

PDGF- α 受体反义寡核苷酸对体外视网膜色素上皮细胞增殖和凋亡的影响

邱梅园¹, 彭燕一¹, 黄岚珍², 张玉明¹, 向秋²

作者单位:¹(541004)中国广西壮族自治区桂林市,桂林医学院附属医院眼科;²(541004)中国广西壮族自治区桂林市,桂林医学院科学实验中心

作者简介:邱梅园,在读硕士研究生,研究方向:眼底病。

通讯作者:彭燕一,学士,教授,主任医师,主任,硕士研究生导师,研究方向:白内障、青光眼. yypeng_7@hotmail.com

收稿日期:2010-11-01 修回日期:2010-12-31

Effect of oligofectamine mediated PDGF- α receptor ASODN transfection on RPE cell proliferation and apoptosis *in vitro*

Mei-Yuan Qiu¹, Yan-Yi Peng¹, Lan-Zhen Huang², Yu-Ming Zhang¹, Qiu Xiang²

¹Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Central Laboratory of Guilin Medical University, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Yan-Yi Peng, Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. yypeng_7@hotmail.com

Received: 2010-11-01 Accepted: 2010-12-31

Abstract

• AIM: To investigate the effect of oligofectamine mediated platelet-derived growth factor- α (PDGF- α) receptor antisense oligodeoxyribonucleotide (ASODN) transfection on retinal pigment epithelium (RPE) proliferation and apoptosis *in vitro*.

• METHODS: After PDGF- α receptor ASODN was transfected into RPE with lipofectamineTM2000 at different concentrations, the proliferation of RPE was detected by MTT. Hoechst staining was used to display the apoptosis form of RPE. Flow cytometry method was applied to detect the change of cell cycle and apoptosis index.

• RESULTS: Compared with control group, PDGF- α receptor ASODN group could effectively inhibit the proliferation of RPE; the percentage of G₀/G₁ phase cells was enhanced and there was significance in increasing apoptosis cells ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: PDGF- α receptor ASODN could induce G₀/G₁ arrest, inhibit cell proliferation, accelerate apoptosis in RPE cells.

• KEYWORDS: PDGF- α receptor; ASODN; RPE; proliferation; apoptosis

Qiu MY, Peng YY, Huang LZ, *et al.* Effect of oligofectamine mediated PDGF- α receptor ASODN transfection on RPE cell proliferation and apoptosis *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(2):229-231

摘要

目的:探讨血小板源性生长因子- α 受体反义寡核苷酸(PDGF- α ASODN)对体外人视网膜色素上皮(human retinal pigment epithelium, HRPE)细胞增殖和凋亡的作用。方法:使用阳离子脂质体 lipofectamineTM2000 将靶向 PDGFR- α 基因的 ASODN 转染至细胞株 HRPE 细胞, MTT 法检测对 HRPE 细胞增殖的影响; Hoechst 33258 荧光染色观察凋亡细胞; 流式细胞仪检测 HRPE 细胞的周期和凋亡率。

结果:PDGFR- α ASODN 转染组细胞增殖抑制率和凋亡率均明显高于对照组 ($P < 0.05$)。

结论:沉默 PDGFR- α 基因表达可显著抑制 HRPE 细胞的增殖,并能诱导其凋亡。

关键词:PDGF- α 受体;反义寡核苷酸;视网膜色素上皮细胞;增殖;凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.02.10

邱梅园,彭燕一,黄岚珍,等. PDGF- α 受体反义寡核苷酸对体外视网膜色素上皮细胞增殖和凋亡的影响. 国际眼科杂志 2011;11(2):229-231

0 引言

增殖性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreous retinopathy, PVR) 是在某些因素的作用下玻璃体及视网膜表面的细胞增生和收缩,造成牵引性视网膜脱离的一种严重眼病。血小板源性生长因子 (PDGF) 是 Ross 于 1974 年首先在机体内发现的一种重要的促细胞生长和诱导细胞分化的因子,具有明显的抗凋亡作用。PVR 的病理过程主要是由于视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞在细胞因子及细胞外基质的作用下,经视网膜裂孔进入视网膜表面或玻璃体腔,并在血浆中的一些成分如纤维连接蛋白、PDGF 或自身分泌的 PDGF 作用下大量增生,从而引起恶性循环,导致 PVR 的发生。PDGF 受体有 α 和 β 两种,其中 PDGF- α 受体与 PVR 有更强的相关性^[1]。我们通过体外化学合成特异性的针对 HRPE 细胞的 PDGFR- α 基因的反义寡核苷酸 (PDGFR- α ASODN) 转

