

靶向 PDGF 受体 - α 的 RNA 干扰对 RPE 细胞增殖和凋亡的影响

秦贤杰, 彭燕一, 秦程

摘要 目的 探讨针对血小板源性生长因子受体- α (PDGFR- α) 的 RNA 干扰对体外培养的人视网膜色素上皮 (hRPE) 细胞增殖和凋亡的影响, 为临床治疗增殖性玻璃体视网膜病变 (PVR) 提供实验依据。方法 利用脂质体将合成的 shRNA 转染体外培养的 hRPE 细胞, MTT 法检测 hRPE 细胞增殖活性; RT-PCR 法检测细胞中 PDGFR- α mRNA 的表达; Western blot 法检测 PDGFR- α 蛋白表达水平; Hoechst 33258 荧光染料核染分析细胞凋亡; 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率。结果 PDGFR- α shRNA 作用 hRPE 细胞 24 ~ 72 h 后, 细胞增殖明显受到抑制, 呈时间剂量效应 ($P < 0.05$); PDGFR- α shRNA 作用 hRPE 细胞 48 h 后, 实验组 PDGFR- α 基因 mRNA 和蛋白的表达水平较空白对照组及阴性对照组明显降低 ($P < 0.05$); 实验组细胞的凋亡率分别为 (37.10 \pm 0.55) %、(50.8 \pm 1.41) %, 与空白对照组 (11.7 \pm 1.11) % 及阴性对照组 (13.5 \pm 1.05) % 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 实验组 G₁ 期细胞百分比分别为 (64.76 \pm 1.16) %、(75.64 \pm 0.93) %, 与空白对照组 (54.51 \pm 1.40) % 及阴性对照组 (56.04 \pm 2.19) % 相比, 差异有统计学

意义 ($P < 0.05$)。结论 PDGFR- α shRNA 能抑制 hRPE 细胞的增殖并诱导其凋亡。

关键词 血小板源性生长因子受体- α ; RNA 干扰; 视网膜色素上皮细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 774.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)02-0180-05

增殖性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 是指增生的纤维膜对视网膜神经上皮层前后面的收缩、牵拉所导致视网膜脱离、失明的一种疾病, 视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞在纤维膜的形成、收缩过程中起着重要的作用^[1]。血小板源性生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 是机体内一种重要的促使细胞生长、分化的生长因子。研究^[2]表明, PDGF 对诱发 RPE 细胞的增殖、移行, 最终导致 PVR 的发生和发展起着重要的作用。玻璃体内许多非 PDGF 家族的因子均可激活 PDGF 受体 (PDGFR), 采用中和 PDGF 的方法来治疗 PVR 所取得的效果并不理想。因此, 阻断 PDGFR 通路是预防 PVR 发生的基本路径; PDGFR 由亚单位 α 和 β 构成, 而 PDGFR- α 与 PVR 的产生有着更强的相关性^[3]。该实验通过将 PDGFR- α shRNA 转染至 hRPE 细胞内, 研究 PDGFR- α shRNA 对 hRPE 细胞增殖、凋亡的影响,

2015-11-06 接收

基金项目: 广西自然科学基金项目 (编号: KY2012021); 广西科学实验中心开放课题项目 (编号: KFJJ2011-11)

作者单位: 桂林医学院附属医院眼科, 桂林 541000

作者简介: 秦贤杰, 男, 硕士研究生;

彭燕一, 女, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yypeng-7@hotmail.com

cleotide phosphate (NADPH) oxidase subunits gp91^{phox} and p22^{phox} in human coronary artery endothelial cells (HCAEC). **Methods** HCAEC were preincubated for 24 h and the control group remained untreated and the test groups were treated with different concentrations of amlodipine (1 \times 10⁻⁵, 1 \times 10⁻⁶, 1 \times 10⁻⁷, 1 \times 10⁻⁸, 1 \times 10⁻⁹ mol/L) and different concentrations of valsartan (1 \times 10⁻⁴, 1 \times 10⁻⁵, 1 \times 10⁻⁶, 1 \times 10⁻⁷, 1 \times 10⁻⁸ mol/L). The NADPH oxidase subunits protein expression were assessed by Western blot analysis. **Results** Expressions of gp91^{phox} and p22^{phox} were significant in the experimental group and the control group. Amlodipine induced the expression of NADPH oxidase subunit p22^{phox} ($P < 0.05$). High concentrations of amlodipine significantly reduced expression of gp91^{phox}, while low concentration promoted the expression of gp91^{phox} ($P < 0.05$). p22^{phox} and gp91^{phox} were significantly inhibited by valsartan ($P < 0.05$) and the higher the concentration of valsartan, the greater the inhibition ($P < 0.05$). **Conclusion** Valsartan can inhibit oxidative stress. The higher the concentration, the greater the inhibition. Amlodipine suppresses part of NADPH oxidase subunit (gp91^{phox}) only at high concentrations, but it may increase oxidative stress in low concentrations.

