

引文格式:李蓉,杜军辉,常远.肿瘤坏死因子- $\alpha$ 对 RF/6A 细胞自噬促进细胞增殖、迁移和管腔形成的影响[J].

眼科新进展,2015,35(12):1132-1136. doi:10.13389/j.cnki.rao.2015.0310

【实验研究】

# 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 对 RF/6A 细胞自噬促进细胞增殖、迁移和管腔形成的影响<sup>△</sup>

李蓉 杜军辉 常远

**作者简介:**李蓉,女,1982年2月出生,四川人,博士,副主任医师,主任,主要从事视网膜新生血管疾病的临床及基础研究。联系电话:029-84277679(O);E-mail:rechelrong198222@163.com

**About LI Rong:** Female, born in February, 1982. Medical doctor, associate chief physician, director of ophthalmology. Tel: +86-29-84277679(O); E-mail:rechelrong198222@163.com

**收稿日期:**2015-08-12

**修回日期:**2015-10-08

**本文编辑:**方红玲

**△基金项目:**陕西省教育厅科研基金资助(编号:15JK1624);陕西省科技厅科研基金资助(编号:2013JC2-19)

**作者单位:**710077 陕西省西安市,西安医学院第一附属医院眼科(李蓉);710021 陕西省西安市,西安交通大学医学院附属西安市第九医院眼科(杜军辉);710054 陕西省西安市,西安医学院(常远)

**Received date:** Aug 12, 2015

**Accepted date:** Oct 8, 2015

**Foundation item:** Shaanxi Provincial Educational Committee Science Research Foundation (No: 15JK1624); Shaanxi Provincial Science and Technology Office Science Research Foundation (No: 2013JC2-19)

From the Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University (LI Rong), Xi'an 710077, Shaanxi Province, China; Department of Ophthalmology, Xi'an Ninth Hospital Affiliated to Medical College of Xi'an Jiaotong University (DU Jun-Hui), Xi'an 710021, Shaanxi Province, China; Xi'an Medical University (CHANG Yuan), Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

## TNF- $\alpha$ promoting proliferation, migration and tube formation of RF/6A cells by inducing cellular autophagy

LI Rong, DU Jun-Hui, CHANG Yuan

**【Key words】** angiogenesis; retinal neovascularization; inflammation; autophagy; TNF- $\alpha$ ; Beclin-1

**【Abstract】 Objective** To observe the effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) on the expression of autophagic protein Beclin-1 and cell proliferation, migration and tube formation of a rhesus macaque choroid-retinal endothelial (RF/6A) cells, and explore the preliminary mechanism of the role of TNF- $\alpha$  in retinal angiogenesis.

