

· 实验研究 ·

缺氧条件下自噬在视网膜血管内皮细胞血管生成中的作用

李蓉 杜军辉 姚杨 于照祥 樊卓 常伟平

710077 西安医学院第一附属医院眼科(李蓉),中心实验室(姚杨、于照祥、樊卓、常伟平);

710054 西安交通大学附属西安市第九医院眼科(杜军辉)

通信作者:李蓉,Email:rechelrong198222@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.03.006

【摘要】目的 研究缺氧条件下自噬对体外培养的小鼠视网膜血管内皮细胞(RVECs)增生、迁移和管腔形成的影响。**方法** 取清洁级 C57BL/6J 小鼠 50 只,采用组织块培养法分离和培养小鼠 RVECs,采用 CD34 免疫荧光染色法对培养细胞进行鉴定。将生长良好的 RVECs 分为正常对照组、缺氧对照组及缺氧+3-甲基腺嘌呤(3-MA)组。正常对照组细胞常规培养,缺氧对照组细胞在氧体积分数 1% 的环境下培养 24 h,缺氧+3-MA 组细胞先用 5 mmol/L 3-MA 预处理 4 h,然后在上述缺氧环境下培养 24 h。采用 Western blot 法检测自噬标志蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3-II/LC3-I)比值及细胞中 Beclin-1 的表达;透射电子显微镜下观察细胞内形成的自噬小体的超微结构;分别采用 Click-iT EdU 试剂盒、细胞划痕法和 Matrigel 胶法检测细胞增生率、细胞迁移情况及细胞管腔形成情况。**结果** 原代培养后 5~7 d 培养的细胞呈铺路石样排列生长,CD34 表达阳性。透射电子显微镜下缺氧对照组细胞自噬小体明显多于正常对照组和缺氧+3-MA 组。正常对照组、缺氧对照组和缺氧+3-MA 组细胞中 LC3-II/LC3-I 比值分别为 0.243 ± 0.030 、 0.658 ± 0.032 和 0.405 ± 0.095 ,Beclin-1 蛋白相对表达量分别为 0.260 ± 0.040 、 0.650 ± 0.071 和 0.461 ± 0.089 ;细胞增生率分别为 $(45.93 \pm 6.39)\%$ 、 $(22.74 \pm 2.35)\%$ 和 $(24.12 \pm 3.59)\%$;细胞划痕愈合率分别为 $(36.02 \pm 5.84)\%$ 、 $(57.26 \pm 11.98)\%$ 和 $(18.16 \pm 9.73)\%$;细胞管腔形成数分别为 (29.20 ± 6.10) 、 (41.40 ± 4.04) 和 (22.00 ± 2.92) 个;总体比较差异均有统计学意义($F = 35.86, 23.53, 34.28, 21.12, 23.27$, 均 $P < 0.01$)。与正常对照组相比,缺氧对照组细胞的 LC3-II/LC3-I 比值、Beclin-1 蛋白相对表达均明显增加,细胞增生率明显下降,划痕愈合率和管腔形成数明显增加,缺氧+3-MA 组细胞中 LC3-II/I 比值、Beclin-1 蛋白相对表达量、划痕愈合率和细胞管腔形成数较缺氧对照组明显降低。**结论** 缺氧激活小鼠 RVECs 自噬,进而促进细胞迁移和管腔形成,自噬抑制剂 3-MA 可抑制自噬小体活性,并抑制 RVECs 的迁移和管腔形成能力。

【关键词】 自噬;血管生成;缺氧;视网膜新生血管;缺血性视网膜病变;细胞培养;近交系 C57BL 小鼠

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81500726);中国博士后自然科学基金项目(2016M592833)

Role of autophagy in angiogenesis of retinal vascular endothelial cells under hypoxia condition Li Rong, Du

Junhui, Yao Yang, Yu Zhaoxiang, Fan Zhuo, Chang Weiping

Department of Ophthalmology (Li R), Department of Central Laboratory (Yao Y, Yu ZY, Fan Z, Chang WP), The First Affiliated Hospital, Xi'an Medical University, Xi'an 710077, China; Department of Ophthalmology, Xi'an Ninth Hospital, Affiliated to Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710054, China (Du JH)

Corresponding author: Li Rong, Email: rechelrong198222@163.com

【Abstract】Objective To study the role of autophagy in proliferation, migration and tube formation of retinal vascular endothelial cells (RVECs) under the condition of hypoxia *in vitro*. **Methods** Mouse RVECs were isolated from 50 C57BL/6J mice primarily cultured using explant culture method, and the cells were identified by immunofluorescence of CD34. Well cultured RVECs were divided into normal control group, hypoxia control group and hypoxia+ 3-methyladenine (3-MA) group. The cells in the normal control group were cultured in the normal environment for 24 hours, and the cells in the hypoxia control group were cultured 1% O₂ environment for 24 hours, and the cells in the hypoxia+3-MA group were pretreated with 5 mmol/L 3-MA for 4 hours and then exposed to 1% O₂ environment for 24 hours. Microtubule-related protein 1 light chain 3 (LC3-II/LC3-I) and Beclin-1 protein contents in the cells were detected by Western blot analysis; the ultrastructure of autophagosome was examined under the transmission electron microscope. The proliferation, migration and tube formation of the cells were detected by Click-iTEdU kit, scratch assay and matrigel, respectively. **Results** Primarily culture cells grew well with the cobblestone-like appearance 5-7 days after culture and showed positive response for CD34. The autophagosome