Key words amlodipine; valsartan; human coronary artery endothelial cell; oxidative stress; p22^{phox}; gp91^{phox}

为PVR的临床防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人视网膜色素上皮(human retinal pigment epithelium, hRPE)细胞(中山大学细胞库);澳洲胎牛血清、低糖型DMEM培养基(美国Gibco公司);脂质体Lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司);RT-PCR试剂盒(北京天根生化科技有限公司);细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司);兔抗人PDGFR- α 多克隆抗体(美国圣克鲁斯生物技术公司);辣根酶标记山羊抗兔IgG亲和纯化(北京中杉金桥生物技术有限公司)。本实验所用质粒由武汉赛晶技术有限公司提供,其正义链:5'-CTACTACTGTTATCAGTAATG-3',反义链:5'-CATTACTGATAACAGTAGTAG-3'。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养 hRPE细胞采用含10%胎牛血清的低糖DMEM培养基在37℃、5% CO₂培养箱中培养,每2~3 d用0.25%的胰蛋白酶消化、传代,倒置显微镜观察细胞生长情况,取对数生长期细胞用于试验。

1.2.2 细胞转染与试验分组 0.25%胰酶消化处于对数生长期的细胞,用不含抗素的培养基培养细胞24 h后,细胞融合率达60%~70%时转染,操作严格按照转染试剂说明进行,转染6 h后换成无抗生素的培养基继续培养细胞。通过预实验优化转染条件得出:PDGFR- α shRNA质粒表达载体与脂质体的比例为1 μ g:2.5 μ l时为最佳转染比例,PDGFR- α shRNA作用细胞的最佳浓度为2.0 μ g/ml。试验分组:空白对照组(不含shRNA和脂质体)、与靶细胞基因无同源性的阴性对照组(含NC-shRNA和脂质体)、1.0 μ g/ml PDGFR- α shRNA组(含1.0 μ g/ml shRNA和脂质体)、2.0 μ g/ml PDGFR- α shRNA组(含2.0 μ g/ml shRNA和脂质体)。

1.2.3 MTT法检测细胞增殖活性 hRPE细胞经胰酶消化后计数,以5 \times 10³个/孔的密度接种于96孔板,每组6孔;在37℃、5% CO₂的孵箱中培养24 h,细胞融合度达60%~70%时进行转染;转染后继续分别培养24、48、72 h,每孔加5 g/L MTT溶液各20 μ l,放入培养箱中作用4 h,吸弃孔内培养液。每孔加入DMSO 150 μ l,摇床上轻摇10 min后用酶标仪进行测试,在490 nm波长处检测吸光度(absorbance, A)值,计算细胞生长抑制率。

1.2.4 RT-PCR法检测PDGFR- α mRNA的表达

将对数生长期的细胞以5 \times 10⁵个/孔的密度接种于6孔板,24 h后进行转染,转染后继续培养48 h,采用TRIzol法提取相应各组的总RNA,按照试剂盒说明书进行逆转录反应,所得cDNA用作PCR反应模板。PDGFR- α F: 5'-GCTCAAAATGAAGATGCTGTG-3', R: 5'-CCTCCACGGTACTCCTGTCT-3',扩增产物长度为270 bp,PCR反应条件为94℃预变性5 min;94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 1 min,共35个循环,72℃延伸5 min;产物经15 g/L琼脂糖电泳检测,拍照,结果用图像处理仪分析处理,测定目的基因及内参的灰度值。

1.2.5 Western blot检测细胞中PDGFR- α 蛋白的表达 取转染48 h的hRPE细胞,弃培养液,PBS洗涤后加入细胞裂解液刮取细胞,并超声裂解,蛋白定量,10% SDS-PAGE蛋白电泳、转膜、牛奶封闭;加入一抗4℃孵育过夜;加入二抗,室温摇床孵育2 h, ECL发光、曝片。