表1 转染 PDGFR- α -ASODN 后对 HRPE 生长抑制率和细胞周期及凋亡率 ($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

Lipo-ASODN	细胞生长抑制率			转染 48h 后细胞周期百分率			转染 48h 后凋亡率
	24h	48h	72h	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	
0 μ mol/L	0	0	0	34.8 \pm 1.4	10.6 \pm 2.1	53.5 \pm 1.9	10.9 \pm 1.7
1.0 μ mol/L	19.3 \pm 1.6	28.5 \pm 2.4	40.2 \pm 3.3	56.3 \pm 2.3 ^b	11.2 \pm 1.3	32.9 \pm 2.4	38.5 \pm 1.4 ^b
2.0 μ mol/L	24.6 \pm 2.1 ^b	37.4 \pm 3.4 ^b	56.0 \pm 4.4 ^b	64.4 \pm 3.2 ^b	10.9 \pm 1.3	24.5 \pm 1.2	61.6 \pm 2.3 ^b

^b $P < 0.01$ vs 0 μ mol/L Lipo-ASODN 组。

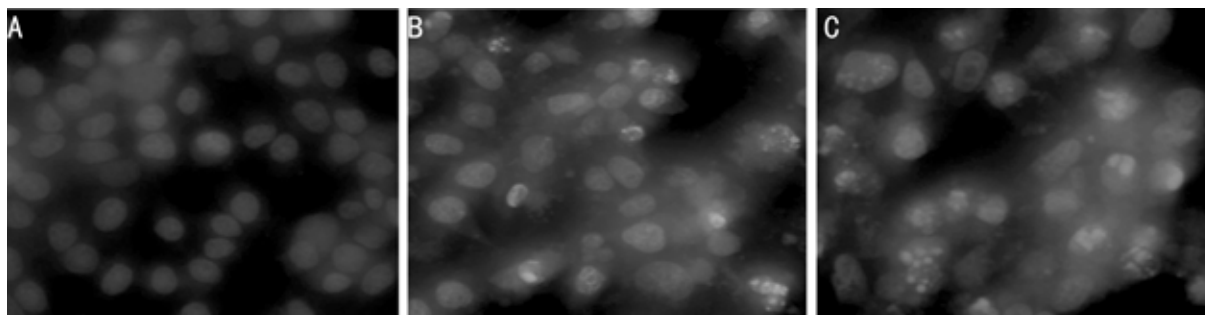


图1 PDGFR- α ASODN 对 HRPE 细胞凋亡的影响 (Hoechst \times 400) A: 脂质体对照组; B: Lipo-ASODN 1.0 μ mol/L; C: Lipo-ASODN 2.0 μ mol/L。

染至 RPE 细胞内,以观察 PDGFR- α ASODN 抑制 PDGFR- α 基因表达后对 RPE 细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 HRPE 细胞株 (HRPE D407) 购自中山大学细胞库; DMEM (低糖型) 培养基 (Gibco); 胎牛血清 (杭州四季青); lipofectamineTM 2000 (Invitrogen); UNIQ-10 Trizo, MTT (上海生工生物工程有限公司); PDGFR- α 基因; 反义链一为: 5'-AACTTCTCCTCCGATGTTA-3'; 反义链二为: 5'-CATAGCTCTGGGAAACTTCTC-3'。HRPE D407 采用低糖 DMEM 培养基 (含 100mL/L 胎牛血清, 100kU/L 青霉素, 100mg/L 链霉素) 单层培养, 在 37 $^{\circ}$ C 50mL/L CO₂ 培养箱培养传代, 倒置显微镜观察培养情况, 每 2~3d 用 2.5g/L 胰酶消化、传代, 选择 50 代以内的细胞进行转染。用阳离子脂质体 lipofectamineTM 2000 将 siRNA 导入 HRPE 细胞中, 按基因转染试剂盒说明书进行转染, 并于转染 48h 行 ASODN 干扰效应的检测。通过预实验发现第 1 条 ASODN 的干扰作用强于第 2 条 ASODN, 故选择第 1 条 ASODN 进行后续试验的检测。