number was increased in the hypoxia control group compared with the hypoxia+3-MA group and normal control group. The LC3-II/LC3-I ratio was 0.243 ± 0.030 , 0.658 ± 0.032 and 0.405 ± 0.095 ; the relative expression of Beclin-1 protein in the cells was 0.260 ± 0.040 , 0.650 ± 0.071 and 0.461 ± 0.089 ; the proliferation rate of the cells was $(45.93 \pm 6.39)\%$, $(22.74 \pm 2.35)\%$ and $(24.12 \pm 3.59)\%$; the scratch healing rate of the cells was $(36.02 \pm 5.84)\%$, $(57.26 \pm 11.98)\%$ and $(18.16 \pm 9.73)\%$; the number of tube formation was 29.20 ± 6.10 , 41.40 ± 4.04 and 22.00 ± 2.92 in the normal control group, hypoxia control group and hypoxia + 3-MA group, respectively, with significant differences among the groups ($F = 35.86, 23.53, 34.28, 21.12, 23.27$; all at $P < 0.01$). Compared with the normal control group, the ratio of LC3-II/LC3-I and the expression of Beclin-1 protein, scratch healing rate and the number of tube formation were significantly increased, and the proliferation rate was significantly reduced in the hypoxia control group (all at $P < 0.05$). Compared with the hypoxia control group, the ratio of LC3-II/LC3-I and the expression of Beclin-1 protein, scratch healing rate and the number of tube formation were significantly decreased in the hypoxia + 3-MA group. **Conclusions** Hypoxia environment activates autophagy of mouse RVECs, which enhances the migration and tube formation abilities of the cells. 3-MA inhibits the angiogenesis abilities of mouse RVECs.

[Key words] Autophagy; Angiogenesis; Hypoxia; Retinal neovascularization; Ischemic retinopathy; Cells, cultured; Mice, inbred C57BL

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81500726); China Postdoctoral Natural Science Foundation (2016M592833)

血管生成指在已形成的血管上通过出芽和延伸的方式形成新血管的复杂过程,这个过程中可出现血管生成刺激因子和血管抑制因子间作用的失衡,导致新生血管形成^[1]。视网膜新生血管(retinal neovascularization, RNV)是多种缺血性视网膜病变的晚期共同特征和主要致盲原因,目前其病理机制尚未完全阐明,给相关眼病的临床防治带来了很大挑战。因此,探索 RNV 的病理机制和寻找安全、有效的治疗方法是近年来眼科领域的重要研究方向。研究证实,哺乳动物细胞在缺氧或缺血-再灌注时自噬明显增加^[2]。抗肿瘤新生血管及心血管疾病方面的实验研究提示,诱导细胞自噬可以促进血管生成,且可能削弱抗新生血管药物疗效^[3-4]。自噬是真核生物中普遍存在的维持细胞内环境稳定的一种生命现象,在眼部疾病中发挥作用,但研究其与眼部新生血管的关系报道较少^[3,5-7]。本研究观察缺氧条件下小鼠视网膜血管内皮细胞(retinal vascular endothelial cells, RVECs)自噬水平的变化对细胞增生、迁移和管腔样结构形成的影响,为进一步在体研究自噬在缺血性视网膜病变中的作用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 清洁级 C57BL/6J 小鼠 50 只(西安医学院实验动物中心提供),实验期间自由饮水、进食,动物饲养环境为光/暗周期 12 h/12 h,背景噪音为 (40 ± 10) dB,室温 $20 \sim 24$ °C。实验动物的使用和饲养符合国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 青霉素(美国 HyClone 公司); 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)(美国

Selleck 公司); 兔抗鼠 CD34 一抗(ab81289, 美国 Abcam 公司); DAPI、Triton X-100(C1002, 上海碧云天生物技术有限公司); 荧光(Cy3)标记羊抗兔 IgG(BA1032)、HRP 标记羊抗兔二抗(BA1054)(武汉博士德生物工程有限公司); 兔抗鼠微管相关蛋白 1 轻链 3(light chain 3, LC3)多克隆抗体(2775)、兔抗鼠 Beclin-1 多克隆抗体(#3738)(美国 CST 公司); 兔抗鼠 GAPDH 多克隆抗体(AB-P-R001, 杭州贤至生物有限公司); Click-iT EdU 成像检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司); M199 培养基(美国 Gibco 公司); 小鼠视网膜微血管内皮细胞完全培养基(CM-M114, 武汉普诺赛生命科技有限公司); Matrigel(美国 BD 公司)。IX51 型倒置相差显微镜、BX53 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司); HT7700-SS 型透射电子显微镜(日本 HITACHI 公司); HF-100 型三气培养箱(上海力申科学仪器有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养及鉴定 将 C57BL/6J 小鼠过量麻醉处死,常规分离视网膜组织并置入含有青霉素 100 U/ml(商品单位)、链霉素 100 μ g/ml 的培养基中漂洗,去除残留的视网膜色素上皮细胞。剪除可见的主枝大血管后将视网膜组织置入培养皿中剪碎,加入胶原酶进行消化,倒置相差显微镜下观察,待细胞开始变圆彼此分离立即终止消化。用网孔为 100 μ m 的细胞筛网过滤细胞,冲洗并收集洗脱液,离心半径 19 cm, 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入内皮细胞专用完全培养基,在 37 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下进行培养,倒置显微镜下观察培养细胞的形态。在培养皿底部标记 RVECs 的克隆,用细胞刮刮去

