

引文格式:吕洋,王雨生,窦国睿,李曼红,常天芳,孙嘉星,等.整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 在SDF-1/CXCR4介导的脉络膜新生血管中的作用[J].眼科新进展,2018,38(5):401-406. doi:10.13389/j.cnki.rao.2018.0094

【实验研究】

整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 在 SDF-1/CXCR4 介导的脉络膜新生血管中的作用[△]

吕洋 王雨生 窦国睿 李曼红 常天芳 孙嘉星 徐文芹 胡至察 程子芳

作者简介:吕洋,女,1984年8月出生,江苏人,博士研究生,主治医师。研究方向:眼内新生血管。联系电话:15117203811;E-mail:15117203811@163.com;ORCID:0000-0002-8113-6502

About LV Yang:Female,born in August,1984. Doctoral candidate. Tel:15117203811;E-mail:15117203811@163.com;ORCID:0000-0002-8113-6502

收稿日期:2018-02-11
修回日期:2018-03-22
本文编辑:方红玲

△基金项目:国家自然科学基金资助(编号:81770936、81570856、81670863、81500748)

作者单位:710032 陕西省西安市,第四军医大学西京医院眼科、全军眼科研究所

通讯作者:王雨生,E-mail:wangys003@126.com;ORCID:0000-0001-9774-7837

Received date:Feb 11,2018
Accepted date:Mar 22,2018

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No:81770936, 81570856, 81670863, 81500748)

From the Department of Ophthalmology, Eye Institute of Chinese PLA Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Responsible author: WANG Yu-Sheng, E-mail: wangys003@126.com;ORCID:0000-0001-9774-7837

SDF-1 group was significantly higher than that in the control group [(135.503±10.301) μm vs. (94.443±12.156) μm] ($P<0.05$). The height of RPE uplift in SDF-1 + AMD3100 group [(95.283±20.062) μm] and SDF-1 + SB273005 group [(99.807±10.403) μm] was significantly decreased ($P<0.05$). On the other hand, in experiment *in vitro*, Western blot showed that the expression levels of integrin $\beta 3$ in SDF-1 group and SDF-1 + Si-NC group were significantly higher than those in the control group [(1.301±0.043) and (1.273±0.077) vs. (0.244±0.069)] ($P<0.01$). The levels of integrin subunit $\beta 3$ protein in SDF-1 + si-CXCR4 group (0.322±0.042) and SDF-1 + AMD3100 group (0.336±0.077) were significantly down-regulated ($P<0.01$). Transwell assay showed that the amount of migrating cells in SDF-1 group increased, which was significantly higher than that of the control group ($P<0.01$), while the number of migrating cells in SDF-1 + AMD3100 group and SDF-1 + SB273005 group was significantly decreased. **Conclusion** Integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ can promote the development of CNV by mediating SDF-1/CXCR4 signaling in endothelial cells.

【Key words】 choroidal neovascularization; endothelial cells; SDF-1/CXCR4; integrin $\alpha\text{v}\beta 3$

Roles of integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ in SDF-1/CXCR4-induced choroidal neovascularization

LV Yang, WANG Yu-Sheng, DOU Guo-Rui, LI Man-Hong, CHANG Tian-Fang, SUN Jia-Xing, XU Wen-Qin, HU Zhi-Cha, CHENG Zi-Fang

【Abstract】 **Objective** To explore the role of integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ in the promotion of the development of choroidal neovascularization (CNV) by SDF-1/CXCR4. **Methods** This study was divided into two parts *in vitro* and *in vivo*. As for the *in vivo* study, a CNV model was induced by laser on C57BL/6J mice, and then assigned into 4 groups: mice with solely CNV modeling as control group, with intravitreal injection of SDF-1 after immediate CNV modeling as SDF-1 group, with intravitreal injection of SDF-1 + CXCR4 inhibitor (AMD3100) after CNV modeling as SDF-1 + AMD3100 group, and mice with intravitreal injection of SDF-1 + $\alpha\text{v}\beta 3$ inhibitor (SB273005) after modeling as SDF-1 + SB273005 group. CXCR4 and $\alpha\text{v}\beta 3$ expression levels in laser-induced eyes were quantified by qRT-PCR at time points of day 1, 3, 5, 7, 10 and 14 after modeling, and immunofluorescence staining was applied to detect $\alpha\text{v}\beta 3$ expression in regional CNV and its endothelial cells in the four groups. Finally, OCT was used to observe the height of retinal pigment epithelial (RPE) layers in CNV after treatment in the four groups. Moreover, in the experiment *in vitro*, Western blot was used to measure the expression of CXCR4 protein of RF/6A cells in normal control group, Si-CXCR4 knockdown group and Si-NC knockdown model group. Meanwhile, the expression of integrin subunit $\beta 3$ protein was determined in the normal control group, SDF-1 group, SDF-1 + AMD3100 group, SDF-1 + Si-NC group and SDF-1 + Si-CXCR4 group. Transwell assay was conducted to detect the migration ability of RF/6A cells in the normal control group, SDF-1 group, SDF-1 + AMD3100 group, SDF-1 + SB273005 group. **Results** On the one hand, the study *in vivo*, qRT-PCR showed that the expression of CXCR4 and integrin subunit $\beta 3$ mRNA was up-regulated at first, and then down-regulated with time passed after CNV induction, with the highest expression level of CXCR4 mRNA (4.263±0.464) on day 3, and the peak expression of $\beta 3$ mRNA (3.678±0.364) on day 7 after CNV modeling. The results of immunofluorescence staining showed that the $\beta 3$ fluorescence intensity of SDF-1 group was significantly enhanced, and the ratio of $\beta 3$ /CD31 was also significantly increased, which both were significantly higher than those of the control group ($P<0.01$). However, the $\beta 3$ fluorescence intensity and $\beta 3$ /CD31 ratio of SDF-1 + AMD3100 group and SDF-1 + SB273005 group were significantly weakened and decreased, respectively ($P<0.05$). OCT showed that the elevation level of RPE layer in

