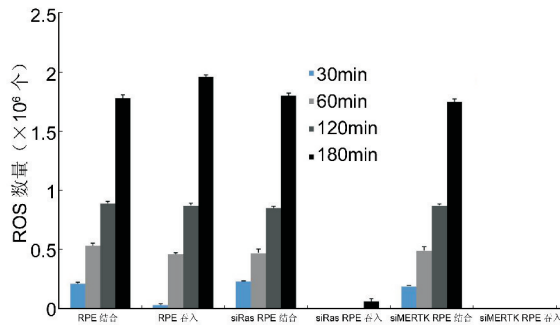


图7 不同孵育时间 RPE、siRas-RPE 及 siMERTK-RPE 细胞及结合及吞入 ROS 数量比较。

合蛋白-2(Grb2)结合,Grb2 实际上是一种结合蛋白,它含有一个 SH2 和两个 SH3 域,SH2 可与 RTK 结合,SH3 可与 GEF(guanine exchange factor,鸟嘌呤交换因子)结合,这样就形成了 RTK-Grb2-GEF 复合体,该复合体在 GEF 的作用下将 Ras 激活,进而通过逐级反应激活 MEK 及 MLCK,从而活化肌球蛋白 myosin,即 RTK-Grb2-Ras-MEK-MLCK-myosin 通路。近年来的研究证实,人 RPE 细胞吞噬 ROS 过程中也是通过受体酪氨酸激酶 MERTK 与细胞内蛋白的 SH2 域结合后来启动细胞骨架重排及细胞膜运动的^[14]。但是 RPE 细胞吞噬 ROS 过程中 MERTK 磷酸化激活后是否启动了下游的 Ras-MEK-MLCK-MLC 通路目前尚未见报道。

本研究在离体条件下模拟 RPE 细胞吞噬 ROS 的条件,并检测了吞噬动力学及吞噬过程中 MERTK、Ras、MEK、MLCK 的变化情况,结果发现在孵育 30min 时可见 ROS 被 RPE 吞入胞浆内,随着孵育时间的延长吞噬数量不断增加,至孵育 3h,吞噬数量达到饱和;同时,在孵育过程中,随着孵育时间的延长,MERTK、Ras、MEK 及 MLCK 的蛋白表达水平不断增加,这种吞噬动力学与蛋白表达的变化趋势的一致性提示,吞噬过程中 MERTK 与 ROS 结合后激活了下游的 Ras 信号通路。

为了进一步证实这一假设,本课题组采用 RNA 干扰技术将 RPE 细胞的 Ras 基因沉默后,再次进行孵育实验并测定吞噬变化及吞噬过程中 MERTK、Ras、MEK 及 MLCK 的变化情况,结果发现:在孵育过程中,随着孵育时间的延长,siRas-RPE 细胞结合 ROS 的数量明显增加,而吞入 ROS 的数量极少,仅在孵育 180min 时可观察到少量 ROS 吞入了 RPE 细胞内。与 RPE 细胞相比,siRas-RPE 细胞结合 ROS 的数量无明显变化,而吞入 ROS 的数量下降了 97% (图 7)。同时,随着孵育时间的延长,MERTK、Ras、MEK 及 MLCK 的蛋白表达水平维持低值且不随孵育时间延长而变化(灰度比值均 <0.5)。比较孵育 120min 及 180min 后正常 RPE 细胞与 siRas-RPE 细胞 MERTK、Ras、MEK 及 MLCK 蛋白表达水平,更可清晰地看到 siRas-RPE 细胞 MERTK、Ras、MEK 及 MLCK 蛋白表达水平的明显下降。siRas-RPE 细胞吞噬动力学与 MERTK、Ras、MEK 及 MLCK 蛋白表达水平的一致变化,提示 RPE 细胞吞噬 ROS 过程是通过启动 MERTK-Ras-MEK-MLCK 通路来重排肌球蛋白来完成的。

另一方面,本研究发现,正常 RPE 细胞孵育过程中随着孵育时间的延长,RPE 细胞结合及吞入 ROS 的数量不

断增加,同时 MERTK 蛋白的表达水平也随着孵育时间的延长而增加;而 siRas-RPE 细胞孵育过程中随着孵育时间的延长结合 ROS 的数量逐渐增加,但吞入 ROS 数量极少,并且 MERTK 蛋白的表达水平也未随着孵育时间的延长而增加,siRas-RPE 细胞的这种变化趋势与 MERTK 基因突变的 RCS 鼠相似:RCS 鼠由于 MERTK 基因突变而表达无功能的 MERTK 蛋白,所以虽然可以结合 ROS 但是却存在摄入 ROS 的明显异常^[5],从而发生视网膜色素变性。这就从另一角度提示 Ras 可能为 MERTK 启动的下游信号这一结论。至于 Ras 干扰后 MERTK 蛋白表达水平降低的原因尚待进一步研究,分析可能的原因应与受体酪氨酸蛋白激酶各个复杂的下游通路之间的相互作用有关^[15]。

