

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000389

Slit2 基因转染对人视网膜色素上皮细胞 VEGF 表达的影响及其作用机制

梅 雨, 周希媛

(重庆医科大学附属第二医院眼科, 重庆 400010)

【摘要】目的:研究 Slit2 基因对人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞表达血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的影响,并探讨丝裂原激活(mitogen-activated, MEK)/细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal regulated protein kinase, ERK)和磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(serine-threonine kinase, AKT)这 2 条信号通路在此过程中的作用。**方法:**(1)体外培养人 RPE 细胞株 RPE-19;(2)将腺病毒介导的 Slit2 (adenovirus-mediated Slit2, Ad-Slit2)转染 RPE 细胞,培养 12、24 h 及 48 h;(3)转染前将 MEK 信号通路阻断剂 PD98059、PI3K 信号通路阻断剂 LY294002 预处理 RPE 细胞 1 h;(4)用 real-time PCR 及酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测 VEGF 的表达水平,用 Western blot 检测磷酸化 ERK、磷酸化 AKT 的表达情况。**结果:**Slit2 转染的 RPE 细胞后,real-time PCR 结果显示不同时间之间 VEGF mRNA 表达有差别($F=12.789, P=0.018$),组别和时间之间存在交互作用($F=13.375, P=0.017$),不同组别有差别($F=16.855, P=0.015$),在 24 h 与 48 h, Ad-Slit2 组高于空腺病毒组($P_{24h}=0.002, P_{48h}=0.018$)。ELISA 结果显示不同时间之间 VEGF 蛋白表达有差别($F=24.886, P=0.000$),组别和时间之间存在交互作用($F=23.524, P=0.000$),不同组别有差别($F=28.250, P=0.006$),在 48 h, Ad-Slit2 组高于空腺病毒组($P=0.003$)。Western blot 结果可见 p-ERK 及 p-AKT 的蛋白表达水平增加,阻断剂 PD98059 及 LY294002 分别能降低 ERK、AKT 的磷酸化水平,并与 Ad-Slit2 组相比较,real-time PCR 结果显示 VEGF mRNA 表达水平在不同时间有差别($F=32.202, P=0.000$),组别和时间之间存在交互作用($F=8.372, P=0.006$);不同组别存在差别($F=15.062, P=0.001$),ELISA 结果显示 VEGF 蛋白表达水平在不同时间之间有差别($F=90.703, P=0.000$),组别和时间之间存在交互作用($F=4.968, P=0.005$),不同组别存在差别($F=69.636, P=0.000$)。**结论:**PI3K/AKT 以及 MEK/ERK 这两条信号通路参与了 Slit2 所诱导的 RPE 细胞中 VEGF 表达水平增加。

【关键词】Slit2 基因;丝氨酸苏氨酸蛋白激酶;细胞外信号调节蛋白激酶;血管内皮生长因子

【中图分类号】R774.1⁺3

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-05-04

Effect of Slit2 gene transfection on vascular endothelial growth factor in retinal pigment epithelium cells and its mechanism

Mei Yu, Zhou Xiuyan

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

【Abstract】Objective: To investigate the effect of Slit2 gene on vascular endothelial growth factor(VEGF)in retinal pigment epithelium (RPE)cells and the function of PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways during the course. **Methods:** (1)human APRE-19 cells were cultured in vitro. (2)RPE cells were transfected by adenovirus-mediated Slit2(Ad-Slit2), then cultured for 12, 24, 48 h. (3) Before being transfected by Ad-Slit2, RPE cells were pretreated with MEK inhibitor PD98059 and PI3K inhibitor LY294002 for 1 h. (4)VEGF mRNA expression levels were detected by real-time PCR and the protein expression levels were detected by ELISA. The protein expression levels of p-ERK, p-AKT were detected by Western blot. **Results:** After RPE cells being transfected with Ad-Slit2, real-time PCR result showed that there were significant statistically differences in VEGF mRNA expression among different time points($F=12.789, P=0.018$) and among different groups($F=16.855, P=0.015$); time points and groups were interrelated; at 24 h and 48 h, the VEGF mRNA expression was higher in Ad-slit2 group than in adenovirus group($P_{24h}=0.002, P_{48h}=0.018$). ELISA results showed that there were significant statistically differences in VEGF protein expression among different time points($F=24.886, P=0.000$) and among different groups($F=28.250, P=0.006$); time points and groups were interrelated; at 48 h, the VEGF protein expression was higher in Ad-Slit2 group than in adenovirus

