

脉络膜新生血管小鼠微小 RNA 对骨髓来源细胞表达基质金属蛋白酶的调控作用

吕洋 侯慧媛 王雨生

【摘要】 背景 基质金属蛋白酶-2(MMP-2)/MMP-13 在脉络膜新生血管(CNV)生成过程中发挥重要作用,但 CNV 原位细胞中 MMP-2/MMP-13 的表达有限。骨髓来源细胞(BMCs)参与 CNV 生成,可能是 CNV 中 MMP-2/MMP-13 的重要来源,而微小 RNA188-5p(miR188-5p)可能是调控 BMCs 表达 MMP-2/MMP-13 的关键节点。目的 探讨参与 CNV 生成的 BMCs 表达 MMP-2/MMP-13 的情况及 BMCs 表达的 MMP-2/MMP-13 是否受 miR188-5p 调控。方法 将表达绿色荧光蛋白(GFP)的转基因雌性小鼠的骨髓细胞移植到野生型雌性 C57BL/6J 小鼠以建立 C57BL/6J. GFP 嵌合体小鼠模型,流式细胞术检测嵌合度大于 85% 的 42 只小鼠纳入实验作为实验组,未进行骨髓细胞移植的野生型雌性 C57BL/6J 小鼠作为对照组。两组小鼠均以视网膜激光光凝法诱导 CNV,两个组分别于光凝前及光凝后第 1、3、5、7、10、14、28 天各取 3 只小鼠分离视网膜脉络膜组织,采用 ELISA 法检测小鼠视网膜脉络膜组织匀浆中 MMP-2/MMP-13 质量浓度的变化;采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测上述时间点小鼠视网膜脉络膜组织中 miR188-5p mRNA 的相对表达量变化;采用免疫荧光染色和原位杂交技术观察上述时间点小鼠 CNV 区 GFP 阳性细胞中 MMP-2/MMP-13 和 miR188-5p 的表达情况,并进行定量分析。结果 实验组 C57BL/6J. GFP 嵌合体模型小鼠外周血单核细胞中表达 GFP 细胞所占比例平均为(90.67±3.02)% ,符合实验要求。ELISA 检测显示,对照组与实验组小鼠视网膜脉络膜匀浆中 MMP-2/MMP-13 的表达趋势一致,总体比较差异均无统计学意义(MMP-2: $F=0.060, P=0.810$; MMP-13: $F=0.012, P=0.915$)。ELISA 和免疫荧光均显示在诱导 CNV 后 1 d,实验组和对照组 MMP-2 表达均快速增加,3 d 时表达量最高,实验组占总表达量的 64.21%,随后两组 MMP-2 表达均下降。两组 MMP-13 表达量在诱导 CNV 后 1 d 缓慢增加,7 d 时表达量最高,实验组占总表达量的 79.61%,随后 MMP-13 总体表达下降。靶基因预测结果可显示 MMP-2 和 MMP-13 的 3' 非编码区有 miR188-5p 的互补结合位点。RT-qPCR 和原位杂交检测结果均显示在诱导 CNV 后 1 d,视网膜脉络膜中 miR188-5p 表达量快速下降,7 d 时表达量最低。小鼠 CNV 区 BMCs 中 miR188-5p 的动态表达与 BMCs 中 MMP-13 的动态表达呈负相关($r=-0.868, P<0.05$);CNV 诱导后 5 d 内 BMCs 中 miR188-5p 的动态表达与 BMCs 中 MMP-2 的动态表达呈负相关($r=-0.997, P<0.05$)。结论 在激光诱导的小鼠 CNV 模型中,MMP-2/MMP-13 的表达随时间发生动态变化,BMCs 对其表达的迅速上调起主要作用。CNV 区 BMCs 中 miR188-5p 表达随时间变化的趋势与 MMP-13 相反,与在 CNV 形成早期 MMP-2 表达趋势相反。miR188-5p 的调控靶基因是 MMP-2/MMP-13,提示 BMCs 的 MMP-2/MMP-13 表达可能受 miR188-5p 调控。

【关键词】 脉络膜新生血管; 基质金属蛋白酶; 骨髓细胞; 微小 RNA

Regulation of microRNA to the expression of matrix metalloproteinases in bone marrow-derived cells in mice with choroidal neovascularization Lyu Yang, Hou Huiyuan, Wang Yusheng. Department of Ophthalmology, Eye Institute of Chinese PLA, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China
Corresponding author: Hou Huiyuan, Email: hhywyx@163.com

【Abstract】 **Background** Matrix metalloproteinases (MMPs) play important roles in the formation of choroidal neovascularization (CNV), but its main origin is not ocular cells in situ. Bone marrow-derived cells (BMCs) participate in the formation of CNV and is probably a primary source of expressing MMPs in CNV. MMP-2/MMP-13 is speculated to be the regulating target genes of miR188-5p. **Objective** This study was to verify whether BMCs are the main source of MMPs, and whether the MMP-2/MMP-13 expression is potentially regulated by miR188-5p. **Methods** BMCs expressed green fluorescent protein (GFP) from transgenic female C57BL/6J mice were transplanted to female wild-type C57BL/6J mice to establish C57BL/6J. GFP chimeras models, and 42 mice with

