

· 实验研究 ·

ADP-核糖基化因子拮抗剂对人视网膜血管内皮细胞形成血管管腔的抑制作用及其机制

吴敬 刘高勤 陈志刚 肖艳辉 徐静 陆培荣

215006 苏州大学附属第一医院眼科(吴敬,现在青海省人民医院眼科)

通信作者:陆培荣,Email:lupeirong@suda.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.01.006

【摘要】 背景 研究证实 ADP-核糖基化因子(ARF)能促进角膜组织中促血管相关因子的分泌,如血管内皮生长因子(VEGF)和一氧化氮合酶(NOS)等,从而导致病理状态下角膜新生血管的发生,但 ARF 对人视网膜膜血管内皮细胞(HRECs)管腔形成能力的影响和机制尚不清楚,了解 ARF 对 HRECs 形成管腔能力的影响对研究视网膜新生血管相关疾病的靶向治疗具有重要意义。**目的** 探讨 ARF 拮抗剂对 HRECs 管腔形成能力的影响以及其作用机制。**方法** 对 HRECs 进行常规培养和传代,取对数生长期细胞分为对照组和 ARF 拮抗剂组,对照组细胞在实验过程中按常规培养法培养,培养基中不添加 ARF 拮抗剂,而 ARF 拮抗剂组细胞在后续实验时于培养液中添加 15 $\mu\text{mol/L}$ 的 ARF 拮抗剂 1 ml。采用逆转录 PCR 法和 Western blot 法检测 ARF mRNA 及蛋白在 HRECs 中的表达。应用半固态 Matrigel 胶体外三维成型法检测对照组和 ARF 拮抗剂组 HRECs 形成管腔形态和数目。采用 RT-PCR 和 Western blot 法检测 VEGF、NOS、局部黏着斑激酶(FAK)、热休克蛋白 90(HSP90)mRNA 及蛋白在各组 HRECs 中的相对表达量。**结果** 逆转录 PCR 和 Western blot 法检测显示,对照组和 ARF 拮抗剂组 HRECs 中 ARF mRNA 的相对表达量分别为 0.65 ± 0.14 和 0.32 ± 0.10 ,对照组和 ARF 拮抗剂组 HRECs 中 ARF 蛋白的相对表达量分别为 0.85 ± 0.15 和 0.24 ± 0.17 ,ARF 拮抗剂组 ARF mRNA 及其蛋白的相对表达量均明显低于对照组,差异均有统计学意义($t = 7.32, P = 0.00; t = 5.15, P = 0.00$)。对照组和 ARF 拮抗剂组 HRECs 形成管腔的数量分别为 (51.46 ± 7.12) 和 (34.66 ± 8.57) 个/视野,差异有统计学意义($t = 2.99, P = 0.04$)。RT-PCR 和 Western blot 法检测显示,ARF 拮抗剂组 HRECs 中 VEGF mRNA 和 NOS mRNA 及蛋白的相对表达量均明显低于对照组,差异均有统计学意义($t = 3.02, P = 0.04; t = 3.68, P = 0.02; t = 3.33, P = 0.03; t = 2.89, P = 0.04$)。ARF 拮抗剂组 HRECs 中 FAK mRNA 和 HSP90 mRNA 的相对表达量分别为 0.65 ± 0.18 和 0.28 ± 0.05 ,均明显低于对照组中 0.76 ± 0.25 和 0.46 ± 0.09 ,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** ARF 拮抗剂对 HRECs 的管腔形成能力有抑制作用,其作用机制可能与下调 VEGF、NOS 和下游重要信号转导因子 FAK、HSP90 在 HRECs 中的表达有关。

【关键词】 ADP-核糖基化因子/拮抗剂 & 抑制剂; 内皮细胞/药物作用; 视网膜; 基因表达/药物作用; 血管内皮生长因子; 人

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972712、81200727); 苏州市科技计划项目(SYS201448); 江苏省医学重点人才项目(RC2011104)

