

## 基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001851

# CD146在聚乙二醇诱导的小鼠脉络膜新生血管模型中的表达及意义

刘彦尧, 宾 玥, 丁 琳, 麦雨欣, 王 星, 彭 惠

(重庆医科大学附属第一医院眼科、眼科学重庆市重点实验室、重庆市眼科研究所, 重庆 400016)

**【摘要】目的:**探讨在聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)诱导的小鼠脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)模型中 CD146 的表达及意义。**方法:**将 60 只 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠采用随机数字表法, 将小鼠随机分为第 5、10 和 15 天组, 每组各 20 只。设定每组小鼠左眼为正常对照眼, 右眼为实验眼, 采用在视网膜下注射 PEG 诱导形成脉络膜新生血管模型。造模后摘取各组小鼠眼球, 制作视网膜组织切片及 HE 染色, 鉴定 CNV 模型。通过比较各组视网膜 HE 染色切片外核层(outer nuclear layer, ONL)厚度, 观察 PEG 的视网膜毒性作用。采用实时荧光定量 PCR 法检测小鼠神经视网膜和 RPE/脉络膜复合体中 CD146、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)的 mRNA 水平变化。免疫组化染色法检测小鼠眼内 CD146、VEGF 和 VEGFR2 的表达。**结果:**HE 染色和 ONL 层厚度比较均证实, 视网膜下注射 PEG 造模成功且模型可靠, 视网膜下注射后第 5 和 10 天均有 CNV 形成。实验组小鼠神经视网膜和脉络膜中 CD146、VEGF、VEGFR2 的 mRNA 表达水平与对照组相比明显升高, 差异有统计学意义( $F=30.412, P=0.000$ ;  $F=84.974, P=0.000$ ;  $F=117.423, P=0.000$ ;  $F=918.786, P=0.000$ ;  $F=319.110, P=0.000$ ;  $F=113.896, P=0.000$ )。Person 相关性分析提示在视网膜下注射 PEG 后, 小鼠 RPE/脉络膜复合体中 CD146 与 VEGF 和 VEGFR2 的表达量呈正相关( $r=0.940, P=0.000$ ;  $r=0.940, P=0.000$ ;  $r=0.769, P=0.045$ ;  $r=0.910, P=0.003$ ;  $r=0.910, P=0.003$ ;  $r=0.777, P=0.042$ )。免疫组化染色的结果显示, 在造模第 10 天后, 造模组与正常对照组相比较 CD146、VEGFR2 在神经节细胞层、内核层、外丛状层、外核层的阳性表达均有不同程度增强( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ )。**结论:**CD146 伴随着 CNV 的形成表达上调, 且与 VEGF 的表达量和 VEGFR2 的表达量呈正相关性, 由此推断 CD146 可能在 CNV 形成的病理过程中起到至关重要的作用。

**【关键词】**CD146; 血管内皮生长因子; 血管内皮生长因子受体 2; 脉络膜新生血管; 年龄相关性黄斑变性

**【中图分类号】**R774

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2018-03-29

## Expression and clinical significance of CD146 in polyethylene glycol-induced choroidal neovascularization in a mouse model

Liu Yanyao, Bin Yue, Ding Lin, Mai Yuxin, Wang Xing, Peng Hui

(Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;  
Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology; Chongqing Eye Institute)

**【Abstract】Objective:** To explore the expression of CD146 in polyethylene glycol(PEG)-induced choroidal neovascularization(CNV) in a mouse model and its significance. **Methods:** Sixty 8-week-old male C57BL/6J mice were randomly and equally divided into 5-day group, 10-day group, and 15-day group using a random number table. The left eye was set as a normal control eye, while the right eye was set as an experimental eye. The CNV model was established by subretinal injection of PEG. After model establishment, the eyeballs of mice were collected in each group. The sections of the retina were stained with hematoxylin-eosin(HE) to evaluate the CNV model. Thickness of the outer nuclear layer(ONL) in HE-stained sections of the retina was compared between the three groups to evaluate the retinal toxicity of PEG. The mRNA levels of CD146, vascular endothelial growth factor(VEGF), and vascular endothelial growth factor receptor 2(VEGFR2) in the neuroretina and RPE/choroid complex were determined by RT-PCR. Immunohistochemical staining was used to measure the expression of CD146, VEGF, and VEGFR2 in the eyes of mice. **Results:** Both HE staining and thickness of the ONL confirmed that model establishment by subretinal injection of PEG was successful and

作者介绍: 刘彦尧, Email: 578975266@qq.com,

研究方向: 眼底病、眼外伤。

通信作者: 彭 惠, Email: peng9@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81670881)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180929.1349.020.html>  
(2018-09-30)

reliable. The development of CNV was observed at 5 and 10 days after subretinal injection. The mRNA expression of CD146, VEGF, and VEGFR2 in the neuroretina and choroid was significantly higher in the experiment group than in the control group ( $F=30.412, P=0.000; F=84.974, P=0.000; F=117.423, P=0.000; F=918.786, P=0.000; F=319.110, P=0.000; F=113.896, P=0.000$ ). The Pearson correlation analysis showed that the expression of CD146 was positively correlated with the expression of VEGF and VEGFR2 in the RPE/choroid complex after subretinal injection of PEG ( $r=0.940, P=0.000; r=0.940, P=0.000; r=0.769, P=0.045; r=0.910, P=0.003; r=0.910, P=0.003; r=0.777, P=0.042$ ). The results of immunohistochemical staining showed that at 10 days after model establishment, the model group had significantly higher expression of CD146 and VEGFR2 in the ganglion cell layer, inner nuclear layer, outer plexiform layer, and ONL than the normal control group ( $P=0.000, P=0.000, P=0.000$ ). **Conclusion:** The expression of CD146 is up-regulated with the development of CNV and positively correlated with the expression of VEGF and VEGFR2. Therefore, CD146 may play a crucial role in the development of CNV.

