

## 重楼总苷 I 对人视网膜色素 上皮细胞系 ARPE-19 增殖、迁移的影响

苏菲菲<sup>1</sup>, 卢木娣<sup>1</sup>, 曾惠红<sup>1</sup>, 江文良<sup>1</sup>, 赖文娟<sup>1</sup>, 梁堂钰<sup>1</sup>, 赖雪燕<sup>1</sup>, 龙剑文<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨重楼总苷 I 对人视网膜色素上皮细胞系 (ARPE-19) 增生、迁移的影响。方法 MTT 法检测重楼总苷 I 对 ARPE-19 细胞增殖的影响, Transwell 小室实验检测 ARPE-19 细胞侵袭能力的变化, 划痕实验检测 ARPE-19 细胞迁移能力的变化, 实时荧光定量 PCR 检测 ERK1/2 mRNA 的表达, Western blot 法检测 ERK1/2 蛋白、p-ERK1/2 蛋白表达水平。结果 重楼总苷 I 可抑制 ARPE-19 细胞的增生、侵袭、迁移, 下调 p-ERK1/2 蛋白的表达, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 但对总 ERK1/2 表达、ERK1 mRNA 和 ERK2 mRNA 表达无明显影响。结论 重楼总苷 I 能有效抑制 ARPE-19 细胞的增殖、侵袭、迁移, 可能与重楼总苷 I 抑制了 ARPE-19 细胞 ERK1/2 蛋白磷酸化有关, 为中药重楼治疗增生性玻璃体视网膜疾病提供了依据。

**关键词** 重楼总苷 I; 增殖; 迁移; 视网膜色素上皮细胞

中图分类号 R 774.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)07-0956-05

人视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 细胞增生、迁移, 细胞外基质成分 (extracellular matrix, ECM) 异常沉积, 形成有收缩能力的增生膜, 是增生性玻璃体视网膜疾病 (PVR) 发生和发展的重要环节<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2]</sup>表明, RPE 细胞在 PVR 的发展中起着最重要的作用。重楼是中医治疗 PVR 的常

用药物之一<sup>[3]</sup>, 研究<sup>[4-6]</sup>表明, 其有效成分重楼总苷 I 对一些肿瘤细胞有抑制作用, 但对人 RPE 细胞作用如何, 目前暂无报道。该研究观察了重楼总苷 I 对人 RPE 细胞增生、迁移的影响, 以及对其 ERK1/2 mRNA 表达、ERK1/2 蛋白、p-ERK1/2 蛋白表达的影响, 探讨重楼总苷 I 治疗 PVR 的可能机制。

### 1 材料与方法

**1.1 主要试剂及仪器** 重楼皂苷 I 粉剂购自中国药品生物制品检定所; 人视网膜色素上皮细胞系 (ARPE-19) 细胞株购自武汉大学细胞库中国典型培养物保藏中心; 100 U/L 青霉素、100 μg/L 链霉素、MTT 试剂盒购自武汉博士德生物公司; DMEM 培养基、小牛血清和胰蛋白酶均购自美国 GIBCO 公司; 分光光度仪购自芬兰 Labsystems 公司; 细胞培养箱 (热电 3111 型) 购自美国热电公司; TRIzol 总 RNA 提取试剂购自美国 Invitrogen 公司; Quantonstep RT-PCR Kit 购自北京天根生化公司; ERK1/2、p-ERK1/2、辣根酶标记抗鼠 IgG 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 辣根酶标记的 β-actin 抗体购自上海兴悠生物科技有限公司; ECL 试剂盒购自美国 Amersham Biosciences 公司; Transwell 小室购自美国 Millipore 公司。

**1.2 MTT 法检测不同浓度药物对 ARPE-19 细胞增生的影响** 将 ARPE-19 细胞以  $5 \times 10^4$  /孔接种于 96 孔板, 每孔接种 100 μl 培养液为含有 10% 小牛血清的 DMEM, 待细胞长至 60% ~ 70% 融合状态时, 加入处理因素, 每组重楼皂苷 I 终浓度分别为 0、0.75、1.5、3.0、6.0 μg/ml, 每组均设 6 个平行孔,