Inhibition of ADP-ribosylation factor antagonist on human retinal vascular endothelial cell tube formation *in vitro* Wu Jing, Liu Gaoqin, Chen Zhigang, Xiao Yanhui, Xu Jing, Lu Peirong

Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China (Wu J, now Department of Ophthalmology, Qinghai Province People's Hospital)

Corresponding author: Lu Peirong, Email: lupeirong@suda.edu.cn

[Abstract] Background Researches showed that ADP-ribosylation factor (ARF) promotes intracorneal secretion of multiple angiogenesis-related factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide synthase (NOS) etc., and therefore results in corneal neovascularization. However, whether ARF affects the tube formation of human retinal endothelial cells (HRECs) is unelucidated. Understanding the effect of ARF tube formation of HRECs is important for the target treatment of retinal vascular diseases. **Objective** The aim of this study was to explore the effect and mechanism of ARF inhibitor on tube formation of HRECs *in vitro*. **Methods** HRECs (HREC line) were cultured and passaged. The growth-well cells were harvested and divided into two groups. The cells were regularly cultured in the control group, and ARF antagonist (1ml) was added in the culture medium in the ARF antagonist group. The expression levels of ARF mRNA and protein in the cells were examined by reverse transcription (RT)-PCR and Western blot. The morphology and number of HREC tube formation were detected by using three-dimensional Matrigel assay. The relative expression levels of VEGF, NOS, focal adhesion kinase (FAK) and heat

shock protein 90 (HSP90) at gene level and protein level were examined by RT-PCR and Western blot *in vitro*.

Results The relative expression levels of ARF mRNA in the cells were 0.65 ± 0.14 and 0.32 ± 0.10 , and those of ARF protein were 0.85 ± 0.15 and 0.24 ± 0.17 in the control group and ARF antagonist group, showing significant differences between the two groups ($t = 7.32, P = 0.00; t = 5.15, P = 0.00$). The number of HREC tube formation was $(34.66 \pm 8.57)/\text{field}$ in the ARF antagonist group, which was significantly lower than $(51.46 \pm 7.12)/\text{field}$ in the control group ($t = 2.99, P = 0.04$). The relative expression levels of VEGF mRNA, NOS mRNA and their proteins in the cells were significantly lower than those of the control group ($t = 3.02, P = 0.04; t = 3.68, P = 0.02; t = 3.33, P = 0.03; t = 2.89, P = 0.04$). The relative expression levels of FAK mRNA and HSP90 mRNA in the ARF antagonist group were 0.65 ± 0.18 and 0.28 ± 0.05 , which were significantly lower than 0.76 ± 0.25 and 0.46 ± 0.09 in the control group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** ARF antagonist appears to have an inhibitory effect on the tube formation ability of HRECs probably by down-regulating the expressions of VEGF, NOS and the downstream signal transduction factors FAK and HSP90 in HRECs *in vitro*.

[Key words] ADP-ribosylation factor 1/antagonists & inhibitory; Endothelial cells/drug effects; Retina; Gene expression/drug effects; Vascular endothelial growth factor; Humans

Fund program: National Natural Science Foundation of China (30972712, 81200727); Suzhou Municipal Natural Science Foundation (SYS201448); Jiangsu Province's Key Provincial Talents Program (RC2011104)

新生血管性眼病包括视网膜新生血管性眼病等疾病,危害较为严重。病理条件下,眼部新生血管的发生可引起相应组织的重构,破坏生理结构,降低屈光介质通透性,导致视觉功能障碍,是主要的致盲眼病^[1-2]。研究眼部新生血管发生及发展的具体机制及干预措施是临床有效诊治新生血管性眼病的前提^[3]。ADP-核糖基化因子(ADP-ribosylation factor, ARF)是囊泡运输过程中重要的调节因子,属于三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)结合蛋白,参与细胞内物质运输和信号转导过程^[4-5]。我们前期研究发现 ARF 点眼能明显抑制实验性碱烧伤小鼠角膜新生血管^[6],但其作用机制尚不清楚。本研究观察 ARF 拮抗剂对人视网膜血管内皮细胞系(human retinal capillary endothelial cells, HRECs)的管腔形成的影响及其机制,为新生血管性眼病的临床治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

