

# 高糖对视网膜 Müller 细胞 VEGF, EPO 和 EPOR mRNA 表达的影响

郭 龙<sup>1</sup>, 许惠卓<sup>2</sup>, 夏晓波<sup>2</sup>, 毛俊峰<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(410008) 中国湖南省长沙市, 中南大学湘雅医学院;<sup>2</sup>(410008) 中国湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院眼科

作者简介: 郭龙, 硕士研究生, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 许惠卓, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病。  
xu\_huizhuo@163.com

收稿日期: 2009-12-07 修回日期: 2010-02-25

## Effect of high levels of glucose on expressions of VEGF, EPO and EPOR in retinal Müller cells

Long Guo<sup>1</sup>, Hui-Zhuo Xu<sup>2</sup>, Xiao-Bo Xia<sup>2</sup>, Jun-Feng Mao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Xiangya Medical College, Central-South University, Changsha 410008, Hunan Province, China; <sup>2</sup> Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital of Central-South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Correspondence to: Hui-Zhuo Xu. Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital of Central-South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. xu\_huizhuo@163.com

Received: 2009-12-07 Accepted: 2010-02-25

### Abstract

• AIM: To observe the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), erythropoietin (EPO), erythropoietin receptor (EPOR) mRNA in different levels of glucose in the retinal Müller cells of mice *in vitro*.

• METHODS: Müller cells of new-born mice were cultured with enzyme digestion. Müller cells were separated and purified by blowing and striking method. The expressions of VEGF mRNA, EPO mRNA, and EPOR mRNA were detected by RT-PCR.

• RESULTS: Retinal Müller cells were cultured successfully, 90% of which were positively stained by glutamine synthetase (GS). The expressions of VEGF mRNA, EPO mRNA and EPOR mRNA in retinal Müller cells were significantly enhanced in the high glucose group which increased obviously ( $P < 0.05$ ), but the difference between 50mmol/L group and the 40mmol/L group did not have statistical significance or time dependence.

• CONCLUSION: With glucose concentration elevating, VEGF, EPO, EPOR expression of cultured retinal Müller cells increased.

• KEYWORDS: retinal Müller cells; vascular endothelial growth factor; erythropoietin; erythropoietin receptor; neovascularization

Guo L, Xu HZ, Xiao XB, *et al*. Effect of high levels of glucose on expressions of VEGF, EPO and EPOR in retinal Müller cells. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(3):449-452

### 摘要

目的: 观察高糖条件下 VEGF mRNA, EPO mRNA 和 EPOR mRNA 在体外培养的 Müller 细胞中的表达情况。

方法: 胰蛋白酶将新生小鼠视网膜组织吹打消化后, 制成单细胞悬液, 体外培养 Müller 细胞, RT-PCR 测定高糖条件下视网膜 Müller 细胞 VEGF, EPO 和 EPOR 基因的表达。

结果: 成功获得视网膜 Müller 细胞, 传代后 90% 以上的细胞呈兔抗鼠谷氨酰胺合酶 (GS) 染色阳性。Müller 细胞 VEGF mRNA, EPO mRNA 和 EPOR mRNA 在高糖条件下表达升高, 且呈浓度依赖性 ( $P < 0.05$ ), 但糖浓度 50mmol/L 组较 40mmol/L 组差异无统计学意义, 无明显时间依赖性。

结论: Müller 细胞在高糖条件下 VEGF, EPO, EPOR 的表达增加。

关键词: 视网膜 Müller 细胞; 血管内皮生长因子; 促红细胞生成素; 促红细胞生成素受体; 新生血管

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.03.015

郭龙, 许惠卓, 夏晓波, 等. 高糖对视网膜 Müller 细胞 VEGF, EPO 和 EPOR mRNA 表达的影响. 国际眼科杂志 2010;10(3):449-452