作者介绍:梅 雨, Email:38236902@qq.com,

研究方向:眼底病。

通信作者:周希媛, Email:zhouxiuyan2002@aliyun.com。

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.cyxh.000389.html>

group($P=0.003$). Western blot showed that p-ERK and p-AKT protein expressions increased in RPE cells transfected with Ad-Slit2; PD98059 decreased the activation of p-ERK and LY294002 decreased the activation of p-AKT. real-time PCR results showed that there were statistically significant differences in VEGF mRNA expression among different time points($F=32.202, P=0.000$) and among different groups($F=15.062, P=0.001$); time points and groups were interrelated($F=8.372, P=0.006$). ELISA results showed there were statistically significant differences in VEGF protein expression among different time points($F=90.703, P=0.000$) and among different groups($F=69.636, P=0.000$); time points and groups were interrelated($F=4.968, P=0.005$). **Conclusion:** The expression of the VEGF in RPE cells transfected with Ad-Slit2 can be increased by MEK/ERK and PI3K/Akt signaling pathways.

【Key words】Slit2 gene; serine-threonine kinase; extracellular signal regulated protein kinase; vascular endothelial growth factor

眼底新生血管是多种眼底疾病所导致的并发症,常引起严重的视力障碍^[1]。眼底新生血管的发生主要是由于促进因子和抑制因子动态平衡失调而导致,在这些因子中,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)作为一种很强的内皮细胞有丝分裂原,具有内皮细胞高度特异性,参与血管内皮细胞增殖、血管新生及增加血管通透性,从而发挥重要的调节作用。而 VEGF 又受到多种因子的调节,如缺氧诱导因子、上皮生长因子、成纤维细胞生长因子等。近年来,Slit 与其受体 Robo 被认为是与肿瘤血管形成有关的信号分子^[2-4]。在 Slit 家族中,表达于内皮细胞上的 Slit2 成为了课题组研究的焦点。

在本课题组的前期研究中已经证实,Slit2 在正常人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞中有表达,并且在 RPE 缺氧后 VEGF 表达增加的同时,也能检测到 Slit2 表达水平的增加^[5]。本实验主要研究 Slit2 对 RPE 中 VEGF 表达的影响,以及这种影响是否通过磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(serine-threonine kinase, AKT)与丝裂原激活(mitogen-activated, MEK)/细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal regulated protein kinase, ERK)这 2 条信号通路起作用,为眼底新生血管疾病的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人 RPE-19 细胞株购于 ATCC 公司,DMEM/F12 培养基(Hyclone 公司);青霉素链霉素混合液(碧云天公司);胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)(Gibco 公司);兔抗人 AKT、ERK1/2、Thr308 位点磷酸化 AKT、Thr202/Tyr204 位点磷酸化

ERK1/2 多克隆抗体(Cell Signaling Technology 公司);特异性阻断剂 PD98059 及特异性阻断剂 LY294002(Cell Signaling Technology 公司);人 VEGF ELISA 试剂盒(Boston 公司);PCR 引物(Takara 公司);Trizol(Takara 公司);腺病毒介导的 Slit2 (adenovirus-mediated Slit2, Ad-Slit2)RNA 由长沙赢润生物技术有限公司构建并测序。

1.2 实验分组

取生长状态良好的一批 RPE 细胞随机分为 Ad-Slit2 病毒组、空腺病毒组,共 2 组,Ad-Slit2 病毒组每 1 ml 培养基加入 1 μ l 的 Ad-Slit2,空腺病毒组每 1 ml 培养基加入 1 μ l 空腺病毒,在未加入病毒前收集细胞及上清(即为 0 h),加入病毒 12、24、48 h 后收取细胞及上清,用于 real-time PCR、ELISA 的检测;另取 1 批 RPE 细胞随机分为 Ad-Slit2 病毒组、LY294002 阻断组、PD98059 阻断组,共 3 组,Ad-Slit2 组仍为每 1 ml 培养基加入 1 μ l 病毒,阻断组为每 1 ml 培养基加入浓度 10 μ mol/L 的 PD98059 或 LY294002 的量为 1 μ l,预处理 1 h 后再加入 1 μ l 的 Ad-Slit2,12、24、48 h 后提取细胞蛋白,用于 Western blot 的检测;另将 1 批 RPE 细胞随机分为 Ad-Slit2 病毒组、LY294002 阻断组、PD98059 阻断组、LY294002+PD98059 阻断组,共 4 组,加入阻断剂与病毒的处理方法同前,12、24、48 h 后收取细胞及上清,用于 real-time PCR、ELISA 的检测。

