

CCR7 和 VEGF 在缺氧时视网膜血管内皮细胞中的表达及意义

底煜,陈晓隆,王爱媛

基金项目:辽宁省科技计划项目基金资助(No. 2010225034);辽宁省自然科学基金资助(No. 20102281)

作者单位:(110004)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学附属盛京医院眼科

作者简介:底煜,毕业于中国医科大学,博士,讲师,研究方向:眼底病、眼外伤。

通讯作者:陈晓隆,教授,博士,研究方向:眼底病、眼外伤. chenxl@sj-hospital.org

收稿日期:2014-11-13 修回日期:2015-03-04

Expression and significance of CCR7 and VEGF in retinal endothelial cell under hypoxia

Yu Di, Xiao-Long Chen, Ai-Yuan Wang

Foundation items: Science and Technology Foundation of Liaoning Province (No. 2010225034); Natural Science Foundation of Liaoning Province (No. 20102281)

Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xiao-Long Chen. Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. chenxl@sj-hospital.org

Received:2014-11-13 Accepted:2015-03-04

Abstract

• **AIM:** To explore the expression and significance of CC chemokine receptor7 (CCR7) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in retinal endothelial cell (REC) under hypoxia.

• **METHODS:** Rhesus choroid-retinal vascular endothelial cells (RF/6A) were cultured under normoxic and hypoxic conditions *in vitro* and divided into the normoxia group, the hypoxia control group (transiently transfected with the vector plasmid) and the treated group (transiently transfected with the CCR7siRNA recombinant plasmid). Plasmids were transiently transfected in RF/6A cells using Lipofectamine™ 2000 (LF2000). RF/6A cells proliferation and apoptosis detected by CCK8 and flow cytometry and the protein and mRNA expression of CCR7 and VEGF were measured by Western blot and RT-PCR.

• **RESULTS:** The cell growth rate became slower and apoptosis rate became increased in the hypoxia group than that in the normoxia group, and in the treated group than that in the normoxia and hypoxia control groups (all $P < 0.05$). Compared with the normoxia group, there were high protein and mRNA expression of CCR7 and VEGF in the hypoxia control group, the differences had statistical significance ($t_{\text{CCR7protein}} = 3.38$, $t_{\text{VEGFprotein}} = 4.75$, $t_{\text{CCR7mRNA}} =$

4.27, $t_{\text{VEGFmRNA}} = 5.34$, all $P < 0.05$). And there was an obvious positive correlation between the expression of CCR7 and VEGF ($r_{\text{protein}} = 0.71$, $r_{\text{mRNA}} = 0.83$, all $P < 0.05$). The protein and mRNA expression of CCR7 and VEGF were obviously decreased in the treated group compared with the normoxia and hypoxia control groups (all $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** CCR7 can upregulate the expression of VEGF in REC under hypoxia. CCR7-VEGF signaling pathway may have potential function in the retinal neovascularization (RNV), and CCR7siRNA may provide an effective method for RNV.

• **KEYWORDS:** CC chemokine receptor7; vascular endothelial growth factor; retinal neovascularization; rhesus choroid-retinal vascular endothelial cells

Citation: Di Y, Chen XL, Wang AY. Expression and significance of CCR7 and VEGF in retinal endothelial cell under hypoxia. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(3):403-406

摘要

目的: 探讨 CC 族趋化因子受体 7 (CC chemokine receptor7, CCR7) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在缺氧状态下视网膜血管内皮细胞 (retinal endothelial cell, REC) 中的表达及意义。

方法: 恒河猴脉络膜-视网膜内皮细胞 (RF/6A) 分别在常氧和低氧环境中培养, 分为正常对照组、低氧对照组和治疗组。低氧对照组和治疗组分别采用脂质体 Lipofectamine™ 2000 (LF2000) 介导转染空载体质粒和 CCR7siRNA 表达质粒。CCK8 法检测细胞增殖情况; 流式细胞术检测细胞凋亡情况; Western blot 和 RT-PCR 法检测三组 RF/6A 内 CCR7、VEGF 蛋白及 mRNA 的表达情况。