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.01.003

基金项目:国家自然科学基金项目(81200708、81070748、81200151);国家重点基础研究发展计划项目(2011CB510200);第四军医大学青年英才项目(2012-2014)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所

通信作者:侯慧媛,Email:hhywyx@163.com

chimerisms more than 85% by flow cytometry were included as the experimental group. Other 42 wild-type C57BL/6J mice without the BMCs transplantation were enrolled as the control group. CNV was induced by laser coagulation of retinas on the mice of both groups. MMP-2/MMP-13 levels in the retinoid tissue were quantified by ELISA at day 1, 3, 5, 7, 10, 14, and 28 after photocoagulation. The expression of miR188-5p mRNA in the retinoid tissue was assayed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). Immunofluorescence stain and fluorescent in situ hybridization were used to identify the MMP-2/MMP-13 and miR188-5p expressed by GFP-positive BMCs in CNV, and the expression level was quantified by images analysis. **Results** The proportion of GFP⁺ mouse mononuclear cells was (90.67±3.02)% in the C57BL/6J. GFP chimeras. The concentration changes of MMP-2/MMP-13 in retinoid tissue homogenate showed a same tendency with the lapse of time between the experimental group and the control group (MMP-2: $F=0.060$, $P=0.810$; MMP-13: $F=0.012$, $P=0.915$). The expression level was zoomed in retinoid tissue after induce of CNV with the maximal value on the third day in both groups, and the proportion in the experimental group was 64.21%; while the expression level of MMP-13 was slowly raised after induce of CNV with the peak at the seventh day, and the proportion in the experimental group was 79.61%. A complementary association point of miR188-5p was exhibited in the 3'-untranslated regions of MMP-2 or MMP-13 by target gene prediction. The expression level of miR188-5p mRNA in the BMCs of CNV area was sharply declined after induce of CNV with the lowest value on the seventh day. A negative correlation was found between the expressing level of miR188-5p and MMP-13 protein ($r=-0.868$, $P<0.05$) as well as early stage of expression level of MMP-2 protein ($r=-0.997$, $P<0.05$). **Conclusions** The elevation of MMP-2/MMP-13 expression levels is associated with the formation of CNV, and the regulation of miR188-5p expression in the BMCs of CNV area is responsible for increase of MMP-2/MMP-13 expression. The tendency of miR188-5p expression is inverses with MMP-2/MMP-13.

[Key words] Choroidal neovascularization; Matrix metalloproteinase; Bone marrow cell; MicroRNA

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是多种眼病的共同病理过程, 各种原因造成视网膜相对缺血缺氧, 诱导来自脉络膜的病理性新生血管长入视网膜内, 不但损伤正常脉络膜、视网膜结构, 且常发生出血、渗出, 是临床上导致严重进行性视力损失的主要原因之一^[1]。近期研究发现, 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 在 CNV 生成过程中参与细胞的移行过程, 主要是发挥降解细胞外基质的作用, 有利于新生血管的出芽, 同时有利于骨髓来源细胞 (bone marrow derived cells, BMCs) 的趋化, 参与新生血管的形成^[2]。CNV 原位细胞对 MMPs 的表达作用是有限的, 而研究表明 BMCs 参与 CNV 的生成^[3-6], 可能是 CNV 中 MMPs 的重要来源^[4,7]。我们前期的研究提示, miR188-5p 可能对 MMP-2/MMP-13 的表达起调控作用, 但相关机制尚未进一步探讨和验证。本研究构建嵌合体小鼠的 CNV 模型, 观察并探讨参与 CNV 生成的 BMCs 是否是 MMPs 的重要来源及 BMCs 表达的 MMP-2/MMP-13 是否受 miR188-5p 调控, 从而研究上述过程对 CNV 发展的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 兔抗小鼠 MMP-2/MMP-13 多克隆抗体、抗 MMP-2 抗体 (ab37150)、抗 MMP-13 抗体 (ab39012)、MMP-2 组织 ELISA 试剂盒 (美国 Abcam 公司); DyLight 594 标记的羊抗兔抗体 (E032220-01) (美国 Earth 公司); 生物素标记山羊抗兔抗体

(#31823) (美国 Neomarkers 公司); MMP-13 组织 ELISA 试剂盒、原位杂交试剂盒 (武汉博士德生物制品有限公司); 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司)。5804R 型离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

1.1.2 实验动物及分组 采用绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 雌性转基因小鼠作为骨髓移植的供体鼠, 6~8 周龄, 体质量 18~24 g (第四军医大学神经生物学教研室惠赠); 受体鼠为野生型雌性 C57BL/6J 小鼠, 6~8 周龄, 体质量 18~24 g (第四军医大学实验动物中心提供), 接受骨髓移植的 50 只 C57BL/6J. GFP 嵌合体小鼠为实验组, 未行骨髓移植的 48 只野生型 C57BL/6J 小鼠作为对照组。