1.3 实验方法

1.3.1 人 RPE 细胞的培养 人 RPE-19 细胞株购于 ATCC 公司,已经过角蛋白染色鉴定,复苏后将细胞接种于含有 10% FBS、1%青霉素链霉素混合液的 DMEM/F12 培养基中,置于含 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中,当细胞铺满 90%时即可传代。

1.3.2 Real-time PCR 检测在人 RPE 细胞上 VEGF mRNA 水平的表达 将 RPE 细胞接种于 6 孔板,当细胞铺满 90%时收取细胞,用 1 ml/孔的冰磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗孔内细胞,然后每孔加入 0.5 ml Trizol,静置 5 min,按试剂盒说明抽提 RNA,测定 RNA 的浓度和纯度,按试剂盒说明逆转录为 cDNA,根据特异性引物序列(表 1),SYBR 反应体系共 25 μ l,按如下条件进行 real-time PCR 反应: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸

15 s, 30 个循环; 根据公式 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$ 和 $\Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta Ct}$, 计算各待检测基因的 mRNA 相对表达量, 每组重复 3 次并取平均值。

1.3.3 ELISA 检测培养上清液中 VEGF 浓度 提取 6 孔板内细胞上清液, 12 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 离心后收集上清, 按 ELISA 试剂盒说明进行操作, 每个标准品和样本的吸光度(A)值减去对照调零孔 A 值, 将样本的 ΔA 值代入标准曲线的公式内, 计算相应的 VEGF 的浓度值(pg/ml)。

表 1 Real-time PCR 扩增所用的引物序列

Tab.1 Primer sequences for real-time quantifimfive polymerase chain reaction

基因	引物	大小(bp)
β -actin	F1: 5'-gtgatctccttctgcatcctgt-3' R1: 5'-ccacgaactacatcctcaactcc-3'	132
VEGF	F1: 5'-gagtacatcttcaagccatcctg-3' R1: 5'-tgctctatcttcttttggtgcg-3'	204

1.3.4 Western blot 检测蛋白的表达 将处理后的细胞用 4 °C 预冷的 PBS 漂洗 3 次后, 在冰上加入蛋白裂解液裂解 1 h, 然后 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min, 提取上清液后测定蛋白浓度, 取 80 μ l 体系样本进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 用水浴式电转法将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜上, 经 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 于 37 °C 封闭 2 h 后, 按 1:1 000 稀释后加入兔抗人 AKT、ERK1/2、p-AKT308、p-ERK1/2 多克隆抗体, 4 °C 孵育过夜, 次日用 TBST 缓冲液漂洗 5 min $\times$ 4 次, 再加入山羊抗兔 (1:10 000), 37 °C 孵育 1 h, TBST 缓冲液漂洗 5 min $\times$ 4 次, 最后采用化学曝光法检测各条带所测定蛋白的表达, 并用 Quality one 分析灰度值结果。

1.4 统计分析

使用 SPSS 16.0 统计分析, VEGF 的浓度和 real-time PCR 值均为计量资料, 用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 结果采用重复测量方差分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Slit2 对 RPE 细胞中 VEGF 表达的影响

通过重复测量方差分析 real-time PCR 的结果, 不同时间之间差异具有统计学意义 ($F=12.789, P=0.018$), 说明 VEGF mRNA 的表达量有随时间变化的趋势, 组别和时间之间存在交互作用 ($F=13.375, P=0.017$), 说明时间因素的作用随分组的不同而不同, 不同组别也存在组间差异 ($F=16.855, P=0.015$), 说明分组因素起作用, 边际均值估计变化图可以直观的看出 VEGF mRNA 的表达量随时间的变化趋势 (图 1); 比较同一时间不同组间的 VEGF mRNA 表达量的差异, 在 24 h 与 48 h, Ad-Slit2 组的 VEGF mRNA 表达量明显高于空腺病毒组 ($P_{24h}=0.002, P_{48h}=0.018$), 说明腺病毒所介导的 Slit2 能增加 VEGF mRNA 的表达水平, 在空腺病毒组各时间点无明显差异 ($P_{0h,12h}=0.601, P_{0h,24h}=0.737, P_{0h,48h}=0.698$), 说明空腺病毒对 VEGF mRNA 的表达没有作用 (表 2)。