【摘要】 目的 探讨内皮细胞表达的整合素 $\alpha v\beta 3$ 在基质细胞衍生因子-1 (stromal derived factor-1, SDF-1)/趋化因子受体 4 (chemokine receptor 4, CXCR4) 调控脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 生成过程中的作用。**方法** (1) 体内动物实验: 采用激光诱导 C57BL/6J 小鼠 CNV 模型, 实验分为 4 组: 单纯 CNV 组 (对照组)、CNV 后立即玻璃体内注射 SDF-1 组 (SDF-1 组)、CNV 后立即玻璃体内注射 SDF-1 + CXCR4 抑制剂 AMD3100 组 (SDF-1 + AMD3100 组) 和 CNV 后立即玻璃体内注射 SDF-1 + $\alpha v\beta 3$ 抑制剂 SB273005 组 (SDF-1 + SB273005 组)。实时定量 PCR 观察小鼠激光诱发 CNV 后 1 d、3 d、5 d、7 d、10 d、14 d CXCR4 和 $\alpha v\beta 3$ 的表达; 免疫荧光染色观察 4 组处理后 CNV 局部及内皮细胞上 $\alpha v\beta 3$ 的表达; OCT 观察 4 组处理后 CNV 中视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelial, RPE) 层隆起高度。(2) 体外细胞实验: Western blot 检测正常对照组、Si-CXCR4 敲减组和 Si-NC 模拟敲减组 RF/6A 细胞中 CXCR4 蛋白的表达, 同时检测对照组、SDF-1 组、SDF-1 + AMD3100 组、SDF-1 + Si-NC 组和 SDF-1 + Si-CXCR4 组中整合素 $\alpha v\beta 3$ 蛋白的表达。Transwell 检测正常对照组、SDF-1 组、SDF-1 + AMD3100 组和 SDF-1 + SB273005 组的细胞迁移能力。**结果** (1) 体内动物实验: 实时定量 PCR 显示随着 CNV 诱导后时间的增加, CXCR4 mRNA 和整合素亚基 $\beta 3$ mRNA 表达开始增加, CXCR4 mRNA 在 CNV 后 3 d 表达量最高 (4.263 ± 0.464), $\beta 3$ mRNA 在 CNV 后 7 d 表达量最高 (3.678 ± 0.364), 随后开始下降。免疫荧光结果显示: SDF-1 组 $\beta 3$ 荧光强度显著增加, $\beta 3$ /CD31 比率也明显增加, 显著高于 CNV 对照组 ($P < 0.01$); 而 SDF-1 + AMD3100 组和 SDF-1 + SB273005 组 $\beta 3$ 荧光强度和 $\beta 3$ /CD31 比率显著减弱 ($P < 0.05$)。OCT 显示 SDF-1 组 RPE 层的隆起明显升高 (135.503 ± 10.301) μm , 显著高于 CNV 对照组 (94.443 ± 12.156) μm ($P < 0.05$); 而 SDF-1 + AMD3100 组和 SDF-1 + SB273005 组 RPE 隆起的高度显著降低 (95.283 ± 20.062) μm 和 (99.807 ± 10.403) μm ($P < 0.05$)。(2) 体外细胞实验: SDF-1 组和 SDF-1 + Si-NC 组整合素亚基 $\beta 3$ 蛋白的表达均升高 (1.301 ± 0.043)、(1.273 ± 0.077), 显著高于对照组 (0.244 ± 0.069) ($P < 0.01$); SDF-1 + Si-CXCR4 组和 SDF-1 + AMD3100 组整合素亚基 $\beta 3$ 蛋白的水平显著下降 (0.322 ± 0.042)、(0.336 ± 0.077) ($P < 0.01$)。Transwell 检测显示 SDF-1 组细胞迁移量增多显著高于对照组, 而 SDF-1 + AMD3100 组和 SDF-1 + SB273005 组迁移细胞的数量明显减少。**结论** 整合素 $\alpha v\beta 3$ 在内皮细胞中通过介导 SDF-1/CXCR4 信号转导, 促进 CNV 的发生发展。

