

引文格式:肇莉莉,王萍,孙连义,马为梅,张乐,喻磊. HTRA3 基因对脉络膜新生血管和 M2 型巨噬细胞极化的影响 [J]. 眼科新进展, 2024, 44(4): 275-281. doi:10.13389/j.cnki.rao.2024.0054

【实验研究】

# HTRA3 基因对脉络膜新生血管和 M2 型巨噬细胞极化的影响<sup>△</sup>

肇莉莉 王萍 孙连义 马为梅 张乐 喻磊

**【摘要】** 目的 探讨 HtraA 丝氨酸蛋白酶 3 (HTRA3) 基因对脉络膜新生血管 (CNV) 和 M2 型巨噬细胞极化的影响。方法 收集 30 例湿性年龄相关性黄斑变性 (wAMD) 患者 (wAMD 组) 和 30 例同期健康体检者 (健康组) 的空腹静脉血, 通过 qRT-PCR 检测血清 HTRA3 mRNA 水平。将 RF/6A 细胞随机分为对照组、NC-sh 组和 HTRA3-sh 组, 使用 Lipofectamine2000 将 NC-shRNA 和 HTRA3-shRNA 慢病毒载体分别转染到 NC-sh 组和 HTRA3-sh 组 RF/6A 细胞中, 通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 HTRA3 的转染情况。将 RF/6A 细胞随机分为 N 组、H 组、H + NC-sh 组和 H + HTRA3-sh 组, 细胞转染后, N 组 RF/6A 细胞在完全 RPMI 1640 培养基中进行常氧培养, 其他组细胞在添加 200 mmol · L<sup>-1</sup> 氯化钴 (CoCl<sub>2</sub>) 的 RPMI 1640 培养基中进行低氧培养, 使用 Matrigel 测定小管形成。将 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、CNV 组、CNV + NC-sh 组和 CNV + HTRA3-sh 组, 每组 12 只。对照组为未建模的小鼠, 其他组为激光诱导的 CNV 模型小鼠。向 CNV + NC-sh 组和 CNV + HTRA3-sh 组小鼠玻璃体内分别注射 1 μL 滴度为 1 × 10<sup>11</sup> TU · mL<sup>-1</sup> 的 NC-shRNA 和 HTRA3-shRNA 慢病毒载体。对照组和 CNV 组小鼠注射 PBS。注射后 7 d, 对小鼠进行荧光素眼底血管造影 (FFA) 检测和眼球苏木精伊红 (HE) 染色。通过 qRT-PCR 检测 RF/6A 细胞或各组小鼠脉络膜组织中 HTRA3、类几丁质酶 3 样蛋白 3 (Ym-1)、精氨酸酶 1 (Arg-1)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧合酶-2 (COX-2) 和血管内皮生长因子 (VEGF) mRNA 水平。通过 Western blot 检测 RF/6A 细胞或脉络膜组织中 HTRA3、VEGF 和细胞核因子 κB (NF-κB) p65 的蛋白表达水平。结果 与健康组比较, wAMD 组患者的血清 HTRA3 mRNA 水平升高 ( $t = 11.804, P < 0.001$ )。与对照组和 NC-sh 组比较, HTRA3-sh 组 RF/6A 细胞的 HTRA3 mRNA 和蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。与 N 组比较, H 组 RF/6A 细胞的闭合管腔数量、HTRA3 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达水平均增加 (均为  $P < 0.05$ )。与 H + NC-sh 组比较, H + HTRA3-sh 组 RF/6A 细胞的闭合管腔数量、HTRA3 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达水平均减少 (均为  $P < 0.05$ )。与对照组比较, CNV 组小鼠的 HTRA3 的 mRNA 和蛋白表达水平增加, CNV 相对荧光强度升高, Ym-1 和 Arg-1 mRNA 水平升高, iNOS 和 COX-2 mRNA 水平降低, 细胞核 NF-κB p65 蛋白表达水平升高 (均为  $P < 0.05$ )。与 CNV + NC-sh 组比较, CNV + HTRA3-sh 组小鼠的 HTRA3 的 mRNA 和蛋白表达水平减少, CNV 相对荧光强度降低, Ym-1 和 Arg-1 mRNA 水平降低, iNOS 和 COX-2 mRNA 水平升高, 细胞核 NF-κB p65 蛋白表达水平降低 (均为  $P < 0.05$ )。结论 下调 HTRA3 可抑制 CNV 形成和 M2 型巨噬细胞极化, HTRA3 可能是防治 wAMD 的重要潜在靶点。

**【关键词】** 湿性年龄相关性黄斑变性; 脉络膜新生血管; HtraA 丝氨酸蛋白酶 3; M2 型巨噬细胞极化

**【中图分类号】** R774.5

湿性年龄相关性黄斑变性 (wAMD) 是一种累及视网膜黄斑区的眼病之一, 在老年人群中具有较高的发病率<sup>[1-2]</sup>。脉络膜新生血管 (CNV) 是 wAMD 的典型病变, 也是导致患者视力丧失的主要原因<sup>[3]</sup>。目前, 虽然玻璃体内注射血管内皮生长因子 (VEGF) 抑制剂在治疗 wAMD 方面取得了一定疗效<sup>[4]</sup>, 然而, 抗 VEGF 药物存在耐药性问题<sup>[5]</sup>, 并且会引起眼压升高<sup>[6]</sup>、眼部感染<sup>[7]</sup> 等并发症, 因此, 仍需要开发 AMD 的新型治疗手段。免疫微环境失衡是导致 wAMD 的始发因素, wAMD 病变部位出现大量巨噬细胞浸润, 这些巨噬细胞通过分泌 VEGF 和炎症因子促进血管内皮细胞增殖并引起新生血管渗漏, 导致 wAMD 形成<sup>[8]</sup>。巨噬细胞具有可塑性, 可极化为 M1 和 M2 型, 其中 M2 型极化可导致脉络膜血管形成<sup>[9-10]</sup>。因此, 调控巨噬细胞表型是治疗 wAMD 的有效途径。HtraA 丝氨酸蛋白酶 3 (HTRA3) 是 2003 年

