## · 1089 ·

・实验研究・

# Radixin shRNA 对高氧诱导的小鼠视网膜新生 血管形成的抑制作用

王龙梅 杨侠 闫琳 刘廷 董晓光 徐海峰

【摘要】 背景 视网膜新生血管性疾病是多种眼科疾病的病理基础,迄今为止新生血管形成的发病机 制尚不完全清楚。研究显示,视网膜新生血管形成过程中 radixin 表达量明显增加,因此推测在视网膜新生血 管相关疾病中抑制或沉默 radixin 基因有望成为治疗的新方法。目的 研究 radixin 小发卡(shRNA)干扰质 粒对氧诱导视网膜病变(OIR)小鼠模型视网膜中 radixin 基因表达的抑制作用,观察其对小鼠视网膜新生管 形成的影响。 方法 将 64 只出生后 7 d 的 SPF 级 C57BL/6J 小鼠按照随机数字表法分为正常对照组、模型 对照组、radixin shRNA 质粒组和 shRNA 质粒组,其中模型对照组、radixin shRNA 质粒组和 shRNA 质粒组小鼠 在体积分数(75±2)%的氧环境中饲养5d,建立 OIR 动物模型,正常对照组小鼠饲养于正常氧环境下。radixin shRNA 质粒组和 shRNA 质粒组小鼠于出生后第 12 天分别于玻璃体腔注射 1 μg radixin shRNA 质粒和对照 shRNA 质粒,小鼠出生后第17天,对各组小鼠行 FD-2000S 血管造影术,制备视网膜铺片,观察视网膜血管形 态和分布;摘取各组小鼠眼球制备视网膜切片,采用视网膜苏木精-伊红染色法观察突破视网膜内界膜的血 管内皮细胞核和新生血管;应用免疫组织化学染色法检测 radixin 在视网膜中的表达分布;分别采用实时荧光 定量 PCR 法和 Western blot 法检测 radixin mRNA 及其蛋白在视网膜组织中的表达情况。结果 正常对照组 小鼠视网膜铺片显示视网膜血管走行正常,模型对照组小鼠视网膜后极部大片状无灌注区,可见大血管迂曲 和血管壁荧光素渗漏和新生血管,shRNA 质粒组小鼠视网膜可见无灌注区和微血管瘤,而 radixin shRNA 质粒 组小鼠视网膜后极部无灌注区面积较小,血管迂曲和渗漏现象较模型对照组和 shRNA 质粒组明显减轻。视 网膜组织病理学检查显示,模型对照组和 shRNA 质粒组小鼠视网膜内界膜不连续,可见大量血管内皮细胞核 和血管管腔突破内界膜, radixin shRNA 质粒组视网膜内界膜形态接近正常对照组, 有少量血管内皮细胞核和 血管管腔突破内界膜。免疫组织化学检查显示,正常对照组和 radixin shRNA 质粒组 radixin 表达弱于模型对 照组和 shRNA 质粒组。正常对照组、模型对照组、radixin shRNA 质粒组和 shRNA 质粒组小鼠视网膜中 radixin mRNA的相对表达量分别为1.002±0.043,2.236±0.093,0.556±0.015和2.272±0.096,各组间总体比较差异 有统计学意义(F=504.545,P=0.000)。正常对照组、模型对照组、radixin shRNA 质粒组和 shRNA 质粒组小 鼠视网膜中 radixin 蛋白的相对表达量分别为 1.000±0.082 \1.193±0.021 \0.263±0.016 和 1.235±0.005,各组 间总体比较差异有统计学意义(F=753.522, P=0.000) radixin shRNA 质粒组 radixin mRNA 和蛋白的相对表 达量较模型对照组和 shRNA 质粒组明显减低,差异均有统计学意义(均 P<0.01)。结论 Radixin shRNA 能 有效沉默 OIR 动物模型视网膜中 radixin 基因的表达,抑制视网膜新生血管的形成。