**[Key words]** CD146; vascular endothelial growth factor; vascular endothelial growth factor receptor 2; choroidal neovascularization; age-related macular degeneration

在我国,随着人均寿命逐渐延长和老龄化现象日益严重,年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)的发病率也明显上升<sup>[1]</sup>。2016 年眼科临床指南将 AMD 分为干性 AMD 和湿性 AMD,干性 AMD 的特点为黄斑区视网膜地图状萎缩,湿性 AMD 以脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)的形成为主要表现,CNV 的渗出和出血是引起视力不可逆损害的主要病因。目前对 CNV 的病因研究尚不太清楚,国际上的主流观点认为 CNV 的形成机制是包含炎症、免疫和新生血管生成为主的复杂病理过程,多因素的共同作用介导了 CNV 的形成<sup>[2-3]</sup>。

细胞粘附分子 CD146(又称 MUC18、MCAM 等)是免疫球蛋白超家族成员,是一类细胞跨膜蛋白。CD146 的胞外区域包含 5 个典型的免疫球蛋白样功能域 V-V-C2-C2-C2,胞内区含有潜在的蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)和埃兹蛋白—根蛋白—膜突蛋白(ezrin-radixin-moesin, ERM)和激酶结合位点<sup>[4]</sup>。CD146 作为一种细胞粘附分子,参与细胞与细胞间、细胞与细胞外基质之间的粘附活动,它不仅起着“分子胶水”的作用,还能调节细胞渗透性,促进血管生成参与细胞跨膜信号转导<sup>[5]</sup>。CD146 最早发现和分离于黑色素瘤细胞中,多篇文献报道 CD146 在黑色素瘤、乳腺癌、结肠癌等多种类型的肿瘤组织中高表达,并且可以调控肿瘤新生血管的启动、内皮细胞的增殖迁移,而抗 CD146 抗体可以抑制肿瘤的生长和新生血管的形成<sup>[6-9]</sup>。Zeng 等<sup>[10]</sup>曾报道 CD146 在人眼中表达,且参与视网膜的形成过程,但尚未有

研究表明 CD146 是否参与 CNV 的形成过程。

本研究拟采用视网膜下注射聚乙二醇的方法建立小鼠 CNV 模型,观察 CD146 在 CNV 形成过程中表达量的改变及组织定位,以期从新的角度探讨 CNV 的发生发展机制,为湿性 AMD 的诊疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 2 月龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 60 只购于重庆医科大学实验动物中心并由其代养于 IVC 级,饲养环境为 12 h 光照/12 h 明暗循环,给予足够的食物和水。实验前使用裂隙灯依次检查每只小鼠眼角膜、晶状体、眼底视网膜,排除有任何眼部疾患的小鼠。

1.1.2 试剂 聚乙二醇 400 购于美国 Sigma 公司,兔抗 CD146 单克隆抗体、兔抗血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)多克隆抗体均购于美国 Abcam 公司,鼠抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)单克隆抗体购于美国 Santa cruz 公司。逆转录和 PCR 扩增试剂盒购自中国大连 Takara 公司。Trizol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司, FAS 眼球固定液购自中国武汉,谷歌生物。

1.1.3 仪器 视网膜下微量注射器(HAMILTON, 瑞士)、普通光学显微镜(Nikon, 日本)、正置荧光显微镜(Leica, 德国)、RM2235 石蜡切片机(Leica, 德国)、低温高速离心机(Eppendorf, 德国)、荧光定量 PCR 仪(ABI, 美国)。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组 本实验共 60 只 C57BL/6J 小鼠,随机分为 3 组,即视网膜下腔注射第 5、10、15 天组,每组各 20 只。每

组小鼠均以左眼进行视网膜下腔注射 PBS 作为正常对照组,右眼进行视网膜下腔注射 PEG 作为实验组。

**1.2.2 CNV 模型制作** 对 C57BL/6J 小鼠腹腔内注射 1%戊巴比妥钠(0.01 mL/g),待小鼠深度麻醉后用复方托比卡胺滴眼液散瞳,在注射前使用利多卡因眼药水行眼局部麻醉。剪去小鼠胡须,左手将其头部固定于光学显微镜下,充分暴露眼球,右手持 30G1/2 一次性注射针头,针头斜面向上以 45°自颞上方的角膜缘处进针穿刺角膜,注意避免伤及虹膜和晶状体。然后用带有 33G 平头显微注射针的微量注射器沿穿刺隧道进针,针头绕过晶状体,穿过玻璃体触及视网膜后继续进针至视网膜下腔,双手固定微量加样器,由助手分别往实验组小鼠和对照组小鼠分别缓慢推注带有少量荧光素钠的 1  $\mu$ L PEG 溶液与 1  $\mu$ L PBS 溶液,注射结束后针头缓慢撤回避免损伤虹膜及晶状体。在干净的小号盖玻片上涂少量黏弹剂,将其置于注射眼前,观察小鼠眼底情况以及荧光染料在视网膜下的分布范围,术中有眼底出血或晶体虹膜损伤的,该鼠另做标记,不纳入实验。研究者已完成重庆医科大学实验动物资质培训,取得了实验动物资格证书。本研究所涉及的动物实验操作亦经重庆医科大学附属第一医院动物伦理委员会批准[许可证:SCXK(渝) 2012-0001]。

