

[文章编号] 1000-4718(2007)04-0639-05

Norrin 基因对人视网膜微血管内皮 细胞增殖和周期的影响*

丁小燕, 李涛, 谢素贞, 马红婕, 李斌, 唐仕波[△]
(中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

[摘要] 目的: 体外培养并鉴定人视网膜微血管内皮细胞(HRCECs), 并探讨 Norrin 基因高表达对 HRCECs 增殖和周期的影响。方法: 体外分离、培养并鉴定人视网膜微血管内皮细胞, 抗第Ⅷ因子相关抗原抗体鉴定细胞。利用脂质体 lipofectamine 2000 将 AP-3myc-hNorrin/pRK5 质粒转染 HRCECs, RT-PCR、免疫组化和 Western blotting 方法检测 Norrin/myc 的表达确定转染效率。采用 MTT 法测定转染后细胞的增殖能力, 流式细胞术分析其细胞周期变化。结果: 所培养的细胞第Ⅷ因子相关抗原免疫组化为强阳性。AP-3myc-hNorrin/pRK5 质粒转染后 24 h, RT-PCR 显示实验组 Norrin 表达水平明显高于阴性对照组($P < 0.01$)。转染后 48h 免疫组化及 Western blotting 均显示实验组细胞 Myc 表达强于阴性对照组。MTT 法显示细胞增殖高于对照组, 细胞周期检测示实验组 G₂ 期细胞高于阴性对照组, $P < 0.01$ 。结论: 脂质体能成功转染 AP-3myc-hNorrin/pRK5 进入 HRCECs。Norrin 高表达能促进 HRCECs 的增殖, 并促进细胞 DNA 合成, 提示 Norrin 在视网膜血管生成过程中可能具有重要作用。

[关键词] 基因, Norrin; 视网膜血管; 细胞增殖; 细胞周期

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effects of Norrin gene on the proliferation and cell cycle of human retinal capillary endothelial cells

DING Xiao-yan, LI Tao, XIE Su-zhen, MA Hong-jie, LI Bin, TANG Shi-bo

(Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China. E-mail: tangsb@mail.sysu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To isolate, cultivate and identify human retinal capillary endothelial cells (HRCECs), and to assess the effects of high expression of Norrin gene on the proliferation and cell cycle of HRCECs. **METHODS:** The cultured cells were identified with anti-factor VIII related antigen. AP-3myc-hNorrin/pRK5 were transfected into cultured HRCECs *in vitro* by lipofectamine 2000. Their transfection efficiency were measured by RT-PCR, immunohistochemistry and Western blotting, respectively. Its effects on cell proliferation and cell cycle were detected. **RESULTS:** The cultured cells were identified with immunochemically positive brown staining. In comparison with those of the controls, the Norrin expression in experimental group was significantly increased on mRNA and protein levels (showed by the myc tag) after 48 h. The cell number of experimental group was larger than that in the control group with statistically significant differences. Flow cytometry showed the cells in G₂ phase were mainly increased ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** The plasmid AP-3myc-hNorrin/pRK5 is successfully transfected into HRCECs by lipofectamine 2000. Norrin gene improves the proliferation ability of HRCECs by promoting the synthesis of DNA. Norrin may have an important role in the retinal angiogenesis, which may provide a new gene target in the treatment of retinal vascular disorders.

[KEY WORDS] Genes, Norrin; Retinal vessels; Cell proliferation; Cell cycle

临床上, Norrin 病患者眼部常表现为视网膜血管增殖、出血并引起视网膜脱离^[1], 究其原因, 乃因 Norrin 基因的各种缺陷导致视网膜正常血管发育过程中断, 视网膜处于缺氧状态, 从而启动了新生血管的发生发展^[2]。近年来, 有关 Norrin 基因在正常血

