

CoCl₂ 诱导大鼠视网膜前体细胞表达 VEGF 的研究

梁安然¹, 赖铭莹¹, 赖平红²

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 810060080)

作者单位:¹(518040)中国广东省深圳市,暨南大学附属深圳市眼科医院;²(330006)中国江西省南昌市,江西省人民医院眼科中心

作者简介:梁安然,在读硕士研究生,研究方向:青光眼、白内障。
通讯作者:赖铭莹,博士,主任医师,副教授,硕士研究生导师,研究方向:青光眼、眼底病、白内障。 laimydoc@163.com

收稿日期:2013-01-11 修回日期:2013-04-24

Effect of hypoxia induced by CoCl₂ on VEGF expression in RPCs

An-Ran Liang¹, Ming-Ying Lai¹, Ping-Hong Lai²

Foundation item: National Nature Science Foundation of China (No. 810060080)

¹Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China;²Eye Center, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Ming-Ying Lai. Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China. laimydoc@163.com
Received:2013-01-11 Accepted:2013-04-24

Abstract

• AIM: To investigate the cobalt chloride (CoCl₂) simulated hypoxic environment's effect on the gene expression and protein secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) of rats' retinal progenitor cells (RPCs).

• METHODS: RPCs were separated, cultured and identified by the use of neurospheres-adhesive culture. RT-PCR and ELISA were used to detect the change of RPCs VEGF's expression after 24-hour intervention of CoCl₂ with different concentration (0, 50, 100, 150 μmol/L and 200 μmol/L), and detect the change of RPCs VEGF's expression in 150 μmol/L CoCl₂ for different period (0, 12, 24, 36, 48, 72 hours).

• RESULTS: The RPCs cultured by neurospheres-adhesive culture system could highly express the specificity of stem cells (Nestin), and express mature retinal neuron after natural differentiation. After culturing them in the hypoxic environment for the same period, the gene express of VEGF gradually increased and then decreased with the increasing concentration of CoCl₂, and peaked ($P \leq 0.05$) when the concentration of CoCl₂ was 150 μmol/L. When the concentration of CoCl₂ was

150 μmol/L, the gene expression of VEGF also gradually increased and then decreased with the increasing hypoxia intervention period, and peaked ($P \leq 0.05$) when the hypoxia intervention period was 36 hours, the change of protein and gene expression were consistent.

• CONCLUSION: The RPCs cultured by neurospheres-adhesive culture system can better express the specificity of stem cells. Under CoCl₂ simulated hypoxic environment, hypoxia strengthens RPCs VEGF's secretion and dependent on the time and dose.

• KEYWORDS: hypoxia; retinal progenitor cell; vascular endothelial growth factor; CoCl₂

Citation: Liang AR, Lai MY, Lai PH. Effect of hypoxia induced by CoCl₂ on VEGF expression in RPCs. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(5):850-853

摘要

目的:探讨氯化钴(CoCl₂)模拟缺氧环境下对大鼠视网膜前体细胞(RPCs)中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)基因表达及蛋白分泌的影响。

方法:全神经球贴壁法分离、培养、鉴定RPCs。应用RT-PCR及ELISA,检测不同浓度CoCl₂(0, 50, 100, 150, 200 μmol/L)干预24h后RPCs中VEGF表达的变化,检测150 μmol/L CoCl₂作用不同时间(0, 12, 24, 36, 48, 72h)RPCs中VEGF表达的变化。

结果:全神经球贴壁法培养的RPCs高表达神经干细胞特异性标记(Nestin),自然分化后表达视网膜细胞标志性抗原Rhodopsin, MAP-2和GFAP,在缺氧培养时间相同的情况下,VEGF基因的表达随着CoCl₂浓度的增加而逐渐增加而后降低,CoCl₂为150 μmol/L时达到峰值($P \leq 0.05$)。当CoCl₂浓度为150 μmol/L培养不同时间时,随着缺氧干预时间的延长,VEGF基因的表达亦是逐渐增加而后降低,于36h时达到峰值($P \leq 0.05$),蛋白与基因表达的变化基本一致。

结论:全神经球贴壁法培养RPCs能较好地表达其干细胞特性。CoCl₂模拟缺氧环境下,缺氧使RPCs中VEGF的分泌增强并具有时间和剂量依赖性。

关键词:缺氧;视网膜前体细胞;血管内皮生长因子;CoCl₂
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.05.03

