

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000263

腺病毒介导的 Slit2 及 Slit2 ShRNA 转染缺氧诱导的人 RPE 细胞对人脉络膜微血管内皮细胞增殖的影响

汤艳玲, 周希媛

(重庆医科大学附属第二医院眼科, 重庆 400010)

【摘要】目的:观察腺病毒介导的 Slit2 及 Slit2 ShRNA 转染缺氧诱导的人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial cells, RPE)细胞对人脉络膜微血管内皮细胞(human choroidal microvascular endothelial cell, HCMEC)增殖的影响,探讨 Slit2 在脉络膜新生血管中的可能作用,为脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)提供新的治疗思路。**方法:**体外培养并鉴定人 RPE 细胞、HCMEC;200 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴建立化学缺氧模型,Transwell 小室建立细胞共培养模型;将缺氧的 RPE 细胞随机分为 Slit2 组(加入 Slit2)、Slit2 ShRNA 组(加入 Slit2 ShRNA)、空腺病毒组(加入空腺病毒)、缺氧组,12、24、48 h 后采用 CCK 8(Cell Counting Kit-8, CCK 8)法检测 HCMEC 的增殖。**结果:**不同组别存在组间差别,差异均有统计学意义($F=98.122, P=0.000$),不同时间点存在差别($F=3388.913, P=0.000$),组别与时间点的交互作用($F=82.863, P=0.000$)。Slit2 组吸光度(absorbance, A)值在 24 h、48 h 均高于其他组(与缺氧组 $P=0.001$,其余 $P=0.000$),Slit2 ShRNA 组 A 值在 24 h、48 h 均低于其他组(48 h 与缺氧组 $P=0.003$,与空腺病毒组 $P=0.008$,其余 $P=0.000$)。**结论:**Slit2 的高表达可明显促进 HCMEC 的增殖,沉默 RPE 细胞中的 Slit2 的表达后,会明显抑制 HCMEC 的增殖。

【关键词】Slit2;人视网膜色素上皮细胞;人脉络膜微血管内皮细胞;Transwell 共培养

【中图分类号】R773.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-12-16

Effects of the hypoxia-induced human retinal pigment epithelial cells which transfected by adenovirus-mediated Slit2 and adenovirus-mediated Slit2 ShRNA on the proliferation of human choroidal microvascular endothelial cells

Tang Yanling, Zhou Xiyuan

(Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effect of the hypoxia-induced human retinal pigment epithelial cells(RPE) which transfected by adenovirus-mediated Slit2 and adenovirus-mediated Slit2 ShRNA on the proliferation of human choroidal microvascular endothelial cells(HCMEC), to explore the possible role of Slit2 in choroidal neovascularization(CNV) and to provide new ideas for the treatment of choroidal neovascularization. **Methods:** RPE cells and HCMEC cells were identified and cultured in vitro. Hypoxic conditions were achieved by adding 200 $\mu\text{mol/l}$ cobalt chloride to medium to mimic hypoxia. RPE cells and HCMEC cells were cultured in a contact co-culture system by Transwell chamber. The hypoxia RPE cells were randomly divided into Slit2 treated group(adding Slit2RNA), Slit2 shRNA treated group(adding Slit2 shRNA), empty adenovirus group(adding empty adenovirus), hypoxia group. CCK8 assay was carried out to determine the proliferation of HCMEC cells after 12, 24, 48 h. **Results:** There were statistically significant differences among different groups($F=98.122, P=0.000$) and different time points($F=3388.913, P=0.000$). The interaction between different groups and time points were also different($F=82.863, P=0.000$). The absorbance(A) value was higher in Slit2 treated group than in other groups(hypoxia group: $P=0.001$; other groups: $P=0.000$). The A value was lower in Slit2 shRNA treated group than in other groups at 24 h and 48 h(at 48 h: hypoxia group, $P=0.003$; empty adenovirus group, $P=0.008$; other groups, $P=0.000$). **Conclusion:** High-expression of Slit2 can significantly promote the proliferation of HCMEC cells. Silencing Slit2 shRNA expression in RPE cell can significantly inhibit the proliferation of HCMEC cells.