2015-04-13 接收

基金项目: 湖北省卫生计生委中医药、中西医结合科研指导性项目 (编号: 2013Z-B05)

作者单位: <sup>1</sup>贺州市人民医院眼科, 贺州 542899

<sup>2</sup>湖北省中医院、湖北中医药大学临床医学院, 武汉 430061

作者简介: 苏菲菲, 女, 硕士, 责任作者, E-mail: 984625812@qq.com

than group B and group A ( $P < 0.05$ ). After adaptive training, the expression of COX-2 mRNA was significantly higher in group D than in group B and in group E than group C. The content of 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> and the expression of COX-1 mRNA and the expression of COX-2 mRNA, had no significant correlation ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Adaptive training can significantly reduce the gastric mucosal damage caused by high +Gz value, and its mechanism is related to the increase in PGI<sub>2</sub> content and expression of COX-2 mRNA.

**Key words** positive acceleration; adaptive training; gastric mucosa; cyclooxygenase 1; cyclooxygenase 2; prostacyclin

培养 24 h 后加入 20  $\mu\text{l}$  MTT (5 mg/ml) 继续培养 4 h 后加入 DMSO 振荡, 调零, 酶标仪 570 nm 波长处检测光密度 (optical density, OD) 值, 细胞生长抑制率 (IR) =  $1 - \text{OD}_{\text{实验组}} / \text{OD}_{\text{空白对照组}}$ , 实验重复 3 次。

**1.3 Transwell 实验检测重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞侵袭能力的影响** 在上室膜表面均匀铺培养基稀释的 Matrigel (1 : 3) 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中放置 30 min, Matrigel 凝固。再加入 200  $\mu\text{l}$  无血清悬浮培养基, 轻洗水化基底膜后备用。取对数生长期的 ARPE-19 细胞常规消化后, 加入终浓度为 0、1.5、3.0、6.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  重楼皂苷 I 孵育 1 h 后, 调整浓度为  $5 \times 10^5$  个/ml 取 200  $\mu\text{l}$  细胞悬液加入上室, 另取 200  $\mu\text{l}$  含 20% FBS 的培养基放置于 Transwell 下室内, 每组均设 6 个复孔, 培养 48 h 后, 取出小室, 先弃去培养基, 棉签擦去位于上室的细胞, PBS 漂洗 2 次, 每孔加入 10% 甲醇溶液固定, 再弃甲醇溶液, 加入结晶紫染色, 弃染色液, 蒸馏水洗涤、干燥, 显微镜下随机选取 5 个视野, 计数侵袭细胞数, 实验独立重复 3 次。

**1.4 划痕实验检测低氧对 ARPE-19 细胞迁移能力的影响** 细胞培养, 分组同 1.3, 取单层融合的 ARPE-19 细胞, 用 20  $\mu\text{l}$  枪头在细胞层上垂直划线, PBS 冲洗 3 次, 去除划下的细胞, 培养 48 h, 显微镜下观察细胞的迁移情况, 软件分析并计算平均划痕愈合率。

**1.5 测定 ERK1/2 mRNA 表达水平** ARPE-19 细胞培养, 分组同 1.3。设计上、下游引物, ERK1 上游引物: 5-GAACTCCAAGGGCTATACCAAGT-3, 下游引物: 5-GGAGGGCAGAGACTGTAGGTAGT-3, 产物 164 bp; ERK2 上游引物: 5'-TCCCCATCACAAGAAGAC-CT-3', 下游引物: 5'-AGTCAGCATTGGGAACAGC-3', 产物 106 bp; GAPDH 上游引物: 5'-GTCAACG-GATTTGGTCTGATTG-3', 下游引物: 5'-TGGAGG-GATCTCGCTCCTGGAAGAT-3', GAPDH 扩增长度为 214 bp。提取 ARPE-19 细胞总 RNA; cDNA 合成; 取 cDNA 1  $\mu\text{l}$ , 2.5  $\times$  RealMasterMix/20  $\times$  SYBR 溶液 11.25  $\mu\text{l}$ , 上下游引物各 1  $\mu\text{l}$ , 加无 Rnase 水, 总反应体积 25  $\mu\text{l}$ ; PCR 反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 2 min, 循环 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 50  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 68  $^{\circ}\text{C}$  延伸 50 s。结果采用  $\Delta\text{Ct}$  值法,  $\Delta\text{Ct} = \text{样品的 Ct 均值} - \text{内参的 Ct 均值}$ ,  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  即某样品初始 cDNA 的相对量。