**Methods** Cultured RF/6A cells were randomly divided into the control group, TNF- $\alpha$  group and TNF- $\alpha$  + 3-MA group according to the different treatment in culture medium. After 24 hours and 48 hours, Beclin-1 was tested by Western blot analysis and cell proliferation, migration and tube formation was detected by MTT assay, scratch assay and matrigel, respectively. **Results** After 24 hours and 48 hours, the ratios of Beclin-1/ $\beta$ -actin were  $0.673 \pm 0.017$  (TNF- $\alpha$  group, 24 hours),  $0.491 \pm 0.017$  (TNF- $\alpha$  + 3-MA group, 24 hours),  $0.792 \pm 0.006$  (TNF- $\alpha$  group, 48 hours),  $0.504 \pm 0.007$  (TNF- $\alpha$  + 3-MA group, 48 hours) and  $0.268 \pm 0.017$  (control group), respectively. Expression of Beclin-1 by RF/6A cells in TNF- $\alpha$  group for both time points was significantly higher than the control group ( $P < 0.05$ ) and TNF- $\alpha$  + 3-MA group ( $P < 0.05$ ). The cell relative growth rate (RGR) were  $1.410 \pm 0.010$  (TNF- $\alpha$  group, 24 hours),  $1.290 \pm 0.004$  (TNF- $\alpha$  + 3-MA group, 24 hours),  $1.320 \pm 0.011$  (TNF- $\alpha$  group, 48 hours),  $0.180 \pm 0.015$  (TNF- $\alpha$  + 3-MA group, 48 hours),  $1.000 \pm 0.020$  (control group, 24 hours) and  $1.000 \pm 0.011$  (control group, 48 hours), respectively. RGR in TNF- $\alpha$  group was higher than the control group ( $P < 0.05$ ). And the promoting effects of TNF- $\alpha$  on RGR of RF/6A cells was inhibited for both time points when pretreated with 3-MA ( $P < 0.05$ ). The migration distance were  $(345 \pm 28) \mu\text{m}$  (TNF- $\alpha$  group, 24 hours),  $(259 \pm 77) \mu\text{m}$  (TNF- $\alpha$  + 3-MA group, 24 hours),  $(762 \pm 55) \mu\text{m}$  (TNF- $\alpha$  group, 48 hours),  $(659 \pm 48) \mu\text{m}$  (TNF- $\alpha$  + 3-MA group, 48 hours),  $(195 \pm 63) \mu\text{m}$  (control group, 24 hours) and  $(412 \pm 94) \mu\text{m}$  (control group, 48 hours), respectively. The migration distance of RF/6A cells in the TNF- $\alpha$  group was significantly longer than the control group ( $P < 0.05$ ), and it was decreased when pretreated with 3-MA, but still longer than the control group ( $P < 0.05$ ) at 24 hours time point. Compared with 24 hours, more cells migrated into the scratch areas at 48 hours and the differences among the three groups were similar to that of 24 hours ( $P < 0.05$ ). The number of tube formation at 24h were  $11.80 \pm 0.81$  (TNF- $\alpha$  group),  $7.50 \pm 0.72$  (TNF- $\alpha$  + 3-MA group) and  $4.30 \pm 1.12$  (control group), respectively. The number in TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  + 3-MA groups was higher than the control group ( $P < 0.05$ ), and that in TNF- $\alpha$  + 3-MA group was lower than TNF- $\alpha$  group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** TNF- $\alpha$  can promote proliferation, migration and tube formation of RF/6A cells and induction of autophagy, and TNF- $\alpha$  plays an important role in regulating angiogenesis.

**【关键词】** 血管生成;视网膜新生血管;炎症;自噬;肿瘤坏死因子 $\alpha$ ;Beclin-1

**【摘要】 目的** 本研究观察肿瘤坏死因子 $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 对体外培养的恒河猴脉络膜/视网膜内皮细胞 (RF/6A) 表达自噬蛋白 Beclin-1 及细胞增殖、迁移和管腔形成的影响,探讨 TNF- $\alpha$  参与新生血管生成的可能机制。**方法** 将生长良好的 RF/6A 细胞随机分为空白对照组、TNF- $\alpha$  组和 TNF- $\alpha$  + 3-MA 组。培养 24 h、48 h 后采用 Western blot 检测细胞 Beclin-1 蛋白的表达,MTT 法检测细胞增殖,细胞划痕法检测细胞迁移,Matrigel 法检测管腔形成。**结果** 培养 24 h 和 48 h,各组 Beclin-1/ $\beta$ -actin 比值分别是 TNF- $\alpha$  组 (24 h)  $0.673 \pm 0.017$ 、TNF- $\alpha$  + 3-MA 组 (24 h)  $0.491 \pm 0.017$ 、TNF- $\alpha$  组 (48 h)  $0.792 \pm$

