

# 促红细胞生成素小干扰 RNA 对兔角膜新生血管的抑制作用

薛雨顺<sup>1</sup>, 秦莉<sup>2</sup>, 杨乐<sup>1</sup>, 朱涛<sup>1</sup>, 石蕊<sup>1</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(710068) 中国陕西省西安市, 陕西省人民医院眼科;<sup>2</sup>(710068) 中国陕西省西安市, 西安交通大学第一附属医院眼科

作者简介: 薛雨顺, 副主任医师, 研究方向: 白内障。

通讯作者: 石蕊, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病、眼表疾病。vivianlio@163.com

收稿日期: 2016-09-20 修回日期: 2017-02-15

## Inhibition of erythropoietin siRNA on corneal neovascularization of rabbit

Yu - Shun Xue<sup>1</sup>, Li Qin<sup>2</sup>, Le Yang<sup>1</sup>, Tao Zhu<sup>1</sup>, Rui Shi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Rui Shi. Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China. vivianlio@163.com

Received: 2016-09-20 Accepted: 2017-02-15

## Abstract

• AIM: To observe the expression of erythropoietin (EPO) on the corneal of rabbit and evaluate the inhibition effect of EPO siRNA on corneal neovascularization (CNV).

• METHODS: Totally 22 healthy rabbits were randomly divided into 2 groups, which were experimental group and normal control group. Both eyes of rabbits in experimental group were chosen to establish corneal neovascularization model by alkali burn. The morphologic change of corneal was observed with slit lamp microscope and the area of CNV was calculated every day. After alkali burn, the right eye of the experimental group was accepted EPO siRNA injection under the conjunctiva, and the left eye was assigned to be experimental control group. The corneal with CNV was collected for immunohistochemistry at 3d, 7d, 14d, 21d after alkali burn, and the expression of EPO was measured.

• RESULTS: CNV began growing at the 3d after alkali burn in experimental group, and it was vigorous growing at 7d-14d period. The result of immunohistochemistry shows that the expression of EPO increased after the operation. Compared with experimental group, the rabbits who were treated by EPO siRNA was found with less

neovascularization on their corneal, and the expression of EPO decreased. There were statistical significance between the two group at different time ( $P < 0.05$ ).

• CONCLUSION: EPO is likely to play an important role on CNV growth, and EPO siRNA can inhibit the growth of CNV by restraining the expression of EPO.

• KEYWORDS: siRNA; corneal neovascularization; erythropoietin; rabbit

Citation: Xue YS, Qin L, Yang L, et al. Inhibition of erythropoietin siRNA on corneal neovascularization of rabbit. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(3):432-435

## 摘要

目的: 评估促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 在兔角膜新生血管发病机制中的作用, 并观察促红细胞生成素小干扰 RNA (siRNA) 对角膜新生血管的抑制作用。

方法: 健康新西兰白兔 22 只, 随机分为实验组及正常对照组, 实验组兔双眼行碱烧伤法建立角膜新生血管模型, 造模后每日裂隙灯检查角膜形态学改变并计算新生血管面积, 同时自造模当日起右眼每日结膜下注射 siRNA 1U 组成 siRNA 治疗组, 左眼以 control siRNA 为实验对照组, 分别于术后 3、7、14、21d 取角膜组织行免疫组化染色, 观察 EPO 的表达情况。

结果: 实验组最早于碱烧伤后 3d 可见 CNV 长入, 7~14d 生长最为旺盛, 免疫组织化学染色见随碱烧伤时间延长, 角膜 EPO 的表达逐渐增加; siRNA 治疗后 CNV 延迟长入, 面积较实验对照组明显减小, 炎性细胞浸润减轻, 且角膜中 EPO 的表达较前者明显降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

