

## · 实验研究 ·

# 缺氧条件下 SNAI1 激活基质金属蛋白酶对脉络膜新生血管生成的促进作用

孙嘉星 窦国睿 常天芳 李曼红 杨子岩 晏贤春 刘瑗 韩骅 王雨生

710032 西安,解放军空军军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所(孙嘉星、窦国睿、常天芳、李曼红、王雨生);710032 西安,解放军空军军医大学基础医学院遗传与发育生物学教研室 肿瘤生物学国家重点实验室(杨子岩、晏贤春、刘瑗、韩骅)

通信作者:窦国睿,Email:fierywang@126.com;王雨生,Email:wangys003@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.01.004

**【摘要】目的** 探讨缺氧环境下活化的血管内皮细胞是否可诱导 SNAI1 表达上调,进而通过 SNAI1-基质金属蛋白酶(MMP)2 和 MMP9 途径参与 CNV 生成。**方法** 选取 SPF 级 6~8 周龄雄性 C57 小鼠 16 只并分为对照组和模型组,采用视网膜激光光凝法诱导小鼠 CNV 模型。于造模后 7 d 摘取小鼠眼球以制备视网膜色素上皮(RPE)-脉络膜-巩膜复合体铺片和冰冻切片,采用 Isolectin B4 免疫荧光染色技术检测脉络膜铺片中 CNV 形成情况,并观察 CNV 组织附近血管内皮细胞中 SNAI1、MMP2 和 MMP9 的表达及定位;采用实时荧光定量 PCR 法检测 CNV 组织中 SNAI1、MMP2 和 MMP9 mRNA 的表达变化。将培养的恒河猴脉络膜/视网膜内皮(RF/6A)细胞分为常氧组和缺氧组,分别在含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱或含体积分数 94% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 和体积分数 1% O<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h,分别采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 技术测定各组细胞中 SNAI1、MMP2 和 MMP9 在转录水平和蛋白水平的表达变化。用小干扰 SNAI1 (siSNAI1) 转染 RF/6A 细胞,采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 法检测细胞中 MMP2 和 MMP9 在转录和蛋白水平的表达变化,并采用 Transwell 小室法检测血管内皮细胞的迁移数目。**结果** 造模后 7 d 小鼠脉络膜铺片中可见 CD31 阳性和 SNAI1 阳性荧光染色细胞及双阳性细胞;模型组小鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体中 SNAI1 mRNA 和 MMP2 mRNA 相对表达量分别为 1.291±0.060 和 1.610±0.424,均明显高于对照组的 0.759±0.074 和 0.772±0.080,差异均有统计学意义( $P=0.001, 0.044$ ),模型组小鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体中 MMP9 mRNA 升高,但与对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),且 MMP2 mRNA 表达量高于 MMP9 mRNA,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。缺氧组 RF/6A 细胞中缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )、SNAI1 和 MMP2 mRNA 及其蛋白的相对表达量均明显高于常氧组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ ),各组间 MMP9 mRNA 相对表达量的差异无统计学意义( $P>0.05$ )。缺氧+siSNAI1 组 RF/6A 细胞中 MMP2 mRNA 相对表达量为 0.217±0.036,明显低于单纯缺氧组的 0.818±0.105;缺氧+siSNAI1 组 RF/6A 细胞中 MMP2 蛋白相对表达量为 0.236±0.009,明显低于单纯缺氧组的 1.043±0.120,差异均有统计学意义( $P=0.002, 0.003$ )。siSNAI1 组血管内皮细胞迁移数目为 (254.60±71.31)/视野,明显少于正常对照组的 (534.10±96.21)/视野,差异有统计学意义( $P=0.029$ )。**结论** CNV 局部的缺氧环境可能通过上调血管内皮细胞中 SNAI1 的表达而激活 MMP2,促进血管内皮细胞迁移,从而参与 CNV 生成;缺氧条件下 SNAI1 的下调可抑制上述过程。

**【关键词】** 脉络膜新生血管; 基质金属蛋白酶; 小干扰 RNA; 转录因子 SNAI1; 血管内皮细胞; 动物模型; 缺氧

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81770936、81670863); 高等学校全国优秀博士学位论文作者专项基金项目 (201481); 陕西省青年科技新星计划项目 (2016KJXX-19)

**The promoting effects of SNAI1 activating matrix metalloproteinase on choroidal neovascularization under hypoxia** Sun Jiaying, Dou Guorui, Chang Tianfang, Li Manhong, Yang Ziyan, Yan Xianchun, Liu Yuan, Han Hua, Wang Yusheng

Department of Ophthalmology, Eye Institute of Chinese PLA, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China (Sun JX, Dou GR, Chang TF, Li MH, Wang YS); State Key Laboratory of Cancer Biology, Department of Genetics and Developmental Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China (Yang ZY, Yan XC, Liu Y, Han H)

Corresponding author: Dou Guorui, Email:fierywang@126.com; Wang Yusheng, Email:wangys003@126.com

**【Abstract】Objective** To investigate whether vascular endothelial cells in choroidal neovascularization whether hypoxia condition can up-regulate SNAI1 and activate matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 therefore to participate in choroidal neovascularization(CNV). **Methods** Sixteen SPF male C57 mice aged 6-8 weeks were