管发育中作用的研究取得了突破性进展, 现已认为其在血管生成过程中起到了关键性作用^[3,4]。

血管内皮细胞在血管生成过程中起着主导作用^[5]。内皮细胞衬覆于血管内壁, 是构成血管壁通透性的主要屏障, 对调节血管张力、血小板和单核细

[收稿日期] 2006-07-04 [修回日期] 2006-11-08

* [基金项目] 广东省自然科学基金项目资助 (No. 05001786) 资助

[△] 通讯作者 E-mail: tangsb@mail.sysu.edu.cn

胞的黏附、平滑肌细胞增殖以及细胞外基质成分的产生均有重要作用,直接影响着血管壁的稳定和功能健全。血管内皮细胞的功能异常,在新生血管的形成中起着重要作用。

Norrin 对血管内皮细胞有什么作用,目前对这一问题了解得还非常少。Ohlmann 等^[6]将外源性 Norrin 基因作用于人皮肤微血管内皮细胞,初步观察到 Norrin 对内皮细胞的增殖有一定的促进作用,但没有进一步的观察。至今为止,还未见到 Norrin 对人视网膜血管内皮细胞作用的研究。在这一研究中,我们通过体外实验,将 AP-3myc-hNorrin/pRK5 质粒转染人视网膜微血管内皮细胞,并观察转染后细胞的增殖和周期的改变。

材 料 和 方 法

1 人视网膜微血管内皮细胞(HRCECs)的分离、培养与鉴定

新鲜人尸体眼球来源于广东省眼库。无菌条件下沿赤道剪开眼球,去除眼前段组织,小心分离玻璃体和视网膜组织,取视网膜神经层,D-Hanks 液清洗 2 次后剪碎,去除肉眼可见的大血管组织,用 2% 胰蛋白酶室温消化视网膜 30 min,离心后用 0.066% II 型胶原酶室温消化 15 min,过滤,取滤液加内皮细胞培养液混匀,接种于包被有纤维连接蛋白的培养瓶内,置于 5% CO₂ 37 °C 培养箱内培养。每 48 - 72 h 换液 1 次。培养液为人内皮细胞培养液(human endothelial - SFM basal growth medium HE - SFM BGM, Gibco),加入 10% 胎牛血清,添加体积比为 1:100 的胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒添加物(insulin - transferrin - selenium, ITS, Gibco)、0.5 μg/L β - 内皮细胞生长因子 ECGF (β - endothelial cell growth factor, β - ECGF, Invitrogen), 100 × 10³ U/L 青霉素和链霉素双抗(Gibco)。

2 人视网膜微血管内皮细胞的组织化学鉴定

细胞传代时接种于 6 孔板中涂有 FN 的玻璃片上。待细胞爬满玻片后取出,4% 多聚甲醛溶液固定 30 min。PBS 中漂洗 5 min × 3 次。3% H₂O₂ 溶液孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶。5% 山羊血清封闭液放置湿盒中室温封闭 20 min。PBS 漂洗后滴加 1:100 兔抗人第 VIII 因子相关抗原单克隆抗体(anti - factor VIII related antigen, 武汉 Boster 公司),湿盒内 4 °C 过夜后取出, PBS 漂洗。滴加 1:100 羊抗兔 IgG, 室温孵育 30 min。PBS 漂洗后显微镜下 DAB 显色。盐酸乙醇分化,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片观察。阴性对照片采用 PBS 代替 I 抗。

3 质粒的来源、转化、提取和鉴定

本研究中所用 AP-3myc-hNorrin/pRK5 表达型质粒由 John Hopkins University 的 Jeremy Nathans 教授惠赠,为方便转染效率的检测,构建时加入 AP、Myc 两个标签。感受态大肠杆菌转化、扩增后,提取质粒并测定浓度。取适量质粒样本送测序。