首次报道的一个蛋白质编码基因, 位于染色体 4p16.1 上<sup>[11]</sup>。HTRA3 与 HTRA1 类似, 都能抑制转化生长因子-β 家族蛋白介导的信号通路<sup>[12]</sup>。据报道, HTRA1 基因启动子里的一个单核苷酸多态性与 AMD 有关联, 含有 HTRA1 多态性的人群发生 AMD 的危险度比正常人高 10 倍<sup>[13-14]</sup>。HTRA3 在 AMD 小鼠视网膜中表达升高, 提示 HTRA3 很可能参与 AMD 病变的进展<sup>[15]</sup>。另外, HTRA3 可能调节免疫细胞功能<sup>[16]</sup>。本研究旨在揭示 HTRA3 基因对 CNV 和 M2 型巨噬细胞极化的影响, 从而开发 AMD 的新型治疗靶标。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验试剂

慢病毒载体由吉玛基因合成。RPMI 1640 培养

基(货号:22400105)购自美国 Gibco 公司。氯化钴( $\text{CoCl}_2$ )(货号:C8661)购自美国 Sigma 公司。Lipofectamine2000(货号:11668027)购自美国 Invitrogen 公司。Matrigel(货号:356234)购自美国 BD Biosciences 公司。苏木精伊红(HE)染色试剂盒(货号:C0105S)、TRIzol(货号:R0016)、RIPA 裂解液(货号:P0013B)、ECL 试剂盒(货号:P0018S)购自碧云天生物技术研究所。荧光素钠(货号:A833)购自美国 Thermo Fisher 公司。Prime Script RT Master Mix 试剂盒(货号:RR036A)购自日本 TaKaRa 公司。SYBR Green Master Mix(货号:4367659)购自美国 ABI 公司。HTRA3(货号:ab227463)、VEGFA(货号:ab46154)、核因子  $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )p65(货号:ab288751)、Lamin B(货号:ab32535)和  $\beta$ -actin(货号:ab8226)一抗以及 HRP 标记的 IgG 二抗(货号:ab205718)购自英国 Abcam 公司。

### 1.1.2 实验细胞和动物

恒河猴脉络膜血管内皮细胞系(RF/6A)购自美国 ATCC。60 只 SPF 级雄性老龄 C57BL/6J 小鼠(18~20 个月龄,体重 35~40 g)由西北大学提供[SYXK(陕)2021-004]。小鼠在 25 °C、55% 相对湿度、12 h 循环照明环境中使用标准小鼠饲料和纯净水饲养。

## 1.2 方法

### 1.2.1 血清样本收集

2019 年 1 月至 2022 年 8 月期间,收集西安市人民医院(西安市第四医院)就诊的 30 例 wAMD 患者为 wAMD 组,其中男 16 例,女 14 例,年龄 51~78 (68.81 $\pm$ 6.09)岁,参考 wAMD 国际诊断标准<sup>[17]</sup>对患者进行诊断。剔除伴有其他视网膜疾病、恶性肿瘤、心脑血管系统疾病、器官病变及接受治疗的 wAMD 患者。收集同期来院体检的健康者 30 例为健康组,其中男 15 例,女 15 例,年龄 53~81 (70.43 $\pm$ 6.42)岁。健康组与 wAMD 组受试者的年龄、性别比例相比,差异均无统计学意义(均为  $P > 0.05$ )。收集两组受试者的空腹静脉血,qRT-PCR 检测血清 HTRA3 mRNA 水平。本研究通过西安市人民医院(西安市第四医院)伦理委员会审批(审批号:201901170025),受试者均知情同意。

### 1.2.2 细胞培养与转染处理

将 RF/6A 细胞培养在添加体积分数 10% 胎牛血清和 10 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>双抗的 RPMI 1640 培养基中,置于 37 °C 和含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。细胞生长至对数期后用于实验。将 RF/6A 细胞随机分为对照组、NC-sh 组和 HTRA3-sh 组,6 孔板中接种 RF/6A 细胞并培养至 80% 融合,按照试剂盒说明,使用 Lipofectamine2000 将 NC-shRNA 和 HTRA3-shRNA 慢病毒载体分别转染到 NC-sh 组和 HTRA3-sh 组 RF/6A 细胞。对照组细胞不进行转染。转染 48 h 后,通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 HTRA3

的转染效率。每组设置 6 个复孔。

### 1.2.3 细胞分组及处理

验证 HTRA3 转染效率后,将 RF/6A 细胞随机分为 N 组、H 组、H + NC-sh 组和 H + HTRA3-sh 组。其中,H + NC-sh 组和 H + HTRA3-sh 组细胞分别转染 NC-shRNA 和 HTRA3-shRNA;N 组 RF/6A 细胞在完全 RPMI 1640 培养基中进行常氧培养,其他组细胞在添加 200 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub> 的 RPMI 1640 培养基中进行低氧培养。每组设置 6 个复孔。

### 1.2.4 小管形成测定

使用 Matrigel(每孔 80  $\mu\text{L}$ )包被 96 孔板,室温静置 30 min,加入 1.2.3 分组处理后的细胞 30  $\mu\text{L}$ (每孔  $5 \times 10^4$  个 RF/6A 细胞),培养 6 h 后在显微镜下观察小管形成情况,Image-Pro Plus 6.0 软件计算闭合管腔数量。每组设置 6 个复孔。

### 1.2.5 激光诱导 CNV 小鼠模型

使用复方托吡酰胺滴眼液对小鼠进行散瞳,10 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>苯巴比妥钠经腹腔注射麻醉小鼠(10 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)。围绕视盘用氩激光(激光波长 350 nm,输出功率 350 mW,曝光时间 0.1 s,光斑直径 75  $\mu\text{m}$ )对小鼠双眼发射四个激光点。光凝后有白色气泡产生证实 Bruch 膜破裂,表明建模成功。

