

## · 实验研究 ·

## 多聚嘧啶序列结合蛋白相关剪接因子对视网膜血管内皮细胞 IGF-1/VEGF 信号通路的抑制作用

田芳 东莉洁 吉洁 周玉 李文博 白伶伶 王飞 漆晨 苏畅 张晓敏 李筱荣  
300384 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  
通信作者:东莉洁,Email:aitaomubang@126.com  
DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.01.003

**【摘要】** 背景 视网膜新生血管(RNV)是多种眼底血管疾病的共同表现,研究证实胰岛素样生长因子(IGF-1)能够刺激血管内皮细胞的增生,从而促进新生血管的形成,而多聚嘧啶序列结合蛋白相关剪接因子(PSF)在 IGF-1 信号转导的过程中发挥转录抑制的作用。但 PSF 在 RNV 形成过程中的作用尚不清楚。目的 研究 PSF 对 IGF-1/血管内皮生长因子(VEGF)信号通路的调控作用。方法 将猕猴视网膜血管内皮细胞 RF/6A 进行培养后分为 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组、pGenesil-PSF-RNAi 质粒转染组及各自的对照组,分别在细胞中转入真核质粒 Pegfp-C2-PSF、pGenesil-PSF-RNAi 及相应的空白质粒。各组细胞培养液中分别添加或不添加胰岛素样生长因子 1(IGF-1)以刺激细胞生长,采用 MTT 法检测各组 RF/6A 细胞的增生率并筛选各组最适 PSF 剂量,用于进一步的实验。采用逆转录 PCR 法测定和比较不同 PSF 转染组间用或不用 U0126 处理组间 RF/6A 细胞中 VEGF mRNA 的表达;采用 Western blot 法验证 PSF 对 IGF-1 诱导的细胞外调节蛋白激酶(ERK)活化的促进作用。结果 IGF-1 刺激后 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组以 0.50  $\mu\text{g}$  PSF 为最适剂量,其 RF/6A 细胞的增生率为  $0.220 \pm 0.020$ ,细胞中 VEGF mRNA 相对表达量为  $0.79 \pm 0.07$ ,分别低于其对照组的  $0.260 \pm 0.006$  和未转染组的  $1.26 \pm 0.19$ ,差异均有统计学意义( $P=0.040, 0.016$ );IGF-1 刺激后 pGenesil-PSF-RNAi 质粒转染组以 1.00  $\mu\text{g}$  PSF 作为最适剂量,其 RF/6A 细胞增生率为  $0.35 \pm 0.02$ ,VEGF mRNA 相对表达量为  $2.29 \pm 0.43$ ,分别高于其对照组的  $0.210 \pm 0.019$  和未转染组的  $1.26 \pm 0.19$ ,差异均有统计学意义( $P=0.003, 0.019$ )。IGF-1 刺激后 1、3、6 h Pegfp-C2-PSF 质粒转染组细胞中 pERK 蛋白表达量均明显低于未转染组,差异均有统计学意义( $P=0.017, 0.000, 0.000$ )。Pegfp-C2-PSF 质粒转染组 U0126 处理后细胞中 VEGF mRNA 的相对表达量为  $0.93 \pm 0.21$ ,明显低于未转染组的  $1.32 \pm 0.08$ ,差异均有统计学意义( $P=0.037$ ),同时明显低于 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组无 U0126 处理的细胞中 VEGF mRNA 的相对表达量  $1.23 \pm 0.09$ ,差异有统计学意义( $P=0.002$ )。结论 PSF 可抑制 IGF-1 诱导的 RF/6A 细胞中的 ERK 信号通路的活化,下调 VEGF 在 RF/6A 细胞中的表达,进而抑制 RF/6A 细胞的增生。

**【关键词】** 多聚嘧啶序列结合蛋白; RNA 剪切; 胰岛素样生长因子; 细胞系; 内皮细胞/药物作用; 视网膜血管/细胞学; 血管内皮生长因子; 细胞外调节蛋白激酶

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目(81570872); 国家自然科学基金青年项目(311009911); 天津市应用基础与前沿技术研究计划一般项目(15JCYBJC24900); 天津市应用基础与前沿技术研究计划重点项目(14JJCZDJC36200); 无锡市卫生局课题(MS201403); 天津医科大学青年基金项目(2013KYQ09)

**Inhibition of PTB-associated splicing factor on IGF-1/VEGF signaling pathway in retinal vascular endothelial cells** Tian Fang, Dong Lijie, Ji jie, Zhou Yu, Li Wenbo, Bai Lingling, Wang Fei, Qi Chen, Su Chang, Zhang Xiaomin, Li Xiaorong

Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin Medical University Eye Institute, School of Optometry and Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300384, China

