DOI:10.16016/j.1000-5404.201411197

论著

腺病毒介导slit2基因转染人视网膜色素上皮细胞对RF/6A细胞迁移及管腔形成的影响

张明慧,周希瑗 (400016 重庆,重庆医科大学第二附属医院眼科)

[摘要] **目的** 观察共培养模型下,腺病毒介导的slit2基因转染人视网膜色素上皮细胞(RPE)对猴脉络膜视网膜血管内皮细胞(RF/6A)迁移及管腔形成的影响。**方法** 用腺病毒介导的slit2基因(Ad-slit2)转染RPE细胞,同时设空载体腺病毒转染组(Ad-null)及空白对照组。转染24 h及48 h后,采用RT-PCR及Western blot法分别检测RPE细胞中slit2、VEGF的mRNA及蛋白表达情况;ELISA法检测RPE细胞培养基上清液中VEGF的分泌水平;建立RPE&RF/6A共培养模型,采用Transwell小室法及Matrigel胶体外三维成型法分别检测过表达slit2基因的RPE细胞对RF/6A细胞迁移能力及管腔形成能力的影响,并计算迁移数目及管腔形成长度、管腔数。**结果** Ad-slit2转染24、48 h后,RPE细胞在基因及蛋白水平表达slit2、VEGF均有明显增高;ELISA结果显示过表达slit2基因的RPE细胞其培养基上清液中分泌型VEGF水平增高;在RPE&RF/6A共培养下,空白对照组、Ad-null转染24 h组、Ad-slit2转染24 h组、Ad-null转染48 h组、Ad-slit2转染48 h组中,RF/6A细胞迁移数目分别是(40.6±4.5)、(36.7±3.5)、(67.7±4.2)、(36.0±3.6)、(79.7±3.5);管腔形成长度分别是(3.95±0.31)、(4.53±0.26)、(6.04±0.34)、(4.09±0.18)、(7.27±0.45) mm,管腔数分别是(8.7±3.2)、(8.9±3.6)、(15.9±4.2)、(8.3±2.4)、(23.3±4.5)。Ad-slit2转染24 h及48 h组与空白对照组比较,差异具有统学意义($P<0.05$)。**结论** 腺病毒介导的slit2基因转染RPE细胞可促进RF/6A细胞的迁移及管腔形成。RPE细胞中的slit2可能参与脉络膜新生血管形成过程。

[关键词] slit2基因;脉络膜新生血管;脉络膜视网膜血管内皮细胞;迁移;管腔形成
[中图法分类号] R322.91;R329.28;R394.2 [文献标志码] A

Retinal pigment epithelial cells with adenovirus-slit2 transfectin improve migration and tube formation in choroidal vascular endothedial cells *in vitro*

Zhang Minghui, Zhou Xiyuan (Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of retinal pigment epithelial (RPE) cells with adenovirus-slit2 (Ad-slit2) transfection on the migration and tube formation of choroidal vascular endothelial (RF/6A) cells in a co-culture system. **Methods** After RPE cells were transfected with ad-slit2 or ad-null for 24 and 48 h, the expression of slit2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) at mRNA and protein levels was quantified by RT-PCR and Western blotting, and the level of secreted VEGF protein from the media of RPE cells were investigated by ELISA. Coculture models (RPE&RF/6A) were used to observe the effects of RPE cells transfection with ad-slit2 on the migration and tube formation of RF/6A by Transwell chamber test and Matrigel invasion assay respectively. **Results** After ad-slit2 transfected to RPE cells for 24 and 48 h, the expression of slit2 and VEGF at mRNA and protein levels was obviously increased. At the same time, the level of secreted VEGF protein from the media of RPE cells was also elevated. In the coculture system, the number of RF/6A migrated was 40.6±4.5, 36.7±3.5, 67.7±4.2, 36.0±3.6 and 79.7±3.5 in the blank control group, ad-null for 24 h group, ad-slit2 for 48 h group, ad-null for 48 h and ad-slit2 for 48 h

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170858)
[通信作者] 周希瑗,E-mail:zhouxiyuan2002@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150105.0837.005.html(2015-01-05)

group respectively, the total length of tube formation of RF/6A was 3.95 ±0.31, 4.53 ±0.26, 6.04 ±0.34, 4.09 ±0.18, 7.27 ±0.45 mm respectively, and the number of tube was 8.7 ±3.2, 8.9 ±3.6, 15.9 ±4.2, 8.3 ±2.4, and 23.3 ±4.5 respectively. There were significant differences in the above indexes between the ad-slit2 for 24 h group, ad-slit 2 for 48 h group with blank control group respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** RPE cells with ad-slit2 transfection promote the migration and tube formation of RF/6A *in vitro*. Slit2 gene in the RPE cells may take part in the formation process of choroidal neovascularization.