divided into control group and model group. CNV models were induced by retinal laser photocoagulation, and flat-mount and frozen sections of retinal pigment epithelium (RPE)-choroid-sclera compound were prepared at 7 days after modeling. The CNV in flat-mount was examined by Isolectin B4 staining, and the location of SNAI1, MMP2 and MMP9 in frozen sections was determined by immunofluorescence technology. The expression of SNAI1, MMP2 and MMP9 at mRNA level in CNV was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (real-time PCR). The use and care of experimental animals complied with Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research. The RF/6A cells were divided into normoxia group and hypoxia group and cultured for 24 hours in 5% CO<sub>2</sub> condition and mix condition of 94% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 1% O<sub>2</sub>, respectively. The expression of SNAI1, MMP2 and MMP9 in the cells at mRNA and protein levels was detected by real-time PCR and Western blot assay, respectively. Small interfering RNA of SNAI1 (siSNAI1) was transfected into the cells, and then the expression of MMP2 in the cells at mRNA and protein levels was detected by real-time PCR and Western blot assay, respectively, and the migrating number of the cells was assayed by Transwell chamber assay. **Results** CD31 and SNAI1 positive-response cells were seen in RPE-choroid-sclera flat-mounts under the laser scanning confocal microscope. The relative expression levels of SNAI1 mRNA and MMP2 mRNA in RPE-choroid-sclera tissues were higher in the model group than those in the control group (SNAI1 mRNA:  $1.291 \pm 0.060$  vs.  $0.759 \pm 0.074$ ,  $P = 0.001$ ; MMP2 mRNA:  $1.610 \pm 0.424$  vs.  $0.772 \pm 0.080$ ,  $P = 0.044$ ). The expression of MMP9 mRNA was not significantly elevated between model group and control group ( $P > 0.05$ ). The relative expression level of MMP2 mRNA was higher in comparison with MMP9 mRNA in the model group ( $P < 0.01$ ). The relative expressions of hypoxic induced factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), SNAI1 and MMP2 at mRNA level and protein level in RF/6A cells were significantly higher in the hypoxia group than those in the normoxia group (all at  $P < 0.05$ ) and no considerable difference was seen in MMP9 mRNA expression between the two groups ( $P > 0.05$ ). The relative expressions of MMP2 mRNA in the cells were  $0.217 \pm 0.036$  and  $0.818 \pm 0.105$ , and those of MMP2 protein in the cells were  $0.236 \pm 0.009$  and  $1.043 \pm 0.120$  in the hypoxia+siSNAI1 group and only hypoxia group, respectively, with significant differences between them ( $P = 0.002, 0.003$ ). The migrating number of the cells was  $(254.60 \pm 71.31)$ /field in the hypoxia+siSNAI1 group, which was significantly less than  $(534.10 \pm 96.21)$ /field in the control group ( $P = 0.029$ ). **Conclusions** The hypoxic environment at CNV can activate MMP2 by up-regulating the expression of SNAI1, which promotes the migration of vascular endothelial cells and therefore participates in CNV formation, and the intervention of SNAI1 activation under the hypoxic condition can inhibit this process.

**[Key words]** Choroidal neovascularization; Matrix metalloproteinase; Small interfering RNA; Transcriptional factor SNAI1; Vascular endothelial cells; Disease model, C57 mice; Hypoxia

**Fund program:** National Nature Science Foundation of China (81770936, 81670863); Special Funds for Authors of Excellent Doctoral Dissertations of Universities and Colleges (201481); Shaanxi Youth Science and Technology Nova Program (2016KJXX-19)

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 可见于多种眼部疾病, CNV 穿透 Bruch 膜而生长于视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 下, 或穿透视网膜生长于视网膜下腔, 继而造成渗出、出血及瘢痕形成, 导致视力损害<sup>[1]</sup>。血管内皮细胞的活化、增生、迁移和成管是新生血管形成的基本病理过程, 而局部组织缺氧是血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 质量浓度升高和血管内皮细胞活化的主要原因, 血管基底膜和 Bruch 膜的胶原降解是 CNV 形成的重要环节<sup>[2]</sup>。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 2 和 MMP9 可特异性地降解血管基底膜和 Bruch 膜的主要成分 IV 型胶原, 为新生血管出芽提供了条件<sup>[3]</sup>。尽管 MMP2 和 MMP9 在 CNV 中的作用已得到证实, 但由于 CNV 内存在血管内皮细胞、RPE 细胞、巨噬细胞、成纤维细胞等多种细胞组分, 缺氧是否调控血管内皮细胞中 MMP2 和 MMP9 的表达及其相应的调控机制仍待阐明。转录因子 SNAI1 可调控肿瘤组织中 MMPs 的表达, 进而促进肿瘤的转移和侵袭<sup>[4]</sup>。那么, 在 CNV 的

发生和发展中, 缺氧活化的血管内皮细胞是否高表达 SNAI1 并激活 MMP2 和 MMP9 呢? 探讨这个问题可为眼科新生血管性疾病的防治提供新的靶点。本研究观察体外缺氧环境下 SNAI1 的表达改变及其对 MMP2 和 MMP9 的调控作用及其对血管内皮细胞迁移能力的影响, 进一步探讨参与 CNV 生成的分子网络。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SPF 级 6~8 周龄健康雄性 C57 小鼠 16 只 (购自第四军医大学实验动物中心), 体质量 18~22 g。小鼠在 12 h/12 h 昼夜的光线环境下喂养, 饲养温度为  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 湿度为 59%~61%。实验动物的饲养和使用均遵照 ARVO 规范。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 恒河猴脉络膜/视网膜内皮细胞系 (RF/6A 细胞) (美国 ATCC 公司产品, 购自武汉博士德生物工程有限公司); FITC 标记的蓖麻子凝集素 (Isolectin B4, IB4) (FL-1201, 1:100, 美国 Vector 公司); 大鼠抗小鼠 CD31 单克隆抗体 (102502, 1:400,