【关键词】 脉络膜新生血管; 内皮细胞; SDF-1/CXCR4; 整合素 $\alpha v\beta 3$

【中图分类号】 R773.4

眼部病理性血管的生成往往导致严重的后果, 包括难治性高眼压、视力障碍, 甚至不可逆性失明。脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是一种常见的眼部新生血管疾病的共同特征, 常导致不可逆性视力丧失, 已成为 ≥ 50 岁人群失明的主要原因^[1]。来自脉络膜的病理性新生血管增生并突破视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 和 Bruch 膜, 引起渗出性或出血性视网膜脱离, 从而异常长入视网膜下腔^[1]。CNV 的发病机制是多因素的, 目前仍未能完全揭示。趋化因子受体是 G 蛋白偶联的细胞表面受体, 它与特定趋化因子的相互作用可诱导细胞向趋化因子浓度梯度做定向迁移^[2-3]。既往研究显示, 基质细胞衍生因子-1 (stromal derived factor-1, SDF-1) 与其特异性趋化因子受体 4 (chemokine receptor 4, CXCR4) 结合在 CNV 中高表达, 参与内皮细胞的动员、迁移和黏附等新生血管的形成^[4]。然而, 研究发现, CXCR4 不能直接促进细胞黏附和迁移运动, 但对于传递 SDF-1 诱导的信号是必不可少的, 其可能通过向细胞内转导信号, 激活其他黏附分子, 促进细胞的迁移和黏附^[5]。因此, 参与细胞迁移、黏附直接相关的黏附分子可能在 SDF-1/CXCR4 信号转导中促进内皮细胞迁移和黏附。整合素属于细胞表面黏附分子家族, 每个成员的分子都是由 α 和 β 亚单位靠非共价键连接形成的异源双体跨膜蛋白。整合素 $\alpha v\beta 3$ 在健康的内皮细胞中不存在或低表达, 但在胚胎发生、组织修复和眼部新生血管形成过程中富集^[6]。本研究主要探讨 $\alpha v\beta 3$ 在激光诱导的小鼠 CNV 局部介导 SDF-1/CXCR4 信号转导、促进内皮细胞迁移进而影响 CNV 发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和细胞来源 选用清洁级 C57BL/6J 雄性小鼠 45 只, 体质量 160 ~ 180 g, 12 h 明/暗环境下饲养。恒河猴脉络膜-视网膜内皮细胞 (RF/6A 细胞) 获自中国科学院, 培养于含体积分数 15% FBS、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的 DMEM 培养基, 在 37°C 、含体积分数 5% CO_2 的温箱中培养。

1.1.2 主要试剂 实时定量 PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); 山羊多克隆抗体 CXCR4、兔单克隆抗体 $\alpha v\beta 3$ 、小鼠单克隆抗体 CD31 (美国 Abcam 公司); 抗羊 IgG 二抗和抗兔 IgG 二抗 (美国 BioLab 公司); DyLight 594 标记的羊抗兔荧光二抗和 AlexaFluor 488/FITC 偶联的兔抗鼠荧光二抗 (美国 Earth 公司); SDF-1 (北京北方生物公司); SB273005 和 AMD3100 (Selleckchem, 美国); β -actin 抗体 (美国 Sigma 公司); ECL 化学发光显影 (美国 Pierce 公司); Olympus Fluoview 300 共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 CNV 通过激光光凝诱导^[7]。使用 532 nm 波长的激光, 在远离视神经 ($100 \mu\text{m}$, 125 mV 0.1 s) 的眼底 $1.5 \sim 2.0$ 视盘直径上进行激光光凝。有气泡产生 (证明击破 Bruch 膜), 且无出血的激光斑作为有效光斑^[8]。

1.2.2 分组方法 (1) 体内动物实验: CNV 诱导前和 CNV 诱导后 1 d、3 d、5 d、7 d、10 d、14 d 7 个时间点, 每天各取 3 只小鼠, 共 21 只小鼠用于实时定量 PCR 实验。同时在 CNV 诱导后 7 d, 剩余 24 只小鼠