[**Key words**] slit2 gene; choroidal neovascularization; choroid retinal endothelial cells; migration; tube formation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81170858). Corresponding author: Zhou Xiyuan, E-mail: zhouxiyuan2002@aliyun.com

脉络膜新生血管(choroidal noevascularization, CNV)参与多种眼底疾病的发生,如年龄相关性黄斑变性、特发性脉络膜视网膜炎等,是目前致盲的最重要因素之一,且发病率近年有所增长。尽管CNV形成的研究不断进展,但其发病机制极其复杂,至今尚不完全明确。近年研究发现神经轴突导向因子slit2参与新生血管形成[1-2]。slit2是一种分泌型糖化蛋白,主要分布在肺、肾、神经、实体肿瘤等,参与血管新生、细胞迁移,调节肿瘤的增殖、凋亡,调控白细胞趋化等[3]。但slit2是否也参与CNV形成的研究尚少见报道。本课题组前期研究证明沉默视网膜色素上皮细胞(RPE)中的slit2基因,可使缺氧诱导的血管内皮生长因子(VEGF)降低,而后者是促进CNV形成的重要因子,因此认为slit2可能参与CNV的形成[4]。本实验利用腺病毒转染技术,使RPE细胞中slit2基因过表达,观察过表达slit2的RPE细胞对猴脉络膜视网膜血管内皮细胞(RF/6A)的迁移及管腔形成的影响,为CNV的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

人视网膜色素上皮细胞ARPE-19细胞系由本课题组提供,RF/6A购自中国上海中科院细胞库。

1.2 实验试剂

Ad-slit2、Ad-null(长沙赢润生物技术有限公司),RPMI1640培养基、胎牛血清(FBS)、胰酶(美国Gibco公司),磷酸盐缓冲溶液(PBS)、青霉素-链霉素混合液、SDS-PAGE制胶试剂盒、SDS上样缓冲液(中国碧云天公司),RT-PCR试剂盒、Prime Script™ RT reagent kit、SYBR Premix *Ex Tap*™ Ⅱ(日本TaKaRa公司),ELISA试剂盒、山羊抗兔抗体(武汉博士德公司),兔抗人slit2抗体(美国Abcam公司),兔抗人VEGF抗体(美国Immunoway公司),Matrigel胶(美国BD公司),Transwell小室(美国Corning公司)等。

1.3 细胞培养

RPE细胞及RF/6A细胞均用含10% FBS、1%青霉素-链霉素混合液的RPMI1640培养基,置于37 ℃,5% CO_2条件下的孵箱内培养。按细胞传代方法,将RPE细胞消化成悬浮状体,种于6孔板或24孔板中,分成3组:空白对照组、Ad-null转染组、Ad-slit2转染组。待其贴壁成对数成长时,按1∶1 000的比例分别将Ad-slit2、Ad-null分别加入孔内的培养基中,将板置于孵箱内,孵育24 h及48 h后收集细胞做检测。

1.4 RT-PCR检测

按RT-PCR试剂盒说明,提取各组细胞总mRNA,并逆转录为cDNA。slit2上游引物5′-GGGCATTTGATACTCCATTC-3′,下游引物5′-TCTTCTTTCTCAGCCACTCTCC-3′,104 bp;VEGF上游引物5′-GAGTACATCTTCAAGCCATCCTG-3′,下游引物5′-TGCTCTATCTTTCTTTGGTCTGC-3′,204 bp;β-actin上游引物5′-GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT-3′,下游引物5′-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3′,132 bp。引物由上海生工生物工程公司合成。SYBR Premix *Ex Tap*™ Ⅱ实时PCR总反应体系是25 μL:Premix *Ex Tap*™ Ⅱ 12.5 μL、上游引物(10 μmol/L)及下游引物(10 μmol/L)均1 μL、模板2 μL、无酶DNase 8.5 μL。反应条件:95 ℃预变性30 s,95 ℃变性5 s,60 ℃退火30 s,均扩增40个循环。循环结束后进行产物溶解曲线测定。根据$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算slit2、VEGF的相对含量。