1.2 方法

1.2.1 骨髓移植及嵌合度分析 50 只受体鼠接受 ⁶⁰Co 照射, 剂量为 8.0 Gy, 1.0 Gy/min。参照文献 [5] 的方法, ⁶⁰Co 照射后 12 h 内经鼠尾静脉注射制备的细胞悬液行骨髓移植, 注射量为 300 μl/只^[5]。移植后 28 d, 剪去小鼠尾静脉末端 1 mm, 取 40~60 μl 嵌合体小鼠尾静脉血于 5 ml 离心管中 (预置 7 μl 稀释肝素钠生理盐水); 加入 3 ml ACK, 混匀, 冰上静置 1 min 后, 置于离心机, 离心半径 10 cm, 4℃ 下 800 r/min 离心 5 min; 弃上清, 加入 3 ml ACK, 重复裂解; 弃上清, 加入流式液 2 ml, 重悬, 4℃ 下 800 r/min 离心 5 min; 弃上清, 加入 40 μl 流式液重悬细胞, 置于冰上待流式细胞分析仪检测。同时设立阴性对照血样, 为未经骨髓移植的 C57BL/6J 小鼠; 用流式细胞仪分析外周血样本

中 GFP 标记细胞在单核细胞中所占的比例^[8]。

1.2.2 视网膜激光凝法建立 CNV 模型 对照组小鼠 42 只与骨髓移植成功的实验组小鼠 42 只行视网膜激光凝,光波长为 532 nm,曝光时间为 0.1 s,光斑直径为 75 μm ,功率为 100 mW。参照文献[9]的方法,每眼 6~8 个激光斑,距视盘 1~1.5 个视盘直径。

1.2.3 ELISA 法检测视网膜和脉络膜中 MMP-2/MMP-13 蛋白的表达 实验组与对照组分别于光凝后第 1、3、5、7、10、14、28 天各取 3 只小鼠,分离小鼠视网膜及脉络膜组织,浸入 100 μl 含质量分数 0.05% 苯甲磺酰氟的 PBS 中速冻,冰上匀浆,匀浆液完成 3 个冻融循环,收集上清。依据 ELISA 试剂盒说明检测上清中 MMP-2/MMP-13 的表达量。

1.2.4 RT-qPCR 法检测小鼠 CNV 区 miR188-5p mRNA 的表达 分别于上述各时间点对照组取 3 只小鼠。人和动物 miR188-5p 片段长度均为 21 bp,其序列为 3'-CAUCCCUUGCAUGGUGGAGGG-5',根据其序列设计引物为 3'-TAGTTGCATGCTGGAGGGAAA-5'。依据 RT-qPCR 试剂盒说明检测小鼠视网膜及脉络膜组织中 miR188-5p mRNA 的表达 $C_{t_{\text{miR188-5p}}}/C_{t_{\text{U6}}}$ 。

1.2.5 免疫荧光化学染色观察小鼠视网膜和脉络膜中 MMP-2/MMP-13 蛋白的表达 分别于上述各时间点取实验组 3 只小鼠,小鼠视网膜和脉络膜标本在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下做垂直于视网膜的 8~10 μm 厚冰冻切片。切片干燥、封闭后与兔抗小鼠 MMP-2/MMP-13 多克隆抗体(1:200;1:300)在室温下孵育过夜;洗涤后滴加红色荧光标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1:300),室温下孵育 3 h,洗涤、封片后激光扫描共焦显微镜下观察并拍照。以 PBS 代替一抗作为空白对照,观察 CNV 中 GFP 阳性细胞表达的 MMP-2/MMP-13,在显微镜下 BMCs 标记显示为绿色荧光,MMP-2/MMP-13 显示为红色荧光,两者共聚焦部分显示为黄色荧光。采用 Image J 软件测量 BMCs 中表达 MMP-2/MMP-13 的黄色荧光面积和 CNV 部位表达 MMP-2/MMP-13 的红色荧光总面积(以像素为单位),计算并分析 CNV 中 MMP-2/MMP-13 的总表达量及其中 BMCs 的表达构成比,即 $C_{t_{\text{miR188-5p}}}/C_{t_{\beta\text{-actin}}}$ 。

1.2.6 原位杂交技术观察 miR188-5p 在 CNV 中的动态表达 冰冻切片制作过程同 1.2.5。依据原位杂交试剂盒说明检测。MiR188-5p(一般采用多聚赖氨酸或 APES 处理过的玻片)固定液为质量分数 4% 多聚甲醛/体积分数 0.1% PBS (pH 7.2~7.6),含有 1:1 000 DEPC,室温固定 20~30 min。蒸馏水充分洗涤,干燥后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻。水与纯甲醇 1:50 混合,室温处理

30 min。蒸馏水洗涤 3 次。切片上滴加质量分数 3% 枸橼酸稀释的胃蛋白酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 或室温消化 5~120 s。PBS 洗涤 3 次,蒸馏水洗涤 1 次。1% 多聚甲醛/0.1% PBS (pH 7.2~7.6) 室温固定 10 min。蒸馏水洗涤 3 次。每张片滴加 20 U(商品单位)预杂交液,恒温箱 38~42 $^{\circ}\text{C}$,2~4 h 后吸出多余的液体不洗。每张片滴加 20 U 预杂交液,恒温箱 38~42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜。次日取出后用 37 $^{\circ}\text{C}$ 左右水温的 SSC 洗涤。滴加封闭液 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min,甩去多余液体。滴加生物素化鼠抗地高辛,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 60 min 或室温下作用 120 min。原位杂交专用 PBS 洗涤 4 次。加抗生物素红色荧光标记的抗体(1:200),37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h。甩去多余液体,PBS 洗涤 2 遍。甘油封片后激光扫描共焦显微镜下观察并拍照。其拍照观察和分析方法同前。