**1.6 Western blot 检测** 根据预实验结果, 加入不

同浓度的重楼皂苷 I (终浓度依次为 0、1.5、3.0、6.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 每个浓度均设 6 孔。培养 48 h, 收集培养后的 ARPE-19 细胞, 提取总蛋白, 用 BCA 法蛋白定量, 上样, SDS-PAGE 凝胶电泳后, 转膜, PBS 洗膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h; PBS 洗膜后加入一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜; PBS 洗膜; 加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 0.5 h; 洗膜; 用增强化学发光试剂盒检测。结果扫描后, 用 Quantity one 图像分析软件光密度分析, 以  $\beta$ -actin 为内参校正。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 组间均数比较采用  $t$  检验, 多组间数据比较采用重复测量设计的单因素方差分析。

## 2 结果

**2.1 MTT 法检测重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞的生长活性的影响** 培养 24 h 后, 6.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组 ( $t = 23.317, P = 0.000$ )、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组 ( $t = 16.266, P = 0.000$ )、1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组 ( $t = 8.012, P = 0.000$ ) 与 0.75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组抑制率比较差异均有统计学意义; 3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组 ( $t = 8.442, P = 0.000$ )、1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组 ( $t = 15.224, P = 0.000$ ) 与 6.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组抑制率比较差异均有统计学意义。表明重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞的生长有抑制作用, 其作用有浓度依赖性 ( $F = 187.601, P = 0.000$ )。见图 1。

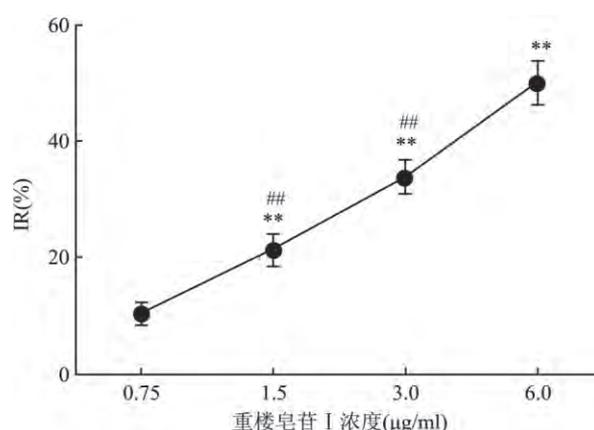


图1 MTT 法检测重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞增殖的影响  
与 0.75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 6.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组比较: ##  $P < 0.01$

**2.2 重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞侵袭能力的影响** 培养 48 h 后, 与空白对照组比较, 6.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组 ( $t = 14.221, P = 0.000$ )、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组 ( $t = 8.754, P = 0.000$ )、1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  组 ( $t = 5.176, P = 0.000$ ) 侵袭细

胞数差异均有统计学意义; 3.0  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 7.537$ ,  $P = 0.000$ )、1.5  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 11.507$ ,  $P = 0.000$ )与 6.0  $\mu\text{g/ml}$  组抑制率比较差异均有统计学意义。表明重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞的侵袭能力有抑制作用,其作用呈浓度依赖性( $F = 75.733$ ,  $P = 0.000$ )。见图 2。