结果: 低氧对照组较正常对照组比较及治疗组较正常对照组和低氧对照组比较细胞生长速度明显减慢, 增殖能力减弱, 细胞凋亡率显著增加 (均为 $P < 0.05$); 低氧对照组与正常对照组比较, RF/6A 内 CCR7、VEGF 蛋白及 mRNA 表达显著增高, 均有统计学意义 ($t_{\text{CCR7蛋白}} = 3.38$, $t_{\text{VEGF蛋白}} = 4.75$, $t_{\text{CCR7mRNA}} = 4.27$, $t_{\text{VEGFmRNA}} = 5.34$, 均为 $P < 0.05$), 且二者表达呈正相关 ($r_{\text{蛋白}} = 0.71$, $r_{\text{mRNA}} = 0.83$, 均为 $P < 0.05$)。治疗组 CCR7 和 VEGF 的蛋白及 mRNA 表达较正常对照组和低氧对照组明显下降 (均为 $P < 0.05$)。

结论: 缺氧时 REC 中 CCR7 可上调 VEGF 的表达, CCR7-VEGF 信号途径在视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 形成的过程中可能具有潜在功能, CCR7siRNA 有望成为防治 RNV 的一种有效方法。

关键词: CC 族趋化因子受体 7; 血管内皮生长因子; 视网膜新生血管; 恒河猴脉络膜-视网膜内皮细胞

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.3.06

引用:底煜,陈晓隆,王爱媛. CCR7 和 VEGF 在缺氧时视网膜血管内皮细胞中的表达及意义. 国际眼科杂志 2015;15(3):403-406

0 引言

视网膜新生血管性疾病,如早产儿视网膜病变、增殖型糖尿病视网膜病变、缺血性视网膜静脉阻塞以及 Eale's 病等是主要的致盲性眼病,已引起眼科界的广泛认识,其致盲的病理机制关键在于视网膜新生血管(retinal neovascularization, RNV)的形成^[1]。RNV 的形成的始发因素主要和内皮细胞的损伤有关^[2]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是血管内皮细胞的特异性有丝分裂原,能使血管内皮细胞变形、移动、分裂增殖;能增加血管的通透性,对 RNV 形成具有重要作用^[3]。近年来,趋化因子受体成员之一 CC 族趋化因子受体 7(CC chemokine receptor 7, CCR7)日益引起研究者的关注。研究表明 CCR7 在肿瘤周围的血管内皮中有表达^[4-5],进而猜测 CCR7 可能在血管形成中发挥重要作用。有研究发现 CCR7 可通过 p-ERK 信号通路上调非小细胞肺癌细胞中 VEGF 表达,从而促进肿瘤血管形成^[6]。因此,我们推测类似的分子机制也可能发生在 RNV 的形成过程中。本实验选用恒河猴脉络膜-视网膜内皮细胞(rhesus choroid-retinal vascular endothelial cells, RF/6A)作为观察对象,通过 CCR7siRNA 转染 RF/6A,研究 CCR7、VEGF 蛋白及 mRNA 在缺氧状态下 REC 中的表达情况,探讨 CCR7-VEGF 信号通路在 RNV 的作用,为预防和治疗视网膜新生血管性疾病提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 恒河猴脉络膜-视网膜内皮细胞 RF/6A 来源于中国科学院细胞库。RPMI-1640 培养液(美国 Gibco 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);CCK-8 试剂盒(美国 Beyotime 公司);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(美国 KeyGEN 公司);LipofectamineTM2000(美国 Invitrogen 公司);CCR7siRNA 质粒(上海 GenePharma 公司合成:正义链 5'-TCG AGA AAA AAG CTG GTC GT-3',反义链 5'-TCT CTT GAA ATA GGT CAA CAC GA-3');兔抗人 CCN1 多克隆抗体(英国 Abcam 公司);羊抗人 CCR7 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);兔抗人 VEGF 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 生物工程有限公司);CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司);细胞培养板、细胞培养瓶(美国 Corning 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组 RF/6A 细胞培养于含 10% 胎牛血清和 100U/mL 双抗(青霉素/链霉素)的 RPMI-1640 培养液中。常规在 37℃、5% CO₂、20% O₂ 环境中培养至 70%~80% 融合时,用 0.25% 胰酶消化传代继续培养。当细胞进入对数生长期后,更换新鲜培养液,将细胞分别置于常氧(正常对照组)和低氧环境中(1% O₂、5% CO₂ 和 94% N₂ 混合气体)培养。低氧环境细胞又分为低氧对照组和治疗组,两组分别以脂质体 LipofectamineTM2000(LF2000)介导转染空载体质粒和 CCR7siRNA 重组质粒(500ng/μL)。细胞转染后继续在低氧环境下培养 24h 后取样进行后续实验。转染 6h 后倒置相差荧光显微镜下观察转染效率。