0.006、TNF- $\alpha$  + 3-MA 组(48 h) 0.504  $\pm$  0.007、空白对照组 0.268  $\pm$  0.017。TNF- $\alpha$  组 RF/6A 细胞 Beclin-1 的表达量均明显高于空白对照组( $P < 0.05$ )，TNF- $\alpha$  + 3-MA 组 Beclin-1 的表达量较 TNF- $\alpha$  组明显减少( $P < 0.05$ )。各组细胞的相对增殖率分别是 TNF- $\alpha$  组(24 h) 1.410  $\pm$  0.010、TNF- $\alpha$  + 3-MA 组(24 h) 1.290  $\pm$  0.004、TNF- $\alpha$  组(48 h) 1.320  $\pm$  0.011、TNF- $\alpha$  + 3-MA 组(48 h) 0.180  $\pm$  0.015、对照组(24 h) 1.000  $\pm$  0.020、对照组(48 h) 1.000  $\pm$  0.011；TNF- $\alpha$  组细胞的相对增殖率均较空白对照组升高( $P < 0.05$ )，3-MA 预处理后，TNF- $\alpha$  促进 RF/6A 细胞增殖的能力在两个时间点均受到抑制(均为  $P < 0.05$ )。各组细胞的相对迁移距离分别是 TNF- $\alpha$  组(24 h) (345  $\pm$  28)  $\mu\text{m}$ 、TNF- $\alpha$  + 3-MA 组(24 h) (259  $\pm$  77)  $\mu\text{m}$ 、TNF- $\alpha$  组(48 h) (762  $\pm$  55)  $\mu\text{m}$ 、TNF- $\alpha$  + 3-MA 组(48 h) (659  $\pm$  48)  $\mu\text{m}$ 、空白对照组(24 h) (195  $\pm$  63)  $\mu\text{m}$ 、空白对照组(48 h) (412  $\pm$  94)  $\mu\text{m}$ ；TNF- $\alpha$  处理组 RF/6A 细胞 24 h 的迁移明显强于对照组( $P < 0.05$ )，加入 3-MA 预处理后，这种增强作用有所下降，但仍然明显高于对照组( $P < 0.05$ )；培养 48 h，更多细胞迁移入划痕区域，较 24 h 明显增加；不同组之间的差异与 24 h 时的结果类似，差异有统计学意义( $P < 0.05$ )；培养 24 h 各组细胞管腔形成个数：TNF- $\alpha$  组(11.80  $\pm$  0.81) 个、TNF- $\alpha$  + 3-MA 组(7.50  $\pm$  0.72) 个、空白对照组(4.30  $\pm$  1.12) 个，TNF- $\alpha$  组及 TNF- $\alpha$  + 3-MA 组管腔形成个数均高于对照组(均为  $P < 0.05$ )，TNF- $\alpha$  + 3-MA 组较 TNF- $\alpha$  组明显减少( $P < 0.05$ )。**结论** TNF- $\alpha$  能够促进 RF/6A 细胞的增殖、迁移和管腔样结构的形成，且 TNF- $\alpha$  促进内皮细胞自噬在血管新生中发挥重要的调控作用。

病理性的视网膜新生血管是许多眼病致盲的主要原因，如早产儿视网膜病变、增殖性糖尿病视网膜病变等。新生血管的形成是一个涉及多种细胞和分子的复杂过程，主要病理机制为视网膜神经组织的高需氧量与局部缺血缺氧之间的不平衡导致多种促血管生成因子的释放，从而刺激内皮细胞增殖和分化，诱导血管生成<sup>[1-2]</sup>。过去几十年内，全世界对于包括视网膜新生血管在内的新生血管领域十分关注，试图阐明血管生长的调控过程，以期研发治疗多种新生血管相关疾病的有效方法。炎症细胞通过分泌多种细胞因子影响内皮细胞的增生、移行和激活等功能而参与血管生成过程，但炎症诱导的血管生成机制尚未完全阐明<sup>[3-4]</sup>。肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 同时也是一种重要的促血管生成因子，在视网膜血管生成中发挥重要作用，但具体参与机制并不明确。自噬是真核生物普遍存在的维持细胞内环境的一种自我保护机制，有利于细胞应对各种环境。近年来研究证实，细胞自噬与炎症反应密切相关，而细胞自噬又对炎症反应有调控作用<sup>[5]</sup>。此外，心血管疾病方面的研究发现，诱导细胞自噬可以促进血管生成<sup>[6-7]</sup>。上述研究提示，炎症与自噬、血管生成三者之间互相存在密切的联系，通过诱导细胞自噬促进血管生成可能是 TNF- $\alpha$  参与视网膜新生血管形成的机制之一。为了验证这一假设，本实验以恒河猴视网膜血管内皮细胞系 RF/6A 为研究对象，观察 TNF- $\alpha$  对 RF/6A 细胞表达自噬蛋白及细胞增殖、迁移和管腔形成的影响。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料和分组