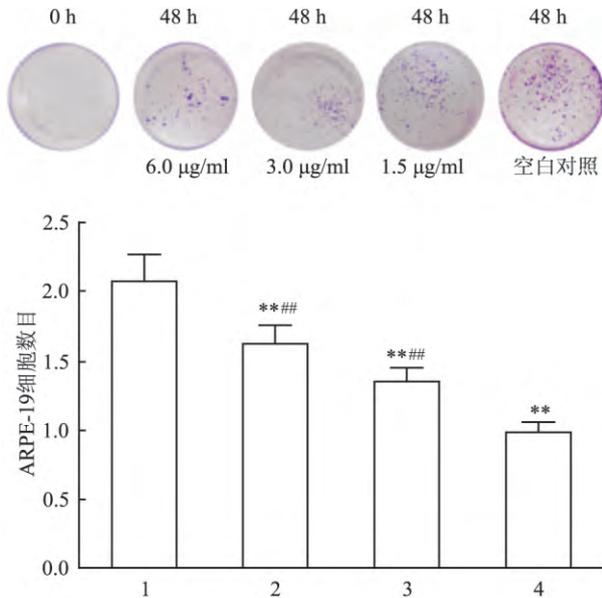


图2 重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞侵袭能力的影响  $\times 40$

1: 空白对照组; 2: 1.5  $\mu\text{g/ml}$  组; 3: 3.0  $\mu\text{g/ml}$  组; 4: 6.0  $\mu\text{g/ml}$  组; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 6.0  $\mu\text{g/ml}$  组比较: ##  $P < 0.01$

### 2.3 重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞迁移能力的影响

培养 48 h 后,与空白对照组比较,6.0  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 28.853$ ,  $P = 0.000$ )、3.0  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 18.804$ ,  $P = 0.000$ )、1.5  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 10.860$ ,  $P = 0.000$ )划痕愈合率差异均有统计学意义; 3.0  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 8.089$ ,  $P = 0.000$ )、1.5  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 18.269$ ,  $P = 0.000$ )与 6.0  $\mu\text{g/ml}$  组抑制率比较差异均有统计学意义。表明重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞的迁移能力有抑制作用,其作用呈浓度依赖性( $F = 281.005$ ,  $P = 0.000$ )。见图 3。

### 2.4 重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞 ERK1/2 mRNA 表达的影响

重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞 ERK1/2 mRNA 表达无明显影响。与空白对照组比较,6.0  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 2.127$ ,  $P = 0.059$ )、3.0  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 2.041$ ,  $P = 0.069$ )、1.5  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 2.095$ ,  $P = 0.063$ )重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞 ERK1 mRNA

表达无明显影响。与空白对照组比较,6.0  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 1.236$ ,  $P = 0.245$ )、3.0  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 0.246$ ,  $P = 0.811$ )、1.5  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 0.320$ ,  $P = 0.755$ )重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞 ERK2 mRNA 表达均无明显影响。见图 4。