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

**【Abstract】** **Background** Retinal neovascularization (RNV) is common findings of many fundus diseases. Research showed that insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induces the proliferation of vascular endothelial cells and therefore promotes the formation of new blood vessel. Polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor (PSF) is determined to play the inhibitory effect on the gene transcription in IGF-1 signal pathway, but its effect on RNV is still unelucidated. **Objective** This study was to observe the regulation of PSF on IGF-1/vascular endothelial growth factor(VEGF) signaling pathway *in vitro*. **Methods** RF/6A cells were cultured and divided into four groups. Pegfp-C2-PSF plasmid, Pegfp-C2 plasmid, pGenesil-PSF-RNAi plasmid and pGenesil-RNAi plasmid were transfected into the cells with the PSF dose of 0.00, 0.25, 0.50 and 1.00  $\mu\text{g}$  respectively. The cells were cultured with or without IGF-1. The proliferation rates of the cells were detected by using MTT assay to determine the

optimal PSF dose. Reverse-transcription PCR (RT-PCR) was employed to assay and compare the relative expression levels of VEGF mRNA in the cells among different PSF plasmid transfected groups or between the treated groups with and without U0126, and the levels of phosphorylated extracellular signal-regulation kinase (pERK) in the cells were detected by Western blot assay. **Results** After IGF-1 stimulation, 0.50  $\mu\text{g}$  and 1.00  $\mu\text{g}$  PSF appeared to be the optimal dose in the Pegfp-C2-PSF plasmid group and the pGenesil-PSF-RNAi plasmid group, respectively. The cell proliferation rates and VEGF mRNA levels in the cells were (0.22 $\pm$ 0.02) and (0.79 $\pm$ 0.07), respectively, in the Pegfp-C2-PSF plasmid group, which were significantly lower than 0.260 $\pm$ 0.006 in the Pegfp-C2 plasmid group and 1.26 $\pm$ 0.19 in the untransfected group ( $P=0.040, 0.016$ ). The mean cell proliferative rate was 0.32 $\pm$ 0.03, and the mean expression level of VEGF mRNA was 2.29 $\pm$ 0.43 in the pGenesil-PSF-RNAi plasmid group, showing significant increases in comparison with 0.210 $\pm$ 0.019 of the pGenesil-RNAi plasmid group and 1.26 $\pm$ 0.19 of the untransfected group ( $P=0.003, 0.019$ ). The expression levels of pERK protein in the cells were evidently reduced in the Pegfp-C2-PSF plasmid group compared with the untransfected group 1 hour, 3, 6 hours after addition of IGF-1 ( $P=0.017, 0.000, 0.000$ ). After treated by U0126, the relative expression level of VEGF mRNA in the Pegfp-C2-PSF plasmid group was 0.93 $\pm$ 0.21, which was significantly lower than 1.32 $\pm$ 0.08 in the untransfected group ( $P=0.037$ ) and 1.23 $\pm$ 0.09 in the non-U0126 treated cells of the Pegfp-C2-PSF plasmid group ( $P=0.002$ ). **Conclusions** PSF inhibits the activation of ERK signal pathway in the IGF-1-stimulated RF/6A cells and down-regulates the expression level of VEGF in RF/6A cells and thus suppresses the growth and proliferation of RF/6A cells.

**[Key words]** Polypyrimidine tract-binding protein; RNA splicing; Insulin-like growth factor; Cell line; Endothelial cells/drug effect; Retinal vessels/cytology; Vascular endothelial growth factor; Extracellular signal-regulation kinase

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81570872, 311009911); Tianjin Municipal Science and Technology Commission (15JCYBJC24900, 14JCZDJC36200); Health Bureau Foundation of Wuxi City (MS201403); Foundation of Tianjin Medical University (2013KYQ09)

视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 是严重的致盲原因之一, 常见于糖尿病视网膜病变、视网膜血管阻塞性疾病、视网膜静脉周围炎、早产儿视网膜病变等。RNV 的发生机制和抑制 RNV 形成的调控因子一直是该领域的研究焦点。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是促进新生血管形成的主要生长因子, 通过与视网膜血管内皮细胞上大量 VEGF 高亲和受体结合而促进视网膜血管内皮细胞的增生及移行, 同时也可诱导新生血管形成<sup>[1]</sup>。胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 通过对 VEGF 表达的调控来参与血管内皮的增生, 在 RNV 中发挥主导作用<sup>[2]</sup>, 目前已证实糖尿病患者血清中 IGF-1 及其血管相关因子的高表达是糖尿病性 RNV 进入增生期的重要标志<sup>[3]</sup>。因此 RNV 发病机制研究已逐渐聚焦于 IGF-1/VEGF 通路的生物学活动。一项关于多囊卵巢综合征的研究发现, 多聚嘧啶序列结合蛋白相关剪接因子 (polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor, PSF) 可抑制 IGF-1 诱导的猪粒膜细胞中细胞色素 P-450 胆固醇侧链分解酶的表达, 在 IGF-1 信号转导过程中发挥转录抑制的作用。那么 PSF 蛋白是否有可能通过抑制视网膜血管内皮细胞中 IGF-1 通路的活性来参与视网膜新生血管的形成和发展? 为明确此问题本研究探讨 PSF 对视网膜血管内皮细胞 IGF-1/VEGF 信号通路的调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞来源** 猕猴脉络膜-视网膜血管内皮细胞 (RF/6A) 由天津医科大学眼科研究所张琰教授惠赠。