【关键词】 小干扰 RNA/应用;视网膜新生血管;高氧/生理病理;细胞骨架蛋白;膜蛋白;动物模型;近交系 C57BL/6J 小鼠;根蛋白

Inhibitory effect of radixin shRNA on retinal neovascularization induced by hyperoxia in mice Wang Longmei, Yang Xia, Yan Lin, Liu Ting, Dong Xiaoguang, Xu Haifeng. Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, China

Corresponding author: Xu Haifeng, Email: chxhf@126. com

[Abstract] Background Retinal neovascularization is pathological basis of a variety of fundus diseases, but its pathogenesis is unclear. Studies showed that the expression level of radixin in retina is remarkably increased in

DOI:10.3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 12.008

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2011HM012)

作者单位:266071 山东青岛市,山东省眼科研究所(王龙梅,现在日照市中医医院眼科;闫琳,现在烟台爱尔眼科医院) 通信作者:徐海峰,Email:chxhf@126.com

retinal neovascularization-related diseases. It is presumed that silencing or down-regulating the abnormal expression of radixin is helpful for curing retinal neovascularization-related diseases. Objective This study was to investigate the inhibitory effect of radixin short hairpin RNA (shRNA) plasmid on expression of radixin gene in retina of oxygeninduced retinopathy (OIR) mice. Methods Sixty-four 7-day-old C57BL/6J mice were randomly divided into normal control group, model control group, radixin shRNA plasmid group and shRNA plasmid group by random number table. There were 16 mice in every group. OIR models were established by exposing the mice in an environment of (75±2)% oxygen for 5 days and then returned to the normal air in the model control group, radixin shRNA plasmid group and shRNA plasmid group, while the mice of the normal control group were fed in the normal air environment. Radixin shRNA plasmid or control shRNA plasmid at the dose of 1 µg was intravitreally injected in 12-day-old mice of the radixin shRNA plasmid group or shRNA plasmid group, respectively. Five days later, FD-2000S angiography was performed on the mice of each group and then retinal flatmounts were prepared for the observation of retinal vessels. The mice from various groups were sacrificed and retinal sections were prepared. The vascular endothelial nucleus and new blood vessels extending inner limiting membrane (ILM) were examined by hematoxylin and eosin staining; the expression of radixin in the retinas was detected using immunochemistry; the relative expression levels of radixin mRNA and protein were quantitative assayed by real-time quantitative RCR and Western blot, respectively. The use and care of the animals adhered to the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Results The distribution of retinal yessels was normal in the normal control group. Non-perfusion zone at the posterior pole of retina, circuity of blood vessels, leakage of vessel wall and new blood vessels were found in the mice of the model control group. Non-perfusion zone and microaneurysms were also exhibited in the shRNA plasmid group. However, these findings were slight in the radixin shRNA plasmid group. The surface of ILM was in discontinuity in the model mice and shRNA-injected mice with more vascular endothelial cell nucleus and more tubes extending ILM than that in the radixin shRNA plasmid group. The immunochemistry results showed that the expressions of radixin in the normal control group and radixin shRNA plasmid group were weaker than those in the model control group and control shRNA plasmid group. The relative expression levels of radixin mRNA were 1.002±0.043, 2.236±0.093, 0.556±0.015 and 2.272±0.096 in the normal control group, model control group, radixin shRNA plasmid group and control shRNA plasmid group, and those in the radixin shRNA plasmid group were significantly reduced in comparison with the normal control group, model control group and the shRNA plasmid group (all at P < 0.01). The relative expression levels were  $1.000 \pm 0.082$ ,  $1.193 \pm 0.021$ ,  $0.263 \pm 0.021$ 0.016 and 1.235±0.005 in the normal control group, model control group, radixin shRNA plasmid group and shRNA plasmid, with the lowest expression level in the radixin shRNA plasmid group (all at P < 0.01). Conclusions Radixin shRNA can downregulate the expression of radixin gene in the retinas of OIR mice and further inhibit pathological retinal neovascularization.

