

反义 CD44 基因转染对人眼小梁细胞合成细胞外基质的影响

李中国¹, 王青², 梅红英², 罗一青², 陈永娟², 张宇宏², 余萍², 云亚歌², 史强²

基金项目: 中国青海省自然科学基金资助项目 (No. 2009-Z-706)
作者单位: ¹(210006) 中国江苏省南京市, 南京医科大学附属南京医院 (南京市第一医院) 眼科; ²(810001) 中国青海省西宁市, 青海大学附属医院眼科

作者简介: 李中国, 男, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 青光眼的防治。

通讯作者: 李中国. zgli2002@163.com

收稿日期: 2012-01-12 修回日期: 2012-02-29

Effect of CD44-specific antisense oligonucleotide on extracellular matrix synthesis of human trabecular meshwork cells

Zhong-Guo Li¹, Qing Wang², Hong-Ying Mei², Yi-Qing Luo², Yong-Juan Chen², Yu-Hong Zhang², Ping Yu², Ya-Ge Yun², Qiang Shi²

Foundation item: Qinghai Provincial Natural Science Foundation Project, China (No. 2009-Z-706)

¹Department of Ophthalmology, Affiliated Nanjing First Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China; ²Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China

Correspondence to: Zhong-Guo Li, Department of Ophthalmology, Affiliated Nanjing First Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. zgli2002@163.com

Received: 2012-01-12 Accepted: 2012-02-29

Abstract

• **AIM:** To observe the effect of CD44-specific antisense oligonucleotide on extracellular matrix (ECM) synthesis of human trabecular meshwork cells, then to discuss the possible relationship between CD44 and primary open angle glaucoma (POAG).

• **METHODS:** CD44-specific antisense oligonucleotide were delivered with cationic lipid to cultured human trabecular meshwork cells. Effect of CD44-specific antisense oligonucleotide on synthesis of collagen- α_1 , Laminin were examined by immunohistochemistry and the synthesis of hyaluronic acid were examined by radioimmunoassay.

• **RESULTS:** Three different concentrations of CD44 antisense oligonucleotide could promote the synthesis of collagen- α_1 , Laminin in trabecular meshwork cells and in a concentration-dependent manner. But CD44 antisense oligonucleotide inhibited the synthesis of hyaluronic acid.

• **CONCLUSION:** CD44 antisense oligonucleotide promotes the synthesis of collagen- α_1 and Laminin but inhibits the synthesis of hyaluronic acid. CD44 may play a role in pathogenesis of POAG by affecting the synthesis of ECM.

• **KEYWORDS:** trabecular meshwork cell; CD44; antisense oligonucleotide; extracellular matrix

Li ZG, Wang Q, Mei HY, et al. Effect of CD44-specific antisense oligonucleotide on extracellular matrix synthesis of human trabecular meshwork cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012; 12(4): 615-617

摘要

目的: 观察反义 CD44 基因转染对人眼小梁细胞合成细胞外基质的影响, 探讨黏附分子 CD44 在原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma, POAG) 发病过程中可能的作用。

方法: 采用硫代修饰的 CD44 反义寡核苷酸, 通过脂质体介导转染体外培养的人眼小梁细胞, 免疫组织化学染色观察 CD44 反义寡核苷酸对小梁细胞合成胶原蛋白 I 型、层黏附蛋白的影响, 放射免疫法观察 CD44 反义寡核苷酸对小梁细胞合成透明质酸的影响。

结果: CD44 反义寡核苷酸对人眼小梁细胞合成胶原蛋白 I 型、层黏附蛋白起促进作用, 且呈浓度依赖性, 浓度越高促分泌作用越强, 但对小梁细胞合成透明质酸起抑制作用, 浓度越高抑制作用越明显。

结论: CD44 反义寡核苷酸封闭 CD44 基因表达后人眼小梁细胞合成胶原蛋白 I 型、层黏附蛋白增加而合成透明质酸减少。黏附分子 CD44 可能通过影响小梁细胞合成细胞外基质功能参与了 POAG 发病过程。