结论: EPO 可能在 CNV 的发生发展中发挥重要作用, 碱烧伤后 siRNA 的早期干预可能通过影响 EPO 的表达而抑制 CNV 的生长。

关键词: siRNA; 角膜新生血管; 促红细胞生成素; 兔

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.3.10

引用: 薛雨顺, 秦莉, 杨乐, 等. 促红细胞生成素小干扰 RNA 对兔角膜新生血管的抑制作用. *国际眼科杂志* 2017;17(3):432-435

## 0 引言

角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 是多种眼部疾病的常见并发症, 也是常见的致盲眼病之一。对于其发生机制的研究认为, 创伤后组织的缺血缺氧及炎症反应是 CNV 发生的始动因素之一, 进而机体反应所产生的各种细胞因子所形成的网络精确地调控着 CNV 的发生发展。近年研究发现, 促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO)

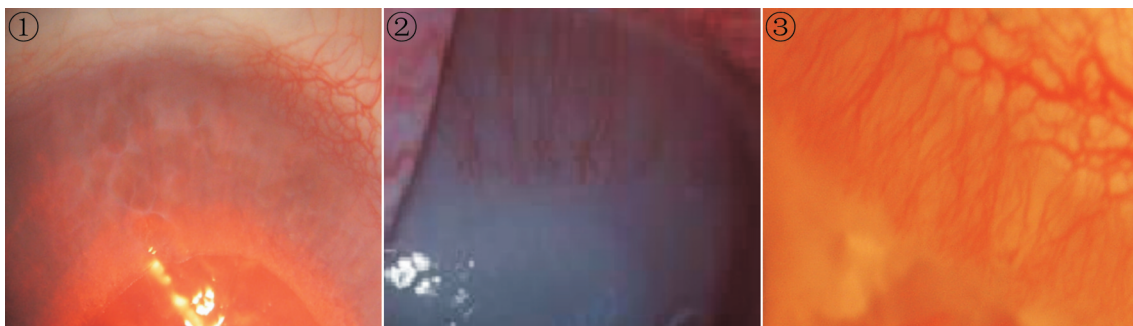


图1 实验对照组碱烧伤后 3d 可见散在新生血管芽长入。

图2 实验对照组碱烧伤后 14d,新生血管长入约 6mm,血管排列整齐,可见少量分支吻合。

图3 siRNA 治疗组碱烧伤后 14d,新生血管长入约 4mm。

在血管内皮细胞上有表达,提示 EPO 可能具有促进新生血管形成的作用<sup>[1]</sup>。为进一步发现 EPO 在 CNV 发生中的作用,并评估以其为“靶点”的治疗方向的有效性,我们制备了兔 CNV 模型,并以促红细胞生成素小干扰 RNA (siRNA)治疗,进一步探索 CNV 发生的部分机制,为临床 CNV 的治疗提供方向。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康新西兰白兔 22 只,裂隙灯显微镜检查双眼无疾患。随机选取分为实验组(20 只 40 眼)和正常对照组(2 只 4 眼),实验组双眼行角膜碱烧伤诱导新生血管生长。

### 1.2 方法

**1.2.1 模型制备<sup>[2]</sup>** 氯胺酮 50mg/kg 和异丙嗪 25mg/kg 按 1:1 比例混合,背部皮下注射全身麻醉,爱尔凯因点眼 3 次表面麻醉。棉片清除结膜囊液体,直径 2~2.5mm 的圆形滤纸片浸入 1mol/L NaOH 溶液 1min 后,待滤纸片达饱和后置于兔右眼角膜中央 10s,取下滤纸,用 0.9% 生理盐水冲洗角膜及结膜囊 1min;实验组兔左眼用 0.9% 生理盐水代替 1mol/L NaOH 溶液做自身对照,碱烧伤后 3d 每日滴抗生素眼药水及眼膏预防感染。自造模当日起右眼每日 6:00 位结膜下注射 siRNA 1U,组成 siRNA 治疗组,左眼以 control siRNA 为实验对照组。