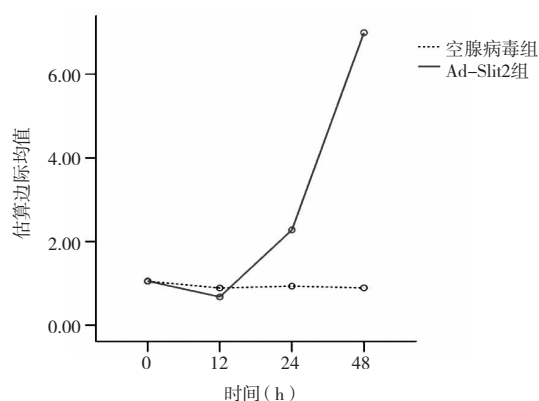


图 1 边际均值估计趋势变化图

Fig.1 Changing trend of estimated marginal means

表 2 Ad-Slit2 及空腺病毒转染 RPE 细胞后 VEGF mRNA 水平的变化

Tab.2 Expression levels of VEGF mRNA in RPE cells transfected with Ad-Slit2 or adenovirus

时间 (h)	Ad-Slit2 组	空腺病毒组
0	1.05 $\pm$ 0.43	1.05 $\pm$ 0.43
12	0.68 $\pm$ 0.43	0.89 $\pm$ 0.07
24	2.28 $\pm$ 0.27	0.94 $\pm$ 0.22
48	6.99 $\pm$ 2.72	0.89 $\pm$ 0.25

通过重复测量方差分析 ELISA 的结果, 不同时间之间差异具有统计学意义 ($F=24.886, P=0.000$), 说明 VEGF 蛋白表达量有随时间变化的趋势, 组别和时间之间存在交互作用 ($F=23.524, P=0.000$), 说明时间因素的作用随分组的不同而不同, 不同组别存在组间差异 ($F=28.250, P=0.006$), 说明分组因素起作用, 边际均值估计变化图可以直观的看出 VEGF 蛋白表达量随时间的变化趋势 (图 2); 比较相同时间不同组间的 VEGF 蛋白表达量的差异, 在 48 h, Ad-Slit2 组的 VEGF 蛋白表达量明显高于空腺病毒组 ($P=0.003$), 进一步比较同一组不同时间 VEGF 蛋白表达量的差异, 在 Ad-Slit2 组, 可见 VEGF 蛋白表达量在 48 h 表达明显增加 ($P_{0h,48h}=0.010, P_{12h,48h}=0.033, P_{24h,48h}=0.038$); 而空腺病毒组在各时间均无明显差异 ($P_{0h,12h}=0.672, P_{0h,24h}=0.605, P_{0h,48h}=0.676, P_{12h,24h}=0.730, P_{12h,48h}=0.989, P_{24h,48h}=0.904$), 以上结果表明腺病毒所介导的 Slit2 能增加 VEGF 的蛋白表达水平, 而腺病毒本身对 VEGF 的蛋白表达无明显作用 (表 3)。

表 3 Ad-Slit2 及空腺病毒转染 RPE 细胞后 VEGF 蛋白水平的变化

Tab.3 Expression levels of VEGF mRNA in RPE cells transfected with Ad-Slit2 or adenovirus

时间 (h)	Ad-slit2组	空腺病毒组
0	696.69 $\pm$ 236.110	696.69 $\pm$ 236.11
12	662.634 $\pm$ 159.063	765.94 $\pm$ 40.75
24	1 113.043 $\pm$ 241.752	772.69 $\pm$ 34.26
48	2 688.14 $\pm$ 509.83	764.93 $\pm$ 70.31