4 阳离子脂质体转染 HRCECs

转染前 1 d 接种细胞,接种时细胞密度约 80%。用无血清培养基 OPTI - MEM (Invitrogen) 分别稀释脂质体 lipofectamine2000 (Invitrogen) 和质粒 DNA,各孵育 5 min。混合稀释的脂质体和质粒,室温放置 20 min。然后将混合物加入培养瓶内,轻轻混匀,脂质体终浓度为 2 mg/L。实验组转入 1 mg/L 的 AP-3myc-hNorrin/pRK5 表达型质粒,阴性对照组转入等量空载体,余同实验组,另设空白对照组。24 h (MTT 法测定细胞增殖、RT - PCR) 或 48 h (Western blotting, 细胞周期检测) 收集细胞进行下一步实验。

5 RT - PCR 检测转染后细胞 Norrin mRNA 表达水平

常规消化转染 24 h 后各组细胞,计数后分别收集 3 × 10⁶ 个细胞。应用总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,测定 RNA 浓度和 A_{260/280} 值。反转录采用 First strand cDNA synthesis kit (立陶宛 Fermentas Life Sciences 公司)。Norrin 引物,forward: 5' - GGCAC - CACTATGTGGATTCTA - 3', reverse: 5' - TAGGTG - GCAGTGAGTCGCAT - 3',产物大小 238 bp。内参照 β - actin 引物,forward: 5' - CTACAATGAGCTGCGT - GTGG - 3', reverse: 5' - CGGTGAGGATCTTCAT - GAGG - 3',产物大小 293 bp。Norrin、β - actin 两者的 PCR 反应循环条件为:预变性 94 °C 5 min,然后 94 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳,显像,拍照。结果经全自动图像分析系统 Gel analyser 软件处理,计算每个目的条带的吸光度值,得出各组 Norrin/β - actin 值,实验重复 3 次。

6 免疫组化和 Western blotting 法检测转染前后 Myc 蛋白的表达

细胞固定后按常规免疫组化方法进行, I 抗为 1:100 兔抗人 Myc (Upstate), 4 °C 孵育过夜。II 抗为羊抗兔 IgG, 37 °C 孵育 30 min。DAB 显色,苏木素复染,显微镜下观察。

细胞消化离心后去除上清加入蛋白裂解液,混匀后超声粉碎,12 000 r/min 离心 1 h。Bradford 法测定蛋白浓度并制作标准曲线。按 40 μg 蛋白/泳道上样,经 SDS - PAGE 电泳后,电转膜至硝酸纤维素

膜,5% 脱脂奶粉/TBST 溶液中室温封闭 2 h。抗 Myc 单克隆抗体或抗 β -actin 单克隆抗体 1:1 000 稀释后室温孵育 2 h。用 1:1 000 稀释的 HRP-抗小鼠 IgG 和抗生物素 IgG 室温孵育 1 h,最后经 ECL 化学发光,拍摄照片。

7 MTT 比色法测定细胞增殖

选用 P3 代 HRCECs,每孔 2×10^3 个细胞接种 96 孔培养板,次日给予干预,方法同前述。继续培养 48 h,每孔加入 5 g/L MTT 20 μ L,继续孵育 4 h,弃培养液后加入二甲基亚砜(DMSO) 150 μ L/孔,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。采用 492 nm 波长测各孔吸光度(A) 值,结果以 A_{490} 值表示细胞增殖水平,每组 6 复孔,实验重复 3 次。

8 流式细胞仪观察细胞生长周期

HRCECs 接种于培养皿中,待细胞长至 60% 左右融合度后改用无血清培养基继续培养 24 h 使其同步化。次日给予各组干预,继续培养 48 h。消化后调整各组样本细胞数为 1×10^9 cells/L,离心后加入预冷的 70% 乙醇溶液固定,冰箱过夜。次日取细胞悬液 100 μ L,加入 50 mg/L 的 PI 染液(含 RNase) 1 mL,30 min 后上机检测,激发光波长 488 nm。CELLquest 和 MODFIT 软件进行分析,计算出细胞周期各时相分布的百分比。