引用:梁安然,赖铭莹,赖平红. CoCl₂诱导大鼠视网膜前体细胞表达VEGF的研究. 国际眼科杂志 2013;13(5):850-853

0 引言

视网膜缺血缺氧是糖尿病性视网膜病变等多种视网膜疾病的主要病理特征,以视网膜新生血管形成及纤维化为特点,迄今没有满意的治疗方法。视网膜前体细胞(retinal progenitor cells, RPCs)具有神经干细胞特性,具有多系分化和趋化能力,存在于胚胎大鼠视网膜以及成人睫状体区,玻璃体腔内干细胞移植被认为是治疗视网膜疾病最有前景的方法之一,将给不可逆性致盲眼病患者带来新的希望。此外,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)被认为是最重要的眼内新生血管生长因子,是促进糖尿病性视网膜病变等多种以新生血管形成为病理特点的眼部疾病发生发展的关键介质。本实验通过氯化钴(CoCl_2)模拟缺氧,研究 RPCs 在不同程度缺氧条件下 VEGF 表达的变化,为进一步探讨其作用机制及动物实验和临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 孕龄 17d 的 SD 大鼠(广东省动物实验中心提供)、流式细胞仪(美国, Beckman 公司)、酶标仪(芬兰 Labsystems 公司)、荧光 PCR 仪(美国, ABI 公司)、视网膜前体细胞培养液[DMEM/F12, $1 \times N_2$ 添加剂(Gibco)、100U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素、20ng/mL EGF (PeproTech)、20ng/mL bFGF (PeproTech)、2mmol/L GlutaMAX (Gibco)]、 CoCl_2 (Sigma)、上下游引物(英潍捷基公司)、ELISA 试剂盒(依科赛生物公司)、Nestin, Rhodopsine, MAP-2 和 GFAP 抗体(Santa Cruz)。

1.2 方法

1.2.1 RPCs 的分离和培养与鉴定 无菌条件下取出胎龄 17d 的 SD 大鼠眼球, D-Hanks 平衡盐液冲洗 3 次, 在解剖显微镜下仔细剪除眼球周围结缔组织及视神经, 沿角巩缘剪开眼球, 去除角膜、虹膜、晶状体、巩膜及脉络膜, 剪除视盘部分, 将分离出的视网膜置于装有 D-Hanks 液的培养皿中, 用显微剪剪碎组织, 加 2.5g/L 胰酶(含 0.3g/L EDTA) 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 15min, 吸管反复吹打, 制成密度为 $(5 \sim 10) \times 10^6/\text{mL}$ 单细胞悬液, 接种于 25 cm^2 培养瓶中, 3d 换 1 次液, 培养 1wk 后, 部分细胞形成大神经球样结构并悬浮生长, 将低速离心(700r/min, 5min)后分离出的神经球接种于预先包被 poly-D-lysine 的培养瓶中, 细胞呈贴壁生长。取对数生长期的细胞行免疫组化染色及流式细胞术检测细胞 Nestin 阳性率(具体操作步骤按试剂说明书进行)。加入 100mL/L 胎牛血清进行分化培养 7d, 免疫组化法鉴定视网膜细胞标记抗原 Rhodopsine, MAP-2 和 GFAP(具体操作步骤按试剂说明书进行)。

1.2.2 实验分组 不同浓度组(分别含 0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CoCl_2 的干细胞液培养 RPCs 24h), 以 0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CoCl_2 组为对照组, 余为实验组; 不同时间组(含 150 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CoCl_2 的干细胞液培养 RPCs 0, 12, 24, 36, 48, 72h), 以 0h 组为对照组, 余为实验组。

1.2.3 VEGF mRNA 表达的 RT-PCR 检测 当贴壁生长良好的 RPCs 进入对数生长期, 换等量新鲜干细胞培养

液后, 按上述分组条件加入 CoCl_2 , 严格无菌条件下, 提取细胞总 RNA, 用分光光度计测定抽提的 RNA 浓度和纯度, 逆转录为 cDNA(步骤严格按 TaKaRa 试剂盒说明进行)。采用 Premier 5.0 设计荧光定量 PCR 引物, VEGF 上游引物: TGCAACGCCAGTCTGTGTTT; 下游引物: GCGGGCTGCTGCAATG。GAPDH 上游引物: TGCCACTCA GAAGACTGTGG; 下游引物: TTCAGCTCTGGGATGACCTT, 引物均由 Invitrogen 公司合成。PCR 的反应条件为: Cycle 1:($\times 1$) 94 $^{\circ}\text{C}$, 3 ~ 4min; Cycle 2:($\times 30$) 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30s; Cycle 3:($\times 1$) 72 $^{\circ}\text{C}$ 10min, 16 $^{\circ}\text{C}$ 5min。采用 SYBRGREN 荧光定量 PCR 检测 VEGF 基因的表达, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 的方法对 CT 值进行分析。