1.2.7 靶基因预测 利用 miRNA 的靶基因预测软件 RNA22microRNA target detection (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22>) 检测可能调控 MMP-2 和 MMP-13 表达的 miRNA。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件(ISBN:9787560960944, 华中科技大学出版社)进行数据分析。本研究检测指标的数据资料经 W 检验呈正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间均数经 Levene 检验方差齐(均 $P>0.05$)。采用完全随机分组两水平实验设计,实验组与对照组间小鼠在不同时间点视网膜脉络膜中 MMP-2 和 MMP-13 mRNA 及蛋白表达的总体差异比较采用两因素方差分析;小鼠 CNV 区 BMCs 中 miR188-5p 表达变化与视网膜脉络膜中 MMP-2/MMP-13 蛋白表达的关系分析采用 Pearson 线性相关分析。采用双尾检测法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓移植后嵌合程度

骨髓移植后 4 周,嵌合度 $>85\%$ 者共有 48 只小鼠。将移植成功的小鼠纳入实验,其外周血单核细胞中表达 GFP 细胞所占比例为 $(90.67\pm 3.02)\%$,符合实验要求。

2.2 各组小鼠视网膜和脉络膜匀浆中 MMP-2/MMP-13 质量浓度

对照组和实验组小鼠视网膜和脉络膜中 MMP-2/MMP-13 总体表达趋势一致,组间差异均无统计学意义(MMP-2: $F=0.060$, $P=0.810$; MMP-13: $F=0.012$, $P=0.915$)。对照组和实验组均显示 MMP-2 在激光诱发前表达量最低,为 $(2\ 780.371\pm 185.218)$ pg/ml 和 $(2\ 696.512\pm 151.848)$ pg/ml,在诱发 CNV 后 1 d 快速增

加到 (3 813. 207 ± 114. 375) pg/ml 和 (3 759. 645 ± 119. 585) pg/ml, 到 CNV 3 d 时表达量最高, 为 (5 765. 056 ± 73. 952) pg/ml 和 (5 693. 572 ± 88. 330) pg/ml, 随后开始下降。CNV 后 5 d 为 (4 830. 434 ± 209. 099) pg/ml 和 (4 777. 178 ± 68. 685) pg/ml, CNV 后 7 d 为 (4 261. 634 ± 62. 968) pg/ml 和 (4 026. 429 ± 104. 231) pg/ml, CNV 后 10 d 为 (4 027. 848 ± 150. 237) pg/ml 和 (3 965. 345 ± 109. 380) pg/ml, CNV 后 14 d 为 (3 472. 017 ± 100. 274) pg/ml 和 (3 359. 987 ± 151. 330) pg/ml, CNV 后 28 d 为 (3 157. 485 ± 126. 114 5) pg/ml 和 (2 880. 636 ± 280. 197) pg/ml。MMP-13 在激光诱发前表达量最低, 为 (95. 064 ± 13. 492) pg/ml 和 (90. 881 ± 9. 205) pg/ml, CNV 后 1 d 缓慢增加到 (225. 673 ± 25. 177) pg/ml 和 (195. 068 ± 8. 909) pg/ml, 3 d 时增加到 (444. 450 ± 35. 858) pg/ml 和 (422. 686 ± 4. 621) pg/ml, 5 d 时增加到 (731. 017 ± 54. 225) pg/ml 和 (702. 299 ± 21. 655) pg/ml, CNV 后 7 d 表达量最高, 达到 (1 603. 885 ± 77. 781) pg/ml 和 (1 535. 267 ± 91. 478) pg/ml, 随后开始下降。CNV 后 10 d MMP-2 和 MMP-13 的质量浓度为 (457. 419 ± 39. 391) pg/ml 和 (417. 852 ± 8. 544) pg/ml, CNV 后 14 d 为 (337. 080 ± 11. 056) pg/ml 和 (340. 163 ± 11. 361) pg/ml, CNV 后 28 d 为 (102. 782 ± 4. 118) pg/ml 和 (82. 804 ± 3. 236) pg/ml (图 1)。

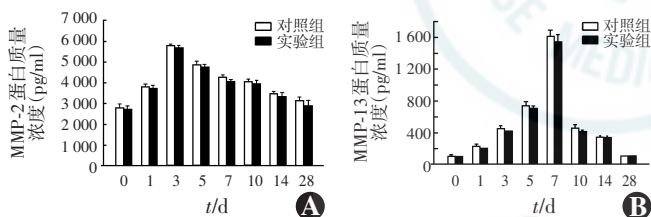


图 1 ELISA 法检测不同时间点小鼠视网膜脉络膜匀浆中 MMP-2/MMP-13 的质量浓度 A: CNV 诱导后不同时间点 MMP-2 的表达 $F_{\text{分组}} = 0.060, P = 0.810; F_{\text{时间}} = 180.938, P < 0.001$ (两因素方差分析, $n = 3$) B: CNV 诱导后不同时间点 MMP-13 的表达 $F_{\text{分组}} = 0.012, P = 0.915; F_{\text{时间}} = 838.652, P < 0.001$ (两因素方差分析, $n = 3$) MMP: 基质金属蛋白酶

