

· 实验研究 ·

叉头框转录因子 F2 小发夹 RNA 对人眼小梁网细胞外基质蛋白表达的抑制作用

刘爱华¹ 高美子² 黄亮瑜¹ 刘勋¹ 苏睿虹¹ 赵今稚¹ 王礼明¹ 张晓敏¹ 李筱荣¹ 东莉洁¹¹天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼科研究所 天津医科大学眼视光学院 300384; ²天津中医药大学 天津中医药大学第一附属医院 300193

通信作者: 东莉洁, Email: aitaomubang@126.com

【摘要】 目的 探讨叉头框转录因子 F2 (FoxF2) 对小梁网细胞外基质表达的调控作用。 **方法** 将培养人眼小梁网细胞 (HTMCs) 分为 Scramble 对照组和 FoxF2 小发夹 RNA (shRNA) 组, 构建 FoxF2 重组干扰载体 FoxF2 shRNA, 应用 FoxF2 shRNA 慢病毒颗粒感染 HTMCs, 采用 Western blot 法检测 FoxF2 shRNA 的敲低效果及细胞外基质 (ECM) 蛋白的表达变化, 利用 Transwell 计数实验分析 HTMCs 的迁移能力。 **结果** 体外培养的 HTMCs 呈长梭形, 生长状态良好, 形态符合 HTMCs 形态学特征。 FoxF2 shRNA 组 FoxF2 蛋白相对表达量为 0.72 ± 0.02 , 显著低于 Scramble 对照组的 1.27 ± 0.05 , 差异有统计学意义 ($t = 16.68, P < 0.01$)。 FoxF2 shRNA 组纤连蛋白 (FN)、I 型胶原蛋白 (COL I)、 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 相对表达量分别为 0.43 ± 0.03 、 0.53 ± 0.08 和 0.86 ± 0.15 , 显著低于 Scramble 对照组的 0.87 ± 0.04 、 1.66 ± 0.06 和 1.73 ± 0.13 , 差异均有统计学意义 ($t = 15.08, 18.81, 7.50$, 均 $P < 0.01$)。 FoxF2 shRNA 组 HTMCs 的迁移数量为 117.30 ± 11.41 , 显著低于 Scramble 对照组的 251.00 ± 10.37 , 差异有统计学意义 ($t = 8.72, P < 0.01$)。 **结论** 成功制备可特异性敲低 HTMCs 内源性 FoxF2 表达的 FoxF2 shRNA 病毒, 并证实 FoxF2 干扰对 HTMCs 中 ECM 的表达及细胞迁移具有抑制作用。

【关键词】 叉头框转录因子 F2; 小梁网细胞; 细胞外基质; 原发性开角型青光眼

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81570872); 天津市应用基础与前沿技术研究计划项目 (15JCYBJC24900); 天津市卫生局基金项目 (2011KZ103); 天津市教委课题项目 (20110132); 天津医科大学眼科医院院内基金项目 (yk2006-04); 天津医科大学博士科研启动基金项目 (20120402)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.06.002

The inhibitory effect of FoxF2 shRNA on the expression of extracellular matrix of human trabecular meshworkLiu Aihua¹, Gao Meizi², Huang Liangyu¹, Liu Xun¹, Su Ruihong¹, Zhao Jinzhi¹, Wang Liming¹, Zhang Xiaomin¹, Li Xiaorong¹, Dong Lijie¹¹Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin Medical University Eye Institute, School of Optometry and Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300384, China; ²Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Corresponding author: Dong Lijie, Email: aitaomubang@126.com

[Abstract] Objective To explore the role of forkhead box F2 (FoxF2) in the extracellular matrix of trabecular meshwork. **Methods** The cultured human trabecular meshwork cells (HTMCs) were divided into Scramble control group and FoxF2 small hairpin RNA (shRNA) group, then FoxF2 shRNA, the FoxF2 restructuring interference carrier was built, HTMCs were infected with FoxF2 shRNA lentivirus. Western blot assay was used to detect the expression of FoxF2 protein and extracellular matrix. Furthermore, Transwell counting experiment was used to analyze the migration ability of HTMCs. **Results** The cultured HTMCs grew well and showed a long spindle shape. The growth status of HTMCs was well, and their morphological characteristics were consistent with the HTMCs *in vivo*. The relative expression level of FoxF2 protein in the FoxF2 shRNA group was lower than that in the Scramble control group, with a significant difference between them (0.72 ± 0.02 vs. 1.27 ± 0.05 ; $t = 16.68, P < 0.01$). The relative expression level of fibronectin (FN), collagen type I (COL I) and α -smooth muscle actin (α -SMA) were