**1.1.1 材料** 猴 RF/6A 细胞系购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。RPMI-1640 细胞培养液购自美国 Gibco 公司，噻唑蓝 MTT 试剂盒购自北京索莱宝生物技术有限公司，自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-Methyladenine, 3-MA) 购自美国 Sigma 公司，Matrigel 购自美国 BD 公司，TNF- $\alpha$  试剂购自西安科昊生物科技有限公司，抗 Beclin-1 单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的兔和抗鼠免疫球蛋白购自美国

Sigma 公司。

**1.1.2 分组** 将 RF/6A 细胞置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中常规培养。在细胞培养液中分别加入 PBS、10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$ 、10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$  + 5 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  3-MA(3-MA 预处理细胞 1.5 h)，分别为空白对照组、TNF- $\alpha$  组和 TNF- $\alpha$  + 3-MA 组。

**1.2 方法**

**1.2.1 自噬蛋白 Beclin-1 的检测** 采用 Western blot 法检测自噬标志蛋白 Beclin-1 的表达。各组 RF/6A 细胞培养 4 d，PBS 清洗后进行细胞裂解。用 Bradford 法分析测定样品的蛋白含量。将含 50  $\mu\text{g}$  蛋白的细胞裂解液用 SDS-PAGE 凝胶电泳，转到 NC(硝酸纤维素)膜上用抗 Beclin-1 单克隆抗体孵育膜，辣根过氧化物酶标记的二抗和 DBA 显色、照相。用 BandScan 图像分析软件完成条带密度分析，将结果与内参  $\beta$ -actin 的表达比较，计算相对光密度值。

**1.2.2 细胞增殖** 采用 MTT 法检测细胞增殖。取对数生长期细胞，弃上清液，用胰蛋白酶消化后加入含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液，重悬并吹打成单个细胞后计数，将细胞密度调整成为  $10 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ ，以每孔 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液接种到 96 孔板中，在培养箱中继续培养 24 h。吸净培养液后分别加入含有 PBS、10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$ 、10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$  + 5 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$  3-MA 的培养液，同一组别均设置 3 个复孔。分别于给药 24 h、48 h 后，每孔加入 5 g  $\cdot \text{L}^{-1}$  MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ ，置于 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱中继续孵育 4 h。用酶联免疫检测仪在 570 nm 波长处测定每孔的光密度值，计算细胞增殖率(相对增殖率 = 实验组/阴性对照组  $\times 100\%$ )。每组重复检测 3 次，取平均值。

**1.2.3 细胞迁移** 采用细胞划痕法检测细胞迁移。用记号笔在 6 孔板背面画 3 条间隔均匀的直线作为定位线。将 RF/6A 细胞按照每孔  $500 \times 10^3$  个细胞接种于 6 孔板中，培养 24 h 后待细胞均匀铺满培养孔底部，用 100  $\mu\text{L}$  的移液枪头划痕，使之垂直于定位线。将划痕与定位线的交点作为监测点。用 PBS 漂洗培养孔底部 3 次，洗净漂浮细胞后加入含体积分数 1% 胎牛血清的培养基，给予相应浓度的药物处

理。每组设置3个复孔,实验重复3次。拍照记录监测点的划痕宽度,作为0 h时间记录点。将细胞继续培养24 h、48 h后拍照记录监测点的划痕宽度。用Image J图像处理软件计算划痕宽度(相对迁移距离=24 h或48 h迁移距离-0 h迁移距离)。

**1.2.4 管腔形成检测** 采用Matrigel法检测管腔形成。将Matrigel置于4℃过夜融化。在超净工作台取96孔板在冰上操作,每孔内缓慢加入100 μL液态Matrigel。消化RF/6A细胞,用含体积分数10%胎牛血清的RPMI-1640培养基稀释至 $200 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ ,每组均加入细胞悬液50 μL,按不同分组加入相应的无血清培养基及药物50 μL。孵育24 h后在相差显微镜下观察,随机取5个放大200倍的视野照相,采用Image J图像分析软件计算完整管腔数(每3个分叉处记作一个血管腔),取平均值。每组设3个复孔,重复实验3次。