[Key words] RNA, small interfering/administration; Retinal neovascularization; Hyperoxia/physiopathology; Cytoskeletal proteins; Membrane proteins; Disease model; Mouse, inbred C57BL/6J; Radixin

视网膜病理性新生血管形成是许多眼科疾病发生 和发展的病理基础<sup>[1]</sup>,新生血管引起牵拉性视网膜脱 离、玻璃体出血、视网膜裂孔等病变,导致视觉功能损 害。迄今为止,新生血管形成的具体机制尚不完全清 楚。Radixin 是 ERM(Ezrin/radixin/moesin)蛋白家族 中的一员,是膜细胞骨架连接蛋白,属于4.1蛋白超家 族<sup>[2-4]</sup>。研究显示,radixin 在肿瘤细胞增生和迁移浸 润以及血管内皮屏障功能的破坏等病理过程中都起到 了重要作用<sup>[5-10]</sup>,目前有关 radixin 与视网膜新生血管 形成的关系研究甚少。我们前期的研究发现,小鼠视 网膜新生血管形成过程中 radixin 在视网膜中的表达 量升高<sup>[11]</sup>,推测 radixin 在视网膜新生血管形成过程 中可能与血管内皮细胞的生物学行为有关。本研究应用 radixin 小发卡 RNA (short hairpin RNA, shRNA)质粒进行小鼠视网膜新生血管模型的玻璃体腔注射,探讨 radixin 对血管内皮细胞异常增生和迁移、新生血管形成以及血管通透性的影响,为视网膜新生血管性疾病的靶向治疗和相关的研究提供实验依据。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级健康成熟 C57BL/6J 小鼠 (北京维通利华公司),按雌雄比例 3:1合笼饲养,母鼠 怀孕后单独饲养,取其所生幼鼠制作视网膜新生血管

模型。本研究符合美国 ARVO 关于在眼科和视觉研究中动物使用宣言的规定。

1.1.2 主要试剂及仪器 radixin shRNA 质粒 (sc-37367)、对照 shRNA 质粒(sc-108060)、羊抗小鼠 radixin 一抗(sc-6408)(美国 Santa Cruz 公司)、辣根过 氧化物酶标记兔抗羊二抗(ZB-2306)(中杉金桥生物 技术有限公司);异硫氰酸荧光素标记的右旋糖酐 (FD-2000S) (美国 Sigma 公司); 免疫组织化学 EliVisio plus 检测试剂盒(福州迈新生物技术开发有限 公司); RNA 提取试剂盒(德国 MACHEREY-NAGEL 公司);逆转录试剂盒(大连 Takara 公司);实时荧光定 量 PCR 试剂盒(北京天根生化科技有限公司);探针引 物(南京金斯瑞生物科技有限公司); BCA 蛋白定量试 剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);ECL 显影试剂 盒(美国 Thermo scientific 公司)。LB-CYl2C 数字测氧 仪(青岛路博伟业环保科技有限公司);5 μl 微量注射 器(配 33G 针头)(美国 Hamilton 公司);荧光显微镜 (日本 Nikon 公司);7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 氧诱导视网膜病变动物模型建立及分组 将 64 只7 日龄的小鼠用随机数字表法将每窝小鼠随机 分为4个组,每组16只。正常对照组小鼠置正常环境 中饲养;模型对照组、radixin shRNA 质粒组和 shRNA 质粒组7日龄小鼠与母鼠同笼置于氧体积分数 (75±2)%、室温(23±2)℃的高氧氧箱中饲养。 LB-CYI2C数字测氧仪每日监测 3~4次,保证氧箱内 氧体积分数稳定。饲养5d后,小鼠出氧箱时随机取1 只小鼠颈椎脱臼处死,摘取眼球行血管灌注视网膜铺 片,以视网膜形成大片无灌注区作为氧诱导视网膜病 变(oxygen induced retinopathy, OIR) 动物模型造模成 功的标准<sup>[12]</sup>。radixin shRNA 质粒组和 shRNA 质粒组 小鼠玻璃体腔分别注射 radixin shRNA 质粒和空白 shRNA 质粒1μg,模型对照组小鼠不进行任何处理。 将小鼠置于到正常环境中继续饲养,各组小鼠均于出 生后第17天颈椎脱臼处死并取材。