0.43±0.03, 0.53±0.08 and 0.86±0.15 in the FoxF2 shRNA group, and 0.87±0.04, 1.66±0.06 and 1.73±0.13 in the Scramble control group, respectively, the relative expression levels of FN, COL I and α -SMA in the FoxF2 shRNA group were significantly lower than those in the Scramble control group ($t=15.08, 18.81, 7.50$, all at $P<0.01$). The migration number of HTMCs in the FoxF2 shRNA group was significantly lower than that in the Scramble control group (117.30 ± 11.41 vs. 251.00 ± 10.37 ; $t=8.72, P<0.01$). **Conclusions** The FoxF2 shRNA lentivirus are successfully constructed, which can decrease the expression of FoxF2 in HTMCs. Low expression of FoxF2 can reduce the expression level of extracellular matrix protein in HTMCs and inhibit the migration ability of HTMCs.

[Key words] Forkhead box F2; Trabecular meshwork cells; Extracellular matrix; Primary open angle glaucoma

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81570872); Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology (15JCYBJC24900); Tianjin Health Bureau Fund (2011KZ103); The Science & Technology Development Fund of Tianjin Education Commission for Higher Education (20110132); Tianjin Medical University Eye Hospital Fund Project (yk2006-04); Tianjin Medical University Doctoral Research Fund (20120402)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.06.002

原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma, POAG) 是一种由于特征性视神经损伤, 最终造成视野缺损, 甚至致盲的眼病。各种原因引起的房水循环障碍导致的病理性眼压升高是目前公认的 POAG 发病的主要原因, 其中以小梁网房水循环失衡, 房水排出阻力增加, 从而引起的眼压上升为主要因素^[1]。小梁网是小梁细胞贴附于小梁柱上形成的筛网状结构, 通过网眼引流的房水, 其引流阻力直接与网眼大小相关, 而小梁网细胞外基质蛋白 (extracellular matrix, ECM) 的成分和含量直接影响网眼的大小^[2-3]。因此, 适量的小梁网 ECM 是维持房水循环系统正常的重要生理基础。叉头框转录因子 (forkhead box, Fox) 是一类翼螺旋/叉头型转录因子调节家族, 在胚胎发育过程中起着关键性的调控作用^[4]。FoxF2 蛋白是 Fox 家族的重要成员之一, 为间质转录因子, 在上皮相邻的间质中特异性表达, 参与调控上皮间质之间的相互转化并维持组织稳态, 与动物的生长发育、免疫调控以及肿瘤的发生密切相关^[5-6]。研究发现, FoxF2 的表达也参与细胞外基质和胶原的调控, 沉默 FoxF2 后前列腺间质 ECM 的表达下降^[7], 而敲除了 FoxF2 基因的小鼠可能导致肠发育不良和肠组织 I 型、IV 型胶原的减少^[8]。然而 FoxF2 在眼部组织发育以及疾病发生和发展过程中作用的研究却鲜有报道。因此, 本研究中拟建立表达 FoxF2 小发夹 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 的人眼小梁网细胞株, 并通过敲低人眼小梁网细胞 (human trabecular meshwork cells, HTMCs) 中 FoxF2 的表达, 检测胞外基质蛋白和 HTMCs 迁移的变化, 探讨 FoxF2 在小梁网 ECM 中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小梁网细胞来源 HTMCs 由天津医科大学眼科医院汪建涛教授惠赠, 传 3~4 代备用。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清、青霉素/链霉素 (美国 Gibco 公司); 抗 FoxF2 抗体 (ab198283)、抗纤连蛋白 (fibronectin, FN) 抗体 (ab2413)、抗胶原蛋白 I (collagen I, COL I) 抗体 (ab34710)、抗 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (ab5694)、山羊抗兔 IgG H&L (HRP) (ab6721) (美国 Abcam 公司); PVDF 膜、化学发光液 (美国 Millipore 公司); 慢病毒载体 pHB-U6-MCS-ZsGreen-Puro、pHB-U6-MCS-ZsGreen-Puro-Scramble 质粒、HEK293FT 细胞、psPAX2 质粒、pMD2G 质粒、polybrene (上海汉恒公司); Transwell 小室 (美国 Corning 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与实验分组 将 HTMCs 接种于 T25 细胞培养瓶中, 用质量分数 0.1% 明胶润洗瓶底后加入含有体积分数 10% 胎牛血清的 DME 培养基, 将培养瓶放置于 37 °C、含体积分数 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。将细胞分为 Scramble 对照组和 FoxF2 shRNA 组。

