

EGFR 反义寡核苷酸对人视网膜神经胶质细胞迁移的影响

严浩¹, 邱庆华², 王艳丽¹

作者单位:¹(518052)中国广东省深圳市,广东医学院附属深圳南山医院眼科;²(200080)中国上海市,上海交通大学附属第一人民医院眼科

作者简介:严浩,男,博士,副主任医师,副教授,研究方向:眼表疾病及眼底病。

通讯作者:邱庆华,男,博士后,副主任医师,副教授,硕士研究生导师,研究方向:眼底病. qiuqh9@163.com

收稿日期:2010-05-19 修回日期:2010-07-01

Effect of EGFR antisense oligonucleotide on migration of retinal glial cells *in vitro*

Hao Yan¹, Qing-Hua Qiu², Yan-Li Wang¹

¹Department of Ophthalmology, the Nanshan Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen 518052, Guangdong Province, China;

²Department of Ophthalmology, the Affiliated First People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China

Corresponding to: Qing-Hua Qiu. Department of Ophthalmology, the Affiliated First People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China. qiuqh9@163.com

Received:2010-05-19 Accepted:2010-07-01

Abstract

• **AIM:** To observe the effect of antisense oligonucleotide (ASODN) hybridized epidermal growth factor receptor (EGFR) on migration of human retinal glial (RG) cells.

• **METHODS:** Human RG cells were cultured *in vitro*. Modified EGFR ASODN was transfected into RG cells by lipofectin. By using an *in vitro* wound healing model in which a small area of a confluent monolayer of RPE cells was denuded, migration was measured by the number of cells that had entered the denuded area.

• **RESULTS:** The cell migration was inhibited effectively by ASODN with lipofectin at 63.27%. The missense oligonucleotides showed no such effect ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** EGFR ASODN can inhibit the migration of RG cells.

• **KEYWORDS:** retinal glial cell; epidermal growth factor receptor; antisense oligonucleotide; lipofectin; migration

Yan H, Qiu QH, Wang YL. Effect of EGFR antisense oligonucleotide on migration of retinal glial cells *in vitro*. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(8):1488-1489

摘要

目的:观察表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASODN)对人视网膜神经胶质(retinal glial, RG)细胞迁移的影响。

方法:人视网膜神经胶质细胞的原代培养,用脂质体(Lipofectin)作为载体将修饰型EGFR ASODN转染RG细胞后,采用Murphy细胞计数方法评价反义寡核苷酸对人RPE细胞体外迁移的影响。

结果:脂质体介导EGFR反义寡核苷酸组与对照组比较,细胞迁移活性受到明显抑制($P < 0.05$),转染24h后抑制率63.27%。

结论:EGFR ASODN能够抑制人RG细胞迁移。

关键词:视网膜神经胶质细胞;表皮生长因子受体;反义寡核苷酸;脂质体;细胞迁移

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.08.011

严浩,邱庆华,王艳丽. EGFR反义寡核苷酸对人视网膜神经胶质细胞迁移的影响. 国际眼科杂志 2010;10(8):1488-1489

0 引言

视网膜胶质(retinal glial, RG)细胞在维持视网膜正常的代谢和功能中起了重要的作用,同时也参与多种病理过程, RG细胞在一些因素的启动下,迁移到玻璃体腔或视网膜表面,增生、形成增生膜并收缩导致一系列病变,在增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)、增生性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic, PDR)和特发性黄斑表面膜等病变中起重要作用。许多生长因子及其受体和RG细胞的迁移有关,其中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在RG细胞迁移的过程中起重要作用。我们使用EGFR反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASODN)导入RG细胞,研究其对RG细胞体外迁移的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 人眼取自正常人猝死尸体,清除球周组织,用1:5 000 氧氰化汞浸泡30min, Hanks液冲洗,沿赤道部剪开眼球,弃去眼球前段晶状体、玻璃体等。在体视显微镜下将视网膜神经上皮层自切口处轻轻提起, Hanks液冲洗,置入2.5g/L胰蛋白酶消化60min, 800r/min离心10min,去上清液后再加入500U/L的IV型胶原酶消化60min,滤网(100 μ m)过滤,滤液800r/min离心10min,吸去上清液后将细胞接种于DMEM/F₁₂(Gibco公司)的混合培养液瓶中,内含100mL/L的胎牛血清(Gibco公司), 100 \times 10³ U/L青、链霉素(Gibco公司),置于950mL/L O₂, 50mL/L CO₂, 37 $^{\circ}$ C培养箱内培养。于24h和48h用吸管吹打,可使视细胞、节细胞和红细胞悬浮,经换液去除得到单一的贴壁细胞。用2.5g/L胰蛋白酶(Gibco公司)消化传代,实验用第3代细胞。