1.2.2 CCK8 法检测细胞增殖反应 将三组细胞接种于 96 孔板配置 100μL 的细胞悬液,置于 CO₂ 的培养箱中,37℃ 培养过夜。分别在接种后 0,24,48,72,96h 各取一块培养板采用 Cell Counting Kit-8 法检测细胞活性相对数目;用全自动酶标仪检测各孔 A450nm 的吸光光度值(OD 值)。以时间为横轴,OD 值为纵轴绘制细胞生长曲线。

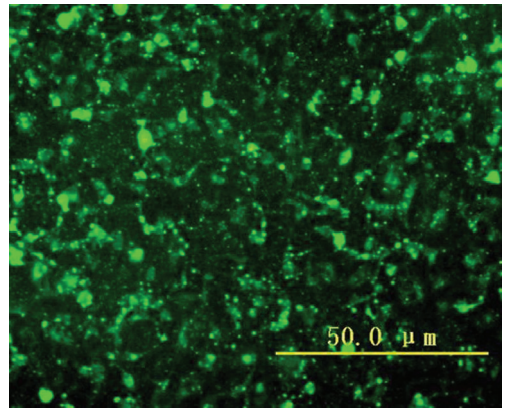


图 1 倒置相差荧光显微镜下观察,可见 siRNA 成功转染至细胞中,转染效率>80%。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 将三组悬浮细胞离心(2000r/min 5min)收集;磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered solution, PBS)洗涤,加入 5μL Annexin V-FITC 及 5μL 的碘化丙啶(Propidium Iodide, PI),混匀置冰浴暗处温育 10min,流式细胞仪进行分析,每份样品检测 1×10⁴ 个细胞,应用 cell QUEST 软件分析结果。

1.2.4 Western blot 检测蛋白的表达 收集细胞提取总蛋白,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和转印,一抗(anti-CCR7 1:200 稀释,anti-VEGF 1:300 稀释)4℃ 孵育过夜,各自对应二抗(1:3000 稀释)37℃ 孵育 2h,然后进行化学发光、显影和定影。采用 β-actin 作为内参照。结果用 Chemi Imager 5500 V2.03 图像分析系统进行扫描,Fluor Chen 2.0 软件进行整合光密度(IDV)分析。目的蛋白的相对表达量为目的蛋白条带灰度值/β-actin 条带灰度值。抑制效率=(低氧对照组蛋白相对表达量-治疗组蛋白相对表达量)/低氧对照组蛋白相对表达量×100%。