1.2.2 构建 FoxF2 重组干扰载体 FoxF2 shRNA 根据 FoxF2 特异性干扰序列 5'-GAGAGCGTCTGTCTGATATTA-3' 进行相应的引物合成, 将单链的引物退火成双链 Oligo 序列并连接入经 BamHI/EcoRI 双酶切后的线性化的 pHB-U6-MCS-ZsGreen-Puro RNA 干扰载体, 该载体中含有 CMV 启动子调控的 ZsGreen

基因表达及 PGK 启动子启动的 Puro 抗性基因表达,构建成功后挑取单克隆菌落,转化子送往测序公司进行测序验证,对测序验证正确的克隆进行高纯度质粒抽提。

1.2.3 慢病毒包装 首先将构建好的慢病毒载体 FoxF2 shRNA 和辅助质粒 pSPAX2、pMD2G 分别进行高纯度无内毒素大量抽提,具体要求为质量浓度大于 $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $A_{260/280}$ 在 1.7 ~ 1.8 的无内毒素质粒方可应用于后续的病毒制备,接种 293T 细胞于直径 100 mm 细胞培养皿中待细胞汇合达到 70% ~ 80% 进行转染。三质粒慢病毒包装体系如下:pSPAX2 $10\text{ }\mu\text{g}$ 、pMD2G $5\text{ }\mu\text{g}$ 、FoxF2 shRNA1 质粒 $10\text{ }\mu\text{g}$ 及 Lipofiter™ $75\text{ }\mu\text{l}$,混合均匀并室温孵育 20 min 后,将混合好的包装体系加入到已经接种好的 HEK293FT 细胞中。细胞培养箱内培养 6 h,去除含有 Lipofiter™-DNA 的培养液。更换含 10% 胎牛血清的新鲜完全培养基,继续培养。转染后 48 h 收集病毒上清时,将 100 mm 培养皿中的培养基倒入 50 ml 离心管中,注意培养皿壁不要接触离心管口,以防出现细菌污染,随后补入 10 ml 含 10% 胎牛血清的新鲜完全培养基,平稳置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温培养箱中继续培养。转染后 72 h,将 100 mm 培养皿中的培养基倒入 50 ml 离心管中,同样注意培养皿壁不要接触离心管口,以防出现细菌污染。取 50 ml 离心管中的培养上清液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $2\,000\times g$ 离心 10 min,去除细胞碎片;然后收集病毒原液上清置于超速离心管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $82\,700\times g$ 离心 120 min,将得到的 $2\times 10^8\text{ TU/ml}$ 高滴度慢病毒超离液置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2.4 慢病毒感染 HTMCs 预先接种 1.4×10^5 /孔 HTMCs 至 24 孔板中,将细胞生长时间控制在 12 ~ 18 h 汇合达到 50% ~ 60% 为宜,为提高细胞的感染效率,在感染细胞前每孔给予 $500\text{ }\mu\text{l}$ polybrene 使其终质量浓度为每孔 6 ng/ml ,室温静置 30 min 后吸除培养基,每孔中加入 $250\text{ }\mu\text{l}$ FoxF2 shRNA 慢病毒液,室温静置 4 h 后在现有培养基的基础上使用高糖完全培养基补齐至每孔 $500\text{ }\mu\text{l}$,每 24 h 换液 1 次,48 h 换液后于倒置荧光显微镜下观察并记录慢病毒感染情况。

1.2.5 Western blot 法检测 HTMCs 及细胞外基质蛋白的表达 将感染 Scramble/FoxF2 shRNA 的 HTMCs 培养 3 ~ 4 d,收集细胞进行总蛋白提取,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存,调整蛋白浓度,制备样品进行 SDS 凝胶电泳实验; 300 mA 恒流转膜 3 h 封闭液室温封闭 1 h 后加入 FoxF2 抗体 (1:1 000)、FN 抗体 (1:500)、COL I 抗体 (1:1 000)、 α -SMA 抗体 (1:1 000) 孵育过夜后 PBST 室温洗 3 次,每次 10 min,并于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育二抗

(HRP 标记的山羊抗兔 IgG, 1:5 000) 2 h 后 PBST 洗 3 次,每次 10 min,后置于暗室化学发光进行胶片曝光,实验重复 3 次。利用 Image J (1.49v 版本) 软件对 Western blot 结果进行量化分析,以 GAPDH 为内参,计算各目的蛋白条带的相对灰度值。