**1.1.2 主要试剂与仪器** Pegfp-C2-PSF 真核质粒由本实验室自行构建。pGenesil-PSF-RNAi 真核表达质粒 (武汉晶赛公司); 一抗 PSF 单克隆抗体 (P2860, 美国 Sigma 公司); 一抗 p44/42 细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular signal regulated protein kinases, ERK) 抗体 (#4695) 抗体、一抗磷酸化 p44/42 ERK (phospho ERK, pERK) 抗体 (#4370) 抗体、抗小鼠 IgG 抗体 (#7076)、抗兔 IgG 抗体 (#7074) (美国 CST 公司)。酶联免疫检测仪 (美国 Thermo 公司); 实时定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 凝胶成像系统 (美国 UVP 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞的培养和分组** 将细胞置于含有体积分数 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素 (商品单位) 的低糖 1640 完全培养基, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 95%  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$  的密闭恒温培养箱中培养。将 RF/6A 细胞接种至 96 孔培养板, 每孔  $1.5 \times 10^4$  个, 共 60 孔 (包括复孔在内), 培养体系为 100  $\mu\text{l}$ , 待细胞融合至 70% 时, 分为 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组、pGenesil-PSF-RNAi 质粒转染组及各自的对照组。采用转染试剂脂质体 2000 分别将 Pegfp-C2-

PSF 真核质粒和 pGenesil-PSF-RNAi 真核质粒 (PSF 质量均分别为 0.25、0.50、1.00  $\mu\text{g}$ ) 瞬时转染至培养的细胞中,不含 PSF 的 Pegfp-C2 转染组为 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组的对照组,以 pGenesil-scramble-siRNA 空质粒转染组作为 pGenesil-PSF-RNAi 真核质粒转染组的对照组,仅加入转染试剂脂质体 2000。

**1.2.2 MTT 法检测细胞的增殖活性** 依据实验分组将细胞接种于 96 孔板中,并进行相应的转染处理,细胞转染后 24 h 更换为无血清培养基,以 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  IGF-1 刺激 6 h (同时设置 IGF-1 非刺激组),再次更换为完全培养基,继续培养 48 h 后每孔加入 5  $\text{mg}/\text{ml}$  的 MTT 溶液 20  $\mu\text{l}$ ,继续培养 4 h 后终止培养,小心吸去孔内培养液,每孔加入 150  $\mu\text{l}$  二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度值。重复 3 次,筛选最适量的质粒。

**1.2.3 逆转录 PCR 检测细胞中 VEGF mRNA 的表达**

将 RF/6A 细胞接种于 6 孔培养板,每孔  $7.5 \times 10^5$  个细胞,培养体系为 1 ml,共 6 个复孔,待细胞融合达到 70% 时,利用脂质体 2000 分别将 0.50  $\mu\text{g}$  的 Pegfp-C2-PSF、1.00  $\mu\text{g}$  的 pGenesil-PSF-RNAi 及相应的空质粒瞬时转染至细胞中,转染后 24 h 更换为无血清培养基,并加入 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  IGF-1 刺激 6 h,提取各组细胞的总 RNA,逆转录为 cDNA 作为模板。参照文献[6]的方法自行构建 Pegfp-C2-PSF 真核表达质粒。VEGF 上游引物为 5'-GGAGGAGGCATTCGGAAAGT-3',下游引物为 5'-GCACTACCTGGGTCAGCTTCA-3'; GAPDH 上游引物为 5'-TGAAACCCTAGTTCATATCTTCAAACA-3',下游引物为 5'-CTCCTTCTGTGACTCTAACTTCTCAT-3'。PCR 扩增条件:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 1 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,59  $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min,40 个循环,95  $^{\circ}\text{C}$  反应 15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 min,95  $^{\circ}\text{C}$  反应 15 s,以 GAPDH 作为内参照,以  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法分析结果。

**1.2.4 Western blot 法检测视网膜组织中 ERK 蛋白的表达量** 将 RF/6A 细胞接种至 12 孔培养板,每孔  $7.5 \times 10^5$  个细胞,培养体系为 1 ml,共 8 个复孔,待细胞融合至 70% 后,其中 4 个孔转染 0.50  $\mu\text{g}$  的 Pegfp-C2-PSF,另 4 个孔仅行转染处理步骤,但不加入任何质粒载体,转染后 24 h 再添加 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 IGF-1 分别刺激细胞 0、1、3、6 h,收集各组全细胞提取物,以 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白复合物,半干法转膜后质量分数 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,pERK 一抗(1:1 000)室温孵育 2 h,1 倍 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;滴加 HRP 标记二抗室温孵育 1 h(1:5 000),再以 1 倍

TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min;最后加入 ECL 显色并拍照。同一张膜经蛋白剥脱处理后,再次滴加 ERK 一抗进行免疫杂交反应,利用 Quantity one 软件计算条带的灰度值计算 pERK 和总 ERK 蛋白的相对表达。

**1.2.5 逆转录 PCR 检测 U0126 干预后细胞中 VEGF mRNA 的表达** 将 RF/6A 细胞接种于 6 孔培养板,每孔  $7.5 \times 10^5$  个细胞,共 4 个复孔,培养体系为 1 ml,细胞融合至 70% 时分为 2 个组,每组 2 个孔,其中 1 个孔转染 0.50  $\mu\text{g}$  的 Pegfp-C2-PSF,另 1 个孔仅进行转染步骤但不加入任何质粒载体,转染后 24 h 更换为无血清培养基,1 个组加入 IGF-1,另 1 个组加入 IGF-1 联合 20  $\mu\text{mol}/\text{L}$  U0126。仅经 IGF-1 刺激的 RF/6A 细胞作为对照组,处理后 6 h 提取各组细胞的总 RNA,逆转录为 cDNA 作为模板,通过实时定量 PCR 法比较各组细胞中 VEGF mRNA 的相对表达量,以  $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$  法分析结果。

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 19.0 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  $\bar{x} \pm s$  表达。采用均衡分组的实验设计,IGF-1 刺激后不同剂量的 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组和 pGenesil-PSF-RNAi 质粒转染组与各自对照组间 RF/6A 细胞的增生率的差异比较、有或无 IGF-1 刺激时未转染组、Pegfp-C2-PSF 质粒转染组和 pGenesil-PSF-RNAi 质粒转染组 RF/6A 细胞中 VEGF mRNA 的相对表达量的差异比较、Pegfp-C2-PSF 质粒转染组 IGF-1 刺激不同时间细胞中 pERK 蛋白表达量的差异比较、有或无 U0126 处理时 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组和未转染组细胞中 VEGF mRNA 相对表达量的差异比较均采用两因素方差分析,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 有无 IGF-1 刺激下 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组 RF/6A 细胞的增生率**

有或无 IGF-1 刺激的不同剂量 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组细胞增生率的总体比较差异有统计学意义 ( $F_{\text{IGF 刺激}} = 839.270, P = 0.000; F_{\text{PSF 剂量}} = 5.224, P = 0.005$ )。与无 IGF-1 刺激的 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组比较,IGF-1 刺激后 Pegfp-C2 转染组以及 0.00  $\mu\text{g}$ 、0.25  $\mu\text{g}$ 、0.50  $\mu\text{g}$  及 1.00  $\mu\text{g}$  Pegfp-C2-PSF 质粒转染组 RF/6A 细胞的增生率均明显升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );与 0.00  $\mu\text{g}$  Pegfp-C2-PSF 质粒转染组相比,0.50  $\mu\text{g}$  及 1.00  $\mu\text{g}$  Pegfp-C2-PSF 质粒转染组细

胞增生率明显下降, 差异均有统计学意义 ( $P_{0.50} = 0.040, P_{1.00} = 0.015$ ) (表 1), 故以  $0.50 \mu\text{g}$  Pegfp-C2-PSF 质粒转染组作为最适剂量组。

**表 1 IGF-1 刺激后不同剂量 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组细胞的增生率 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

组别	样本量	对照组	不同剂量 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组细胞增生率			
			0.00 $\mu\text{g}$	0.25 $\mu\text{g}$	0.50 $\mu\text{g}$	1.00 $\mu\text{g}$
IGF <sup>-</sup>	3	0.120±0.008	0.120±0.002	0.120±0.012	0.120±0.007	0.130±0.010
IGF <sup>+</sup>	3	0.260±0.006 <sup>a</sup>	0.250±0.002 <sup>a</sup>	0.250±0.017 <sup>a</sup>	0.220±0.020 <sup>ab</sup>	0.210±0.010 <sup>ab</sup>

注:  $F_{\text{IGF 刺激}} = 839.270, P = 0.000; F_{\text{PSF 剂量}} = 5.224, P = 0.005$ . 与各自的 IGF<sup>-</sup> 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各自 0.00  $\mu\text{g}$  Pegfp-C2-PSF 转染组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) IGF: 胰岛素样生长因子; PSF: 多聚嘧啶序列结合蛋白相关剪接因子