分为四组:对照组、SDF-1 组($200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、SDF-1 ($200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) + AMD3100 ($200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组和 SDF-1 ($200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) + SB273005 ($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 组;将所有试剂按照指定剂量溶解于 PBS 中,并在小鼠 CNV 诱导后 2 h 内玻璃体内注射 $1\text{ }\mu\text{L}$ 。12 只小鼠用于冰冻切片免疫荧光染色,12 只小鼠用于光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)。(2)体外细胞实验:应用 RF/6A 细胞,Western blot 检测正常对照组、Si-CXCR4 敲减组和 Si-NC 模拟敲减组中 CXCR4 蛋白的表达量;同时检测对照组、SDF-1 组、SDF-1 + AMD3100 组、SDF-1 + Si-NC 组和 SDF-1 + Si-CXCR4 组中整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 蛋白的表达量。采用 Transwell 实验检测正常对照组、SDF-1 组、SDF-1 + AMD3100 组和 SDF-1 + SB273005 组细胞迁移能力。

1.2.3 实时定量 PCR 检测 使用 Trizol 试剂提取来自脉络膜组织总 RNA。使用 RT 系统制备 cDNA,试剂盒和 ABI PRISM 7500 实时 PCR 系统以 β -肌动蛋白作为内部对照进行 PCR。小鼠 CXCR4、整合素亚基 αv 、整合素亚基 $\beta 3$ 上游引物分别是:5'-TCAGTGGCTGACCTCTCTT-3'、5'-CATTTCTGCTGCTGCCATTA-3'、5'-AGTCGCCTACCTCAACCAAG-3';下游引物分别是:5'-CTTGGCCTCTGACTGTTG-GT-3'、5'-TTGAAGGGACTCGGAGATTG-3'、5'-ACTGTTTGCAGAGGCTGGAC-3'。SiRNA 片段序列: CXCR4-163 上游引物:5'-CCAUGAAGGAACCCU-GUUUTT-3',下游引物:5'-AAACAGGGUUCUUC-CAUGGTT-3';SiRNA 对照片段上游引物:5'-UU-CUCCGAACGUGUCACGUTT-3',下游引物:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。经过 3 次独立实验,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法定量分析相对表达量。

1.2.4 冰冻切片免疫荧光染色 CNV 诱导后 7 d 麻醉摘除双侧眼球,将眼球固定 2 h。然后切除眼前节和玻璃体,在分级蔗糖溶液($200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)中低温过夜。将眼球包埋并以 $8\text{ }\mu\text{m}$ 厚度垂直切片,封闭 30 min,洗涤后加一抗,分别为小鼠 CD31 单克隆抗体(1:300)、兔 $\beta 3$ 单克隆抗体(1:300), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。洗涤后滴加二抗,分别为红色荧光标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1:200)、绿色荧光标记的兔抗小鼠 IgG 抗体(1:200),室温孵育 2 h,并采用 DAPI 染色 10 min。使用共焦显微镜可视化免疫荧光拍照。采用 Image J 测量 CNV 局部 4 种不同处理后 $\beta 3$ 的总面积(红色;以像素为单位),统计分析 CNV 中 $\beta 3$ 在内皮细胞中的表达构成比。

1.2.5 OCT 检查 使用 4D-ISOCT (OptoProbe Research Ltd., Burnaby, BC, 加拿大)提供的软件对 CNV 的 RPE 层隆起厚度进行定量。每眼中选择 4~6 个斑点作分析。CNV 被定义为 RPE 层上方的纺锤形的视网膜下超反射区域。选择通过“几何”损伤中心扫描分析并评估每只小鼠 CNV 损伤的厚度。

1.2.6 Western blot 检测 在裂解缓冲液中制备细

胞裂解物,并使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白质浓度。将 $20\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白质在 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 聚丙烯酰胺凝胶上电泳并转移到 PVDF 膜上。使用一抗在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。将膜与二抗一起室温培育 90 min。检测蛋白条带信号并将其标准化为 β -肌动蛋白。ECL 发光反应后,采用 Image J 软件定量分析蛋白条带。

1.2.7 细胞迁移实验 (Transwell 实验) 在 24 孔改良的 Boyden 室评估迁移能力。将 $200\text{ }\mu\text{L}$ 在无血清培养基中的 $10\times 10^6\text{ }\mu\text{L}^{-1}$ RF/6A 细胞接种在上室中,并将悬浮在相同培养基中的阴性对照细胞加入到下室中,最终体积为 $500\text{ }\mu\text{L}$ 。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 24 h, $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 多聚甲醛固定 10 min,并用 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 结晶紫-甲醇溶液染色,15 min 后 PBS 清洗。随机取 3 个视野进行拍照,所有细胞数目计数后统计分析。