1.2.4 VEGF 蛋白表达的 ELISA 检测 当贴壁生长良好的 RPCs 进入对数生长期, 换等量新鲜干细胞培养液后, 按上述分组条件加入 CoCl_2 , 完全收集细胞的培养上清, 每组设 3 个复孔, 严格按照 ELISA 试剂盒的说明书进行操作。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(OD 值), 用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式, 将样品的 OD 值代入方程式, 计算出样品浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品 VEGF 的实际浓度。

统计学分析: 所有实验的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据采用 SPSS 13.0 软件分析。各组间的比较用单因素方差分析, 以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SD 大鼠中 RPCs 的形态学观察及鉴定 从胎龄 17d SD 大鼠分离、扩增 RPC。自由悬浮培养 3d 后, 部分细胞形成单克隆神经球样形态, 随着培养天数的增加, 神经球逐渐增大, 培养至第 7d, 低速离心得到的神经球接种到预先用 poly-D-lysine 包被的细胞瓶中, 神经球逐渐变得扁平, 伸出触角并相互融合, 5 ~ 7d 后细胞长满瓶底。贴壁培养 7d 后, 流式细胞学及免疫组织化学显示, RPCs 高表达 nestin(阳性率 > 90%, 图 1)。加入 100mL/L 胎牛血清进行分化培养 7d, 免疫组织化学法鉴定视网膜细胞标记抗原 Rhodopsine, MAP-2 和 GFAP, 均为阳性反应(图 2)。

2.2 SD 大鼠 RPCs 中 VEGF mRNA 的表达 CoCl_2 模拟缺氧环境下 RT-PCR 法检测 VEGF, 0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CoCl_2 作用 24h, 随着 CoCl_2 浓度的增加, VEGF 的表达逐渐增高后降低, 150 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时达高峰(图 3)。150 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CoCl_2 作用 0, 12, 24, 36, 48, 72h, 随着作用时间的延长, VEGF 的表达逐渐增高后降低, 36h 时达高峰(图 4)。

2.3 SD 大鼠 RPCs 中 VEGF 蛋白的表达 CoCl_2 模拟缺氧环境下 ELISA 法检测 VEGF, VEGF 蛋白的变化趋势基本同基因的表达, 0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CoCl_2 作用 24h, 随着 CoCl_2 浓度的增加, VEGF 的表达逐渐增高后降低, 150 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时达高峰(图 5)。150 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CoCl_2 作用 0, 12, 24, 36, 48, 72h, 随着作用时间的延长, VEGF 的表达逐渐增高后降低, 36h 时达高峰(图 6)。

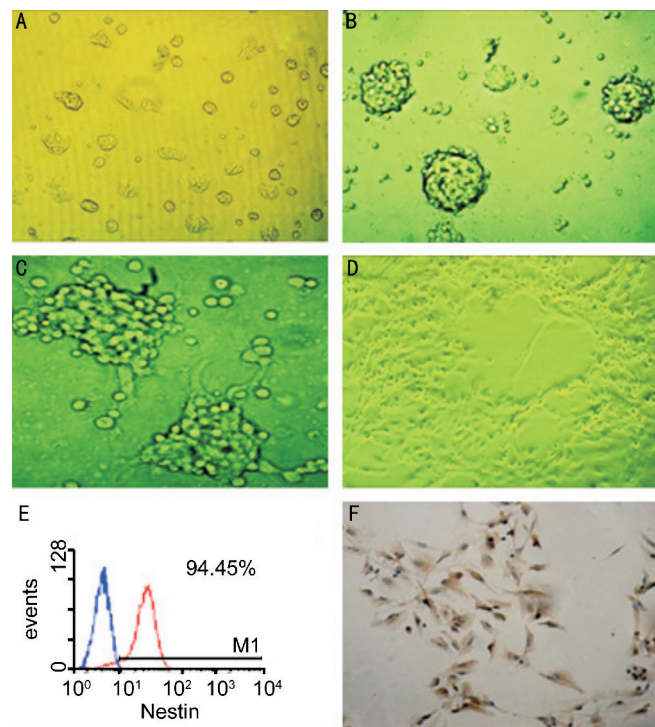


图1 SD大鼠中RPCs的培养与鉴定 A:悬浮培养3d($\times 100$); B:悬浮培养7d($\times 100$); C:神经球贴壁法培养3d($\times 100$); D:神经球贴壁法培养7d($\times 100$); E:流式细胞学检测 nestin 阳性率 $>90\%$; F:免疫组化法检测 nestin 阳性率 $>90\%$ ($\times 100$)。