美国 Biologend 公司);小鼠抗小鼠 SNAIL 单克隆抗体 (MABE167, 1:80, 美国 Millipore 公司);兔抗小鼠 SNAIL 多克隆抗体 (ab180714, 1:200, 美国 Abcam 公司);兔抗小鼠 MMP-2 多克隆抗体 (10372-2-AP, 1:200)、兔抗小鼠 MMP-2 多克隆抗体 (10375-2-AP, 1:200) (美国 Proteintech 公司);小鼠抗小鼠  $\beta$ -actin 抗体 (A1978, 1:1 000 稀释, 美国 Sigma 公司);Alexa Fluor 594 标记的驴抗大鼠二抗 (A-21209, 1:400)、Alexa Fluor 594 标记的羊抗小鼠二抗 (A-11032, 1:400)、Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔二抗 (A-11034, 1:400)、Trizol reagent (美国 Invitrogen 公司);HRP 标记的羊抗小鼠二抗 (1:2 000, 武汉博士德生物工程有限公司);逆转录试剂盒 Prime Script RT Master Mix、实时荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Taq (日本 Takara 公司);Lipofectamine™ 2000 转染试剂 (美国 Thermo Fisher 公司);DMEM 培养液、胎牛血清 (美国 Gibco 公司);胰蛋白酶、青-链霉素 (上海康成生物公司);PBS (美国 Corning 公司);结晶紫染液 (深圳碧云天生物科技有限公司)。532 nm 倍频掺钕钇铝石榴石激光器 (IRIS)、7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司);Fluoview 300 型激光扫描共焦显微镜 (日本 Olympus 公司);CM1900 型冰冻切片 (德国 Leica 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及 CNV 模型的建立** 采用抽签法将小鼠随机分为对照组和 CNV 组, 对照组 6 只小鼠无任何干预, CNV 模型组 10 只。采用质量分数 1% 戊巴比妥钠行小鼠腹腔内注射麻醉, 复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳。CNV 模型组小鼠右眼造模, 涂加替沙星眼用凝胶后眼前放置三面镜, 经裂隙灯显微镜用 532 nm 倍频激光距离视盘 1~1.5 视盘直径处围绕视盘光凝, 共击射 6 个光斑, 功率为 90 mW, 光斑直径为 75  $\mu$ m, 曝光时间为 100 ms, 参照文献[5]的标准, 光凝后有气泡产生或伴轻度出血者提示击破 Bruch 膜, 为有效光斑。

**1.2.2 小鼠脉络膜铺片及眼杯冰冻切片** 小鼠麻醉方法同上, 于造模后 7 d, 用 20 ml PBS 溶液行小鼠左心室灌注, 立即摘取眼球, 置于含质量分数 4% PFA 的 PBS 中固定 2 h, 于体视显微镜下去除眼球周围结缔组织, 沿角巩膜缘剪开眼球壁, 去除眼前节, 取 3 只眼球在后段眼球壁做 6~8 个放射状切开, 去除视网膜神经感觉层, 铺展 RPE-脉络膜-巩膜复合体, 制备脉络膜铺片; 另取 3 只眼球制备成眼杯, 用质量分数 30% 蔗糖溶液浸泡过夜以脱水, 用组织冰冻切片最佳切削温度 (optimum cutting temperature, OCT) 包埋剂包埋, -80  $^{\circ}$ C 冻存, 冰冻切片切片。

**1.2.3 RF/6A 细胞培养及分组** 将 RF/6A 细胞分为常氧培养组和缺氧培养组, 常氧培养组细胞用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基在 37  $^{\circ}$ C 且含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h, 缺氧培养组细胞用相同培养基在 37  $^{\circ}$ C 且含体积分数 94% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 和体积分数 1% O<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24 h。

**1.2.4 小干扰 RNA 的细胞转染** 小干扰 SNAIL (small intervention SNAIL, siSNAIL) 由锐博生物科技公司 (广州) 合成, 用灭菌无 RNA 酶水溶解为 20  $\mu$ mol/L。缺氧处理的 RF/6A 细胞用 Lipofectamine™ 2000 转染试剂分别转染 siSNAIL 1、siSNAIL 2 和 siSNAIL 3 序列以筛选最适转染序列, 终浓度为 50 nmol/L, 转染 4~6 h 后换液, 再转染 24 h, 将细胞分为常氧培养组和缺氧培养组, 采用 1.2.3 的方法继续培养 24 h, 收集样本行后续检测。经测定 siSNAIL 1 为最佳转染序列, 用于后续实验。

**1.2.5 免疫荧光染色法检测小鼠脉络膜铺片及眼杯组织中目的蛋白表达** 脉络膜铺片用 FITC 标记的 Isolectin B4 染色, 洗后封片, 用 Image pro plus 6.0 图像分析软件测量脉络膜铺片的最大荧光面积和视盘面积 (disc area, DA), 绿色荧光面积大于 1/2 DA 者为 CNV 形成。小鼠视杯冰冻切片于室温下干燥 2 h, PBS 洗涤, 质量分数 5% 牛血清白蛋白和体积分数 1% Triton 封闭 1 h。滴加相应一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBS 清洗, 滴加相应二抗, 室温下孵育 2 h 或 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBS 清洗 3 次, Hoechst 染核 5 min; PBS 洗涤, 体积分数 50% 甘油封片, 激光扫描共焦显微镜下观察并采集图片。

**1.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测小鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体中目的基因表达** 冰上取小鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体或 6 孔板培养细胞, 加入 TRIzol 消化液 1 ml 消化并匀浆, 移入 EP 管, 加入氯仿 300  $\mu$ l/ml, 剧烈振荡 15 s, 离心半径 8.5 cm, 12 000 r/min 4  $^{\circ}$ C 离心 15 min, 吸取上层水相, 转入新 EP 管, 加入 0.5 ml 异丙醇振荡混匀, 12 000 r/min 4  $^{\circ}$ C 离心 10 min; 弃上清, 加入 0.5 ml 乙醇 (以无 RNA 酶水配制) 洗涤, 12 000 r/min 4  $^{\circ}$ C 离心 5 min, 弃上清, 室温干燥后溶于 200  $\mu$ l 无 RNA 酶水中。以上步骤所用均为无 RNA 酶 EP 管和移液枪头。RNA 逆转录体系为 50  $\mu$ l, 含 5 倍 PrimeScript RT Master Mix 10  $\mu$ l 和总 RNA 2.5  $\mu$ g, 无 RNase 双蒸水补至 50  $\mu$ l, 反应条件为 37  $^{\circ}$ C 反应 15 min, 85  $^{\circ}$ C 反应 5 s, 4  $^{\circ}$ C 至反应终止; 实时荧光定量 PCR 体系为 25.0  $\mu$ l, 其中 SYBR 混合液 12.5  $\mu$ l、参比染料 ROX 0.5  $\mu$ l、SNAIL/MMP2/MMP9/缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxic induced factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )/ $\beta$ -Actin 上游引物和下游引