为了明确 RCS 鼠是否因 MERTK 异常而无法启动下游的 Ras 信号通路,从而进一步证实 RPE 细胞吞噬过程中 MERTK-Ras 信号通路的存在,本研究用质粒转染技术沉默 RPE 细胞的 MERTK 基因来模拟 RCS 鼠的 RPE 细胞状态,再次进行孵育实验并测定吞噬变化及吞噬过程中 MERTK、Ras、MEK 及 MLCK 的变化情况,结果发现,在全部孵育过程中 siMERTK-RPE 细胞 MERTK、Ras、MEK、MLCK 的蛋白始终维持在较低的表达水平(灰度比值均<0.5),比较孵育 120min 及 180min 后正常 RPE 细胞与 siMERTK-RPE 细胞 MERTK、Ras、MEK 及 MLCK 蛋白表达水平,也可看到 siMERTK-RPE 细胞 MERTK、Ras、MEK 及 MLCK 蛋白表达水平的降低。这与 siRas-RPE 细胞孵育过程中 MERTK、Ras、MEK、MLCK 的蛋白表达变化保持一致,证实 Ras 确为 MERTK 启动的下游信号。

当然,本研究采用的是质粒瞬时转染技术干扰 Ras 及 MERTK 基因及蛋白的表达,虽然进行了多个序列筛选、采用效果最佳的序列进行转染,但仍不能完全沉默 Ras 及 MERTK 基因及蛋白的表达(图 3),加上目前检测蛋白表达的免疫印迹方法也只能通过灰度比值这一相对数值来评估,所以研究结果存在无法避免的误差。

但是,无论如何本研究初步探讨了鼠 RPE 细胞吞噬功能与 MERTK-Ras-MEK-MLCK 通路的关系,发现正常鼠 RPE 细胞在吞噬 ROS 过程中 MERTK、Ras、MEK 及 MLCK 蛋白表达增加(灰度比值>0.5),而干扰了 MERTK 及 Ras 基因表达后 RPE 细胞在吞噬 ROS 过程中 MERTK、Ras、MEK 及 MLCK 蛋白表达维持在较低水平,且不随孵育时间延长而增加(灰度比值均<0.5),从而证实 RPE 细胞通过受体酪氨酸激酶 MERTK 激活下游 Ras、MEK 及 MLCK 通路,引起肌球蛋白重排完成吞噬功能,进一步阐明了 RPE 细胞吞噬机制,为今后视网膜色素变性的治疗提供了新的靶点。

参考文献

- 1 Mayerson PL, Hall MO. Rat retinal pigment epithelial cells show specificity of phagocytosis *in vitro*. *J Cell Biology* 1986;103(1):299-308
- 2 Feng W, Yasumura D, Matthes MT, *et al*. MerTK triggers uptake of photoreceptor outer segments during phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;277(19):17016-17022
- 3 Nandrot EF, Silva KE, Scelfo C, *et al*. Retinal pigment epithelial cells use a MerTK-dependent mechanism to limit the phagocytic particle binding activity of $\alpha v \beta 5$ integrin. *Biol Cell* 2012;104(6):326-341
- 4 Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, *et al*. Macrophages and dendritic cells use different Axl/MerTK/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J Immunol* 2007;178(9):5635-5642
- 5 Strick DJ, Feng W, Vollrath D. MerTK drives myosin II redistribution during retinal pigment epithelial phagocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(5):2427-2435
- 6 Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL, *et al*. Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ* 1994;5(6):647-657
- 7 Kopec AM, Carew TJ. Growth factor signaling and memory formation: temporal and spatial integration of a molecular network. *Learn Mem* 2013;20(10):531-539
- 8 Nguyen DH, Catling AD, Webb DJ, *et al*. Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of Urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J Cell Biol* 1999;146(1):149-164
- 9 Hu WY, Han YJ, Gu LZ, *et al*. Involvement of Ras-regulated myosin light chain phosphorylation in the captopril effects in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2007;20(1):53-61
- 10 Papermaster DS, Dreyer WJ. Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods. *Biochemistry* 1974;13(11):2438-2439
- 11 孙昱昭,洪晶. 双重荧光标记法检测人视网膜色素上皮细胞吞噬的功能. *国际眼科杂志* 2006;6(1):42-46
- 12 Yue J, Mulder KM. Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a Smad-dependent pathway. *J Biol Chem* 2000;275(40):30765-30773
- 13 McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, *et al*. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul* 2006;46:249-279
- 14 Shelby SJ, Colwill K, Dhe-Paganon S, *et al*. MERTK interactions with SH2-domain proteins in the retinal pigment epithelium. *PLoS One* 2013;8(2):e53964
- 15 Sasaki T, Hiroki K, Yamashita Y. The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment. *Biomed Res Int* 2013;2013:546318