**1.2.2 角膜新生血管的模型观察** 碱烧伤后 21d 内,每天裂隙灯显微镜观察角膜形态学改变。CNV 出现后,每天用游标卡尺测量自角膜缘长出的新生血管长度。每次测量时以连续弯曲度小、朝向角膜中心生长的最长血管的垂直长度为准,并按照 Robert 电脑数字公式<sup>[3]</sup>  $S = C/12 \times 3.14 \times [r^2 - (r-l)^2]$ , 计算 CNV 面积。其中 C 为新生血管累及角膜的圆周钟点数,  $r$  为角膜半径(兔角膜半径约为 7mm),  $l$  为角膜新生血管从角膜缘深入角膜的长度。

**1.2.3 siRNA 的制备及筛选** 为了有效抑制 EPO 的表达,设计并合成的小干扰 RNA 由武汉市巴菲儿生物公司设计并合成。根据人类基因库(NCBI, GENE BANK)中人 EPO 基因的 mRNA 序列设计化学合成 2 对靶向 EPO siRNA: SiEPO1 正义链(5'-3') GGUACAUCU UAGAGGCCAAAdTdT, 反义链(3'-5') dTdTCCAUGUAGAAUCUCCGGUU; SiEPO2 正义链(5'-3') AAAAGAAUGGAGUGGAAGAAAdTdT, 反义链(3'-5') dTdTUUUUCUUACCUCCACCUUCUU, 并设立阴性对照。采用脂质体转染的方法转染 NIH3T3 细胞(武汉市巴菲儿生物公司,转染浓度为 100nmol/L),通过 RT-PCR 技术检测 EPO siRNA 对细胞内 EPO mRNA 表达的抑制效果。根

据公式: EPO 表达抑制效率 = (空白对照细胞灰度值 - 转染 siRNA 细胞灰度值) / 空白对照细胞灰度值  $\times 100\%$ , 计算 EPO siRNA 对细胞中 EPO 表达的抑制效率,其中 siEPO2 对 EPO mRNA 抑制效率最高,抑制效率达到了 79%,而被选为治疗所用。实验组造模后每日结膜下注射 siRNA 2 $\mu$ L,对侧眼注射 control siRNA 2 $\mu$ L。观察角膜新生血管抑制情况。

**1.2.4 角膜组织 HE 染色及免疫组织化学检查** 分别于碱烧伤后 3、7、14、21d 各时间点取 5 只兔(每组 5 眼),处死后取带 1mm 宽巩膜的角膜后,取新生血管生长侧 2/3 角膜组织,福尔马林固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,切片,切片厚度为 4 $\mu$ m,展片。烤片 1h 后,置 37 $^{\circ}$ C 恒温箱内干燥过夜。HE 染色观察角膜组织的基本形态,SP 法行免疫组化染色:石蜡切片常规脱蜡至水、封酶、用 TBS 将兔抗 EPO 一抗按 1:70 倍稀释,血清封闭,滴加一抗,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素(TBS 稀释)、DAB 显色、苏木素染色 8min,依次脱水、透明、封片。显微镜观察。

**1.2.5 结果判定** 以组织内出现棕黄色颗粒为阳性判断标准。按照染色程度的深浅可分为 5 级: -级,细胞核和细胞间质不着色; +级,标本内绝大多数细胞可疑阳性,少部分细胞(<10%)可辨别为阳性; ++级,标本内大部分阳性细胞呈清楚可辨的棕黄色,但未达到+++级那么鲜艳; +++级,细胞染色典型,呈鲜艳的棕色; ++++级,超过 10% 阳性细胞染色成棕黑色。随机选择视野拍照记录。

统计学分析:数据资料用 SPSS20.0 统计软件包处理。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间及各时间点的比较采用重复测量数据的方法分析,同一时间点的组间用独立样本  $t$  检验,不同时间点之间比较采用 LSD- $t$  检验。等级资料采用 Wilcoxon 秩和检验。相关性分析采用 Spearman 相关分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 角膜形态学观察** 实验对照组最早于第 3d 见新生血管芽(图 1),平均长出时间为  $4.20 \pm 1.17$ d, 7d 生长达角膜缘内 3mm 左右,出现分枝状吻合,14d 达角膜缘内 6mm (图 2),此后生长速度减慢; 21d 达角膜中央, CNV 单支管径变粗,血管分枝交织成网各时间点差异有统计学意义( $F = 3.156, P = 0.020$ )。siRNA 治疗组造模后 7d CNV 长出,平均  $7.86 \pm 1.62$ d, 14d 达 4mm (图 3),以后 CNV 生长速度减慢, 21d 达 5mm, 比实验对照组 CNV 的长度明显变短( $F = 4.985, P = 0.01$ )及面积显著减小( $F = 5.301, P = 0.009$ )。