### 1.2.6 动物分组及处理

将小鼠随机分为对照组、CNV 组、CNV + NC-sh 组和 CNV + HTRA3-sh 组,每组 12 只。对照组为未建模的小鼠,其他组为 CNV 建模成功的小鼠。使用盐酸奥布卡因进行表面麻醉,然后使用 30G 穿刺针头向 CNV + NC-sh 组和 CNV + HTRA3-sh 组小鼠玻璃体内分别注射 1  $\mu\text{L}$ 滴度为  $1 \times 10^{11}$  TU $\cdot$ mL<sup>-1</sup>的 NC-shRNA 和 HTRA3-shRNA 慢病毒载体,对照组和 CNV 组小鼠玻璃体内注射 PBS,均为双眼注射。注射后给予左氧氟沙星滴眼液抗感染。

### 1.2.7 荧光素眼底血管造影

注射后 7 d,所有小鼠均行荧光素眼底血管造影(FFA)检查。使用复方托吡酰胺滴眼液对各组小鼠进行散瞳,10 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>苯巴比妥钠经腹腔注射麻醉小鼠(10 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup>)。然后经腹腔注射 0.05 mL 100 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>荧光素钠,2~3 min 后拍摄眼底照片,在 480 nm 激发光和 525 nm 发射光下使用滤光片获取图像。使用 ImageJ 软件计算 CNV 的平均荧光强度。

### 1.2.8 样本收集

所有小鼠 FFA 检查结束后处死,摘取双眼眼球,取双眼中任意一只眼球行 40 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>多聚甲醛固定,用于 HE 染色;另一只眼球在显微镜下冰上小心去除结缔组织和肌肉,去除眼前节,分离出脉络膜组织,与生理盐水混合并研磨匀浆,用于 qRT-PCR 和 Western blot 检测。

### 1.2.9 眼球 HE 染色

40 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>多聚甲醛固定眼球 24 h。常规制成 4  $\mu\text{m}$  厚的石蜡切片,根据试剂盒说明进行 HE 染色。

### 1.2.10 qRT-PCR 检测

通过 qRT-PCR 检测 wAMD 患者和健康体检者的血清中 HTRA3 mRNA 水平,并检测 RF/6A 细胞或各组小鼠脉络膜组织中 HTRA3、类几丁质酶 3 样蛋白 3(Ym-1)、精氨酸酶 1(Arg-1)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧化酶-2(COX-2)和 VEGFA mRNA 水平。TRIzol 试剂提取总 RNA。使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,然后在 ABI Prism 7900HT 型荧光定量 PCR 仪上使用 SYBR Green Master Mix 进行扩增。扩增程序:95 °C 30 s,95 °C 5 s、60 °C 30 s,循环 40 次。引物序列见表 1。GAPDH 为内参基因。通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因相对表达量。

表 1 引物序列

基因	引物序列
HTRA3	F:5'-ACAAGCATGTGAAAGCCCTCT-3' R:5'-GTCTTGGCTGTACTGGGGTC-3'
Ym-1	F:5'-TGTCCCTAATGACAGCTCCTT-3' R:5'-GCATCCACCCAATGACACAT-3'
Arg-1	F:5'-TGTCCCTAATGACAGCTCCTT-3' R:5'-GCATCCACCCAATGACACAT-3'
iNOS	F:5'-CGGCAAACATGACTTCAGGC-3' R:5'-GCATCAAAGCGGGCATAG-3'
COX-2	F:5'-TCAAGTCCCTGAGCATCTAC-3' R:5'-CATTCTACCACCAGCAACC-3'
VEGFA	F:5'-GCATAGAGAGAATGAGCTTCC-3' R:5'-CTCCGCTCTGAACAAGGCT-3'
GAPDH	F:5'-CACCATCTTCCAGGAGCGAG-3' R:5'-GGGGCCATCCACAGTCTTC-3'

### 1.2.11 Western blot 检测

通过 RIPA 裂解液提取 RF/6A 细胞或小鼠脉络膜组织总蛋白,然后在  $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  SDS-PAGE 上分离蛋白并转移到 PVDF 膜上, $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  脱脂牛奶室温封闭 30 min。然后与 1:5 000 稀释的 HTRA3、VEGFA、NF- $\kappa$ B p65、Lamin B 和  $\beta$ -actin 一抗在 4 °C 下孵育过夜。然后将膜与 1:5 000 稀释的 HRP 标记的 IgG 二抗在室温下孵育 2 h。ECL 显影,ImageJ 软件测定条带灰度值。Lamin B 作为核蛋白内参, $\beta$ -actin 作为总蛋白内参。

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件行统计分析,定量数据采用均数  $\pm$  标准差表示。组间差异比较采用 *t* 检验或单向方差分析。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 wAMD 患者和健康体检者的血清 HTRA3 mRNA 水平

与健康组( $1.00 \pm 0.33$ )比较,wAMD 组患者的血清中 HTRA3 mRNA 水平( $2.41 \pm 0.57$ )升高,差异有统计学意义( $t=11.804, P<0.001$ )。

### 2.2 下调 HTRA3 抑制缺氧诱导的 RF/6A 细胞小管形成

RF/6A 细胞转染后,与对照组和 NC-sh 组比较,HTRA3-sh 组 RF/6A 细胞的 HTRA3 mRNA 和蛋白表达水平均降低(均为  $P<0.05$ )(表 2 和图 1)。缺氧处理后,与 N 组比较,H 组 RF/6A 细胞的闭合管腔数量、HTRA3 和 VEGFA 的 mRNA 和蛋白表达水平均增加(均为  $P<0.05$ );与 H + NC-sh 组比较,H + HTRA3-sh 组 RF/6A 细胞的闭合管腔数量、HTRA3 和 VEGFA 的 mRNA 和蛋白表达水平均减少(均为  $P<0.05$ );H 组与 H + NC-sh 组 RF/6A 细胞的闭合管腔数量、HTRA3 和 VEGFA 的 mRNA 和蛋白表达水平相比,差异均无统计学意义(均为  $P>0.05$ )(表 3、图 2、表 4 和图 3)。