1.2.6 Transwell 细胞迁移试验检测细胞迁移率 将分别表达 Scramble 和 FoxF2 shRNA 的 HTMCs 进行消化,台盼蓝染色后计数,用无血清培养基以 1.5×10^5 个细胞接种于 Transwell 小室上室内,下室加 10% 胎牛血清的培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养 10 h 后吸出小室和 24 孔板内液体,棉签将小室上表面细胞轻轻擦掉,质量分数 4% 多聚甲醛固定 Transwell 小室下表面细胞 15 min 后 Dulbecco 磷酸盐缓冲液 (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS) 洗 3 次,质量分数 0.1% 结晶紫染色液 (质量分数 0.9% NaCl 溶液稀释) 染色 25 min 后 DPBS 洗 3 次。将小室晾干,用无菌尖刀片将小室表面切下,进行中性的树胶封片,每组设置 3 个复孔,本实验共重复 3 次。倒置显微镜下拍照,每组任意选取 6 ~ 8 个视野用以计数小室底膜上下室附着的细胞,即为发生迁移的细胞数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。计量资料的数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,经 Levene 检验证实方差齐性,以 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示,2 个组计量资料数据的比较采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HTMCs 的形态学特点

HTMCs 经过培养后贴壁生长,分布均匀,呈长梭形,生长状态良好,形态符合 HTMCs 形态学特征,生长状态及形态稳定 (图 1)。

2.2 慢病毒包装法感染 HTMCs

HTMCs 经载有绿色荧光的 FoxF2 shRNA 慢病毒感染后在荧光显微镜下呈绿色荧光,HTMCs 感染后用 DAPI 染成蓝色,DAPI 染色与绿色荧光图片相互叠加可用于指示感染效率,结果显示慢病毒可有效感染 HTMCs 细胞 (图 2)。

2.3 FoxF2 shRNA 敲低效果检测

慢病毒感染后, FoxF2 shRNA 组 FoxF2 蛋白表达水平显著低于 Scramble 对照组 (图 3A)。FoxF2 shRNA 组 FoxF2 蛋白相对表达量为 0.72 ± 0.02 ,显著低于 Scramble 对照组的 1.27 ± 0.05 ,差异有统计学意义 ($t=16.68, P<0.01$) (图 3B)。

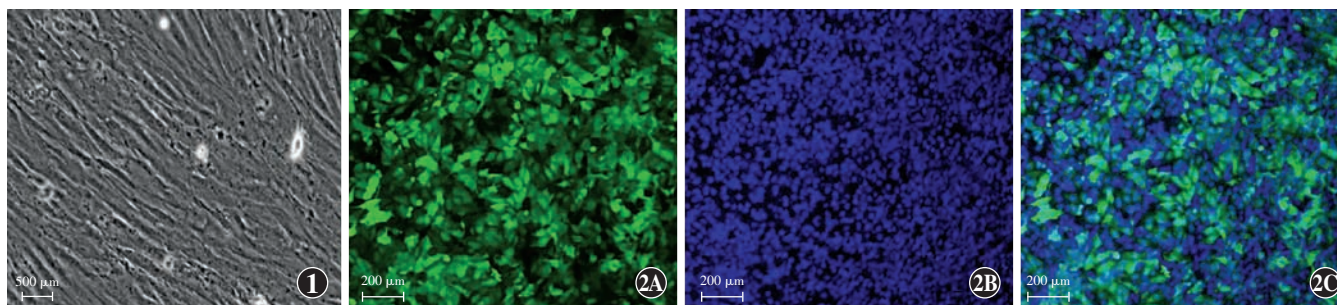


图1 HTMCs的形态学观察($\times 40$, 标尺=500 μm) HTMCs贴壁生长,分布均匀,呈长梭形,生长状态良好 图2 慢病毒包装法感染 HTMCs 效果($\times 100$, 标尺=200 μm) A:经 FoxF2 shRNA 慢病毒颗粒感染的 HTMCs 呈绿色荧光 B:FoxF2 shRNA 慢病毒颗粒感染后经 DAPI 染色 HTMCs, 示踪细胞核位置 C:DAPI 染色与绿色荧光图片相互叠加用于指示感染效率

