

# I型胶原对缺氧状态下 RPE 细胞 DDR2 和 HIF-1 $\alpha$ 及 VEGF 表达的影响

张煜,朱洁,储昭节,王雨生

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(No. 2011CB510200);国家自然科学基金资助项目(No. 81000392,81070748)

作者单位:(710032)中国陕西省西安市,第四军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所

作者简介:张煜,女,硕士,研究方向:眼底病与眼外伤。

通讯作者:朱洁,博士,主治医师,讲师,研究方向:眼内新生血管发生、视网膜色素上皮细胞生物学特性和因子表达、脉络膜新生血管疾病。naneee@fmmu.edu.cn

收稿日期:2012-07-16 修回日期:2012-08-29

## Effect of collagen I on the DDR2, HIF-1 $\alpha$ and VEGF expression of human retinal pigment epithelial cells under hypoxia

Yu Zhang, Jie Zhu, Zhao-Jie Chu, Yu-Sheng Wang

**Foundation items:** National Key Basic Research and Development Program of China (plan 973) (No. 2011CB510200); National Natural Science Foundation of China (No. 81000392, 81070748) Department of Ophthalmology, Institute of Ophthalmology of Chinese PLA, Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Jie Zhu. Department of Ophthalmology, Institute of Ophthalmology of Chinese PLA, Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. naneee@fmmu.edu.cn

Received:2012-07-16 Accepted:2012-08-29

### Abstract

• **AIM:** To observe the expression of discoidin domain receptor 2 (DDR2) in retinal pigment epithelium (RPE) cells under hypoxia state, the expression of DDR2, hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in RPE cells under hypoxia state with stimulation of collagen I, discussing the effects of collagen I and DDR2 in choroidal neovascularization (CNV).

• **METHODS:** It was a controlled experimental study, using 200 $\mu$ mol/L CoCl<sub>2</sub> treated RPE cells to establish chemical hypoxia model. The expression of DDR2 in cells was examined after hypoxia 0, 2, 6, 12, 24 hours by immunofluorescence, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting. In hypoxia state with collagen I's (10 $\mu$ g/mL in 50 degrees incubated box) stimulation, the expression of DDR2 and HIF-1 $\alpha$  in cells were examined after hypoxia 0, 2, 6, 12, 24 hours by RT-PCR and Western blotting, using enzyme

linked immunosorbent assay (ELISA) to observe the expression of VEGF in cell culture supernatant.

• **RESULTS:** After prolonged hypoxia, the expression of DDR2 mRNA and protein were reduced. Collagen I could multiply the expression of DDR2 mRNA and protein in hypoxia as time goes on, it could active DDR2. The expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA, protein and VEGF protein dropped off in hypoxia state with collagen I's stimulation compared with hypoxia.

• **CONCLUSION:** The expression of DDR2 in RPE cells reduced with time under hypoxia state. Collagen I can activate DDR2 as time goes on. In hypoxia state with collagen I's stimulation can suppress hypoxia induced up-regulation expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in RPE cells.

• **KEYWORDS:** collagen; discoidin domain receptor 2; hypoxia; retinal pigment epithelial cell; hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ; vascular endothelial growth factor; choroidal neovascularization

**Citation:** Zhang Y, Zhu J, Chu ZJ, *et al.* Effect of collagen I on the DDR2, HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression of human retinal pigment epithelial cells under hypoxia. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(10):1830-1835

### 摘要

**目的:**观察缺氧状态下人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞中盘状结构域受体2(discoidin domain receptor 2, DDR2)的表达,观察I型胶原缺氧刺激下RPE细胞中DDR2,缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,探讨I型胶原和DDR2在脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)发生中的作用。

**方法:**对照实验研究。将体外培养的人RPE细胞置于含终浓度为200 $\mu$ mol/L CoCl<sub>2</sub>的培养液中培养以建立RPE细胞化学缺氧模型。在缺氧后即刻(即常氧状态下)、2, 6, 12和24h终止缺氧,用免疫荧光、逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)和免疫蛋白印迹法(Western blotting)检测RPE细胞中DDR2的表达。缺氧条件下以I型胶原(10 $\mu$ g/mL, 50 $^{\circ}$ C孵箱内孵育)刺激,在刺激后即刻(即常氧状态下)、2, 6, 12, 24h终止缺氧,用RT-PCR和Western blotting检测RPE细胞中DDR2和HIF-1 $\alpha$ 的表达,酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法观察RPE细胞培养上清中VEGF的表达。

**结果:**随着缺氧时间延长,RPE细胞中DDR2 mRNA和蛋白表达降低。在缺氧状态下I型胶原仍可以随时间迁移

使得 DDR2 mRNA 和蛋白表达增加,激活 DDR2。缺氧胶原刺激组相对于缺氧组 HIF-1 $\alpha$  mRNA 和蛋白表达减少,VEGF 蛋白表达减少。