**1.2.3 石蜡切片与 HE 染色** 从各组随机选取 4 只小鼠,使用过量 1%戊巴比妥钠麻醉处死小鼠,利用弯镊将眼球完整取出,放置于 FAS 眼球固定液中固定过夜,酒精梯度脱水后用石蜡包埋机对眼球进行包埋。沿角膜-视神经轴方向对包埋蜡块进行切片,切片厚度为 4~5  $\mu$ m。切片置于烤箱中 60  $^{\circ}$ C 烘烤 2 h 后使用二甲苯对蜡片进行脱蜡,苏木素染色冲洗 10 min,使用流水反复冲洗蜡片,置入盐酸酒精中分化 15 s,双蒸水反复洗涤 5 遍,伊红染色 1 min。酒精梯度脱水,二甲苯透明后中性树胶封片。

**1.2.4 qRT-PCR 检测 CD146、VEGF、VEGFR2 在神经视网膜和 RPE/脉络膜复合体中的表达水平** 从视网膜下注射后第 5、10、15 天组分别随机选取 9 只小鼠,采用过量 1%戊巴比妥钠麻醉处死后,使用弯镊迅速将眼球完整取出后放置于 FAS 眼球固定液中固定 1 h,使用 PBS 将眼球冲洗干净将其置于盛有少量 PBS 的玻璃皿中。在解剖显微镜下,剪去视神经和眼外肌筋膜。用有齿镊夹住角膜,使用眼科剪沿角膜缘将角膜剪去,去除晶状体,使用镊子将视杯巩膜与神经视网膜完整分离,操作中注意动作轻柔,尤其在分离视网膜下注射部位时,由于病变部位神经视网膜与脉络膜粘连紧密,更需谨慎操作,避免机械性损伤。神经视网膜分离完后用刮匙轻轻刮下 RPE/脉络膜复合体,连同分离好的神经视网膜分别放入标记好的 EP 管中,每个 EP 管中加入 1 mL Trizol Reagent 后,超声匀浆,按照说明书提取组织总 RNA。采用 Nanodrop 分光光度计测定总 RNA 的浓度,OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> 比

值在 1.8~2.0 的样本纯度较高,可选用进行下一步逆转录反应,不达标的样本将剔除本实验。按照 Takara 反转录试剂盒说明书将 mRNA 逆转录成 cDNA,并进行实时荧光定量 PCR,总反应体积为 20 mL。PCR 的反应条件如下:预变性(95  $^{\circ}$ C 10 min,循环 1 次);PCR 反应(95  $^{\circ}$ C 变性 15 s,60  $^{\circ}$ C 预变性退火、延伸 1 min,共循环 40 次)。通过 2<sup>- $\Delta\Delta$</sup>  法计算基因的相对表达量,使用 GAPDH 作为内参基因,且本实验所有引物序列均由北京擎科新业生物技术有限公司合成并检测,引物序列详见表 1。

表 1 CD146、VEGF、VEGFR2 及 GAPDH 的引物序列

| 引物名称       | 引物序列(5'-3')                  |
|------------|------------------------------|
| CD146-正义链  | TCAATGGTTCGGCAACTGAATGGA     |
| CD146-反义链  | GGGAGTTGGAGGCTGTACACTCTGCACC |
| VEGF-正义链   | ATCTTCAAGCCGCTCCTGTGT        |
| VEGF-反义链   | GCATTACATCTGCTGTGCT          |
| VEGFR2-正义链 | GAGGAAAGGGTATTGCTGACTG       |
| VEGFR2-反义链 | AGGCGATGAATGGTGATCTG         |
| GAPDH-正义链  | CTCACTCAAGATTGTCAGCA         |
| GAPDH-反义链  | GTCTTCTGGGTGGCACTGAT         |

**1.2.5 免疫组化法检测小鼠 CNV 模型视网膜 CD146、VEGF、VEGFR2 的分布及表达** 将上述制作好的石蜡切片常规脱蜡水化,使用 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育 20 min,灭活内源性过氧化物酶,PBS 洗涤 5 次,每次 3 min。将切片抗原微波热修复后使用山羊血清封闭 30 min,CD146、VEGF、VEGFR2 抗体按照说明书比例稀释后,4  $^{\circ}$ C 环境下孵育过夜。PBS 将抗体冲洗甩干后滴加生物素标记的二抗工作液,37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min,再滴加适量链霉亲和过氧化物酶 SP,37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。滴加 DAB 显色后,PBS 反复冲洗,苏木精复染,酒精梯度脱水,二甲苯透明后中性树胶封片。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件对实验数据进行整理分析,本研究所有数据均以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,数据比较采用重复测量方差分析和多变量方差分析。采用 Pearson 相关性分析 CD146 与 VEGF 以及 CD146 与 VEGFR2 表达的相关性,并对 P 值进行 Bonferroni 校正。部分数据使用 Graph Pad Prism 7.0 软件分析,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 CNV 模型视网膜组织形态学表现

在 PBS 组(对照组)视网膜下注射 PBS 溶液第 5 天,视网膜组织石蜡切片 HE 染色可见除了视网膜下有轻微的浅脱离以外,视网膜组织平伏,各层结构清晰、完整。各层次细胞无色素沉着与缺失,视网膜厚度正常。在 PEG 注射后第 5

天,CNV 自脉络膜向上生长突破 Bruch 膜,巨噬细胞增生,RPE 细胞增殖迁移,细胞色素沉着增加或缺失,视网膜内外层结构紊乱,外核层、外丛状层、内核层、内丛状层均有不同程度的破坏与缺失(图 1E、F 白色箭头所指区域)。在 PEG 注射后第 10 天,CNV 位于视网膜下呈梭形(图 1F 白线包绕区域),纤维结缔组织增生,新生血管腔明显(图 1F 五角星区域)。小鼠视网膜组织 HE 染色结果提示视网膜下注射 PEG 能够成功诱导形成 CNV,结果如图 1 所示。