物(表 1)各 0.5  $\mu\text{l}$ 、ddH<sub>2</sub>O 10  $\mu\text{l}$  模板 cDNA 1.0  $\mu\text{l}$ 。反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  延伸 34 s,45 个循环。同一样本 3 个复孔, $\beta$ -actin 为内参照。以 ABI 7500 软件进行分析,各基因相对表达量采用 2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  法进行计算。

表 1 目的基因引物序列

| 基因                 | 引物序列(5'-3')                 |
|--------------------|-----------------------------|
| mml <i>SNAI1</i>   | F:CGGAAGCCTAACTACAGCGA      |
| mml <i>SNAI1</i>   | R:TCCAGATGAGCATTGGCAG       |
| mml <i>MMP2</i>    | F:GATACCCTTTGATGGTAAGGA     |
| mml <i>MMP2</i>    | R:CCTTCTCCAAGTCCATAGT       |
| mml <i>MMP9</i>    | F:GGGACGCAGACATTGTGCATC     |
| mml <i>MMP9</i>    | R:TCGTCACTCGTGAATGGGC       |
| mml <i>HIF1A</i>   | F:TCGGCGAAGTAAAGAATCTGAA    |
| mml <i>HIF1A</i>   | R:CAAATCACCAGCATCCAGAAG     |
| mml $\beta$ -Actin | F:CACAGTGTGTCTGGTGGCA       |
| mml $\beta$ -Actin | R:TGGAAAGGGCCAGACTCGTCA     |
| mmu <i>SNAI1</i>   | F:CACACGCTGCCTTGTGTCT       |
| mmu <i>SNAI1</i>   | R:GGTCAGCAAAAGCACGGTT       |
| mmu <i>MMP2</i>    | F:CAAGTTCCCCGGCGATGTC       |
| mmu <i>MMP2</i>    | R:TCTGTGCAAGGTCACCTGTC      |
| mmu <i>MMP9</i>    | F:CTGGACAGCCAGACACTAAAG     |
| mmu <i>MMP9</i>    | R:CTCGCGGCAAGTCTTCAGAG      |
| mmu $\beta$ -Actin | F:CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC |
| mmu $\beta$ -Actin | R:ATGGAGCCACCGATCCACA       |

注:MMP:基质金属蛋白酶;HIF:缺氧诱导因子

**1.2.7 Western blot 法检测 RF/6A 细胞中目的蛋白表达** RF/6A 细胞弃去培养液,RIPA 裂解,12 000 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min 获得上清液(蛋白样品),制备质量分数 12% 分离胶/5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE,取出凝胶,将电泳分离蛋白转移至 PVDF 膜,180 mA 恒流转印 2 h,置于 PBST 配置的质量分数 5% 脱脂奶粉中,室温下振摇 1 h,添加相应一抗及相应二抗,加强型化学发光法显色。 $\beta$ -actin 作为内参照。采用 Image J 图像分析软件对结果进行灰度值分析,目的条带与  $\beta$ -actin 条带的比值代表蛋白的相对表达水平。

**1.2.8 Transwell 小室试验检测细胞迁移能力** Transwell 小室放入 24 孔板中,以无血清 DMEM 培养基水化 30 min。上室加入 200  $\mu\text{l}$  含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养基,含  $1 \times 10^5$  个细胞,下室加入 500  $\mu\text{l}$  含

10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,孵育 30 h 取出培养板,用质量分数 4% 多聚甲醛固定下室细胞 30 min,PBS 冲洗,晾干。用质量分数 0.5% 结晶紫染液染色 30 min,棉签轻轻擦去上室内细胞,PBS 反复冲洗小室,棉签拭去多余染液,光学显微镜下计数迁移细胞,每组在 100 倍镜下计数 4 个视野,取平均值。

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验证实呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数经 Levene 检验方差齐。采用随机分组两水平实验设计,对照组小鼠 RPE-脉络膜-巩膜铺片和切片中各目的基因 mRNA 和蛋白相对表达量的差异比较、缺氧组与常氧组 RF/6A 细胞中各目的基因 mRNA 和蛋白相对表达量的差异比较、MMP2 与 MMP9 mRNA 及其蛋白相对表达量的差异比较均采用独立样本 t 检验;不同 siSNAI1 序列对比采用单因素方差分析,siSNAI1 转染组与对照组间 MMP2 mRNA 和 MMP9 mRNA 及其蛋白相对表达量以及细胞迁移数目的比较均采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 小鼠 CNV 局部 SNAI1 和 MMP2/9 表达情况**

造模后 7 d,小鼠脉络膜铺片 Isolectin B4 免疫荧光染色显示小鼠 CNV 生长(图 1A)。免疫荧光染色可见 CD31 和 SNAI1 双阳性细胞,分别呈红色和绿色荧光;同时,CD31 表达阳性细胞周围可见 MMP2、MMP9 染色,MMP2 主要表达于新生血管周围,MMP9 表达于 Bruch 膜,部分 MMP2、MMP9 与 CD31 信号呈现共定位,提示造模后 7 d CNV 局部存在 MMP2 和 MMP9 表达,且部分来源于血管内皮细胞(图 1B)。