表 2 各组 RF/6A 细胞的 HTRA3 mRNA 和蛋白相对表达量

组别	HTRA3 mRNA	HTRA3 蛋白
对照组	$1.00 \pm 0.04$	$1.00 \pm 0.03$
NC-sh 组	$1.03 \pm 0.04$	$1.01 \pm 0.01$
HTRA3-sh 组	$0.27 \pm 0.03^{**}$	$0.25 \pm 0.03^{**}$
<i>F</i>	722.638	1591.733
<i>P</i>	$<0.001$	$<0.001$

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ;与 NC-sh 组比较,# $P<0.05$ 。

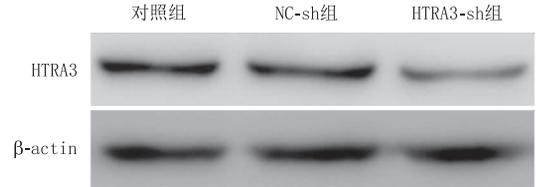


图 1 Western blot 检测各组 RF/6A 细胞 HTRA3 蛋白表达

表 3 各组 RF/6A 细胞 HTRA3 mRNA 和蛋白相对表达量

组别	HTRA3 mRNA	HTRA3 蛋白
N 组	$1.00 \pm 0.04$	$1.00 \pm 0.05$
H 组	$3.22 \pm 0.39^*$	$3.10 \pm 0.12^*$
H + NC-sh 组	$3.32 \pm 0.24^*$	$2.86 \pm 0.26^*$
H + HTRA3-sh 组	$0.70 \pm 0.06^{**\&}$	$0.68 \pm 0.07^{**\&}$
<i>F</i>	221.026	406.357
<i>P</i>	$<0.001$	$<0.001$

注:与 N 组比较,\* $P<0.05$ ;与 H 组比较,# $P<0.05$ ;与 H + NC-sh 组比较,& $P<0.05$ 。

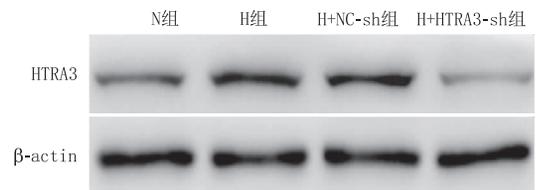
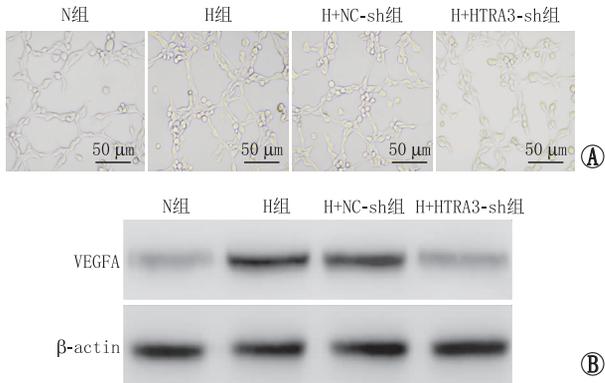


图 2 Western blot 检测各组 RF/6A 细胞 HTRA3 蛋白表达

**表 4 各组 RF/6A 细胞的闭合管腔数量、VEGFA mRNA 和蛋白相对表达量**

组别	闭合管腔数量/个	VEGFA mRNA	VEGFA 蛋白
N 组	5.56 ± 0.49	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.05
H 组	22.27 ± 2.00*	4.07 ± 0.47*	3.89 ± 0.31*
H + NC-sh 组	21.30 ± 2.30*	4.00 ± 0.23*	4.06 ± 0.25*
H + HTRA3-sh 组	14.15 ± 1.29* <sup>#</sup> &	1.67 ± 0.13* <sup>#</sup> &	1.42 ± 0.18* <sup>#</sup> &
<i>F</i>	128.182	207.531	326.709
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 N 组比较,\**P* < 0.05;与 H 组比较,<sup>#</sup>*P* < 0.05;与 H + NC-sh 组比较,<sup>&</sup>*P* < 0.05。



A: 各组 RF/6A 细胞的小管形成图;B: 各组 RF/6A 细胞的 VEGFA 蛋白条带。

**图 3 下调 HTRA3 对缺氧诱导的 RF/6A 细胞小管形成和 VEGFA 蛋白表达的影响**

### 2.3 下调 HTRA3 抑制 CNV 小鼠脉络膜血管生成

与对照组比较,CNV 组小鼠的 HTRA3 mRNA 和蛋白表达水平均增加(均为 *P* < 0.05);与 CNV + NC-sh 组比较,CNV + HTRA3-sh 组小鼠的 HTRA3 mRNA 和蛋白表达水平均减少(均为 *P* < 0.05);CNV 组与 CNV + NC-sh 组小鼠的 HTRA3 mRNA 和蛋白表达水平相比,差异均无统计学意义(均为 *P* > 0.05)(表 5 和图 4)。对照组小鼠脉络膜形态正常;CNV 组和 CNV + NC-sh 组小鼠脉络膜结构紊乱,脉络膜增生,Bruch 膜破裂,血管生成增加;CNV + HTRA3-sh 组小鼠脉络膜病变减轻,脉络膜增生和血管生成减少(图 5)。与对照组比较,CNV 组小鼠的 CNV 相对荧光强度升高(*P* < 0.05);与 CNV + NC-sh 组比较,CNV + HTRA3-sh 组小鼠的 CNV 相对荧光强度降低(*P* < 0.05);CNV 组与 CNV + NC-sh 组小鼠的 CNV 相对荧光强度相比,差异无统计学意义(*P* > 0.05)(表 5 和图 5)。

### 2.4 下调 HTRA3 对 CNV 小鼠脉络膜组织中巨噬细胞极化的影响

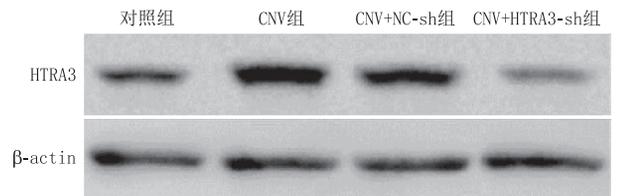
与对照组比较,CNV 组小鼠脉络膜组织中 M2 型巨噬细胞标志物 Ym-1 和 Arg-1 mRNA 水平升高,M1 型巨噬细胞标志物 iNOS 和 COX-2 mRNA 水平降低(均为 *P* < 0.05);与 CNV + NC-sh 组比较,CNV + HTRA3-sh 组小鼠脉络膜组织中 Ym-1 和 Arg-1 mRNA