1.2.6 Hoechst 33258荧光核染分析细胞凋亡 采用胰酶消化hRPE细胞,以每孔5 \times 10⁵的密度接种至6孔板,24 h后转染,继续培养48 h,采用Hoechst 33258荧光染料染色,在倒置荧光显微镜下观察、分析。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡 取对数生长期细胞以每孔5 \times 10⁵的密度接种至6孔板,至60%~70%融合时换无血清培养基培养24 h,使细胞周期同步化,转染后继续培养48 h,消化、2 000 r/min离心5 min并收集细胞,以预冷的70%乙醇固定,4℃过夜,2 000 r/min离心5 min后洗涤以PI染液重悬,用流式细胞仪检测细胞周期及凋亡。

1.3 统计学处理 采用SPSS 17.0统计学软件进行分析。本实验测量的数据资料经W检验呈正态分布,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间的均数比较采用方差分析和SNK-q检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组hRPE细胞的形态学变化 转染48 h后,空白对照组和阴性对照组细胞均生长状态良好,细胞形态正常,胞质均匀,贴壁好,细胞数目多;1.0 μ g/ml shRNA组细胞数量减少、间隙增大,出现脱壁、皱缩,甚至碎裂现象。与1.0 μ g/ml shRNA组相比,2.0 μ g/ml shRNA组细胞数量明显减少,死亡、漂浮、碎裂细胞明显增多。见图1。

2.2 PDGFR- α shRNA对hRPE细胞增殖的影响 PDGFR- α shRNA分别作用于hRPE细胞24、48、

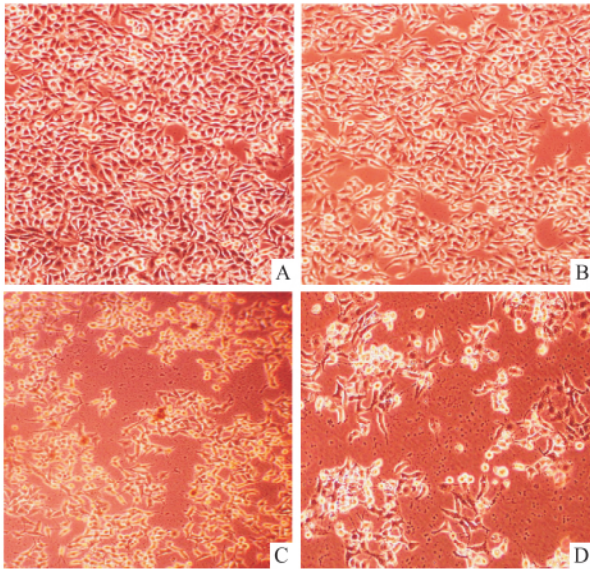


图1 倒置显微镜下各组 hRPE 细胞的生长状态 ×200

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 1.0 μg/ml shRNA 组; D: 2.0 μg/ml shRNA 组

72 h hRPE 细胞的增殖均受到抑制, 随时间和剂量的增加而呈正相关性, 差异有统计学意义 ($F = 238.95, 224.38, 1228.75, P < 0.05$)。见表1。

表1 转染 PDGFR-α shRNA 后对 hRPE 细胞生长抑制率的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞生长抑制率 (%)		
	24 h	48 h	72 h
空白对照	0	0	0
阴性对照	1.76 ± 0.04	2.60 ± 0.02	2.40 ± 0.01
1.0 μg/ml shRNA	9.46 ± 0.03* #	20.96 ± 0.02* #	32.00 ± 0.01* #
2.0 μg/ml shRNA	14.93 ± 0.15* #△	31.33 ± 0.01* #△	51.76 ± 0.01* #△

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$; 与 1.0 μg/ml shRNA 组比较: △ $P < 0.05$

2.3 hRPE 细胞中 PDGFR-α mRNA 和蛋白的表达变化 PDGFR-α shRNA 作用 hRPE 细胞 48 h 后, PDGFR-α mRNA 和蛋白在 RPE 细胞中的表达随 shRNA 作用浓度的增强呈降低趋势, 差异有统计学意义 ($F = 74.20, 125.94, P < 0.05$)。见图 2、3, 表 2。