1.2.2 小鼠玻璃体腔注射质粒 Radixin shRNA 质粒 组和 shRNA 质粒组小鼠取出高氧氧箱后立即腹腔注 射盐酸氯氨酮(0.1 g/kg)、盐酸氯丙嗪(0.125 g/kg)麻 醉,置开睑器充分暴露眼球,复方托吡卡胺滴眼液点眼 扩瞳。在手术显微镜下用微量注射器沿眼球角巩膜缘 后缘穿刺进入玻璃体腔,放出少量液体后注入相应的 质粒溶液。眼球复位,送回笼内喂养,质量分数0.5% 左氧氟沙星滴眼液点眼,每日3次,预防感染。 1.2.3 视网膜 FD-2000S 血管灌注铺片 每组任意取 3 只小鼠,腹腔注射麻醉后于手术显微镜下自上腔静脉灌注 25 g/L FD-2000S 0.05 ml,保持正常血液循环 5 min后颈椎脱臼处死小鼠,摘取小鼠眼球,质量分数 4%多聚甲醛溶液固定 15 min,手术显微镜下沿角巩膜 缘剪开眼球,去除角膜、虹膜和晶状体,完整分离视网 膜。将视网膜呈放射状剪开,玻璃体面向上平铺于载 玻片上,甘油封片后置于荧光显微镜下,应用 488 nm 波长蓝光激发,观察视网膜血管的形态并拍照。

 1.2.4 各组小鼠视网膜形态的组织病理学观察 每 组任意取3只小鼠,颈椎脱臼法处死小鼠,摘取小鼠眼球,4%多聚甲醛溶液固定24h,石蜡包埋。全眼球矢状位连续切片,切片厚度4μm。待眼环呈现不完整圆环时,每隔15张切片取2张置于1张载玻片上,苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察并拍照。

1.2.5 免疫组织化学染色法检测各组小鼠视网膜中 radixin 的表达分布 按照 1.2.4 方法制备小鼠眼球石 蜡切片,常规脱蜡,枸橼酸盐高压抗原修复,体积分数 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>封闭 15 min,山羊血清孵育 15 min,加入羊抗 小鼠 radixin 一抗(1:200),以 PBS 代替一抗作为阴性 对照,37℃水浴锅孵育1h,PBS漂洗;滴加试剂盒中增 强剂及兔抗羊二抗,37 ℃水浴锅孵育 30 min, PBS 漂 洗;DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片,光学显微镜 下观察并拍照。细胞中出现棕黄色颗粒者为阳性反应。 1.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测小鼠视网膜中 radixin mRNA 的表达 每组任意取 5 只小鼠,按照 1.2.4 方法分离视网膜,每3 个视网膜合并为1 个样 本,采用 RNA 提取试剂盒提取视网膜总 RNA,并采用 逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,加 入设计的引物和探针进行扩增(表1)。反应条件: 95 ℃ 预变性 10 s;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 延伸 60 s,共 40 个循环。

表 1 实时荧光定量 PCR Taqman 法引物探针序列		
基因名称 (基因库序号)	探针引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
GAPDH	F: ACAACTTTGGCATTGTGGAA	133
(NM_008084)	R:GATGCAGGGATGATGTTCTG	
	P:CATGCCATCACTGCCACCCA	
radixin	F:GAAGAATGAACGCGTGAAG	103
(NM_0011046160)	R:CTCAGCGTGAAGAACATCGT	
	P:TCTGAACTCAATGCCTGGAGCTGC	
注:F:上游序列;R:下游序列;P:探针序列;radixin:根蛋白		