HRECs(上海雅吉生物科技有限公司); ARF 拮抗剂(sc-3030)、兔抗人 ARF 抗体(sc-9063)、兔抗人血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体(A-20)和兔抗人一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抗体(sc-8309)(美国 Santa Cruz 公司); DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(fetal calf serum, FBS)、PBS(美国 Gibco 公司);微量 RNA 抽提试剂盒、逆转录试剂盒、Dnase 纯化剂(德国 Qiagen 公司);PCR 试剂盒、DNA 标志物(日本 TaKaRa 公司); ARF、VEGF、NOS、局部黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、热休克蛋白 90(heat shock protein, HSP90)、GAPDH 引物(南京金思瑞生物科技有限公司); Matrigel 胶(美国

BD 公司);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)FITC 标记的羊抗兔二 IgG 多克隆抗体(A27036)(德国 Pierce 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 从液氮中取出 HRECs 细胞系,置 37℃ 水浴中解冻复苏,离心半径为 14.75 cm, 800 r/min 离心 5 min,弃上清后加入 5 ml 含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养液,混匀。细胞置于 37℃、体积分数 5% 的 CO₂、饱和湿度的培养箱中常规培养,隔日换液。培养 3~4 d 细胞生长密度达到饱和后按 1:5 比例接种于新培养瓶中传代。取对数生长期状态良好的细胞分为对照组和 ARF 拮抗剂组,对照组细胞在实验过程中按常规培养法培养,培养基中不添加 ARF 拮抗剂,而 ARF 拮抗剂组细胞在后续实验时于培养液中添加 ARF 拮抗剂。

1.2.2 HRECs 形成管腔情况的观察 HRECs 接种于 96 孔板中进行培养,将细胞分成无 ARF 拮抗剂的对照组和添加 15 μmol/L ARF 拮抗剂的 ARF 拮抗剂组 1 ml/孔,每组设 3 个复孔。加入细胞前,每孔加入 60 μmol Matrigel 胶,37℃ 培养箱中孵育 1 h 后完全凝固,各孔加入 100 μl 对数生长期的 HRECs 悬液,细胞数为 $2 \times 10^4/\text{孔}$,按照分组情况再分别加入相应浓度的 ARF 拮抗剂。37℃ 培养箱孵育 12 h 后观察 HRECs 形成管腔的情况,倒置相差显微镜拍照并计数,以完整管腔形成的数量表示 HRECs 的管腔形成能力。

1.2.3 逆转录 PCR 法检测 HRECs 中 ARF、VEGF、NOS、FAK 和 HSP90 基因的相对表达 常规消化 HRECs, PBS 洗涤后收集细胞。利用微量 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA,利用 DNA 裂解试剂盒清除总 RNA 中残留的基因组 DNA,逆转录成 cDNA。以 cDNA 为

模板,PCR 法扩增目的基因 *ARF*、*VEGF*、*NOS*、*FAK*、*HSP90* 等。反应条件为:94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,37 个循环后 72 ℃ 再延伸 10 min。内参 *GAPDH* 扩增 25 个循环。扩增产物加入 2 μ l 混有 DNA 染色剂 Gel Red 的进样缓冲液,用质量浓度 10 g/L 琼脂糖凝胶上样电泳,以凝胶成像仪观察并拍照^[7]。Image J 软件分析条带灰度。目的基因与内参灰度的比值即为目的基因表达的相对值。引物序列及反应条件见表 1。