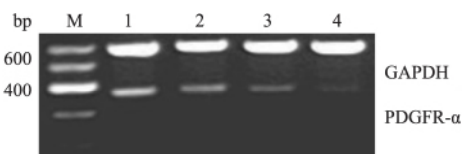


图2 PDGFR-α mRNA 表达

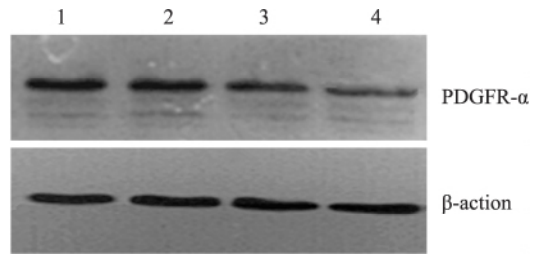


图3 PDGFR-α 蛋白表达

1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 1.0 μg/ml shRNA 组; 4: 2.0 μg/ml shRNA 组

表2 细胞内 PDGFR-α 蛋白和 mRNA 的表达 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	PDGFR-α	PDGFR-α mRNA
空白对照	0.73 ± 0.05	0.58 ± 0.03
阴性对照	0.72 ± 0.04	0.55 ± 0.02
1.0 μg/ml PDGFR-α shRNA	0.38 ± 0.02* #	0.35 ± 0.03* #
2.0 μg/ml PDGFR-α shRNA	0.23 ± 0.02* #△	0.16 ± 0.05* #△

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照比较: # $P < 0.05$; 与 1.0 μg/ml shRNA 比较: △ $P < 0.05$

2.4 hRPE 细胞凋亡的变化 PDGFR-α shRNA 处理 hRPE 细胞 48 h, Hoechst33258 染色后在倒置荧光显微镜下观察, 细胞核处出现致密浓染颗粒状或团块状荧光的凋亡细胞随用药浓度的升高而增加, 空白对照组及阴性对照组则出现较少。见图 4。

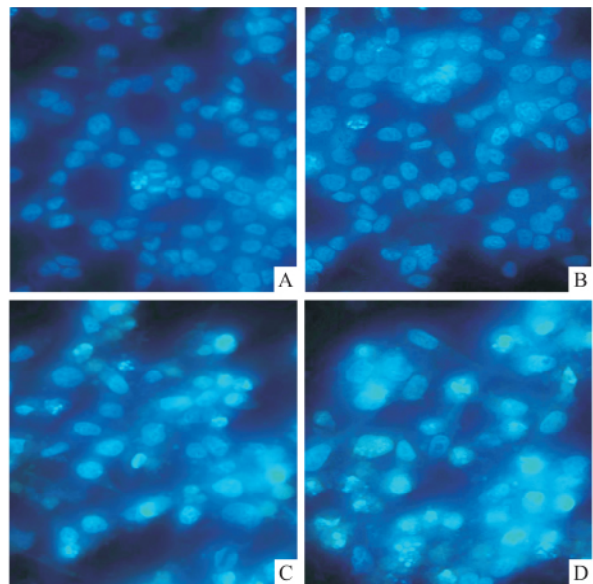


图4 Hoechst33258 染色观察细胞凋亡 ×400

A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: 1.0 μg/ml shRNA 组; D: 2.0 μg/ml shRNA 组

2.5 PDGFR-α shRNA 对细胞周期及凋亡的影响 PDGFR-α shRNA 作用 hRPE 细胞 48 h 后, 细胞

周期各时相比例及总体凋亡率发生了显著的变化, G_1 期细胞比例及凋亡率显著增加, 呈剂量效应, 差异有统计学意义 ($F = 125.49, 927.55, P < 0.05$)。见表 3。

表 3 不同浓度的 PDGFR- α shRNA 对 hRPE 细胞周期和凋亡率的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞周期 (%)			凋亡率 (%)
	G_1 期	S 期	G_2/M 期	
空白对照	54.51 \pm 1.40	35.76 \pm 1.05	8.45 \pm 0.94	11.7 \pm 1.11
阴性对照	56.04 \pm 2.19	35.43 \pm 1.06	8.05 \pm 0.51	13.5 \pm 1.05
1.0 μ g/ml shRNA	64.76 \pm 1.16* #	25.73 \pm 1.20* #	4.24 \pm 0.19* #	37.1 \pm 0.55* #
2.0 μ g/ml shRNA	75.64 \pm 0.93* # Δ	16.60 \pm 1.21* # Δ	2.55 \pm 0.67* # Δ	50.8 \pm 1.41* # Δ

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$; 与 1.0 μ g/ml shRNA 组比较: $\Delta P < 0.05$