**1.3 统计学分析** 本研究数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用SPSS 19.0软件进行分析,组间差异采取方差分析和Student-Newman-Keuls检验进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TNF-α对RF/6A细胞表达Beclin-1的影响

TNF-α组刺激细胞24 h和48 h,RF/6A细胞Beclin-1的表达量均明显高于空白对照组(均为 $P < 0.05$ );TNF-α+3-MA组Beclin-1的表达量较TNF-α组明显减少( $P < 0.05$ );各组Beclin-1/β-actin比值分别是TNF-α组(24 h)  $0.673 \pm 0.017$ 、TNF-α+3-MA组(24 h)  $0.491 \pm 0.017$ 、TNF-α组(48 h)  $0.792 \pm 0.006$ 、TNF-α+3-MA组(48 h)  $0.504 \pm 0.007$ 、空白对照组  $0.268 \pm 0.017$ (图1)。

**Figure 1** Western blot electrophoresis bands of Beclin-1 protein  
Beclin-1蛋白的Western blot电泳条带

**2.2 TNF-α对RF/6A细胞增殖的影响** 培养细胞24 h、48 h得到各组细胞的相对增殖率,分别是TNF-α组(24 h)  $1.410 \pm 0.010$ 、TNF-α+3-MA组(24 h)  $1.290 \pm 0.004$ 、TNF-α组(48 h)  $1.320 \pm 0.011$ 、TNF-α+3-MA组(48 h)  $0.180 \pm 0.015$ 、空白对照组(24 h)  $1.000 \pm 0.020$ 、空白对照组(48 h)  $1.000 \pm 0.011$ 。与空白对照组相比,TNF-α组24 h及48 h细胞的相对增殖率均升高,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$ )。3-MA预处理后,TNF-α促进RF/6A

细胞增殖的能力在24 h和48 h时均受到抑制(均为 $P < 0.05$ )。

**2.3 TNF-α对RF/6A细胞迁移的影响** 细胞划痕实验结果显示,各组细胞的相对迁移距离分别是TNF-α组(24 h)  $(345 \pm 28) \mu\text{m}$ 、TNF-α+3-MA组(24 h)  $(259 \pm 77) \mu\text{m}$ 、TNF-α组(48 h)  $(762 \pm 55) \mu\text{m}$ 、TNF-α+3-MA组(48 h)  $(659 \pm 48) \mu\text{m}$ 、空白对照组(24 h)  $(195 \pm 63) \mu\text{m}$ 、空白对照组(48 h)  $(412 \pm 94) \mu\text{m}$ 。培养24 h后,大量细胞迁移进入划痕区。与空白对照组相比,TNF-α组RF/6A细胞迁移明显增强( $P < 0.05$ ),加入3-MA预处理后,这种增强作用有所下降,但仍然明显高于空白对照组( $P < 0.05$ );培养48 h后,更多细胞迁移入划痕区域,较24 h明显增加。同样,不同组之间的差异与24 h时的结果类似,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;见图2)。

**2.4 TNF-α对RF/6A细胞管腔形成的影响** 培养24 h各组细胞管腔形成个数:TNF-α组  $(11.80 \pm 0.81)$ 个、TNF-α+3-MA组  $(7.50 \pm 0.72)$ 个和空白对照组  $(4.30 \pm 1.12)$ 个。TNF-α作用24 h后,细胞管腔形成明显增多,3-MA预处理后又有所减少(图3)。比较三组RF/6A细胞形成的完整管腔数显示:TNF-α组和TNF-α+3-MA组的数目明显高于空白对照组( $P < 0.05$ ),而前两组间的差异也有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

新生血管的形成包括血管发生和血管生成两个最基本的过程。前者是指内皮祖细胞增殖形成原始血管网,该过程主要发生于胚胎发育的早期。后者是指从已有的毛细血管发展而形成新的血管,主要包括血管内皮细胞发生激活、增殖和迁移,形成新的血管,主要发生于器官发育和组织修复过程中。正常情况下,促血管形成因子和抑制因子保持平衡,一旦此平衡打破就会使血管生成过度或退化<sup>[8]</sup>。体内实验发现,TNF-α在人增殖性眼病或视网膜新生血管动物模型中表达增强,缺血缺氧会使全身和眼球局部(脉络膜、玻璃体、视神经等处)的巨噬细胞很快迁移到缺氧处视网膜,增殖并分泌包括TNF-α在内的多种因子,影响血管生成的所有步骤<sup>[9-10]</sup>。同样本研究也发现,TNF-α可在体外明显促进RF/6A细胞增殖、迁移和管腔形成,参与血管形成的基本过程,证实了TNF-α具有促血管形成的作用。