## 2.2 有无 IGF-1 刺激下 pGenesil-PSF-RNAi 质粒转染组细胞增生率

有或无 IGF-1 刺激的不同剂量 pGenesil-PSF-RNAi 质粒转染组细胞增生率的总体比较差异有统计学意义 ( $F_{\text{IGF 刺激}} = 1312.867, P = 0.000; F_{\text{PSF 剂量}} = 55.086, P = 0.000$ )。在无 IGF-1 刺激的条件下, 不同剂量 pGenesil-PSF-RNAi 质粒转染组间 RF/6A 细胞的增生率无明显变化, 而 IGF-1 刺激后对照组以及 0.00、0.25、0.50、1.00  $\mu\text{g}$  pGenesil-PSF-RNAi 质粒转染组的细胞增生率均明显高于相应的无 IGF-1 刺激组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); IGF-1 刺激后 0.25、0.50、1.00  $\mu\text{g}$  pGenesil-PSF-RNAi 质粒转染组 RF/6A 细胞的增生率明显高于 0.00  $\mu\text{g}$  pGenesil-PSF-RNAi 质粒转染组, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.041、0.010、0.003$ ) (表 2)。选择 1.00  $\mu\text{g}$  PSF-RNAi 转染组作为最适 PSF 剂量。

**表 2 IGF-1 刺激后不同剂量 pGenesil-PSF-RNAi 转染组细胞的增生率 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

组别	样本量	对照组	不同剂量 pGenesil-PSF-RNAi 组细胞增生率			
			0.00 $\mu\text{g}$	0.25 $\mu\text{g}$	0.50 $\mu\text{g}$	1.00 $\mu\text{g}$
IGF <sup>-</sup>	3	0.110±0.004	0.090±0.015	0.090±0.04	0.110±0.005	0.110±0.005
IGF <sup>+</sup>	3	0.210±0.019 <sup>a</sup>	0.190±0.016 <sup>a</sup>	0.270±0.02 <sup>ab</sup>	0.320±0.03 <sup>ab</sup>	0.350±0.02 <sup>ac</sup>

注:  $F_{\text{IGF 刺激}} = 1312.867, P = 0.000; F_{\text{PSF 剂量}} = 55.086, P = 0.000$ . 与各自的 IGF<sup>-</sup> 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各自 0.00  $\mu\text{g}$  Pegfp-C2-PSF 转染组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05, ^c P < 0.01$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) IGF: 胰岛素样生长因子; PSF: 多聚嘧啶序列结合蛋白相关剪接因子

## 2.3 IGF-1 刺激后不同 PSF 转染组 RF/6A 细胞中 VEGF mRNA 的相对表达量

不同 PSF 转染组在有或无 IGF-1 刺激时 RF/6A

细胞中 VEGF mRNA 相对表达量的总体比较差异有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 28.064, P = 0.000; F_{\text{刺激}} = 203.651, P = 0.000$ ), 其中无 IGF-1 刺激时, Pegfp-C2-PSF 质粒转染组和 pGenesil-PSF-RNAi 转染组 RF/6A 细胞中 VEGF mRNA 的相对表达量与对照组比较差异均无统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), IGF-1 刺激后, Pegfp-C2-PSF 质粒转染组 VEGF mRNA 的相对表达量明显低于对照组, 而 pGenesil-PSF-RNAi 转染组细胞中 VEGF mRNA 的相对表达量明显高于对照组, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.016、0.019$ ) (表 3)。

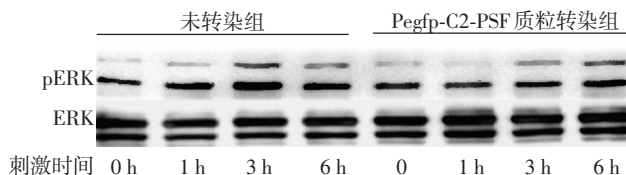
**表 3 IGF-1 刺激后不同 PSF 转染组细胞内 VEGF mRNA 的相对表达 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	样本量	不同刺激下细胞中 VEGF mRNA 的相对表达量	
		IGF <sup>-</sup>	IGF <sup>+</sup>
对照组	3	0.27±0.09	1.26±0.19
Pegfp-C2-PSF 质粒转染组	3	0.22±0.08	0.79±0.07 <sup>a</sup>
pGenesil-PSF-RNAi 转染组	3	0.24±0.05	2.29±0.43 <sup>a</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 28.064, P = 0.000; F_{\text{刺激}} = 203.651, P = 0.000$ . 与各自的对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) IGF: 胰岛素样生长因子; PSF: 多聚嘧啶序列结合蛋白相关剪接因子; VEGF: 血管内皮生长因子