**结论:**缺氧条件下,RPE 细胞中 DDR2 表达随时间推移逐渐降低。I 型胶原仍可以随时间迁移激活 DDR2,缺氧胶原刺激可以抑制缺氧诱导的 RPE 细胞 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 表达上调。

**关键词:**胶原;盘状结构域受体 2;缺氧;视网膜色素上皮细胞;缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ;血管内皮生长因子;脉络膜新生血管

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.10.04

**引用:**张煜,朱洁,储昭节,等. I 型胶原对缺氧状态下 RPE 细胞 DDR2 和 HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 表达的影响. 国际眼科杂志 2012;12(10):1830-1835

## 0 引言

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是眼内新生血管的重要表现形式之一。CNV 常累及黄斑区,引起反复出血、渗出和瘢痕形成,引起视力障碍。迄今为止,还没有针对其有效的治疗方法,针对其病因、阻止新生血管生成的有效疗法将为治疗 CNV 的相关疾病提供可能。在 CNV 发生过程中,人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞起着重要的调控作用<sup>[1]</sup>。缺氧环境中 RPE 细胞通过增加缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达促进 CNV 发展<sup>[2]</sup>。盘状结构域受体 2(discoidin domain receptor 2, DDR2)是一种受体型蛋白酪氨酸激酶。它通过与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的接触促进细胞的迁移、黏附、分化和转移,在肿瘤和免疫性疾病的发生发展中扮演重要角色。通过胶原的激活,DDR2 可以诱导受体磷酸化,随后介导众多信号传导途径和调控细胞生物学行为。Olaso 等发现在肝癌模型中,缺氧状态下 DDR2 基因缺失的肝星形细胞 VEGF 表达上调,DDR2 可以通过 VEGF 的基因转录参与调控肿瘤细胞增生和血管生成<sup>[3]</sup>。关于 I 型胶原以及 DDR2 是否参与 CNV 的发生发展尚不明确。本研究拟观察缺氧状态下,胶原对体外培养 RPE 细胞中 DDR2, HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 表达的影响,探讨 I 型胶原在 CNV 发生中的作用以及 DDR2 参与 CNV 生成的可能性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 仪器设备** 荧光显微镜(德国 Leica 公司),凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),普通聚合酶链仪(polymerase chain reaction, PCR,德国 Eppendorf 公司)。

**1.1.2 试剂** 无血清细胞冻存培养液(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)培养基(北京陆桥公司),胎牛血清(天津易生源生物技术有限公司),氯化钴( $\text{CoCl}_2$ ,美国 Sigma 公司),山羊抗人 DDR2 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),小鼠抗人 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体(Chemicon 公司),小鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体(Sigma 公司),FITC 标记的大鼠抗山羊荧光抗体(Takara 公司),FITC 标记的大鼠抗小鼠荧光抗体(Takara 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 人 RPE 细胞取自角膜移植术后的供体

眼球,采用文献[4]的方法分离、培养及鉴定 RPE 细胞,选第 3~6 代的细胞为实验细胞,将细胞置于体积分数为 100mL/L 胎牛血清、 $10^5$  U/L 青霉素和 100g/L 链霉素的 DMEM/F<sub>12</sub> 培养基(Gibco)中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 50mL/L  $\text{CO}_2$  孵箱中培养。2.5g/L 胰蛋白酶消化传代,第 3~6 代细胞用于后续实验。以  $2 \times 10^6$ /孔细胞的密度将 RPE 细胞接种于 6 孔板,培养 24h 后待细胞长至 50%~60% 融合。参照文献[2]用含 200 $\mu\text{mol/L}$   $\text{CoCl}_2$  建立细胞化学缺氧模型,分别设置缺氧后即刻(即常氧状态下)、2,6,12,24h 组。以 I 型胶原(10 $\mu\text{g/mL}$  1mL 涂布 6 孔板,50 $^{\circ}\text{C}$  孵箱内孵育)涂布后 30min 接种细胞,12h 后给缺氧刺激,分别设置胶原刺激后缺氧即刻(即常氧状态下)、2,6,12,24h 组。将体外培养的人 RPE 细胞置于含终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$   $\text{CoCl}_2$  的培养液中培养,以建立 RPE 细胞化学缺氧模型。在缺氧后即刻(即常氧状态下)、2,6,12 和 24h 终止缺氧,用免疫荧光、逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)和免疫蛋白印迹法(Western blotting)检测 RPE 细胞中 DDR2 的表达。缺氧条件下以 I 型胶原(10 $\mu\text{g/mL}$ , 50 $^{\circ}\text{C}$  孵箱内孵育)刺激,在刺激后即刻(即常氧状态下)、2,6,12,24h 终止缺氧,用 RT-PCR 和 Western blotting 检测 RPE 细胞中 DDR2 和 HIF-1 $\alpha$  的表达,酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)观察 RPE 细胞培养上清中 VEGF 的表达。