其他细胞,继续培养至细胞密度达 80% 时按 1:3 的比例传代培养。将已爬好细胞的载玻片用 PBS 浸洗 3 次,用质量分数 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 浸洗 3 次,加入体积分数 0.5% Triton X-100 室温通透 20 min, PBS 浸洗 3 次,吸水纸吸干 PBS,滴加正常山羊血清室温下封闭 30 min,吸掉封闭液,每张载玻片滴加稀释好的 CD34 一抗(1:200),放入湿盒,4 °C 孵育过夜;PBST 浸洗 3 次,吸干爬片上多余液体,滴加 Cy3 标记羊抗兔 IgG(1:200),湿盒中 20~37 °C 孵育 1 h, PBST 浸洗 3 次;滴加 DAPI 避光孵育 5 min, PBST 浸洗 3 次,吸干爬片上的液体,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.2 细胞分组及处理 取对数生长期、生长状态良好的细胞接种于 6 孔板,每孔 5×10^5 个细胞。将细胞分为正常对照组、缺氧对照组和缺氧+3-MA 组,其中缺氧对照组细胞置于 $O_2:CO_2:N_2$ 体积比为 1:5:9 的培养箱中培养 24 h;缺氧+3-MA 组细胞先用 5 mmol/L 3-MA 预处理 4 h,然后处理方法同缺氧对照组。

1.2.3 Western blot 法检测各组细胞中 LC3 和 Beclin-1 蛋白表达 各组培养的细胞弃培养基, PBS 漂洗 2 次,加 100~150 μ l RIPA 裂解液裂解细胞,离心提取总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。按每孔 40 μ g 总蛋白上样,采用体积分数 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,120 V 恒压条件下分离蛋白,于 200 mA 及 90 min 条件下将蛋白转印至 PVDF 膜。采用含质量分数 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温摇床封闭 1 h。滴加相应一抗, LC3、Beclin-1 及 GAPDH 稀释比例均为 1:1 000,4 °C 摇床孵育过夜。TBST 充分洗涤 PVDF 膜,用 HRP 标记的羊抗兔二抗(封闭液稀释 1:50 000)浸泡,室温下摇床孵育 1 h。TBST 充分洗涤 PVDF 膜,ECL 显色,采用 BandScan 图像分析软件进行条带灰度信号分析,以 GAPDH 为内参照,计算 Beclin-1 蛋白相对表达量及 LC3-II/LC3-I 比值,每组重复测量 3 次,取其平均值。

1.2.4 透射电子显微镜下观察自噬小体 用细胞刮刮取各组细胞,在 4 °C 环境中用含有体积分数 2.5% 戊二醛的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲剂 4 °C 固定 2 h;PBS 漂洗 3 次,在质量分数 1% 锇酸中 4 °C 固定 2 h;采用连续梯度乙醇进行细胞脱水,将细胞包埋在 Embed-812 媒介中 48 h;在裸铜网格上使用超薄切片机制备 60~80 nm 超薄切片。将超薄切片用质量分数 2% 醋酸铀饱和水溶液和枸橼酸铅各染色 15 min;切片室温干燥过夜,透射电子显微镜下拍照,观察双层膜状结构的自噬体以及其他相关亚细胞结构。

1.2.5 细胞增生试验检测各组细胞增生率 将已爬

满细胞的载玻片用 PBS 浸洗 3 次,4% 多聚甲醛固定爬片 15 min, PBS 浸洗载玻片以去除固定液,用含体积分数 3% 牛血清蛋白的 PBS 洗涤爬片,每孔加入 1 ml 含 0.5% Triton X-100 的 PBS,室温孵育 20 min。按照 Click-iT EdU 成像检测试剂盒说明书进行染色,吸干爬片上的液体,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,光学显微镜下观察并采集图像,随机选取 4 个视野计算细胞增生率。细胞增生率 = 增生细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.6 细胞划痕试验检测各组细胞划痕愈合率 取各组处理细胞培养 24 h,用 P200 枪头在单层 REVCs 细胞上垂直划痕,用 PBS 洗细胞 3 次,去除划下的漂浮细胞,加入无血清 M199 培养基继续培养 24 h,倒置显微镜下观察并拍照。采用 Image J 软件测量从划痕边缘迁移的细胞面积,划痕愈合率 = (划痕后 0 h 划痕面积 - 划痕后 24 h 划痕面积) / 划痕后 0 h 划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.2.7 血管内皮细胞的管腔形成能力试验 4 °C 条件下过夜融化 Matrigel 胶,将每孔 200 μ l Matrigel 胶加至 24 孔板,37 °C 孵育 30~60 min,使 Matrigel 胶凝固。取按 1.2.2 方法处理过的细胞接种于铺好胶的 24 孔板内,密度为每孔 2×10^5 个细胞,37 °C 孵育 8 h。随机选取中部细胞分布均匀(避开边缘细胞分布不均匀)的视野,采用 Image J 软件计数管腔数目,每 3 个分叉处记作 1 个血管腔。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用均衡分组单因素干预三水平研究设计,正常对照组、缺氧对照组和缺氧+3-MA 组 RVECs 中 LC3-II/LC3-I 比值、Beclin-1 蛋白相对表达量、细胞增生率、划痕愈合率以及管腔形成数的总体差异比较均采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠 RVECs 的培养及鉴定