## 2.2 视网膜 ONL 层比较

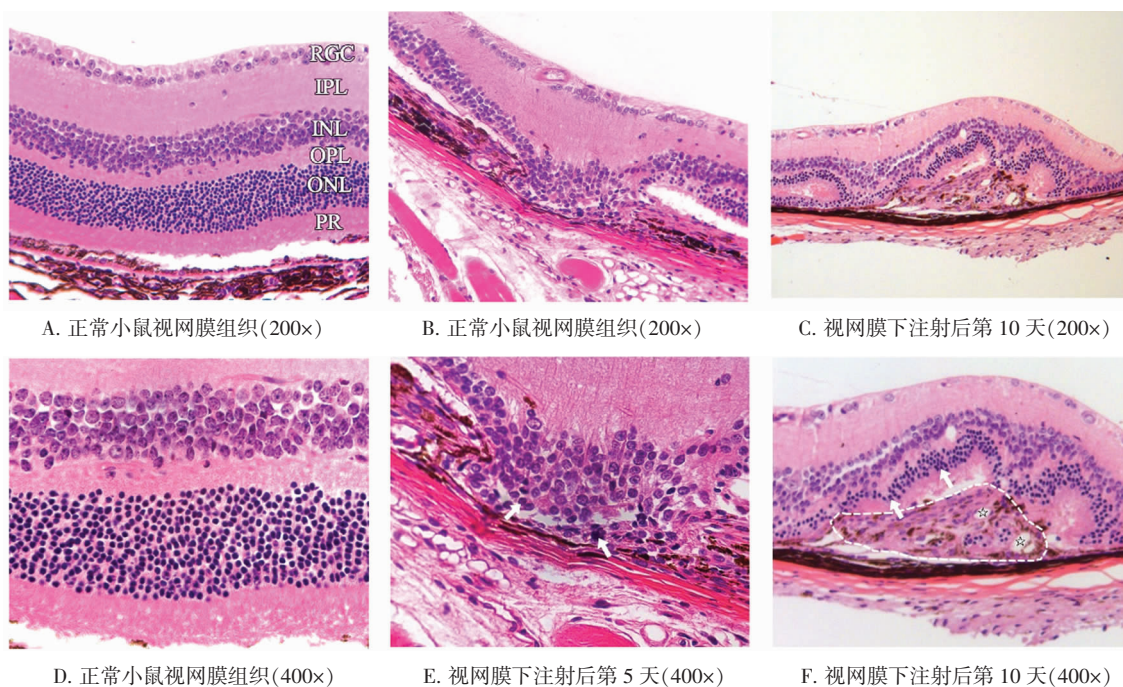
将视网膜下注射 PBS、PEG 第 5、10、15 天小鼠视网膜 HE 染色石蜡切片 ONL 层厚度进行比较后发现,视网膜下注射 PEG 组相较于视网膜下注射 PBS 组,视网膜的 ONL 层厚度明显变薄差异具有统计学意义( $F=38.602, P=0.000$ ),ONL 层结构紊乱,细胞有不同程度的减少或缺失(图 2、表 2)。

表 2 各组小鼠视网膜 ONL 层厚度比较统计分析 ( $n=6, \mu\text{m}$ )

| 时间/组别     | 对照组(左眼)            | 实验组(右眼)            |
|-----------|--------------------|--------------------|
| 造模后第 5 天  | $66.968 \pm 5.927$ | $50.652 \pm 6.009$ |
| 造模后第 10 天 | $61.484 \pm 7.149$ | $42.332 \pm 4.746$ |
| 造模后第 15 天 | $67.632 \pm 8.572$ | $57.415 \pm 6.707$ |
| 组别        | $F$ 值              | 38.602             |
|           | $P$ 值              | 0.000              |
| 时间        | $F$ 值              | 6.791              |
|           | $P$ 值              | 0.011              |
| 交互效应      | $F$ 值              | 1.156              |
|           | $P$ 值              | 0.347              |