**1.2.2 细胞免疫荧光检测 RPE 细胞中 DDR2 蛋白表达的动态变化** 将 RPE 细胞接种于预先放置有盖玻片的 24 孔培养板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 50mL/L  $\text{CO}_2$  孵箱中培养 24h 后,2.5g/L 胰蛋白酶消化传代,第 3~6 代细胞用于后续实验。更换为含终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$   $\text{CoCl}_2$  建立细胞化学缺氧模型,于缺氧后即刻(即常氧状态下)、6,12,24h 观察 RPE 细胞中 DDR2 的表达,参考文献[3]的方法行 RPE 细胞免疫荧光检测。RPE 细胞接种于 24 孔板,4% 多聚甲醛固定 10min, PBS 漂洗 5min(3 次),5mL/L Triton 穿孔 15min, PBS 漂洗 5min(2 次),羊血清封闭 60min, TBST 稀释的山羊抗人 DDR2 单克隆抗体(1:500)于 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜, PBS 漂洗 5min(2 次), TBST 稀释的大鼠抗山羊 FITC(1:1000)于 37 $^{\circ}\text{C}$  杂交 2h, PBS 漂洗 5min(2 次),5 $\mu\text{g/mL}$  DAPI 染色 2min, PBS 洗 3 次,荧光显微镜下观察 RPE 细胞中 DDR2 蛋白表达的动态变化。

**1.2.3 Western blotting 检测 RPE 细胞中 DDR2 和 HIF-1 $\alpha$  表达的变化** 消化法收集 RPE 细胞后,调整细胞密度为  $5 \times 10^4$ /L,随后将其接种于 6 孔培养板,RPE 细胞化学缺氧模型的建立同 1.2.1。分别于缺氧后即刻(即常氧状态下)、2,6,12,24h 共 5 个时间点终止缺氧,预冷 PBS 漂洗 2 次,冰上裂解 30min 提取细胞总蛋白。Western blotting 检测 DDR2 和 HIF-1 $\alpha$  的表达。80g/L SDS-PAGE 分离蛋白,电转法转膜 4 $^{\circ}\text{C}$ , 35V 过夜,50g/L 脱脂奶粉封闭 1h,用山羊抗人 DDR2 单克隆抗体(1:500)和小鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体(1:500),室温孵育 1h, TBS 漂洗 3 次;用小鼠抗人 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体(1:500)和小鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体(1:500),室温孵育 1h。用荧光素标记的二抗(发光抗体)大鼠抗山羊 FITC(1:200000)/大鼠抗小鼠 FITC(1:200000)二抗结合一抗,暗室曝光显影。X 光片扫描后,采用 BandsScan 5.0 对目的条带灰度值定量。各个时

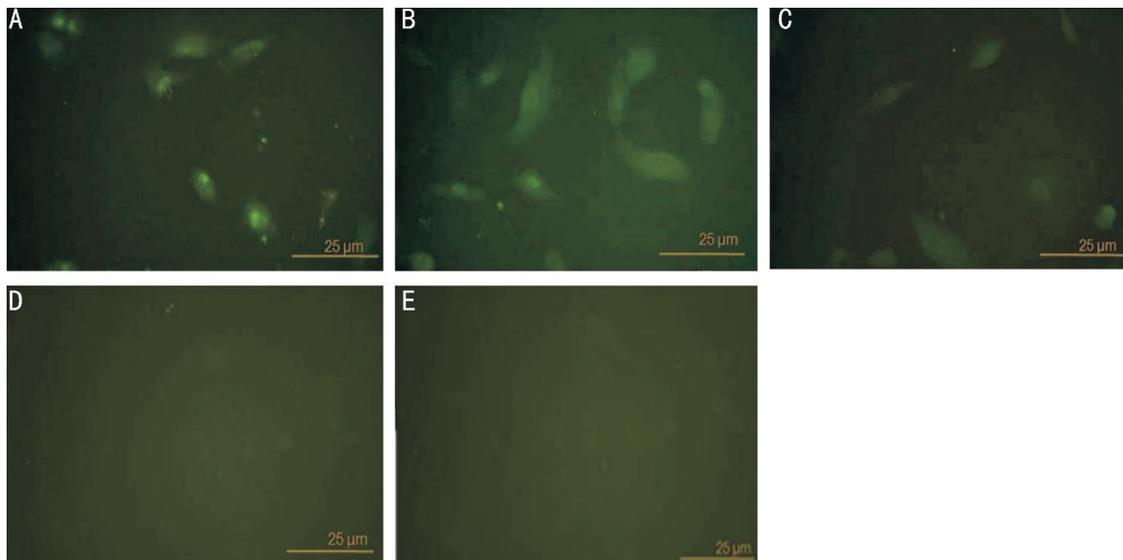


图1 免疫荧光染色检测体外培养的RPE细胞中DDR2蛋白的表达 A:缺氧后即刻(即常氧状态下); B:缺氧6h; C:缺氧12h; D:缺氧24h; E:对照组。