2.3 小鼠视网膜脉络膜中 miR188-5p mRNA 的相对表达

CNV 模型诱导前后, 随着 CNV 诱导后时间的延长, 小鼠视网膜脉络膜中 miR188-5p mRNA 在激光诱发前相对表达量最高, 为 4.657 ± 0.387 , 随后出现先下降后上升的趋势。miR188-5p mRNA 在 CNV 诱导后 7 d 时相对表达量最低, 为 0.722 ± 0.090 。CNV 诱导后 1 d 时 miR188-5p mRNA 的相对表达量为 3.111 ± 0.237 , 诱导后 3 d 时为 1.607 ± 0.127 , 诱导后 5 d 时为 1.697 ± 0.350 , 诱导后 10 d 时为 1.027 ± 0.190 , 诱导后 14 d 时为 2.149 ± 0.248 , 而诱导后 28 d 时为 3.706 ± 0.396 (图 2)。

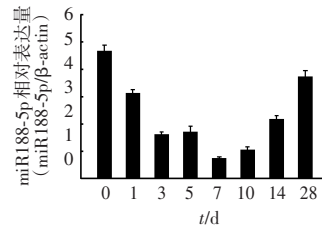


图 2 RT-qPCR 检测小鼠视网膜脉络膜中 miR188-5p mRNA 的相对表达 随着 CNV 诱导后天数的增加, miR188-5p mRNA 出现先下降后上升的趋势

2.4 CNV 模型组小鼠视网膜脉络膜组织中 MMPs 蛋白及 mRNA 相对表达的关系

CNV 诱导前及诱导后 28 d 内, 对照组和实验组小鼠视网膜脉络膜中 miR188-5p 的动态表达与 MMP-13 的动态表达均呈明显负相关 (对照组: $r = -0.740, P < 0.05$; 实验组: $r = -0.738, P < 0.05$); 造模前和造模后 5 d 内, 对照组和实验组小鼠视网膜脉络膜中 miR188-5p 的动态表达与 MMP-2 的动态表达均呈明显负相关 (对照组: $r = -0.957, P < 0.05$; 实验组: $r = -0.960, P < 0.05$) (图 3)。

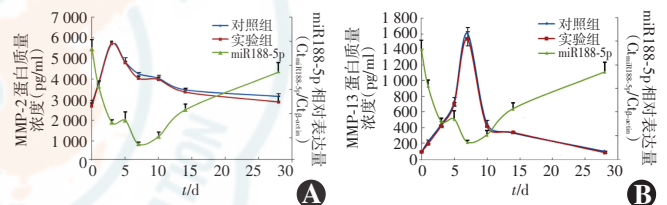


图 3 激光诱发前和激光诱发 CNV 后各时间点 MMPs/miR188-5p mRNA 表达的相关分析 A: CNV 诱导后不同时间点 MMP-2 与 miR188-5p mRNA 的表达 B: CNV 诱导后不同时间点 MMP-13 与 miR188-5p mRNA 的表达 MMP: 基质金属蛋白酶

2.5 靶基因预测

MMP-2 和 MMP-13 mRNA 的 3' 非编码区 (untranslated regions, UTR) 有 miR188-5p 的互补结合位点见图 4。

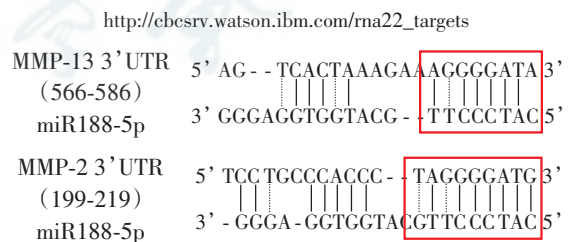


图 4 MiR188-5p 的互补结合位点 MMP: 基质金属蛋白酶

2.6 小鼠 CNV 区域 BMCs 中 MMP-2/MMP-13 及 miR188-5p 的表达

实验组免疫荧光图像显示, 激光光凝后, 表达 GFP 的 BMCs 在 CNV 区域富集, CNV 区域的本细胞可表达 MMP-2/MMP-13 及 miR188-5p (图 5)。BMCs 表达的 MMP-2 在诱发 CNV 后 1 d 就开始快速增加, 到 CNV 诱导后第 3 天时表达量达高峰, 占总表达量的 64.21%, 到 CNV 诱导后 5 d 时 MMP-2 的表达量占总