【Key word】Slit2; retinal pigment epithelial cells; human choroidal microvascular endothelial cell; Transwell coculture

作者介绍: 汤艳玲, Email: 420663397@qq.com,

研究方向: 眼底病。

通信作者: 周希媛, Email: zhouxiyuan2002@aliyun.com.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81170858)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000263.html>

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是一系列引起视功能严重障碍的脉络膜、视网膜疾病的重要病理生物学机制,尤其在渗出性老年性黄斑变性,CNV是致盲的根本原因,它的发生是一个多因子、多细胞共同作用的过程,在CNV发生过程中,脉络膜微血管内皮细胞是CNV发生的靶细胞,而视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞对其起着重要的调控作用^[1]。目前Slit2(神经导向因子)在血管系统中的作用受到关注,Wang等^[2]研究证实,在结肠癌、乳腺癌、胃癌等实体瘤中均有Slit2蛋白的表达,同时血管内皮细胞上有Robo1表达,并首次证实Slit2与Robo1结合可促进肿瘤新生血管形成,但在CNV中的作用未见报道。本实验利用CoCl₂造成RPE细胞缺氧模型,并通过腺病毒转染使Slit2高表达及RNA干扰技术将Slit2靶向沉默后,采用Transwell小室建立人脉络膜微血管内皮细胞(human choroidal microvascular endothelial cell, HCMEC)和RPE细胞共培养模型,研究腺病毒介导的Slit2及Slit2 ShRNA转染缺氧诱导的人RPE细胞对HCMEC增殖的影响,进一步研究Slit2在CNV中的作用,为CNV的治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

人ARPE-19细胞株购于ATCC公司,HCMEC购自上海众华生物公司,DMEM基础培养基(Hyclone),M199培养基(GIBCO),内皮细胞生长添加剂(EGGS, Sigma),Heparin sulfate(Sigma),人纤维连接蛋白(Sigma),胎牛血清(GIBCO),胰酶(Sigma),Transwell小室(Corning),2-3-5-2H-四唑单钠盐(CCK8,广州),CoCl₂(Sigma),腺病毒介导的Slit2及Slit2 ShRNA由长沙赢润生物技术有限公司构建并测序。

1.2 细胞的培养及鉴定

1.2.1 RPE细胞的培养 人ARPE-19细胞株购自ATCC公司,复苏后将细胞接种于含10%FBS、1%青霉素、链霉素混合液的DMEM/F12培养液中,培养条件为37℃,5%CO₂恒温培养箱,细胞达80%~90%融合时以1:2传代。

1.2.2 HCMEC的培养 复苏后将细胞接种于包被有10 μg/cm²纤维连接蛋白的培养瓶中,M199完全培养基(含有10%FBS、75 μg/ml ECGS、1 000 μg/ml Heparin sulfate、100 IU/ml青霉素及100 μg/ml链霉素),培养条件为37℃,5%CO₂,3~4 d后待细胞达80%~90%融合时,以1:2的比例传代。

1.2.3 HCMEC的鉴定 取第4代细胞爬片,爬片后用4%的多聚甲醛固定15 min,PBS漂洗3次(每次5 min),0.5%Triton X-100孵育1次20 min,PBS漂洗3次(每次2 min),封闭血

清孵育20 min,加入一抗(FVIII因子1:50)4℃过夜,PBS漂洗4次(每次2 min),加入二抗(山羊抗兔1:2 000)37℃30 min,PBS漂洗3次(每次2 min),DAB显色,复染、脱水、透明、封片。以PBS代替一抗作为阴性对照组。

1.3 建立共培养体系及缺氧模型

1.3.1 细胞共培养系统的建立 取第20代生长状态良好的RPE细胞,胰酶消化制成单细胞悬液,细胞密度 $5 \times 10^4/L$,每孔约600 μl接种于24孔板。利用微孔孔径0.4 μm Transwell小室建立非接触的细胞共培养系统,取第3、4代生长状态良好HCMEC,胰酶消化制成单细胞悬液,细胞密度为 $5 \times 10^4/L$,每孔约100 μl接种于Transwell小室内底面,然后将小室置于接种有RPE细胞的孔内。

1.3.2 细胞缺氧模型的建立 向RPE细胞培养液中加入200 μmol/L CoCl₂建立细胞化学缺氧模型。

1.3.3 腺病毒介导的Slit2及Slit2 ShRNA转染RPE细胞 Slit2组、Slit2 ShRNA处理组、空腺病毒组分别加入1 μl的AD-Slit2、3 μl的AD-Slit2-ShRNA,1 μl空腺病毒;12、24、48 h后行CCK8检测。