1.2.5 RT-PCR 检测 mRNA 的表达 收集三组细胞,按照试剂盒说明书用 Trizol 提取总 RNA。CCR7 的引物序列:F:5'-GAGGCTATTGTCCTCCCTAAACC-3',R:5'-TGGA GGACAGTGAAGAAAACG-3',扩增产物为 304bp;VEGF 的引物序列:F:5'-TCAGCATCCCATCGGTCCACTAG-3';R:5'-CAACAGCCACCACATCGGAACAC-3',扩增产物为 215bp;β-actin 为内参照,引物序列:F:5'-GAGAGGGAAATC GTGCCGTGA-3';R:5'-GCCTAGAAGCATTTCGCGTG-3',扩增产物为 518bp。PCR 反应条件:预热 94℃ 5min,94℃ 40s,55℃ 40s,72℃ 40s,72℃ 5min。CCR7、VEGF mRNA 的相对表达量为实验组目的基因表达量是对照组的倍数,即 2^{-ΔΔct} 值,而 ΔΔct=(ct 实验组目的基因-ct 实验组内参)-(ct 对照组目的基因-ct 对照组内参)。抑制效率=(低氧对照组 mRNA 相对表达量-治疗组 mRNA 相对表达量)/低氧对照组 mRNA 相对表达量×100%。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析。所有数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 Dunnett-t 检验,细胞增殖实验结果比较采用两因素方差分析,CCR7 和 VEGF 蛋白及 mRNA 的相关性采用 Pearson 相关分析。以 a=0.05 为水准,P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率的检测 用 LipofectamineTM2000 转染体外合成的 siRNA NC(用 FAM 荧光标记),能顺利进入 RF/6A,说明 siRNA 成功转染至细胞中。转染 6h 后倒置相差荧光显微镜下观察转染效率>80%(图 1)。

表1 各组不同时间吸光度值(A_{450nm})的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	时间				
	0d	24d	48d	72d	96d
正常对照组	0.296±0.001	0.618±0.001	0.886±0.002	0.988±0.001	1.161±0.003
低氧对照组	0.293±0.002	0.495±0.001	0.628±0.004	0.741±0.002	0.855±0.002
治疗组	0.291±0.001	0.387±0.001	0.413±0.002	0.582±0.003	0.615±0.002

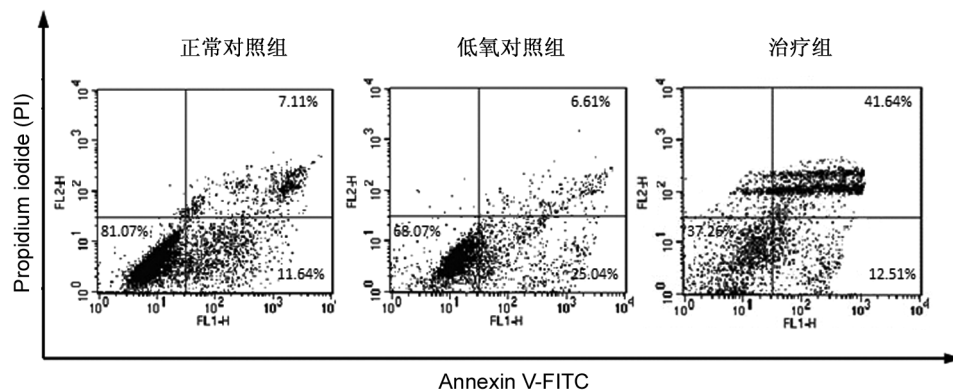


图2 Annexin V/PI 双染法检测各组细胞的凋亡。

2.2 细胞增殖实验分析结果 随着体外培养时间的延长, RF/6A 细胞数目迅速增加, 治疗组细胞生长速度较正常对照组和低氧对照组细胞生长速度明显减慢, 增殖能力减弱, 其差异均有统计学意义(表1)($F_{\text{组别}} = 182.16, P_{\text{组别}} < 0.05; F_{\text{时间}} = 34.25, P_{\text{时间}} < 0.05$; 不同组间、不同时间点间的两两比较均为 $P < 0.05$)。