表 1 逆转录 PCR 引物序列与退火温度

基因	引物序列	退火温度(℃)	循环数
<i>ARF</i>	上游 5'-ATCGTGACCACCATTCAC-3'	58	37
	下游 5'-GAGCTGATTGGACAGCCAGT-3'		
<i>VEGF</i>	上游 5'-GGGGCAGAAATCATCACGAA-3'	58	37
	下游 5'-GCAACGGCAGTCTGTGTTT-3'		
<i>NOS</i>	上游 5'-TCCGAGTCAGAGTCACCAT-3'	58	37
	下游 5'-AGCTCATCCCTTCTCCAT-3'		
<i>FAK</i>	上游 5'-GCAGCTCCACCAAGAAACC-3'	59	37
	下游 5'-CTGAAGCTTGACACCTCGT-3'		
<i>HSP90</i>	上游 5'-TGAAACTGCGCTCCTGTCTT-3'	58	37
	下游 5'-CTCCTTCAAGGGGTGGCATT-3'		
<i>GAPDH</i>	上游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	58	25
	下游 5'-TCCACCACCTGTGCTGTA-3'		

注:ARF:ADP-核糖基化因子;VEGF:血管内皮生长因子;NOS:一氧化氮合酶;FAK:局部黏着斑激酶;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶

1.2.4 Western blot 法检测 HRECs 中 ARF、VEGF、NOS 蛋白的表达 细胞经蛋白裂解液裂解抽提,离心清除沉淀,加入等容积含 SDS 的 2 倍蛋白上样液沸水中煮沸约 10 min,行 SDS-PAGE 电泳和转膜,结束后进行免疫印迹检测。用含质量分数 5% 脱脂奶粉封闭液封闭硝酸纤维素膜,4 ℃ 孵育过夜。次日分别加入兔抗人 ARF 抗体(1:200)、兔抗人 VEGF 抗体(1:200)和兔抗人 NOS 抗体(1:500),室温孵育 1 h,用 TBST 洗去未结合的抗体,加入 HRP 羊抗兔 IgG 多抗(1:2 000),室温孵育 1 h,加入底物 ECLA 和 ECLB 混合液显色^[8]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计学软件(美国 SPSS 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,经 Levene 检验方差齐性。采用均衡分组两水平实验设计,对照组与 ARF 拮抗剂组间 HRECs 中 ARF、VEGF、NOS、FAK、HSP 90 mRNA 及其蛋白的相对表达量以及 HRECs 形成管腔的数量的差异比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养 HRECs 的形态

倒置相差显微镜观察 HRECs 形态及生长状态显示,HRECs 大小均匀、呈梭形,细胞质透亮,细胞核居中、清晰可见。细胞增生活跃,2~3 d 细胞生长密度达到 90% 以上(图 1)。

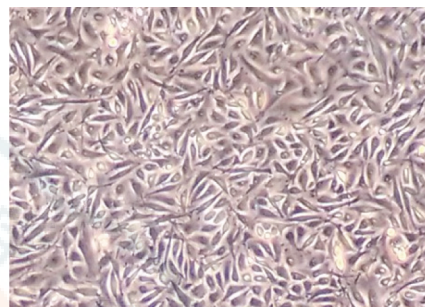


图 1 倒置相差显微镜观察培养的 HRECs($\times 200$)
HRECs 呈梭形,细胞质透亮,细胞核居中

2.2 HRECs 中 ARF mRNA 和蛋白的表达

逆转录 PCR 和 Western blot 法检测显示,HRECs 在基因水平和蛋白水平均表达 ARF 分子。对照组 ARF mRNA 的相对表达量为 0.65 ± 0.14 ,ARF 拮抗剂组为 0.32 ± 0.10 ;对照组 ARF 蛋白的相对表达量为 0.85 ± 0.15 ,ARF 拮抗剂组为 0.24 ± 0.17 ,ARF 拮抗剂组 ARF mRNA 及蛋白的相对表达量均明显低于对照组,差异均有统计学意义($t = 7.32, P = 0.00; t = 5.15, P = 0.00$)(图 2)。