## 2.3 CD146、VEGF 和 VEGFR2 在视网膜下注射 PEG 后第 5、10、15 天神经视网膜和脉络膜组织 mRNA 表达水平

RT-PCR 的重复测量方差分析结果显示,实验组小鼠神



注:RGC,视神经节细胞层;IPL:内丛状层;INL:内核层;OPL:外丛状层;ONL:外核层;PR:光感受器层

白色箭头可见细胞色素沉着,视网膜网膜结构紊乱、破坏、细胞缺失,五角星区域可见明显的新生血管管腔,白色横线包绕的梭型区域为脉络膜新生血管

图 1 正常小鼠和视网膜下注射后第 5、10 天视网膜 HE 染色

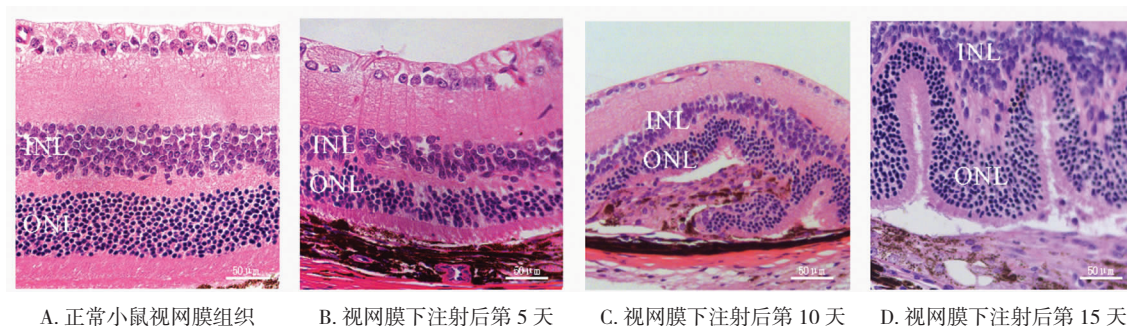


图 2 正常小鼠和视网膜下注射后第 5、10、15 天视网膜 ONL 层厚度比较

经视网膜和 RPE/脉络膜复合体中 CD146、VEGF 和 VEGFR2 的 mRNA 相对表达量较正常对照组相比具有统计学差异,且时间效应的检验  $P$  值小于 0.05,表明造模时间对 CD146、VEGF 和 VEGFR2 的 mRNA 在各组织中的表达水平有显著影响。RT-PCR 的配对  $t$  检验分析结果显示,在视网膜下注射后第 5 天,神经视网膜和 RPE/脉络膜复合体中 VEGF 和 VEGFR2 的 mRNA 相对表达量较正常对照组相比差异有统计学意义,CD146 在神经视网膜中的 mRNA 表达水平较正常对照组无明显变化,在 RPE/脉络膜复合体中的表达量较正常组明显升高,差异具有统计学意义;在视网膜下注射后第 10、15 天,小鼠神经视网膜和 RPE/脉络膜复合体中 CD146、

VEGF、VEGFR2 的 mRNA 表达水平与正常组相比明显升高,统计学分析各组之间均有统计学差异(表 3、表 4)。

#### 2.4 CD146 与 VEGF、VEGFR2 的相关性分析

采用 Person 相关分析法对造模后第 5、10 和 15 天小鼠神经视网膜和脉络膜复合体中 CD146 与 VEGF 的 mRNA 表达水平进行相关性分析。统计分析显示视网膜中 CD146 与 VEGF 比较仅在造模后第 10 天两者具有相关性,比较各组脉络膜中 CD146 与 VEGF 的 mRNA 表达水平,发现其表达量呈正相关且差异具有统计学意义,结果见表 5。采用上述相同方法对 3 组造模后小鼠神经视网膜和脉络膜复合体中 CD146 与 VEGFR2 的 mRNA 表达水平进行相关性分析,统计结果显示

表 3 CD146、VEGF 和 VEGFR2 在各组小鼠神经视网膜中的 mRNA 表达水平 ( $n=6$ )

| 时间        | CD146         |               | VEGF          |               | VEGFR2        |               |
|-----------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|           | 对照组 (左眼)      | 实验组 (右眼)      | 对照组 (左眼)      | 实验组 (右眼)      | 对照组 (左眼)      | 实验组 (右眼)      |
| 造模后第 5 天  | 0.909 ± 0.207 | 1.041 ± 0.312 | 1.105 ± 0.526 | 3.846 ± 1.122 | 0.807 ± 0.086 | 1.290 ± 0.349 |
| 造模后第 10 天 | 1.160 ± 0.363 | 2.198 ± 0.291 | 1.742 ± 0.138 | 4.579 ± 0.714 | 0.896 ± 0.223 | 2.543 ± 0.341 |
| 造模后第 15 天 | 0.999 ± 0.185 | 1.389 ± 0.167 | 1.198 ± 0.358 | 2.531 ± 0.584 | 1.088 ± 0.228 | 1.744 ± 0.282 |
| 组别        | $F$ 值         | 30.412        |               | 84.974        |               | 117.423       |
|           | $P$ 值         | 0.000         |               | 0.000         |               | 0.000         |
| 时间        | $F$ 值         | 26.040        |               | 17.825        |               | 17.789        |
|           | $P$ 值         | 0.000         |               | 0.000         |               | 0.000         |
| 交互效应      | $F$ 值         | 8.200         |               | 3.789         |               | 17.927        |
|           | $P$ 值         | 0.004         |               | 0.047         |               | 0.000         |
| 造模后第 5 天  | $F$ 值         | 0.736         |               | 29.344        |               | 10.812        |
|           | $P$ 值         | 1.233         |               | 0.000         |               | 0.024         |
| 造模后第 10 天 | $F$ 值         | 29.854        |               | 91.314        |               | 98.166        |
|           | $P$ 值         | 0.000         |               | 0.000         |               | 0.000         |
| 造模后第 15 天 | $F$ 值         | 14.693        |               | 22.677        |               | 19.579        |
|           | $P$ 值         | 0.009         |               | 0.003         |               | 0.003         |

表 4 CD146、VEGF 和 VEGFR2 在各组小鼠 RPE/ 脉络膜复合体组织中的 mRNA 表达水平 ( $n=6$ )