1.3 统计学方法 本研究统计分析使用 SPSS 13.0 软件进行,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。每个实验至少重复 3 次。LSD 检验后方差分析用于两组比较,其余的统计分析使用 t 检验。对所有实验数据行正态分布方差和非参数检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 激光诱导后不同时间 SDF-1/CXCR4 和整合素 $\alpha\text{v}\beta 3$ 的 mRNA 表达 CXCR4 mRNA 和整合素亚基 $\beta 3$ mRNA 在激光诱导前相对表达量最低,分别为 1.107 ± 0.142 和 0.641 ± 0.295 ;CNV 诱导后 1 d CXCR4 mRNA 的相对表达量为 2.746 ± 1.055 ,CNV 诱导后 3 d 相对表达量最高,为 4.263 ± 0.464 ,诱导后 5 d 为 2.736 ± 0.523 ,诱导后 7 d 为 1.678 ± 0.636 ,诱导后 10 d 为 1.804 ± 0.282 ,诱导后 14 d 为 1.770 ± 0.345 。CNV 诱导后 1 d $\beta 3$ mRNA 的相对表达量为 0.746 ± 0.218 ,诱导后 3 d 为 1.597 ± 0.467 ,诱导后 5 d 为 2.402 ± 0.136 ,诱导后 7 d 相对表达量最高,为 3.678 ± 0.364 ,诱导后 10 d 为 1.014 ± 0.048 ,诱导后 14 d 为 0.837 ± 0.240 。整合素亚基 αv mRNA 表达在 CNV 模型诱导前后基本无明显差异。

2.2 RF/6A 细胞中 SDF-1/CXCR4 对整合素亚基 $\beta 3$ 的影响 Western blot 结果显示: CXCR4 特异性的 siRNA 有效抑制了 CXCR4 蛋白的表达,正常对照组、Si-CXCR4 敲减组和 Si-NC 模拟敲减组中 CXCR4 蛋白表达分别为: 1.628 ± 0.261 、 0.168 ± 0.038 、 1.616 ± 0.268 (图 1)。SDF-1 组和 SDF-1 + Si-NC 组整合素亚基 $\beta 3$ 的表达均升高,分别为 1.301 ± 0.043 、 1.273 ± 0.077 ,均显著高于对照组(0.244 ± 0.069)(均为 $P<0.01$);CXCR4 特异性的 siRNA 和 CXCR4 的抑制剂 AMD3100 均显著抑制了 SDF-1 诱导后整合素亚基 $\beta 3$ 蛋白的表达(0.322 ± 0.042)、(0.336 ± 0.077)(均为 $P<0.01$),见图 2。

2.3 SDF-1/CXCR4 对整合素亚基 $\beta 3$ 的影响 免疫荧光显示,激光诱导后 7 d,绿色荧光标记的 CD31

和红色荧光标记的 $\beta 3$ 在 CNV 区域富集;CNV 区域的 CD31 可表达 $\beta 3$ (图 3)。SDF-1 组处理后 CNV 7 d $\beta 3$ 荧光强度显著增加($1\,338\,800 \pm 191\,266$), $\beta 3$ /CD31 比率也明显增加(0.493 ± 0.187),均显著高于对照组($642\,896 \pm 103\,412$)、(0.268 ± 0.150) (均为 $P < 0.01$)。然而,SDF-1 + AMD3100 组和 SDF-1 + SB273005 组 $\beta 3$ 荧光强度和 $\beta 3$ /CD31 比率显著减弱,为 $872\,634 \pm 63\,351$ 、 0.372 ± 0.070 和 $840\,842 \pm 100\,663$ 、 0.325 ± 0.064 ($P < 0.05$)。

图1 Western blot 法检测 CXCR4 蛋白表达

2.4 SDF-1/CXCR4 调控 $\alpha v\beta 3$ 增加激光诱导小鼠 CNV 严重程度 OCT 显示,CNV 处 RPE 层隆起,视网膜下可见纺锤形超反射病灶(图 4)。SDF-1 组 RPE 层的隆起明显升高(135.503 ± 10.301) μm ,显著高于对照组(94.443 ± 12.156) μm ($P < 0.05$)。SDF-1 + AMD3100 组(95.283 ± 20.062) μm 和 SDF-1 + SB273005 组(99.807 ± 10.403) μm 显著降低了 SDF-1 诱导的 RPE 隆起高度($P < 0.05$)。