间点的DDR2和HIF-1 $\alpha$ 灰度值与自身 $\beta$ -actin灰度值之比以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并以此绘图描述缺氧状态下RPE细胞中DDR2和HIF-1 $\alpha$ 表达的变化。

**1.2.4 RT-PCR检测RPE细胞中DDR2和HIF-1 $\alpha$  mRNA表达量的动态变化** 消化法收集RPE细胞后,调整细胞密度为 $5 \times 10^4/L$ ,随后将其接种于6孔培养板,RPE细胞化学缺氧模型的建立同1.2.1。分别于缺氧后即刻(即常氧状态下)、2,6,12,24h共5个时间点终止缺氧,预冷PBS漂洗2次,用Trizol提取总RNA,并测定其浓度。取 $1 \mu g$  RNA进行逆转录,按逆转录试剂盒(Takara)说明合成cRNA。PCR反应条件:94 $^{\circ}C$ 预变性120s,然后94 $^{\circ}C$ 变性30s,55 $^{\circ}C$ 退火30s,共进行30个循环,72 $^{\circ}C$ 延伸30s,72 $^{\circ}C$ 延伸120s。DDR2,HIF-1 $\alpha$ ,VEGF及GAPDH引物由上海生工全程合成,以cDNA为模板进行PCR扩增。所得各PCR产物于10g/L琼脂糖凝胶电泳,紫外凝胶成像仪分析成像,采用Bandscan5.0数据分析软件分析灰度值,计算mRNA表达的相对值。计算方法:mRNA表达的相对值=目的基因灰度值/GAPDH灰度值。所用引物序列为:DDR2正义链:5'-CTC CCA GAA TTT GCT CCAG-3',反义链:5'-GCC ACA TCT TTT CCT GAGA-3',扩增片段长度为110bp;HIF-1 $\alpha$ 正义链:5'-CCA TTA GAA AGC AGT TCCGC-3',反义链:5'-TGG GTA GGA GAT GGA GATGC-3',扩增片段长度为194bp;GAPDH正义链:5'-CCG CAG ACG TGT AAA TGT TCCT-3',反义链:5'-CAG GCG CCC AAT ACG ACC AAA TC-3',扩增片段长度为110bp。取各自扩增产物 $5 \mu L$ ,10g/L琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,鉴定RT-PCR产物。结果用紫外凝胶成像系统照相,Bandscan5.0数据分析软件分析灰度值。以各组DDR2和HIF-1 $\alpha$ 的产物条带与其相应的GAPDH的RT-PCR产物条带的灰度比值作为DDR2和HIF-1 $\alpha$  mRNA表达的相对量,观测RPE细胞中DDR2和HIF-1 $\alpha$  mRNA表达量的动态变化。

**1.2.5 ELISA检测RPE细胞培养上清中VEGF的表达** 收集细胞培养上清于离心管内,用1000r/min离心去除杂质,样品检测前存储于-80 $^{\circ}C$ 备用。按照人VEGF ELISA检测试剂盒(上海森雄科技实业有限公司)说明进行操作。

酶标仪490nm波长读取吸光度值,绘制标准曲线查出相应VEGF浓度。

统计学分析:以上实验重复3次,不同时间点的实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 17.0版本软件处理,用Student's-t检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 缺氧状态下RPE细胞中DDR2的表达** 免疫荧光检测结果提示,正常RPE细胞在缺氧后即刻(即常氧状态下)DDR2蛋白在RPE细胞的胞核、胞质以及胞膜中都有表达。随缺氧时间的延长,细胞质和细胞核内的荧光强度逐渐减弱。提示随缺氧时间的延长,RPE细胞中DDR2的表达降低(图1)。

**2.2 缺氧状态下RPE细胞中DDR2 mRNA表达** RT-PCR检测结果提示,随着缺氧时间延长,DDR2 mRNA的表达逐渐降低(图2)。

**2.3 缺氧状态下RPE细胞中DDR2蛋白表达** Western blotting检测结果提示,随着缺氧时间延长,DDR2蛋白的表达逐渐降低(图3)。

**2.4 缺氧状态下胶原刺激后RPE细胞中DDR2表达** RT-PCR检测结果提示,牛真皮胶原(I型胶原)刺激下在缺氧即刻(即常氧状态下)RPE细胞内DDR2 mRNA表达较少;随着缺氧时间延长,DDR2 mRNA的表达逐渐升高。Western blotting检测结果可见,牛真皮胶原(I型胶原)刺激下在缺氧即刻(即常氧状态下)RPE细胞内DDR2蛋白表达较少;随着缺氧时间延长,DDR2蛋白的表达逐渐升高(图4)。

