

P16 在氧诱导视网膜病变大鼠视网膜中的表达及作用机制

李游¹, 庞东渤¹, 陈晓隆²

基金项目: 辽宁医学院校长基金 (No. XZJJ20140221)

作者单位:¹(121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院眼科;²(110004) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院眼科

作者简介: 李游, 博士, 主治医师, 研究方向: 眼底病、眼外伤。

通讯作者: 李游. yo8300@163.com

收稿日期: 2016-09-22 修回日期: 2016-12-25

Expression and function of P16 in a rat model of oxygen-induced retinopathy

You Li¹, Dong-Bo Pang¹, Xiao-Long Chen²

Foundation item: Principal Fund of Liaoning Medical College (No. XZJJ20140221)

¹Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; ²Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: You Li. Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. yo8300@163.com

Received: 2016-09-22 Accepted: 2016-12-25

Abstract

• AIM: To investigate the effect of p16 protein expression on the proliferation of retinal neovascularization in oxygen-induced retinopathy (OIR).

• METHODS: Totally 60 SD rats aged 7d were randomly divided into 4 groups: normal group, model group, intervention group and NS control group. Normal group was raised in a normal air feeding; model group at 75% high oxygen for 5d to establish the model of oxygen induced retinopathy; intervention group was given anti p16 methylation drug 5-aza-CdR (0.25 mg/kg) intraperitoneal injection; NS control group was given the same volume NS intraperitoneal injection. The eyes were taken from each group and the left eyes were removed for observation of retinal neovascularization by HE staining, and immunohistochemistry and immunofluorescence were taken for observations of p16 protein expression. Right retina had been performed real time-PCR to analysis p16mRNA expression.

• RESULTS: The normal group were not found retinal neovascularization breaking through internal limiting mebrane. In model group and NS control group, the retinal tissue was obviously thickened, and a large number of new blood vessels were found. In the intervention group, a small amount of new blood vessels were found in the retina. The expression of p16 was low

in the model group, the positive cell number was 19.52 ± 2.67 , and the number of the positive cells was 36.38 ± 3.16 in the intervention group, the difference was statistically significant ($P < 0.001$). Real time-PCR showed decreased expression of p16 mRNA in the model group ($2^{-\Delta\Delta ct} = 0.14 \pm 0.01$), the expression of p16 mRNA in the intervention group rats retina was significantly higher than that of NS control group rat retina, there was significant difference between two groups ($2^{-\Delta\Delta ct} = 0.68 \pm 0.08$, $P < 0.001$).

CONCLUSION: The abnormal expression of P16 may be closely related to the proliferation of retinal neovascularization. Inhibition of p16 methylation can decrease the proliferation of retinal neovascularization.

• KEYWORDS: oxygen - induced retinopathy; P16; retinal neovascularization

Citation: Li Y, Pang DB, Chen XL. Expression and function of p16 in a rat model of oxygen-induced retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(2):221-225

摘要

目的: 研究氧诱导视网膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 中 p16 表达的变化对新生血管增殖的影响。

方法: 鼠龄 7d 的 SD 大鼠 60 只随机分为正常组、模型组、干预组和 NS 对照组共 4 组。正常组置于正常空气中饲养; 模型组置于 75mL/L 高氧环境 5d 建立氧诱导视网膜病变模型; 干预组给予抗 p16 甲基化药物 5-aza-CdR (0.25mg/kg) 腹腔注射; NS 对照组腹腔注射同体积的生理盐水。各组分别取双侧眼球, 左眼做 HE 染色观察视网膜新生血管, 免疫组织化学和免疫荧光观察 p16 蛋白的表达。右眼视网膜行 real time-PCR 分析 p16 mRNA 的表达。

结果: 正常组幼鼠的视网膜未发现突破视网膜内界膜的新生血管管腔。模型组和 NS 对照组视网膜组织明显增厚, 可见大量新生血管管腔。干预组视网膜偶见新生血管管腔。免疫组织化学和免疫荧光显示, 模型组视网膜 p16 呈低表达, 阳性细胞数为 19.52 ± 2.67 个; 而干预组阳性细胞数为 36.38 ± 3.16 个, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。real time-PCR 显示, 模型组 p16 mRNA 的表达降低 ($2^{-\Delta\Delta ct} = 0.14 \pm 0.01$), p16 mRNA 在干预组大鼠的视网膜表达明显高于 NS 对照组大鼠视网膜, 两组相比差异有统计学意义 ($2^{-\Delta\Delta ct} = 0.68 \pm 0.08$, $P < 0.001$)。

