

CD147 在激光诱导的大鼠脉络膜新生血管中的表达

王雯秋 陆峰青 王泓 孙晓东

200080 上海市第一人民医院眼科

通信作者:孙晓东, Email: xdsun@sjtu.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.10.007

【摘要】 **背景** 脉络膜新生血管(CNV)是眼底多种疾病的共有病理改变,是造成中心视力严重损害的主要原因之一。基质金属蛋白酶(MMPs)诱导因子 CD147 能通过旁分泌作用刺激多种细胞 MMPs 表达,降解细胞间质和基底膜成分,具有促进血管新生作用。 **目的** 通过建立激光诱导的棕色挪威(BN)大鼠 CNV 动物模型,观察 CD147 和血管内皮生长因子(VEGF)在 CNV 形成过程中的动态表达。 **方法** 将 30 只清洁级 BN 大鼠按照随机数字表法分为正常对照组 6 只和激光光凝组 24 只,于光凝后 1、7、14 和 21 d 通过荧光素眼底血管造影(FFA)观察 CNV 形成;采用 Western blot 法分别检测正常对照组和激光光凝后 1、7、14 和 21 d 组大鼠视网膜色素上皮(RPE)-脉络膜-巩膜复合物中 CD147 蛋白相对表达水平的变化;采用 ELISA 法检测各组大鼠玻璃体内 VEGF 质量浓度变化。 **结果** FFA 检查显示,激光光凝后 7 d 开始出现盘状荧光素渗漏,激光光凝后 14 d 形成 CNV。正常对照组激光光凝前,光凝后 1、7、14 和 21 d,大鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合物中 CD147 蛋白的相对表达量分别为 1.00 ± 0.43 、 0.97 ± 0.53 、 0.99 ± 0.45 、 1.56 ± 0.67 和 2.27 ± 0.54 ,玻璃体内 VEGF 质量浓度分别为 (72.96 ± 29.95) 、 (79.36 ± 10.46) 、 (103.82 ± 32.94) 、 (166.05 ± 21.54) 和 (195.64 ± 39.90) pg/ml,总体比较差异均有统计学意义(CD147: $F = 10.95$, $P < 0.01$; VEGF: $F = 304.50$, $P < 0.01$);激光光凝后 14 d 和 21 d,大鼠 CD147 蛋白和 VEGF 的相对表达量均较正常对照组明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。 **结论** CD147 在激光诱导的大鼠 CNV 中进行性升高,与 VEGF 的表达趋势一致,CD147 可能参与 CNV 的早期形成,在眼部血管新生中发挥重要作用。

【关键词】 脉络膜新生血管; CD147; 血管内皮生长因子; 基质金属蛋白酶

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81300778)

Expression of CD147 in laser-induced rat choroidal neovascularization model Wang Wenqiu, Lu Fengqing, Wang Hong, Sun Xiaodong

Department of Ophthalmology, Shanghai General Hospital, Shanghai 200080, China

Corresponding author: Sun Xiaodong, Email: xdsun@sjtu.edu.cn

【Abstract】 **Background** The pathology of choroidal neovascularization (CNV) is not clear. CD147 plays a critical role in angiogenesis through activating matrix metalloproteinases (MMPs) and degradation of extracellular matrix (ECM). However, the study of CD147 in CNV is rare. **Objective** This study was to investigate the expression of CD147 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in laser-induced rat CNV model. **Methods** Thirty clean BN rats were divided into normal control group (six rats) and laser group (24 rats) according to the random number table. CNV was induced on laser photocoagulation group rats using 532 nm multiple-wave length photocoagulation. The development of CNV was followed up by fundus fluorescence angiography (FFA) on 1 day, 7, 14 and 21 days post-photocoagulation. The expression of CD147 protein in retinal pigment epithelium (RPE)-choroid-sclera complex was examined by Western blot in normal control group and 1 day, 7, 14, 21 days post-photocoagulation group. The vitreous VEGF concentrations of those groups were detected by ELISA. **Results** Disk like fluorescein leakage was detected on 7 days after photocoagulation, and CNV was formed on 14 days after photocoagulation. The expressions of CD147 protein were 1.00 ± 0.43 , 0.97 ± 0.53 , 0.99 ± 0.45 , 1.56 ± 0.67 and 2.27 ± 0.54 , and the concentrations of vitreous VEGF were (72.96 ± 29.95) , (79.36 ± 10.46) , (103.82 ± 32.94) , (166.05 ± 21.54) and (195.64 ± 39.90) pg/ml in normal control group and 1 day, 7, 14, 21 days post-photocoagulation group, with significant differences among the groups (CD147: $F = 10.95$, $P < 0.01$; VEGF: $F = 304.50$, $P < 0.01$). The expressions of CD147 and VEGF were significantly higher in the 14, 21 days post-photocoagulation groups than those in the normal

control group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** The expression of CD147 increases as the induction of CNV, in accordance with the expression of VEGF. CD147 may play an important role in the early development of CNV.