自噬是由溶酶体介导的降解细胞内受损的蛋白质或细胞器的代谢过程,具有清除变性蛋白质、衰老或损伤细胞器、实现物质再循环的功能,帮助细胞应对各种不利环境<sup>[11-12]</sup>。在已知的30多种自噬相关基因中,Beclin-1是酵母自噬基因Atg/Vps30的同源基因。Beclin-1蛋白是自噬体形成过程中的一个必需分子,通过介导其他自噬蛋白定位于吞噬泡,调控自噬体的形成与成熟,因此被广泛用作自噬的标志

**Figure 2** Migration images of RF/6A cells under inverted microscope. A: Control group at 0 hour; B: Control group at 24 hours; C: Control group at 48 hours; D: TNF- $\alpha$  group at 0 hour; E: TNF- $\alpha$  group at 24 hours; F: TNF- $\alpha$  group at 48 hours; G: TNF- $\alpha$  + 3-MA group at 0 hour; H: TNF- $\alpha$  + 3-MA group at 24 hours; I: TNF- $\alpha$  + 3-MA group at 48 hours 倒置显微镜下观察 RF/6A 细胞迁移图像。A:空白对照组 0 h; B:空白对照组 24 h; C:空白对照组 48 h; D:TNF- $\alpha$  组 0 h; E:TNF- $\alpha$  组 24 h; F:TNF- $\alpha$  组 48 h; G:TNF- $\alpha$  + 3-MA 组 0 h; H:TNF- $\alpha$  + 3-MA 组 24 h; I:TNF- $\alpha$  + 3-MA 组 48 h

**Figure 3** Tube formation images of RF/6A cells under inverted microscope. A: Control group; B: TNF- $\alpha$  group; C: TNF- $\alpha$  + 3-MA group 倒置显微镜下观察 RF/6A 细胞管状结构形成图像。A:空白对照组; B:TNF- $\alpha$  组; C:TNF- $\alpha$  + 3-MA 组

物<sup>[13]</sup>。3-MA 是磷脂酰肌醇 3 激酶的抑制剂,可特异性阻断自噬体的形成,被广泛用作自噬的抑制剂<sup>[14]</sup>。本研究在自噬水平方面也检测了 Beclin-1 的表达水平以及采用 3-MA 作为抑制剂观察其对血管生成过程的作用。

近年来研究发现,自噬在免疫、感染与炎症<sup>[5]</sup>、心血管疾病<sup>[6-7]</sup>、肿瘤<sup>[15]</sup>、代谢<sup>[16]</sup>中均发挥重要作用。细胞自噬与炎症反应相互作用和调控在机体抗感染和炎症性疾病中发挥效应。细胞通过 Toll 样受体(Toll like receptor,TLR)识别配体,导致受体活化,继而引起多蛋白的信号转导级联反应,分泌促炎因子并激活免疫应答。研究发现,多种 TLR 的配体在诱发炎症反应的同时能够诱导细胞自噬的发生,调控炎症过程的信号通路也能够调节细胞自噬;而细

胞自噬对 TLR 信号和炎症反应有明显的调控作用,细胞自噬的缺陷或自噬相关蛋白发生变异与炎症性疾病的发生关系密切<sup>[17-19]</sup>。在正常情况下,哺乳动物的细胞自噬维持在基础水平,但受到外界环境的刺激后,自噬就会被激活。与上述结果类似,本研究发现,炎性因子 TNF- $\alpha$  能够诱导 RF/6A 细胞的自噬,促进 Beclin-1 蛋白的表达。