9 统计学处理

用 SPSS 11.0 软件对数据进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。

结 果

1 HRCECs 的形态学观察和组织化学鉴定

所分离的细胞一般在接种 24-48 h 后贴壁。贴壁后见有部分细胞从微血管碎片中长出、游离,早期如小鲤鱼状聚集在微血管碎片周围,细胞聚集成团,呈短梭形。3 W 左右融合,呈铺路石样排列,存在接触性抑制。传代培养时 5-6 d 可融合生长(图 1A、B、C、D)。第 VIII 因子相关抗原抗体免疫组化可见细胞浆内有棕色的免疫沉积物,见图 2A、B。

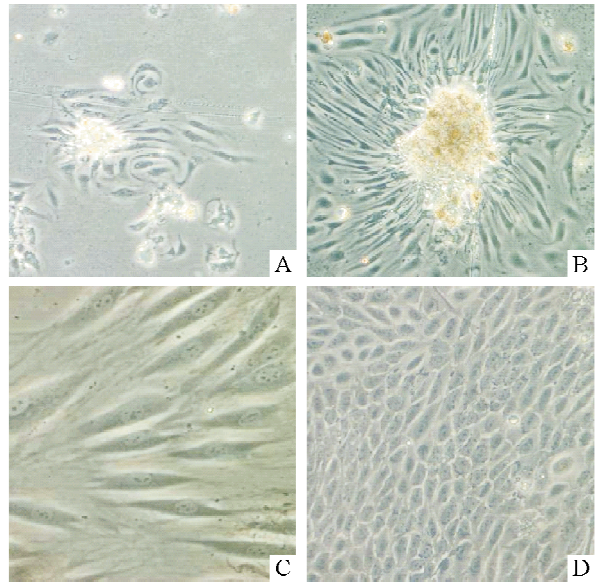


Fig 1 Cultured human retinal capillary endothelial cells *in vitro*. A: 2 d after incubation($\times 100$); B: 5 d after incubation ($\times 100$); C: 2 weeks after incubation($\times 400$); D: confluent monolayer stone-like cells($\times 100$).

图 1 体外培养的人视网膜微血管内皮细胞

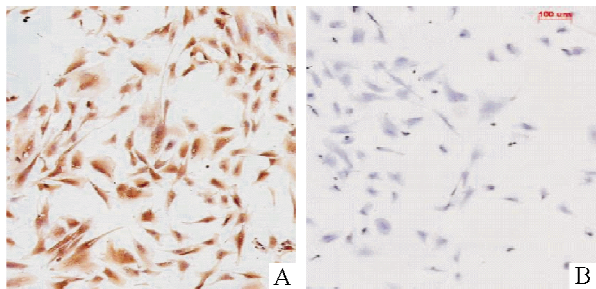


Fig 2 Identification of HRCECs. A: anti-VIII factor related antigen immunohistochemical positive staining; B: results of black control.

图 2 HRCECs 的鉴定

2 AP-3myc-hNorrin/pRK5 质粒的鉴定

对转化、扩增、提取、浓度测定后的适量质粒进行测序,结果与 GenBank 中人类 Norrin 基因(序列号:NM-000266) 比对,证实含人 Norrin 基因片段,见图 3。

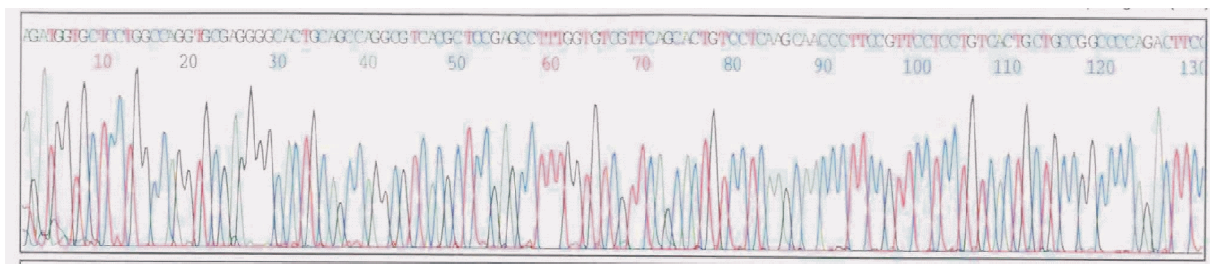


Fig 3 Sequencing of plasmid AP-3myc-hNorrin/pRK5 (Partly), 581-711 of human Norrin gene(NM-000266).