结论: P16 的异常表达可能与视网膜新生血管增殖密切相关, 抑制 p16 甲基化可减少视网膜新生血管的增殖。

关键词: 氧诱导视网膜病变; P16; 视网膜新生血管

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.2.07

引用:李游,庞东渤,陈晓隆. P16在氧诱导视网膜病变大鼠视网膜中的表达及作用机制. 国际眼科杂志 2017;17(2):221-225

0 引言

早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)是一种增殖性视网膜病变,好发于低出生体重的早产儿,是儿童最主要致盲眼病之一。尤其在发达国家,医疗技术快速发展,早产儿的成活率也显著提高,但ROP的发病率也随之呈上升趋势。其严重的病变类型可以造成视力的损坏,甚至致盲。因此,研究早产儿视网膜病变的发病机制,寻找更加方便有效的治疗方法,是目前亟待解决的问题。在大多数ROP患者,视网膜新生血管的形成过程和程度与某些细胞因子的表达变化密切相关^[1]。已知与ROP视网膜新生血管增殖有关的细胞因子有很多,如血管内皮因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)^[2]、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-1, IGF-1)^[3-4]等,但新生血管的增殖是一个极其复杂的过程,其机制是多元的,仍有许多未知因素尚未阐明。并且随着新生血管的发生发展,一些细胞因子表达的变化也未见研究报道。P16是人们发现的第一个直接作用于细胞周期、抑制细胞分裂的抑癌基因。P16作为一种细胞周期调控因子,在细胞周期中起负反馈调节作用。本研究以高氧诱导的大鼠视网膜病变模型作为研究对象,观察p16表达的变化,研究p16在ROP新生血管形成中作用机制及其对新生血管增生的影响,旨在从新的角度探索ROP新生血管的发生机制,从而为ROP防治寻找新的突破口,为ROP的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 新生SD大鼠60只,7天龄,由中国医科大学盛京医院实验动物中心提供许可证[No. SYXK(辽)2003-0019]。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》^[5]。

1.2 方法

1.2.1 SD大鼠氧诱导视网膜病变模型的建立 60只7日龄(P7)SD大鼠随机分为正常组、模型组、干预组和NS对照组,每组15只。正常组幼鼠与其母鼠置于正常空气中饲养。模型组幼鼠与其母鼠共同置于氧体积分数为750mL/L的密闭氧舱内5d(P7~P12),出生后12d回到正常室内环境中诱导视网膜新生血管形成。干预组建立氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)模型并于7、9、11d腹腔注射5-aza-CdR(0.25mg/kg)。NS对照组幼鼠建立OIR模型并于7、9、11d腹腔注射同体积的生理盐水。所有动物均饲养于12h/12h明暗循环条件下,每日常规加食、换水、换垫料^[6]。各组分别于17d(P17)处死并取材。

1.2.2 组织的制备 各组动物分别进行腹腔注射水合氯醛(3g/kg)过量麻醉处死后,摘取双眼。左眼置于4%多聚甲醛溶液中充分固定,用于做HE染色观察视网膜新生血管、p16蛋白的免疫组化和免疫荧光检测。右眼取视网膜置于-80℃冰箱中冷冻保存,用于做real time-PCR检测p16 mRNA。

1.2.3 HE染色及观察 将固定好的眼球剖开置于梯度蔗糖溶液中(10% 30min, 20% 1h, 30% 过夜)脱水。取视杯包埋于OCT中并置于冰冻切片待其凝固,平行于角

膜至视盘的矢状位连续8μm切片,贴片于多聚赖氨酸处理的载玻片上,做HE染色,光学显微镜下观察视网膜结构及是否出现突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核。