### 0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病最常见、最严重的微血管并发症之一, 是患者视力丧失的主要原因。视网膜 Müller 细胞为一种特殊的神经胶质细胞, 在病理因素下, 参与 DR 的发生。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 具有血管生成素的活性<sup>[1]</sup>。已经发现, VEGF 主要由视网膜 Müller 细胞分泌, 近来 Fu 等<sup>[2]</sup>发现, 正常视网膜组织中的 EPO 主要是由 Müller 细胞产生的。而增生性视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 患者的眼玻璃体中的 EPO 浓度增高, 与血清中 EPO 浓度无关<sup>[3]</sup>。那么, 视网膜 Müller 细胞中 VEGF, EPO 和促红细胞生成素受体 (erythropoietin receptor, EPOR) 的表达受哪些因素调控呢? 是否与细胞周围环境中糖浓度有关呢? 同时, 还是与葡萄糖作用时间有关呢? 为了证实以上假设, 我们采用不同葡萄糖浓度干预小鼠视网膜 Müller 细胞, 并且同一糖浓度组干预不同的时间, 然后观察 Müller 细胞 VEGF, EPO 和 EPOR 基因表达的变化, 从而探讨高糖对视网膜 Müller 细胞 VEGF, EPO 和 EPOR 基因表达的调控作用。

### 1 材料和方法

1.1 材料 出生 7d 的清洁级健康昆明小鼠, 由中南大学

湘雅医学院动物学部提供。逆转录试剂盒(Promeg公司),Simply P总RNA提取试剂盒(Solarbio公司),兔抗鼠谷氨酰胺合酶(GS)(美国Adi公司),高糖型和低糖型DMEM培养液(美国Hyclone公司),胎牛血清(FBS)(灏洋生物技术公司),PCR试剂盒(大连宝生物有限公司),PCR引物及DNA分子量标准(上海生物工程有有限公司),DAB显色盒、生物素标记的山羊抗兔IgG、辣根酶标记的链霉卵蛋白素工作液(北京中衫金桥生物技术有限公司)等。出生7d的昆明小鼠脱颈处死后,无菌条件下迅速摘除眼球,移入超净台,D-Hanks液重复冲洗2次后,将离体眼球置于含DMEM培养液(含200mL/L胎牛血清、100kU/L青霉素、100mg/L庆大霉素)沿角膜缘后约1mm剪开,轻轻挤压剥取视网膜。将视网膜剪碎,2.5g/L胰蛋白酶消化10min,含血清培养液终止消化。反复吹打细胞制成细胞悬液,经200目筛网过滤后,800r/min离心5min后弃上清。DMEM培养液调整细胞浓度为 $3 \times 10^8$ /L,接种于事先包被有明胶的50mL塑料培养瓶内,置入恒温湿热培养箱(37℃,含50mL/L CO<sub>2</sub>,50mL/L空气)中培养。3~4d后,首次半定量换液,以后换液2~3次/wk。约10~12d,达80%以上融合,以1:2方式进行传代。小鼠视网膜细胞悬液接种于细胞培养瓶24h后,可见有细胞贴壁呈不规则圆形,有角。3~5d后贴壁细胞增多,并从边缘长出数个细胞伪足。而后细胞分裂生长,10~12d左右融合达80%以上时,细胞形态典型:胞体呈长梭形,胞质丰富,胞核位于胞体中央、椭圆形、有2个或2个以上核仁,细胞呈轴向平行而紧密排列,可进行消化传代培养。P1~P4代细胞5~7d左右融合达80%以上,与原代细胞具有相似的细胞形态,胞体较原代细胞变大,变长,呈梭形、星形等多种形态。细胞间可有嵌合、粘连。取第2~3代细胞消化接种于预置有盖玻片的六孔培养板内,待盖玻片上细胞增殖到80%融合时,以谷氨酰胺合酶(GS)为一抗,进行免疫细胞化学染色,阴性对照用PBS代替一抗,DAB显色剂显色,苏木素复染细胞核,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察并照相。免疫细胞化学染色示细胞质中和细胞膜上出现棕黄色、棕褐色颗粒状或者网状物质的为阳性细胞。阳性细胞率>90%,可以认为实验所用为Müller细胞。而加PBS代替一抗的细胞,免疫细胞化学染色呈阴性。