关键词: 小梁细胞; CD44; 反义寡核苷酸; 细胞外基质蛋白
DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.04.05

李中国, 王青, 梅红英, 等. 反义 CD44 基因转染对人眼小梁细胞合成细胞外基质的影响. *国际眼科杂志* 2012; 12(4): 615-617

0 引言

原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma, POAG) 是常见的致盲眼病之一, 虽然其发病机制仍不清楚。但研究显示: 其主要的病理变化是小梁细胞数目减少以及细胞外基质的异常沉积^[1]。其中某些分子可能参与了这一过程^[2-4]。有研究显示: CD44 分子作为一种特殊类型的黏附分子, 在人眼小梁细胞、小梁组织及房水中均有表达^[5-9], 而 CD44 分子在调节骨关节软骨细胞分泌基质金属蛋白酶以及人软组织瘤细胞尿激酶型血浆素原激活剂及其受体的表达等方面具有重要的作用^[10, 11]。提示参

与调节小梁细胞合成细胞外基质作用可能是 CD44 分子参与 POAG 发病过程中方式之一。为此,我们观察了反义 CD44 基因转染对人眼小梁细胞合成细胞外基质的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人眼小梁组织取自本院眼库行角膜移植的供体眼,均于死后 24h 内取材。

1.2 方法

1.2.1 人眼小梁细胞的培养与鉴定 参照我们以前报道的方法^[7]采用组织块培养法获取人眼小梁细胞:角膜缘后 5mm 环形剪开巩膜,取小梁组织用 PBS 漂洗后剪成 1mm 长的碎块,接种于有少许 DMEM + F12 培养液(含 200mL/L 胎牛血清)的培养瓶中,待贴壁后加入适量上述培养液,置 37℃、含 50mL/L CO₂培养箱中培养。取第 3 代细胞传代接种于预置有消毒盖玻片的培养板中,培养至近融合,固定,免疫组织化学 SP 法行 I 和 IV 型胶原、神经特异性烯醇化酶(NSE)、层黏附蛋白(LN)、纤维连接蛋白(FN)染色进行鉴定。

1.2.2 CD44 反义寡核苷酸/LipoVec™复合物转染人眼小梁细胞 实验分空白对照组、2μmol/L 正义寡核苷酸组和 0.5,1,2μmol/L 反义寡核苷酸共 5 组。CD44 反义寡核苷酸序列为:5'-GGATCCATGGGTATGGGA-3';正义寡核苷酸序列为:5'-TCCCATACCCATGGATCC-3'(大连宝生物公司合成),序列两端各三个碱基进行硫代修饰。按脂质体(LipoVec™,Invivogen USA)转染说明:取相应的寡核苷酸和 LipoVec™混合,室温孵育 30min。取 3 代人眼小梁细胞消化传代接种于预置有消毒盖玻片的 12 孔培养板中,12h 后,加入 CD44 反义或正义寡核苷酸/LipoVec™复合物,使反义寡核苷酸的最终浓度为 0.5,1,2μmol/L,正义寡核苷酸浓度为 2μmol/L,对照组以 PBS 代替,继续培养。

1.2.3 免疫组织化学检测小梁细胞合成 I 型胶原和 LN

将接种于预置有消毒盖玻片的 12 孔培养板中的小梁细胞用 CD44 反义或正义寡核苷酸/LipoVec™复合物转染 3d 后,取出盖玻片,PBS 漂洗,1:1 体积的无水乙醇和丙酮固定。5mL/L H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶活性,滴加 10mL/L 的山羊血清封闭液,室温下置 30min,以封闭非特异性抗原。甩去山羊血清,分别滴加小鼠抗人 I 型胶原、LN 单克隆抗体,4℃湿盒过夜,PBS 冲洗 3 次,滴加羊抗鼠生物素-过氧化物酶标记的二抗,置 37℃湿盒中孵育 30min,PBS 冲洗后滴加辣根标记链霉卵白素液 37℃孵育 20min,DAB 显色,显微镜下观察出现棕黄色阳性信号,蒸馏水漂洗终止反应。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,光学树脂封片,显微镜下观察拍照。对照组以 PBS 代替一抗。采用 MPIAS-500 彩色医学图像分析系统测量免疫组织化学阳性细胞的积分光密度(OD)。