**2.5 缺氧状态下胶原刺激后RPE细胞中HIF-1 $\alpha$ 表达** RT-PCR检测结果提示,缺氧状态下在缺氧即刻(即常氧状态下)RPE细胞内HIF-1 $\alpha$  mRNA表达较少;随着缺氧时间延长,HIF-1 $\alpha$  mRNA的表达量逐渐升高,至6h达到峰值;24h已降低,但仍高于常氧状态。缺氧状态下在牛真皮胶原(I型胶原)刺激后,HIF-1 $\alpha$  mRNA在各个时间点的表达量相对于缺氧组明显降低。Western blotting检测结果可见,缺氧状态下在缺氧即刻(即常氧状态下)RPE细胞内HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达较少;随着缺氧时间延长,

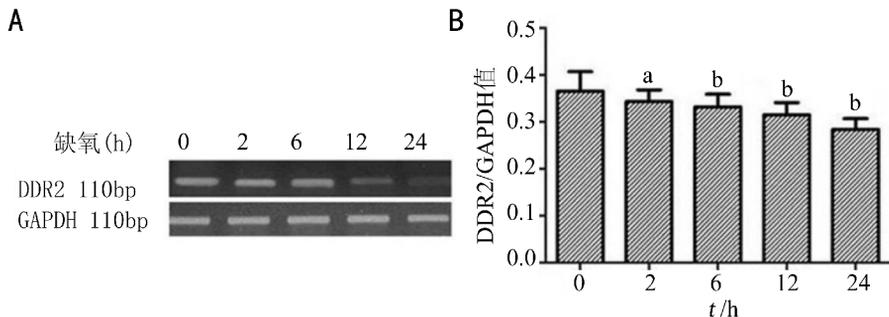


图2 RT-PCR 检测缺氧状态下 RPE 细胞内 DDR2 mRNA 的表达 A:DDR2 电泳条带; B:DDR2/GAPDH 统计图;<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 缺氧 0h 组。

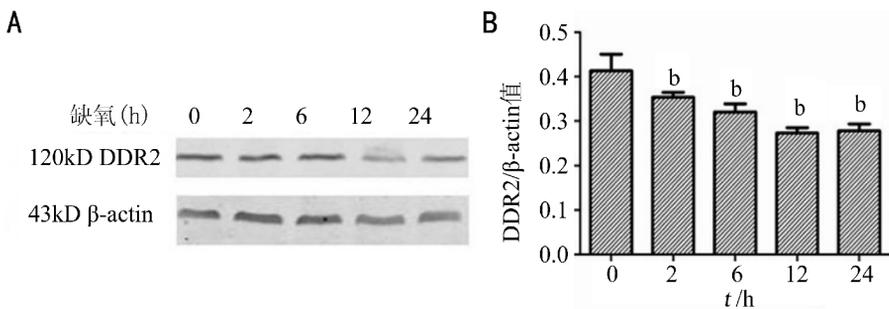


图3 Western blotting 检测缺氧状态下 RPE 细胞内 DDR2 蛋白的表达 A:DDR2 电泳条带; B:DDR2/β-actin 统计图;<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 缺氧 0h 组。

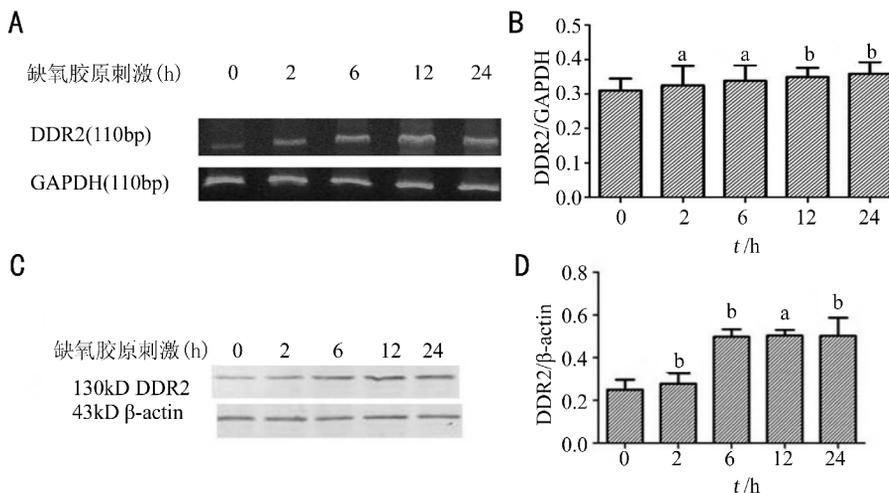


图4 RT-PCR 和 Western blotting 检测胶原刺激缺氧状态下 RPE 细胞内 DDR2 的表达 A: RT-PCR 中 DDR2 电泳条带; B: RT-PCR 中 DDR2/GAPDH 统计图; C: Western blotting 中 DDR2 电泳条带; D: Western blotting 中 DDR2/GAPDH 统计图;<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 缺氧 0h 组。

HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达量逐渐升高,至 12h 达到峰值;24h 略降低,但仍高于常氧状态。缺氧状态下在牛真皮胶原 (I 型胶原) 刺激后, HIF-1 $\alpha$  蛋白在各个时间点的表达量相对于缺氧组来说明显降低 (图 5)。以上结果提示缺氧胶原刺激后,可以抑制缺氧诱导的 RPE 细胞 HIF-1 $\alpha$  表达上调 ( $P<0.01$ )。

### 2.6 ELISA 检测 RPE 细胞培养上清中 VEGF 的表达

ELISA 检测结果提示 (图 6), 缺氧状态下在缺氧即刻 (即常氧状态下) RPE 细胞培养上清中 VEGF 蛋白表达较少; 随着缺氧时间延长, VEGF 蛋白的表达量逐渐升高, 至 24h 达到高峰。缺氧状态下在牛真皮胶原 (I 型胶原) 刺激后, VEGF 蛋白在各个时间点的表达量相对于缺氧组明显降低。提示缺氧胶原刺激后可以抑制缺氧诱导的 RPE 细胞 VEGF 蛋白表达上调。

### 3 讨论

CNV 的形成是一个多因素共同调节的复杂过程, 缺氧是目前较为明确的原因, 可以导致 RPE 细胞内信号通路和细胞因子的表达变化<sup>[2]</sup>。缺氧环境中 RPE 细胞通过增加 HIF-1 $\alpha$  的表达, 显著上调 VEGF 因子的表达, 促进 CNV 发展<sup>[3]</sup>。DDRS 是一类受体型蛋白酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinases, RTKS)。DDRS 由胞外区、跨膜区和胞内激酶区 3 部分组成, DDRS 被胶原激活后, 可诱导受体发生自磷酸化, 随后介导众多信号传导途径, 使下游众多靶基因产生变化, 调控细胞的生物学行为<sup>[4]</sup>。目前发现哺乳动物有两种 DDRS: DDR1 可能与肿瘤细胞的侵袭性相关, DDR2 与细胞分泌细胞外基质代谢酶类辅酶-1 (matrix metalloproteinases - 1, MMP - 1) 家族相关<sup>[5]</sup>。DDR2 基因定位于人 6P21 和小鼠 17C, 编码 856 个氨基酸

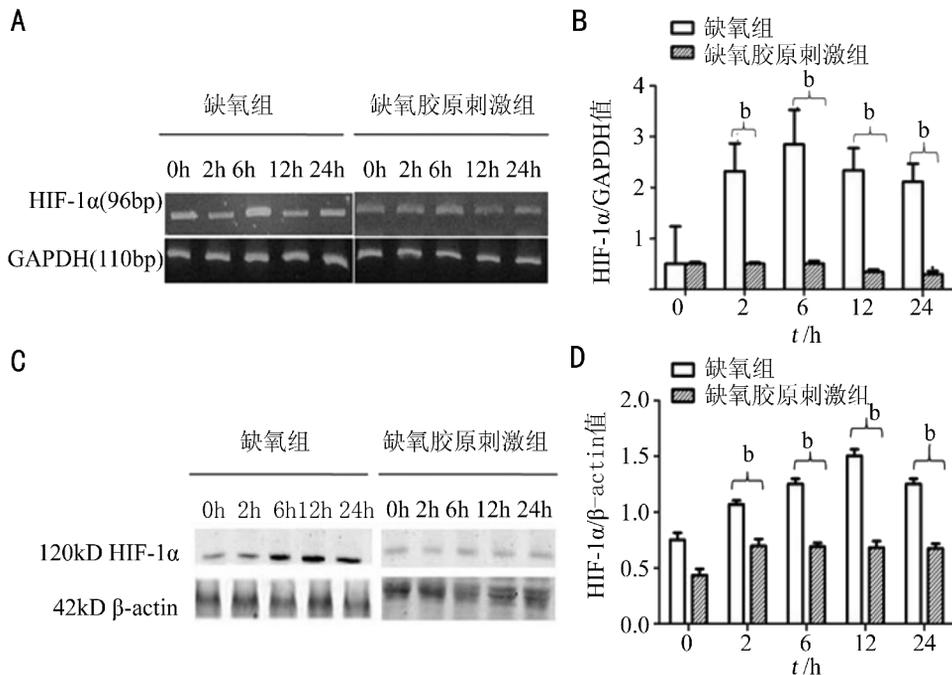


图5 RT-PCR和Western blotting检测缺氧胶原刺激下RPE细胞内HIF-1 $\alpha$ 的表达 A: RT-PCR中HIF-1 $\alpha$ 电泳条带;B: RT-PCR中HIF-1 $\alpha$ /GAPDH统计图;C: Western blotting中HIF-1 $\alpha$ 电泳条带;D: Western blotting中HIF-1 $\alpha$ /GAPDH统计图; <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 缺氧0h组。