1.2 寡核苷酸的合成 EGFR ASODN的合成采用针对人EGFR基因cDNA的上游部位(包含起始密码子)的21个碱基互补序列。序列如下:5'-GGC CGT CCC GGA GGG TCGCAT-3'。另设与人EGFR基因cDNA无互补性的一段ODN作为毒性对照,序列如下:5'-GGC CTC GGA TCC TGCTTT GCA-3'。OND两端各3个碱基硫代磷酸化修饰(上海生工生物工程公司在DNA自动合成仪上合成)。22 μ m微孔滤膜过滤除菌,60mmol/L贮存液-20 $^{\circ}$ C贮存备用,使用前冰上融解。

1.3 寡核苷酸的准备 用脂质体(Lipofectin, Gibco公司)作为载体,在2个无菌EP管中分别将2 μ g ASODN和10 μ L Lipofectin稀释于100 μ L不含血清及青、链霉素的

DEMEM/F₁₂中,室温下放置 45min,轻轻混匀上述溶液,室温下孵育 15min。然后在 Lipofectin-ASODN 复合液 EP 管中加 0.8mL 无血清及抗生素的 DEMEM/F₁₂,轻轻混匀后立即用于转染。

1.4 寡核苷酸处理细胞 以 100 × 10³ 个/L 细胞接种于 6 孔板上,每孔 1mL。37℃,50mL/L CO₂条件下培养至细胞 50% 汇合(约需 4~6h)。在 2 个无菌 EP 管中准备下述溶液:(1)溶液 A:每次转染,将 2μg ASODN 稀释于 100μL 不含血清及青、链霉素的 DEMEM/F₁₂中;(2)溶液 B:每次转染,将 10μL Lipofectin 稀释于 100μL 不含血清及青、链霉素 DEMEM/F₁₂中。将 A、B 液室温下放置 45min,轻轻混匀上述溶液,室温下孵育 15min。将 6 孔板中的细胞用 2mL 不含血清及抗生素的 DEMEM/F₁₂洗 2 次,然后在 Lipofectin-ASODN 复合液 EP 管中加 0.8mL 无血清及抗生素的 DEMEM/F₁₂,轻轻混匀后将复合物铺于细胞上。37℃,50mL/L CO₂条件下培养。

1.5 细胞迁移实验和分组 分组为对照组、错义寡核苷酸组和反义寡核苷酸组。对照组加等体积含 100mL/L 胎牛血清的 DEMEM/F₁₂,错义寡核苷酸组和反义寡核苷酸组分别加入错义和反义 ODN 复合液处理细胞。细胞迁移试验参照文献[1]的方法。培养瓶底部涂鼠尾胶原,培养箱中晾干。接种培养细胞,待细胞生长融合后,如上法用寡核苷酸处理细胞,6h 后用细玻璃棒紧贴培养瓶底壁,在细胞层中划线,换液 2 次去除漂浮的细胞,然后加入含 100mL/L 胎牛血清的 DEMEM/F₁₂ (Gibco),此时计为 0 点。在相差显微镜下,可见一条无细胞的裸露区。实验组与对照组同置入培养箱中继续培养,观察 24 h 裸露区两边细胞移行情况,用目镜网格器对移行至裸露区的细胞计数,实验重复 3 次。细胞迁移的抑制率 = [(对照组-实验组)/对照组] × 100%。

1.6 酶联免疫吸附法检测 RPE 细胞的 EGFR 蛋白表达 使用 EGF-R ELISA KIT 试剂盒 (ONCO-GENE),实验步骤按说明书进行。

统计学分析:全部数据输入计算机,以 SPSS 10.5 for Windows 统计软件包处理,采用 One-Way ANOVA 方法。以 $P < 0.05$ 为统计学意义。

2 结果

2.1 培养细胞 培养的 RG 细胞呈不规则或三角形,胞核多呈椭圆形,位于中央,免疫组化染色 GFAP 和 S-100 阳性,符合 RG 细胞的特点。

2.2 EGFR ASODN 对细胞迁移的影响结果: (1)对照组:划线后 6h,裸露区已有明显的细胞出现,24h 后裸露区移行的细胞数为 118.17 ± 15.21; (2)错义 ODN 对照组:划线后 24h 的裸露区移行的细胞数为 107.23 ± 16.12,与对照组差异无显著性; (3)反义 ODN 实验组 24h 的裸露区移行的细胞数为 43.40 ± 9.25,与对照组差异有显著性 ($P = 0.007$);细胞迁移的抑制率在 24h 为 63.27%。

2.3 细胞 EGFR 蛋白表达 转染 24h 后对照组、错义 ODN 组和 ASODN 组的 RG 细胞 EGFR 表达(浓度 fm/mL)分别为:256.17,235.29 和 107.37,ASODNS 对 RG 细胞 EGFR 表达有抑制作用,差异有显著性意义, $P = 0.003$,抑制率为 58.09%,而错义 ODN 对照组没有抑制作用。转染 48h 后各组表达没有差异。