表达量的 56.22%，然后开始下降。BMCs 表达的 MMP-13 在 CNV 诱导后 1 d 缓慢增加，CNV 诱导后 3 d 时 MMP-13 的表达量占总表达量的 56.08%，CNV 诱导后 5 d 时 MMP-13 的表达量占总表达量的 68.14%，CNV 诱导后 7 d 时表达量达高峰，占总表达量的 79.61%，随后表达下降。BMCs 表达的 miR188-5p 在 CNV 诱导后 1 d 时表达量最高，占总表达量的 31.91%，随后开始快速下降，CNV 诱导后 7 d 时表达量降至最低，占总表达量的 7.43%，随后总量上升(图 6)。免疫荧光定位半定量分析得出 CNV 区域 BMCs 内 miR188-5p 的动态表达与 BMCs 内 MMP-13 的表达呈明显负相关($r = -0.868, P < 0.05$)；CNV 诱导后 5 d 内 BMCs 中 miR188-5p 的动态表达与 BMCs 中 MMP-2 的表达呈明显负相关($r = -0.997, P < 0.05$)(图 7)。对照组小鼠免疫荧光染色结果中未见绿色荧光，说明绿色荧光来自于供体鼠骨髓细胞。

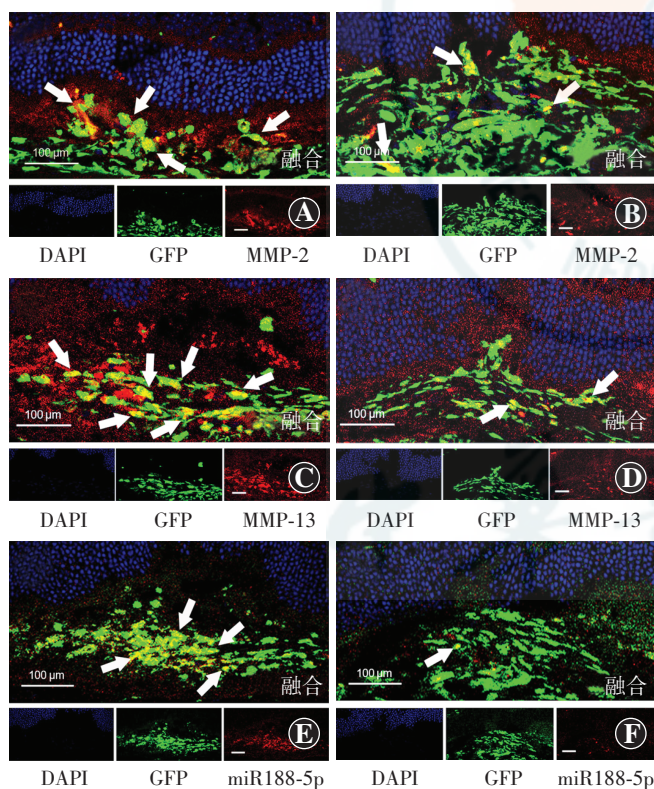


图 5 激光扫描共聚焦显微镜下小鼠 CNV 区域 BMCs 中 MMP-2、MMP-13 及 miR188-5p 的表达(标尺 = 100 μm) GFP 阳性的 BMCs 呈绿色荧光，MMP-2、MMP-13 及 miR188-5p 表达呈红色荧光，两者共表达区域(箭头)呈黄色荧光 A: CNV 诱导后 3 d MMP-2 与 GFP 阳性的 BMCs 的共表达定位 B: CNV 诱导后 7 d MMP-2 与 GFP 阳性的 BMCs 的共表达定位 C: CNV 诱导后 7 d MMP-13 与 GFP 阳性的 BMCs 的共表达定位 D: CNV 诱导后 28 d MMP-13 与 GFP 阳性的 BMCs 的共表达定位 E: CNV 诱导后 1 d miR188-5p 与 GFP 阳性的 BMCs 的共表达定位 F: CNV 诱导后 7 d miR188-5p 与 GFP 阳性的 BMCs 的共表达定位 GFP: 绿色荧光蛋白; MMP: 基质金属蛋白酶

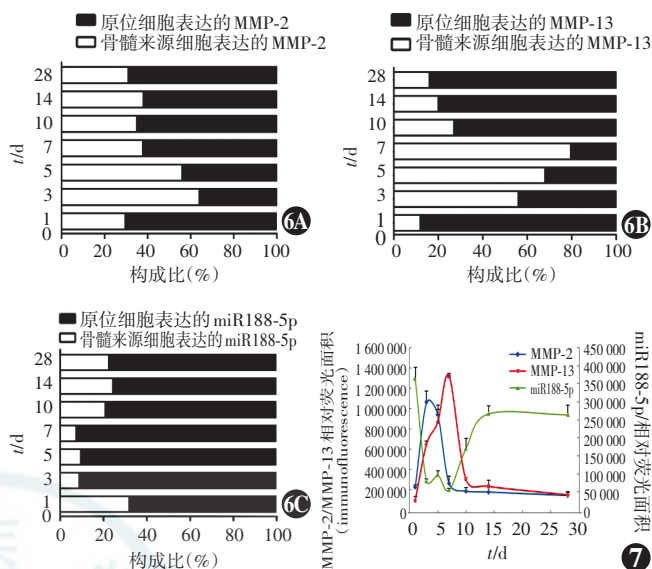


图 6 各时间点组小鼠 BMCs 内 MMP-2、MMP-13 及 miR188-5p 表达的构成比 A: CNV 诱导后各时间点小鼠视网膜脉络膜 MMP-2 的总表达量及 BMCs 的表达构成比 B: CNV 诱导后各时间点小鼠视网膜脉络膜 MMP-13 的总表达量及 BMCs 的表达构成比 C: CNV 诱导后各时间点中 miR188-5p 的总表达量 BMCs 的表达构成比 MMP: 基质金属蛋白酶 图 7 激光诱发 CNV 后各时间点骨髓来源细胞表达的 MMP-2/MMP-13 及 miR188-5p 在各个时间点的免疫荧光面积统计 (Pearson 线性相关分析) MMP: 基质金属蛋白酶