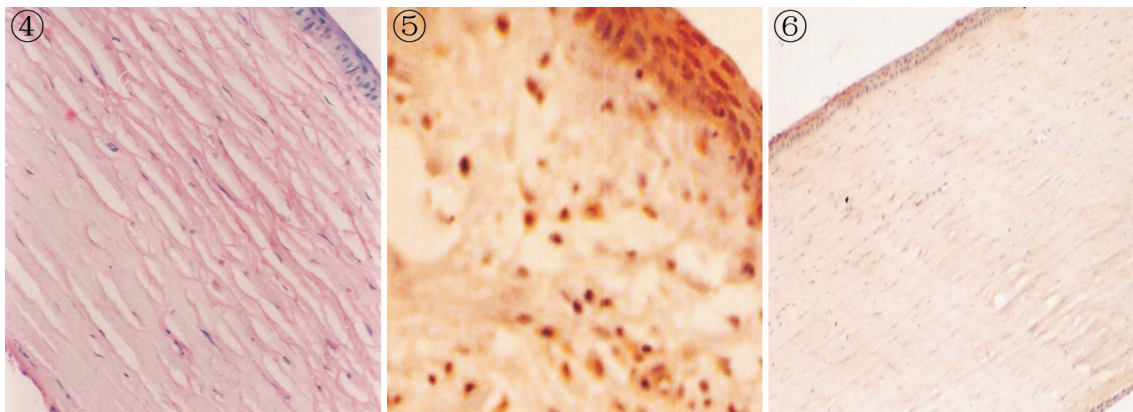


图4 正常对照组兔角膜组织 HE 染色,各层组织排列整齐( $\times 200$ )。  
 图5 实验对照组角膜上皮细胞内可见 EPO 呈阳性表达增强( $\times 400$ )。  
 图6 实验组 14d( siRNA 治疗组 ),上皮细胞及内皮细胞面的 EPO 表达较对照组明显减轻( $\times 200$ )。

表1 两组碱烧伤后不同时间点 CNV 面积比较 ( $\bar{x} \pm s, \text{mm}^2, n=5$ )

组别	碱烧伤			
	3d	7d	14d	21d
siRNA 治疗组	0.00 $\pm$ 0.00	5.43 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	13.16 $\pm$ 2.01 <sup>a</sup>	16.61 $\pm$ 1.24 <sup>a</sup>
实验对照组	0.00 $\pm$ 0.00	10.20 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>	17.13 $\pm$ 1.29 <sup>a</sup>	22.80 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup>

注:<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 碱烧伤 3d。

表2 三组碱烧伤后不同时间点角膜全层的 EPO 表达阳性情况

组别	碱烧伤			
	4d	7d	14d	21d
实验对照组	+ ~ ++	++ ~ +++	+++ ~ ++++	+++
siRNA 治疗组	+	+ ~ ++	++	++
正常对照组	- ~ +	- ~ +	- ~ +	- ~ +

注:因为是等级资料,不能做均数统计,所以表格中“- ~ +”表示正常对照组中 IL-1 $\beta$  的表达有“-”和“+”两种情况存在。Wilcoxon 秩和检验进行各组之间的比较。

组间  $t$  检验:同一时间点, siRNA 治疗组 CNV 的面积明显小于实验对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表 1)。