1.2.7 Western blot 法检测小鼠视网膜中 radixin 蛋白的表达 每组任意取 5 只小鼠,按照 1.2.4 方法分离

视网膜,试剂盒提取视网膜总蛋白质,BCA蛋白定量 法测蛋白浓度,取总蛋白 30 μg进行质量分数 10% SDS-PAGE凝胶电泳。电泳结束后,100 mA恒流电转 3h将蛋白转印至 PVDF 膜上。质量分数 5% 脱脂奶粉 室温封闭 1h,加入羊抗小鼠 radixin —抗(1:500)4 ℃ 孵育过夜。用含体积分数 0.1% Tween-20 的磷酸盐 缓冲液(PBST)洗膜,加入兔抗羊 IgG 二抗(1:3000) 室温孵育 1h。PBST 洗膜,ECL 显影试剂盒显影并成 像,Gel-Del凝胶成像系统照相,Image J2x 软件测量目 的蛋白条带的灰度值,以 GAPDH 为内参,计算 radixin 蛋白的相对表达量。

#### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。本研究 测量指标的数据资料经 W 检验证实呈正态分布,以 x±s表示,组间方差经 Levene 检验证实方差齐。采用 完全随机分组单因素干预多水平分组实验设计,正常 对照组、模型对照组、radixin shRNA 质粒组和 shRNA 质粒组间小鼠视网膜中 radixin mRNA 及蛋白相对表 达量的总体差异比较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 各组小鼠视网膜铺片中血管形态的变化

正常小鼠出生后 12 d 视网膜血管已发育完全(图 1A)。高氧诱导小鼠出生后 12 d 视网膜动脉高度收 缩,后极部出现大片无灌注区,仅在视网膜周边小面积 内形成血管网,显示 OIR 造模成功(图 1B)。正常对 照组小鼠视网膜血管走行清晰,血管分布均匀、致密, 走行规则(图 1C)。模型对照组小鼠视网膜大分支血 管迂曲扩张,视网膜周边部血管网向后极部生长,可见 大量新生血管芽及微血管瘤,血管走行紊乱,后极部可 见无血管灌注区(图 1D)。radixin shRNA 质粒组小鼠 视网膜血管迂曲,FD-2000S 渗漏现象明显减轻,形态 趋于正常,新生血管数量明显减少,血管密度仍低于正 常对照组(图 1E)。shRNA 质粒组小鼠视网膜血管形 态与模型对照组相似,血管走行迂曲,出现明显的 FD-2000S渗漏(图 1F)。

### 2.2 各组小鼠视网膜组织病理学表现

正常对照组小鼠视网膜内界膜平整、光滑,未见血管芽。模型对照组和 shRNA 质粒组小鼠视网膜内界 膜表面粗糙,内界膜不连续,可见大量血管内皮细胞核 和新生血管突破内界膜。radixin shRNA 质粒组小鼠 视网膜内界膜稍粗糙,视网膜各层组织形态接近正常 对照组,但可见少量血管内皮细胞核和血管突破内界



图 1 各组小鼠 FD-2000S 血管灌注视网膜铺片(×40) A:正常对 照组小鼠 12 d 视网膜血管分布清晰,走行正常 B:模型对照组小鼠 视网膜可见大片无灌注区 C:正常对照组出生后 17 d 小鼠视网膜 血管分布均匀、致密,走行规则 D:模型对照组小鼠视网膜可见大 片无灌注区,大血管迂曲,管径不均,管壁可见 FD-2000S 渗漏 E: radixin shRNA 质粒组小鼠视网膜血管可见 FD-2000S 渗漏,新生血 管少于模型对照组,但仍可见无灌注区 F:shRNA 质粒组小鼠视网 膜血管迂曲扩张,可见大量新生血管形成,局部可见微血管瘤

膜。shRNA 质粒组小鼠视网膜内界膜表面粗糙,突破 内界膜表面的血管内皮细胞核数和血管管腔较多 (图 2)。

2.3 各组小鼠视网膜组织中 radixin 的表达分布 免疫组织化学结果显示, radixin 主要表达于视网



图 2 各组小鼠视网膜组织病理学观察(HE×400) A:正常对照组 小鼠视网膜层次清晰,内界膜平整、连续 B:模型对照组小鼠视网 膜内界膜不光滑,可见血管内皮细胞核和异常增生的血管突破内界 膜(箭头) C:radixin shRNA 质粒组小鼠视网膜内界膜较模型对照 组平整,突破内界膜的血管内皮细胞核和血管管腔较少(箭头) D: shRNA 质粒组小鼠视网膜内界膜表面粗糙,突破内界膜表面的血管 内皮细胞核和血管管腔较多(箭头)