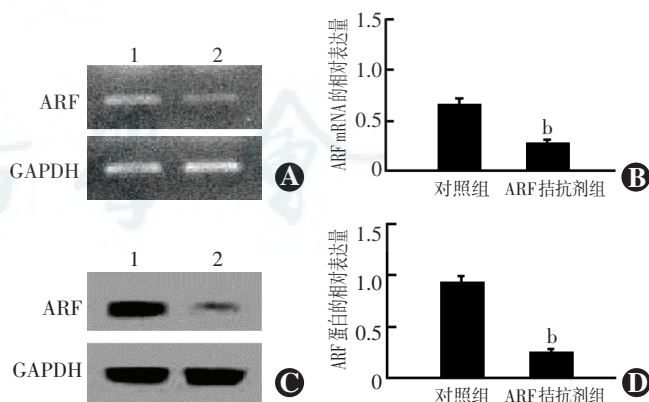


图 2 对照组和 ARF 拮抗剂组 HRECs 中 ARF mRNA 及蛋白的表达 A:对照组与 ARF 拮抗剂组 HRECs 中 ARF mRNA 表达的电泳图显示 ARF 拮抗剂组细胞中 ARF mRNA 表达条带较对照组减弱 1:对照组 2:ARF 拮抗剂组 B:ARF 拮抗剂组 HRECs 中 ARF mRNA 表达的量化比较 与对照组比较, $P < 0.01$ (独立样本 *t* 检验, $n = 6$) C:对照组和 ARF 拮抗剂组 HRECs 中 ARF 蛋白表达的电泳图显示 ARF 拮抗剂组细胞中 ARF 蛋白表达条带较对照组减弱 1:对照组 2:ARF 拮抗剂组 D:ARF 拮抗剂组 HRECs 中 ARF 蛋白表达的量化比较 与对照组比较, $P < 0.01$ (独立样本 *t* 检验)
ARF:ADP-核糖基化因子;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶

2.3 各组 HRECs 形成管腔的数量比较

Matrigel 体外管腔成型法显示,对照组每个视野内 HRECs 形成的管腔数量较多,排列密集,而 ARF 拮抗剂组每个视野内 HRECs 形成的管腔数量较少,管腔排列较稀疏。对照组和 ARF 拮抗剂组管腔数目分别为(51.46 ± 7.12)和(34.66 ± 8.57)个/视野,ARF 拮抗剂组 HRECs 形成管腔的数量较对照组明显减少,差异有统计学意义($t=2.99, P=0.04$)(图 3)。

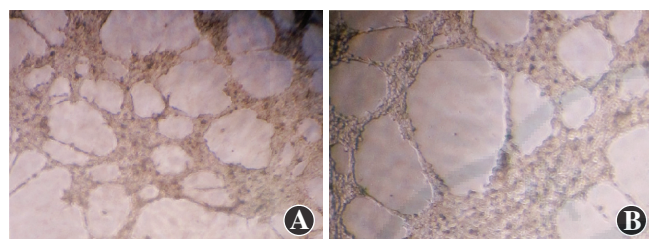


图 3 对照组与 ARF 拮抗剂组 HRECs 形成管腔情况的比较($\times 100$) A:对照组 HRECs 管腔形成数量较多 B:ARF 拮抗剂组 HRECs 管腔形成少于对照组 C:对照组与 ARF 拮抗剂组 HRECs 管腔形成数目的比较 与对照组比较, $^a P<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=5$) ARF:ADP-核糖基化因子

2.4 各组 HRECs 中 VEGF 和 NOS 的表达变化

对照组和 ARF 拮抗剂组 HRECs 中 VEGF mRNA 的相对表达量分别为 1.25 ± 0.22 和 0.88 ± 0.25 ,VEGF 蛋白相对表达量分别为 1.65 ± 0.28 和 0.89 ± 0.23 ,组间 VEGF mRNA 及蛋白的相对表达量差异均有统计学意义($t=3.02, P=0.04$; $t=3.68, P=0.02$)。对照组和 ARF 拮抗剂组 NOS mRNA 的相对表达量分别为 0.91 ± 0.20 和 0.72 ± 0.16 ,NOS 蛋白的相对表达量分别为 0.73 ± 0.15 和 0.41 ± 0.12 ,组间 NOS mRNA 和蛋白水平的表达差异均有统计学意义($t=3.33, P=0.03$; $t=2.89, P=0.04$)(图 4,5)。