水平降低,iNOS 和 COX-2 mRNA 水平升高(均为 *P* < 0.05);CNV 组与 CNV + NC-sh 组小鼠脉络膜组织中 Ym-1、Arg-1、iNOS 和 COX-2 mRNA 水平相比,差异均无统计学意义(均为 *P* > 0.05)(表 6)。

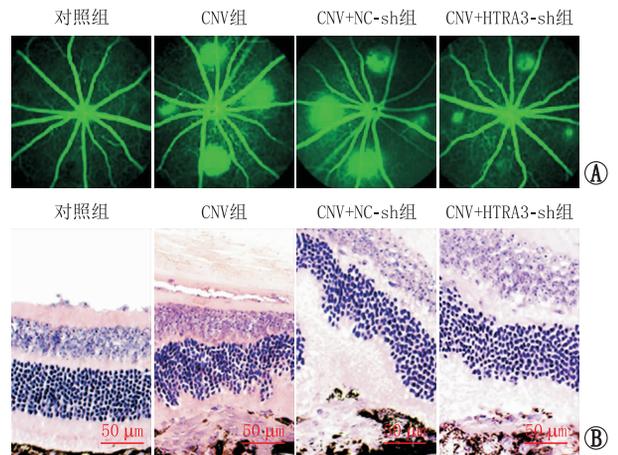
**表 5 各组小鼠脉络膜组织中的 HTRA3 mRNA 和蛋白相对表达量以及 CNV 相对荧光强度**

组别	HTRA3 mRNA	HTRA3 蛋白	CNV 相对荧光强度
对照组	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.05
CNV 组	3.49 ± 0.43*	3.22 ± 0.19*	3.41 ± 0.36*
CNV + NC-sh 组	3.50 ± 0.39*	3.21 ± 0.49*	3.31 ± 0.28*
CNV + HTRA3-sh 组	0.84 ± 0.09* <sup>#</sup> &	0.50 ± 0.05* <sup>#</sup> &	1.72 ± 0.16* <sup>#</sup> &
<i>F</i>	303.094	357.802	295.811
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,\**P* < 0.05;与 CNV 组比较,<sup>#</sup>*P* < 0.05;与 CNV + NC-sh 组比较,<sup>&</sup>*P* < 0.05。



**图 4 Western blot 检测各组小鼠脉络膜组织中 HTRA3 蛋白表达**



A: FFA 图;B: HE 染色图。

**图 5 下调 HTRA3 对 CNV 小鼠脉络膜血管生成的影响**

**表 6 各组小鼠脉络膜组织中 Ym-1、Arg-1、iNOS 和 COX-2 的 mRNA 相对表达量**

组别	Ym-1 mRNA	Arg-1 mRNA	iNOS mRNA	COX-2 mRNA
对照组	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.05
CNV 组	4.05 ± 0.35*	3.18 ± 0.26*	0.49 ± 0.04*	0.42 ± 0.04*
CNV + NC-sh 组	3.55 ± 0.34*	3.32 ± 0.26*	0.48 ± 0.04*	0.43 ± 0.04*
CNV + HTRA3-sh 组	1.47 ± 0.13* <sup>#</sup> &	1.53 ± 0.15* <sup>#</sup> &	0.78 ± 0.05* <sup>#</sup> &	0.73 ± 0.06* <sup>#</sup> &
<i>F</i>	420.897	402.530	259.795	439.834
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,\**P* < 0.05;与 CNV 组比较,<sup>#</sup>*P* < 0.05;与 CNV + NC-sh 组比较,<sup>&</sup>*P* < 0.05。

## 2.5 下调 HTRA3 对 CNV 小鼠脉络膜组织 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

对照组、CNV 组、CNV + NC-sh 组和 CNV + HTRA3-sh 组小鼠脉络膜组织中的细胞核 NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达量依次为  $1.00 \pm 0.05$ 、 $3.41 \pm 0.27$ 、 $3.39 \pm 0.35$ 、 $1.87 \pm 0.11$  ( $F = 315.393$ ,  $P < 0.001$ )。与对照组比较, CNV 组小鼠的脉络膜组织中细胞核 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与 CNV + NC-sh 组比较, CNV + HTRA3-sh 组小鼠的脉络膜组织中细胞核 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$ ); CNV 组与 CNV + NC-sh 组小鼠脉络膜组织中细胞核 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 6)。

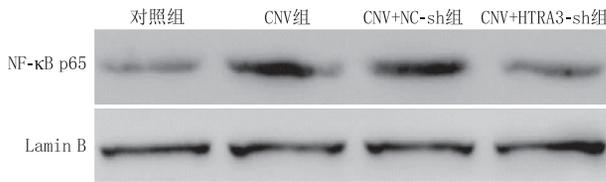


图 6 Western blot 检测各组小鼠脉络膜组织中的细胞核 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达

## 3 讨论

CNV 是 wAMD 患者视力丧失的主要原因, 虽然抗 VEGF 治疗可以抑制 CNV 形成, 但也可能引起多种并发症<sup>[6-7]</sup>, 因此, 仍需要开发新型 wAMD 治疗手段和治疗靶点。Htra 家族是一种热休克诱导的蛋白酶家族, 在进化过程中非常保守, 该家族成员不仅参与调节细胞存活、线粒体稳态、胎盘发育等多种生理功能, 而且参与癌症、神经退行性疾病、关节炎等多种病理过程的发生和发展<sup>[18]</sup>。目前, Htra 家族成员中 HTRA1 的研究较多。据报道, HTRA1 多态性与 AMD 的发生相关<sup>[13-14]</sup>。CNV 患者房水中的 HTRA1 水平高于白内障患者, 并且经雷珠单抗玻璃体内注射治疗后 HTRA1 水平降低<sup>[19]</sup>。HTRA-1 调节血管生成功能, HTRA-1 的升高与早产儿视网膜病变的发生风险相关<sup>[20]</sup>。然而, HTRA3 在 wAMD 中的研究较少。本研究观察到 wAMD 患者的血清 HTRA3 mRNA 水平较健康人明显升高, 提示 HTRA3 可能参与了 AMD 的发病过程。由于 HTRA3 与 HTRA1 具有高度同源性和结构相似性, 这两种酶在人体组织中的表达模式相似, 提示它们可能具有相似的生物学活性和互补的生理功能<sup>[12]</sup>。据报道, HTRA3 在 AMD 小鼠视网膜中表达升高<sup>[15]</sup>。