在心血管方面的研究发现,利用 3-MA 和小干扰 RNA 针对 Atg5 抑制缺乏营养的主动脉内皮细胞的自噬水平可以减少血管生成,而过表达 Atg5 诱导自噬则能促进血管管腔形成和细胞移行<sup>[7]</sup>。已有研究发现,自噬参与多种眼部疾病的发生<sup>[20]</sup>,但是自噬与视网膜新生血管的关系还不清楚。本研究着眼于 RF/6A 细胞也获得了相似的结果,TNF- $\alpha$  诱导的自

噬可以增加 RF/6A 细胞的增殖、迁移和管腔形成,而 3-MA 可以抑制 RF/6A 的血管生成过程。

总之,本研究发现炎症因子 TNF- $\alpha$  可以上调 RF/6A 细胞的自噬蛋白表达,提高细胞的增殖能力,促进细胞迁移以及细胞管腔形成,而这些作用可被自噬抑制剂减弱。我们的初步实验结果提示,TNF- $\alpha$  介导的自噬在血管生成中发挥了重要作用,通过影响自噬水平调节血管生成的程度,这可能是 TNF- $\alpha$  参与、促进视网膜新生血管生成的一种新的机制。然而,本研究尚未深入探讨 TNF- $\alpha$  诱导 RF/6A 细胞自噬的信号通路,该分子机制方面的研究值得进一步深入进行。

参考文献

1 Li SY,Fu ZJ,Lo AC. Hypoxia-induced oxidative stress in ischemic retinopathy[J]. *Oxid Med Cell Longev*,2012,2012:426769.  
2 Maxwell PH,Ratcliffe PJ. Oxygen sensors and angiogenesis[J]. *Semin Cell Dev Biol*,2002,13(1):29-37.  
3 Naldini A,Carraro F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis[J]. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*,2005,4(1):3-8.  
4 Szade A,Grochot-Przeczek A,Florczyk U,Jozkowicz A,Dulak J. Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis[J]. *IUBMB Life*,2015,67(3):145-159.  
5 何贤辉,何健,欧阳东云. 细胞自噬与炎症反应相互作用的研究进展[J]. 暨南大学学报(医学版),2013,34(2):125-127.  
6 Ramakrishnan S,Nguyen TM,Subramanian IV,Kelekar A. Autophagy and angiogenesis inhibition[J]. *Autophagy*,2007,3(5):512-515.  
7 Du J,Teng RJ,Guan T,Eis A,Kaul S,Konduri GG,*et al.* Role of autophagy in angiogenesis in aortic endothelial cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*,2012,302(2):383-391.

8 D' Alessio A,Moccia F,Li JH,Micera A,Kyriakides TR. Angiogenesis and vasculogenesis in health and disease[J]. *Biomed Res Int*,2015,2015:126582.  
9 Kataoka K,Nishiguchi KM,Kaneko H,van Rooijen N,Kachi S,Terasaki H. The roles of vitreal macrophages and circulating leukocytes in retinal neovascularization[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2011,52(3):1431-1438.  
10 Dagtekin G,Schiffer R,Klein B,Jahnen-Dechent W,Zwadlo-Klarwasser G. Modulation of angiogenic functions in human macrophages by biomaterials[J]. *Biomaterials*,2003,24(20):3395-3401.  
11 Clark SL Jr. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope[J]. *J Biophys Biochem Cytol*,1957,3(3):349-362.  
12 Ashford TP,Porter KR. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes[J]. *J Cell Biol*,1962,12(1):198-202.  
13 Mizushima N,Yoshimori T,Levine B. Methods in mammalian autophagy research[J]. *Cell*,2010,140(3):313-326.  
14 Wu YT,Tan HL,Shui G,Bauvy C,Huang Q,Wenk MR,*et al.* Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase[J]. *J Biol Chem*,2010,285(14):10850-10861.  
15 Tsuchihara K,Fujii S,Esumi H. Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues[J]. *Cancer Lett*,2009,278(2):130-138.  
16 Rabinowitz JD,White E. Autophagy and metabolism[J]. *Science*,2010,330(6009):1344-1348.  
17 Jones SA,Mills KH,Harris J. Autophagy and inflammatory diseases[J]. *Immunol Cell Biol*,2013,91(3):250-258.  
18 Levine B,Mizushima N,Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation[J]. *Nature*,2011,469(7330):323-335.  
19 Delgado MA,Elmaoued RA,Davis AS,Kyei G,Deretic V. Toll-like receptors control autophagy[J]. *EMBO J*,2008,27(7):1110-1121.  
20 Klettner A,Kauppinen A,Blasiak J,Roider J,Salminen A,Kaar-niranta K. Cellular and molecular mechanisms of age-related macular degeneration:from impaired autophagy to neovascularization[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2013,45(7):1457-1467.