**1.2 方法** 以P3代对数生长期的小鼠视网膜Müller细胞用于实验:将P2代Müller细胞种植于六孔板中,种植前用含200mL/L胎牛血清的DMEM培养液制成细胞悬液并计数调整细胞浓度约为 $3 \times 10^8$ 个/L,接种至六孔培养板中,每个孔1mL,置于恒温湿热培养箱中培养。当孔中细胞达到80%融合时,换无血清培养液培育24h。分为对照组(糖浓度为25mmol/L)和高糖组(糖浓度分别为30,40和50mmol/L),培养1,3和5d。干预过程中每天换液,维持恒定干预浓度。每孔做3个。用Simply P总RNA提取试剂盒(Solarbio公司),提取细胞的总RNA,取RNA 5μL以15g/L琼脂糖凝胶电泳分析总RNA的完整性,在紫外灯下见到明显的5S,18S,28S的条带认为合格;RNA 2μL用紫外分光光度计测A260nm和A280nm计算A值和浓度,两者比值在1.8~2.0之间者视为合格,剩余于-70℃保存。小鼠引物序列采用Primer 5.0引物设计软件设计,所有碱基对均经BLAST程序检验。所有引物系列均由上海

生工生物工程公司合成。EPO引物序列:上游5'CTC TGG GCC TCC CAG TC 3',下游:5'TGT TCG GAG TGG AGC AG 3',PCR产物大小410bp。EPOR引物序列:上游5'ATT GGA TAA GTG GTT GCT GCC 3',下游:5'CCC CCG AAC TGT AAT CTG TTG 3',PCR产物大小305bp。VEGF引物序列:上游:5'GGA TCC ATG AAC TTT CTG CT 3',下游:5'GAA TCC ACC GCC TCG GCT TGT C 3',PCR产物大小450bp。β-actin引物序列:上游:5'GTG GGC CGC TCT AGG CAC CA 3',下游:5'CGG TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG 3',PCR产物大小245bp。按照Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit说明进行,总反应体系为20μL,反应前将RNA终浓度调整为0.1g/L,进行逆转录反应。各取cDNA 2μL,分别加入VEGF,EPO和EPOR特异性引物,引物终浓度调整为20μmol/L;内参照β-actin特异性引物终浓度调整10μmol/L。按Taq酶说明书加入试剂,PCR扩增条件:94℃,30s,变性;VEGF 60℃,1min,退火,EPO 59℃,1min,退火,EPOR 58℃,1min,退火;68℃,2min,延伸。以上3步循环35次,最后72℃,终末延伸10min。扩增反应结束后取PCR产物5μL与Loading Buffer 1μL混合,进行15g/L的琼脂糖凝胶电泳,100V,30min后,自动凝胶成像仪成像分析,计算目的基因mRNA的相对含量。mRNA的相对含量=目的基因mRNA A值/β-actin mRNA A值。应用MBI公司100bp梯度maker为分子大小对照确定电泳条带。

统计学分析:实验数据用SPSS 17.0软件处理,结果用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示VEGF,EPO和EPOR的表达组间均数比较采用独立样本t检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 VEGF mRNA的表达** Müller细胞VEGF mRNA的表达基本上随着葡萄糖浓度的增加逐渐增强( $P < 0.05$ ),但葡萄糖浓度50mmol/L组相较40mmol/L组差异无统计学意义。随着干预时间的延长Müller细胞表达VEGF mRNA的表达差异无统计学意义(图1,表1)。

**2.2 EPO mRNA的表达** 视网膜Müller细胞EPO mRNA的表达基本上呈浓度依赖性( $P < 0.05$ ),但至最高浓度时(即培养液葡萄糖浓度50mmol/L)差异无统计学意义。在相同糖浓度作用条件下EPO mRNA表达的差异无统计学意义(图1和表1)。

**2.3 EPOR mRNA的表达** Müller细胞EPOR mRNA的表达基本上随着葡萄糖浓度的增加逐渐增强( $P < 0.05$ ),50mmol/L浓度组相较40mmol/L浓度组差异无统计学意义;相同糖浓度条件下EPOR mRNA的表达随时间的变化,差异无统计学意义(图1和表1)。