视网膜缺氧是 wAMD 的主要病因之一<sup>[21]</sup>, 缺氧可诱导 CNV 形成<sup>[22-23]</sup>。本研究通过转染 HTRA3-shRNA 慢病毒下调了 RF/6A 细胞中的 HTRA3, 然后对 RF/6A 细胞进行缺氧处理, 结果表明, 下调 HTRA3 抑制了缺氧诱导的 RF/6A 细胞小管形成, 并

下调了 VEGFA 的表达。另外, 激光诱导 CNV 是一种模拟了人类 wAMD 的动物建模方法<sup>[24]</sup>。本研究建立了激光诱导的 CNV 小鼠模型, 然后对小鼠玻璃体内注射 HTRA3-shRNA 慢病毒, 结果表明, 下调 HTRA3 减轻了 CNV 小鼠脉络膜病变, 抑制了血管生成和 CNV 生成。Nie 等<sup>[25]</sup>报道, HTRA3 是一种含有胰岛素样生长因子 (IGF) 结合结构域的新型丝氨酸蛋白酶, 在小鼠胎盘形成过程中在母胎界面选择性表达, HTRA3 在介导血管和胎盘形成中起着关键作用。本研究证实, HTRA3 水平影响 RF/6A 细胞小管形成及血管生成因子 VEGFA 的表达水平。据报道, HTRA3 是一种调节脑内皮细胞特异性应答的基因, 与前脑血管发育有关<sup>[26]</sup>。敲除 HTRA3 抑制了滋养层细胞的侵袭和血管生成<sup>[27]</sup>。这些结果说明 HTRA3 可促进血管生成和 CNV 形成。

wAMD 发病过程中免疫微环境失衡, 大量巨噬细胞浸润是免疫微环境失衡的重要因素, 因为巨噬细胞可促进血管内皮细胞增殖并引起新生血管渗漏<sup>[8]</sup>。wAMD 发病过程中巨噬细胞主要通过 M2 型极化诱导 CNV 形成<sup>[9-10]</sup>。巨噬细胞发生 M2 型极化后可分泌包括 VEGF 在内的多种促血管生成因子。本研究结果表明, 下调 HTRA3 降低了 CNV 小鼠脉络膜组织中 M2 型巨噬细胞标志物 (Ym-1 和 Arg-1) 的表达, 上调了 M1 型巨噬细胞标志物 (iNOS 和 COX-2) 的表达, 抑制了 M2 型巨噬细胞极化。有学者研究表明, HTRA 家族的基因突变影响巨噬细胞的存活率<sup>[28]</sup>。另外, HTRA3 与胃癌的免疫细胞浸润程度相关<sup>[16]</sup>。HTRA3 的高表达与获得性免疫细胞 (Th17 细胞、T 辅助细胞、T 中央记忆细胞等) 呈负相关, 与天然免疫细胞 (NK 细胞、肿瘤相关巨噬细胞、未成熟树突状细胞等) 呈正相关<sup>[16]</sup>。因此我们推测, HTRA3 可能通过促进 M2 型巨噬细胞极化参与了 wAMD 发病过程。

NF- $\kappa$ B 信号通路参与激活 wAMD 患者脉络膜和视网膜中的炎症反应<sup>[29]</sup>, NF- $\kappa$ B 信号通路的激活与 CNV 形成有关<sup>[30]</sup>, NF- $\kappa$ B 信号通路的激活在包括 wAMD 在内的多种疾病中起到促进血管生成作用<sup>[31-32]</sup>。因此, 抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路是治疗 wAMD 的有效策略<sup>[33]</sup>。其他学者报道, HTRA3 高表达可能激活 NF- $\kappa$ B 通路<sup>[16]</sup>。本研究结果表明, 下调 HTRA3 抑制 CNV 小鼠脉络膜组织 NF- $\kappa$ B 的核转位。据报道, NF- $\kappa$ B p65 可直接与 HTRA1 启动子 (氨基酸 347) 结合, 阻断 HTRA1 可显著抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[34]</sup>。考虑到 HTRA3 与 HTRA1 具有高度同源性和结构相似性, 并且表达模式相似<sup>[12]</sup>, 我们推测, HTRA3 可能与 NF- $\kappa$ B p65 具有结合位点, 下调 HTRA3 对 CNV 形成的抑制作用也可能与抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

## 4 结论

HTRA3 可促进血管生成和 CNV 形成, 可能通过

促进 M2 型巨噬细胞极化参与了 wAMD 的发病过程,通过下调 HTRA3 可抑制 CNV 形成和 M2 型巨噬细胞极化,该作用可能与 NF- $\kappa$ B 信号通路有关。本研究结果提示,HTRA3 可能是防治 wAMD 的重要潜在靶点。