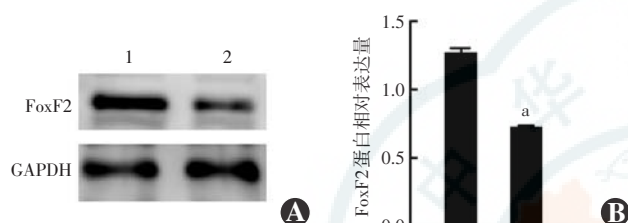


图3 FoxF2 shRNA 敲低效果检测 A:Western blot 检测慢病毒感染后 FoxF2 蛋白表达电泳图 B:慢病毒感染后 FoxF2 蛋白相对表达量比较 与 Scramble 对照组比较, $^*P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) 1:Scramble 对照组 2:FoxF2 shRNA 组 FoxF2:叉头框转录因子 F2

2.4 FoxF2 shRNA 对 HTMCs 细胞外基质蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示,感染后 FoxF2 shRNA 组 HTMCs 细胞外基质蛋白 FN、COL I、 α -SMA 表达水平均低于 Scramble 对照组(图 4A)。FoxF2 shRNA 组 FN、COL I 和 α -SMA 蛋白相对表达量分别为 0.43 ± 0.03 、 0.53 ± 0.08 和 0.86 ± 0.15 ,显著低于 Scramble 对照组的 0.87 ± 0.04 、 1.66 ± 0.06 和 1.73 ± 0.13 ,差异均有统计学意义($t = 15.08$ 、 18.81 、 7.50 , 均 $P < 0.01$) (图 4B ~ D)。

2.5 Scramble 或 FoxF2 shRNA 慢病毒感染后 HTMCs 迁移情况

FoxF2 shRNA 组 HTMCs 迁移细胞数明显少于 Scramble 对照组(图 5A, B)。定量分析结果显示, FoxF2 shRNA 组 HTMCs 的迁移数量为 117.30 ± 11.41 ,显著低于 Scramble 对照组的 251.00 ± 10.37 ,差异有统计学意义($t = 8.72$, $P < 0.01$) (图 5)。

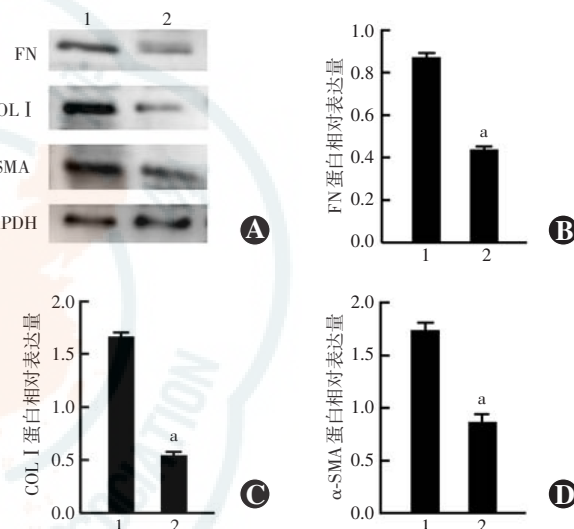


图4 FoxF2 shRNA 对 HTMCs 细胞外基质蛋白的影响 A:感染 Scramble/FoxF2 shRNA 后 HTMCs 胞外基质蛋白表达变化 B:各组 FN 蛋白相对表达量比较 与 Scramble 对照组比较, $^*P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) C:各组 COL I 蛋白相对表达量比较 与 Scramble 对照组比较, $^*P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) D:各组 α -SMA 蛋白相对表达量比较 与 Scramble 对照组比较, $^*P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) 1:Scramble 对照组 2:FoxF2 shRNA 组 FN:纤连蛋白;COL:胶原蛋白;SMA:平滑肌肌动蛋白

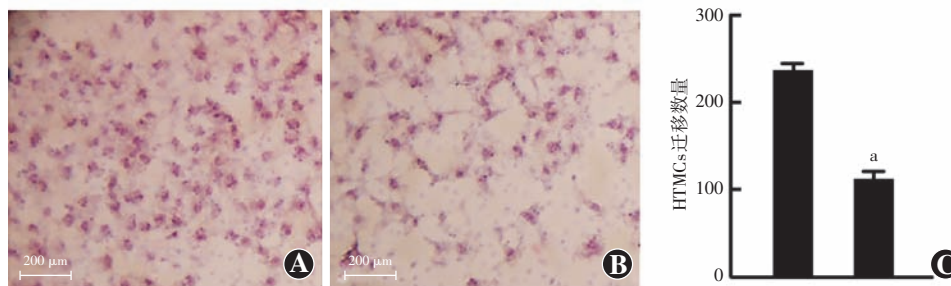


图5 Scramble 或 FoxF2 shRNA 慢病毒感染后 HTMCs 迁移情况 A:感染 Scramble 后 HTMCs 发生迁移细胞数(HE $\times 100$, 标尺=200 μm) B:感染 FoxF2 shRNA 后 HTMCs 发生迁移的细胞数量明显少于感染 Scramble 后 HTMCs 发生迁移的细胞数(HE $\times 100$, 标尺=200 μm) C:各组 HTMCs 迁移细胞数的量化比较 与 Scramble 对照组比较, $^*P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) 1:Scramble 对照组 2:FoxF2 shRNA 组 HTMCs:人眼小梁网细胞