## 2.4 IGF-1 刺激后不同时间 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组细胞 pERK/ERK 蛋白的表达

IGF-1 刺激后 0、1、3、6 h 未转染组细胞中 pERK 的表达条带明显增强, 且明显强于 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组, Pegfp-C2-PSF 质粒转染组细胞中 ERK 蛋白的表达条带强于未转染组 (图 1)。IGF-1 刺激不同时间转染组和未转染组细胞中 pERK/ERK 表达量总体比较差异有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 43.441, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 17.578, P = 0.000$ ), 其中未转染组细胞 IGF-1 刺激后 1、3、6 h pERK/ERK 蛋白表达量均较其对照组 (0 h) 明显升高, 而 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组细胞 IGF-1 刺激后 1、3、6 h pERK/ERK 蛋白表达量均较对照组 (0 h)



**图 1 IGF-1 刺激不同时间 PSF 高表达组 ERK 信号途径活化程度**

IGF-1 (0、1、3、6 h): IGF-1 刺激细胞不同时间 条带 1~4: 生理水平 PSF 的 RF/6A 细胞经 IGF-1 刺激不同时间 pERK 蛋白的变化; 条带 5~8: 高表达 PSF 的 RF/6A 细胞经 IGF-1 刺激不同时间 pERK 蛋白的变化 IGF: 胰岛素样生长因子; PSF: 多聚嘧啶序列结合蛋白相关剪接因子; pERK: 磷酸化细胞外调节蛋白激酶

明显升高(均  $P < 0.05$ )。转染后 1、3、6 h, Pegfp-C2-PSF 质粒转染组细胞中 pERK 蛋白表达量均明显低于相应未转染组, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.017$ 、 $0.000$ 、 $0.000$ ) (表 4)。

表 4 IGF-1 刺激转染或不转染 PSF pERK/ERK 蛋白表达量 ( $\bar{x} \pm s, A$ )

组别	样本量	IGF-1 刺激后不同时间 pERK/ERK 蛋白表达量			
		0 h	1 h	3 h	6 h
未转染组	3	0.41±0.06	0.69±0.03	1.00±0.21	0.64±0.02
Pegfp-C2-PSF 质粒转染组	3	0.39±0.05	0.38±0.06 <sup>a</sup>	0.56±0.08 <sup>a</sup>	0.36±0.08 <sup>a</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 43.441, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 17.578, P = 0.000$ . 与各自对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) IGF: 胰岛素样生长因子; PSF: 多聚嘧啶序列结合蛋白相关剪接因子; pERK: 磷酸化细胞外调节蛋白激酶

## 2.5 U0126 对 VEGF mRNA 的水平的影响

U0126<sup>+</sup>处理后, 未转染组细胞中 VEGF mRNA 相对表达量明显高于 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组, 差异有统计学意义 ( $P = 0.037$ ); 而无 U0126 处理的 Pegfp-C2-PSF 质粒转染组细胞中 VEGF mRNA 相对表达量明显低于无 U0126 处理的未转染组, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.002$ ) (表 5)。

表 5 U0126 处理与否各组细胞中 VEGF mRNA 的相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	U0126 处理与否细胞中 VEGF mRNA 相对表达量	
		U0126 <sup>-</sup>	U0126 <sup>+</sup>
Pegfp-C2-PSF 质粒转染组	3	1.23±0.09 <sup>a</sup>	0.93±0.21 <sup>ab</sup>
未转染组	3	2.32±0.28	1.32±0.08

注:  $F_{\text{分组}} = 147.459, P = 0.000; F_{\text{U0126}} = 110.653, P = 0.000$ . 与各自的未转染组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , 与组内 U0126<sup>-</sup>值比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) IGF: 胰岛素样生长因子; PSF: 多聚嘧啶序列结合蛋白相关剪接因子; VEGF: 血管内皮生长因子

## 3 讨论

VEGF 的活化是血管生成过程中关键的限速步骤, VEGF 可以刺激血管内皮细胞的有丝分裂和迁徙, 增加血管的通透性, 诱导毛细血管腔的形成, 因此, 有关 VEGF 与 RNV 形成之间关系的基础和临床研究一直为眼科学者所关注。

细胞因子在 RNV 形成中的作用越来越受到研究者的重视, 这些因子通过与受体结合影响血管的生成过程, 其中 IGF-1 介导的信号转导通路在新生血管生成中的作用是研究的主要课题之一, IGF-1 是一类促进生长发育和调节物质代谢的多功能活性肽<sup>[8]</sup>, 研究

显示, 玻璃体腔注射 IGF-1 可在动物模型中诱发 RNV, 糖尿病视网膜病变患者血清中 IGF-1 的水平与其疾病的严重程度呈现正相关, 且 IGF-1 介导的 VEGF 表达上调在细胞增生中发挥重要作用<sup>[8-11]</sup>。IGF-1 为有丝分裂原, 不仅直接刺激血管内皮细胞的分裂和增生, 还可经促分裂原活化蛋白 (mitogen-activated protein, MAP) 激酶途径上调血管内皮细胞中 VEGF 的表达, 从而间接调控血管内皮细胞的增生<sup>[12]</sup>。由此可见 IGF-1/VEGF 信号通路在血管内皮细胞的增生调控中发挥重要作用, 同时也提示抑制该信号途径的活性, 有可能预防和治疗眼内新生血管性疾病。