1.3.4 实验分组 缺氧组:HCMEC+RPE+CoCl₂;Slit2组:HCMEC+RPE+CoCl₂+AD-Slit2;Slit2 ShRNA组:HCMEC+RPE+CoCl₂+AD-Slit2-ShRNA,空腺病毒组:HCMEC+RPE+CoCl₂+AD,共4组。每组设置3个复孔,各组分别培养时间为12、24、48 h。

1.4 观察指标及测定方法

CCK8法测定细胞增殖数量:分别于12、24、48 h将小室取出,吸取上清,重新加入新鲜培养基,加入10 μl CCK8反应液,在细胞培养箱中孵育2 h,移至96孔板。在酶联免疫检测仪上选择450 nm波长,测定各孔吸光度(absorbance, A)值。

1.5 统计学方法

数据采用SPSS 19.0软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用多因素多水平的重复测量方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 RPE细胞的培养

RPE细胞属贴壁型细胞,梭形,呈典型的成纤维样细胞生长(图1)。

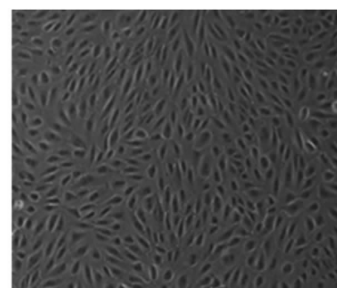


图1 RPE细胞(200×)

Fig.1 Retinal pigment epithelial cells, RPE (200×)

2.2 HCMEC 的培养及鉴定

HCMEC 属贴壁型细胞,开始呈细长形生长,成群生长的细胞呈多边形、类圆形,细胞群融合后呈典型的铺路石样外观。HCMEC 经 FVIII 因子相关抗原免疫细胞化学染色 95% 以上的细胞呈阳性反应—棕褐色着色,阴性对照未见着色(图 2、图 3)。

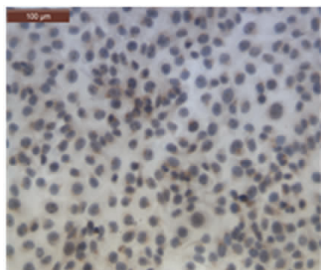


图 2 FVIII 因子相关抗原免疫细胞化学阳性片 (200 ×)

Fig.2 Positive stainine of FVIII-related antigen in cultured HCMEC (200 ×)

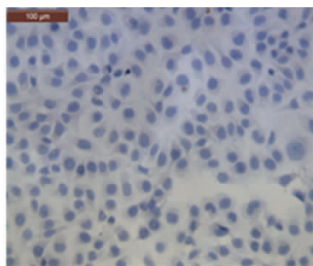


图 3 FVIII 因子相关抗原免疫细胞化学阴性片 (200 ×)

Fig.3 Negative staining of FVIII-related antigen in cultured HCMEC (200 ×)

2.3 CCK 8 法测定细胞增殖情况

不同组别存在组间差别,差异均有统计学意义 ($F=98.122, P=0.000$),不同时间点存在差别 ($F=3388.913, P=0.000$),组别与时间点的交互作用 ($F=82.863, P=0.000$)。Slit2 组 A 值在 24、48 h 均高于其他组(与缺氧组 $P=0.001$,其余 $P=0.000$),Slit2 ShRNA 组 A 值在 24、48 h 均低于其他组(48 h 与缺氧组 $P=0.003$,与空腺病毒组 $P=0.008$,其余 $P=0.000$)。说明 Slit2 的高表达可明显促进 HCMEC 的增殖,沉默 RPE 细胞中的 Slit2 的表达后,会明显抑制 HCMEC 的增殖(表 1、图 4~6)。

表 1 腺病毒介导的 Slit2 及 Slit2ShRNA 转染缺氧诱导的 RPE 细胞对 HCMEC 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effect of the hypoxia-inducible RPE cells which transfected by adenovirus-mediated Slit2 and adenovirus-mediated Slit2 shRNA on the proliferation of HCMEC ($\bar{x} \pm s$)

组别	A 值		
	12 h	24 h	48 h
缺氧组	0.360 ± 0.021	0.640 ± 0.017	0.706 ± 0.008
空腺病毒组	0.344 ± 0.096	0.632 ± 0.005	0.683 ± 0.011
Slit2 组	0.357 ± 0.007	0.747 ± 0.015	0.842 ± 0.014
Slit2 ShRNA 组	0.352 ± 0.003	0.508 ± 0.013	0.585 ± 0.032