1.2.4 P16的免疫组化和免疫荧光检测 视网膜切片滴加山羊血清封闭液,37℃孵育20min以减少非特异性染色;加小鼠抗大鼠P16多克隆抗体(购自Santa Cruz公司,工作浓度1:100)4℃过夜。0.01mol/L PBS清洗后再滴加生物素标记的羊抗小鼠IgG(SABC试剂盒购自武汉博士德公司)37℃孵育20min;滴加SABC,37℃孵育20min;滴加DAB显色剂,镜下控制反应时间,显色后充分水洗;苏木素复染,脱水、透明封片,阴性对照采用PBS替代兔抗大鼠p16,于光镜下观察结果。免疫荧光染色所用二抗为Cy3标记的羊抗小鼠IgG(购自武汉博士德公司,工作浓度1:50),室温避光孵育1.5h,0.01mol/L PBS洗涤后再滴加细胞核荧光染料DAPI(1:200)室温孵育5min,充分洗涤后甘油明胶封片,-20℃避光保存,激光共聚焦显微镜观察并拍照。

1.2.5 P16 mRNA的real time-PCR检测 根据GenBank提供的p16和内参β-actin的mRNA序列,应用Primer6.0软件设计引物,其序列由Invitrogen公司合成。p16上游引物序列:5'-GGCTTACCAAACGCCCCCGA-3';p16下游引物序列:5'-GGGAGAGGGTGGTGGGGTCC-3';β-actin上游引物序列:5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3';β-actin下游引物序列:5'-AGTACTTGGCTCAGGAGGA-3'。Trizol一步法提取RNA,用反转录试剂盒将总RNA逆转录成cDNA第一链,反应体积20μL,37℃孵育15min,85℃5s终止反应,灭活反转录酶,逆转录产物4℃保存。PCR扩增反应体系10μL。上述PCR产物进行95℃10s,60℃20s,在60℃~95℃之间梯度升温0.2℃/s绘制溶解曲线,p16及β-actin mRNA的溶解曲线均为单峰,说明PCR产物单一,证明其为特异性产物。P16 mRNA的相对表达量为模型组目的基因表达量是正常组的倍数,即 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 值, $\Delta\Delta ct = (ct_{\text{实验组目的基因}} - ct_{\text{实验组内参}}) - (ct_{\text{对照组目的基因}} - ct_{\text{对照组内参}})$ 。

统计学分析:数据由SPSS11.5 for Windows统计软件包进行统计学处理,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间比较采用Dunnett-t's检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜新生血管的观察 正常组SD大鼠视网膜未发现突破视网膜内界膜长入玻璃体的血管内皮细胞核(图1A)。模型组SD幼鼠17d观察到视网膜组织明显增厚,可见大量突破内界膜的新生血管管腔(图1B)。干预组:偶见突破视网膜内界膜长入玻璃体的血管内皮细胞核(图1C)。NS对照组:视网膜可见大量突破内界膜的新生血管管腔(图1D)。

2.2 OIR大鼠视网膜中p16蛋白的表达 在OIR大鼠视网膜,p16为细胞核染色,免疫组织化学检测结果显示阳性染色为棕黄色,主要表达于视网膜神经纤维层。正常视网膜中p16呈阳性表达,阳性细胞数为 39.85 ± 3.11 个,而在OIR大鼠视网膜表达为弱阳性,阳性细胞数为 19.52 ± 2.67 个,与正常组相比差异有统计学意义($P < 0.001$)。干预组p16表达为阳性,阳性细胞数为 $36.38 \pm$

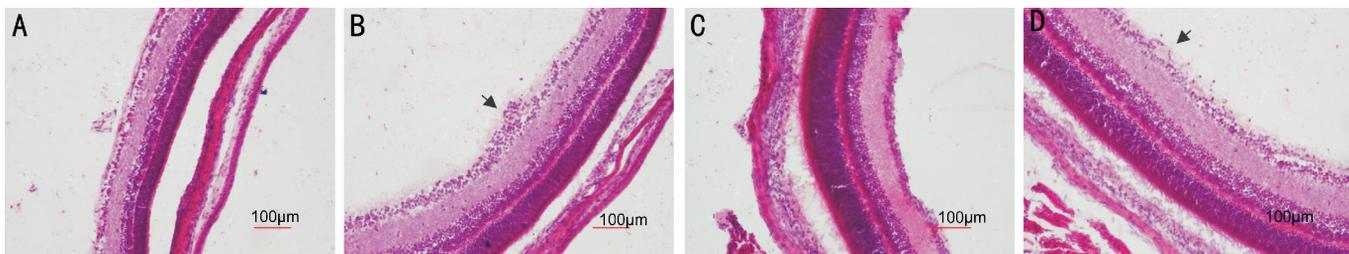


图1 SD 幼鼠视网膜切片 HE 染色 ($\times 100$) A:正常组 17d;B:模型组 17d(箭头示新生血管管腔);C:模型组 17d(箭头示新生血管管腔);D:NS 对照组 17d(箭头示新生血管管腔)。