图 3 AP-3myc-hNorrin/pRK5 质粒测序图

3 AP-3myc-hNorrin/pRK5 质粒转染 HRCECs 后细胞形态的改变

相差显微镜下见细胞在无血清培养基中生长仍良好,48 h 后见阴性对照组和实验组细胞均可见到极小部分细胞变圆,但未见细胞漂浮。绝大部分细胞生长良好,质粒转染组细胞与阴性对照和空白对照组比较,形态无明显改变。

4 AP-3myc-hNorrin/pRK5 质粒转染率

RT-PCR 结果显示,24 h 后实验组细胞内 Norrin/ β -actin mRNA 表达量为 0.537 ± 0.032 ($n = 3$),阴性对照组为 0.433 ± 0.020 ($n = 3$),实验组高于阴性对照组, $P < 0.01$,见图 4。

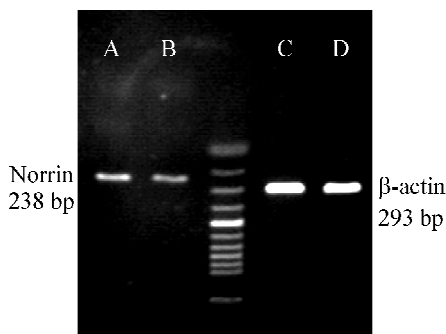


Fig 4 The changes of Norrin mRNA expression in the Norrin-transfected cells (RT-PCR). A: Norrin in transfected cells; B: Norrin in control cells; C: β -actin in transfected cells; D: β -actin in control cells.

图 4 质粒转染后 Norrin mRNA 表达的改变 (RT-PCR)

免疫组化结果显示,转染 48 h 后实验组细胞 DAB 显色 Myc 强阳性,而阴性对照组为阴性(图 5A、B)。Western blotting 免疫印迹法检测实验组细胞 Myc 蛋白表达量明显高于阴性对照组,两组内参照 β -actin 表达量均衡,见图 6。

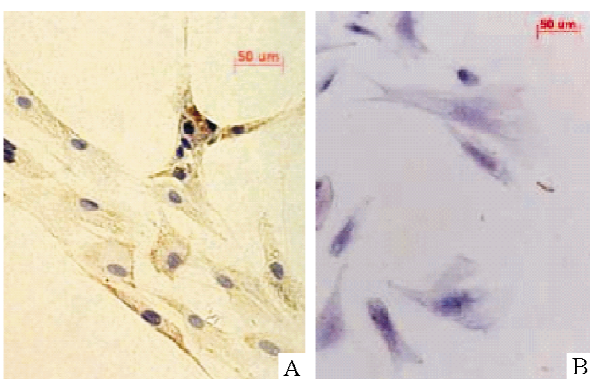


Fig 5 The immunohistochemical changes of Myc expression in the Norrin-transfected cells (DAB staining). A: Myc expression in the cells 48h post-transfection; B: Myc expression in the control cells.

图 5 Myc 在质粒转染后的细胞中表达的改变

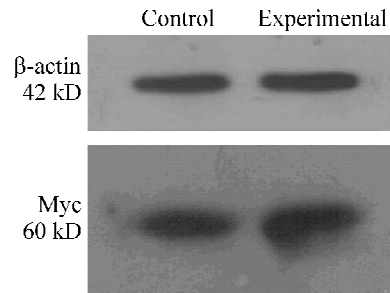


Fig 6 The changes of Myc expression in the Norrin-transfected cells (Western blotting).