2.5 SDF-1/CXCR4 调控 $\alpha v\beta 3$ 对内皮细胞迁移的影响 Transwell 检测显示(图 5):SDF-1 组细胞迁移数量增多(364.333 ± 11.060),显著多于对照组(133.000 ± 11.269) ($P < 0.01$)。SDF-1 + AMD3100 组(216.333 ± 11.240)和 SDF-1 + SB273005 组(23.333 ± 14.572)细胞迁移的数量明显较 SDF-1 组减少(均为 $P < 0.05$)。

图3 共焦显微镜下小鼠 CNV 诱导后 7 d CNV 区域 CD31 与 $\beta 3$ 的共表达定位。CD31 呈绿色荧光, $\beta 3$ 表达呈红色荧光,两者共表达区域呈黄色荧光。A:对照组;B: SDF-1 组;C: SDF-1 + AMD3100 组;D:SDF-1 + SB273005 组

图2 Western blot 法检测整合素亚基 αv 、 $\beta 3$ 蛋白表达

图4 OCT 检测小鼠 CNV 诱导后 7 d RPE 层厚度。A:对照组;B:SDF-1 组;C:SDF-1 + AMD3100 组;D:SDF-1 + SB273005 组

3 讨论

CNV 是多种眼部疾病的共同病理特征,可导致

视力丧失^[9]。因此,抑制新生血管形成在治疗脉络膜疾病等相关性眼病方面具有重要的作用。CNV 的病理变化涉及多种细胞、细胞因子和信号转导通路,

图5 Transwell 检测4组内皮细胞的迁移能力。A:对照组;B:SDF-1组;C:SDF-1 + AMD3100组;D:SDF-1 + SB273005组

并与组织局部缺血、缺氧或炎症等密切相关。其中,血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)或 SDF-1 等细胞因子通过复杂的信号转导参与内皮细胞增殖、分化、募集并迁移到 CNV 处^[10-11]。Cai 等^[10]证实 SDF-1 能够促进缺血性视网膜病变中内皮细胞的趋化作用,并参与激光诱导小鼠 CNV。缺氧条件下 RPE 细胞培养上清液中可见高水平的 SDF-1^[4]。此外,在视网膜和脉络膜层中检测到高水平的 SDF-1。在 SDF-1 上调的同时,其特异性受体 CXCR4 在 CNV 的内皮细胞中表达升高。本研究同样证明:在激光诱导的小鼠 CNV 模型中,视网膜脉络膜组织中 CXCR4 mRNA 在激光诱发 CNV 后随时间的延长,表达开始升高,到 CNV 3 d 表达量最高,随后开始下降。提示 CXCR4 参与小鼠 CNV 的发生,并在 CNV 发展的早期就起到重要的作用。这与 Maddirela 等^[12]的报道结果一致。

SDF-1 和 CXCR4 之间的相互作用调节了内皮动员、靶向性迁移、募集和分化的整个过程。作为内皮细胞上的主要趋化因子受体,表达 CXCR4 的细胞会遵循 SDF-1 浓度梯度做定向迁移。既往还有研究显示^[13-14]:年龄相关性黄斑变性患者的 CNV 膜中表达 $\alpha v\beta 3$,糖尿病视网膜病变患者的视网膜前膜中存在 $\alpha v\beta 3$ 和 $\alpha v\beta 5$,眼组织胞浆菌病综合征患者 CNV 膜中表达 $\alpha v\beta 3$ 。整合素在成熟的眼部血管中并不存在,但在活化的内皮细胞中选择性表达。整合素亚基 $\beta 3$ 通过与纤连蛋白结合介导细胞与细胞外基质的黏附,这可能有助于 SDF-1/CXCR4 募集过程中的管腔的形成。本研究还证实了 SDF-1/CXCR4 轴对 CNV 的影响,并观察到 SDF-1/CXCR4 和黏附因子在 CNV 中的作用。本研究发现:在小鼠 CNV 发展过程中, $\beta 3$ 整合素亚基表达增加,其变化趋势与 CXCR4 相似,而 αv 亚基表达则无明显变化。提示 $\beta 3$ 整合素亚基可能与 CXCR4 相互作用,影响 CNV 的发生发展。

体内免疫荧光染色激光共表达定位中显示:激光诱导的小鼠 CNV 模型中,整合素亚基 $\beta 3$ 在 CNV 局部内皮细胞上高表达。且小鼠玻璃体内注射 SDF-1 后 7 d,内皮细胞上表达的 $\beta 3$ 亚基明显升高,促进更多的内皮细胞迁移至 CNV 区域。提示整合素亚