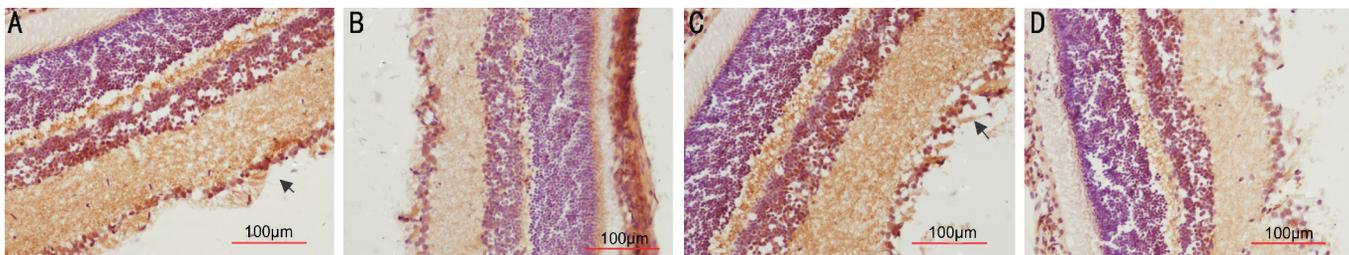


图2 视网膜组织切片 p16 的免疫组化染色 ($\times 200$) A:正常组 17d(箭头示阳性细胞);B:模型组 17d;C:干眼组 17d(箭头示阳性细胞);D:NS 对照组 17d。