[**Key words**] Choroidal neovascularization; CD147; Vascular endothelial growth factor; Matrix metalloproteinases

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81300778)

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是眼底多种疾病共同的病理改变, 常见于年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD)、中心性渗出性脉络膜视网膜炎、眼组织胞浆菌病、眼底血管样条纹、病理性近视、外伤性脉络膜破裂等^[1-3]。CNV 发生时, 新生血管通过 Bruch 膜裂口侵入色素上皮或视网膜下区域, 由于其管壁通透性高于正常血管, 极易引起反复出血、渗出, 最终导致黄斑区瘢痕形成, 是造成中心视力严重损害的主要原因之一^[4]。其中, 新生血管芽突破 Bruch 膜被认为是 CNV 早期形成的关键步骤。研究发现, CD147 能通过旁分泌作用刺激多种基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 的表达, 进而降解细胞间质和基底膜, 在肿瘤血管的新生、肿瘤侵袭过程中起重要作用^[5]。目前, CD147 在脉络膜新生血管发生中的作用及其机制尚不明确。MMPs 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 存在于多种人类肿瘤组织中, 并且在肿瘤侵袭、转移和肿瘤新生血管生成过程中起着非常重要的作用。MMPs 能降解肿瘤细胞周围的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 和基底膜, 增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力, 此外还可以降解毛细血管内皮下基底膜和 ECM, 使内皮细胞向外迁移并增生, 形成新的血管和基底膜。VEGF 可促进血管内皮细胞增生, 并增加微血管的通透性, 促进纤维蛋白沉积和血浆蛋白外渗, 诱导内皮细胞合成大量蛋白水解酶, 有利于内皮细胞的迁移和新生血管的生成。本实验拟动态观察 CD147 在激光诱导 CNV 模型大鼠中的表达变化, 探讨其与 VEGF-A 的关系, 以期进一步明确其在 CNV 发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 6~8 周龄雄性 BN 大鼠 30 只, 体质量 150~180 g, 由中国科学院上海实验动物中心提供。实验动物的喂养和使用遵循上海市第一人民医院动物保护与使用委员会规定。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔抗大鼠 CD147 单克隆抗体、兔抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); 山羊抗兔 IgG-HRP (上海碧云天生物技术有限公

司); 大鼠 VEGF-ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司)。硝酸纤维素膜 (美国 Millipore 公司)。全自动酶标仪、凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及 CNV 模型的建立 采用随机数字表法将大鼠分为正常对照组 6 只和激光光凝组 24 只。参照文献 [6] 的方法建立激光诱导 CNV 大鼠模型: BN 大鼠单眼经复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳, 质量分数 10% 水合氯醛腹腔内注射麻醉, 眼前节和眼底检查均正常者采用眼底 532 nm 多波长激光, 设定激光参数功率为 100 mW, 光斑直径为 50 μm , 持续时间为 50 ms; 距离视盘 1.5~2.0 视盘直径处围绕视盘等距离光凝 6 个点, 光凝后有气泡产生或伴有轻度出血为击破 Bruch 膜的标志。

1.2.2 荧光素眼底血管造影观察 CNV 形成 分别于激光光凝后 1、7、14、21 d 应用随机数字表法随机选取 6 只大鼠, 麻醉、扩瞳后腹腔内注射质量分数 20% 荧光素钠注射液 0.1 ml, 立即行荧光素眼底血管造影 (fundus fluorescence angiography, FFA) 检查, 根据造影晚期 (>5 min) 有无荧光素渗漏来判断 CNV 是否生成。FFA 中 CNV 的判断应符合以下特点: (1) 在造影早期, 即动脉前期或动脉期即显影。(2) 与视网膜血管系统没有联系。(3) 荧光素迅速渗漏且有一定的积存范围, 后期形成高荧光区。