| 时间        | CD146         |                | VEGF          |               | VEGFR2        |               |
|-----------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|           | 对照组 (左眼)      | 实验组 (右眼)       | 对照组 (左眼)      | 实验组 (右眼)      | 对照组 (左眼)      | 实验组 (右眼)      |
| 造模后第 5 天  | 1.255 ± 0.892 | 18.953 ± 1.897 | 1.020 ± 0.224 | 5.529 ± 1.073 | 1.219 ± 0.144 | 2.696 ± 0.558 |
| 造模后第 10 天 | 1.003 ± 0.428 | 15.484 ± 2.260 | 1.048 ± 0.278 | 4.215 ± 0.548 | 1.312 ± 0.298 | 2.979 ± 0.439 |
| 造模后第 15 天 | 1.373 ± 0.391 | 5.039 ± 0.842  | 1.097 ± 0.306 | 1.668 ± 0.339 | 0.997 ± 0.170 | 1.344 ± 0.231 |
| 组别        | $F$ 值         | 918.786        |               | 319.110       |               | 113.896       |
|           | $P$ 值         | 0.000          |               | 0.000         |               | 0.000         |
| 时间        | $F$ 值         | 72.220         |               | 29.998        |               | 25.711        |
|           | $P$ 值         | 0.000          |               | 0.000         |               | 0.000         |
| 交互效应      | $F$ 值         | 115.914        |               | 56.393        |               | 14.293        |
|           | $P$ 值         | 0.000          |               | 0.000         |               | 0.000         |
| 造模后第 5 天  | $F$ 值         | 918.786        |               | 319.110       |               | 113.896       |
|           | $P$ 值         | 0.000          |               | 0.000         |               | 0.000         |
| 造模后第 10 天 | $F$ 值         | 72.220         |               | 29.998        |               | 35.711        |
|           | $P$ 值         | 0.000          |               | 0.000         |               | 0.000         |
| 造模后第 15 天 | $F$ 值         | 115.914        |               | 56.393        |               | 14.293        |
|           | $P$ 值         | 0.000          |               | 0.000         |               | 0.000         |

表 5 各组中 CD146 与 VEGF 的相关性分析 ( $n=6$ )

| 分组    | 造模后第 5 天<br>神经视网膜 | 造模后第 5 天<br>脉络膜复合体 | 造模后第 10 天<br>神经视网膜 | 造模后第 10 天<br>脉络膜复合体 | 造模后第 15 天<br>神经视网膜 | 造模后第 15 天<br>脉络膜复合体 |
|-------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| $r$ 值 | 0.220             | 0.940              | 0.707              | 0.940               | 0.688              | 0.769               |
| $P$ 值 | 1.476             | 0.000              | 0.030              | 0.000               | 0.084              | 0.045               |

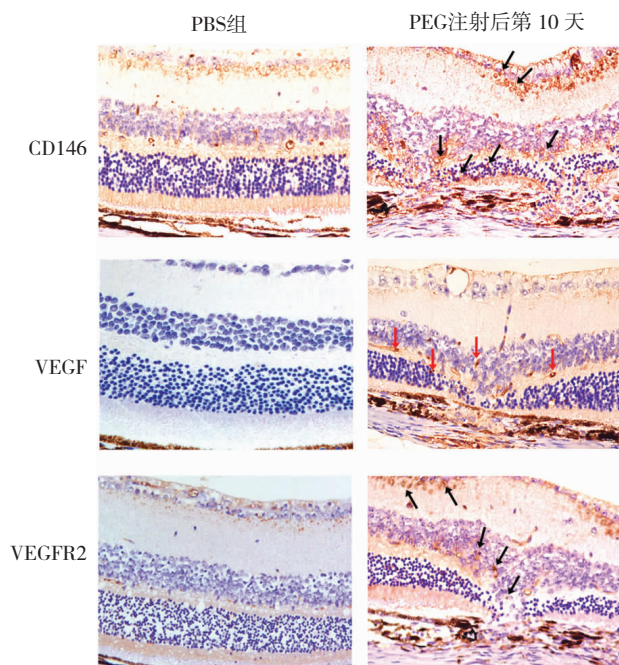
表 6 各组中 CD146 与 VEGFR2 的相关性分析 ( $n=6$ )

| 分组    | 造模后第 5 天<br>神经视网膜 | 造模后第 5 天<br>脉络膜复合体 | 造模后第 10 天<br>神经视网膜 | 造模后第 10 天<br>脉络膜复合体 | 造模后第 15 天<br>神经视网膜 | 造模后第 15 天<br>脉络膜复合体 |
|-------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| $r$ 值 | -0.225            | 0.910              | 0.376              | 0.910               | 0.598              | 0.777               |
| $P$ 值 | 1.596             | 0.003              | 0.852              | 0.003               | 0.267              | 0.042               |

在 3 组神经视网膜中 CD146 与 VEGFR2 的表达量无相关性,而在脉络膜复合体中 CD146 与 VEGFR2 的表达量呈正相关,有统计学意义,结果见表 6。

### 2.5 免疫组化法检测 CNV 模型小鼠视网膜 CD146、VEGF、VEGFR2 的分布及表达

本研究选取新生血管增生量最高的视网膜下注射 PEG 后第 10 天组小鼠眼球石蜡切片,分别通过免疫组化法对 CD146、VEGF、VEGFR2 的表达及分布进行研究后发现,与对照组相比造模组小鼠视网膜中 CD146 与 VEGFR2 在神经节细胞层、内核层、外丛状层、外核层均有表达且表达量明显增加(黑色箭头)。造模组小鼠视网膜外丛状层和外核层均有 VEGF 的表达且相较于对照组表达量增高(红色箭头),结果如图 3 所示。



注:黑色与红色箭头所示为棕色阳性着染细胞和组织分布于各层视网膜

图 3 免疫组化染色中造模组与正常组小鼠眼组织中 CD146、VEGF、VEGFR2 的表达情况

## 3 讨论

年龄相关性黄斑变性已经成为 50 岁以上人群致盲的主要病因之一,根据其临床病理特征分为湿性和干性 2 种类型,研究表明因湿性 AMD 导致的负担增加指数为 160%,对生活质量的与艾滋病、肾衰竭、中风并列<sup>[1]</sup>。湿性 AMD 的主要特点为 CNV 的形成,且 CNV 是导致患者视力进行性下降的主要病因。CNV 形成的过程主要包含 3 个阶段,首先是 RPE 细胞的凋亡和功能障碍,导致 Bruch 膜完整性破坏,局部大量的 VEGF 释放导致脉络膜毛细血管内皮细胞向视网膜方向大量增殖迁移,突破 Bruch 膜。其次活动期的新生血管组织持续增生,脆弱的血管腔持续渗漏出血,引起视网膜下积液,视网膜脱离,神经组织变性严重影响患者视力。最后晚期黄斑区 CNV 的出血病灶逐渐纤维化,形成盘状瘢痕最终导致中心视力不可逆下降甚至失明<sup>[12]</sup>。