膜新生血管管壁和视网膜神经节细胞层。正常对照 组、radixin shRNA 质粒组小鼠视网膜内棕黄色颗粒较 少,radixin 表达较弱,而模型对照组和 shRNA 质粒组 小鼠视网膜中可见大量血管芽突出内界膜并伸向玻璃 体腔,在新生血管管壁、血管芽、内皮细胞及视网膜神 经节细胞层的细胞中可见大量棕黄色颗粒,radixin 表达 明显增强(图3)。



图3 各组小鼠视网膜中 radixin 的表达分布(DAB ×400) A:正常 对照组小鼠视网膜中 radixin 表达较弱,呈棕色染色(箭头) B:模型 对照组小鼠视网膜中 radixin 强阳性表达,呈深棕色染色,阳性细胞 数较多(箭头) C:radixin shRNA 质粒组小鼠视网膜中 radixin 阳性 细胞数较模型对照组减少,且呈淡棕色染色(箭头) D:shRNA 质粒 组小鼠视网膜中 radixin 阳性细胞数多,染色强度较 radixin shRNA 质 粒组增强(箭头)

2.4 各组小鼠视网膜中 radixin mRNA 的相对表达量 实时荧光定量 PCR 结果显示, radixin mRNA 在正常对照组、模型对照组、radixin shRNA 质粒组和 shRNA 质粒组小鼠视网膜中的相对表达量分别为1.002±0.043,2.236±0.093,0.556±0.015 和 2.272±0.096,4 个组间总体比较差异有统计学意义(F = 504.545, P=0.000),其中模型对照组和 shRNA 质粒组 radixin mRNA 相对表达量均明显高于正常对照组, radixin shRNA 质粒组 radixin mRNA 相对表达量显著低于模型对照组,差异均有统计学意义(均 P<0.01), 而模型对照组与 shRNA 质粒组间 radixin mRNA 相对表达量比较,差异无统计学意义(P>0.05)(图4)。

2.5 各组小鼠视网膜中 radixin 蛋白的相对表达量

Western blot 检测结果显示,正常对照组、模型对 照组、radixin shRNA 质粒组、shRNA 质粒组小鼠视网 膜中 radixin 蛋白相对表达量分别为 1.000±0.082、



#### 图 4 各组小鼠视网膜中 radixin mRNA 相对表达量 的比较 F = 504.545, P = 0.000. 与正常对照组比 较,<sup>a</sup> P < 0.01; 与 radixin shRNA 质粒组比较,<sup>b</sup> P < 0.01(单因素方差分析, LSD-t 检验, n=3)

1. 193±0.021、0. 263±0.016 和 1. 235±0.005,各组间 radixin 蛋白相对表达量总体比较差异有统计学意义 (F=753.522,P=0.000)。模型对照组和 shRNA 质粒 组 radixin 小鼠视网膜中 radixin 蛋白相对表达量较正 常对照组明显增加,radixin shRNA 质粒组小鼠视网膜 中 radixin 蛋白相对表达量较模型对照组和 shRNA 质 粒组明显减少,差异均有统计学意义(均 P<0.01),模 型对照组和 shRNA 质粒组间 radixin 蛋白相对表达量 比较,差异无统计学意义(P>0.05)(图 5,6)。



# 图 5 Western blot 法检测 各组 radixin 蛋白的表达 1:正常对照组 2:模型对照组 3: radixin shRNA 质粒组 4: shRNA 质粒组 radixin:根蛋白

图 6 各组 radixin 蛋白相 对表达量的比较 F =753.522, P = 0.000. 与正常 对照组比较,  ${}^{a}P < 0.01$ ; 与模 型对照组比较,  ${}^{b}P < 0.01$ radixin: 根蛋白(单因素方差 分析, LSD-t检验, n = 3)