1.5 Western blot检测

收集各组细胞,加入蛋白酶抑制剂和裂解液的混合液(按1∶100比例混合),吹打混匀,静置5 min后再次吹打,反复6次后,在4 ℃离心机里离心15 min,吸出上清,即为总蛋白。按BCA蛋白定量试剂盒说明,测量各组总蛋白的浓度。按SDS-PAGE制胶试剂盒的说明配制分离胶和浓缩胶,加样后电泳、转膜、5%脱脂奶粉封闭2 h,孵抗slit2或抗VEGF抗体,4 ℃过夜,洗膜后孵二抗,37 ℃静置2 h,洗膜后曝光显影。

1.6 ELISA 检测

收集各组细胞的上清培养基,离心后去沉淀取上清,用样本稀释液按1∶1稀释上清备用。按照人 VEGF ELISA 试剂盒说明操作,检测标准品及各组光密度值。根据标准曲线,计算各组 VEGF 的含量。

1.7 迁移实验(Transwell 小室法)

将 1×10^5/mL 的 RPE 细胞种于 24 孔板中,加入 600 μL 培养基,待其呈对数生长期时,加入 Ad-slit2、Ad-null,转染 24、48 h 后,将种有密度为 1×10^4/mL RF/6A 细胞的 Transwell 小室(孔径为 8.0 μm)放入孔中,建立共培养模式,在 37 ℃、5% CO_2 条件下孵育 48 h后,取出小室,用棉签将小室上层细胞擦掉,用 5% 多聚甲醛固定 15 min,再用 1% 结晶紫染色 15 min,在显微镜下观察并随机取 5 个视野照相,计算每一视野下 RF/6A 细胞的迁移数目。

1.8 管腔形成实验(Matrigel 胶体外三维成型法)

将 1×10^4/mL RPE 细胞种于 Transwell 小室(孔径为 0.4 μm)中,加入 100 μL 培养基,细胞贴壁后加入 Ad-slit2 及 Ad-null,转染 24、48 h 后备用。按 1∶1 将 Matrigel 胶和 RPMI1640 培养基混合均匀,加入 24 孔板中,每孔加 200 μL,置于 37 ℃的孵箱 1 h,基质胶凝固。将 1×10^5/mL 的 RF/6A 细胞种于各孔的基质胶上,加 600 μL 培养基。将 Transwell 小室放入孔中,建立共培养体系,放入 37 ℃、5% CO_2 的孵箱孵育 24 h 后,取出小室。在显微镜下观察各孔中 RF/6A 细胞的管腔形成情况,随机选 5 个视野照相,计算形成管腔个数,并用 Image-pro 软件计算其管腔形成的总长度。

1.9 统计学分析

实验重复至少 3 次。采用 SPSS 17.0 统计软件,计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,进行单因素方差分析及 t 检验。

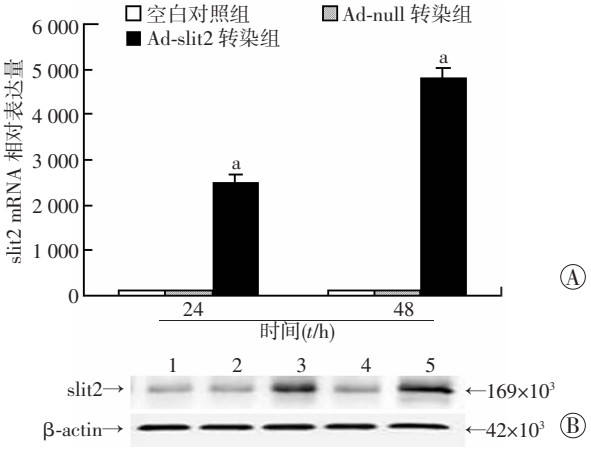
2 结果

2.1 Ad-slit2 转染对 RPE 细胞 slit2 mRNA 及蛋白表达的影响

RT-PCR 结果显示 Ad-slit2 转染 RPE 细胞 24、48 h 后,RPE 细胞中 slit2 mRNA 均较空白对照组表达明显提高,差异具有统计学意义($F=654.11$,$P<0.05$),而其阴性对照组,即 Ad-null 转染 24、48 h 组,较空白对照组无明显变化($P>0.05$,图 1A)。Western blot 显示 Ad-slit2 转染 24 h 及 48 h 组,RPE 细胞中 slit2 蛋白表达水平比空白对照组明显提高;而阴性对照组均较空白对照组无明显变化($P>0.05$,图 1B)。