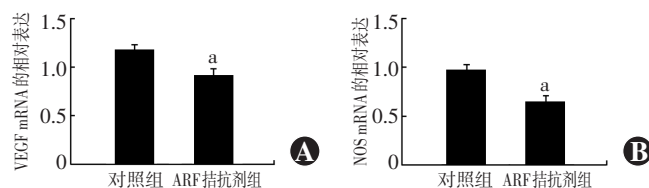


图 4 对照组和 ARF 拮抗剂组 HRECs 中 VEGF 和 NOS mRNA 相对表达的比较 A:ARF 拮抗剂组 HRECs 中 VEGF mRNA 表达的量化比较 B:ARF 拮抗剂组 HRECs 中 NOS mRNA 表达的量化比较 与对照组比较, $^a P<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=5$) VEGF:血管内皮生长因子;NOS:一氧化氮合酶

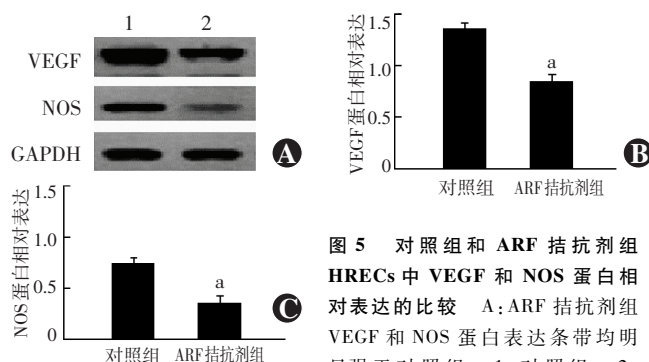


图 5 对照组和 ARF 拮抗剂组 HRECs 中 VEGF 和 NOS 蛋白相对表达的比较 A:ARF 拮抗剂组 VEGF 和 NOS 蛋白表达条带均明显强于对照组 1:对照组 2:ARF 拮抗剂组 B:ARF 拮抗剂组 HRECs 中 VEGF 和 NOS 蛋白相对表达量比较 C:ARF 拮抗剂组 HRECs 中 NOS 蛋白相对表达量比较 与对照组比较, $^a P<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=5$) VEGF:血管内皮生长因子;NOS:一氧化氮合酶;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶

2.5 各组 HRECs 中 FAK mRNA 及其蛋白的相对表达

对照组和 ARF 拮抗剂组 HRECs 中 FAK mRNA 的相对表达量分别为 0.76 ± 0.25 和 0.65 ± 0.18 ,组间比较差异有统计学意义($t=3.01, P=0.039$; $t=3.03, P=0.040$);对照组和 ARF 拮抗剂组 HRECs 中 HSP90 mRNA 的相对表达量分别为 0.46 ± 0.09 和 0.28 ± 0.05 ,ARF 拮抗剂组 FAK 和 HSP90 mRNA 水平的相对表达量明显低于对照组,与 VEGF 表达的下趋势一致(图 6)。