现阶段临床上对 AMD 的治疗缺乏长期安全有效的治疗手段,目前的研究结果显示雷珠单抗、康柏西普等抗 VEGF 药物虽然在治疗湿性 AMD 中表现出了可观的疗效,但长期的临床观察结果显示在接受抗 VEGF 药物治疗 5 年后,72% 的患者视力下降到治疗前水平,治疗效果难以维持。此外抗 VEGF 治疗作为目前湿性 AMD 的一线治疗方式,往往需要患者反复接受玻璃体腔内药物注射,不仅增加了眼内炎、全身动脉血栓等术后并发症的风险,高昂的治疗费用也为患者带来了巨大的经济负担<sup>[13-14]</sup>。因此进一步研究 AMD 的发病机制,特别是对 CNV 形成机制的研究显得尤为重要,通过相关抗新生血管

因子及靶点的研究以期对湿性 AMD 患者的治疗提供新的方向。

CD146 基因包含 16 个外显子结构,是高度保守序列,位于人 11q23.3,跨越 14 kb 的染色体区域,编码分子量为 113 kD 的糖基化蛋白<sup>[5]</sup>。根据文献报道,通过对胚胎组织和成熟组织的比较后发现 CD146 蛋白表达在胚胎期的肾、输卵管、气管上皮以及神经系统当中高表达,在组织成熟后 CD146 的蛋白表达水平明显下降,研究认为 CD146 参与人多种器官和系统的发育成熟,特别是在神经系统和视网膜的发育成熟中起到至关重要的作用<sup>[6]</sup>。近年来大量研究表明 CD146 在众多实体肿瘤如黑色素瘤、肾细胞癌、胃癌、乳腺癌等中表达量增高,且参与肿瘤的增殖分化、血管生成以及远处转移。研究显示 CD146 可作为 VEGFR2 的共受体接受 VEGF 信号,导致 VEGFR2 磷酸化,激活下游的 Akt/p38 和 MAPKs/NF- $\kappa$ B 信号通路,CD146 同时能与神经生长因子 1 结合,由此调节信号级联反应,诱导内皮细胞活化,这 2 种信号通路在新生血管性疾病中,特别在血管内皮细胞的增殖和迁移中发挥重要作用<sup>[6,17]</sup>。

视网膜下注射 PEG 诱导小鼠 CNV 动物模型是一种新型的稳定可靠地模型。传统的激光诱导的 CNV 模型,通过高能量的激光束对 RPE 细胞、Bruch 膜和脉络膜进行一过性的物理损伤,从而诱导产生 CNV。视网膜下注射的相关方法学研究表明,在视网膜下注射后 3 d 内小鼠视网膜组织平复,结构层次扰乱较小,采用视网膜电图对其功能学检测结果表明,该方法不会影响视网膜功能,更不会由于该操作引起的微小损伤诱发 CNV 的形成。视网膜下注射 PEG 相较于激光诱导的 CNV 模型,不仅能够减轻对 RPE/脉络膜复合体的损伤而且表现出良好的耐受性<sup>[18]</sup>。PEG 能在视网膜下激活网膜的补体系统,尤其是替代途径中 C3 的活化明显升高,C3、C9 在视网膜内大量沉积,诱导形成 CNV<sup>[19-20]</sup>。研究显示在小鼠视网膜下注射 PEG 后第 5 天新生血管形成,增生活跃,到了第 10 天新生血管增生最为明显且趋于稳定,此后 CNV 组织趋向瘢痕化,神经视网膜层和 RPE/脉络膜复合体中 VEGF 和 VEGFR2 的表达量逐渐减少,因此本研究选取视网膜下注射 PEG 后第

5、10 和 15 天的小鼠的视网膜和 RPE/脉络膜复合体进行研究。HE 染色切片及小鼠视网膜 ONL 层厚度统计结果均表明 PEG 对视网膜的毒性作用,且可诱导产生 CNV。本研究发现仅在视网膜下注射后第 15 天,相较于正常组小鼠,视网膜 ONL 层厚度有变薄趋势,但无统计学差异,考虑该结果可能与造模后第 15 天 CNV 组织形成较稳定、由单次视网膜下注射的 PEG 诱导产生的视网膜毒性作用逐渐消退、视网膜渗出减少、ONL 层细胞产生一定的自我修复功能相关。