原代培养的小鼠 RVECs 于培养后 1 d 即开始贴壁,培养后 2 d 时贴壁细胞显著增多,倒置相差显微镜下可见 RVECs 自微血管碎片游出,呈克隆样生长,早期细胞呈短梭形,逐渐长成单层,呈铺路石样排列。培养后 5~7 d 细胞融合,细胞大小均匀,传代细胞生长速度明显加快(图 1)。CD34 免疫荧光检测显示细胞质和细胞膜呈红色荧光,证实得到的细胞为 RVECs(图 2)。

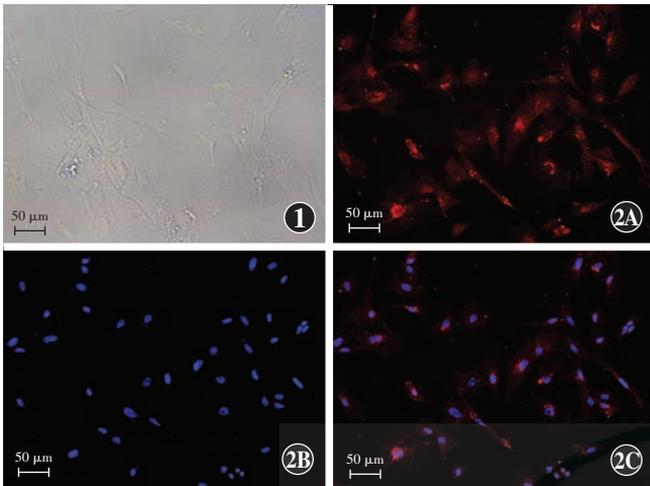


图 1 传代 24 h 贴壁后的小鼠 RVECs 形态 (标尺 = 50 μm) 内皮细胞呈长梭形和多边形 图 2 原代培养的小鼠 RVECs 细胞形态及鉴定 A: 原代培养的小鼠 RVECs 细胞质和细胞膜 CD34 表达阳性, 呈红色荧光 (Cy3, 标尺 = 50 μm) B: 原代培养的小鼠 RVECs 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI, 标尺 = 50 μm) C: A 与 B 的融合图 (标尺 = 50 μm)

2.2 各组细胞中 LC3-II/LC3-I 比值、Beclin-1 蛋白相对表达量的比较

Western blot 检测结果显示, 与正常对照组比较, 缺氧对照组细胞的自噬被激活, 细胞中 LC3-II 和 LC3-I 蛋白表达条带以及 Beclin-1 蛋白表达条带均明显增强, 缺氧 + 3-MA 组细胞中 LC3-II、LC3-I 和 Beclin-1 蛋白表达条带均稍弱于缺氧对照组。正常对照组、缺氧对照组和缺氧 + 3-MA 组细胞中 LC3-II/LC3-I 比值分别为 0.243 ± 0.030 、 0.658 ± 0.032 和 0.405 ± 0.095 , Beclin-1 相对表达量分别为 0.260 ± 0.040 、 0.650 ± 0.07 和 0.461 ± 0.089 , 各组总体比较差异均有统计学意义 ($F = 35.86, P < 0.01$; $F = 23.53, P < 0.01$)。其中缺氧对照组和缺氧 + 3-MA 组细胞中 LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1 蛋白相对表达量均明显高于正常对照组, 缺氧 + 3-MA 组细胞中 LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1 相对表达量均明显低于缺氧对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3)。

2.3 各组细胞中自噬小体超微结构变化

透射电子显微镜下可见 3 个组细胞内均有自噬小

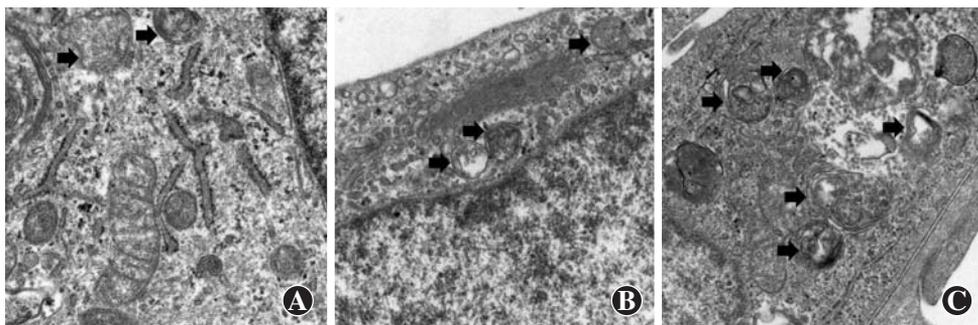


图 4 透射电子显微镜下各组 RVECs 细胞内的自噬小体超微结构 ($\times 8000$) 透射电子显微镜下自噬小体呈双层膜样结构的类圆形小体 A: 正常对照组仅可见极少数自噬小体 (箭头) B: 缺氧对照组细胞自噬小体数目明显增加 (箭头) C: 缺氧 + 3-MA 组细胞中自噬小体多于正常对照组, 少于缺氧对照组 (箭头)