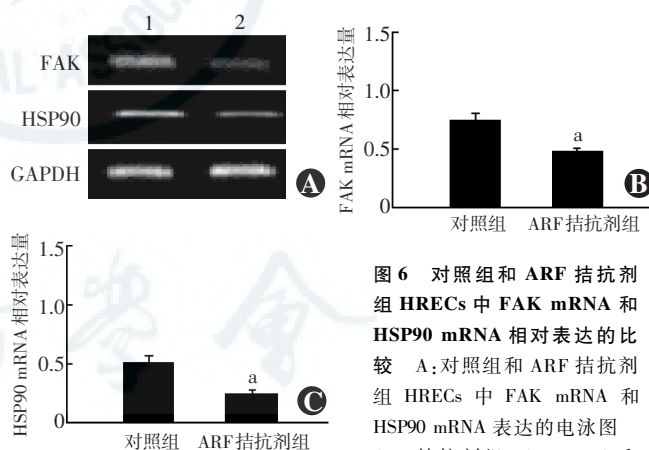


图 6 对照组和 ARF 拮抗剂组 HRECs 中 FAK mRNA 和 HSP90 mRNA 相对表达的比较 A:对照组和 ARF 拮抗剂组 HRECs 中 FAK mRNA 和 HSP90 mRNA 表达的电泳图 ARF 拮抗剂组 FAK mRNA 和 HSP90 mRNA 表达均明显弱于对照组 1:对照组 2:ARF 拮抗剂组 B:ARF 拮抗剂组与对照组 HRECs 中 FAK mRNA 表达的量化比较 与对照组比较, $^a P<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=5$) FAK:局部黏着斑激酶;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶;ARF:ADP-核糖基化因子;C:ARF 拮抗剂组与对照组 HRECs 中 HSP90mRNA 表达量的比较 与对照组比较, $^a P<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=5$) HSP:热休克蛋白;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶;ARF:ADP-核糖基化因子

3 讨论

我们既往研究中发现 ARF 拮抗剂能抑制碱烧伤诱导的实验性角膜新生血管的形成,因此本研究中进行

一步采用体外实验方式研究 ARF 对 HREC 形成管腔的影响和具体机制,以对 ARF 拮抗剂在新生血管性眼病发病过程中发挥作用的结论进行进一步的验证。

在本研究中,我们首先检测了 HREC 中 ARF 的表达,通过 RT-PCR 和 Western blot 法检测发现,ARF 在 HREC 中存在基因和蛋白水平的表达,提示 ARF 可能参与 HREC 的增生、迁移、管腔形成等生物学行为。ARF 是广泛存在于真核生物细胞膜上的小 G 蛋白 Ras 超家族成员,是一类与细胞膜有关的、相对分子质量约为 20 000 的 GTP 结合蛋白^[5],于 1984 年由 Kahn 等^[9]首先纯化并命名。在本研究中,我们选用专门针对 ARF 发挥拮抗作用的小分子拮抗剂作为干预因子,在半固态基质胶作为介质的管腔形成实验中,ARF 拮抗剂组加入相应浓度的 ARF 拮抗剂,培育 12 h 后发现 ARF 拮抗剂组管腔形成受到明显的抑制,HREC 形成的管腔形态不完整,细胞排列紊乱,管腔数目也显著低于对照组,提示 ARF 能抑制 HREC 的体外管腔形成能力。ARF 本身是发挥促血管发生的因子,而 ARF 拮抗剂能与 HREC 细胞膜上表达的 ARF 结合,抑制 ARF 的信号传导途径,进而抑制 ARF 促血管生成作用^[6],最终 HREC 管腔数目降低。该结果也与我们前期研究的结果一致。

与血管发生相关的重要因子包括 VEGF、NOS 等促血管因子。VEGF 是目前研究发现促血管作用最强的细胞因子,NOS 则表达于血管内皮细胞,催化左旋精氨酸(L-ARG)转化,产生 NO,而 NO 是机体内重要的促血管因子^[10-12]。因此检测血管内皮细胞中 VEGF 和 NOS 表达的变化,是评估 ARF 对 HREC 管腔形成能力影响机制的直接证据。通过检测,我们发现 ARF 能够从基因和蛋白水平下调 HREC 中 VEGF、NOS 的表达,提示 ARF 是通过抑制 HREC 中 VEGF 和 NOS 等分子的分泌来影响 HREC 管腔形成能力的。这些发现证实,在细胞因子调控网络中,ARF 是与 VEGF 和 NOS 等分子相关联的重要因子,我们有望将 ARF 作为干预靶点,抑制新生血管的发生在临床上具有潜在的研究价值。