3 讨论

CNV 的发病机制尚未完全明确，近期研究表明，BMCs 不仅可以增生及分化为血管内皮细胞、血管平滑肌细胞等血管壁的构成成分，也可分泌促血管生成因子，参与 CNV 的生成过程^[10]。BMCs 可迅速而特异地向损伤诱导的 CNV 区域趋化，在 CNV 的起始期即可趋化至病变部位。了解 BMCs 在新生血管形成过程中的生物学行为为病理性新生血管的治疗提供了新的思路，即一方面可通过干预 BMCs 的行为控制血管的形成，另一方面也可将 BMCs 作为载体，将药物、药物激活物质等运输到需要治疗的新生血管部位，从而发挥靶向治疗作用^[4]。

MMPs 是 CNV 生成所必需的物质^[4,7]，可广泛降解血管基底膜和细胞外基质，是细胞的移行和出芽、BMCs 趋化的前提条件^[2]。本研究结果显示，在激光诱发 CNV 后，MMP-2/MMP-13 的表达随时间延长出现先上升后下降的动态变化，且 MMP-2 的表达升高较 MMP-13 更早。MMP-2 与 MMP-13 的表达上调可降解 CNV 基底膜和细胞外 I、III、IV、V 型胶原，为血管细胞的增生、移行、出芽创造条件，促进 CNV 病变在早期的快速进展。色素上皮衍生因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) 是 CNV 最强的内源性抑制因子，对手术取出的 CNV 膜样本检测发现，处于活动期的、

富含血管的 CNV 膜中 VEGF 和 PEDF 均呈高表达,而在静止的、纤维化的 CNV 膜中二者的表达均较弱^[11],动物实验中同样可看到类似现象^[12],提示 VEGF 表达上调是 CNV 病变发展的启动因素,在 VEGF 诱导 PEDF 上调这一反馈机制作用下, PEDF 浓度升高。PEDF 是 MMP-2 的底物, MMP-2 对 PEDF 的降解会促进 CNV 的形成和视网膜的损坏^[13]。本研究中观察到,激光光凝后早期 MMP-2 表达迅速上调,对于打破 VEGF 与 PEDF 之间的平衡,诱导新生血管的形成非常重要;而在后期, MMP-2 表达下调,对 PEDF 降解作用减弱, PEDF 促使血管膜发生纤维化。

激光诱导 CNV 后的 7 ~ 14 d 是 CNV 生长的高峰期^[14], BMCs 在 CNV 的早期就开始在 CNV 区聚集^[6],激光诱导 CNV 后 7 d BMCs 荧光强度最强^[3]。本研究结果表明, BMCs 表达的 MMP-13 也达峰值,为 MMP-13 总表达量的近 80%,这与 Lecomte 等^[7]的报道一致,提示 BMCs 对 CNV 生成过程中 MMP-13 的迅速上调起主要作用。同样,在 MMP-2 表达高峰期,大部分 MMP-2 来自 BMCs,说明 BMCs 对 MMP-2 的表达上调也起主要作用。由此推测, CNV 中的 BMCs 是 MMP-2/MMP-13 的重要来源, BMCs 借此调控 CNV 的发生和进展程度。

近年的研究发现, miRNA 通过调控目的蛋白的表达对血管稳态的维持和新生血管的形成发挥重要作用^[15]。Mishra 等^[16]研究证实, miR188-5p 可能通过调节 MMPs 的表达影响高半胱氨酸诱导的心脏组织重构,本研究组前期通过靶基因预测软件进行相关研究,发现 MMP-2 和 MMP-13 的 3' UTR 有 miR188-5p 的互补结合位点,推测 miR188-5p 的调控靶基因可能是 *MMP-2/MMP-13*。在本研究中,我们首先通过靶基因预测验证了 MMP-2 和 MMP-13 的 3' UTR 有 miR188-5p 的互补结合位点,继之发现 CNV 造模后 miR188-5p 表达量出现先下降后上升的动态变化,在 CNV 造模后 7 d, miR188-5p 总表达量和 BMCs 表达的 miR188-5p 量降至最低,随后开始增加,与 MMP-2/MMP-13 的表达趋势呈负相关,进一步提示 miR188-5p 对 MMP-2/MMP-13 表达的潜在调控关系。激光诱导 CNV 后 14 ~ 28 d, CNV 的生长已趋于稳定,这可能与后期 CNV 已经纤维化,病变活动已静止,各种细胞因子的分泌减少有关,提示 miR188-5p 通过影响 BMCs 中 MMPs 的表达,进而影响 CNV 的发生和发展。据此,我们推测, miR188-5p 和 MMP-2/MMP-13 的相关表达对于 CNV 的发展可能具有预后评估的价值,并可作为潜在的干预靶点,但有关 miR188-5p 在 CNV 中调控 MMP-2/MMP-13 表达的具体机制尚需进一步研究。