**2.2 HE 染色观察角膜形态学变化和免疫组化检测角膜组织 EPO 的表达** HE 染色可见角膜全层结构清晰(图 4)。正常对照组:角膜上皮层及内皮层有极微量 EPO 的表达。实验对照组:碱烧伤后 3、7、14、21d,角膜上皮细胞、内皮细胞及新生血管内皮细胞中 EPO 的阳性表达逐渐增强,14d 时表达最强(图 5),21d 时较前减弱。siRNA 治疗组:EPO 的表达程度较实验对照组明显减弱(图 6,表 2)。Wilcoxon 秩和检验及 Spearman 相关分析提示:EPO 的表达在 siRNA 治疗组与实验对照组间存在统计学差异( $\chi^2 = 5.105, P = 0.039$ )。且其表达量与 CNV 面积正相关( $r = 0.876, P < 0.01$ )。

### 3 讨论

新生血管可改变角膜的“相对免疫赦免”状态,导致视力下降甚至失明,但迄今为止,其确切的发病机制仍不完全清楚。近年来,研究认为,各种参与血管生成因子的激活与相互调控作用可能在其中发挥着重要作用<sup>[4-6]</sup>。研究发现,EPO 是贫血及缺氧时的一种应答反应,作为血管内皮细胞的分裂原展现出与 VEGF 相当的促血管生成潜力,其在各种组织新生血管发生中发挥着重要作用<sup>[7-8]</sup>。早产儿视网膜病变、增殖性糖尿病性视网膜病变、翼状胬肉等疾病发生时 EPO 水平增高<sup>[9-11]</sup>,提示 EPO 可能与病理性眼部血管生成有关<sup>[12]</sup>。

对于 EPO 在眼部新生血管发生中的作用,主要集中在

在视网膜新生血管的研究<sup>[13]</sup>,而其是否在各种原因引起的角膜缺血缺氧所致新生血管的发病中同样发挥着重要作用,目前尚未见相关的报道。为进一步明确 EPO 在角膜新生血管发生中的作用,我们通过碱烧伤法诱导兔角膜新生血管形成,并通过免疫组化法检测 CNV 组织中 EPO 的表达情况。结果发现,正常兔角膜上皮层及内皮层有极微量 EPO 的表达。而碱烧伤后 3、7、14、21d,角膜上皮细胞、内皮细胞及新生血管内皮细胞中 EPO 的阳性表达逐渐增强,14d 时表达最强,21d 时较前减弱,且 EPO 的表达量与 CNV 面积正相关。结合既往的研究结果,我们推测,角膜碱烧伤后,角膜血管网堵塞,形成缺血缺氧微环境,从而刺激 EPO 的表达,促进血管新生,损伤后 7d 各种原因所致组织缺氧达高峰,同时 EPO 的表达最强,此后随着组织各种代偿机制的启动,角膜缺氧状态改善,EPO 的表达减弱,CNV 生长减慢,并逐渐出现部分退化。EPO 与 CNV 在时间上的一致性说明 EPO 可能与 CNV 的生长密切相关。这进一步验证了罗灵等<sup>[12]</sup>的研究结果。但其促血管新生的具体机制及相关因子的表达还需进一步研究。

在角膜新生血管发生的部分机制日渐清晰后,针对于 CNV 的治疗方法也日新月异。目前对于 CNV 的不同发生机制,其治疗主要有抗炎<sup>[14]</sup>和抑制新生血管生长因子<sup>[15]</sup>两个主要方向。糖皮质激素作为传统用药副作用大,贝伐单抗等抗 VEGF 药物还未获批正式应用于角膜疾病的治疗,因此我们仍然期待寻找不同途径抑制 CNV 生长的新方法。为进一步确认 EPO 在抗新生血管生长中的作用,因此我们通过以 EPO 为“靶点”制备的促红细胞生成素小干扰 RNA (siRNA) 特异性阻断 EPO 的表达,从而观察其对 CNV 的影响。结果发现:碱烧伤后,经 siRNA 早期干预的实验眼,通过特异性阻断 EPO 的表达,从而影响其相关细胞因子的表达,从而发挥抑制 CNV 的目的,差异具有统计学意义。因此我们认为,针对 EPO 的药物可能为临床 CNV 的治疗提供新的方向。