1.2.3 Western blot 法检测视网膜色素上皮-脉络膜-巩膜复合物中 CD147 蛋白的表达 分别于光凝后 1、7、14、21 d 应用随机数字表法随机选取 6 只大鼠, 10% 水合氯醛过量麻醉处死后立即摘取眼球。去除眼球周围的结缔组织, 沿角巩膜缘剪开, 去除角膜、晶状体和视网膜, 保留视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE)-脉络膜-巩膜复合物, 加入蛋白裂解液提取蛋白, BCA 法测定蛋白质量浓度。取 40 μg 蛋白与蛋白上样缓冲液混合后 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 使其变性, 加入配置好的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳。电泳结束后将凝胶上的蛋白湿转法转印至硝酸纤维素膜上, 50 g/L 脱脂奶粉 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, 加入兔抗大鼠 CD147 单克隆抗体 (1:1 000)、兔抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体 (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 洗膜后加入山羊抗兔 IgG-HRP 二抗 (1:2 000), 室温孵育 2 h, PBS 洗

膜 3 次,每次 10 min。ECL 化学发光显色,化学发光仪检测并拍照。通过 Image J 图像分析系统进行灰度分析,以 GAPDH 为内参照。目的蛋白的相对表达强度 = 目的蛋白吸光度(A)值/内参蛋白 GAPDH 条带 A 值。实验结果重复 3 次,取平均值。

1.2.4 ELISA 法检测各组玻璃体腔内 VEGF 质量浓度 参照大鼠 VEGF-ELISA 试剂盒说明书步骤,测定大鼠玻璃体样品中 VEGF 蛋白质量浓度,反应终止后用酶标仪测定波长 450 nm 处 A 值。制作 VEGF 标准曲线,并计算各组 VEGF 质量浓度。每组 6 个样品,实验重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标数据经 Kolmogorov-Smirnov 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组 CD147 蛋白的相对表达量、VEGF 质量浓度的总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 激光诱导大鼠 CNV 模型的建立

FFA 结果显示,正常 BN 大鼠视网膜血管呈放射状走行,脉络膜血管呈网状分布,造影全程无荧光素渗漏。视网膜激光光凝后 1 d,光斑部位视网膜急性水肿,呈白色,少数可出现视网膜内层及视网膜下出血,荧光素注射后 2 min,光凝区呈盘状荧光素着染(图 1A);光凝后 7 d,造影前期光凝区呈点状强荧光,之后呈网状荧光,造影晚期出现荧光素渗漏,证实 CNV 模型成功建立;光凝后 14 d,光凝区出现盘状荧光素渗漏,呈强荧光(图 1B),并持续至光凝后 28 d。

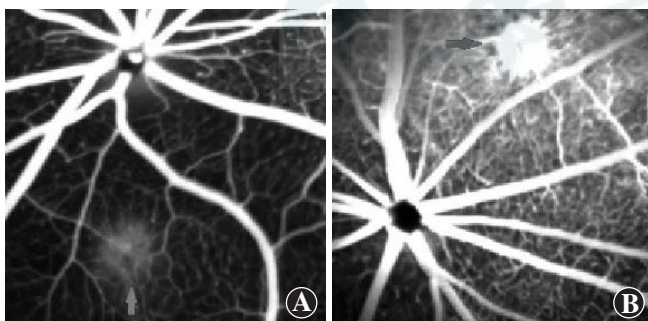


图 1 FFA 观察大鼠 CNV 的形成 A: 视网膜激光光凝后 1 d,光斑部位视网膜急性水肿,呈白色,光凝区呈盘状荧光素着染(箭头) B: 视网膜激光光凝后 14 d,出现盘状荧光素渗漏(箭头)

2.2 各组大鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合物中 CD147 蛋白的相对表达量比较

Western blot 检测结果显示,正常对照组 CD147 蛋

白在正常 RPE-脉络膜-巩膜复合物中的表达条带较弱,激光光凝后第 7 天 CD147 蛋白表达开始增加,至激光光凝后第 21 天时,CD147 蛋白的表达仍旧维持在较高水平(图 2A)。正常对照组激光光凝前、激光光凝后 1、7、14 和 21 d 组大鼠眼 RPE-脉络膜-巩膜复合物中 CD147 蛋白的相对表达量分别为 1.00 ± 0.43 、 0.97 ± 0.53 、 0.99 ± 0.45 、 1.56 ± 0.67 和 2.27 ± 0.54 ,各组 CD147 蛋白的相对表达量总体比较差异有统计学意义($F = 10.95, P < 0.01$),其中激光光凝后 14 d 和 21 d 组大鼠 CD147 蛋白相对表达量明显高于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 2B)。