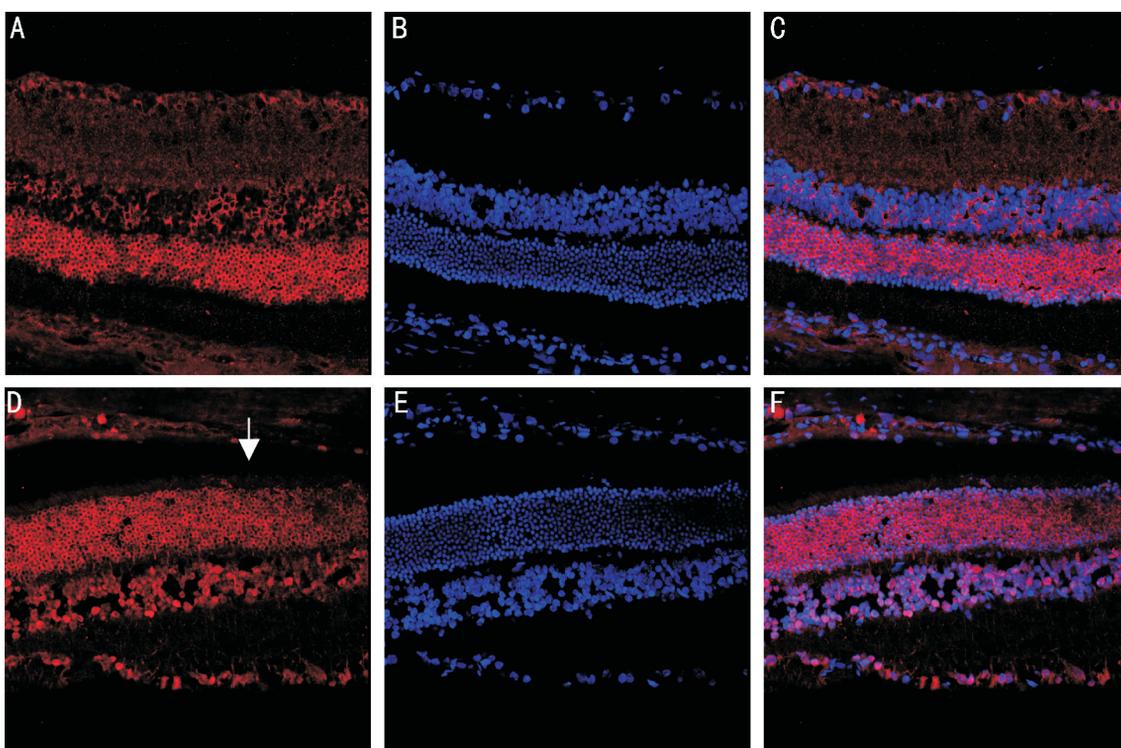


图3 视网膜组织切片 p16 的免疫荧光染色 ($\times 200$) A:模型组 17d p16 染色;B:模型组 17d DAPI 染色;C:模型组 17d p16 与 DAPI 双标染色;D:正常组 17d p16 染色(箭头示阳性细胞);E:正常组 17d DAPI 染色;F:正常组 17d p16 与 DAPI 双标染色。

3.16 个,而 NS 对照组视网膜 p16 呈弱阳性表达,阳性细胞数为 17.22 ± 3.07 个,二者相比差异具有统计学意义 ($P < 0.001$,图 2)。

激光共聚焦显微镜下 p16 阳性表达为红色荧光,DAPI 为蓝色荧光。免疫荧光显示 p16 的表达主要位于视网膜神经节细胞层,与免疫组织化学结果一致。17d 时正常组视网膜可见明显的 p16 阳性荧光信号,而模型组可见微弱的荧光信号。细胞核荧光染料 DAPI 染色显示,模型组较正常组视网膜神经纤维层细胞核增多(图 3)。免疫荧光的结果进一步表明,OIR 大鼠视网膜 p16 的表达较正常视网膜明显减弱。

2.3 大鼠视网膜 real time-PCR 结果 通过 real time-

PCR 技术,对 p16 在各组视网膜的表达进行了相对表达量的分析。对所得 real time-PCR 结果的相对表达量定量分析表明:p16 mRNA 在正常大鼠的视网膜有较高表达 ($2^{-\Delta\Delta ct} = 0.81 \pm 0.03$)。在 OIR 大鼠视网膜,p16 mRNA 有明显的下调 ($2^{-\Delta\Delta ct} = 0.14 \pm 0.01$, $P < 0.001$)。p16 mRNA 在干预组大鼠的视网膜的表达明显高于 NS 对照组大鼠视网膜, $2^{-\Delta\Delta ct}$ 值分别为 0.68 ± 0.08 和 0.16 ± 0.03 ,两组相比有统计学意义 ($P < 0.001$,图 4)。

3 讨论

早产儿视网膜病是一种多发生于早产儿的视网膜增殖性病变,主要是由于早产儿视网膜发育不完善,在多种因素的影响下,使视网膜缺血,造成新生血管形成,并由此

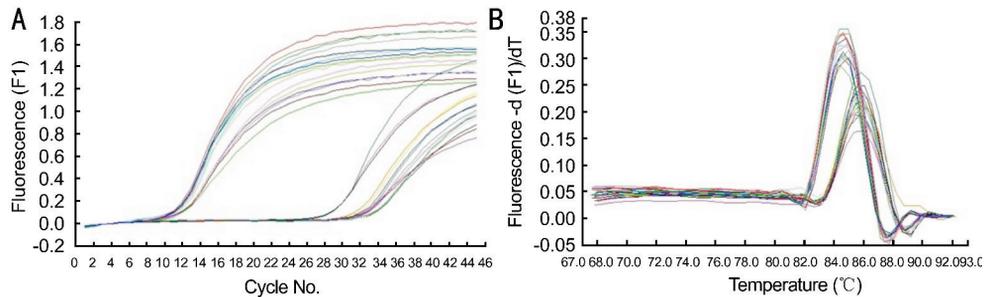


图4 P16 mRNA的 Real time PCR图 A:扩增曲线;B:溶解曲线。

引发玻璃体出血、机化,甚至视网膜脱离,并可发生斜视、弱视、白内障、青光眼、视网膜变性甚至失明,是导致婴幼儿视力损伤和失明的重要原因。随着我国早产低出生体重儿生存率的不断提高,ROP的发生率及严重程度也逐渐上升。ROP的发生是多种因子共同参与相互作用的复杂过程,预防和治疗ROP已成为提高早产低出生体重儿生活质量的重要问题。