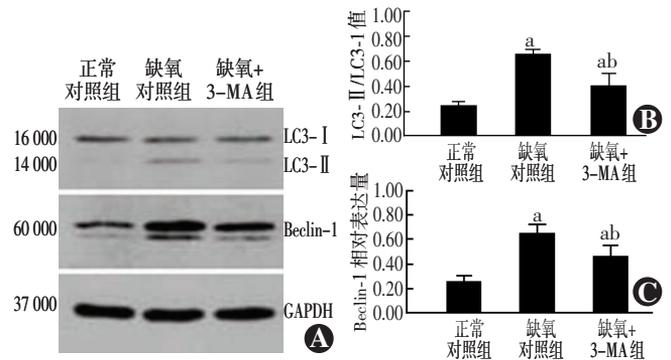


图 3 各组细胞 LC3-II/LC3-I 以及 Beclin-1 蛋白表达变化 A: LC3-II/LC3-I 和 Beclin-1 蛋白 Western blot 电泳图 B: 各组细胞 LC3-II/LC3-I 比值和 Beclin-1 蛋白相对表达量比较 LC3-II/LC3-I 比值: $F = 35.86, P < 0.01$; Beclin-1: $F = 23.53, P < 0.01$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.05$; 与缺氧对照组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 3$) LC3-II/LC3-I、Beclin-1 均为自噬标志物; MA: 甲基腺嘌呤

体形成, 呈双层膜样结构的类圆形小体, 小体内可见吞噬物。正常对照组细胞中仅见极少数自噬小体, 缺氧对照组细胞中自噬小体数量增多, 缺氧 + 3-MA 组细胞中自噬小体少于缺氧对照组, 但仍多于正常对照组 (图 4)。

2.4 各组细胞增生率比较

荧光显微镜下正常对照组增生细胞数量较多, 呈红色荧光; 缺氧对照组红色荧光染色细胞明显减少, 缺氧 + 3-MA 组红色荧光染色细胞数与缺氧对照组接近 (图 5)。正常对照组、缺氧对照组和缺氧 + 3-MA 组细胞的增生率分别为 $(45.93 \pm 6.39)\%$ 、 $(22.74 \pm 2.35)\%$ 和 $(24.12 \pm 3.59)\%$, 各组细胞增生率总体比较差异有统计学意义 ($F = 34.28, P < 0.01$)。与正常对照组比较, 缺氧对照组和缺氧 + 3-MA 组细胞增生率明显下降, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 缺氧 + 3-MA 组细胞增生率与缺氧对照组比较稍升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 6)。

2.5 各组细胞划痕愈合率比较

各组细胞划痕后 24 h 均可见细胞迁移进入划痕区, 缺氧对照组迁移细胞最多, 缺氧 + 3-MA 组迁移细胞最少 (图 7)。正常对照组、缺氧对照组和缺氧 + 3-MA

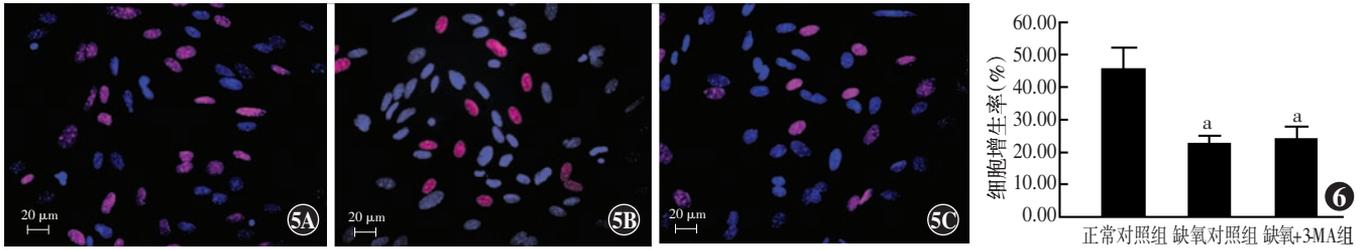


图 5 荧光显微镜下观察细胞增生情况(标尺=20 μm) 增生细胞呈红色荧光(Apollo),细胞核呈蓝色荧光(Hoechst) A:正常对照组可见增生细胞数量较多 B:缺氧对照组增生细胞数少于正常对照组 C:缺氧+3-MA 组增生细胞数与缺氧对照组接近 图 6 各组细胞增生率比较 $F = 34.28, P < 0.01$;与正常对照组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验, $n = 4$) MA:甲基腺嘌呤

组细胞划痕愈合率分别为(36.02±5.84)%、(57.26±11.98)%和(18.16±9.73)%,各组细胞划痕愈合率总体比较差异有统计学意义($F = 21.12, P < 0.01$)。缺氧对照组 RVECs 细胞划痕愈合率明显高于正常对照组和缺氧+3-MA 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);缺氧+3-MA 组细胞划痕愈合率明显低于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 8)。