## 参考文献

- [1] MITCHELL P, LIEW G, GOPINATH B, WONG T Y. Age-related macular degeneration[J]. *Lancet*,2018,392(10153):1147-1159.
- [2] STAHL A. The diagnosis and treatment of age-related macular degeneration[J]. *Dtsch Arztebl Int*,2020,117(29/30):513-520.
- [3] AMBATI J, FOWLER B J. Mechanisms of age-related macular degeneration[J]. *Neuron*,2012,75(1):26-39.
- [4] AMMAR M J, HSU J, CHIANG A, HO A C, REGILLO C D. Age-related macular degeneration therapy: a review [J]. *Curr Opin Ophthalmol*,2020,31(3):215-221.
- [5] YANG S, ZHAO J, SUN X. Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: a comprehensive review[J]. *Drug Des Devel Ther*,2016,10:1857-1867.
- [6] SNIEGOWSKI M, MANDAVA N, KAHOOK M Y. Sustained intraocular pressure elevation after intravitreal injection of bevacizumab and ranibizumab associated with trabeculitis[J]. *Open Ophthalmol J*,2010,4:28-29.
- [7] BAKRI S J, LARSON T A, EDWARDS A O. Intraocular inflammation following intravitreal injection of bevacizumab[J]. *Graefes Arch Clin Ophthalmol*,2008,246(5):779-781.
- [8] AMBATI J, ATKINSON J P, GELFAND B D. Immunology of age-related macular degeneration [J]. *Nat Rev Immunol*,2013,13(6):438-451.
- [9] CAO X, SHEN D, PATEL M M, TUO J, JOHNSON T M, OLSEN T W, et al. Macrophage polarization in the maculae of age-related macular degeneration: a pilot study [J]. *Pathol Int*,2011,61(9):528-535.
- [10] XU N, BO Q, SHAO R, LIANG J, ZHAI Y, YANG S, et al. Chitinase-3-like-1 promotes M2 macrophage differentiation and induces choroidal neovascularization in neovascular age-related macular degeneration [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2019,60(14):4596-4605.
- [11] NIE G Y, HAMPTON A, LI Y, FINDLAY J K, SALAMONSEN L A. Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2[J]. *Biochem J*,2003,371(Pt 1):39-48.
- [12] TOCHARUS J, TSUCHIYA A, KAJIKAWA M, UETA Y, OKA C, KAWAICHI M. Developmentally regulated expression of mouse HtrA3 and its role as an inhibitor of TGF-beta signaling[J]. *Dev Growth Differ*,2004,46(3):257-274.
- [13] YANG Z, CAMP N J, SUN H, TONG Z, GIBBS D, CAMERON D J, et al. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration [J]. *Science*,2006,314(5801):992-993.
- [14] DEWAN A, LIU M, HARTMAN S, ZHANG S S, LIU D T, ZHAO C, et al. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration[J]. *Science*,2006,314(5801):989-992.
- [15] 刘培源. 两种视网膜下新生血管小鼠模型基因表达谱的 RNA-Seq 研究[D]. 汕头: 汕头大学,2016.
- [15] LIU P Y. RNA-Seq study on gene expression profiles of two mouse models of subretinal neovascularization [D]. Shantou: Shantou University, 2016.
- [16] JI C, SUN L S, XING F, NIU N, GAO H L, DAI J W, et al. HTRA3 is a prognostic biomarker and associated with immune infiltrates in gastric cancer[J]. *Front Oncol*,2020,10:603480.
- [17] BIRD A C, BRESSLER N M, BRESSLER S B, CHISHOLM I H, COSCAS G, DAVIS M D, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration [J]. *Surv Ophthalmol*,1995,39(5):367-374.
- [18] ZURAWA-JANICKA D, SKORKO-GLONEK J, LIPINSKA B. HtraA proteins as targets in therapy of cancer and other diseases[J]. *Expert Opin Ther Targets*,2010,14(7):665-679.
- [19] TOSI G M, CALDI E, NERI G, NUTI E, MARIGLIANI D, BAIOCCHI S, et al. HTRA1 and TGF- $\beta$ 1 concentrations in the aqueous humor of patients with neovascular age-related macular degeneration[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2017,58(1):162-167.
- [20] OWEN L A, SHIRER K, COLLAZO S A, SZCZOTKA K, BAKER S, WOOD B, et al. The serine protease HTRA-1 is a biomarker for ROP and mediates retinal neovascularization [J]. *Front Mol Neurosci*,2020,13:605918.
- [21] SCHLINGEMANN R O. Role of growth factors and the wound healing response in age-related macular degeneration [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*,2004,242(1):91-101.
- [22] 张敬法, 赵珍珍. 湿性年龄相关性黄斑变性发病机制及治疗[J]. 眼科新进展,2022,42(2):85-98.
- [22] ZHANG J F, ZHAO Z Z. Pathogenesis and treatment of wet age-related macular degeneration[J]. *Rec Adv Ophthalmol*,2022,42(2):85-98.
- [23] 陶方方, 亢泽峰, 陈水龄, 褚文丽, 刘健, 周志豪. 加减驻景方对脉络膜新生血管动物模型缺氧信号因子表达的影响[J]. 中国中医眼科杂志,2021,31(5):309-315.
- [23] TAO F F, KANG Z F, CHEN S L, CHU W L, LIU J, ZHOU Z H. The effects of modified Zhujing formula on the expression of hypoxia signal factors in choroidal neovascularization animal model [J]. *CHN J Chin Ophthalmol*,2021,31(5):309-315.
- [24] HADDOCK L J, KIM D Y, MUKAI S. Simple, inexpensive technique for high-quality smartphone fundus photography in human and animal eyes [J]. *J Ophthalmol*,2013,2013:518479.
- [25] NIE G, LI Y, HE H, FINDLAY J K, SALAMONSEN L A. HtrA3, a serine protease possessing an IGF-binding domain, is selectively expressed at the maternal-fetal interface during placentation in the mouse [J]. *Placenta*,2006,27(4/5):491-501.
- [26] JENSEN L D, HOT B, RAMSKÖLD D, GERMANO R F V, YOKOTA C, GIATRELLIS S, et al. Disruption of the extracellular matrix progressively impairs central nervous system vascular maturation downstream of  $\beta$ -catenin signaling [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2019,39(7):1432-1447.
- [27] YOSHIDA K, KUSAMA K, AZUMI M, YOSHIE M, KATO K, TAMURA K. Endoplasmic reticulum stress-regulated high temperature requirement A1 (HTRA1) modulates invasion and angiogenesis-related genes in human trophoblasts [J]. *J Pharmacol Sci*,2022,150(4):267-274.
- [28] PALLEN M J, WREN B W. The HtraA family of serine proteases [J]. *Mol Microbiol*,1997,26(2):209-221.
- [29] GHOSH S, SHANG P, YAZDANKHAH M, BHUTTO I, HOSE S, MONTEZUMA S R, et al. Activating the AKT2-nuclear factor- $\kappa$ B-lipocalin-2 axis elicits an inflammatory response in age-related macular degeneration [J]. *J Pathol*,2017,241(5):583-588.
- [30] NAGAI N, IZUMI-NAGAI K, OIKE Y, KOTO T, SATOFUKA S, OZAWA Y, et al. Suppression of diabetes-induced retinal inflammation by blocking the angiotensin II type 1 receptor or its downstream nuclear factor-kappaB pathway [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2007,48(9):4342-4350.
- [31] KARIN M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression [J]. *Nature*,2006,441(7092):431-436.
- [32] LIN L W, WANG S W, HUANG W C, HUYNH T K, LAI C Y, KO C Y, et al. Melatonin inhibits VEGF-induced endothelial progenitor cell angiogenesis in neovascular age-related macular degeneration [J]. *Cells*,2023,12(5):799.
- [33] HIKAGE F, LENNIKOV A, MUKWAYA A, LACHOTA M, IDA Y, UTHEIM T P, et al. NF- $\kappa$ B activation in retinal microglia is involved in the inflammatory and neovascularization signaling in laser-induced choroidal neovascularization in mice [J]. *Exp Cell Res*,2021,403(1):112581.
- [34] HOU Y, LIN H, ZHU L, LIU Z, HU F, SHI J, et al. Lipopolysaccharide increases the incidence of collagen-induced arthritis in mice through induction of protease HTRA-1 expression [J]. *Arthritis Rheum*,2013,65(11):2835-2846.