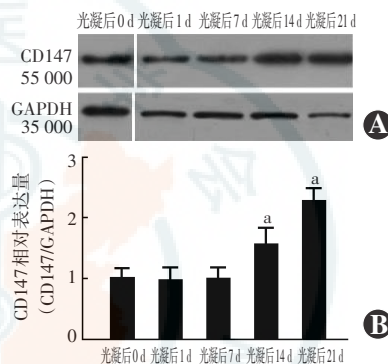


图 2 各组大鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合物中 CD147 蛋白相对表达量比较 A: Western blot 法检测显示 CD147 蛋白表达条带在正常对照组(光凝后 0 d)中较弱,随着激光光凝后时间的延长,CD147 蛋白表达条带逐渐增强 B: 各组大鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合物中 CD147 蛋白相对表达

量的比较 $F = 10.95, P < 0.01$ 。与正常对照组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-t 检验, $n = 6$)

2.3 各组大鼠玻璃体腔内 VEGF 表达变化

正常对照组大鼠玻璃体腔内 VEGF 质量浓度为 (72.96 ± 29.95) pg/ml,激光光凝后 1、7、14 和 21 d 组大鼠玻璃体腔内 VEGF 质量浓度分别为 (79.36 ± 10.46) 、 (103.82 ± 32.94) 、 (166.05 ± 21.54) 和 (195.64 ± 39.90) pg/ml,各组 VEGF 质量浓度总体比较差异有统计学意义($F = 304.50, P < 0.01$),其中激光光凝后 14 d 和 21 d 组 VEGF 质量浓度显著高于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 3)。

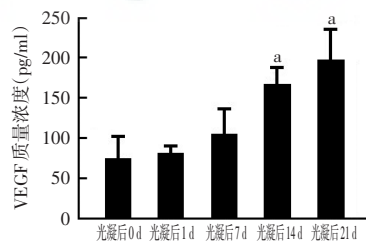


图 3 各组大鼠玻璃体腔内 VEGF 质量浓度比较 $F = 304.50, P < 0.01$ 。与正常对照组(光凝后 0 d)比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-t 检验, $n = 6$) VEGF: 血管内皮生长因子

3 讨论

CNV 形成是眼内多种促新生血管因子与抗血管形成因子共同调控的程序化级联过程,促血管新生因子活化内皮细胞,诱导内皮细胞增生、迁移,形成原始血管芽,产生蛋白水解酶,降解基膜及 ECM,侵入无血

管区,形成新的毛细血管。MMPs 活化引起的 Bruch 膜降解等 ECM 变化是 CNV 早期的重要病理机制^[7]。

MMPs 是一组降解胶原等 ECM 的裂解酶,是降解 ECM 的主要成分,促使 RPE 细胞与基底膜分离、增生和移行。多种视网膜细胞可产生多种 MMPs,包括 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MT1-MMP 和 MT2-MMP^[8-9]。CD147 为 ECM 金属蛋白酶诱导物,可刺激多种 MMPs 的表达。研究发现,肿瘤细胞表面的 CD147 可刺激成纤维细胞生成 MMP-1,被 MMP-1 裂解的 CD147 可溶性细胞外片段可正反馈诱导成纤维细胞生成更多的 MMP-1,CD147 可通过磷脂酶 A2 和 5-脂氧酶激活通路诱导成纤维细胞生成 MMP-2^[10]。近年来研究发现,AMD 体外细胞模型中 RPE 细胞排出的微泡蛋白成分中含有 CD147^[11]。杨华伟等^[12]研究显示,高氧组大鼠视网膜各层可见 CD147 有大量表达。本研究显示,正常的 RPE-脉络膜-巩膜复合物中 CD147 呈低表达,而在激光诱导的 CNV 模型组中,随观察时间的延长,CD147 表达持续增加,至激光光凝后 3 周,仍维持较高水平的表达。结合 FFA 动态观察,本研究推测,在 CNV 形成早期,由于各种病理因素导致 Bruch 膜出现裂隙,CD147 表达量升高,诱导大量 MMPs 活化,进一步降解基膜及 ECM,为血管内皮细胞的增生、移行、出芽提供有利的微环境。因此,推测 CD147 在眼部新生血管生成中发挥了重要作用,其可能参与 CNV 的早期形成。