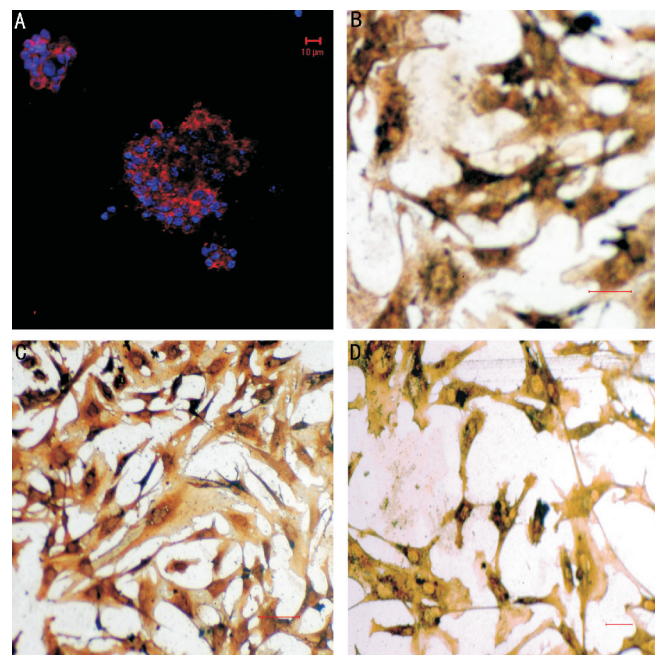


图2 SD大鼠中RPCs的分化 A: nestin 神经干细胞标记(激光共聚焦显微镜, $\times 200$); B: MAP2 视网膜神经元细胞标记($\times 200$); C: Rhodopsin 视杆细胞标记($\times 200$); D: GFAP 胶质细胞(müller细胞)标记($\times 200$)。

3 讨论

本实验培养 RPCs 所应用的全神经球贴壁法,是将单纯的悬浮培养及贴壁培养法结合,既克服了悬浮培养神经球中心细胞营养缺乏的弊端,又改善了贴壁培养 RPCs 易分化的缺憾,全神经球培养法获得的细胞高表达神经干细胞标记 nestin,能够较好地保持其干细胞的未分化状

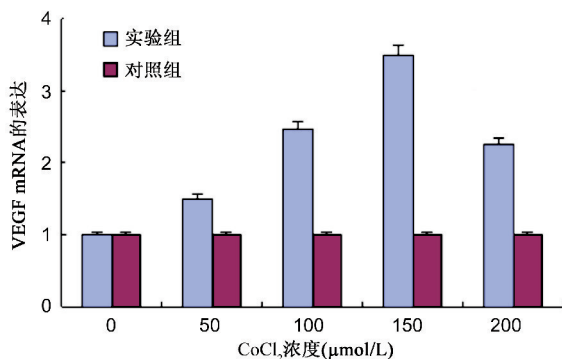


图3 不同浓度 CoCl_2 处理 24h 后 VEGF mRNA 表达的变化。

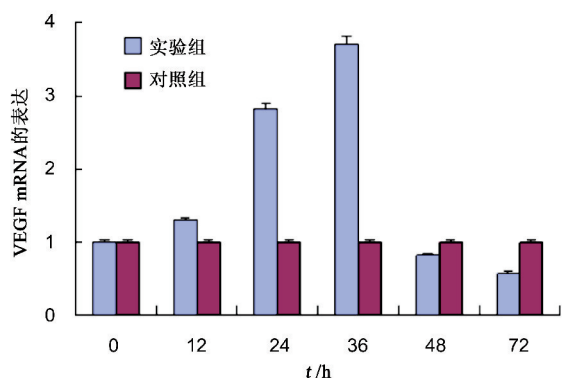


图4 $150\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理不同时间后 VEGF mRNA 表达变化。