ROP病理变化是视网膜组织新生血管增生,而新生血管增生又与血管内皮细胞的增殖有关。P16基因又称多肿瘤抑制基因,可直接作用于细胞周期,抑制细胞的增殖,被认为是重要的细胞周期负向调控因子。细胞周期是细胞分裂增殖的基本过程,细胞增殖要依次经历G₁、S、G₂和M期才能够完成,Cyclin、CDK和CDI这三种分子的表达和相互作用在很大程度上决定了细胞周期的进程,主要在G₁→S和G₂→M两个转折点进行自控性调节^[7],G₁→S和G₂→M的转变是最重要的两个限制点,分别调控细胞周期中两个关键的过程,即DNA的复制和细胞的有丝分裂。其中G₁→S转换的调节更为重要,细胞一旦通过G₁→S转换而进入S期,便可顺利完成DNA复制并易通过其他关卡从而完成有丝分裂^[8]。

现研究认为,p16蛋白主要与CyclinD1竞争性结合CDK4,抑制CDK4的催化活性,从而抑制Rb蛋白磷酸化,减少转录因子E2F的释放,从而使受E2F调节的基因编码多种复制所需的酶和Cyclin不能转录,使细胞分裂不能通过G₁→S限制点进入S期,对G₁→S期转换进行负向调节^[9]。而目前有关p16基因的研究最热衷于各种良恶性肿瘤及其他增殖性疾病。

有关报道,p16蛋白在血管瘤消退期明显高于增生期,而在血管畸形组织中不表达,提示p16对血管瘤内皮细胞有调控作用^[10]。由于p16蛋白表达缺失,失去了对内皮细胞增殖的抑制作用,导致血管瘤迅速生长。而在消退期p16的高表达,抑制了内皮细胞由G₁期向S期转化,使内皮细胞的分裂增殖受到抑制,血管瘤消退。尽管ROP的发生与血管瘤的生长截然不同,但两者都是血管的过度增殖,又有一定的相似之处。ROP的发生与p16蛋白的表达是否有着一定的因果联系,目前尚未见相关文献。但是鉴于上述研究及发现,我们可以推测p16可能参与了视网膜新生血管的生成,p16的低水平表达可能与ROP新生血管增生有一定的关联,在视网膜新生血管形成和增殖中发挥一定作用,利于进一步探讨视网膜新生血管的病理演变机制。

P16蛋白与CyclinD1竞争性结合CDK4/6或与CyclinD1-CDK4/6复合物结合,从而直接抑制CDK4/6的活性,而阻止细胞从G₁期进入S期,抑制细胞增殖。P16

基因主要通过CpG岛异常甲基化而失活,致使p16蛋白缺失^[11]。大量研究结果表明,p16基因外显子甲基化与p16蛋白的表达缺失有明显相关性。也有研究发现,p16基因异常甲基化导致的蛋白表达水平低下可使细胞异常增殖^[12]。启动子区域的CpG岛胞嘧啶的甲基化对p16的表达有明显的抑制作用,可以在转录水平调控基因的表达,从而导致基因的沉默。DNA甲基化的程度与转录的抑制程度有关,如果启动子较弱,可以被DNA的甲基化完全抑制^[13]。目前认为启动子CpG甲基化抑制基因转录可能与三种机制有关:(1)CpG岛发生甲基化修饰后,甲基胞嘧啶伸入DNA双螺旋,从而影响转录因子与其DNA结合;(2)序列特异性甲基化DNA结合蛋白与甲基化启动子序列结合,从而抑制转录因子与靶序列结合;(3)通过改变细胞核内甲基化结合蛋白如MeCP1、MeCP2染色质结构,从而引起基因转录受抑制^[14]。