3 讨论

POAG 的发病与眼压升高密切相关,而正常眼压有赖于房水生成量和排出量的动态平衡^[9]。房水排出阻力主要位于邻管小梁网与巩膜静脉窦交接处,房水经此处流入巩膜内静脉(房水静脉),最后流入睫状前静脉。任何一种小梁网细胞功能的受损或异常所导致的小梁网结构改变都有可能引起房水流出阻力的增加^[10]。

小梁网系多层束状或板片状的扁平、交叉网孔样结构,每一小梁网束均由胶原纤维为核心及其外被的内皮细胞组成^[11]。ECM 是存在于细胞之间的动态网状结构,由一系列复合大分子以共价键或非共价键的形式相互联结形成稳定的复合物,主要包括胶原、糖蛋白、蛋白聚糖和葡萄糖氨基糖苷,作为细胞的网架结构,参与细胞的迁移、增生、分化等生理过程,并与肿瘤浸润、转移、炎症、血管生成等病理过程相关^[12-13]。胶原的特征是形成不溶性纤维,具有高度的抗张性,如果胶原蛋白的表达水平发生异常,必将影响 ECM 结构和小梁网的筛状结构,从而影响房水的排出^[14]。因此,ECM 近年来也逐渐受到眼科领域,尤其是青光眼疾病领域研究者的重视。已有研究发现,ECM 改变可以破坏视神经节细胞之间及细胞与 ECM 之间的相互作用,从而导致细胞的凋亡^[15]。青光眼中小梁网、视盘 ECM 的改变可引起视神经轴浆运输障碍,导致神经营养因子剥夺和视神经节细胞的凋亡^[16]。

Fox 家族成员 FoxF2 作为间质转录因子表达于间质细胞,包括前列腺、肺脏、胎盘间质等。有研究发现 FoxF2 在涉及上皮间充质相互作用的中胚层组织中表达^[17-18],并且在细胞纤维化过程中起到重要作用,为转化生长因子- β 通路中信号传导所必须,参与腭骨间质中继发性腭裂的形成^[19]。FoxF2 的表达水平与多种癌症的转移和预后有关,在肿瘤领域的研究较多,如 Samrat 等^[20] 研究发现并确定了 miR-200 家族和 miR-183 ~ 96 ~ 182 群体通过靶向 FoxF2 抑制肺癌侵袭和转移的新机制,其研究表明 FoxF2 表达与转录因子 Zeb1 密切相关,并在间充质样转移性肺癌细胞中升高, FoxF2 转录可抑制 E-钙粘蛋白和 miR-200 的表达,从而诱导肺癌细胞发生迁移、侵袭和转移。Shao 等^[21] 在肝细胞癌组织中观察到 miR-519a 和 FoxF2 的表达水平呈负相关, FoxF2 也因此被鉴定为肝细胞癌中 miR-519a 的下游靶标,结果显示 Huh7 细胞中 miR-519a 上调可降低 FoxF2 的表达水平,促进细胞增生并减少凋亡;同时在 SMMC-7721 细胞中 miR-519a 下调

升高了 FoxF2 的表达水平,抑制了细胞增生并诱导凋亡,提示 miR-519a 可能是肝细胞癌患者的新型预后预测因子。FoxF2 在眼科领域的研究鲜有报道,因此本课题组探讨 FoxF2 是否参与了调控小梁网胞外基质中相关蛋白的表达。

本研究中 Western blot 检测结果显示, FoxF2 shRNA 敲低效果显著。在 FoxF2 shRNA 敲低效果下,细胞外基质蛋白 FN、COL I 和 α -SMA 表达量均低于对照组,说明 FoxF2 表达水平降低的同时 HTMCs 的 ECM 表达水平也降低, FoxF2 低表达可降低小梁网胞外基质中相关蛋白质的表达,与 van der Heul-Nieuwenhuijsen 等^[7] 研究证明的沉默 FoxF2 后前列腺间质 ECM 的表达下降,以及 Ormestad 等^[8] 研究证明的敲除 FoxF2 基因的小鼠可能导致肠组织 COL I、COLIV 减少的结果相符。由此推断, FoxF2 可能参与了小梁网 ECM 的相关病理变化,进而改变小梁网筛网状结构,从而影响了房水循环系统的稳定,为 POAG 的发病提供了基础, FoxF2 或许可以成为研究 POAG 发病机制的新方向。