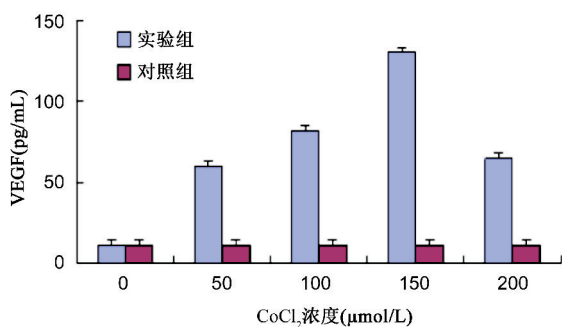


图5 不同浓度 CoCl_2 处理 24h 后 VEGF 蛋白表达的变化。

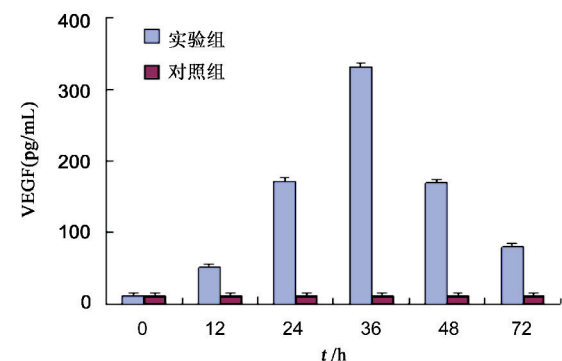


图6 $150\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理不同时间后 VEGF 蛋白表达的变化。

态,经自然分化后表达视网膜细胞标志性抗原 nestin, Rhodopsine, MAP-2 和 GFAP,从而此种方法成为一种更为理想的获得高质量 RPCs 的培养方法,为后续实验提供充足、状态良好的实验细胞^[1]。而 RPCs 也被认为在细胞治疗方面具有独特的优越性^[2,3]。

新生血管形成是缺血性视神经病变基本病理变化之一,VEGF 被认为是最重要的眼内新生血管生长因子,其生物学效应是通过与其特异性受体结合而发挥作用

的^[4,5]。VEGF受体主要有VEGFR-1(Flt-1)和VEGFR-2(Flk-1/KDR)^[4],具体包括:内皮细胞的存活(通过PI3K/Akt通路)、迁移(通过p38MAPK通路)和增殖(通过Raf/MEK/Erk通路)^[5-8]。另外研究表明,在视网膜的发育过程中,血管发育和视网膜神经组织发育相互偶联^[9]。RPCs既表达神经类细胞标记,又分泌VEGF等血管相关因子^[10]。因此,研究缺氧状态对RPCs中VEGF表达的影响,对进一步探寻新生血管性眼病的新型治疗方法奠定理论基础。

CoCl₂化学性模拟低氧的机制主要是Co²⁺可取代传感器原卟啉环上含铁血红蛋白的Fe²⁺,螯合于血红蛋白中,钴原卟啉与氧的亲合力很低,破坏细胞对缺氧状态的感受能力,上调缺氧诱导因子的表达,继而模拟缺氧环境^[11],另外适当浓度的CoCl₂预处理可上调干细胞的抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,下调凋亡前蛋白Bax表达,从而发挥保护细胞的作用^[12]。因此,CoCl₂模拟细胞缺氧环境操作简单易控制,体外实验与体内缺氧状态下的研究结果具有很强的可比性^[13]。

本实验利用CoCl₂预处理模拟缺氧环境,比较不同浓度CoCl₂作用相同时间以及相同浓度CoCl₂作用不同时间后,RPCs中VEGF的表达变化。结果表明,在缺氧培养时间相同的情况下,VEGF基因的表达随着CoCl₂浓度的增加而逐渐增加而后降低,CoCl₂为150μmol/L时达到峰值($P<0.05$)。当CoCl₂浓度为150μmol/L培养不同时间时,随着缺氧干预时间的延长,VEGF基因的表达亦是逐渐增加而后降低,于36h时达到峰值($P<0.05$),蛋白与基因表达的变化趋势基本一致。值得一提的是,从本实验可以看出,在150μmol/L CoCl₂处理72h后,VEGF mRNA的表达量有下降趋势,甚至低于对照组。本研究表明VEGF的表达对CoCl₂模拟的缺氧环境具有时间和浓度依赖性,并呈现出表达量先增多后减少的趋势,其机制可能是缺氧环境下,在基因转录水平缺氧诱导因子1α(HIF-1α)与VEGF 5'增强子相互作用而实现,使VEGF转录和表达增强^[14,15];在肿瘤的研究中发现SEMA3A和VEGF竞争性与NRP-1结合,相互间可被视为拮抗剂^[16]。在氧诱导的缺血性视网膜病变模型中,视网膜细胞分泌SEMA3A,可消退已形成的新生血管,并能阻止缺氧的视网膜组织形成新的新生血管^[17,18]。本实验两组数据推段,VEGF表达量的逐渐减少有可能和上述机制有关,亦有可能较长时间处在缺氧状态下,细胞活性会受到一定程度的影响,还有待进一步实验证实。