## Effect of HtraA serine peptidase 3 gene on choroidal neovascularization and M2 macrophage polarization

ZHAO Lili<sup>1</sup>, WANG Ping<sup>1</sup>, SUN Lianyi<sup>1</sup>, MA Weimei<sup>1</sup>, ZHANG Le<sup>2</sup>, YU Lei<sup>1</sup>

1. Department of Ophthalmology, Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital), Shaanxi Eye Hospital, the People's Hospital Affiliated of Northwest University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

2. Department of Ophthalmology, Northwest Women's and Children's Hospital, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China

**Corresponding author:** YU Lei, E-mail: yulei402@163.com

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of the HtraA serine peptidase 3 (HTRA3) gene on choroidal neovascularization (CNV) and M2 macrophage polarization. **Methods** Fasting venous blood was collected from 30 patients with wet age-related macular degeneration (wAMD group) and 30 healthy subjects (normal group). The serum HTRA3 messenger ribonucleic acid (mRNA) level was detected by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). RF/6A cells were randomly divided into the control group, NC-sh group and HTRA3-sh group. Lentiviral vectors of NC-shRNA and HTRA3-shRNA were transfected into RF/6A cells in the NC-sh group and HTRA3-sh group by Lipofectamine2000. HTRA3 transfection was detected by qRT-PCR and Western blot. Then, the RF/6A cells were randomly divided into the N group, H group, H + NC-sh group and H + HTRA3-sh group. After cell transfection, RF/6A cells in the N group were cultured in a RPMI 1640 complete medium at a normoxia state, and cells in other groups were cultured in a RPMI 1640 medium with 200 mmol · L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub> at a hypoxia state. Tubule formation was measured by Matrigel. The C57BL/6J mice were divided into the control group, CNV group, CNV + NC-sh group and CNV + HTRA3-sh group, with 12 mice in each group. Mice in the control group were unmodeled mice, and mice in the other groups were laser-induced CNV model mice. NC-shRNA and HTRA3-shRNA lentiviral vectors with a titer of 1 × 10<sup>11</sup> TU · mL<sup>-1</sup> were administered to mice in the CNV + NC-sh group and CNV + HTRA3-sh group via intravitreal injection. Mice in the control group and CNV group were injected with phosphate buffered saline. After 7 days of treatment, the mice were examined by fundus fluorescein angiography, and the eyeballs received hematoxylin & eosin staining. The mRNA levels of HTRA3, chitinase-like protein 3 (Ym-1), arginase 1 (Arg-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in RF/6A cells or choroidal tissues were detected by qRT-PCR. The protein expression levels of HTRA3, VEGF and nuclear factor kappa B (NF-κB) p65 in RF/6A cells or choroidal tissues were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal group, serum HTRA3 mRNA level of patients in the wAMD group increased ( $t = 11.804$ ,  $P < 0.001$ ). Compared with the control group and NC-sh group, the expressions of HTRA3 mRNA and protein in RF/6A cells in the HTRA3-sh group decreased (all  $P < 0.05$ ). Compared with the N group, the number of closed lumen and the mRNA and protein expressions of HTRA3 and VEGF in RF/6A cells in the H group increased (all  $P < 0.05$ ). Compared with the H + NC-sh group, the number of closed lumen and the mRNA and protein expressions of HTRA3 and VEGF decreased in RF/6A cells in the H + HTRA3-sh group (all  $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the mRNA and protein expression levels of HTRA3 increased, the relative fluorescence intensity of CNV increased, the mRNA levels of Ym-1 and Arg-1 increased, the iNOS and COX-2 mRNA levels decreased, and the NF-κB p65 protein expression level increased in mice of the CNV group (all  $P < 0.05$ ). Compared with the CNV + NC-sh group, the mRNA and protein expression levels of HTRA3 decreased, the relative fluorescence intensity of CNV decreased, the mRNA levels of Ym-1 and Arg-1 decreased, the mRNA levels of iNOS and COX-2 increased, and the NF-κB p65 protein expression level decreased in mice of the CNV + HTRA3-sh group (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Down-regulation of HTRA3 can inhibit the formation of CNV and the polarization of M2 macrophages. HTRA3 may be an important potential target for the prevention and treatment of wAMD.

**[Key words]** wet age-related macular degeneration; choroidal neovascularization; HtraA serine peptidase 3; M2 macrophage polarization