**2.2 各组小鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体 CNV 局部 SNAI1、MMP2 和 MMP9 mRNA 表达量变化**

造模后 7 d,模型组小鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体中 SNAI1 mRNA 和 MMP2 mRNA 的相对表达量明显高于对照组 ( $1.291 \pm 0.060$  与  $0.759 \pm 0.074$ ;  $1.610 \pm$

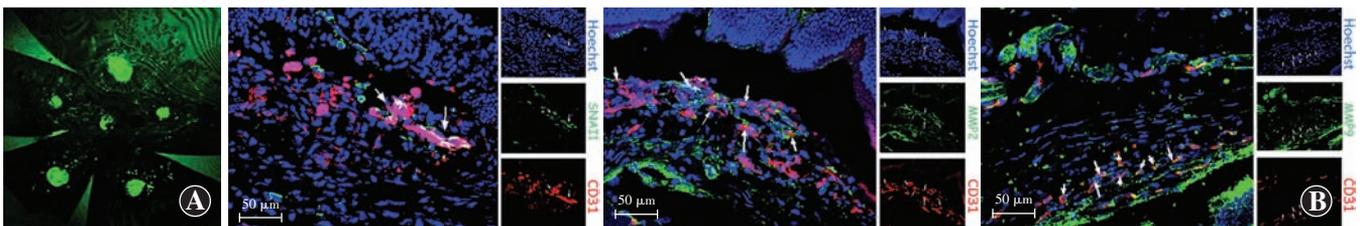


图 1 小鼠造模后 7 d RPE-脉络膜-巩膜复合体铺片中 SNAI1、MMP2 和 MMP9 表达 A:激光扫描共聚焦显微镜下可见脉络膜激光损伤处较多绿色荧光(IB4) B:小鼠眼杯切片可见 CD31 表达阳性,呈红色荧光(Alexa Fluor 594),SNAI1、MMP2、MMP9 呈阳性表达,为绿色荧光(Alexa Fluor 488),且部分出现共定位(箭头),细胞核呈蓝色荧光(Hoechst)(标尺=50  $\mu\text{m}$ )

0.424 与  $0.772 \pm 0.080$ ), 差异均有统计学意义 ( $t = 5.106, P = 0.001; t = 2.393, P = 0.044$ ); 模型组小鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体中 MMP9 mRNA 相对表达量较对照组升高 ( $2.829 \pm 0.555$  与  $1.876 \pm 0.604$ ), 但差异无统计学意义 ( $t = 1.091, P > 0.05$ )。模型组小鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体中 MMP2 mRNA 相对表达量明显高于 MMP9 mRNA ( $0.945 \pm 0.119$  与  $0.017 \pm 0.003$ ), 差异有统计学意义 ( $t = 7.794, P < 0.000$ ) (图 2)。

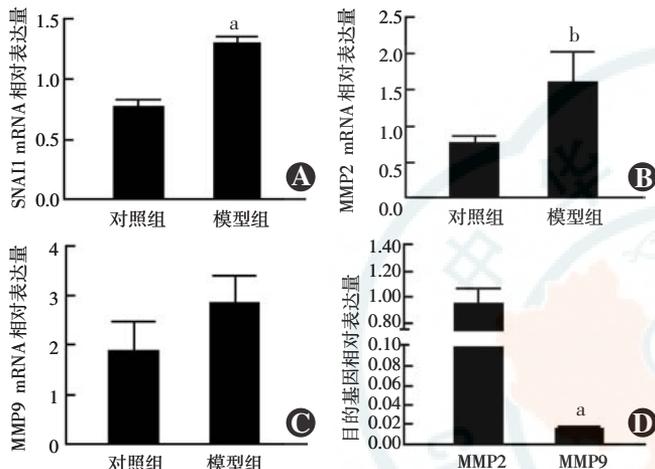


图 2 各组小鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体 CNV 局部目的基因相对表达量比较 A: 各组小鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体中 SNAI1 mRNA 相对表达量的比较 与对照组比较,  $^a P < 0.01$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 4$ ) B: 各组小鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体中 MMP2 mRNA 相对表达量的比较 与对照组比较,  $^b P < 0.05$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 4$ ) C: 各组小鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体中 MMP9 mRNA 相对表达量的比较 与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (独立样本  $t$  检验,  $n = 4$ ) D: 小鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体中 MMP9 mRNA 与 MMP2 mRNA 相对表达量的比较 与 MMP2 mRNA 表达量比较,  $^a P < 0.01$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 10$ ) MMP: 基质金属蛋白酶

### 2.3 各组 RF/6A 细胞中 SNAI1 mRNA、MMP2 mRNA 和 MMP9 mRNA 相对表达量的比较

缺氧组 RF/6A 细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、SNAI1 和 MMP2 mRNA 相对表达量较常氧组升高 (HIF-1 $\alpha$  mRNA:  $0.975 \pm 0.029$  与  $1.485 \pm 0.043$ ; SNAI1 mRNA:  $1.178 \pm 0.294$  与  $3.403 \pm 0.804$ ; MMP2 mRNA:  $0.919 \pm 0.085$  与  $2.292 \pm 0.317$ ), 差异均有统计学意义 ( $t = 9.920, P < 0.000; t = 2.598, P = 0.032; t = 5.045, P = 0.001$ ); 缺氧组 RF/6A 细胞中 MMP9 mRNA 相对表达量较常氧组升高 ( $0.918 \pm 0.236$  与  $1.356 \pm 0.227$ ), 但差异无统计学意义 ( $t = 1.320, P > 0.05$ ); 缺氧组 RF/6A 细胞中 MMP2 mRNA 相对表达量高于 MMP9 mRNA ( $0.5177 \pm 0.1247$  与  $0.0001 \pm 0.0000$ ), 差异有统计学意义 ( $t = 4.150, P = 0.001$ ) (图 3)。