基 $\beta 3$ 上调来源于内皮细胞。OCT 显示:CNV 的病变加重,而小鼠 CNV 后玻璃体内注射 CXCR4 功能性抑制剂 AMD3100 或整合素 $\alpha v\beta 3$ 的抑制剂 SB273005 后 7 d,内皮细胞上表达的 $\beta 3$ 亚基减少,迁移至 CNV 局部的内皮细胞减少,CNV 的病变减轻。提示 AMD3100 或 SB273005 可以抑制由 SDF-1 介导的内皮细胞上 $\beta 3$ 的表达,从而减轻 CNV 病变。这与 Loomans 等^[15]研究认为骨髓来源的血管内皮祖细胞向炎性细胞分化增多,而向血管细胞分化减少不完全一致,可能由于 Loomans 等^[15]的研究为体外实验,并且仅比较了糖尿病小鼠和正常小鼠之间血管内皮祖细胞的差异,并未涉及 CNV 小鼠或 SDF-1 和整合素等上调促进血管内皮祖细胞向血管内皮细胞分化的因素。本研究体外实验中 Western blot 和细胞迁移实验均显示:加入 SDF-1,整合素亚基 $\beta 3$ 表达增加,而 CXCR4 的特异性 SiRNA、功能性阻断剂 AMD3100 和整合素抑制剂 SB273005 均可有效抑制整合素亚基 $\beta 3$ 的表达和内皮细胞的迁移能力。提示在 RF/6A 细胞中,SDF-1/CXCR4 可以上调整合素亚基 $\beta 3$ 的表达。抑制 SDF-1/CXCR4 信号传导以及下游的整合素亚基 $\beta 3$ 的表达,则可以显著抑制内皮细胞的迁移。这可能成为 CNV 治疗的替代选择。SDF-1/CXCR4 与黏附分子之间的关联仅在肾癌和前列腺癌等肿瘤细胞的研究中被报道过^[16-17],而本研究发现提供了趋化因子受体和整合素在 CNV 发病机制中的相互关联。

综上所述,本研究显示小鼠 CNV 中内皮细胞表达的整合素 $\alpha v\beta 3$ 被 SDF-1/CXCR4 信号激发后升高。CXCR4 或整合素 $\alpha v\beta 3$ 的抑制剂降低了内皮细胞的迁移,并最终减轻了 CNV 病变的严重程度,为 CNV 发生的又一危险因素提供了佐证,从而找到一个新的、更高效的分子靶点,实现对 CNV 的多角度治疗,也为临床工作提供了新的理论依据。

参考文献

[1] GAO X, WANG Y, HOU HY, LYU Y, WANG HY, YAO LB, et al. *In vivo* bioluminescence imaging of hyperglycemia exacerbating stem cells on choroidal neovascularization in mice[J]. *Int J Ophthalmol*, 2016, 9(4):519-527.

[2] SCHNABOLK G, PARSONS N, OBERT E, ANNAMALAI B, NASARRE C, TOMLINSON S, et al. Delivery of CR2-fH using

AAV vector therapy as treatment strategy in the mouse model of choroidal neovascularization[J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2018, 9:1-11.

[3] HU GJ, FENG YG, LU WP, LI HT, XIE HW, LI SF. Effect of combined VEGF165/SDF-1 gene therapy on vascular remodeling and blood perfusion in cerebral ischemia[J]. *J Neurosurg*, 2017, 127(3):670-678.

[4] WANG W, HA C, LIN T, WANG D, WANG Y, GONG M. Celastrol attenuates pain and cartilage damage via SDF-1/CXCR4 signalling pathway in osteoarthritis rats[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2018, 70(1):81-88.

[5] LI H, CHEN Y, XU N, YU M, TU X, CHEN Z, et al. AMD3100 inhibits brain-specific metastasis in lung cancer via suppressing the SDF-1/CXCR4 axis and protecting blood-brain barrier[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(12):5259-5274.

[6] LAI T, FONG Y, FU W, YANG R, TANG C. Stromal cell-derived factor-1 increase $\alpha v \beta 3$ integrin expression and invasion in human chondrosarcoma cells[J]. *J Cell Physiol*, 2009, 218(2):334-342.

[7] SHI Y, WANG Y, ZHANG Z, CAI Y, ZHOU J, HOU H, et al. Monocyte/macrophages promote vasculogenesis in choroidal neovascularization in mice by stimulating SDF-1 expression in RPE cells[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2011, 249(11):1667-1679.

[8] HOU H, WANG Y, XU J, WANG B. Nicotine promotes contribution of bone marrow-derived cells to experimental choroidal neovascularization in mice[J]. *Exp Eye Res*, 2008, 86(6):983-990.

[9] HOU H, LIANG H, WANG Y. Bone marrow-derived cells in neovascular age-related macular degeneration: contribution and potential application[J]. *Ophthalmic Res*, 2011, 45(1):1-4.