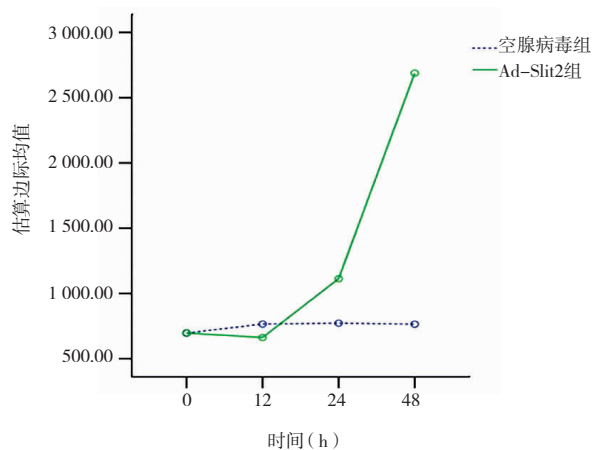


图2 边际均值估计趋势变化图

Fig.2 Changing trend of estimated marginal means

2.2 Slit2 对 RPE 细胞中 p-ERK1/2 及 p-AKT 表达的影响

Western blot 结果显示, Ad-Slit2 转染 RPE 后, p-AKT 蛋白表达量在 12 h 时可见表达增加, 在 24 h 达到高峰, 48 h 回到基础值, 而 p-ERK1/2 蛋白表达量在 12 h 表达明显增加, 随后开始降低, 结果表明当 Slit2 转染 RPE 细胞后, 会导致 p-AKT 与 p-ERK1/2 蛋白水平表达增加(图 3)。

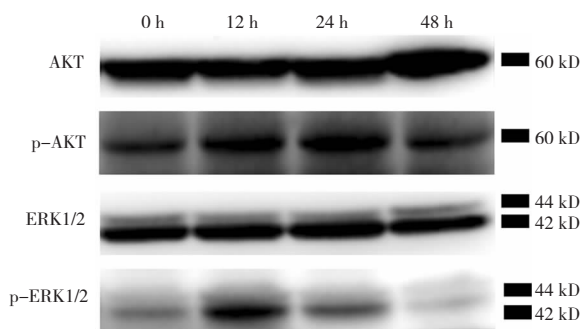


图3 Ad-Slit2 转染 RPE 细胞后 p-ERK1/2、p-AKT 表达的变化

Fig.3 Expression levels of p-ERK1/2 and p-AKT in RPE cells transfected with Ad-Slit2

2.3 PD98059 及 LY294002 阻断剂对 RPE 细胞中 VEGF 表达的影响

通过重复测量方差分析 real-time PCR 的结果, 不同时间具有统计学意义 ($F=32.202, P=0.000$), 组别和时间之间存在交互作用 ($F=8.372, P=0.006$); 不同组别存在组间差异 ($F=15.062, P=0.001$), 边际均值估计变化图可以直观的看出 VEGF mRNA 表达量随时间的变化趋势(图 4), 比较相同时间不同组间的差异, 在 12 h 加入阻断剂的 3 组细胞 VEGF 蛋白表达水平明显较 Ad-Slit2 组无明显变化 ($P_{\text{Ad-Slit2, LY294002}}=0.838, P_{\text{Ad-Slit2, PD98059}}=0.501, P_{\text{Ad-Slit2, LY294002+PD98059}}=0.716$), 在 24 h 时, LY294002 组与 LY294002+PD98059 组这两组的 VEGF mRNA 表达水平明显较 Ad-Slit2 组有明显降低, 而 PD98059 组降低不明显 ($P_{\text{Ad-Slit2, LY294002}}=0.000, P_{\text{Ad-Slit2, PD98059}}=0.302, P_{\text{Ad-Slit2, LY294002+PD98059}}=$

0.000), 在 48 h 时, 加入阻断剂的 3 组细胞 VEGF 蛋白表达水平均较 Ad-Slit2 组有明显降低 ($P_{\text{Ad-Slit2, LY294002}}=0.002, P_{\text{Ad-Slit2, PD98059}}=0.006, P_{\text{Ad-Slit2, LY294002+PD98059}}=0.001$), 以上结果说明分别或者同时阻断 AKT、ERK 这两条信号通路都能降低 VEGF mRNA 的表达水平(表 4)。

表4 LY294002 及 PD98059 对转染 Ad-Slit2 的 RPE 细胞中 VEGF mRNA 水平的影响

Tab.4 Effect of LY294002 and PD98059 on VEGF mRNA in RPE cells transfected with Ad-Slit2