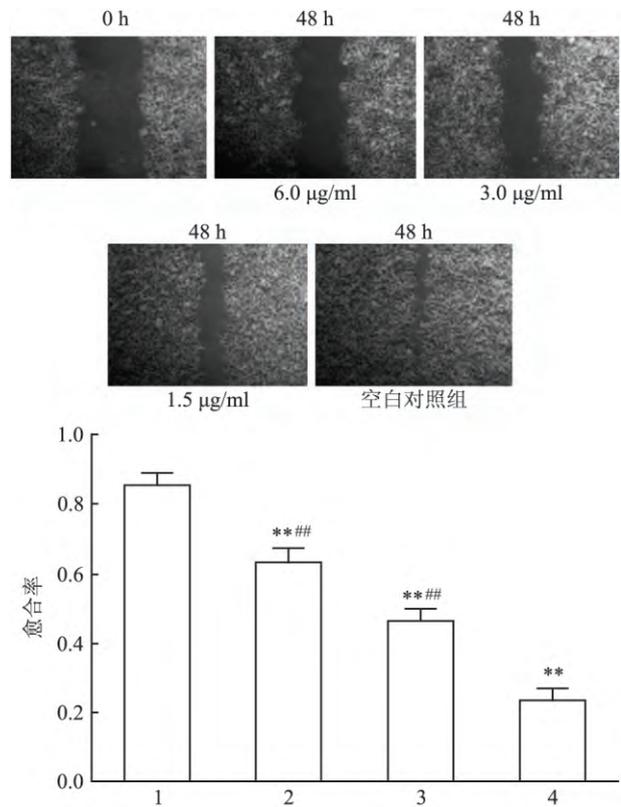


图3 重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞迁移能力的影响  $\times 40$

1: 空白对照组; 2: 1.5  $\mu\text{g/ml}$  组; 3: 3.0  $\mu\text{g/ml}$  组; 4: 6.0  $\mu\text{g/ml}$  组; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 6.0  $\mu\text{g/ml}$  组比较: ##  $P < 0.01$

### 2.5 重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达的影响

重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞 ERK1/2 蛋白表达无明显影响,但对 p-ERK1/2 蛋白表达有明显抑制作用。与空白对照组比较,6.0  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 20.549$ ,  $P = 0.000$ )、3.0  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 15.386$ ,  $P = 0.000$ )和 1.5  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 8.647$ ,  $P = 0.000$ )重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞 p-ERK1/2 蛋白表达有明显抑制作用。与空白对照组比较,6.0  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 2.170$ ,  $P = 0.055$ )、3.0  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 0.447$ ,  $P = 0.664$ )和 1.5  $\mu\text{g/ml}$  组( $t = 0.935$ ,  $P = 0.372$ )重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞 ERK1/2 蛋白表达无明显影响。见图 5。

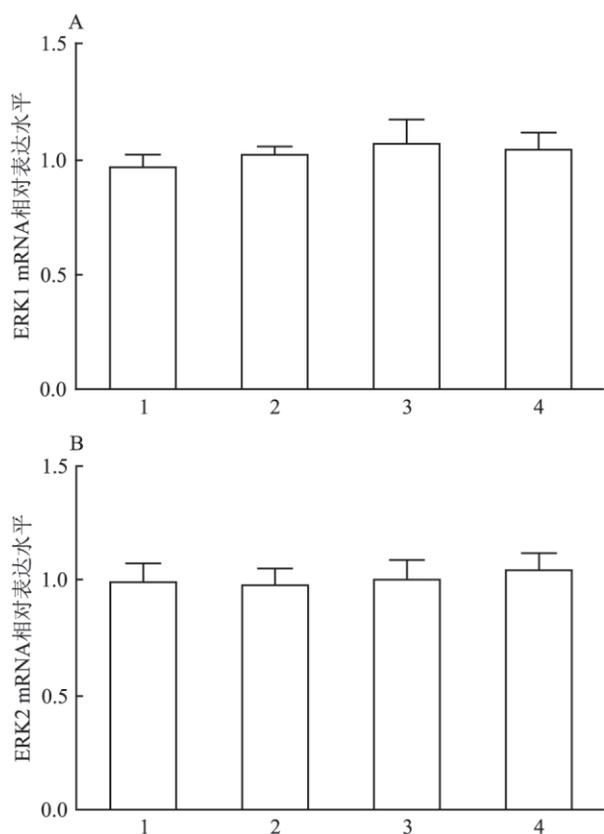


图4 重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞 ERK1/2 mRNA 表达的影响  
A: ERK1 mRNA; B: ERK2 mRNA; 1: 空白对照组; 2: 1.5 μg/ml 组; 3: 3.0 μg/ml 组; 4: 6.0 μg/ml 组

### 3 讨论

PVR 是多种细胞及细胞因子参与的对眼内损伤的过度修复反应<sup>[7]</sup>。人 RPE 细胞的增生、迁移是 PVR 发病的早期组织病理学机制。RPE 细胞在 PVR 的发展中起着决定性的作用。抑制 RPE 细胞迁移、增生是治疗 PVR 的方向之一。体外培养的 RPE 细胞(ARPE-19)有活体内 RPE 细胞所特有的结构和功能特点,可用于各种体外实验<sup>[8]</sup>,因此本研究选择 ARPE-19 细胞作为实验对象。