## 3 讨论

视网膜Müller细胞是一种特化的视网膜神经胶质细胞,具有维持视网膜正常结构与功能、营养视网膜等多种生理功能。DR血管闭塞区域Müller细胞胶质反应性增强,细胞轴突长入闭塞的毛细血管内腔,可能参与PVR和PDR相关的牵拉性视网膜脱离<sup>[4]</sup>。Müller细胞对胶质细胞酸性蛋白、波纹蛋白、谷氨酰胺合酶(GS)、S抗原、碳酸酐酶等染色阳性,因只有GS在视网膜中仅存在于Müller细胞,所以GS为Müller细胞的特异性标志物<sup>[5]</sup>。体外培养时25~30mmol/L的高糖浓度,可近似地等同于糖尿病

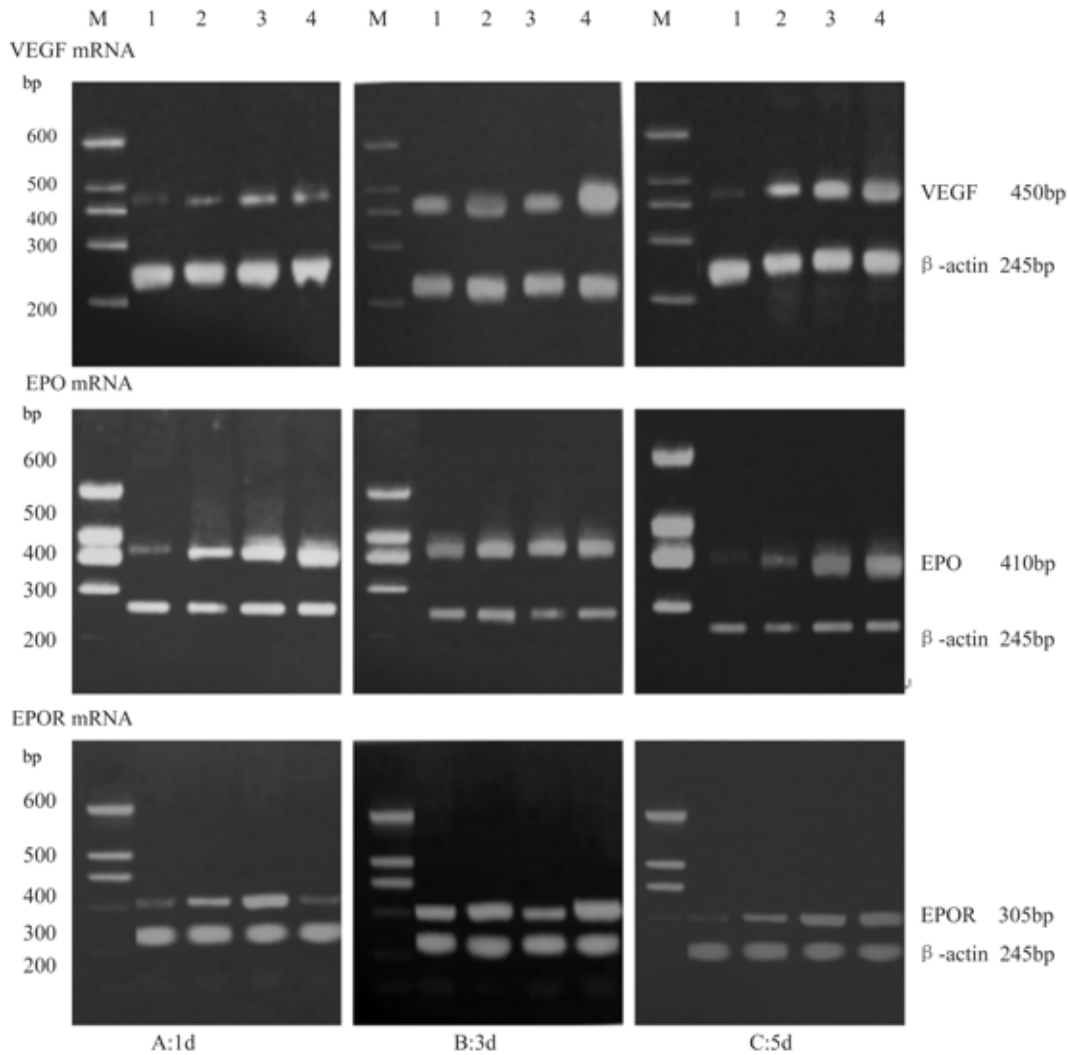


图1 Müller 细胞 VEGF,EPO,EPOR mRNA 凝胶电泳图(1~4 道:糖浓度 25, 30, 40, 50mmol/L)。

表 1 Müller 细胞 VEGF,EPO,EPOR mRNA 的表达 ( $\bar{x} \pm s, A$ )