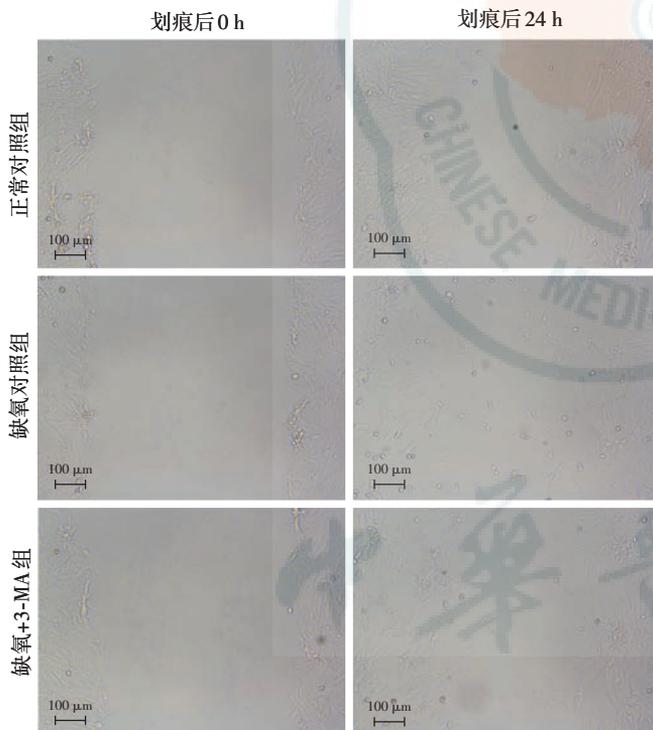


图 7 倒置显微镜下观察各组 RVECs 细胞迁移情况(标尺 = 100 μm) 正常对照组、缺氧对照组和缺氧+3-MA 组划痕后 0 h 均可见明显的无细胞区,划痕后 24 h 可见周围细胞向划痕区迁移,缺氧对照组划痕区内迁移细胞最多,缺氧+3-MA 组迁移细胞最少

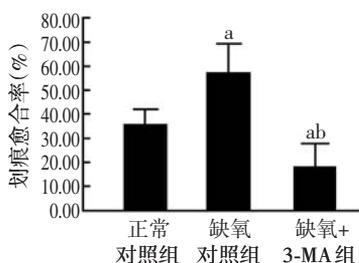


图 8 各组 RVECs 划痕愈合率比较 $F = 21.12, P < 0.01$;与正常对照组比较, $^a P < 0.05$,与缺氧对照组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验, $n = 5$) MA:甲基腺嘌呤

2.6 各组细胞管腔形成数比较

细胞培养后 8 h,各组细胞均有明显的管腔样结构形成,其中缺氧对照组管腔形成较多,正常对照组和缺氧+3-MA 组管腔形成较少(图 9)。正常对照组、缺氧对照组和缺氧+3-MA 组细胞管腔形成数分别是(29.20±6.10)、(41.40±4.04)和(22.00±2.92)个,3 个组细胞管腔形成数总体比较差异有统计学意义($F = 23.27, P < 0.01$)。缺氧对照组细胞管腔形成数明显多于正常对照组和缺氧+3-MA 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),缺氧+3-MA 组细胞管腔形成数少于正常对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 10)。

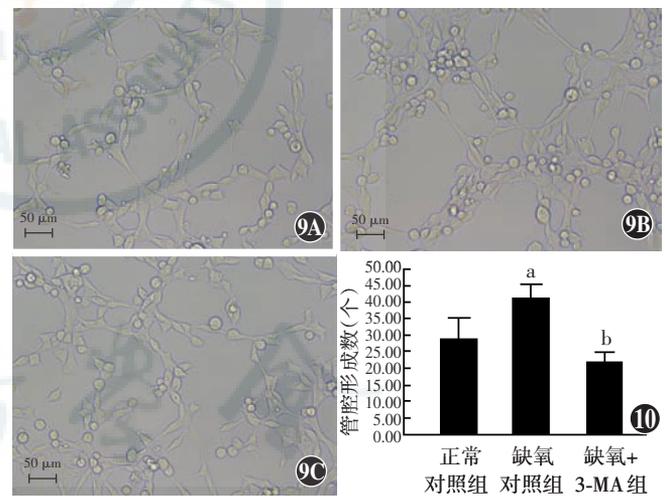


图 9 倒置显微镜下 RVECs 细胞管状结构形成情况(标尺 = 50 μm)

A:正常对照组清晰可见 RVECs 形成的管腔结构 B:缺氧对照组 RVECs 形成的管腔数明显多于正常对照组 C:缺氧+3-MA 组 RVECs 形成的管腔数少于缺氧对照组 图 10 各组细胞管腔形成数比较 $F = 23.27, P < 0.01$;与正常对照组比较, $^a P < 0.05$,与缺氧对照组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验, $n = 5$) MA:甲基腺嘌呤

3 讨论

多种因子参与血管生成过程,包括血管生成因子的分泌,蛋白水解酶的分泌和激活,细胞外基质的降解,血管内皮细胞的活化、迁移、增生、生长、出芽和管

腔形成,新血管的分化和成熟以及血管网的重塑等,缺氧是血管生成的主要诱发因素^[8]。视网膜血管生成是机体的一种正常保护反应,在视网膜组织修复和缺血-再灌注中发挥关键作用。然而,其继发的眼部病变,如玻璃体积血、增生性视网膜病变和新生血管性青光眼等会导致眼部正常结构的破坏,严重危害视功能,影响患者的生存质量。目前,激光、抗新生血管药物和玻璃体切割术虽然对 RNV 有一定的疗效,可在一定程度上延缓病变的进展,但均不可避免地存在损伤健康组织的风险,并且治疗后容易复发,少数患者有眼部不良反应发生,故目前国内外尚未获得完全安全、有效的治疗方法。因此,RNV 的病理机制是眼科研究的热点。