研究结果显示,除了在视网膜下注射 PEG 第 5 天小鼠的神经视网膜中 CD146 表达无明显改变外,其余各组神经视网膜和 RPE/脉络膜复合体中 CD146 的表达量均明显升高,且升高趋势与 VEGF 一致,差异具有统计学意义。本课题组认为 CD146 作为一类内皮细胞跨膜蛋白,在视网膜下注射第 5 天,虽然 CNV 形成且增生活跃,但并未明显累及视网膜导致视网膜新生血管的大量产生,故 qRT-PCR 的结果表明在该组仅表现为 RPE/脉络膜复合体中 CD146 明显升高。在视网膜下注射第 10 和 15 天组,CNV 大量形成,且病变累及视网膜导致这 2 组中 CD146 表达均上调。已有大量研究证实 VEGF 在 CNV 的形成中尤为重要。在临床上,抗 VEGF 的治疗已经成为湿性 AMD 治疗的一线治疗方式,对一部分患者能取得一定的疗效<sup>[21]</sup>。本研究中各组 CNV 小鼠视网膜和 RPE/脉络膜复合体中 VEGF 均明显升高,从分子水平验证了造模的成功,采用 Pearson 相关分析发现 CD146 与 VEGF 的表达量呈正相关性,也更加验证了 CD146 参与 CNV 的发生发展这一假设。有研究报道在病理性新生血管中 CD146 作为 VEGFR2 的共受体参与内皮细胞增殖迁移相关的信号转导,故本实验检测了各组中 VEGFR2 的表达量,结果显示 VEGFR2 仅在各组造模小鼠的 RPE/脉络膜复合体中高表达,采用 Pearson 相关分析发现 CD146 与 VEGFR2 的表达量仅在小鼠 RPE/脉络膜复合体中呈正相关,因为 CNV 中血管内皮细胞的含量较神经视网膜更多,CD146 作为内皮细胞上的跨膜蛋白与 VEGFR2 形成共受体接受上游 VEGF 的刺激后引起下游相关通路的磷酸化。本实

验结果也与 CD146 在血管生成相关领域的研究相符合。免疫组化的结果与 qRT-PCR 的相关结果一致,更为下一步通过干预 CD146 的表达以深入探讨 CD146 在 CNV 形成过程中的作用机制奠定基础。

综上所述,在 CNV 小鼠模型中 CD146 的高表达可能与 CNV 的形成和发展密切相关,特别是在 RPE/脉络膜复合体中 CD146 与 VEGF 和 CD146 与 VEGFR2 的一致性表达,提示在 CNV 形成过程中 CD146 与 VEGF、VEGFR2 之间可能存在协同作用。虽然目前具体的机制尚不明确,但这一发现可以帮助我们新的角度认识且探究湿性 AMD 的发病机制,为湿性 AMD 的治疗寻找更安全有效的治疗措施和更特异的治疗靶点。

## 参 考 文 献

- [1] You QS, Xu L, Yang H, et al. Five-year incidence of age-related macular degeneration[J]. *Ophthalmology*, 2012, 119(12): 2519–2525.
- [2] Ferris FL, Wilkinson CP, Bird A, et al. Clinical classification of age-related macular degeneration[J]. *Ophthalmology*, 2013, 120(4): 844–851.
- [3] van Lookeren Campagne M, LeCouter J, Yaspan BL, et al. Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities[J]. *J Pathol*, 2014, 232(2): 151–164.
- [4] Wang Z, Yan X. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion[J]. *Cancer Lett*, 2013, 330(2): 150–162.
- [5] Jiang T, Zhuang J, Duan H, et al. CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis [J]. *Blood*, 2012, 120(11): 2330–2339.
- [6] Tu T, Zhang C, Yan H, et al. CD146 acts as a novel receptor for netrin-1 in promoting angiogenesis and vascular development[J]. *Cell Res*, 2015, 25(3): 275–287.
- [7] Halt KJ, Parssinen HE, Junttila SM, et al. CD146(+) cells are essential for kidney vacuature development[J]. *Kidney Int*, 2016, 90(2): 311–324.
- [8] Zeng Q, Li W, Lu D, et al. CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(4): 1127–1132.
- [9] Liang YK, Zeng, Xiao YS, et al. MCAM/CD146 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells through induction of epithelial-mesenchymal transition, decreased ERα expression and AKT activation[J]. *Cancer Lett*, 2017, 386: 65–76.
- [10] Zeng Q, Wu Z, Duan H, et al. Impaired tumor angiogenesis and VEGF-induced pathway in endothelial CD146 knockout mice[J]. *Protein Cell*, 2014, 5(6): 445–456.
- [11] Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2163–2196.
- [12] Miller JW, Le Counter J, Strauss EC, et al. Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease[J]. *Ophthalmology*, 2013, 120(1): 106–114.
- [13] Singer MA, Awh CC, Sadda S, et al. HORIZON: an open-label extension trial of ranibizumab for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration[J]. *Ophthalmology*, 2012, 119(6): 1175–1183.
- [14] Wong CW, Yanagi Y, Lee WK, et al. Age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Asians[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2016, 53: 107–139.
- [15] 陈伟, 张森林. CD146 的结构和生理功能及其与肿瘤侵袭和转移的关系[J]. *医学研究生学报*, 2010, 23(11): 1222–1226.
- [16] Tsukamoto Y, Taira E, Miki N, et al. The role of gicerin, a novel cell adhesion molecule, in development, regeneration and neoplasia[J]. *Histol Histopathol*, 2010, 16(2): 563–571.
- [17] Wang P, Luo Y, Duan H, et al. MicroRNA 329 suppresses angiogenesis by targeting CD146[J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(18): 3689–3699.
- [18] 戚艳, 戴旭峰, 张华, 等. 小鼠经角膜视网膜下腔注射的方法学研究[J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(7): 600–605.
- [19] Lyzogubov VV, Tytarenko RG, Liu J, et al. Polyethylene glycol (PEG)-induced mouse model of choroidal neovascularization[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(18): 16229–16237.
- [20] Lyzogubov VV, Bora NS, Tytarenko RG, et al. Polyethylene glycol induced mouse model of retinal degeneration[J]. *Exp Eye Res*, 2014, 127: 143–152.
- [21] Ueta T, Noda Y, Toyama T, et al. Systemic vascular safety of ranibizumab for age-related macular degeneration: systematic review and meta-analysis of randomized trials[J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(11): 2193–203.e1–7.

(责任编辑:冉明会)