综上所述,成功制备可特异性敲低 HTMCs 内源性 FoxF2 表达的 FoxF2 shRNA 病毒,并证实 FoxF2 干扰对 HTMCs 中促纤维 ECM 的表达及细胞迁移具有抑制作用。FoxF2 有望成为研究 POAG 发病机制的新方向,以及临床中预防和治疗 POAG 的潜在生物学靶点。

参考文献

- [1] Zhang M, Maddala R, Rao PV. Novel molecular insights into RhoA GTPase-induced resistance to aqueous humor outflow through the trabecular meshwork [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 295 (5) : C1057-1070. DOI:10.1152/ajpcell.00481.2007.
- [2] Zhao J, Wang S, Zhong W, et al. Oxidative stress in the trabecular meshwork (Review) [J]. Int J Mol Med, 2016, 38 (4) : 995-1002. DOI:10.3892/ijmm.2016.2714.
- [3] 党晓洁,任梅,朱江,等.氧化应激条件下 miR-21 对人眼小梁网细胞外基质蛋白表达的影响 [J]. 眼科新进展, 2017, 37 (1) : 30-34. DOI:10.13389/j.cnki.rao.2017.0008.
Dang XJ, Ren M, Zhu J, et al. Effects of miR-21 on protein expression of extracellular matrix in human trabecular meshwork cells under oxidative stress [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2017, 37 (1) : 30-34. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2017.0008.
- [4] Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review) [J]. Int J Oncol, 2004, 25 (5) : 1495-1500.
- [5] Wang QS, Kong PZ, Li XQ, et al. FOXF2 deficiency promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of basal-like breast cancer [J/OL]. Breast Cancer Res, 2015, 17 : 30 [2018-01-23]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4361145/. DOI: 10.1186/s13058-015-0531-1.
- [6] Cai J, Tian AX, Wang QS, et al. FOXF2 suppresses the FOXC2-mediated epithelial-mesenchymal transition and multidrug resistance of basal-like breast cancer [J]. Cancer Lett, 2015, 367 (2) : 129-137. DOI:10.1016/j.canlet.2015.07.001.
- [7] van der Heul-Nieuwenhuijsen L, Dits N, van Ijcken W, et al. The