(上接第 1131 页)

4 Amano S,Yamagishi SI,Kato N,Inagaku Y,Okamoto T,Makino M,*et al.* Sorbitol dehydrogenase over-expression potentiates glucose toxicity to cultured retinal pericytes[J]. *Bio Biophys Res Commun*,2002,299(2):183-188.  
5 Behl Y,Krothapalli P,Desta T,Dipiazza A,Roy S,Graves DT. Diabetes-enhanced tumor necrosis factor- $\alpha$ production promotes apoptosis and the loss of retinal microvascular cells in type 1 and type 2 models of diabetic retinopathy[J]. *Am J Pathol*,2008,172(5):1411-1418.  
6 Dong N,Chang L,Wang B. Retinal neuronal MCP-1 induced by AGEs stimulates TNF- $\alpha$  expression in rat microglia via p38, ERK, and NF- $\kappa$ B pathways[J]. *Mol Vis*,2014,20:616-628.  
7 Korthagen NM,van Bilsen K,Swagemakers SM,van de Peppel J,Bastiaans J,van der Spek PJ,*et al.* Retinal pigment epithelial cells display specific transcriptional response upon TNF- $\alpha$  stimulation[J]. *Br J Ophthalmol*,2015,99(5):700-704.  
8 Sesti LF,Crispim D,Canani LH,Polina ER,Rheinheimer J,Carvalho PS,*et al.* The -308G > A polymorphism of the TNF gene is associated with proliferative diabetic retinopathy in Caucasian Brazilians with type 2 diabetes[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2015,56(2):1184-1190.  
9 Hang H,Yuan S,Yang Q,Yuan D,Liu Q. Multiplex bead array assay of plasma cytokines in type 2 diabetes mellitus with diabetic retinopathy[J]. *Mol Vis*,2014,20:1137-45.  
10 Dennis MD,Kimball SR,For PE,Jefferson LS. Regulated in development and DNA damage 1 is necessary for hyperglycemia-

induced vascular endothelial growth factor expression in the retina of diabetic rodents[J]. *J Biol Chem*,2015,290(6):3865-3874.  
11 Wang YL,Wang K,Yu SJ,Li Q,Li N,Lin PY,*et al.* Association of the TLR4 signaling pathway in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*,2015,253(3):389-398.  
12 Jiang Y,Thakran S,Bheemreddy R,Ye EA,He H,Walker RJ,*et al.* Pioglitazone normalizes insulin signaling in the diabetic rat retina through reduction in tumor necrosis factor  $\alpha$  and suppressor of cytokine signaling 3[J]. *J Biol Chem*,2014,289(38):395-405.  
13 Li G,Xie B,Li X,Chen Y,Wang Q,Xu Y,*et al.* Down-regulation of survivin and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by  $\beta$ -elemene enhances the radiosensitivity of lung adenocarcinoma xenograft[J]. *Cancer Biother Radiopharm*,2012,27(1):56-64.  
14 宋颖,刘云鹏,杨向红.  $\beta$ -榄香烯对肿瘤细胞上清液诱导的大鼠骨髓来源内皮祖细胞增殖与凋亡的影响[J]. 新乡医学院学报,2013,30(5):368-370.  
15 Bao F,Qiu J,Zhang H. Potential role of  $\beta$ -elemene on histone H1 in the H22 ascites hepatoma cell line[J]. *Mol Med Report*,2012,4:26.  
16 Liu J,Zhang Z,Gao J. Downregulation effects of beta-elemene on the levels of plasma endotoxin,serum TNF-alpha, and hepatic CD14 expression in rats with liver fibrosis[J]. *Front Med*,2011,5(1):101-105.