# 3 讨论

视网膜新生血管形成是缺血、缺氧、炎症等多种刺激因素引起的病理反应,是一个复杂的病理过程<sup>[13]</sup>。目前糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变、老年性黄斑变性等视网膜新生血管性疾病的病理机制尚未明确,新生血管类眼科疾病的主要治疗方法是视网膜激光光凝术、玻璃体切割术、玻璃体腔注射血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)拮抗类药物等,然而这些治疗方法破坏视网膜正常结构、费用昂贵,疗效不理想等,因而仍需探索高效、低损伤的治疗方案。

Radixin 是膜骨架连接蛋白,是 ERM 蛋白家族成员之一。Radixin 在多种真核细胞内表达,可将肌动蛋白骨架与 CD43、CD44、细胞黏附分子及多种细胞膜通道和受体相连接,参与多种细胞的生物活动<sup>[10,14-18]</sup>。

· 1093 ·

· 1094 ·

有研究表明,前列腺癌组织中 radixin 的表达量高于正 常组织,干扰 radixin 基因表达会使 PC3 前列腺癌细胞 移动速度明显减慢<sup>[5,10]</sup>。在胰腺癌 PANC-1 细胞系 中,用 shRNA 抑制 radixin 基因的表达可以抑制癌细 胞的增生和迁移,将转染了 radixinshRNA 的癌细胞种 植到裸鼠体内后瘤体血管密度降低,肿瘤生长明显受 到抑制<sup>[6]</sup>。另最近研究还发现干扰 radixin 基因的表 达可显著抑制人恶性胶质瘤细胞在体内外的生长<sup>[19]</sup>。 Radixin 还与血管内皮间屏障功能改变有关。研究发 现,1-磷酸-鞘氨醇能诱导 ERM 蛋白易位到人肺动脉 内皮细胞(human pulmonary artery endothelial cells, HPAEC)的边缘,促进细胞肌动蛋白骨架重塑,增强内 皮细胞屏障功能,在这个过程中,radixin 起主要作 用<sup>[7]</sup>。ERM 家族还参与肿瘤坏死因子-α 诱导 HPAEC 间通透性增加以及晚期糖基化终末产物诱导人类皮肤 微血管内皮细胞间通透性增加等病理过程<sup>[8-9]</sup>。以上 研究表明, radixin 可能与细胞的迁移有关, 而细胞迁移 是新生血管形成过程中的重要环节,我们前期的实验 研究也发现,视网膜新生血管形成过程中伴随着 radixin 的高表达<sup>[11]</sup>,因此我们推测 radixin 基因可能 与新生血管的形成有关。

本研究中运用 radixin shRNA 技术以沉默 radixin 的表达,观察 OIR 模型小鼠视网膜新生血管形态的变 化。结果表明, radixin shRNA 质粒注入小鼠玻璃体腔 后成功地抑制了 radixin 基因的表达和小鼠视网膜新 生血管的形成,与模型对照组小鼠比较, radixin shRNA 质粒组小鼠视网膜血管迂曲和渗漏现象明显减轻,认 为 radixin 在视网膜新生血管形成过程中起到了重要 作用,而干扰 radixin 基因表达可减少视网膜新生血管 形成。但是作为膜骨架连接蛋白, radixin 是单独作用 还是通过与其他新生血管相关因子如 VEGF 相互作 用,抑或是通过作用于细胞膜通道和受体来参与视网 膜新生血管形成过程,目前尚不清楚。另外本研究中 虽然证实玻璃体腔注射 radixin shRNA 质粒可减少小 鼠视网膜新生血管增生过程,但注射的最低有效剂量、 radixin shRNA 质粒对眼内组织的安全性等诸多问题 还有待进一步研究。本研究的结果证实,利用 radixin 干扰质粒局部注射下调 radixin 基因表达在视网膜新 生血管疾病治疗中可能具有潜在的临床价值,有望成 为临床治疗新生血管视网膜疾病的新靶点。

#### 参考文献

 Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease[J]. Nature, 2005, 438 (15) : 960 - 966. doi: 10.1038/ nature04482960.