- FOXf2 pathway in the human prostate stroma [J]. Prostate, 2009, 69 (14) : 1538-1547. DOI:10. 1002/pros. 20996.
- [8] Ormestad M, Astorga J, Landgren H, et al. Foxf1 and Foxf2 control murine gut development by limiting mesenchymal Wnt signaling and promoting extracellular matrix production [J]. Development, 2006, 133 (5) : 833-843. DOI:10. 1242/dev. 02252.
- [9] Peeters A, Webers CA, Prins MH, et al. Quantifying the effect of intraocular pressure reduction on the occurrence of glaucoma [J]. Acta Ophthalmol, 2010, 88 (1) : 5-11. DOI:10. 1111/j. 1755-3768. 2008. 01452. x.
- [10] 孙瑞竹, 张绍丹, 梁远波. 氧化应激对小梁网的损伤 [J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34 (4) : 375-379. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 04. 019.
- Sun RZ, Zhang SD, Liang YB. Oxidative injury on trabecular meshwork [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34 (4) : 375-379. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 04. 019.
- [11] 杨玉霞, 刘杏, 黄晶晶, 等. 原发性开角型青光眼小梁网组织早衰的初步研究 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2014, 35 (5) : 796-800.
- Yang YX, Liu X, Huang JJ, et al. Primary experimental study of senescence in trabecular meshwork of primary open angle glaucoma [J]. J Sun Yat-sen Univ (Med Sci), 2014, 35 (5) : 796-800.
- [12] O'Callaghan J, Cassidy PS, Humphries P. Open-angle glaucoma: therapeutically targeting the extracellular matrix of the conventional outflow pathway [J]. Expert Opin Ther Targets, 2017, 21 (11) : 1037-1050. DOI:10. 1080/14728222. 2017. 1386174.
- [13] Alves RD, Eijken M, Bezstarosti K, et al. Activin A suppresses osteoblast mineralization capacity by altering extracellular matrix (ECM) composition and impairing matrix vesicle (MV) production [J]. Mol Cell Proteomics, 2013, 12 (10) : 2890-2900. DOI:10. 1074/mcp. M112. 024927.
- [14] Wallace DM, Murphy-Ullrich JE, Downs JC, et al. The role of matricellular proteins in glaucoma [J]. Matrix Biol, 2014, 37 : 174-182. DOI:10. 1016/j. matbio. 2014. 03. 007.
- [15] Santos AR, Corredor RG, Obeso BA, et al. $\beta 1$ Integrin-focal adhesion kinase (FAK) signaling modulates retinal ganglion cell (RGC) survival [J/OL]. PLoS One, 2012, 7 (10) : e48332 [2017-10-21]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0048332>. DOI:10. 1371/journal.pone.0048332.
- [16] Panagis L, Zhao X, Ge Y, et al. Gene expression changes in areas of focal loss of retinal ganglion cells in the retina of DBA/2J mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51 (4) : 2024-2034. DOI:10. 1167/iov. 09-3560.
- [17] Ormestad M, Astorga J, Landgren H, et al. Foxf1 and Foxf2 control murine gut development by limiting mesenchymal Wnt signaling and promoting extracellular matrix production [J]. Development, 2006, 133 (5) : 833-843. DOI:10. 1242/dev. 02252.
- [18] Aitola M, Carlsson P, Mahlapuu M, et al. Forkhead transcription factor Foxf2 is expressed in mesodermal tissues involved in epithelio-mesenchymal interactions [J]. Dev Dyn, 2000, 218 (1) : 136-149.
- [19] Nik AM, Johansson JA, Ghiami M, et al. Foxf2 is required for secondary palate development and Tgf β signaling in palatal shelf mesenchyme [J]. Dev Biol, 2016, 415 (1) : 14-23. DOI:10. 1016/j. ydbio. 2016. 05. 013.
- [20] Kundu ST, Byers LA, Peng DH, et al. The miR-200 family and the miR-183 ~ 96 ~ 182 cluster target Foxf2 to inhibit invasion and metastasis in lung cancers [J]. Oncogene, 2016, 35 (2) : 173-186. DOI:10. 1038/one. 2015. 71.
- [21] Shao J, Cao J, Liu Y, et al. MicroRNA-519a promotes proliferation and inhibits apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by targeting FOXF2 [J]. FEBS Open Bio, 2015, 5 : 893-899. DOI:10. 1016/j. fob. 2015. 10. 009.

(收稿日期:2018-09-16 修回日期:2019-04-02)

(本文编辑:刘艳)

读者·作者·编者

本刊对医学研究中知情同意和医学伦理学描述的要求

根据国际医学期刊编辑委员会提供的“生物医学期刊投稿统一要求”的表述,本刊对作者撰写稿件时关于“知情同意”和“医学伦理学”的描述提出如下要求:

(1) 知情同意 在未事先获得知情同意的情况下,患者有隐私不被侵犯的权力。患者的身份信息,包括姓名、来源、住院号等均不应该以文字、图片或家系信息的方式在出版物上公开,除非这些信息对于本研究是必需的,如需在出版物上显示,应征得患者(或者父母、监护人)签署的书面同意书。

发表的文章中应该省略不必要的患者个人信息,但难以做到完全匿名时(如在照片中掩盖患者的眼部,不足以保护患者的隐私权),应提供知情同意的信息。如果用改变患者的身份特征(如遗传家系等)以保护患者隐私权的方法,作者应该确保这些改变不影响研究的科学性,并且编辑应在文中对此予以说明。

(2) 医学伦理学 以人体为实验对象的研究,作者应该提及试验步骤是否符合相应的负责机构、国家委员会或 1975 年赫尔辛基宣言(2005 年修订)的医学伦理学标准。如果研究过程对是否符合赫尔辛基宣言有疑问或存在一定的问题,作者应当做出客观说明并解释研究的合理性,提交已通过审查机构的批准情况。以动物为实验对象的研究,作者应当说明是否遵循当地的相关机构、学会(国内或国外)及国家实验动物保护和利用指南。

本刊对来稿中组织病理学彩色图片及电子显微镜图片中标尺的要求

如果作者稿件中包含有组织病理图、免疫荧光染色图、免疫组织化学图、电子显微镜图片,为了反映组织标本大小的最精确尺度,请在电子版图片的左下方附注标尺。

(本刊编辑部)