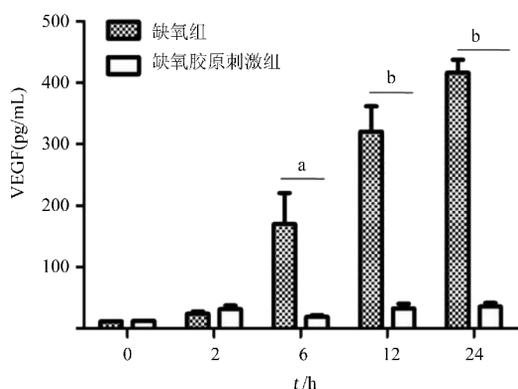


图6 ELISA检测缺氧胶原刺激下RPE细胞内VEGF的表达 <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 缺氧0h组。

的蛋白质,相对分子质量为130000<sup>[6]</sup>,主要表达在骨骼肌、平滑肌、皮肤、肺、肾脏等。激活DDR1的胶原包括I, II, III, IV, V和VIII型,而激活DDR2的胶原有I, II, III和X型<sup>[7]</sup>。相关研究发现DDRS通过与ECM相互作用,特别是被胶原激活后参与了多种细胞的迁移、黏附、分化、转移,并在肿瘤、自身免疫性疾病的发生和发展中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。有报道称通过Src信号调解,I型胶原激活DDR1诱导血管平滑肌细胞迁移<sup>[9]</sup>。本实验的意义在于通过观察胶原缺氧状态下体外培养RPE细胞中HIF-1 $\alpha$ 和VEGF的表达,探讨I型胶原在CNV发生中的作用以及DDR2参与CNV生成的可能性。

本实验采用200 $\mu$ mol/L CoCl<sub>2</sub>化学缺氧方法建立人RPE细胞体外缺氧模型。实验分组依据文献[2]中设立缺氧条件下不同时间点观测相关指标,通过免疫荧光、RT-PCR和Western blotting以及ELISA方法检测DDR2和HIF-1 $\alpha$ 及VEGF的表达,结果显示缺氧条件下RPE细

胞中DDR2表达随时间推移逐渐降低;缺氧状态下I型胶原仍能随时间推移激活RPE细胞中DDR2,使其表达增加;缺氧胶原刺激组相对于缺氧组HIF-1 $\alpha$ 和VEGF表达减少。近来,Olaso等发现在肝癌模型中,缺氧状态下DDR2基因缺失的肝星形细胞VEGF表达上调,DDR2可以通过VEGF的基因转录参与调控肿瘤细胞增生和血管生成<sup>[3]</sup>,提示DDR2参与了不同细胞缺氧状态下VEGF的表达调控。本研究中运用胶原激活DDR2表达,抑制缺氧诱导的RPE细胞HIF-1 $\alpha$ 和VEGF表达上调,将为CNV的防治提供新的思路。

眼部新生血管的发生与ECM及其受体密切相关。ECM受体是细胞与ECM相互作用的桥梁,介导细胞与基质间的相互作用。ECM分子通过与细胞表面的特异性受体结合调节多种胞内信号通路。目前发现的最重要的ECM受体主要包括整合素家族和DDRS家族。整合素和DDRS的活化过程相互独立。DDRS和整合素活化后,在调控细胞黏附、移行和分析表达的过程中存在协同作用。有研究证实,DDR1-SHP2-STAT3信号参与调控胶原诱导的细胞移行,其中STAT3是DDR1和 $\alpha 2\beta 1$ 整合素调控细胞移行的共同胞内信号靶点,二者介导的信号通路有交互作用。在胶原介导的人胰腺癌细胞上皮-间质化过程中, $\alpha 2\beta 1$ 整合素和DDR1两种受体分别独立传递信号, $\alpha 2\beta 1$ 整合素激活下游的黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK),DDR1激活下游的蛋白酪氨酸激酶pyk2,两条信号通路汇合于支架蛋白p130CAS相关的底物体系,并最终表现为N-钙黏蛋白表达上调,促进肿瘤生长、侵袭和转移<sup>[10]</sup>。Badiola等发现细胞内的FAK抑制胶原纤维生成,FAK水平和DDR2酪氨酸磷酸化水平相关,siRNA对DDR2的消耗阻断了FAK的下调<sup>[11]</sup>。而我组前期实验已证实FAK信号通路参与脉络膜血管形成,通过影响HIF-1 $\alpha$

和 VEGF 在 RPE 细胞中的表达影响血管内皮细胞的增生和移行<sup>[12]</sup>。氧化衰老、吞噬光感受器外节膜盘和细胞基质成分等因素作用下, RPE 细胞中出现 FAK 的表达及磷酸化, 提示 FAK 在 CNV 发生过程中发挥调控作用<sup>[13]</sup>。由此提示 DDR2 可能协同整合素-FAK 信号通路影响 CNV 的发生。