分组	12 h	24 h	48 h
Ad-Slit2	0.68 ± 0.43	2.28 ± 0.27	6.99 ± 2.72
LY294002	0.72 ± 0.05	0.98 ± 0.08	2.11 ± 0.33
PD98059	0.81 ± 0.12	2.05 ± 0.41	2.84 ± 0.12
LY294002+PD98059	0.61 ± 0.10	0.72 ± 0.05	1.22 ± 0.08

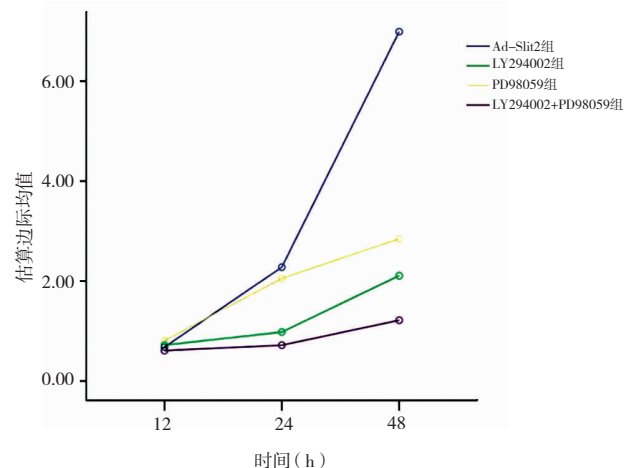


图4 边际均值估计趋势变化图

Fig.4 Changing trend of estimated marginal means

通过重复测量方差分析 ELISA 的结果, 不同时间之间差异亦具有统计学意义 ($F=90.703, P=0.000$), 组别和时间之间存在交互作用 ($F=4.968, P=0.005$), 不同组别存在组间差异 ($F=69.636, P=0.000$), 边际均值估计变化图可以直观的看出 VEGF 蛋白表达量随时间的变化趋势(图 5); 比较相同时间不同组间的差异, 在 12 h 加入阻断剂的 3 组细胞 VEGF 蛋白表达水平较 Ad-Slit2 组明显降低 ($P_{\text{Ad-Slit2, LY294002}}=0.001, P_{\text{Ad-Slit2, PD98059}}=0.020, P_{\text{Ad-Slit2, LY294002+PD98059}}=0.001$), 在 24 h 加入阻断剂的 3 组细胞 VEGF 蛋白表达水平较 Ad-Slit2 组明显降低 ($P_{\text{Ad-Slit2, LY294002}}=0.002, P_{\text{Ad-Slit2, PD98059}}=0.032, P_{\text{Ad-Slit2, LY294002+PD98059}}=0.001$), 在 48 h 加入阻断剂的 3 组细胞 VEGF 蛋白表达水平均较 Ad-Slit2 组有明显降低 ($P_{\text{Ad-Slit2, LY294002}}=0.000, P_{\text{Ad-Slit2, PD98059}}=0.003, P_{\text{Ad-Slit2, LY294002+PD98059}}=0.000$), 以上结果说明分别或者同时阻断 AKT、ERK 这 2 条信号通路都能降低 VEGF 的蛋白水平, 表明了 Slit2 在 RPE 细胞中通过 PI3K/AKT 与 MEK/ERK 这 2 条信号通路调控 VEGF 的表达增加(表 5)。

表 5 PD98059 及 LY294002 对转染 Ad-Slit2 的 RPE 细胞中 VEGF 蛋白水平的影响
Tab.5 Effect of PD98059 and LY294002 on VEGF in RPE cells transfected with Ad-Slit2

分组	12 h	24 h	48 h
Ad-Slit2	662.63 ± 159.06	1 113.04 ± 241.75	2 688.13 ± 509.83
LY294002	285.18 ± 75.45	517.94 ± 143.48	1 229.50 ± 217.62
PD98059	444.08 ± 29.97	773.44 ± 151.76	1 637.28 ± 58.96
LY294002+PD98059	285.52 ± 44.87	418.33 ± 27.94	1 009.38 ± 267.30