### 2.4 siSNAI1 转染与否 RF/6A 细胞中 SNAI1 mRNA 和 MMP2 mRNA 相对表达量变化

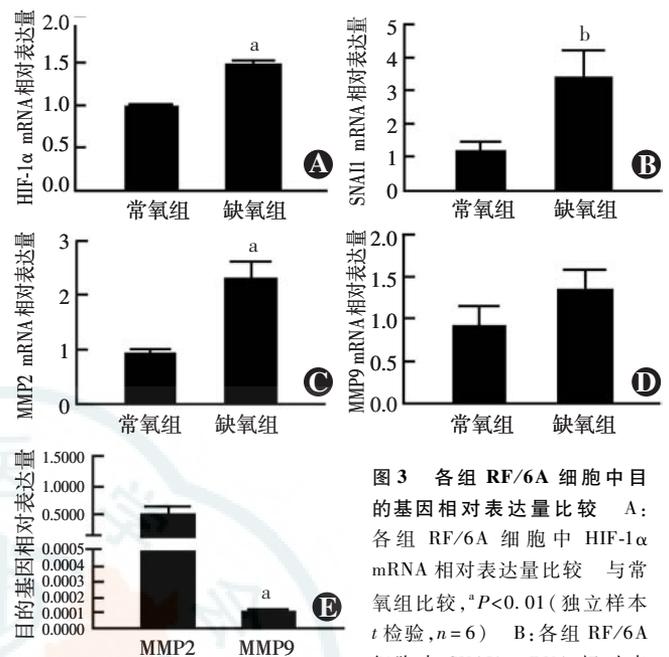
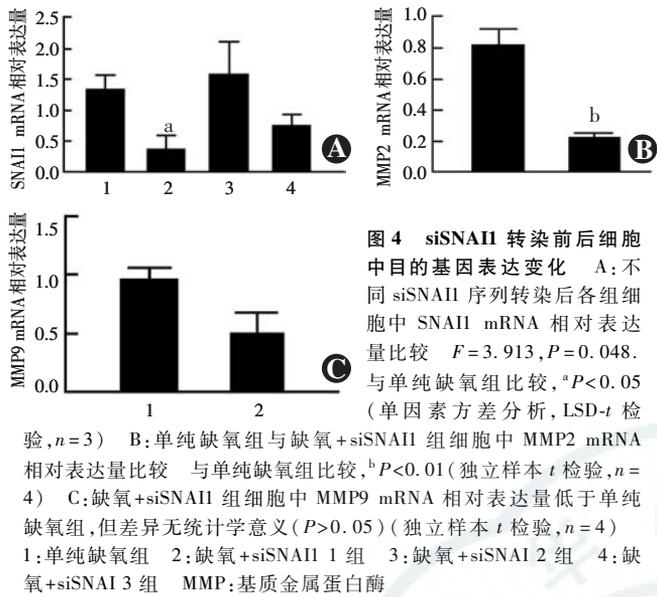


图 3 各组 RF/6A 细胞中目的基因相对表达量比较 A: 各组 RF/6A 细胞中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 相对表达量比较 与常氧组比较,  $^a P < 0.01$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 6$ ) B: 各组 RF/6A 细胞中 SNAI1 mRNA 相对表达量比较 与常氧组比较,  $^b P < 0.05$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 6$ ) C: 各组 RF/6A 细胞中 MMP2 mRNA 相对表达量比较 与常氧组比较,  $^a P < 0.01$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 6$ ) D: 各组 RF/6A 细胞中 MMP9 mRNA 相对表达量比较 与常氧组比较, MMP9 mRNA 相对表达量升高, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (独立样本  $t$  检验,  $n = 6$ ) E: RF/6A 细胞中 MMP2 mRNA 与 MMP9 mRNA 相对表达量比较 与 MMP2 mRNA 比较,  $^a P < 0.01$  (独立样本  $t$  检验,  $n = 12$ ) HIF: 缺氧诱导因子; MMP: 基质金属蛋白酶

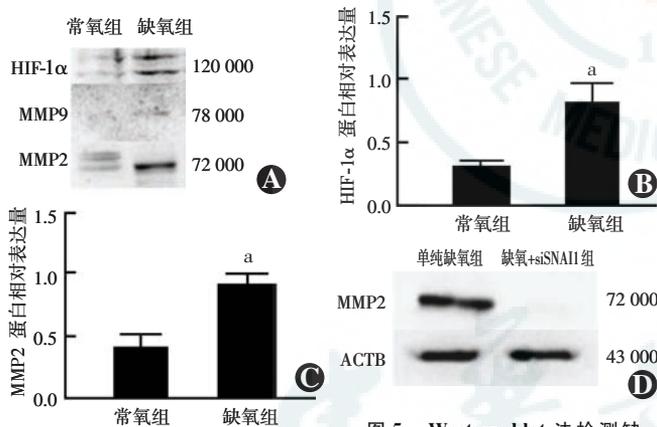
单纯缺氧组及缺氧+siSNAI1 1、2、3 组 RF/6A 细胞中 SNAI1 mRNA 相对表达量分别为  $1.330 \pm 0.236$ 、 $0.375 \pm 0.215$ 、 $1.577 \pm 0.534$  和  $0.744 \pm 0.193$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 3.913, P = 0.048$ ), 其中缺氧+siSNAI1 1 组 RF/6A 细胞中 SNAI1 mRNA 相对表达量明显低于单纯缺氧组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 敲减效率可达 71.8%, 故 siSNAI1 1 用于后续实验 (统一标识为 siSNAI1)。缺氧+siSNAI1 组 RF/6A 细胞中 MMP2 mRNA 相对表达量明显低于单纯缺氧组 ( $0.217 \pm 0.036$  与  $0.818 \pm 0.105$ ), 差异有统计学意义 ( $t = 5.402, P = 0.002$ ); 缺氧+siSNAI1 组 RF/6A 细胞中 MMP9 mRNA 相对表达量低于单纯缺氧组 ( $0.499 \pm 0.178$  与  $0.960 \pm 0.100$ ), 但差异无统计学意义 ( $t = 2.260, P > 0.05$ ) (图 4)。