[10] CAI Y, LI X, WANG Y, SHI Y, YE Z, YANG G, et al. Hyperglycemia promotes vasculogenesis in choroidal neovascularization in diabetic mice by stimulating VEGF and SDF-1 expression in retinal pigment epithelial cells[J]. *Exp Eye Res*, 2014, 123(1):87-96.

[11] ZHANG ZX, WANG YS, SHI YY, HOU HY, ZHANG C, CAI Y, et al. Hypoxia specific SDF-1 expression by retinal pigment epithelium initiates bone marrow-derived cells to participate in choroidal neovascularization in a laser-induced mouse model[J]. *Curr Eye Res*, 2011, 36(9):838-849.

[12] MADDIRELA DR, KESANAKURTI D, GUJRATI M, RAO JS. MMP-2 suppression abrogates irradiation-induced microtubule formation in endothelial cells by inhibiting alphavbeta3-mediated SDF-1/CXCR4 signaling[J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(4):1279-1288.

[13] HONDA S, NAGAI T, NEGI A. Anti-angiogenic effects of non-peptide integrin alphavbeta3 specific antagonist on laser-induced choroidal neovascularization in mice[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2009, 247(4):515-522.

[14] TANG R, LONG J, CHEN B. Expression of integrin alphavbeta3, tissue factor, and vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization[J]. *J Centr S Univ(Med Sci)*, 2009, 34(8):762-767.

[15] LOOMANS CJ, VAN HAPEREN R, DUJLS JM, VERSEYDEN C, DE CROM R, LEENEN PJ, et al. Differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells is shifted into a proinflammatory phenotype by hyperglycemia[J]. *Mol Med*, 2009, 15(5-6):152-159.

[16] ENGL T, RELJA B, MARIAN D, BLUMENBERG C, MULLER I, BEECKEN WD, et al. CXCR4 chemokine receptor mediates prostate tumor cell adhesion through alpha5 and beta3 integrins[J]. *Neoplasia*, 2006, 8(4):290-301.

[17] JONES J, MARIAN D, WEICH E, ENGL T, WEDEL S, RELJA B, et al. CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells[J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(19):4051-4065.

关于我刊文后参考文献引用和著录新标准的说明

为了正确执行国家标准 GB/T 7714-2015《信息与文献 参考文献著录规则》，自 2016 年 1 月起，我刊文后参考文献的引用和著录执行以下新标准。

1 不同文献类型的引用和著录格式

1.1 阅读型参考文献(reading reference) 著者为撰写或编辑论著而阅读过的信息资源，或供读者进一步阅读的信息资源。著录时需要标注文章的起始页。

1.2 引文参考文献(cited reference) 著者为撰写或编辑论著而引用的信息资源。页码只需著录引用信息所在页。

著录格式示例如下：

阅读型参考文献：邵毅，余静，余瑶，高桂平，杨继玲，裴重刚，等. 无缝线骨髓间充质干细胞羊膜移植预防角膜缘干细胞缺乏的实验研究[J]. *眼科新进展*, 2013, 33(11):1011-1015.

SHAO Y, YU J, YU Y, GAO GP, YANG JL, PEI ZG, et al. Novel sutureless bone marrow mesenchymal stem cells with amniotic membrane transplantation for corneal limbus stem cells defect in rabbit model[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2013, 33(11):1011-1015.

引文参考文献：杨秀梅，王雨生. MEK/ERK 参与大鼠脉络膜新生血管基质金属蛋白酶-2 和基质金属蛋白酶-9 的表达调控[J]. *眼科新进展*, 2015, 25(6):504.

YANG XM, WANG YS. Contribution of MEK/ERK pathway

in regulation of MMP-2 and MMP-9 expression in rat choroidal neovascularization[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2015, 25(6):504.

2 著者的著录新规则

著者的著录时要求其姓全部著录，字母全大写，名可缩写为首字母，缩写名后省略缩写点。

著录格式示例如下：

[1] COOKE CA, LUM DJ, WHEELDON CE, TEOH H, MCGHEE CN. Surgical approach, histopathology, and pathogenesis in cataract associated with true lens exfoliation[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2007, 33(4):735-738.

3 标识符号

论文正文和文献表中的序号均要使用“[]”括起，正文中连续序号和文献表中连续页码间用短横线连接。

需要注意的是，国家新标准新增了 4 个文献类型及其标识：(1) 档案，A：分类保存以备查考的文件和材料，如人事档案、科技档案、法律法规、政府文件等。(2) 舆图，CM：世界、国家、区域的地图。(3) 数据集，DS：一种由数据所组成的集合，又称为资料集、数据集或资料集合。(4) 其他，Z：凡是归不进前面 15 个类型的文献，均可放到“Z”中。

本刊编辑部