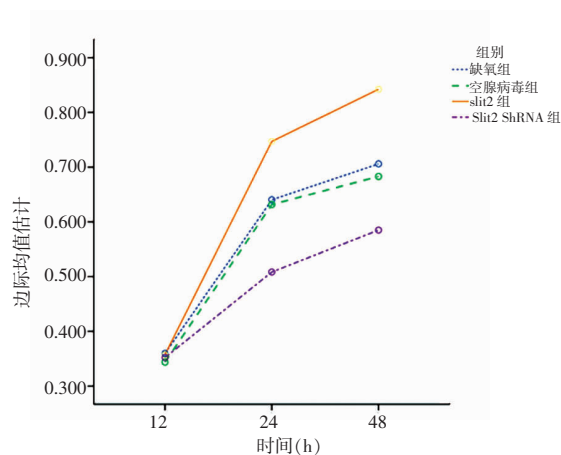


图 4 边际均值估计趋势变化图

Fig.4 Changing trend of estimated marginal means

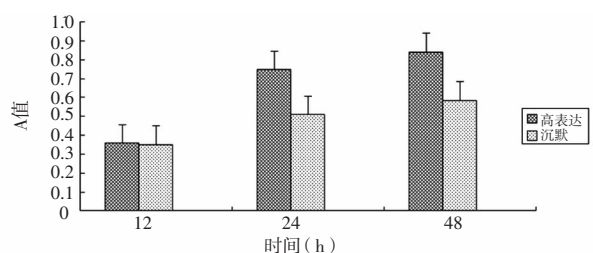


图 5 Slit2 组 A 值在 24 h、48 h 均明显高于 Slit2 ShRNA 组

Fig.5 Higher absorbance value of Slit2 treated group than Slit2 ShRNA group at 24 h and 48 h

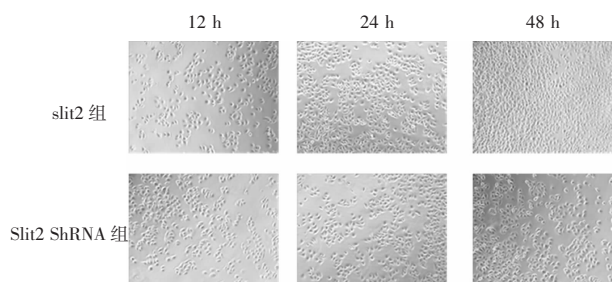


图 6 Slit2 组细胞密度在 24 h、48 h 均高于 Slit2 ShRNA 组

Fig.6 Higher cell density of Slit2 treated group than Slit2 ShRNA group at 24 h and 48 h

3 讨论

CNV 的发生发展是一个复杂的过程,是一种异常血管发生和血管形成的病理生物学改变,是多种眼底疾病的最终结局,目前常用的治疗方法如光动力治疗、玻璃体腔注射雷珠单抗(诺适得)等,但均具有一定的局限性,这些方法只能针对已经形成的 CNV,却不能从根本上阻止 CNV 的发生发展,因此探索新的方法从而阻止 CNV 的发生发展是目前研究的热点。

Slit2 在体内对神经元轴突的生长进行导向,在体外与感觉轴突侧枝发芽和生长有关^[3]。Wang 等^[2]发现 Slit2 在多种肿瘤细胞株和原发肿瘤中表达都有增加;杨淑萍等^[4]研究发现 Slit2/Robo1 信号途径在食管癌发生发展和血管形成过程中发挥着重要作用,在食管鳞癌中 Slit2 过表达可刺激新生血管增生进而促进肿瘤生长、浸润、转移。王丽京等^[5]研究也发现 Slit2 在金黄地鼠颊囊癌变过程中的表达与 VEGF、MVD 的变化呈一致性。VEGF 在早期参与了新生血管的形成,促进肿瘤微血管的形成,因此得出 Slit2/Robo 在新生血管形成的过程中发挥一定的功能,或者是在新生血管形成的开启过程前后的某个阶段发挥功能。陈军等^[6]研究初步证明了 Slit2/Robo1 蛋白在直肠癌血管生成中起着重要作用,并与直肠癌的生长、侵袭及转移密切相关。故推测 Slit2、Robo1 在新生血管形成中发挥了重要作用,前期研究显示靶向沉默缺氧诱导的 RPE 细胞中 Slit2 的表达后,用 real-time PCR 和 Western blot 检测 Slit2、Robo1 和 VEGF 的表达变化,结果显示 VEGF 会随着 Slit2、Robo1 的表达减少而显著降低,而沉默缺氧诱导的 RPE 细胞中 Slit2 的表达后,用 real-time PCR 和 Western blot 检测 Slit2、Robo1 和 VEGF 的表达变化,结果显示 VEGF 会随着 Slit2、Robo1 的表达增加而显著增高^[7],故推测 Slit2-Robo1 信号通路可以调节缺氧诱导的 VEGF 的表达。VEGF 作为新生血管不可缺少的因子,能特异结合 HCMEC,从而促进 HCMEC 增殖,从而参与了 CNV 的形成。