### 2.5 siSNAI1 转染与否 RF/6A 细胞中 MMP2 蛋白表达变化

缺氧组 RF/6A 细胞中 HIF-1 $\alpha$  和 MMP2 蛋白表达条带较常氧组增强, 2 个组 MMP9 蛋白表达条带强度接近。缺氧组 RF/6A 细胞中 HIF-1 $\alpha$  和 MMP2 蛋白相对表达量均高于常氧组 (HIF-1 $\alpha$ :  $0.816 \pm 0.156$  与



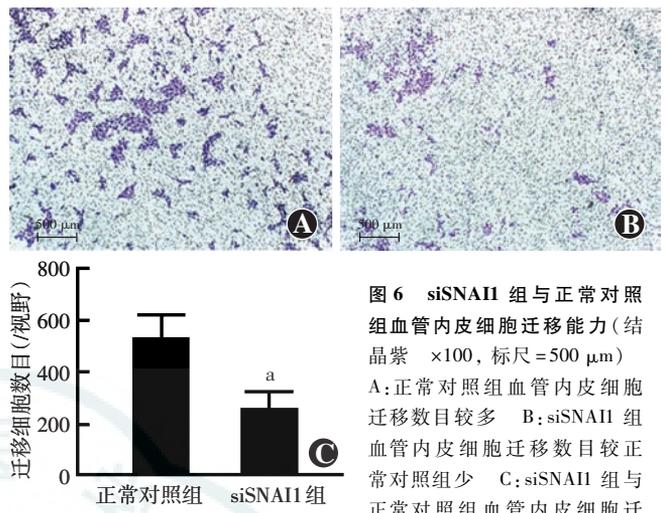
0.316 ± 0.0416; MMP2: 0.913 ± 0.100 与 0.415 ± 0.110), 差异均有统计学意义 ( $t=3.097, P=0.036; t=3.350, P=0.029$ ); siSNAIL 转染后, 缺氧+siSNAIL 组细胞中 MMP2 蛋白相对表达量为 0.236 ± 0.009, 低于单纯缺氧组的 1.043 ± 0.120, 差异有统计学意义 ( $t=6.702, P=0.003$ ) (图 5)。



**2.6 siSNAIL 转染与否对血管内皮细胞迁移能力的影响**

siSNAIL 组细胞迁移细胞数目为 (254.60 ± 71.31)/视野, 明显低于正常对照组的 (534.10 ± 96.21)/视野, 差异有

统计学意义 ( $t=2.334, P=0.029$ ) (图 6)。



统计学意义 ( $t=2.334, P=0.029$ ) (图 6)。

### 3 讨论

新生血管形成包括血管发生和血管生成过程,前者指血管内皮前体细胞迁移分化的成管过程,后者是血管结构中血管内皮细胞降解基底膜、增生、移行并且进行功能分化的过程<sup>[6]</sup>。已有研究证实,上述 2 种形式均参与 CNV 生成,且以后一种形式为主<sup>[7]</sup>。

在 CNV 的发生和发展中,组织缺氧可上调 HIF-1α 活性及其下游信号通路,激活 VEGF 等一系列细胞因子,调控 RPE 细胞、血管内皮细胞、巨噬细胞等,促进血管生成<sup>[2]</sup>。因此,缺氧是 CNV 局部血管内皮细胞活化的主要动因。此外,血管生成需要血管内皮细胞从基底膜上释放并获得迁移能力, MMPs 发挥重要作用<sup>[8]</sup>。MMPs 是 CNV 发生和发展中所必需的细胞分泌蛋白<sup>[9]</sup>, 可分为胶原酶 (MMP1/8/13)、明胶酶 (MMP2/9)、基质溶解酶 (MMP3/7/10/11/12) 和膜型 MMP (MMP13/15/16/17), 其中 MMP2 和 MMP9 可降解 IV、V、VII、X 型胶原和弹性蛋白并使胶原变性,参与血管生成、肿瘤转移。MMPs 以酶原形式分泌,故受转录及活化的调节。MMP2 在激光诱导的 CNV 中升高并贯穿整个血管新生过程,而 MMP9 的表达较低,仅限于激光诱导 CNV 早期<sup>[9-10]</sup>。CNV 局部细胞包括血管内皮细胞、RPE 细胞、巨噬细胞、骨髓来源细胞等,而 MMP2 主要来源于血管内皮细胞、RPE 细胞和巨噬细胞等, MMP9 主要表达在 Bruch 膜附近,在 RPE 细胞、血管内皮细胞、基质细胞和炎症细胞中也有一定程度的表达<sup>[11]</sup>。MMP2 和/或 MMP9 基因敲除小鼠 CNV 程度较轻<sup>[3]</sup>。尽管 MMP2 和 MMP9 在 CNV 中的作用已被证实,但血管内皮细胞来

源的 MMP2 和 MMP9 是否受缺氧调控及其机制尚未完全阐明。

研究表明, 锌指结构转录因子 SNAI1 的高表达与肿瘤转移和侵袭密切相关, 可通过下调胞间黏附分子促进上皮-间充质转化, 增强肿瘤细胞的侵袭能力<sup>[12]</sup>。SNAI1 还可激活多种 MMPs, 促进肿瘤细胞突破基底膜<sup>[4,13]</sup>。研究表明, SNAI1 是 HIF-1 $\alpha$  的下游分子, 缺氧可诱导人冠状动脉内皮细胞表达 SNAI1<sup>[14]</sup>。那么, CNV 局部缺氧状态是否能激活血管内皮细胞中的 SNAI1 并上调 MMP2 和 MMP9, 从而促进新生血管形成呢? 本研究建立激光诱导的小鼠 CNV 模型, 发现造模后 7 d 脉络膜铺片中可见新生血管形成, RPE-脉络膜-巩膜复合体可见 CD31 与 SNAI1 的共表达, 说明 CNV 中血管内皮细胞可表达 SNAI1, 提示后者参与 CNV 形成。此外, 造模后 7 d CNV 周围组织中可见 MMP2、MMP9 的表达, 其中 MMP2 主要分布于新生血管周围, MMP9 局限在 Bruch 膜附近, 与既往报道一致<sup>[9-10]</sup>。本研究还发现, MMP2、MMP9 部分地与 CD31 信号共定位, 提示部分 MMP2 和 MMP9 来源于血管内皮细胞。造模后 7 d 脉络膜局部 SNAI1、MMP2 和 MMP9 mRNA 表达上调, 且 MMP2 mRNA 的表达高于 MMP9 mRNA, 推测 MMP2 在 CNV 形成中发挥主要作用。