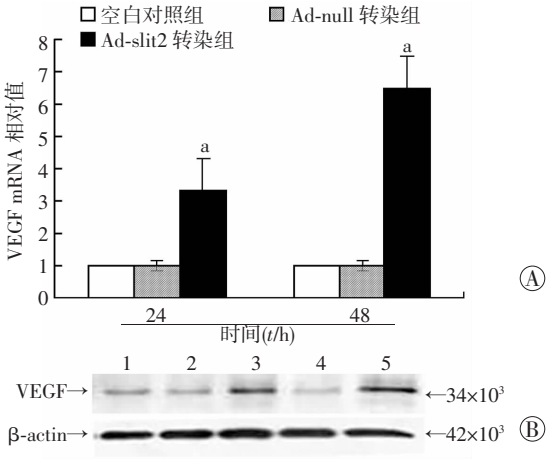
2.2 Ad-slit2 转染对 RPE 细胞中 VEGF mRNA 及蛋白表达的影响

RT-PCR 结果显示,Ad-slit2 转染 24 h 及 48 h 组 RPE 细胞中 VEGF mRNA 表达量均显著高于空白对照组,差异具有统计学意义($F=66.816$,$P<0.05$);而阴性对照组,即 Ad-null 转染 24、48 h 组,均较空白对照组无明显变化($P>0.05$,图 2A)。Western blot 结果显示 Ad-slit2 转染 24、48 h 后,RPE 细胞中 VEGF 蛋白表达水平均较空白对照组明显提高(图 2B)。



A:各组 slit2 mRNA 的相对表达量 a:$P<0.05$,与空白对照组比较;B:各组 slit2 蛋白表达 1:空白对照组;2:Ad-null 转染 24 h 组;3:Ad-slit2 转染 24 h 组;4:Ad-null 转染 48 h 组;5:Ad-slit2 转染 48 h 组

图 1 Ad-slit2 转染对 RPE 细胞 slit2 mRNA 及蛋白表达的影响



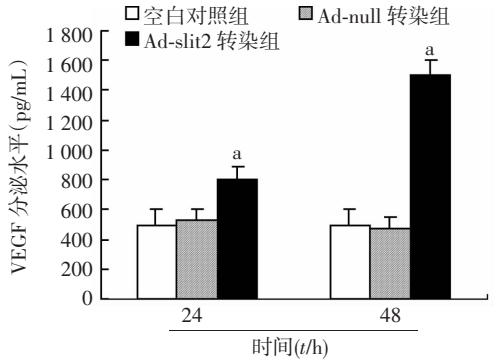
A:各组 VEGF mRNA 的相对表达量 a:$P<0.05$,与空白对照组比较;B:各组 VEGF 蛋白表达 1:空白对照组;2:Ad-null 转染 24 h 组;3:Ad-slit2 转染 24 h 组;4:Ad-null 转染 48 h 组;5:Ad-slit2 转染 48 h 组

图 2 Ad-slit2 转染对 RPE 细胞 VEGF mRNA 及蛋白表达的影响

2.3 Ad-slit2 转染对 RPE 细胞培养基上清液内 VEGF 分泌水平的影响

ELISA 结果显示 Ad-slit2 转染于 RPE 细胞 24、48 h后,其培养基上清液中分泌型 VEGF 均较空白对

照组分泌量增多，差异具有统计学意义（$F=30.69$，$P<0.05$）；而 Ad-null 转染 24、48 h 组，均较空白对照组无明显变化（$P>0.05$，图 3）。



a：$P<0.05$，与空白对照组比较

图 3　Ad-slit2 转染对 RPE 细胞培养基上清液内 VEGF 分泌水平的影响

2.4　迁移实验

Ad-slit2 转染 24、48 h 后，RPE 细胞对 RF/6A 细胞的迁移数目[(67.7±4.2)、(79.7±3.5)个]均较空白对照组[(40.6±4.5)个]增多，差异具有统计学意义（$F=81.16$，$P<0.05$）；而阴性对照组，即 Ad-null 转染 24、48 h 组[(36.7±3.5)、(36.0±3.6)个]，与空白对照组比较无明显变化（图 4）。