3 讨论

PDGF 是近年来发现的一种重要的促有丝分裂生长因子, 其可由多种细胞产生并分泌, 可刺激特定细胞群的分裂与增殖。研究^[4]证实, PDGF 是 PVR 形成过程中最重要的生长因子之一, PDGF 能够刺激 RPE 细胞增生和迁移, 还可以促进 RPE 细胞表达 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA), α -SMA 的表达又可刺激 RPE 细胞的转型, 对 PVR 的发生和发展起到重要作用^[5]。

PVR 的发生发展是多种细胞、体液因素之间相互作用的结果, RPE 细胞不但是增殖膜形成和收缩的主要细胞, 而且还可以产生趋化因子, 吸引胶质细胞和成纤维细胞等参与增殖膜的形成^[6]。Cassidy et al^[7]发现, 与单纯患有 DR 的患者比较, 伴有 PVR 患者的成纤维生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 和 PDGF 水平均升高。梁勇等^[8]采用免疫电镜双标记法证实了 PVR 增殖膜中 RPE 细胞和神经胶质细胞是 PDGF 的分泌细胞。RPE 细胞可分泌 PDGF, 同时又含有 PDGF 受体, 在增殖膜中 PDGF 的自分泌及旁分泌作用机制对 PVR 的发展起到重要作用^[9], 因此, 通过阻断 PDGF 受体通路来抑制 RPE 细胞的增殖对防治 PVR 有着重要的意义。李林林等^[10]发现, 抗 PDGFR- α 抗体可以抑制铁锈诱导的 hRPE 细胞的增殖活性。在基因治疗领域, 有学者^[11]利用反义寡核苷酸技术沉默 PDGFR- α 的基因表达, 发现 PDGFR- α ASODN 可以显著抑制 RPE 细胞的增生, 并能诱导其凋亡。蒋姣姣等^[12]通过动物实验证实了 PDGFR- α ASODN 可以降低 PVR 的发展程度, 推测其可能与下调视网膜细胞中 PDG-

FR- α 有关。

RNA 干扰是近几年发展起来的新兴的基因阻断技术, 因其高特异性、高效性、低毒等优点, 已被广泛应用于多种疾病的治疗。研究^[13]表明靶向 PDGF-A mRNA 的 shRNA 可以有效抑制 RPE 细胞的增殖和移行, 并能够抑制 PVR 的发生、发展。本研究首次将 PDGFR- α shRNA 转染至 hRPE, RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示 PDGFR- α shRNA 能有效沉默 hRPE 细胞中靶基因的表达, 并且呈剂量效应。MTT 检测显示细胞生长受到抑制, 呈时间浓度依赖性, 可能与本实验沉默了 hRPE 细胞中 PDGFR- α 基因的表达, 使靶细胞膜上相应的受体生成减少, 阻断了 PDGF 的生物学作用, 导致细胞增殖活性降低有关。本实验应用 PDGFR- α shRNA 沉默 hRPE 细胞后, 细胞周期发生了改变, S 期、 G_2/M 期比例显著降低, G_1 期的比例显著增加, 细胞周期表现出 G_1 期阻滞, 说明 PDGFR- α shRNA 可将细胞阻滞于 G_1 期。 G_1 期为细胞的 DNA 合成前期, 细胞阻滞于 G_1 期, 其增殖受到抑制。本研究流式细胞仪及荧光核染结果观察到, 细胞凋亡率随着药物浓度的增加而升高, 推测其凋亡机制可能为沉默 PDGFR- α 基因表达阻断了一系列细胞信号的激活, 启动了细胞的凋亡程序从而诱导了细胞的凋亡。

综上所述, PDGFR- α shRNA 转染于 hRPE 细胞后, 可以有效的抑制 RPE 细胞的增殖, 促进细胞凋亡并将 RPE 细胞阻滞于 G_1 期, 为进一步应用 shRNA 防治 PVR 提供了实验依据, PDGFR- α shRNA 作用细胞的具体调控机制还有待于进一步深入的研究和探讨。

参考文献

- [1] Umazume K, Tsukahara R, Liu L, et al. Role of retinal pigment epithelial cell β -catenin signaling in experimental proliferative vitreoretinopathy [J]. Am J Pathol 2014, 184(5): 1419-28.
- [2] Lei H, Rheaume M A, Kazlauskas A, et al. Recent developments in our understanding of how platelet-derived growth factor (PDGF) and its receptors contribute to proliferative vitreoretinopathy [J]. Exp Eye Res 2010, 90(3): 376-81.
- [3] Lei H, Rheaume M A, Velez G, et al. Expression of PDGFR- α is a determinant of the PVR potential of ARPE-19 cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011, 52(9): 5016-21.
- [4] Carrington L, McLeod D, Boulton M. IL-10 and antibodies to TGF- β 2 and PDGF inhibit RPE-mediated retinal contraction [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000, 41(5): 1210-16.
- [5] Si Y, Wang J, Guan J, et al. Platelet-derived growth factor induced α -smooth muscle actin expression by human retinal pigment