由于 CNV 形成过程中对单一类型细胞分子调控机制的和干预困难, 因此, 本研究中采用缺氧培养的 RF/6A 细胞进行研究, 证实缺氧上调细胞中 HIF-1 $\alpha$ 、SNAI1、MMP2 和 MMP9 mRNA 的表达, 且 MMP2 表达水平高于 MMP9, Western blot 检测也证实, 缺氧诱导的 RF/6A 细胞 HIF-1 $\alpha$  表达明显增加, MMP2 酶原被激活, 而 MMP9 蛋白表达强度微弱, 提示缺氧主要诱导血管内皮细胞中 MMP2 的活化。上述结果说明, 缺氧可激发 RF/6A 细胞中 SNAI1 和 MMP2 的活性, 而对 MMP9 的影响较弱。

为进一步研究 SNAI1 激活对 MMP2 和 MMP9 表达的调控作用, 本研究中设计了恒河猴特异的 siSNAI1。siSNAI1 对 SNAI1 mRNA 有良好的抑制作用, 且可在转录水平和蛋白水平抑制缺氧引起的 MMP2 表达, 对 MMP9 有一定下调趋势。此外, 由于 MMPs 的表达与血管内皮细胞迁移能力有关, 本研究中应用 Transwell 小室进一步探究了 SNAI1 对血管内皮细胞迁移能力的影响, 结果显示 siSNAI1 转染可抑制血管内皮细胞的迁移。这些结果说明缺氧可经 SNAI1 通路激活血管内皮细胞中 MMP2 的表达, 增强血管内皮细胞迁移能力, 从而发挥促血管生成作用。

综上所述, 缺氧可诱导血管内皮细胞中 SNAI1 的高

表达, 从而激活 MMP2 并促进血管内皮细胞迁移, 而对 MMP9 表达的影响有限。因而, CNV 局部缺氧状态引起的 SNAI1-MMP2 激活可能是血管内皮细胞直接参与 CNV 形成的方式之一。本实验为干预 SNAI1 治疗 CNV 提供了新的思路, 我们拟进一步关注在体干预 SNAI1 对 CNV 的抑制作用, 从而探究 SNAI1 作为 CNV 治疗新靶点的可能性或可行性。

## 参考文献

- [1] 王雨生. 脉络膜新生血管性疾病 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 3-15.
- [2] Campochiaro PA. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases [J]. Prog Retin Eye Res, 2015, 49: 67-81. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.002.
- [3] Lambert V, Wielockx B, Munaut C, et al. MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization [J]. FASEB J, 2003, 17(15): 2290-2292. DOI: 10.1096/fj.03-0113fje.
- [4] Abdulkhalek S, Geen OD, Brodhagen L, et al. Transcriptional factor snail controls tumor neovascularization, growth and metastasis in mouse model of human ovarian carcinoma [J/OL]. Clin Transl Med, 2014, 3(1): 28 [2017-03-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4884043/>. DOI: 10.1186/s40169-014-0028-z.
- [5] Lambert V, Lecomte J, Hansen S, et al. Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice [J]. Nature Protocols, 2013, 8(11): 2197-2211. DOI: 10.1038/nprot.2013.135.
- [6] Patel-Hett S, D'Amore PA. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis [J]. Int J Dev Biol, 2011, 55(4-5): 353-363. DOI: 10.1387/ijdb.103213sp.
- [7] Gao F, Hou H, Liang H, et al. Bone marrow-derived cells in ocular neovascularization: contribution and mechanisms [J]. Angiogenesis, 2016, 19(2): 107-118. DOI: 10.1007/s10456-016-9497-6.
- [8] Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview [J]. Front Biosci, 2006, 11: 1696-1701.
- [9] Kvant A, Shen WY, Sarman S, et al. Matrix metalloproteinase (MMP) expression in experimental choroidal neovascularization [J]. Curr Eye Res, 2000, 21(3): 684-690.
- [10] Lambert V, Munaut C, Jost M, et al. Matrix metalloproteinase-9 contributes to choroidal neovascularization [J]. Am J Pathol, 2002, 161(4): 1247-1253. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64401-X.
- [11] Samtani S, Amaral J, Campos MM, et al. Doxycycline-mediated inhibition of choroidal neovascularization [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(11): 5098-5106. DOI: 10.1167/iovs.08-3174.
- [12] Miyoshi A, Kitajima Y, Sumi K, et al. Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells [J]. Br J Cancer, 2004, 90(6): 1265-1273. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601685.
- [13] Sun L, Lin P, Qin Z, et al. Hypoxia promotes HO-8910PM ovarian cancer cell invasion via snail-mediated MT1-MMP upregulation [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2015, 240(11): 1434-1445. DOI: 10.1177/1535370215570205.
- [14] Xu X, Tan X, Tampe B, et al. Snail is a direct target of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) in hypoxia-induced endothelial to mesenchymal transition of human coronary endothelial cells [J]. J Biol Chem, 2015, 290(27): 16653-16664. DOI: 10.1074/jbc.M115.636944.

(收稿日期: 2017-03-21 修回日期: 2017-12-04)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)