1.2 方法

1.2.1 抑制 HRPE 增殖作用的检测 取对数生长期细胞, 调节细胞浓度为 5 \times 10⁵/孔, 接种于 96 孔板, 待细胞生长至 80%~90% 融合时进行转染, 细胞分为 3 组: 空白对照组 (不加 PDGFR- α ASODN 及 lipofectamineTM2000), ASODN 组 (加 ASODN 及 lipofectamineTM2000, 分为 1, 2 μ mol/L 浓度组)。转染 48h 后加入 5g/L MTT, 在 37 $^{\circ}$ C 50mL/L CO₂ 培养箱继续培养 4h 后, 加入 DMSO 150 μ L 终止反应。所有样本设 3 个复孔, 用酶标仪测量样品的吸光度 A 值, 波长为 490nm。细胞生长抑制率 (%) = (1-观察组 A 值/空白对照组 A 值) \times 100%。

1.2.2 凋亡细胞的检测 各组细胞培养 3d 后, 应用 PBS 洗 3 次, 40g/L 多聚甲醛室温下固定 10 min, PBS 洗涤后应用 10g/L Hoechst 33258 室温下染色, 置 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵化 15min, PBS 洗 3 次, 5min/次, 固定盖玻片, 应用 Olympus 荧

光显微镜观察细胞凋亡情况。另取对数生长期 HRPE 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞长满至 80%~90% 后, 换无血清培养基培养 24h 使细胞周期同步化。然后换全培养基, 并按上述步骤进行转染, 于 48h 后收集细胞, 并以 700mL/L 预冷的乙醇固定, 于 4 $^{\circ}$ C 过夜。离心洗涤后, 悬浮于 PI 染液中, 最后以 300 目筛网过滤, 调整细胞密度 1 \times 10⁸⁻⁹/L, 用 Multicycle DNA 分析软件行细胞周期和凋亡率测定。

统计学分析: 各组数据均采取均数 \pm 标准差表示, 采用 SPSS 13.0 统计学软件处理。多样本比较采用 F 检验, 两组间比较采用 q 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染 PDGFR- α ASODN 对 HRPE 细胞增殖的作用

PDGFR- α ASODN 处理后 HRPE 细胞增殖明显受到抑制, 且随时间和剂量的增加而增加 (表 1)。

2.2 HRPE 细胞凋亡的变化 PDGFR- α ASODN 处理后 HRPE 细胞 72h 后, Hoechst 33258 染色后于倒置荧光显微镜下观察, 细胞核或细胞质内出现致密浓染的颗粒状或条块状荧光为凋亡细胞 (图 1)。PDGFR- α ASODN 能将 HRPE 细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 且随着 PDGFR- α ASODN 浓度升高, 凋亡的细胞增加, 说明 PDGFR- α ASODN 能够促进 HRPE 细胞的凋亡, 且随浓度的增加而增加 (表 1)。

3 讨论

PDGF 是 PVR 形成过程中最重要的生长因子之一^[2-4] 及体外 RPE 细胞的强力趋化因子和有丝分裂原, 能够刺激停滞于 G₀/G₁ 期的细胞进入分裂增生周期, 还能直接刺激 RPE 细胞的增生和移行, 并使 RPE 细胞向成纤维细胞转化, 对 PVR 的发生和发展起重要作用。PDGF 受体有 α 和 β 两种, α 受体与 PDGF 配体的 A 链和 B 链均有很高的亲和力, β 受体只能和 B 链结合, 因此 PDGF 对 PVR 的促进作用主要由 α 受体介导^[5]。PDGF 不仅来源于血小板, 活化的巨噬细胞及 RPE 细胞等都可以产生, 在细胞增殖过程中, 可促进细胞由 M₁ 向 G₁ 转变。以往的实验显示, PDGF 是参与 PVR 形成的重要生长因子, PVR 患者的玻璃