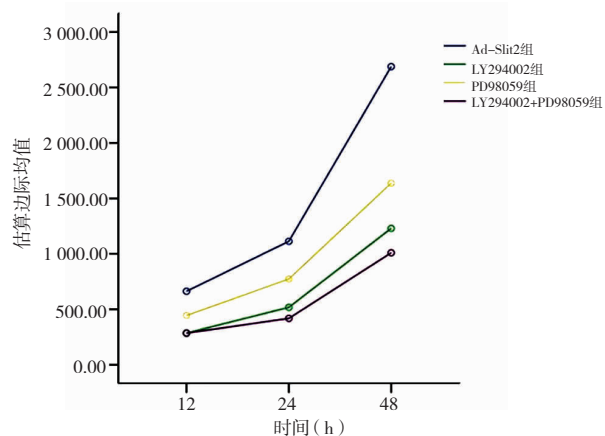


图 5 边际均值估计趋势变化图

Fig.5 Changing trend of estimated marginal means

2.4 PD98059 处理组及 LY294002 处理组对 RPE 细胞中 p-ERK1/2 及 p-AKT 表达的影响

当 RPE 细胞加入 PD98059 或 LY294002 阻断剂预处理 1 h 后,再利用 Ad-Slit2 转染 RPE 细胞,与 Ad-Slit2 组相比较,可见 p-ERK1/2 及 p-AKT 蛋白表达水平在各时间点均有明显降低(图 6)。

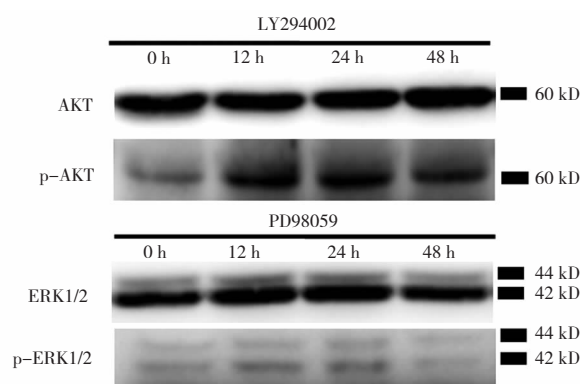


图 6 LY294002 及 PD98059 对转染 Ad-Slit2 的 RPE 细胞中 p-ERK、p-AKT 表达的影响

Fig.6 Effect of LY294002 and PD98059 on p-ERK and p-AKT in RPE cells transfected with Ad-Slit2

3 讨论

研究者首次发现在中枢神经中线胶质细胞中

有 Slit 蛋白的合成^[6]。起初研究者认为 Slit 是一种神经导向因子,存在于神经系统中,它能阻止轴突向中线延伸,还能引导轴突到达指定的区域^[7]。在随后的研究发现 Slit 还存在于其他细胞类型,Wu 等^[8]研究发现 Slit 作为一种分泌性的糖蛋白,还可表达于内皮细胞上。近来 Slit-Robo 信号通路在肿瘤细胞中所引起的越来越受到研究者的关注。Wang 等^[9]的研究结果显示,Slit2 在多种原发性肿瘤中表达增高,如恶性黑色素瘤、肝癌等,同时受体 Robo1 在肿瘤血管内皮细胞中也有表达,它可以通过增加 Slit 的表达,从而参与肿瘤新生血管的形成。随着研究的不断深入,我国已经成功制备出 Slit2 特异性受体 Robo1 的阻断性抗体 R5,为肿瘤的治疗提出新的方向。然而 Slit2 在眼底新生血管的发生过程中,是否具有一定的作用及其作用机制,尚未见报道。本实验研究发现,Slit2 在 RPE 细胞中无论在 mRNA 水平及蛋白水平都能明显促进 VEGF 的表达增加,结合前期实验研究结果,正常 RPE 细胞中有 Slit2 与受体 Robo1 的表达,而在缺氧的病理条件刺激下,Slit2 与受体 Robo1 的表达水平也出现增加,提示 RPE 细胞在处于病理状态下,Slit2 表达增加会导致 VEGF 的表达增加,从而诱发眼底新生血管的发生。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)途径是普遍存在于各种细胞中的信号转导途径,ERK 作为 MAPKs 中最重要的一员,在受到上游激酶——MEK 的激活后,参与多数细胞的生长、增殖、分化等的调节过程^[10],而在视网膜新生血管疾病以及其他缺血性疾病中都可以观察到 ERK1/2 磷酸化表达增加^[11-12]。PI3K 作为一种信使分子,在细胞内参与多种信号的传递,AKT 通过 PI3K 依赖信号传导途径而激活,在细胞增殖、分化与存活等活动中起到重要作用^[13]。众所周知,PI3K/AKT 途径在局部缺血、血管生成中具有重要作用^[14],在生理状态下,血管的生成需要 PI3K/AKT 信号通路的激活。当 VEGF 与受体结合后激活 PI3K,促进第二