研究表明DNA通过去甲基化作用使用过甲基化的抑癌基因重新表达,恢复其抑癌作用。5-氮胞苷(5-azacytidine,5-aza-C)可以通过抑制DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase)的活性从而达到使DNA去甲基化的作用^[15]。研究表明5-aza-CdR可直接干扰DNA甲基化。甲基化转移酶抑制剂5-aza-CdR为胞嘧啶的类似物,可以与甲基转移酶共价结合,降低甲基转移酶的生物活性。5-aza-CdR可结合到DNA链中,在胞嘧啶甲基转移酶(C5Mtases)与含5-azaC的DNA链之间形成稳固的共价化合物,从而抑制胞嘧啶的甲基化^[16],因而可有效逆转p16基因甲基化状态。

本研究结果表明,干预组大鼠视网膜中p16蛋白和mRNA的表达明显高于NS对照组。我们的结果证实了5-Aza-CdR可影响p16表达的变化。由此我们推断p16的异常表达可能与视网膜新生血管增殖密切相关,抑制p16甲基化可减少视网膜新生血管的增殖,利于进一步探讨视网膜新生血管的病理演变机制。使用p16基因甲基化抑制剂可能成为治疗ROP病变或视网膜新生血管性疾病的辅助治疗方法。

参考文献

- 1 Rivera JC, Madaan A, Zhou TE, et al. Review of the mechanisms and therapeutic avenues for retinal and choroidal vascular dysfunctions in retinopathy of prematurity. *Acta Paediatr* 2016;105(12):1421-1433
- 2 Budd SJ, Thompson H, Hartnett ME. Association of retinal vascular endothelial growth factor with avascular retina in a rat model of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 2010;128(8):1014-1021
- 3 Quimson SK. Retinopathy of prematurity: pathogenesis and current treatment options. *Growth Horm IGF Res. Neonatal Netw* 2015;34(5):284-287
- 4 Silva J, Silva JM, Garcia JM, et al. Concomitant expression of p16^{INK4a}

and p14ARF in primary breast cancer and analysis of inactivation mechanisms. *J Pathol* 2003;199(3):289-297

5 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30

6 Zhang SX, Sima J, Shao C, *et al.* Plasminogen kringle 5 reduces vascular leakage in the retina in rat models of oxygen - induced retinopathy and diabetes. *Diabetologia* 2004;47(1):124-131

7 Li You, Zhang Yuqiang, Shi Shaoyang, *et al.* Expression of CyclinD1 in a rat model of oxygen-induced retinopathy. *Neural Regen Res* 2011;6(21):1651-1655

8 李基伟, 吴学东, 潘云, 等. 儿童血管瘤内皮细胞 Cyclin D1、p16、CDK4 的表达及其意义. *中国现代医学杂志* 2013;7(20):55-59

9 Trimarchi JM, Fairchild B, Wen J, *et al.* The E2F transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(4):1519-1524

10 付桂莉, 郑源泉, 卢静静, 等. 5-氮杂胞苷逆转 P16 基因甲基化对血管瘤细胞增殖和凋亡的影响. *中国生化药物杂志* 2014;34(4):15-18

11 Min JY, Lim SO, Jung G. Downregulation of catalase by reactive

oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. *FEBS Lett* 2010;584(11):2427-2432

12 Schrage YM, Lam S, Jochemsen AG, *et al.* Central chondrosarcoma progression is associated with pRb pathway alterations: CDK4 down-regulation and p16 overexpression inhibit cell growth *in vitro*. *J Cell Mol Med* 2009;13(9A):2843-2852

13 Karim RZ, Gerega SK, Yang YH, *et al.* p16 and pRb immunohistochemical expression increases with increasing tumour grade in mammary phyllodes tumours. *Histopathology* 2010;56(7) 868-875

14 Liu TJ, Niu Y, Feng YM, *et al.* Methylation of CpG islands of p16 (INK4a) and CyclinD1 overexpression associated with progression of intraductal proliferative lesions of the breast. *Human Pathology* 2008;39(11):1637-1646

15 Gallagher WM, Bergin OE, Rafferty M, *et al.* Multiple markers for melanoma progression regulated by DNA methylation: insights from transcriptomic studies. *Carcinogenesis* 2005;26(11):1856-1867

16 Taylor EM, Farlane RJ, Price C. 5-Azacytidine treatment of the fission yeast leads to cytotoxicity and cell cycle arrest. *Mol Gen Genet* 1996;253:128-137