自噬是细胞的一种高度保守的降解途径,具有清除变性蛋白质和衰老或损伤细胞器、实现物质再利用、合成新的蛋白质、产生新的 ATP 的作用,从而维持细胞内环境稳态,以应对各种不利环境^[9-10]。自噬在机体的免疫、感染、炎症、肿瘤、心血管疾病、神经退行性疾病的发病过程中具有十分重要的作用^[11-16],细胞自噬广泛存在于酵母、线虫、果蝇以及脊椎动物的细胞中,目前已发现 30 多个与细胞自噬相关的特异性基因,其编码蛋白以协同的方式参与自噬的诱导、前自噬体的形成、自噬体的形成、自噬体的运输及膜泡融合等自噬体形成的各个阶段,其中 Beclin-1 和 LC3 广泛用作自噬标记蛋白。Beclin-1 是酵母 Atg6 的同源基因,与早期自噬体形成有关,且是其他自噬蛋白基因参与自噬形成过程的必需成分^[17]。LC3 是 Atg8 在哺乳动物细胞中的同源蛋白,以胞质型 LC3 (LC3-I) 和膜型 LC3 (LC3-II) 2 种形式存在,参与自噬小体的形成。自噬形成时,LC3-I 酶解掉一小段多肽,转变为 LC3-II^[18]。

目前实验中自噬检测主要是采用电子显微镜下超微结构检查和 LC3-II/LC3-I 比值的 Western blot 检测。透射电子显微镜可观察到膜状结构的自噬小体以及其他亚细胞结构,是检测自噬的金标准。近年来,检测细胞自噬的方法不断问世,然而迄今尚无任何一种方法是绝对准确或特异的,因此提倡多种方法联合使用以获取可靠数据^[18]。本研究中采用透射电子显微镜技术结合 Western blot 法检测细胞中 Beclin-1 和 LC3 蛋白表达,以评估不同处理组 RVECs 的自噬水平。3-MA 是 Class III PI3K 通路抑制剂,可特异性阻断自噬体的形成,广泛用作自噬的抑制剂^[4,19-20]。鉴于此,本研究中采用 3-MA 抑制自噬。

正常情况下细胞自噬维持在基础水平,外部环境变化,例如营养缺乏和氧化应激的刺激可刺激自噬,以利于细胞存活^[2]。本研究也证实在缺氧环境下,

RVECs 中表达的 Beclin-1 和 LC3 蛋白表达上调,且自噬体的形成增多。细胞缺氧时自噬水平增加,对细胞和组织发挥保护作用,但对于不同类型的细胞,自噬会导致细胞存活或细胞死亡等不同结果^[21]。在本研究中,缺氧条件下 RVECs 中 Beclin-1 和 LC3 蛋白表达上调,且自噬体形成增多,RVECs 的细胞活力明显降低,与 Rosen 等^[22]化学诱导缺氧研究结果类似。研究显示缺氧应激状态下视网膜 Atg3 的表达上调,以保护视网膜免受缺损伤^[23],同时许多视网膜细胞发生凋亡^[24]。我们推测缺氧时激活的细胞自噬可促进细胞凋亡,因此抑制了细胞活力。近年来的研究发现,牛主动脉内皮细胞在缺乏营养时诱导自噬可增加细胞管腔形成和细胞迁移,而抑制自噬可减少血管生成,提示抑制自噬减弱了血管内皮生长因子诱导的血管生成作用^[4]。本研究中也发现,缺氧诱导自噬可增加 RVECs 细胞迁移和管腔形成,自噬抑制剂 3-MA 可抑制这些过程。此外,有研究显示血管生成抑制剂可以诱导血管内皮细胞 Beclin-1 表达上调,而这种效应与营养状况或缺氧应激无关^[3]。以上研究结果提示,新生血管抑制剂可以诱导细胞自噬,进而促进血管生成,形成恶性循环,削弱抗新生血管治疗药物的疗效。以自噬为靶点可能成为治疗心血管疾病的新方向,且自噬反应可作为增强血管生成抑制剂疗效的新靶点。

本研究的初步研究结果提示,自噬在缺氧环境下 RVECs 的血管生成过程中发挥作用,推测调控自噬有望成为治疗 RNV 的药物靶点。然而,自噬对 RVECs 血管生成的调控机制、自噬抑制剂对视网膜血管生成的在体影响仍需进一步研究。

参考文献

- [1] D'Alessio A, Moccia F, Li JH, et al. Angiogenesis and vasculogenesis in health and disease [J/OL]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 126582 [2017-08-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4478295/>. DOI:10.1155/2015/126582.
- [2] Abounit K, Scarabelli TM, McCauley RB. Autophagy in mammalian cells [J]. World J Biol Chem, 2012, 3(1): 1-6. DOI:10.4331/wjbc.v3.i1.1.
- [3] Ramakrishnan S, Nguyen TM, Subramanian IV, et al. Autophagy and angiogenesis inhibition [J]. Autophagy, 2007, 3(5): 512-515.
- [4] Du J, Teng RJ, Guan T, et al. Role of autophagy in angiogenesis in aortic endothelial cells [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2012, 302(2): 383-391. DOI:10.1152/ajpcell.00164.2011.
- [5] Mitter SK, Rao HV, Qi X, et al. Autophagy in the retina: a potential role in age-related macular degeneration [J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 723: 83-90. DOI:10.1007/978-1-4614-0631-0_12.
- [6] 谢佳,朱瑞琳,杨柳.自噬在年龄相关性黄斑变性和视网膜脱离中的研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(12): 1145-1148. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.12.021.
Xie J, Zhu RL, Yang L. Research progress of autophagy in age-related macular degeneration and retinal detachment [J]. Chin J Exp