2.5　管腔形成实验

与空白对照组比较，Ad-slit2 转染 24 h 及 48 h 组，在每一视野下 RF/6A 细胞形成管腔总长度及管腔数均明显增加，差异具有统计学意义（$F=59.66$，$P<0.05$；$F=9.676$，$P<0.05$）；而阴性对照组，即 Ad-null 转染 24、48 h 组，均较空白对照组无明显变化（$P>0.05$，表 1、图 5）。

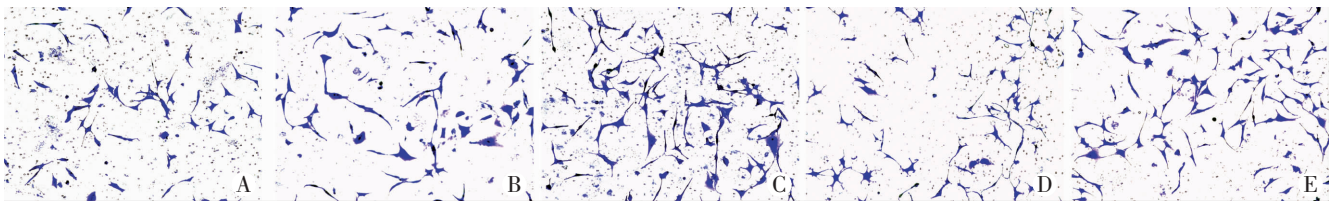
表 1　各组 RF/6A 管腔形成的总长度及个数（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	管腔长度(mm)	管腔形成个数
空白对照组	3.95±0.31	8.7±3.2
Ad-null 转染 24 h 组	4.53±0.26	8.9±3.6
Ad-slit2 转染 24 h 组	6.04±0.34[a]	15.0±4.2[a]
Ad-null 转染 48 h 组	4.09±0.18	8.3±2.4
Ad-slit2 转染 48 h 组	7.27±0.45[a]	23.0±4.5[a]

a：$P<0.05$，与空白对照组比较

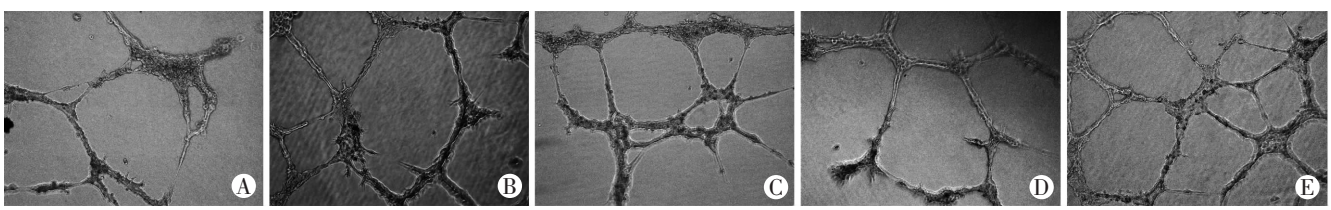
3　讨论

slit 基因最早于 1984 年由 Nusslein-Volhard 等在果蝇的中枢神经系统发现，其家族在脊椎动物中存在 3 个亚型，即 slit1、slit2、slit3，并有 4 种受体，即 Robo1～4[5]。其中 slit2 与新生血管的发生关系密切，成为时下研究热点。然而 slit2 对新生血管形成所起的作用存在分歧。Wang 等[6]研究发现 slit2 表达于恶性黑色素瘤细胞，且促进肿瘤诱发的血管形成；Wang 等[7]在口腔鳞状细胞癌的研究中也证明了 slit2/Robo1 在癌变过程中参与激活血管形成，经 slit2/Robo1 特异性阻断剂 R5 处理后，肿瘤的血管形成受到抑制。但也有一些研究得到的却是相反的结论，如 Han 等[8]研究表明 slit2 参与角膜新生血管的形成，且 slit2 与 robo1 及 robo4 的相互作用抑制角膜新生血管形成；Jones 等[9]研究发现通过 slit2 激活 robo4 在体外可抑制血管内皮生长因子（VEGF）所诱导的血管形成，在体内可通过阻断 Scr 家族激酶活化抑制 VEGF 所刺激的血管渗漏。综上表明，slit2 处在不同环境下，对新生血管形成所起作用亦有所不同。



A：空白对照组；B：Ad-null 转染 24 h 组；C：Ad-slit2 转染 24 h 组；D：Ad-null 转染 48 h 组；E：Ad-slit2 转染 48 h 组