随着重楼皂苷 I 增高,对 ARPE-19 细胞 IR 逐渐提高,提示重楼皂苷 I 有抑制 ARPE-19 细胞增殖的活性。此外,通过划痕试验和 Transwell 试验分别检测了重楼皂苷 I 对 RPE 细胞横向和纵向迁移的影响。因为 PVR 的本质是机体对损伤的过度修复。在 PVR 中,由于受到各种细胞因子的影响,视网膜色素上皮细胞除了水平方向运动外,纵向侵袭也是视网膜前、下增生膜形成的重要原因。结果表明,重楼皂苷 I 明显抑制了 ARPE-19 细胞的侵袭和迁移。

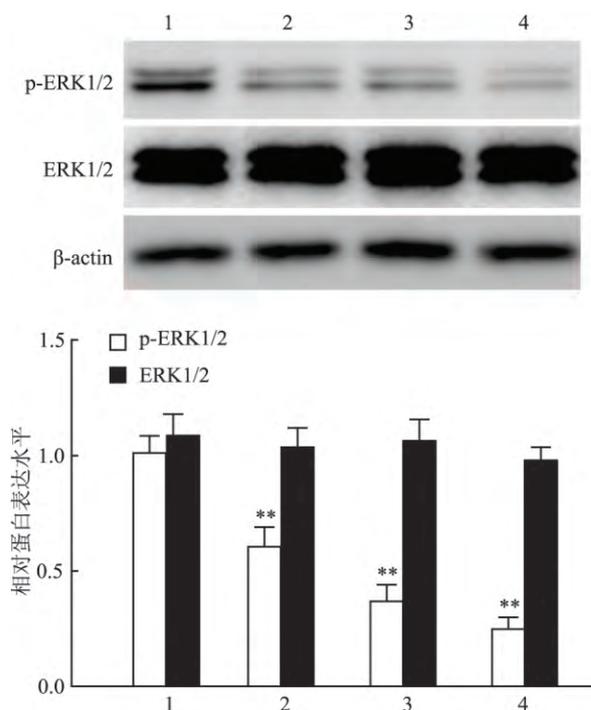


图5 重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达的影响

1: 空白对照组; 2: 1.5 μg/ml 组; 3: 3.0 μg/ml 组; 4: 6.0 μg/ml 组; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

目前就重楼皂苷 I 抑制 ARPE-19 细胞增殖、侵袭和迁移的机制还不清楚。重楼活性单体能通过抑制 ERK 的磷酸化抑制结肠癌 SW620 细胞的增殖<sup>[9]</sup>。ERK 也被称为丝裂原激活的 MAPK 通路,研究<sup>[10]</sup>显示,只有磷酸化的 ERK 才可以进入细胞核内,促进 c-Fos 与 c-Jun 等转录因子的磷酸化,参与 ERK 通路下游的一系列的激活反应。ERK 主要参与细胞分化或增殖,促进细胞生存<sup>[11]</sup>,ERK1/2 MAPK 通路阻断可抑制胃癌、乳腺癌等细胞凋亡、促进细胞侵袭,并且抑制 miR-21 及其靶基因表达<sup>[12-14]</sup>。本研究检测了不同浓度重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞 ERK1/2 mRNA 表达以及对 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达的影响。结果表明,重楼皂苷 I 对 ARPE-19 细胞 ERK1/2 mRNA 表达以及对 ERK1/2 蛋白表达并无明显影响。重楼皂苷 I 可能主要通过下调 ERK1/2 磷酸化的程度,从而抑制了 ARPE-19 细胞增殖、侵袭和迁移。

综上所述,本研究结果显示重楼皂苷 I 能够抑制人视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19 增殖、迁移,这可能与抑制 ERK1/2 的磷酸化有关。这为中药重楼治疗 PVR 提供了一定的依据。