本研究中进一步检测 VEGF 下游重要信号转导因子 FAK 和 HSP90 的基因水平的表达变化,检测结果与 VEGF 下调的变化一致。在 ARF 拮抗剂组,FAK 和 HSP90 表达明显降低,提示 ARF 干预通路中终末效应分子包含 FAK 和 HSP90。VEGF 诱导的 FAK 信号途

径与细胞的迁移增生相关,而 HSP90 则与 NO 的分泌相关,HSP90 是 VEGF 信号通路中重要的促 NO 生成的转导因子。因此 ARF 可经过逐级信号传导对 FAK 和 HSP90 的表达发挥抑制作用,从而抑制 HREC 的增生和迁移及 NO 产生,最终影响 HREC 的管腔形成。

参考文献

- [1] 薛文文,邹海东. 内皮抑素在抗新生血管性眼病治疗中的研究进展[J]. 国际眼科杂志,2011,11(12):2138-2140. DOI:10.3969/j.issn.1675-5123.2011.12.025.
- Xue WW,Zou HD. Recent advances of endostatin in the treatment of ocular neovascularization[J]. Int J Ophthalmol,2011,11(12):2138-2140. DOI:10.3969/j.issn.1675-5123.2011.12.025.
- [2] Hayreh SS,Zimmerman MB. Ocular neovascularization associated with central and hemicentral retinal vein occlusion[J]. Retina,2012,32(8):1553-1565. DOI:10.1097/IAE.0b013e318246912c.
- [3] Hisatomi T,Nakao S,Murakami Y, et al. The regulatory roles of apoptosis-inducing factor in the formation and regression processes of ocular neovascularization[J]. Am J Pathol,2012,181(1):53-61. DOI:10.1016/j.ajpath.2012.03.022.
- [4] D'Souza-Schorey C,Chavrier P. ARF proteins:roles in membrane traffic and beyond[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2006,7(5):347-358. DOI:10.1038/nrm1910.
- [5] Saegusa M,Hashimura M,Suzuki E, et al. Transcriptional up-regulation of Sox9 by NF- κ B in endometrial carcinoma cells, modulating cell proliferation through alteration in the p14 (ARF)/p53/p21 (WAF1) pathway[J]. Am J Pathol,2012,181(2):684-692.
- [6] Dai C,Liu G,Li L, et al. ADP-ribosylation factor as a novel target for corneal neovascularization regression[J]. Mol Vis,2012,18(4):2947-2953.
- [7] Liu G,Lu P,Li L, et al. Critical role of SDF-1 α -induced progenitor cell recruitment and macrophage VEGF production in the experimental corneal neovascularization[J]. Mol Vis,2011,17(6):2129-2138.
- [8] 刘高勤,陈源,陈磊,等. 一氧化氮合成酶及其抑制剂在碱烧伤诱导的角膜新生血管中的作用[J]. 中华实验眼科杂志,2013,31(10):908-913. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.10.002.
- Liu GQ,Chen Y,Chen L. The effects of nitric oxide synthase and its antagonist on alkali burn-induced corneal neovascularization[J]. Chin J Exp Ophthalmology,2013,31(10):908-913. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.10.002.
- [9] Kahn RA,Gilman AG. Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin[J]. J Biol Chem,1984,259(10):6228-6234.
- [10] Ambati BK,Nozaki M,Singh N, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1[J]. Nature,2006,443(7114):993-997.
- [11] Gallo O,Masini E,Morbidelli L, et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer[J]. J Natl Cancer Inst,1998,90(9):587-596.
- [12] Ando A,Yang A,Nambu H, et al. Blockade of nitric-oxide synthase reduces choroidal neovascularization[J]. Mol Pharmacol,2002,62(3):539-544.

(收稿日期:2015-11-19)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)