总之,本实验通过全神经球贴壁培养法获得了高纯度RPCs,在CoCl₂诱导缺氧环境下VEGF基因和蛋白的表达量逐渐增高后降低,并具有时间和浓度依赖性,为以后探讨其作用机制及后续动物实验奠定了实验基础,并为缺血性视网膜疾病的治疗提供了理论依据。

参考文献

1 赖平红,唐仕波,林少芬,等.全神经球贴壁培养法体外长期扩增

- 视网膜前体细胞.眼科学报2006;(22):92-97
- 2 Jiang CH, Zhang MN, Young M, et al. Subretinal transplantation of mouse retinal progenitor cells. *Neural Regen Res* 2011;6(7):500-504
- 3 Seiler MJ, Aramant RB. Cell replacement and visual restoration by retinal sheet transplants. *Prog Retin Eye Res* 2012;31(6):661-687
- 4 Rahimi N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Front Biosci* 2006;11:818-829
- 5 Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, et al. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(5):359-371
- 6 Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358(19):2039-2049
- 7 Kawamura H, Li X, Goishi K, et al. Neuropilin-1 in regulation of VEGF-induced activation of p38MAPK and endothelial cell organization. *Blood* 2008; 112(9):3638-3649
- 8 Lu KT, Sun CL, Wo PY, et al. Hippocampal neurogenesis after traumatic brain injury is mediated by vascular endothelial growth factor receptor-2 and the Raf/MEK/ERK cascade. *J Neurotrauma* 2011;28(3):441-450
- 9 Nishiguchi KM, Nakamura M, Kaneko H, et al. The role of VEGF and VEGFR2/Flk1 in proliferation of retinal progenitor cells in murine retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(9):4315-4320
- 10 Hashimoto T, Zhang XM, Chen BY, et al. VEGF activates divergent intracellular signaling components to regulate retinal progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *Development* 2006;133(11):2201-2210
- 11 Ardyanto TD, Osaki M, Tokuyasu N, et al. CoCl₂-induced HIF-1α expression correlates with proliferation and apoptosis in MKN-1 cells: a possible role for the PI3K/Akt pathway. *Int Jm Oncol* 2006;29(3):549-555
- 12 Shrivastava K, Shukla D, Bansal A, et al. Neuroprotective effect of cobalt chloride on hypobaric hypoxia-induced oxidative stress. *Neurochem Int* 2008;52(3):368-375
- 13 Hara A, Niwa M, Aoki H, et al. A new model of retinal photoreceptor cell degeneration induced by a chemical hypoxia-mimicking agent, cobalt chloride. *Brain Res* 2006;1109(1):192-200
- 14 Liu X, Du J, Xi Q. HIF-1α ODD polypeptides increased the expression of HIF1 and VEGF in hypoxic rat cortical neuron. *Neurol Sci* 2011;32(6):1029-1033
- 15 Dong X, Wang YS, Dou GR, et al. Influence of Dll4 via HIF-1α-VEGF signaling on the angiogenesis of choroidal neovascularization under hypoxic conditions. *PLoS One* 2011;6(4):e18481
- 16 Nguyen QD, Rodrigues S, Rodrigue CM, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-165 and semaphorin 3A-mediated cellular invasion and tumor growth by the VEGF signaling inhibitor ZD4190 in human colon cancer cells and xenografts. *Mol Cancer Ther* 2006;5(8):2070-2077
- 17 Guttman - Raviv N, Shraga - Heled N, Varshavsky A, et al. Semaphorin-3A and semaphorin-3F work together to repel endothelial cells and to inhibit their survival by induction of apoptosis. *J Biol Chem* 2007;282(36):26294-26305
- 18 Joyal JS, Sitaras N, Binet F, et al. Ischemic neurons prevent vascular regeneration of neural tissue by secreting semaphorin 3A. *Blood* 2011;117(22):6024-6035