综上所述,我们的研究首次报道在角膜新生血管组织 EPO 表达增加,EPO siRNA 可以抑制 EPO 的表达,减小 CNV 的面积。这些结果进一步证实 EPO 在角膜新生血管的形成机制中起一定的作用。且 EPO 为靶点的治疗可能成为治疗角膜新生血管疾病的新方法。然而,EPO 在角膜新生血管中的具体作用机制,以及 EPO siRNA 在人体中的应用还需要进一步研究。

## 参考文献

- 1 Zhou M, Chen S, Wang W, *et al.* Levels of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in surgery - required advanced neovascular glaucoma eyes before and after intravitreal injection of bevacizumab. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(6):3874-3879
- 2 Dursun A, Arici MK, Dursun F, *et al.* Comparison of the effects of bevacizumab and ranibizumab injection on corneal angiogenesis in an alkali burn induced model. *Int J Ophthalmol* 2012;5(4):448
- 3 王峰, 石蕊, 赵琳. 兔角膜及房水中 VEGF 的表达与角膜新生血管形成的相关性. *国际眼科杂志* 2007;7(5):1311-1313
- 4 Chang JH, Garg NK, Lunde E, *et al.* Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review. *Sur Ophthalmol* 2012;57(5):415-429
- 5 Wara AK, Foo SY, Croce K, *et al.* TGF- $\beta$ 1 signaling and Krüppel-like factor 10 regulate bone marrow - derived proangiogenic cell differentiation, function, and neovascularization. *Blood* 2011;118(24):6450-6460
- 6 Oladipupo SS, Hu S, Santeford AC, *et al.* Conditional HIF-1 induction produces multistage neovascularization with stage-specific sensitivity to VEGFR inhibitors and myeloid cell independence. *Blood* 2011;117(15):4142-4153
- 7 Sasahara M, Otani A, Yodoi Y, *et al.* Circulating hematopoietic stem cells in patients with idiopathic choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(4):1575-1579
- 8 Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, *et al.* Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003;102(4):1340-1346
- 9 Terrin MG, Faiella A, Magli A, *et al.* Early Administration of Erythropoietin Increase the Risk of Retinopathy of Prematurity. *Pediatric Research* 2011;70:741
- 10 Wang Q, Gorbey S, Pfister F, *et al.* Long-term treatment with suberythropoietic Epo is vaso- and neuroprotective in experimental diabetic retinopathy. *Cell Physiol Biochem* 2011;27(6):769-782
- 11 Rocha EM, Cotrim AP, Zheng C, *et al.* Recovery of radiation-induced dry eye and corneal damage by pretreatment with adenoviral vector-mediated transfer of erythropoietin to the salivary glands in mice. *Human Gene Therapy* 2013;24(4):417-423
- 12 罗灵, 陈浩宇, 张卯年, 等. 促红细胞生成素 (Epo) 及其受体 (EpoR) 在正常及碱烧伤诱导的鼠新生血管化角膜上的表达. *国际眼科杂志* 2008;8(5):857-860
- 13 Feng Y. Transcription of Inflammatory Cytokine TNF $\alpha$  is Upregulated in Retinal Angiogenesis under Hyperoxia. *Cell Physiol Biochem* 2016;39(2):573-583
- 14 Loewenstein A, Kuppermann BD, Weinberger D, *et al.* Safety and efficacy of OZURDEX<sup>TM</sup> (Dexamethasone Intravitreal Implant) as adjunctive therapy to lucentis (R) in patients with choroidal neovascularization (CNV) secondary to age-related macular degeneration (AMD). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(5):1255
- 15 Tseng JJ, Vance SK, Della Torre KE, *et al.* Sustained increased intraocular pressure related to intravitreal antivascular endothelial growth factor therapy for neovascular age-related macular degeneration. *J Glaucoma* 2011;21(4):241-247