本研究发现 BMCs 是 MMP-2/MMP-13 的重要来源, miR188-5p 可能调控 BMCs 对 MMP-2/MMP-13 的表达,进而影响血管细胞的出芽、移行、凋亡及 CNV 纤维化。对 miR188-5p 调控 BMCs 参与 CNV 发生及发展的机制研究不仅是从 BMCs 和 miRNA 两个新的角度探索 CNV 的发病机制,而且还有可能找到一个新的、更高效的分子靶点,实现对 CNV 单一靶点的多角度治疗,从而为临床工作提供理论依据和新的思路。

参考文献

- [1] Li Caizi S, Neu MB, Shaw LC, et al. EPCs and pathological angiogenesis: when good cells go bad [J]. *Microvasc Res*, 2010, 79 (3): 207-216. doi: 10.1016/j.mvr.2010.02.011.
- [2] Hoffmann S, He S, Ehren M, et al. MMP2 and MMP9 secretion by RPE is stimulated by angiogenic molecules found in choroidal neovascular membranes [J]. *Retina*, 2006, 26 (4): 454-461.
- [3] Barnett JM, Penn JS, Jayagopal A. Imaging of endothelial progenitor cell subpopulations in angiogenesis using quantum dot nanocrystals [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1026: 45-56. doi: 10.1007/978-1-62703-468-5_4.
- [4] Hou HY, Liang HL, Wang YS. Bone marrow-derived cells in neovascular age-related macular degeneration; contribution and potential application [J]. *Ophthalmic Res*, 2011, 45 (1): 1-4. doi: 10.1159/000313983.
- [5] Hou HY, Wang YS, Xu JF, et al. The dynamic conduct of bone marrow-derived cells in the choroidal neovascularization microenvironment [J]. *Curr Eye Res*, 2006, 31 (12): 1051-1061. doi: 10.1080/02713680601100459.
- [6] Hou HY, Wang YS, Xu JF, et al. Nicotine promotes contribution of bone marrow-derived cells to experimental choroidal neovascularization in mice [J]. *Exp Eye Res*, 2008, 86 (6): 983-990. doi: 10.1016/j.exer.2008.03.018.
- [7] Lecomte J, Louis K, Detry B, et al. Bone marrow-derived mesenchymal cells and MMP13 contribute to experimental choroidal neovascularization [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68 (4): 677-686. doi: 10.1007/s00018-010-0476-6.
- [8] Espinosa-Heidmann DG, Caicedo A, Hernandez EP, et al. Bone marrow-derived progenitor cells contribute to experimental choroidal neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (11): 4914-4919. doi: 10.1167/iovs.03-0371.
- [9] 杨秀梅, 王雨生. 脉络膜新生血管的动物模型 [J]. *国际眼科纵览*, 2006, 30 (3): 166-170. doi: 10.3760/cma.j.issn.1673-5803.2006.03.007.
- [10] 侯慧媛, 王雨生, 徐建峰. 骨髓来源细胞在脉络膜新生血管中的作用 [J]. *中华眼底病杂志*, 2009, 25 (1): 30-33.
- [11] Matsuoka M, Ogata N, Otsuji T, et al. Expression of pigment epithelium derived factor and vascular endothelial growth factor in choroidal neovascular membranes and polypoidal choroidal vasculopathy [J]. *Br J Ophthalmol*, 2004, 88 (6): 809-815. doi: 10.1136/bjo.2003.032466.
- [12] Tong JP, Yao YF. Contribution of VEGF and PEDF to choroidal angiogenesis: a need for balanced expressions [J]. *Clin Biochem*, 2006, 39 (3): 267-276. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2005.11.013.
- [13] Chung C, Shugrue C, Nagar A, et al. Ethanol exposure depletes hepatic pigment epithelium-derived factor, a novel lipid regulator [J]. *Gastroenterology*, 2009, 136 (1): 331-340. doi: 10.1053/j.gastro.2008.09.065.
- [14] Hou HY, Liang HL, Wang YS, et al. A therapeutic strategy for choroidal neovascularization based on recruitment of mesenchymal stem cells to the sites of lesions [J]. *Mol Ther*, 2010, 18 (10): 1837-1845. doi: 10.1038/mt.2010.144.
- [15] Lim LP, Glasner ME, Yekta S, et al. Vertebrate microRNA genes [J]. *Science*, 2003, 299 (5612): 1540. doi: 10.1126/science.1080372.
- [16] Mishra PK, Tyagi N, Kundu S, et al. MicroRNAs are involved in homocysteine-induced cardiac remodeling [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2009, 55 (3): 153-162. doi: 10.1007/s12013-009-9063-6.

(收稿日期: 2014-06-20)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)