1.2.4 放射免疫法检测培养液中透明质酸的含量 接种于 12 孔培养板中的小梁细胞培养液中加入不同浓度的 CD44 反义或正义寡核苷酸/LipoVec™复合物或者等量 PBS(对照组)培养 3d 后,分别收集培养液上清,用¹²⁵I 标记的透明质酸放射免疫检测试剂盒测定培养液上清中的透明质酸含量。运用电脑自带分析软件对检测结果进行 Logit-Log 回归分析。计算出上清液中透明质酸的浓度。

统计学分析:数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学分析。两组间差异比较采用 *t* 检验,取 *P* < 0.05 时差异有统计学意义。

表 1 CD44 反义寡核苷酸对小梁细胞合成 I 型胶原和 LN 的影响 $\bar{x} \pm s$

分组	I 型胶原	LN
对照组	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.03
2.0μmol/L 正义组	0.17 ± 0.04 ^c	0.18 ± 0.05 ^c
0.5μmol/L 反义组	0.21 ± 0.04 ^a	0.21 ± 0.04 ^a
1.0μmol/L 反义组	0.25 ± 0.03 ^a	0.26 ± 0.06 ^a
2.0μmol/L 反义组	0.28 ± 0.06 ^a	0.29 ± 0.05 ^a

^a*P* < 0.05, ^c*P* > 0.05 vs 对照组。

表 2 CD44 反义寡核苷酸对小梁细胞合成透明质酸的影响

分组	透明质酸含量 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)
对照组	276.31 ± 12.46
0.5μmol/L 反义组	224.16 ± 10.66 ^a
1.0μmol/L 反义组	175.69 ± 10.32 ^a
2.0μmol/L 反义组	135.88 ± 16.43 ^a
2.0μmol/L 正义组	274.08 ± 12.46 ^c

^a*P* < 0.05, ^c*P* > 0.05 vs 对照组。

2 结果

2.1 人眼小梁细胞的培养及鉴定 人眼小梁组织培养 10 ~ 15d 可见组织块周边有细胞增殖移出,细胞形态不一,核圆形或椭圆形,约 8 ~ 15d 局部融合。消化传代 24h 大部分细胞贴壁,多呈不规则的三角形或梭形,大约 10d 左右融合。细胞爬片 I 和 IV 型胶原、FN、LN 及 NSE 染色均呈阳性。符合人眼小梁细胞的特点。

2.2 CD44 反义寡核苷酸对小梁细胞合成 I 型胶原和 LN 的影响 各组 I 型胶原和 LN 免疫组织化学染色的光密度值见表 1,三种浓度的 CD44 反义寡核苷酸处理组的光密度值均高于对照组,经统计学处理,差异有统计学意义 (*P* < 0.05),表明此浓度组的 CD44 反义寡核苷酸能够促进 I 型胶原和 LN 的合成。而 2.0μmol/L 正义 CD44 寡核苷酸组则无此作用 (*P* > 0.05;图 1,2)。

2.3 CD44 反义寡核苷酸对小梁细胞合成透明质酸的影响 用¹²⁵I 标记的透明质酸放射免疫检测试剂盒测定各组透明质酸含量见表 2,空白对照组与正义寡核苷酸组比较无统计学差异 (*P* > 0.05),而三种浓度的 CD44 反义寡核苷酸组培养液上清中透明质酸平均浓度与对照组和正义寡核苷酸组比较,差异有统计学意义 (*P* < 0.05),且呈现浓度依赖性,CD44 反义寡核苷酸浓度越高,分泌的透明质酸的浓度越低。说明 CD44 反义寡核苷酸浓度依赖性抑制小梁细胞合成透明质酸。