2.3 流式细胞术分析结果 应用 Annexin V 和 PI 对细胞进行荧光染色。实验结果显示治疗组细胞凋亡率(53.5±1.2)% 明显高于正常对照组(18.8±1.1)% 和低氧对照组细胞凋亡率(32.1±0.7)%, 差异均有统计学意义(图2)($t_1 = 2.14, t_2 = 3.23, P < 0.05$)。

2.4 Western-blot 检测 CCR7、VEGF 蛋白的表达 Western-blot 检测三组 RF/6A 细胞中 CCR7、VEGF 蛋白表达(图3,4)。正常对照组可以检测到 CCR7、VEGF 蛋白条带, 提示常氧环境的 RF/6A 能够表达 CCR7、VEGF 蛋白, 表达水平分别为 $0.19 \pm 0.01, 0.38 \pm 0.02$; 低氧对照组 RF/6A 细胞中 CCR7、VEGF 蛋白表达显著上调, 表达水平分别为 $1.30 \pm 0.04, 1.62 \pm 0.02$, 与正常对照组相比差异有统计学意义($t_{\text{CCR7 蛋白}} = 3.38, t_{\text{VEGF 蛋白}} = 4.75, P < 0.05$); 治疗组 RF/6A 细胞中 CCR7、VEGF 蛋白表达水平分别为 $0.35 \pm 0.02, 0.67 \pm 0.01$, 较正常对照组和低氧对照组比较表达下调, 差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。CCR7、VEGF 蛋白抑制效率分别为 73.08%、58.64%。相关分析: CCR7 蛋白与 VEGF 蛋白表达呈显著正相关($r_{\text{蛋白}} = 0.71, P < 0.05$)。

2.5 RT-PCR 检测 CCR7、VEGF mRNA 的表达 RT-PCR 法检测三组 RF/6A 细胞中 CCR7、VEGF mRNA 的表达(图5)。正常对照组 CCR7、VEGF mRNA 表达低, mRNA 相对表达水平分别为 $2.80 \pm 0.01, 4.25 \pm 0.02$; 低氧对照组较正常对照组比较表达显著上调, mRNA 相对表达水平分别为 $6.33 \pm 0.01, 10.28 \pm 0.02$, 两组间基因表达水平差异均有统计学意义($t_{\text{CCR7 mRNA}} = 4.27, t_{\text{VEGF mRNA}} = 5.34$, 均为 $P < 0.05$); 治疗组 RF/6A 细胞中 CCR7、VEGF mRNA 相对表达水平分别为 $3.53 \pm 0.02, 6.82 \pm 0.01$, 较正常对照组和低氧对照组比较表达下调, 差异均有统计学意义(均为 $P <$

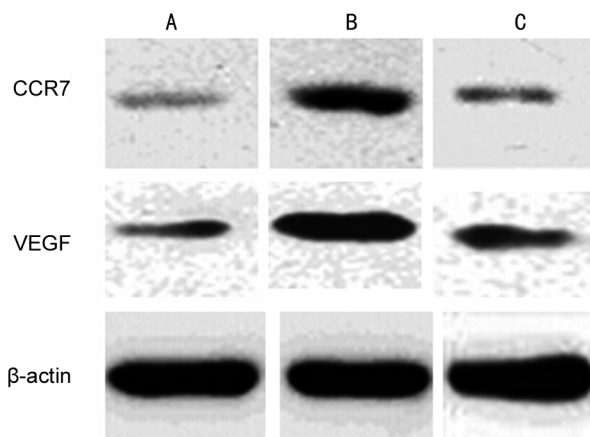


图3 Western blot 检测 RF/6A 细胞内 CCR7、VEGF 蛋白的表达 A: 正常对照组; B: 低氧对照组; C: 治疗组。

0.05)。CCR7、VEGF mRNA 抑制效率分别为 44.23%、33.63%。相关分析: CCR7 mRNA 相对量与 VEGF mRNA 相对量表达呈显著正相关($r_{\text{mRNA}} = 0.83, P < 0.05$)。