## 参考文献

- [1] Ryan S J. 视网膜[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 2011: 2209-11.
- [2] 李彬, 阚红卫, 张大传, 等. 衰老对大鼠视网膜色素上皮细胞 ROS 生成和 NADPH 氧化酶表达的影响[J]. 安徽医科大学学报 2012, 47(8): 936-9.
- [3] 朱翠萍. 云南红药胶囊与银杏叶片在治疗眼底出血性疾病中的应用[J]. 中国医药指南 2011 9(7): 28-9.
- [4] Kong M, Fan J, Dong A. Effects of polyphyllin I on growth inhibition of human non-small lung cancer cells and in xenograft [J]. *Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai)* 2010, 42(11): 827-33.
- [5] Ma D D, Lu H X, Xu L S, et al. Polyphyllin D exerts potent anti-tumour effects on lewis cancer cells under hypoxic conditions [J]. *J Int Med Res* 2009, 37(3): 631-40.
- [6] 程卉, 苏婧婧, 候会洁, 等. 重楼皂苷 I 抗宫颈癌 HeLa 细胞作用及机制研究[J]. 中药材 2013, 36(11): 1815-9.
- [7] Khan M A, Brady C J, Kaiser R S. Clinical management of proliferative vitreoretinopathy: an update [J]. *Retina* 2015, 35(2): 165-75.
- [8] Dunn K C, Aotaki-Keen A E, Putkey F R, et al. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties [J]. *Exp Eye Res* 1996, 62(2): 155-69.
- [9] 陈家劲, 王娟娟, 张鹏, 等. 重楼活性单体抑制结肠癌 SW620 细胞增殖并诱导细胞凋亡[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版) 2015, 36(2): 124-30.
- [10] Marshall C J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation [J]. *Cell* 1995, 80(2): 179-85.
- [11] Yokawa E, Takai S, Tanaka M, et al. Overexpression of ERK, an EPH family receptor protein tyrosine kinase, in various human tumors [J]. *Cancer Res* 1994, 54(14): 3645-50.
- [12] Lim S C, Duong H Q, Parajuli K R, et al. Pro-apoptotic role of the MEK/ERK pathway in urso-deoxycholic acid-induced apoptosis in SNU601 gastric cancer cells [J]. *Oncol Rep* 2012, 28(4): 1429-34.
- [13] Ling M, Li Y, Xu Y, et al. Regulation of miRNA-21 by reactive oxygen species-activated ERK/NF- $\kappa$ B in arsenite-induced cell transformation [J]. *Free Radic Biol Med* 2012, 52(9): 1508-18.
- [14] Huang T H, Wu F, Loeb G B, et al. Up-regulation of miR-21 by HER2/neu signaling promotes cell invasion [J]. *J Biol Chem* 2009, 284(27): 18515-24.

## Effects of Polyphyllin I on proliferation and migration of human retinal epithelial cells line ARPE-19

Su Feifei, Lu Mudi, Zeng Huihong, et al

(Dept of Ophthalmology, Hezhou Renmin Hospital, Hezhou 542899)

**Abstract Objective** To study the effects of Polyphyllin I on the proliferation and migration of human retinal pigment epithelial cell ARPE-19. **Methods** MTT assay was performed to investigate the effect of Polyphyllin I on the proliferation of ARPE-19 cells. Invasion ability of ARPE-19 cells was determined by a Matrigel invasion assay. Migration ability of ARPE-19 cells was determined by a wound healing assay. Real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction was used to detect ERK1/2 mRNA expression. Western blot was used to detect the expression of ERK1/2, p-ERK1/2. **Results** Polyphyllin I inhibited proliferation of ARPE-19 cells in a dose dependent manner ( $P < 0.01$ ). Polyphyllin I treatment reduced migration and invasion capacity of ARPE-19 cells ( $P < 0.01$ ). Polyphyllin I treatment has no effect on the ERK1/2 mRNA and ERK1/2 protein expression in ARPE-19 cells, but p-ERK1/2 protein expression was markedly decreased by treatment with Polyphyllin I ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Polyphyllin I can effectively inhibit the ARPE-19 cells proliferation and migration, it may be related to inhibition of the phosphorylation of ERK1/2 in ARPE-19 cells. This study provides some evidences for the efficacy of paradisi in the treatment of proliferative vitreoretinopathy.

**Key words** Polyphyllin I; proliferation; migration; retinal pigment epithelial cells