VEGF 是目前公认的眼部促血管新生最重要的分子之一。研究证实,CD147 可激活 PI3K-Akt 通路,诱导肿瘤细胞及内皮细胞表达 VEGF,引起肿瘤生长及血管生成。VEGF 与内皮细胞表面的 CD147 可以自身作为受体和配体通过同源作用诱导细胞生成 MMPs^[13-14]。本研究发现,CNV 造模后的 7~14 d 是 CNV 生长的高峰期,在 CNV 造模后 7 d,大鼠脉络膜组织中 CD147 表达量开始增加,与其相应的玻璃体腔内的 VEGF 质量浓度也发生相应改变,提示 CD147 对 VEGF 的表达可能存在潜在的调控作用。

本研究结果存在一定的局限性,如样本量较小、观察时间较短等。本研究结果证实了 CD147 在 CNV 模型组织中的表达,CD147 参与 CNV 的调控机制可能是作为上游因子诱导 MMPs 生成,同时参与调控 CNV 中 VEGF 的生成,在今后的实验中我们将进一步探讨其具体机制以及相关信号通路。综上所述,本研究结果提示 CD147 是早期 CNV 形成重要的分子靶点之一,为 CNV 的多靶点治疗干预提供了理论依据及新的思路。

参考文献

[1] Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, et al. Global data on visual

impairment in the year 2002 [J]. Bull World Health Organ, 2004, 82(11): 844-851. DOI: /S0042-96862004001100009.

[2] 许迅. 积极稳妥地进行治疗效果优化及新适应症探索研究, 不断提高科学使用抗血管内皮生长因子药物治疗眼底病的临床应用水平 [J]. 中华眼底病杂志, 2015, 31(1): 3-5. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2015.01.002.

Xu X. Optimization of treatment outcome and exploration of new indication in anti-vascular endothelial growth factor therapy [J]. Chin J Ocul Fundus Dis, 2015, 31(1): 3-5. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2015.01.002.

[3] 雷春燕, 雷博. 眼科新一代抗血管内皮生长因子药物的基础研究及临床试验进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(10): 938-942. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.10.016.

Lei CY, Lei B. Curative effect and safety of the new generation of anti-vascular endothelial growth factor drugs in neovascular eye diseases [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(10): 938-942. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.10.016.

[4] Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, et al. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily [J]. Cancer Res, 1995, 55(2): 434-439.

[5] 赵世红, 何守志. 氮激光诱导的大鼠脉络膜新生血管模型研究 [J]. 中华眼科杂志, 2003, 39(5): 298-302.

Zhao SH, He SZ. Study on the experimental model of krypton laser-induced choroidal neovascularization in the rats [J]. Chin J Ophthalmol, 2003, 39(5): 298-302.

[6] Madri JA. Extracellular matrix modulation of vascular cell behaviour [J]. Transpl Immunol, 1997, 5(3): 179-183.

[7] Kanekura T, Chen X, Kanzaki T. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts [J]. Int J Cancer, 2002, 99(4): 520-528. DOI: 10.1002/ijc.10390.

[8] Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions [J]. Cancer Res, 2001, 61(5): 2276-2281.

[9] Tang Y, Kesavan P, Nakada MT, et al. Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN [J]. Mol Cancer Res, 2004, 2(2): 73-80.

[10] Taylor PM, Woodfield RJ, Hodgkin MN, et al. Breast cancer cell-derived EMMPRIN stimulates fibroblast MMP2 release through a phospholipase A₂ and 5-lipoxygenase catalyzed pathway [J]. Oncogene, 2002, 21(37): 5765-5772.

[11] Alcazar O, Hawkridge AM, Collier TS, et al. Proteomics characterization of cell membrane blebs in human retinal pigment epithelium cells [J]. Mol Cell Proteomics, 2009, 8(10): 2201-2211. DOI: 10.1074/mcp.M900203-MCP200.

[12] 杨华伟, 雷宇玉, 王丽君, 等. CD147、基质金属蛋白酶-2 和血管内皮生长因子在氧诱导视网膜病变大鼠中的表达 [J]. 中华眼底病杂志, 2014, 30(1): 71-74. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2014.01.018.

Yang HW, Lei NY, Wang LJ, et al. The expression of CD147, matrix metalloproteinases-2 and vascular endothelial growth factor in a rat model of oxygen induced retinopathy [J]. Chin J Ocul Fundus Dis, 2014, 30(1): 71-74. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2014.01.018.

[13] Kanekura T, Chen X, Kanzaki T. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts [J]. Int J Cancer, 2002, 99(4): 520-528. DOI: 10.1002/ijc.10390.

[14] Lim M, Martinez T, Jablons D, et al. Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38 [J]. FEBS Lett, 1998, 441(1): 88-92.

(收稿日期: 2017-03-16)

(本文编辑: 刘艳 张宇)