3 讨论

新生血管是以缺血、缺氧为基础的, 受多因素、多通路调控, 在原有的血管上, 通常是小静脉, 以出芽的方式生长形成, 主要出现在创伤愈合及某些病变过程中如糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变等。在新生血管形成的过程中, 血管内皮细胞分泌血小板源性生长因子, 刺激间质细胞的增殖, 促进血管壁的发育^[7]。因此, 血管内皮细胞在新生血管的形成中占主导地位。

趋化因子受体 CCR7 是一种介导趋化因子行使功能的跨膜受体, 分子量 8~10kd 的小分子多肽, 在幼稚 T 细胞、B 细胞及树突状细胞表面表达^[8-9]。生理条件下, CCR7 与其配体相互作用可以调节体内多种免疫细胞归巢。近年来研究发现 CCR7 在多种肿瘤中表达, 其中包括胃癌^[10-11]、结肠直肠癌、黑色素瘤^[12]、头颈部鳞状细胞癌^[13]、非小细胞肺癌^[14]、甲状腺癌^[15]等。Takanami^[4]通过免疫组化方法检测非小细胞肺癌中 CCR7 表达时, 发现

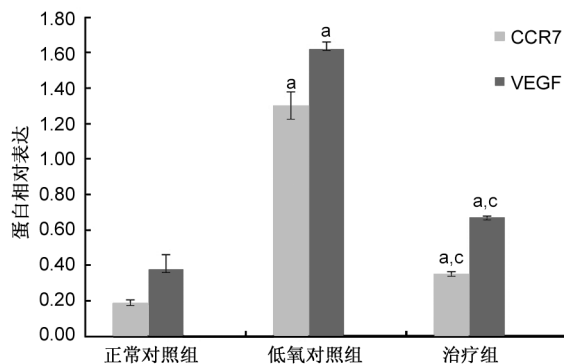


图4 柱状图显示 RF/6A 细胞内 CCR7、VEGF 蛋白表达情况

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 低氧对照组。

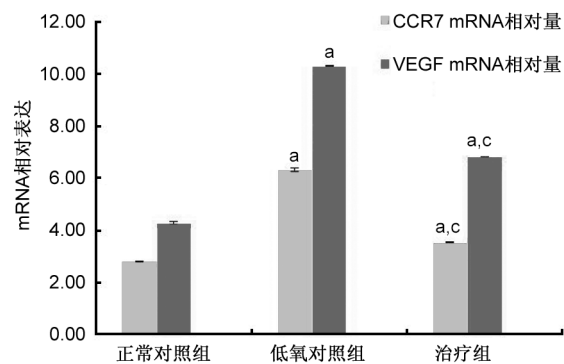


图5 RT-PCR 法检测 RF/6A 细胞内 CCR7、VEGF mRNA 表达情况

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 低氧对照组。

CCR7 在肿瘤周围的血管内皮中也有表达,证实 CCR7 在血管形成中发挥重要作用。VEGF 是血管内皮特异性的生长因子^[16-17],在血管生成的过程中起中心调控作用,是启动新生血管形成所必须的最重要最有效的物质。

本研究采用缺氧环境培养的 RF/6A 细胞模拟 RNV 形成的体外模型,实验结果显示低氧处理 RF/6A 细胞后,细胞增殖能力和生长速度明显减弱,细胞凋亡率显著增强。在此基础上,本实验 Western-blot 和 RT-PCR 结果显示,由于缺氧,低氧组 RF/6A 细胞中 CCR7、VEGF 蛋白和 mRNA 的表达与正常对照组相比明显上调,说明 CCR7、VEGF 与 RNV 的形成密切相关。为了进一步探讨 CCR7 与 VEGF 之间的关系,本实验通过 CCR7 小干扰 RNA 转染 RF/6A 细胞,实验结果显示通过 RNAi 技术抑制 CCR7 的表达,可下调 REC 中 VEGF 的表达,进而抑制 RNV 的发生。另外,对 CCR7 与 VEGF 蛋白及 mRNA 的表达进行了相关性分析,结果显示,CCR7 与 VEGF 蛋白及 mRNA 的表达呈正相关。因此,本研究推测 CCR7 可能通过上调细胞 VEGF 表达而促进 RNV 的形成,但 CCR7 在 RNV 形成中调控 VEGF 表达的精确机制有待进一步研究。