Patton 等<sup>[13-14]</sup>于 1993 年首次成功纯化克隆 PSF, 相对分子质量为 76 000, 可同时以弥散和凝集状态存在于细胞中, 其蛋白序列由富含脯氨酸和谷氨酸的氨基末端的、包含 2 个核内定位信号的羧基末端及 RRM1 和 RRM2 两个 RNA 识别基团组成。PSF 多作为转录抑制因子而参与转录调控, 在多种不同的生物学反应中介导基因转录抑制或沉默<sup>[15-16]</sup>。近年来逐渐揭示了 PSF 蛋白在调控 RNV 的形成、视神经再生中发挥重要的作用, 日益受到眼科相关领域研究者的关注。在斑马鱼生长发育过程中, PSF 对于其神经元的生存及分化发挥必不可少的作用<sup>[17]</sup>, 存在于成年斑马鱼视网膜中的 PSF 通过调控细胞因子信号抑制物 3 (suppressor of cytokine signaling3, socs3) 的表达而抑制视神经的再生<sup>[18]</sup>。我们的前期研究曾将重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus, rAAV) 包装的 PSF 蛋白注射进 RNV 小鼠模型的玻璃体腔证实小鼠视网膜组织中存在 PSF mRNA 的表达, 以抑制氧诱导视网膜病变小鼠 RNV 的形成, 下调 VEGF 的表达<sup>[19]</sup>。为进一步明确 PSF 调控 VEGF 表达的分子机制, 本研究中利用视网膜血管内皮细胞模型, 从体外实验角度观察 PSF 对 IGF-1/VEGF 信号通路的调控作用。

本研究中首次将 PSF 引入 RNV 性疾病中, 发现 PSF 高表达可抑制 IGF-1 诱导的 VEGF 表达以及随之产生的 RF/6A 增生, 另外在 PSF 高表达之后 ERK 也呈现了磷酸化水平下降的趋势。在此基础上, 我们进一步研究 ERK 信号途径的特异性抑制剂 U0126 对 ERK 信号通路的影响, 发现 U0126 可以高效并特异性地抑制、MAP/ERK 激酶 (MEK 激酶) 的 MEK1 和 MEK2 活化, 但不会抑制 ERK 自身活性。本研究中显示, 在 PSF 高表达之后 U0126 的抑制水平增加, 提示 PSF 可以协同并增加 U0126 的效果, 说明 PSF 可抑制 IGF-1/ERK/VEGF 信号通路, 成为防治 RNV 的新药物。本研究结果还显示, 高表达的 PSF 仅能抑制 IGF-1

刺激后的 RF/6A 细胞增生并下调 VEGF 的表达,即在 IGF-1 刺激的前提下,PSF 才能发挥上述作用。Lukong 等<sup>[20]</sup>发现,表皮生长因子刺激后,PSF 通过与 BREast 肿瘤激酶相结合,参与细胞周期调控。本研究前期也证实白细胞介素-4 刺激后 PSF 可与信号转导子和转录激活子 6 结合形成复合物,通过募集组蛋白去乙酰化酶 1 到 STAT6 基因转录复合物中,导致组蛋白去乙酰化,进而抑制 STAT6 介导的转录活性<sup>[21]</sup>。可见细胞因子与其受体的结合是 PSF 发挥作用的启动信号,在全身或局部细胞因子水平发生改变时,PSF 可对及时针对机体或微环境的动态变化做出精准的应变反应,以维持内环境的稳定。PSF 的 IGF-1 配体依赖性对于疾病的临床治疗的意义较为重大,目前医疗市场上应用的 VEGF 抑制剂大多为 VEGF 单克隆抗体或者 VEGF-trap,它们与 VEGF 的结合不具有时相选择性,无法感应病理水平和生理水平 VEGF 的差异,而生理水平的 VEGF 可以维持血管的正常结构和功能,一旦过度抑制,必将对正常血管的功能有所影响,引起相应的并发症。PSF 蛋白则不同,它可通过感知眼部微环境中 IGF-1 水平的改变,准确地识别 VEGF 的病理性表达量升高,从而对其发挥有效的抑制,同时并不影响 VEGF 的生理水平的维持,有望成为特异性抑制 VEGF 表达及 RNV 基因治疗的新药物。