信使三磷酸磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol-3-phosphate, PIP3) 的生成, PIP3 激活 AKT 信号通路, 从而促进 VEGF 表达增加, 导致新生血管的形成^[15-16]。故本课题研究重点关注了 PI3K/AKT 与 MEK/ERK 这两条广泛参与细胞增殖、分化等重要生命活动的信号通路, 试图探寻 Slit2 对 VEGF 产生影响的作用机制。实验结果表明, Slit2 转染 RPE 细胞后会导致细胞内 AKT 与 ERK1/2 的磷酸化水平表达增加, 而加入 AKT 与 ERK 的特异性阻断剂后, 可抑制 AKT 与 ERK 的磷酸化水平的表达, 同时检测到 VEGF mRNA 与细胞液上清 VEGF 的蛋白表达量均有降低, 以上结果证实, Slit2 在 RPE 细胞中对 VEGF 的影响是通过 PI3K/AKT 与 MEK/ERK 这两条信号通路发挥作用。课题组希望通过本次研究结果能够为眼底新生血管疾病在 Slit2 的基因治疗方面提供新的理论依据, 就如同 Slit2 基因在肿瘤疾病治疗中得到突破一样, 为眼底新生血管疾病找到一种新的治疗方向。

参 考 文 献

- [1] Leibowitz HM, Krueger DE, Maunders LR, et al. The Framingham Eye Study Monograph: an ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975[J]. Surv Ophthalmol, 1980, 24(S): 335-610.
- [2] Morlot C, Thieleas NM, Ravelli RB, et al. Structural insights into the Slit-Robo complex[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(38): 14923-14928.
- [3] Grone J, Doeblner O, Lodenkemper C, et al. Robo1/Robo4: differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2006, 15(6): 1437-1443.
- [4] Rossi MR, Huntoon K, Cowell JK. Differential expression of the LIG and SLIT families of genes in human cancer cells[J]. Gene, 2005, 356: 85-90.
- [5] 黄莉芸, 周希媛. 腺病毒介导的 Slit2 ShRNA 转染缺氧诱导的人视网膜色素上皮细胞对 VEGF 表达的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(12): 310-314.
- [6] Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS, et al. Slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both ECF and LRR domains[J]. Genes Dev, 1990, 4(12A): 2169-2187.
- [7] Bagri A, Marin O, Plump AS, et al. Slit protein prevents midline crossing and determines the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain[J]. Neuron, 2002, 33(2): 233-248.
- [8] Wu JY, Feng L, Park HT, et al. The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors[J]. Nature, 2001, 410(6831): 948-952.
- [9] Wang B, Xiao Y, Ding BB, et al. Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity[J]. Cancer Cell, 2003, 4(1): 19-29.
- [10] Cobb MH. MAP kinase pathways[J]. Prog Biophys Mol Biol, 1999, 71(3-4): 479-500.
- [11] Messadi E, Aloui Z, Belaidi E, et al. Cardioprotective effect of VEGF and venom VEGF-like protein in acute myocardial ischemia in mice: effect on mitochondrial function[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2014, 63(3): 274-281.
- [12] Yang XM, Wang YS, Zhang J, et al. Role of PI3K/Akt and MEK/ERK in mediating hypoxia-induced expression of HIF-1 α and VEGF in laser-induced rat choroidal neovascularization[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(4): 1873-1879.
- [13] Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (γ -Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation[J]. Biochem J, 1998, 335(pt 1): 1-13.
- [14] Ackah E, Yu J, Zoellner S, et al. Akt1/protein kinase B α is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis[J]. J Clin Invest, 2005, 115(8): 2119-2127.
- [15] Li WW, Hutnik M, Gehr G. Antiangiogenesis in hematological malignancies[J]. Br J Haematol, 2008, 143(5): 622-631.
- [16] Negaard HF, Iversen N, Bowitz-lothe IM, et al. Increased bone marrow microvascular density in hematological malignancies is associated with differential regulation of angiogenic factors[J]. Leukemia, 2009, 23(1): 162-169.

(责任编辑: 关蕴良)