血管生成的重要步骤是活化的微血管内皮细胞在毛细血管基底膜和 ECM 中的入侵和移行。内皮细胞周围的 ECM 必须有选择地降解, 控制这一活动的是基质代谢酶类辅酶(matrix metalloproteinases, MMPs) 家族。我组前期有实验证实 MMPs 在 RPE 细胞移行、修复中有重要意义<sup>[14]</sup>。有科学家证实 DDR2 的活化通过 Ras/Raf/MEK/ERK 通路增加了 MMP-13 在软骨细胞中的表达<sup>[15]</sup>, DDR2 可能通过 MMP-2 调节肝星形细胞<sup>[16]</sup>和成纤维细胞移行和增生<sup>[17]</sup>, 脑肿瘤中 DDR1 呈高表达, 在胶质瘤和垂体腺瘤中都可通过上调 MMPs 的表达降解 ECM, 从而增强肿瘤的侵袭性<sup>[18]</sup>。综上所述, 研究 DDR2 影响 CNV 生成的信号通路以及其对缺氧状态下 RPE 细胞中 MMPs 表达的影响是十分有意义的, 有助于进一步探索 DDR2 在 CNV 发生机制中的作用。

致谢: 本研究得到德国洪堡基金会(Alexander von Humboldt Foundation)仪器设备捐赠基金(V-8151/02085)资助。另外, 本研究得到西京医院眼科蔡岩博士、张晓光博士、苏静波老师、马吉献老师和生化教研室马晓燕老师、卜歆技术员以及同期学习的王黎硕士、赵虎硕士在实验过程中给予的技术指导, 特此感谢。

#### 参考文献

- 侯慧媛, 王雨生. 脉络膜新生血管的组织病理学特征. 脉络膜新生血管性疾病. 北京: 人民卫生出版社 2007; 6-23
- Zhang P, Wang YS, Hui YN, *et al.* Inhibition of VEGF expression by targeting HIF-1 alpha with small interference RNA in human RPE cells. *Ophthalmologica* 2007; 221(6): 411-417
- Badiola I, Olaso E, Crende O, *et al.* Discoidin domain receptor 2 deficiency predisposes hepatic tissue to colon carcinoma metasis. *Gut* 2011; 9(2): 10-12
- 王雨生, 严密, 杨抚华. 视网膜色素上皮细胞培养技术及其应用. 中华眼底病杂志 1994; 10(4): 124-128
- Curat CA, Vogel WF. Discoidin domain receptor 1 controls growth and

- adhesion of mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(2): 2648-2656
- 王吉村, 药立波. 蛋白酪氨酸激酶 DDRs 的结构和功能研究进展. 国外医学分子生物学分册 2001; 6: 348-350
  - 郭晓娟, 胡永红. 盘状结构域受体研究进展. 中华风湿病学杂志 2009; 13(2): 127-130
  - Vogel WF, Abdulhussein R, Ford EC. Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function. *Cell Signal* 2006; 18(8): 1108-1116
  - Vogel WF. Discoidin domain receptors: structural relation and functional implication: structural relation and functional implication. *FASEB J* 1999; 13(6): 77-82
  - Lu KK, Trcka D, Bendeck MP. Collagen stimulates discoidin domain receptor 1-mediated migration of smooth muscle cells through Src-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. *Cardiovasc Pathol* 2011; 20(2): 71-76
  - Bhadriraju K, Chung KH, Spurlin TA, *et al.* The relative roles of collagen adhesive receptor DDR2 activation and matrix stiffness on the downregulation of focal adhesion kinase in vascular smooth muscle cells. *Biomaterials* 2009; 30(35): 6687-6694
  - Zhu J, Wang YS, Zhang J, *et al.* Focal adhesion kinase signaling pathway participates in the formation of choroidal neovascularization and regulates the proliferation and migration of choroidal microvascular endothelial cells by acting through HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in RPE cells. *Exp Eye Res* 2009; 88(5): 910-918
  - 朱洁, 王雨生, 赵炜, 等. 氧化衰老, 细胞外基质和光感受器外节膜盘对 RPE 细胞中黏着斑激酶表达的影响. 中华实验眼科杂志 2011; 29(6): 544-548
  - 郭长梅, 王雨生, 惠延年, 等. 基质金属蛋白酶在体外视网膜色素上皮细胞损伤模型中的表达. 国际眼科杂志 2007; 7(6): 1539-1542
  - Vonkl A, Doulabi BZ, Huang C, *et al.* Collagen-induced expression of collagenase-3 by primary chondrocytes is mediated by integrin  $\alpha$ -1 and discoidin domain receptor2; a protein kinase C-dependent pathway. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 50(3): 463-472
  - Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, *et al.* DDR2 receptor promotes MMP-2 mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest* 2001; 108(9): 1369-1378
  - Olaso E, Labrador P, Wang L. DDR2 receptor regulated fibroblast proliferation and migration through extracellular matrix by transcriptional activation of MMP-2. *J Biol Chem* 2001; 277(5): 3606-3613
  - 朱洁, 王雨生, 惠延年. 脉络膜新生血管的生成和抑制. 眼科新进展 2004; 24(1): 57-60