分组	t/d	25mmol/L	30mmol/L	40mmol/L	50mmol/L
VEGF mRNA	1	0.697 ± 0.022	1.177 ± 0.252 <sup>a</sup>	1.707 ± 0.126 <sup>b,c</sup>	1.816 ± 0.106 <sup>b,c</sup>
	3	0.708 ± 0.034	1.269 ± 0.100 <sup>a</sup>	1.867 ± 0.124 <sup>a,c</sup>	1.887 ± 0.232 <sup>b</sup>
	5	0.856 ± 0.021	1.395 ± 0.198 <sup>b</sup>	1.941 ± 0.213 <sup>a,c,g</sup>	1.958 ± 0.202 <sup>a</sup>
EPO mRNA	1	0.801 ± 0.032 <sup>g</sup>	1.205 ± 0.142 <sup>b</sup>	1.629 ± 0.123 <sup>b,c</sup>	1.723 ± 0.146 <sup>a</sup>
	3	0.878 ± 0.029	1.317 ± 0.108 <sup>b</sup>	1.728 ± 0.134 <sup>a,c</sup>	1.901 ± 0.264 <sup>a,c</sup>
	5	0.967 ± 0.043	1.387 ± 0.091 <sup>b</sup>	1.857 ± 0.154 <sup>a,c</sup>	1.901 ± 0.167
EPOR mRNA	1	0.912 ± 0.043	1.316 ± 0.132 <sup>a</sup>	1.730 ± 0.145 <sup>a,c</sup>	1.834 ± 0.357 <sup>a</sup>
	3	0.998 ± 0.030	1.422 ± 0.205 <sup>b</sup>	1.809 ± 0.113 <sup>a,c</sup>	1.901 ± 0.166
	5	1.001 ± 0.031	1.510 ± 0.043 <sup>g</sup>	1.893 ± 0.173 <sup>b,c</sup>	1.981 ± 0.073

<sup>a</sup> P < 0.05, <sup>b</sup> P < 0.01 vs25mmol/L; <sup>c</sup> P < 0.05 vs30mmol/L; <sup>e</sup> P < 0.05 vs40mmol/L; <sup>g</sup> P < 0.05 vs3d。

时体内高糖状态,故以此为对照组。我们实验选用 30,40 和 50mmol/L 的葡萄糖浓度模拟体内的绝对高糖环境。实验中采用了高糖 DMEM 培养液,取 25mmol/L 葡萄糖浓度作为对照组。VEGF 是由 2 条相同多肽链组成的高度糖基化碱性蛋白。免疫组化研究表明,糖尿病患者视网膜血管内皮细胞 VEGF 反应明显增高,而非糖尿病患者视网膜毛细血管内皮细胞及周细胞染色较弱<sup>[6]</sup>。高糖作为 DR 的始动因素,其可能机制之一为诱导视网膜 Müller 细胞 VEGF 的表达,并且已经出现了针对 VEGF 血管生成素活性的治疗手段。Avastin 是重组的人类单克隆 IgG1 抗体,

与 VEGF 异构体结合,达到中和配体的作用,从而抑制其生物活性。在 PDR 手术前 1~2wk 玻璃体腔注射 1~1.25mg 的 Avastin 可以有效地减少术中出血,并且使新生血管消退<sup>[7]</sup>。我们发现,不同浓度葡萄糖组的 Müller 细胞 VEGF 表达较前一浓度升高,差异具有统计学意义(P < 0.05),这与以往报道是一致的。而 50mmol/L 组相较 40mmol/L 组差异无统计学意义。这种现象可能是 Müller 细胞的一种自分泌反馈调节机制。而随着干预时间的延长,Müller 细胞 VEGF 的表达差异无统计学意义。