图 6 Myc 在质粒转染后的细胞中表达的改变

5 Norrin 对 HRCECs 增殖的影响

MTT 比色法测得空白对照组 A 值为 0.032 ± 0.007 ($n = 3$),阴性对照组 A 值为 0.029 ± 0.009 ($n = 3$),实验组 A 值为 0.049 ± 0.006 ($n = 3$)。从中可以看出,转染后 48 h,实验组细胞 A 值明显大于空白和阴性对照组,实验组比阴性对照细胞增加 68.9%,增殖明显, $P < 0.01$ 。阴性对照组与空白对照组差异不明显, $P > 0.05$,见图 7。

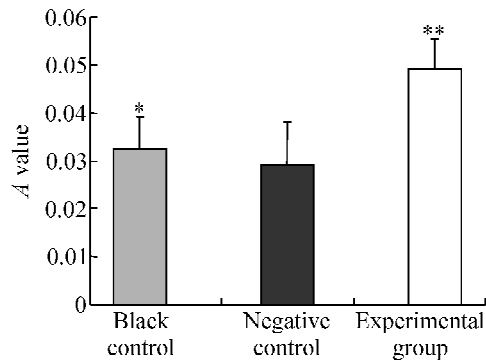


Fig 7 The cell proliferation 48 h after transfection (MTT method). $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.01$ vs negative group.

图 7 质粒转染后 48 h MTT 比色法测定细胞增殖状态

6 细胞周期分析

质粒转染后 48h 经流式细胞仪分析细胞周期显示:阴性对照组细胞 G_0/G_1 期、 G_2 期细胞分别为 $80.5\% \pm 0.9\%$ 和 $7.7\% \pm 0.5\%$ ($n = 3$);实验组细胞则分别为 $82.3\% \pm 0.8\%$ 和 $10.6\% \pm 0.3\%$ ($n = 3$)。经统计学分析,两组 G_2 期细胞所占比例统计学上存在显著差异, $P < 0.01$,见图 8。

讨 论

在基因研究或治疗中,选择高效的基因转移途径是实验或治疗顺利进行的前提。在本实验中,我们采用脂质体作为传递 DNA 的工具。脂质体可以通过受体介导、细胞吞噬等过程被细胞摄入,将各种 DNA 转入细菌、动植物细胞,并在细胞内表达。这种方法简便,重复性好,对多种细胞有效,同时包装容

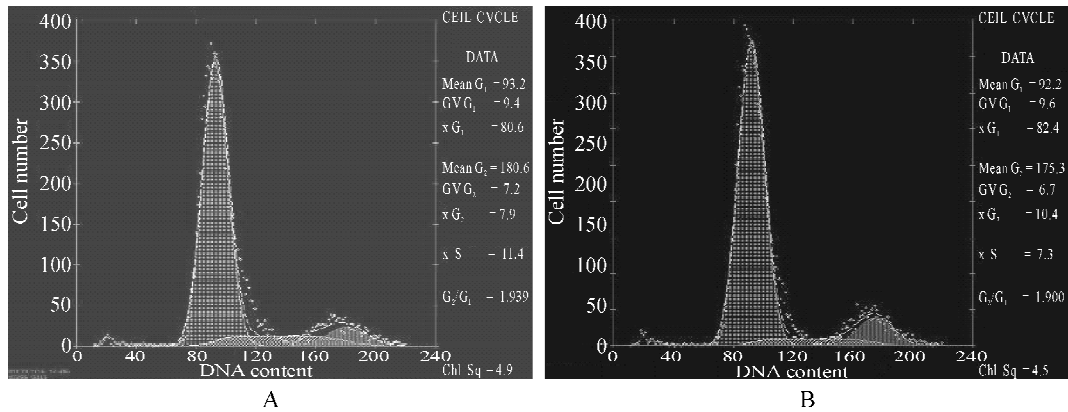


Fig 8 Cell cycle distribution 48h after transfection (FCM). A: the ratio of G₂ stage cells in control group; B: the ratio of G₂ stage cells in experimental group.