图 4　光学显微镜下观察 Ad-slit2 转染于 RPE 细胞对 RF/6A 细胞迁移数的影响　（结晶紫 × 200）



A：空白对照组；B：Ad-null 转染 24 h 组；C：Ad-slit2 转染 24 h 组；D：Ad-null 转染 48 h 组；E：Ad-slit2 转染 48 h 组

图 5　倒置显微镜下观察 Ad-slit2 转染于 RPE 细胞对 RF/6A 细胞管腔形成的影响　（× 200）

脉络膜新生血管形成的病理基础是脉络膜毛细血管突破bruch膜侵入RPE层,局部血管生成因子和抑制因子动态平衡打破。而目前有关slit2基因在脉络膜新生血管形成中所起作用的研究较少,我们前期研究证明RPE细胞中slit2及Robo1均有表达,且沉默slit2后,Robo1及VEGF的表达也随之减少,初步证实了slit2/robo1可能参与CNV的形成。本实验以猴脉络膜视网膜血管内皮细胞(RF/6A)为研究对象,RF/6A细胞是公认的研究CNV形成的细胞[10-11]。发现腺病毒介导slit2转染至RPE细胞24、48 h后,RPE细胞中slit2基因均呈过表达状态,将过表达slit2的RPE细胞与RF/6A共培养后,发现其可促进RF/6A的迁移及管腔形成。研究中还发现RPE细胞过表达slit2基因的同时,其VEGF表达量也随之增多,分泌型VEGF蛋白亦随之增加,与我们课题组前期研究结果一致,表明VEGF参与了RPE中slit2基因对RF/6A的作用。Jin等[12]也证明VEGF可促进RF/6A的增殖及管腔形成,其作用机制是通过PI3K/Akt及MEK/ERK信号通路起作用。因此本实验进一步证实了RPE细胞中的slit2基因参与脉络膜新生血管的形成,从而导致相关疾病的发生。

综上所述,本实验证明过表达slit2的RPE细胞可促进RF/6A细胞的迁移及管腔形成,进而参与了CNV的形成,为其相关疾病提供新的治疗靶点,如湿性老年黄斑变性、病理性脉络膜变性等。但腺病毒介导目前仍局限在实验研究,尚未进入临床试验;除此本实验为体外实验,尚需要进一步完成体内实验的研究加以证明。

参考文献:

[1] 孙丽梅, 田连胜, 马红艳, 等. SLIT2在乳腺浸润性导管癌中的表达及意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2012, 21(4): 377-380.

[2] 余祖滨, 白莉, 高磊, 等. 肺癌组织神经生长导向因子Slit2蛋白表达及其临床意义的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(12): 901-904.

[3] 李霖, 卿国忠. Slit-Robo信号通路作用的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2013, 33(1): 72-77.

[4] 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, 27(3): 361-365, 371.

[5] Nusslein-Volhard C, Wieschaus E, Kluding H. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in Drosophila melanogaster[J]. Roux's Arch Dev Biol, 1984, 193(5): 267-282.

[6] Wang B, Xiao Y, Ding B B, *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.

[7] Wang L J, Zhao Y, Han B, *et al*. Targeting Slit-Roundabout signaling inhibits tumor angiogenesis in chemical-induced squamous cell carcinogenesis[J]. Cancer Sci, 2008, 99(3): 510-517.

[8] Han X, Zhang M C. Potential anti-angiogenic role of Slit2 in corneal neovascularization[J]. Exp Eye Res, 2010, 90(6): 742-749.

[9] Jones C A, London N R, Chen H, *et al*. Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability[J]. Nat Med, 2008, 14(4): 448-453.

[10] 罗旭昇, 吴星伟, 顾青, 等. 复方血栓通对猴脉络膜-视网膜内皮细胞增生、移行和管腔形成的作用[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2011, 13(4): 263-268.

[11] Dong X, Wang Y S, Dou G R, *et al*. Influence of DII4 *via* HIF-1α-VEGF signaling on the angiogenesis of choroidal neovascularization under hypoxia conditions[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18481.

[12] Jin J, Yuan F, Shen M Q, *et al*. Vascular endothelial growth factor regulates primate choroid-retinal endothelial cell proliferation and tube formation through PI3K/Akt and MEK/ERK dependent signaling[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 381(1/2): 267-272.

(**收稿**:2014-11-21;**修回**:2014-12-07)

(编辑 张 维)