体液中 PDGF 含量升高,在培养的 RPE 细胞中存在自分泌链。动物实验也表明,玻璃体腔注射 PDGF 后可引发 PVR 样反应^[6]。熊蕾等^[7]研究表明,特异性的 PDGF- α 受体酪氨酸激酶抑制剂 AG1296 可显著抑制兔牵拉性视网膜脱离(TRD) 的发生,其作用明显强于 PDGF- β 受体酪氨酸激酶抑制剂 AG1295,提示 PDGF 对 PVR 的促进作用主要由 α 受体介导,这一通路的阻断可能成为治疗 PVR 的一种方法。另外在 PVR 发病早期局部应用阻断 PDGF 生物学作用的药物,有可能延缓 PVR 发展、减轻其病变程度^[2]。Lei 等^[8]利用人为造成的兔 PVR 的模型揭示阻断 PDGFR 是防止兔 PVR 发生的重要途径,而利用中和 PDGF 的方法则阻止 PVR 发生的作用大为减少,PDGFR 可被玻璃体里很多非 PDGF 家族的因子激活,阻断被非 PDGF 家族的因子激活的 PDGFR- α 的信号传导通路,阻止 PVR 的发生。

近年来,ASODN 类药物逐渐成为药物研究和开发的热点。我们将靶向 PDGF- α 受体的 ASODN 转染至 HRPE 后,HRPE 细胞的增殖受到显著的抑制,抑制率随着 ASODN 浓度的升高和作用时间的延长而增加,即呈现明显的时间-剂量效应。流式细胞检测示 PDGFR- α ASODN 转染于 HRPE 细胞后能将细胞阻滞于 G_0/G_1 期。 G_1/S 期为细胞增殖限制点,通过控制限制点,使细胞的 G_1 期延迟,引起细胞增殖的抑制^[9]。我们发现,PDGFR- α ASODN 能促进 HRPE 的凋亡。

综上所述,PDGFR- α ASODN 转染于 HRPE 细胞后,细

胞出现明显的凋亡现象,进一步说明下调 PDGFR- α 基因的表达来抑制细胞增殖是通过诱导 HRPE 细胞凋亡来实现的。因此,PDGFR- α 有可能成为治疗或预防 PVR 发生的新的治疗靶点。

参考文献

- 1 Ikuno Y, Kazlauskas A. TGFbeta1-dependent contraction of fibroblasts is mediated by the PDGFalpha receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(1):41-46
- 2 梁勇,黎晓新,赵明威,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. *中华眼科杂志* 2002;38(3):144-147
- 3 Carrington L, McLeod D, Boulton M. IL-10 and antibodies to TGF-beta2 and PDGF inhibit RPE-mediated retinal contraction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(5):1210-1216
- 4 司艳芳,惠延年,关娟,等. 血小板源性生长因子对人视网膜色素上皮细胞表达肌动蛋白的影响. *中华眼底病杂志* 2003;19(4):241-243
- 5 权彦龙,王峰,郑玉萍,等. 血小板源性生长因子 α 和 β 受体酪氨酸激酶抑制剂对兔 PVR 的治疗作用. *眼科新进展* 2003; 23(6): 402-405
- 6 康军,崔志利,海鸥,等. 细胞因子及苏拉明对视网膜色素上皮细胞增殖的影响. *国际眼科杂志* 2005;5(4):655-658
- 7 熊蕾,权彦龙,郑玉萍,等. 血小板源性生长因子受体 α 在兔增殖性玻璃体视网膜病变中的作用. *国际眼科杂志* 2008;8(1):6-9
- 8 Lei H, Rheaume MA, Kazlauskas A, et al. Recent developments in our understanding of how platelet-derived growth factor (PDGF) and its receptors contribute to proliferative vitreoretinopathy. *Exp Eye Res* 2010; 90(3):376-381
- 9 倪琦,曾思恩,谭宁,等. 姜黄素对肝癌细胞增殖及凋亡的影响. *山东医药* 2010;50(7):6-8