图8 质粒转染后 48 h 流式细胞仪分析细胞周期

量大,安全性高,对人体无害,无致病性。经脂质体介导的质粒 DNA 转染到视网膜细胞后,目的基因可在细胞内表达并持续表达一定时间(17 周以上)。本研究中,HRCECs 被转染后,Norrin 在 mRNA 水平及 Myc 在蛋白水平上均有明显增高,说明转染成功,导入的目的基因 hNorrin 在细胞内成功表达。

据王丰等^[7]报道,脂质体具有一定毒性,高浓度情况下可引起较多细胞脱落或死亡。在我们的研究中,经脂质体介导的 AP-3myc-hNorrin/pRK5 质粒转染到视网膜微血管内皮细胞后,在相差显微镜下见空白对照组的细胞在无血清培养基中生长仍良好,48 h 后见阴性对照组和质粒转染组的绝大部分细胞生长良好,但两组中均可见到少量细胞变圆,极少部分细胞脱落,漂浮。质粒转染组细胞与阴性对照组之间比较,细胞形态无明显差别。提示这种细胞死亡脱落的现象可能与脂质体转染试剂 lipofectamine2000 对 HRCECs 的毒性作用有关。

本研究通过 MTT 比色法观察到:脂质体介导的 AP-3myc-hNorrin/pRK5 质粒转染到视网膜微血管内皮细胞后 48 h,细胞数目较空白组和阴性对照组明显增加,与阴性对照组相比,细胞增加了 48.9%,统计学上差异明显,提示 Norrin 能促进体外培养的 HRCECs 的增殖。

经 PI 染色用流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测质粒转染后 48 h 细胞周期变化时发现,质粒转染组 G₀/G₁ 期细胞数少于阴性对照组,而 G₂ 期数量则多于阴性对照组。这一结果表明:外源性 Norrin 导入后即 Norrin 高表达可促进 HRCECs 由 G₀/G₁ 向 G₂ 期过渡,促进 HRCECs 的增殖。Norrin 对 HRCECs 的促增生作用主要是通过促进 HRCECs 由细胞间期进入 G₂ 期来实现的。

本研究通过将携带有 hNorrin 基因的质粒采用脂质体法转染人视网膜微血管内皮细胞,获得稳定

高表达 Norrin 基因的 HRCECs 细胞。通过对细胞的增殖及细胞周期的研究发现: Norrin 高表达后,HRCECs DNA 合成能力、生长增殖能力增强。新生血管生成的生物学特性是血管内皮细胞的异常生长,其主要分子机制是细胞周期紊乱导致细胞增殖过多和凋亡减少。因此,我们认为,Norrin 基因可能在新生血管的生成中起到一定作用,对它进行深入研究,可能为新生血管的治疗找到新的有潜力的治疗靶点。

[参 考 文 献]

- [1] Richter M, Gottanka J, May CA, et al. Retinal vasculature changes in Norrie disease mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(12): 2450-2457.
- [2] Luhmann UFO, Lin J, Acar N, et al. Role of the norrie disease pseudoglioma gene in sprouting angiogenesis during development of the retinal vasculature[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(9): 3372-3382.
- [3] Lobov IB, Rao S, Carroll TJ, et al. WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature[J]. Nature, 2005, 437(7057): 417-421.
- [4] Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, et al. Vascular development in the retinal and inner ear: control by norrin and frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair[J]. Cell, 2004, 116(6): 883-895.
- [5] Takagi H, King GL, Robinson GS, et al. Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37(11): 2165-2176.
- [6] Ohlmann A, Scholz M, Goldwisch A, et al. Ectopic norrin induces growth of ocular capillaries and restores normal retinal angiogenesis in norrie disease mutant mice[J]. J Neurosci, 2005, 25(7): 1701-1710.
- [7] 王丰,夏欣,胡宏慧,等. 脂质体介导质粒 DNA 视网膜转移[J]. 中华眼科杂志, 2002, 38(9): 520-522.