- [2] Diakowski W, Grzybek M, Sikorski AF. Protein 4.1, A component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4. 1/FERM superfamily[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2006, 44(4):231-248.
- [3] Hoeflich KP, Tsukita S, Hicks L, et al. Insights into a single rod-like helix in activated radixin required for membrane-cytoskeletal cross-linking[J]. Biochemistry, 2003, 42(40):11634-11641.
- [4] Neisch AL, Fehon RG. Ezrin, Radixin and Moesin: key regulators of membrane-cortex interactions and signaling[J]. Curr Opin Cell Biol, 2011,23(4):377-382. doi:10.1016/j.ceb.2011.04.011.
- [5] Valderrama F, Thevapala S, Ridley AJ. Radixin regulates cell migration and cell-cell adhesion through Rac1[J]. J Cell Sci, 2012, 125 (Pt 14): 3310-3319. doi:10.1242/jcs.094383.
- [6] Chen SD, Song MM, Zhong ZQ, et al. Knockdown of radixin by RNA interference suppresses the growth of human pancreatic cancer cells in vitro and in vivo[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13 (3): 753-759.
- [7] Adyshev DM, Moldobaeva NK, Elangovan VR, et al. Differential involvement of ezrin/radixin/moesin proteins in sphingosine 1phosphate-induced human pulmonary endothelial cell barrier enhancement[J]. Cell Signal, 2011, 23 (12) : 2086 - 2096. doi: 10. 1016/j. cellsig. 2011.08.003.
- [8] Koss M, Pfeiffer GR, Wang Y, et al. Ezrin/radixin/moesin proteins are phosphorylated by TNF-alpha and modulate permeability increases in human pulmonary microvascular endothelial cells[J]. J Immunol, 2006,176(2):1218-1227.
- [9] Guo XH, Wang LJ, Chen Bo, et al. ERM protein moesin is phosphorylated by advanced glycation end products and modulates endothelial permeability[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 97(2):238-246. doi:10.1152/ajpheart.00196.2009.
- Bartholow TL, Chandran UR, Becich MJ, et al. Immunohistochemical staining of radixin and moesin in prostatic adenocarcinoma [J/OL].
   BMC Clin Pathol, 2011, 11 : 1 [ 2015 04 17 ]. http://www.biomedcentral.com/1472-6890/11/1.doi:10.1186/1472-6890-11-1.
- [11] Yang X, Dong XG, Jia CK, et al. Profiling of genes associated with the murine model of oxygen induced retinopathy [J]. Mol Vis, 2013, 19(4): 775-788.
- [12] Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,1994,35(1): 101-111.
- [13] Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, et al. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis[J]. Q J Nucl Med, 2003, 47(3):149-161.
- [14] Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(8): 586-599. doi:10.1038/nrm882.
- [15] Hoeflich KP, Ikura M. Radixin: cytoskeletal adopter and signaling protein[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36 (11): 2131-2136. doi: 10.1016/j. biocel. 2003. 11.018.
- [16] Nam K, Oh S, Lee KM, et al. CD44 regulates cell proliferation, migration, and invasion via modulation of c-Src transcription in human breast cancer cells[J]. Cell Signal, 2015, 27(9):1882-1894. doi:10. 1016/j. cellsig. 2015.05.002.
- [17] Hausrat TJ, Muhia M, Gerrow K, et al, Radixin regulates synaptic GABAA receptor density and is essential for reversal learning and shortterm memory[J]. Nat Commun, 2015, 6 (4) : 6872. doi: 10.1038/ ncomms7872.
- [18] Amsellem V, Dryden NH, Martinelli R, et al. ICAM-2 regulates vascular permeability and N-cadherin localization through ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins and Rac-1 signalling[J/OL]. Cell Commun Signal, 2014,12:12[2015-04-19]. http://www.biosignaling.com/content/ 12/1/12. doi:10.1186/1478-811X-12-12.
- [19] Qin JJ, Wang JM, Du J, et al. Radixin knockdown by RNA interference suppresses human glioblastoma cell growth in vitro and in vivo[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(22):9805-9812.

(收稿日期:2015-06-11)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)