本实验通过 Transwell 小室实现成 RPE 细胞与 HCMEC 的共培养。Transwell 膜,是含带有微孔的聚碳酸酯膜,孔径为 0.4 μm ,这种膜允许生物大分子自由通过膜的微孔隙^[8],细胞不可通过膜的微孔隙,下层培养液中的成分可以影响到上室内的细胞,从而可以研究下层培养液中的成分对上层细胞生长、运动等的影响。本实验将 HCMEC 接种于上室,RPE 细胞接种在下室,使 RPE 的培养液可以通过滤膜作用于 HCMEC,从而观察在非接触情况下 RPE 细胞对 HCMEC 增殖的影响^[9]。本实验采用 200 $\mu\text{mol/l}$ 氯化钴建立化学缺氧模型,操作简单、重复性好、不易受外界环境影响^[10]。

本实验将 RPE 细胞与 HCMEC 共培养,进而研究腺病毒介导的 Slit2 及 Slit2 ShRNA 转染缺氧诱导的 RPE 细胞对 HCMEC 增殖的影响,证实了 Slit2 的高表达可明显促进 HCMEC 的增殖,沉默 RPE 细胞中的 Slit2 的表达后,会明显抑制 HCMEC 的增殖。考虑可能是 Slit2 与 Robo1 结合后使 VEGF 表达增加,从而 VEGF 对 HCMEC 的增殖产生影响,但其机制还需进一步研究。为治疗 CNV 提供了新的治疗思路。

参 考 文 献

- [1] Peterson LJ, Wittchen ES, Geisen P, et al. Heterotypic RPE-choroidal endothelial cell contact increases choroidal endothelial cell transmigration via PI3-kinase and Rac1[J]. *Exp Eye Res*, 2007, 84(4): 737-744.
- [2] Wang B, Xiao Y, Ding BB, et al. Induction of tumor angiogenesis by Slit2-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity[J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(1): 19-29.
- [3] Mathilda MT, Andrews WD, Ypsilanti AR, et al. Slit-roundabout signaling regulates the development of the cardiac systemic venous return and pericardium[J]. *Circ Res*, 2013, 112(3): 465-475.
- [4] 杨淑萍, 卢雪峰, 王 仲, 等. Slit2 与 MVD 及食管癌生物学行为关系的研究[J]. *医学与哲学*, 2009, 30(2): 53-55.
- [5] Wang LJ, Zhao Y, Han B, et al. Targeting Slit2-Roundabout signaling inhibits tumor angiogenesis in chemical-induced squamous cell carcinogenesis[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(3): 510-517.
- [6] 陈 军, 于东风, 刘 弋, 等. Slit2/Robo1 蛋白在直肠癌中的表达及与微血管密度的关系[J]. *安徽医药*, 2011, 15(6): 735-737.
- [7] 黄莉芸, 周希瑗. 腺病毒介导的 slit2 shRNA 对缺氧诱导的人视网膜色素上皮细胞中血管内皮生长因子表达的影响[J]. *中国生物制品学杂志*, 2014(3): 361-365, 371.
- [8] 张晓梅, 王彬杰, 王 巍, 等. Transwell 小室共培养条件下缺氧时视网膜色素上皮细胞对内皮细胞增殖的影响[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2011, 45(4): 312-315.
- [9] Geisen P, McColm JR, Hartnett ME. Choroidal endothelial cells transmigrate across the retinal pigment epithelium but do not proliferate in response to soluble vascular endothelial growth factor[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82(4): 608-619.
- [10] Oh JH, Oh J, Togloom A, et al. Effects of ginkgo biloba extract on cultured human retinal pigment epithelial cells under chemical hypoxia[J]. *Curr Eye Res*, 2013, 38(10): 1072-1082.

(责任编辑:唐宗顺)