- epithelium cell[J]. *J Ocul Pharmacol Ther* 2013 ,29(3): 310 - 18.
- [6] 李林,徐剑容,王咏针,等.微小RNA-7对人视网膜色素上皮细胞增生和迁移的影响[J]. *眼科新进展* 2014 ,34(2): 122 - 6.
- [7] Cassidy L, Barry P, Shaw C, et al. Platelet derived growth factor and fibroblast growth factor basic levels in the vitreous of patients with vitreoretinal disorders [J]. *Br J Ophthalmol* ,1998 ,82(2): 181 - 5.
- [8] 梁勇,黎晓新,樊景禹,等.血小板源性生长因子对增生性玻璃体视网膜病变增生膜形成的影响[J]. *中华眼科杂志* , 2002 ,38(3): 144 - 7.
- [9] Johnsen E O, Frøen R C, Albert R, et al. Activation of neural progenitor cells in human eyes with proliferative vitreoretinopathy [J]. *Exp Eye Res* 2012 ,98: 28 - 36.
- [10] 李林,庞东渤.抗PDGFR- α 抗体对铁锈诱导的人视网膜色素上皮细胞增殖过程的作用[J]. *国际眼科杂志* ,2013 ,13(10): 1974 - 7.
- [11] 彭燕一,邱梅园,丁芝祥,等.应用反义寡核苷酸沉默PDGFR- α 表达对RPE细胞增生和凋亡的影响[J]. *中华实验眼科杂志* , 2012 ,30(4): 341 - 5.
- [12] 蒋姣姣,彭燕一,黄海,等.PDGFR- α 受体反义寡核苷酸治疗实验性增生性玻璃体视网膜病变[J]. *眼科新进展* ,2013 ,33(9): 812 - 5, 821.
- [13] 孙蕾.靶向PDGFR- α RNA干涉抑制增生性玻璃体视网膜病变中RPE细胞增殖的实验研究[D]. 吉林大学 2008 ,77 - 83.

Effects of RNA interference targeting PDGF receptor- α on RPE cells proliferation and apoptosis

Qin Xianjie, Peng Yanyi, Qin Cheng

(Dept of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541000)

Abstract Objective To investigate the effect of RNA interference targeting platelet-derived growth factor receptor- α (PDGFR- α) on hRPE cell proliferation and apoptosis *in vitro* so that experimental evidence was provided for the clinical treatment of proliferative vitreoretinopathy. **Methods** Retinal pigment epithelium cells were cultured *in vitro*, and shRNA which was chemically synthesized was transfected into hRPE cell mediated by cationic liposomes, the cell proliferation ability was detected by MTT; the expression of PDGFR- α mRNA of hRPE cells was detected by Reverse Transcription Polymerase Chain Response; the expression of PDGFR- α protein was detected by Western blot; cell apoptosis was analyzed by Hoechst 33258; the Flow Cytometry was used to analyze the effect of cycle and apoptosis. **Results** PDGFR- α shRNA had effect on hRPE cells 24 ~ 72 h, the proliferation of hRPE cells were inhibited, and showed a time-dose response ($P < 0.05$); after treated with PDGFR- α shRNA 48 h, the expression of mRNA and protein of PDGFR- α gene was significantly reduced compared with the control group and negative control group ($P < 0.05$); the apoptosis rate of experimental group was $(37.10 \pm 0.55)\%$, $(50.8 \pm 1.41)\%$, compared with the blank control group $(11.7 \pm 1.11)\%$ and the negative control group $(13.5 \pm 1.05)\%$, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); the percentage of G1 phase of experimental group was $(64.76 \pm 1.16)\%$, $(75.64 \pm 0.93)\%$, compared with the blank control group $(54.51 \pm 1.40)\%$ and the negative control group $(56.04 \pm 2.19)\%$, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** PDGFR- α shRNA can inhibit hRPE cells proliferation and induce apoptosis.

Key words PDGF- α receptor; RNA interference; retinal pigment epithelial cells; proliferation; apoptosis