- Ophthalmol, 2016, 34 (12) : 1145-1148. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 12. 021.
- [7] 侯文文, 石焕琦, 张真, 等. 自噬抑制剂 3-MA 对高糖诱导的人视网膜色素上皮细胞增生的抑制作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(1) : 5-9. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 01. 002.
- Hou WW, Shi HQ, Zhang Z, et al. Inhibitory effects of autophagy inhibitor 3-MA on high glucose-induced proliferation of human retinal pigment epithelium cells[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35 (1) : 5-9. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 01. 002.
- [8] Maxwell PH, Ratcliffe PJ. Oxygen sensors and angiogenesis[J]. Semin Cell Dev Biol, 2002, 13(1) : 29-37. DOI: 10. 1006/scdb. 2001. 0287.
- [9] Clark SL. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope[J]. J Biophys Biochem Cytol, 1957, 3(3) : 349-362.
- [10] Ashford TP, Porter KR. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes[J]. J Cell Biol, 1962, 12 : 198-202.
- [11] Orvedahl A, Sumpter R, Xiao G, et al. Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors [J]. Nature, 2011, 480(7375) : 113-117. DOI: 10. 1038/nature10546.
- [12] Zhao Y, Xiong X, Sun Y. DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF(β TrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy[J]. Mol Cell, 2011, 44 (2) : 304-316. DOI: 10. 1016/j. molcel. 2011. 08. 029.
- [13] Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism[J]. Nature, 2009, 458 (7242) : 1131-1135. DOI: 10. 1038/nature07976.
- [14] Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism [J]. Science, 2010, 330(6009) : 1344-1348. DOI: 10. 1126/science. 1193497.
- [15] Tsuchihara K, Fujii S, Esumi H. Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues [J]. Cancer Lett, 2009, 278(2) : 130-138. DOI: 10. 1016/j. canlet. 2008. 09. 040.
- [16] Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(9) : 1016-1023. DOI: 10. 1038/ncb2329.
- [17] Maiuri MC, Le TG, Ciriollo A, et al. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1 [J]. EMBO J, 2007, 26(10) : 2527-2539. DOI: 10. 1038/sj. emboj. 7601689.
- [18] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research [J]. Cell, 2010, 140(3) : 313-326. DOI: 10. 1016/j. cell. 2010. 01. 028.
- [19] Wu YT, Tan HL, Shui G, et al. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase [J]. J Biol Chem, 2010, 285(14) : 10850-10861. DOI: 10. 1074/jbc. M109. 080796.
- [20] Du JH, Li X, Li R, et al. Role of autophagy in angiogenesis induced by a high-glucose condition in RF/6A cells [J]. Ophthalmologica, 2017, 237(2) : 85-95. DOI: 10. 1159/000455270.
- [21] Mazure NM, Pouyssegur J. Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? [J]. Curr Opin Cell Bio, 2010, 22(2) : 177-180. DOI: 10. 1016/j. ceb. 2009. 11. 015.
- [22] Rosen R, Vagaggini T, Chen Y, et al. Zeaxanthin inhibits hypoxia-induced VEGF secretion by RPE cells through decreased protein levels of hypoxia-inducible factors-1 α [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015 : 687386. DOI: 10. 1155/2015/687386.
- [23] Wu BX, Darden AG, Laser M, et al. The rat Apg3p/Aut1p homolog is upregulated by ischemic preconditioning in the retina [J]. Mol Vis, 2006, 12 : 1292-1302.
- [24] Kunchithapatham K, Rohrer B. Apoptosis and autophagy in photoreceptors exposed to oxidative stress [J]. Autophagy, 2000, 3(5) : 433-441.

(收稿日期: 2017-10-11 修回日期: 2018-01-04)

(本文编辑: 尹卫靖 张宇)

读者·作者·编者

本刊对论文中关键词的著录要求

本刊投稿的论文请分别在中英文摘要下方标引 3~5 个关键词以便于编制文献索引。关键词应选取能反映文章主题概念的词或词组, 中英文关键词应一致。投稿作者可登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> 或 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh> 网站从美国国立医学图书馆的 MeSH 数据库中选取关键词, 其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。未被词表收录的新的专业术语(自由词)可直接作为关键词使用, 但应排序在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释字顺表》还原为全称, 各关键词之间用“;”分隔。

(本刊编辑部)

广告目次

- 拓普康 OCT(全能真彩扫频源 OCT) 北京拓普康医疗器械有限公司……封二
- 同息通(曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……前插页
- 普诺特(预装式非球面人工晶状体) 爱博诺德(北京)医疗科技有限公司……前插页
- 千寿眼科系列产品 千寿制药株式会社……前插页
- 博士伦治疗用绷带镜(软性亲水接触镜) 博士伦(上海)贸易有限公司……前插页
- 沃丽汀(卵磷脂络合碘片) 广东泰恩康医药股份有限公司……前插页
- 阿玛仕(准分子激光角膜屈光治疗机) 高视医疗……前插页
- 见康(拉坦前列素滴眼液) 华润紫竹药业有限公司……前插页
- 灵光(复方樟柳碱注射液) 华润紫竹药业有限公司……前插页
- 氟美童(氟米龙滴眼液) 参天制药(中国)有限公司……封三
- 迈达科技 天津迈达科技股份有限公司……封底