3 讨论

小梁网作为房水流出的主要通道,在调节房水外流及控制眼压方面具有重要作用。研究显示:房水流出的主要阻力部位在小梁网尤其是富含糖蛋白的近小管区,而小梁网主要是由各种细胞外基质组成的小梁柱以及内衬的小梁细胞组成,目前认为 POAG 主要的病理变化之一就是小梁细胞的异常丢失以及细胞外基质的异常沉积,尤其是在邻管组织的异常沉积^[12]。因而对小梁细胞功能特性的研究越来越受到重视。其中多种黏附分子水平改变可能参与小梁细胞的异常丢失以及功能改变过程^[2-4]。

黏附分子 CD44 是一种广泛分布于多种细胞表面的跨膜糖蛋白,通过与其主要配体透明质酸结合,参与细胞

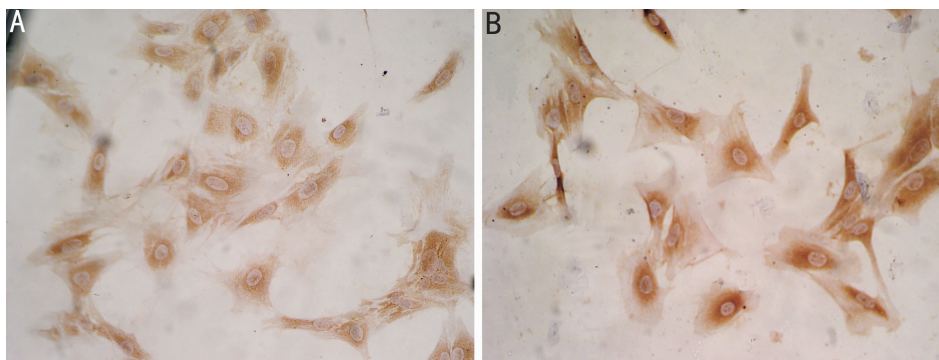


图1 各组人眼小梁细胞 I 型胶原蛋白染色 (SP × 200) A: 对照组; B: 2 μmol/L CD44 反义寡核苷酸组。

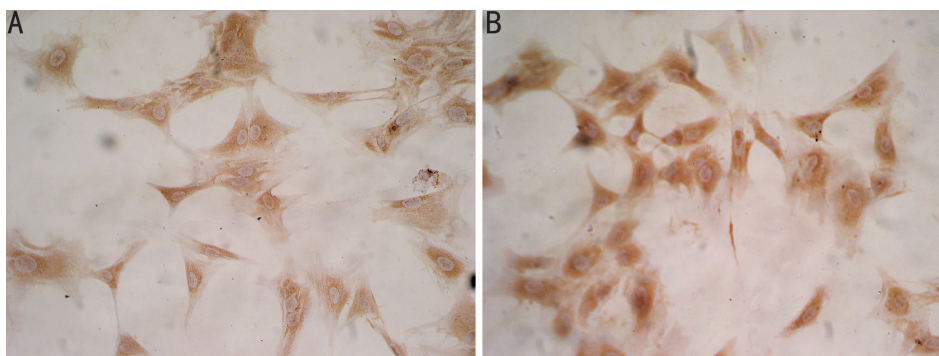


图2 各组人眼小梁细胞 LN 染色 (SP × 200) A: 对照组; B: 2 μmol/L CD44 反义寡核苷酸组。

多种功能的调节。在眼部, CD44 分子在小梁组织和小梁细胞有表达, 并且参与了小梁细胞的黏附、聚集、增殖等生物学功能的调节^[13]。为探讨 CD44 对小梁组织细胞外基质的影响, 我们采用特异性 CD44 反义核苷酸封闭 CD44 的基因表达来观察 CD44 分子对小梁细胞功能的影响。结果显示: CD44 反义寡核苷酸封闭 CD44 的基因表达后小梁细胞 LN 以及 I 型胶原合成增加, 而合成透明质酸的能力降低。提示参与对小梁细胞合成细胞外基质的调节可能是 CD44 参与 POAG 发病的机制之一。