EPO 是含有 165 个氨基酸,分子质量为 34.4kDa 的激

素糖蛋白,EPOR属于I型细胞因子受体家族成员之一,由507个氨基酸组成。研究表明在增生性糖尿病视网膜病(PDR)患者的眼玻璃体中的EPO浓度较普通人有显著的提高<sup>[8]</sup>。高氧诱导的血管增生性视网膜病变的动物模型实验,玻璃体内注射促红细胞生成素受体抗体(EPORA),发现突破视网膜内界膜进入玻璃体腔内的新生血管内皮细胞核明显少于未经注射眼,且新生血管的密度明显轻于未注射眼<sup>[9]</sup>。EPO/EPOR系统与糖尿病视网膜病变的联系可以具体到DR的不同阶段。早期糖尿病大鼠的视网膜中EPOR呈大量强阳性表达,到了DM的晚期EPO便作为一个血管源性因子发挥作用<sup>[10]</sup>,由此推测在早期DR中EPO/EPOR是自我保护系统,到了晚期EPO的自我保护转化成了致病因素。我们的实验中发现:不同浓度葡萄糖组的Müller细胞EPO mRNA,EPOR mRNA表达较前一浓度组明显升高( $P < 0.05$ )。而50mmol/L组相较40mmol/L组差异无统计学意义。同样可能为Müller细胞的自分泌反馈调节。随着干预时间的延长,Müller细胞EPO/EPOR的表达差异无统计学意义。故高糖条件下视网膜Müller细胞的EPO/EPOR表达增多可能为DR发生的机制之一。因此,我们推测DM可能通过刺激视网膜Müller细胞VEFG,EPO,EPOR的分泌增多,从而导致DR的发生。

#### 参考文献

- 1 俞梅,郎景和,朱兰,等. 子宫颈病变中促红细胞生成素受体的表达及其与微血管密度的相关性研究. 中国现代实用医学杂志 2005;14(6):1-4
- 2 Fu QL, Wu WT, Wang H, et al. Upregulated endogenous erythropoietin/erythropoietin receptor system and exogenous erythropoietin rescue retinal ganglion cells after chronic ocular hypertension. *Cell Mol Neurobiol* 2008;28(2):317-329
- 3 Katsura Y, Okano T, Matsuno K, et al. Erythropoietin is highly elevated in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabete Care* 2005;28(9):2252-2254
- 4 凌志红,徐格致. 糖尿病视网膜Müller细胞病理改变的体内外研究. 眼科研究 2005;23(3):262-265
- 5 苟琳,张作明,徐汉鹏. 视网膜Müller细胞在视网膜病变中的作用和研究现状. 眼科研究 2003;21(2):217-220
- 6 Yokoi M, Yamagishi SI, Takeuchi M, et al. Elevation of AGE and vascular endothelial growth factor with decreased total antioxidant status in the vitreous fluid of diabetic patients with retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2005;89(6):673-675
- 7 李灵,席新华. Avastin在眼科中的应用. 国际眼科杂志 2008;8(3):582-583
- 8 Lynch SS, Cheng CM. Bevacizumab for neovascular ocular diseases. *Ann Pharmac* 2007;41(4):614-625
- 9 刘鹏飞,惠延年,谢小萍. 促红细胞生成素受体抗体抑制小鼠视网膜新生血管形成. 国际眼科杂志 2008;8(3):507-509
- 10 朱弼楮,王卫峻,许讯,等. rhEPO对早期糖尿病大鼠视网膜超微结构和EPO表达信号的影响. 眼科新进展 2007;27(8):581-584

## 本刊为作者开辟论文优先/加急发表绿色通道

本着“想读者之所想,急作者之所急”全心全意为广大作者、读者服务的精神,本刊正式开辟论文优先/加急发表绿色通道。①对全英文论文和省部级以上基金项目论文,本刊将优先审阅,优先发表;②对作者要求加急发表的普通论文,本刊将根据作者要求加急审阅,审稿通过者可加急发表,并根据加急程度适当收取加急费。需要加急的作者请投稿时注明并留下联系方式,本刊将竭诚为您服务。

IJO 编辑部