## 参考文献

- [1] Deissler HL, Deissler H, Lang GE, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) is sufficient to completely restore barrier malfunction induced by growth factors in microvascular retinal endothelial cells [J]. *Br J Ophthalmol*, 2011, 95 (8) : 1151-1156. DOI: 10.1136/bjo.2010.192229.
- [2] Nicosia RF, Nicosia SV, Smith M, et al. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro [J]. *Am J Pathol*, 1994, 145(5) : 1023-1029.
- [3] Chantelau E, Meyer-Schwickerath R, et al. Reversion of 'early worsening' of diabetic retinopathy by deliberate restoration of poor metabolic control [J]. *Ophthalmologica*, 2003, 217 (5) : 373-377. DOI: 10.1159/000071355.
- [4] Urban RJ, Bodenbun YH, Wood TG, et al. NH2 terminus of PTB-associated splicing factor binds to the porcine P450scc IGF-I response element [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 283 (3) : 423-427. DOI: 10.1152/ajpendo.00057.2002.
- [5] Urban RJ, Bodenbun Y, Kurosky A, et al. Polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor is a negative regulator of transcriptional activity of the porcine p450scc insulin-like growth factor response element [J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14(6) : 774-782.
- [6] 东莉洁, 李晓冬, 何津岩, 等. 重组 Pegfp-C2-PSF 质粒的构建及表达 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2009, 6(3) : 235-238. DOI: 10.3870/j.issn.1672-8009.2009.03.010.
- [7] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor [J]. *Endocr Rev*, 1997, 18(1) : 4-25.
- [8] Punglia RS, Lu M, Hsu J, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor I [J]. *Diabetes*, 1997, 46(10) : 1619-1626. DOI: 10.2337/diacare.46.10.1619.
- [9] Danis RP, Bingaman DP. Insulin-like growth factor-1 retinal microangiopathy in the pig eye [J]. *Ophthalmology*, 1997, 104(10) : 1661-1669.
- [10] Baudouin C, Fredj-Reygrobellet D, Brignole F, et al. Growth factors in vitreous and subretinal fluid cells from patients with proliferative vitreoretinopathy [J]. *Ophthalmic Res*, 1993, 25(1) : 52-59.
- [11] Merimee TJ, Zapf J, Froesch ER. Insulin-like growth factors. Studies in diabetics with and without retinopathy [J]. *N Engl J Med*, 1983, 309(9) : 527-530. DOI: 10.1056/NEJM198309013090904.
- [12] Smith LE, Shen W, Perruzzi C, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor [J]. *Nat Med*, 1999, 5(12) : 1390-1395. DOI: 10.1038/70963.
- [13] Patton JG, Mayer SA, Tempst P, et al. Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing [J]. *Genes Dev*, 1991, 5(7) : 1237-1251. DOI: 10.1101/gad.5.7.1237.
- [14] Patton JG, Porro EB, Galceran J, et al. Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor [J]. *Genes Dev*, 1993, 7(3) : 393-406. DOI: 10.1101/gad.7.3.393.
- [15] Tyson-Capper AJ, Shiells EA, Robson SC. Interplay between polypyrimidine tract binding protein-associated splicing factor and human myometrial progesterone receptors [J]. *J Mol Endocrinol*, 2009, 43(1) : 29-41. doi: 10.1677/JME-09-0001.
- [16] Dong X, Sweet J, Challis JR, et al. Transcriptional activity of androgen receptor is modulated by two RNA splicing factors, PSF and p54nrb [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(13) : 4863-4875.
- [17] Lowery LA, Rubin J, Sive H. Whitesnake/sfpq is required for cell survival and neuronal development in the zebrafish [J]. *Dev Dyn*, 2007, 236(5) : 1347-1357. DOI: 10.1002/dvdy.21132.
- [18] Elsaiedi F, Bemben MA, Zhao XF, et al. Jak/Stat signaling stimulates zebrafish optic nerve regeneration and overcomes the inhibitory actions of Soes3 and Sfpq [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(7) : 2632-2644. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3898-13.2014.
- [19] 田芳, 东莉洁, 周玉, 等. 重组腺相关病毒多聚嘧啶序列结合蛋白相关剪接因子对氧诱导视网膜新生血管形成的抑制作用 [J]. *中华眼底病杂志*, 2014, 30(5) : 504-508.
- [20] Tian F, Dong LJ, Zhou Y, et al. Inhibition of oxygen induced retinal neovascularization by recombinant adeno-associated virus-polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor intraocular injection in mice [J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2014, 30(5) : 504-508.
- [21] Lukong KE, Huot ME, Richard S. BRK phosphorylates PSF promoting its cytoplasmic localization and cell cycle arrest [J]. *Cell Signal*, 2009, 21(9) : 1415-1422. DOI: 10.1016/j.cellsig.2009.04.008.
- [22] Dong L, Zhang X, Fu X, et al. PTB-associated splicing factor (PSF) functions as a repressor of STAT6-mediated Ig epsilon gene transcription by recruitment of HDAC1 [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(5) : 3451-3459. DOI: 10.1074/jbc.M110.168377.

(收稿日期: 2015-11-03)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)