分泌基质金属蛋白酶是小梁细胞的一种重要功能, 而对基质金属蛋白酶合成分泌进行调节可能是 CD44 参与对小梁细胞合成细胞外基质调节的途径之一。Yasuda 等^[10]运用免疫印迹、免疫荧光等方法观察了抗 CD44 抗体对体外培养的骨关节软骨细胞分泌基质金属蛋白酶 1, 2, 9, 13 等的影响, 发现抗 CD44 抗体明显抑制基质金属蛋白酶的分泌。另外, Kobayashi 等^[11]研究发现: CD44 分子可以在 mRNA 及蛋白水平明显上调人软骨肉瘤细胞尿激酶型血浆素原激活剂及其受体的表达。提示除了对基质金属蛋白酶进行调节, CD44 还可能通过对尿激酶的调节间接参与对小梁细胞合成细胞外基质的调节。

综上所述, 反义核酸封闭 CD44 基因表达后人眼小梁细胞合成 LN 和 I 型胶原增加, 而合成透明质酸减少, 结合 Knepper 等^[6]的研究, POAG 患者小梁组织中 CD44 的表达明显低于正常患者, 我们认为黏附分子 CD44 可能通过影响小梁细胞合成细胞外基质的功能参与了 POAG 的发病过程。

参考文献

- 1 Keller KE, Mini A, Bradley JM, et al. Extracellular Matrix Turnover and Outflow Resistance. *Exp Eye Res* 2009;88(4):676-682
- 2 Robertson JV, Golesic E, Gauldie J, et al. Ocular genetransfer of active TGF-β induces changes in anterior segment morphology and

- elevated IOP in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(1):308-318
- 3 Comes N, Buie LK, Borrás T. Evidence for a role of angiopoietin-like 7 (ANGPTL7) in extracellular matrix formation of the human trabecular meshwork: implications for glaucoma. *Genes Cells* 2011;16(2):243-259
- 4 Comes N, Borrás T. Individual molecular response to elevated intraocular pressure in perfused postmortem human eyes. *Physiol Genomics* 2009;38:205-225
- 5 Budak YU, Akdogan M, Huysal K. Aqueous humor level of sCD44 in patients with degenerative myopia and primary open-angle glaucoma. *BMC Research Notes* 2009;8(2):224-227
- 6 Knepper PA, Goossens W, Mayanil CS. CD44H localization in primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(5):673-680
- 7 Li ZG, Zhang H. Expression of CD44 in cultured human trabecular meshwork cells. *Eye Science* 2004;20(1):52-56
- 8 Mokbel TH, Ghanem AA, Kishk H, et al. Erythropoietin and soluble CD44 levels in patients with primary open-angle glaucoma. *Clin Experiment Ophthalmol* 2010;38(6):560-565
- 9 Nolan MJ, Giovingo MC, Miller AM, et al. Aqueous humor sCD44 concentration and visual field loss in primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 2007;16(5):419-429
- 10 Yasuda T, Poole AR, Shimizu M, et al. Involvement of CD44 in induction of matrix metalloproteinases by a COOH-terminal heparin-binding fragment of fibronectin in human articular cartilage in culture. *Arthritis Rheum* 2003;48(5):1271-1280
- 11 Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, et al. CD44 stimulation by fragmented hyaluronic acid induces upregulation of urokinase-type plasminogen activator and its receptor and subsequently facilitates invasion of human chondrosarcoma cells. *Int J Cancer* 2002;102(4):379-389
- 12 Johnson M. What controls aqueous humour outflow resistance. *Exp Eye Res* 2006;82(4):545-557
- 13 Li ZG, Zhang H. Effect of CD44 suppression by antisense oligonucleotide on attachment of human trabecular meshwork cells to HA. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2004;24(5):486-489