3 讨论

RG 细胞从原来的位置迁移到视网膜表面或者玻璃体腔,过度增生,产生增生膜并收缩,是导致增生性玻璃体视网膜病变(PVR)、黄斑表面膜、黄斑裂孔等疾病的重要原因。其中 PVR 是视网膜脱离手术失败的重要原因之一,

也是目前治疗的难点和重点。细胞的过度增生是 PVR 形成的最主要原因之一,参与 PVR 形成的细胞有 RG 细胞、视网膜色素上皮细胞、成纤维细胞和巨噬细胞等,其中 RG 和 RPE 细胞是 PVR 的主要细胞,有研究发现 RG 细胞是成熟视网膜前膜的最重要的细胞成分^[2-4]。RG 细胞在硅油填充术后的患者视网膜表面明显表达上调,RG 细胞内容的表达也明显表达增加,说明 RG 细胞在硅油眼的增生性病变中也扮演了重要的角色^[5]。在玻璃体切除手术中取的内界膜标本上也可以检测出神经胶质细胞的残留物如足板等^[6]。细胞因子具有多种生物学功能,它与相应的受体结合而发挥作用。细胞因子与 RG 细胞相应的受体结合会促进 RG 细胞的迁移,导致或促进异常的细胞增生性病变。EGF 通过与细胞表面的 EGFR 特异性结合而激活受体的酪氨酸酶活性,促进细胞生长。培养的 RG 细胞能释放 EGF 和表达 EGFR。PVR 患者玻璃体中、视网膜前膜、视网膜下膜等生长因子表达增加,细胞膜上生长因子受体表达也增多。PVR 患者玻璃体中 EGF 含量明显高于正常玻璃体及视网膜下液的含量,表明 EGF 和 EGFR 在 RG 细胞参与 PVR 等的形成和发展中起重要作用^[7-9]。有研究显示 EGFR 和许多肿瘤细胞的迁移、侵袭和扩散有关。MMP2 是基质金属蛋白酶家族中的明胶酶,是人体内降解 IV 型胶原和细胞外基质的主要酶,与肿瘤的扩散、转移和侵袭密切相关。EGFR 可通过 Ras/MAPK 途径磷酸化转录因子 ER81,活化的 ER81 则直接与 MMP-2 启动子区结合而促进其转录,从而启动 MMP2 的表达,促使肿瘤细胞的扩散和侵袭^[10]。根据以上理论,我们设计 EGFR ASODN,并用脂质体作为载体转染 EGFR ASODN 于 RG 细胞内,结果表明,EGFR ASODN 能有效的抑制人 RG 细胞的 EGFR 的表达,同时可以有效地抑制 RG 细胞的迁移,从而阻断了细胞增生性病变的第一步反应,对利用 ASODN 技术针对 RG 细胞有关的增生性等疾病的基因治疗提供了参考。

参考文献

- 1 Ma LN, Hui YN, Wang YS, et al. Inhibition of migration but stimulation of proliferation of human retinal pigment epithelial cells cultured with uniform vesicles of silicone oil. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010; 248(4):503-510
- 2 Bringmann A, Wiedemann P. Involvement of Müller glial cells in epiretinal membrane formation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247(7):865-883
- 3 Charteris DG, Downie J, Aylward GW, et al. Intraretinal and periretinal pathology in anterior proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245(1):93-100
- 4 Hollborn M, Krause C, Iandiev I, et al. Glial cell expression of hepatocyte growth factor in vitreoretinal proliferative disease. *Lab Invest* 2004;84(8):963-972
- 5 Wickham LJ, Asaria RH, Alexander R, et al. Immunopathology of intraocular silicone oil: retina and epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol* 2007;91(2):258-262
- 6 La Heij EC, Dieudonn SC, Mooy CM, et al. Immunohistochemical analysis of the internal limiting membrane peeled with intracyanine green. *Am J Ophthalmol* 2005;140(6):1123-1125
- 7 Chen Z, Chen CZ, Gong WR, et al. Integrin-alpha5 mediates epidermal growth factor-induced retinal pigment epithelial cell proliferation and migration. *Pathobiology* 2010;77(2):88-95
- 8 Yan F, Hui YN, Li YJ, et al. Epidermal growth factor receptor in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmologica* 2007;221(4):244-250
- 9 Charteris DG. Growth factors in proliferative vitreoretinopathy. *Br J Ophthalmol* 1998;82(2):106
- 10 樊平, 邹赛英, 赵海华. EGFR 在胃癌中的研究进展. 现代生物医学进展 2009;9(14):2773-2775