综上所述,本研究揭示了 CCR7-VEGF 信号通路在 RNV 的形成中发挥重要的作用,CCR7-VEGF 信号通路的研究将为视网膜新生血管性疾病的防治开辟新的思路和途径。

参考文献

- 1 CamPochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 2000;184(3):301-310
- 2 Vessey KA, Wilkinson-Berka JL, Fletcher EL. Characterization of retinal function and glial cell response in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *J Comp Neurol* 2011;519(3):506-527
- 3 Lashkari K, Hirose T, Yazdany J, et al. Vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor levels are differentially elevated in patients with advanced retinopathy of prematurity. *Am J Pathol* 2000;156(4):1337-1344
- 4 Zhang Q, Sun L, Yin L, et al. CCL19/CCR7 upregulates heparanase via specificity protein-1 (Sp1) to promote invasion of cell in lung cancer. *Tumour Biol* 2013;34(5):2703-2708
- 5 Takanami. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 2003;105(2):186-189
- 6 Xu Y, Liu L, Qiu X, et al. CCL21/CCR7 Promotes G2/M Phase Progression via the ERK Pathway in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS One* 2011;6(6):e21119
- 7 Saint-Geniez M, D'Amore PA. Development and pathology of the hyaloids, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol* 2004;48(8-9):1045-1058
- 8 Suqaya M, Fang L, Cardones AR, et al. Oncostatin M Enhances CCL21 Expression by Microvascular Endothelial Cells and Increases the Efficiency of Dendritic Cell Trafficking to Lymph Nodes. *Immunol* 2006;177(11):7665-7672
- 9 Sanchez-Sanchez N, Riol-Blanco L, Rodriguez-Fernandez JL, et al. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *Immunol* 2006;176(9):5153-5159
- 10 Wang WN, Chen Y, Zhang YD, et al. The regulatory mechanism of CCR7 gene expression and its involvement in the metastasis and progression of gastric cancer. *Tumour Biol* 2013;34(3):1865-1871
- 11 Ishigami S, Natsugoe S, Nakajo A, et al. Prognostic value of CCR7 expression in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2007;54(76):1025-1028
- 12 Takekoshi T, Fang L, Paragh G, et al. CCR7-expressing B16 melanoma cells downregulate interferon- γ -mediated inflammation and increase lymphangiogenesis in the tumor microenvironment. *Oncogenesis* 2012;1(5):e9
- 13 Wang J, Xi L, Gooding W, et al. Chemokine receptors 6 and 7 identify a metastatic expression pattern in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Adv Otorhinolaryngol* 2005;62:121-133
- 14 Xu Y, Liu L, Qiu X, et al. CCL21/CCR7 Prevents Apoptosis via the ERK Pathway in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS One* 2012;7(3):e33262
- 15 Sancho M, Vieira JM, Casalou C, et al. Expression and function of the chemokine receptor CCR7 in thyroid carcinomas. *Endocrinol* 2006;191(1):229-238
- 16 蒋瑶祁,彭辉灿. VEGF 家族及其受体与视网膜新生血管形成. *国际眼科杂志* 2006;6(5):1113-1116
- 17 Gulati N, Foroghian F, Lieberman R, et al. Vascular endothelial growth factor inhibition in uveitis: a systematic review. *Br J Ophthalmol* 2011;95(2):162-165