

羟基红花黄色素 A 对高糖作用下视网膜微血管内皮细胞增殖的影响

黄沁园¹, 黄敏丽², 何纯刚³

基金项目: 中国广西教育厅科研资助面上项目 (No. 200911MS25); 中国广西大型仪器协作网资助项目 (No. 558-2008-001)

作者单位:¹(530021)中国广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学护理学院;²(530021)中国广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院眼科;³(530021)中国广西壮族自治区南宁市, 广西壮族自治区人民医院普通外科

作者简介: 黄沁园, 硕士, 讲师, 研究方向: 糖尿病视网膜微血管病变的临床与基础。

通讯作者: 黄敏丽, 博士, 教授, 主任医师, 研究方向: 眼底病的临床与基础. nnhml@163.com

收稿日期: 2011-05-01 修回日期: 2011-06-28

Effects of hydroxysafflor yellow A on high glucose-induced proliferation of retinal capillary endothelial cells

Qin-Yuan Huang¹, Min-Li Huang², Chun-Gang He³

Foundation items: Education Department Scientific Research Funded Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region, China (No. 200911MS25); Large-scale Instrument Collaboration Funded Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region, China (No. 558-2008-001)

¹Nursing College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; ³Department of General Surgery, The People's hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Min-Li Huang. Nursing College of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. nnhml@163.com

Received: 2011-05-01 Accepted: 2011-06-28

Abstract

• **AIM:** To determine whether hydroxysafflor yellow A (HSYA) inhibits high glucose-induced cell proliferation and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in retinal capillary endothelial cells (Macaca rhesus monkey vascular endothelial cells, RF/6A cells).

• **METHODS:** RF/6A cells cultured *in vitro* were divided into NG + H0 group in which contained with normal glucose of 5.5mol/L, and was added with HSYA of 0mg/L, and were divided into HG + H0, HG + H18, HG + H37, HG +

H73 group, in which contained with high glucose of 22mmol/L and were added with HSYA of 0, 18, 37 and 73mg/L, respectively. At 24, 48, 72 hours cultured, the cells were observed by inverted microscope. The effects of HSYA on cell proliferation and expression of VEGF mRNA were tested by MTT assay and RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction), respectively.

• **RESULTS:** The results of MTT assay for the effects of HSYA on the proliferation of RF/6A cells were showed as follows: at 48hours of cells cultivation, compared with HG + H0, the effects in HG + H37 and HG + H73 group were statistically significant ($P < 0.01$). With the concentration of HSYA increased in high glucose groups, the absorbance values of RF/6A cells showed a descending trend. At 72hours of cells cultivation, there were statistically significant effects in groups of HG + H18, HG + H37 and HG + H73 when compared with HG + H0 group ($P < 0.01$). With the concentration of HSYA increased in high glucose groups, the absorbance values of RF/6A cells showed a descending trend, and there was a marked reduction in HG + H73 group compared with the HG + H18 and HG + H37 group ($P < 0.01$, $P < 0.05$, respectively). The RT-PCR results for the effects of HSYA on VEGF mRNA expression were showed as follows: at 48hours of cells cultivation, the expression of VEGF mRNA in HG + H37, HG + H73 group was statistically significant lower than that in HG + H0 group ($P < 0.01$) and with the same results showed in HG + H18, HG + H37, HG + H73 group at 72hours of cells cultivation ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** These results suggested that HSYA can inhibit the expression of VEGF and the high glucose-induced proliferation of RF/6A cells. The inhibitory effect of cell proliferation was increased in both time-dependent and dose-dependent manner. These effects may be associated with down-regulating the expression of VEGF mRNA by HSYA.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; retinal capillary endothelial cells; cell proliferation; hydroxysafflor yellow A

Huang QY, Huang ML, He CG. Effects of hydroxysafflor yellow A on high glucose-induced proliferation of retinal capillary endothelial cells. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011; 11 (8): 1324-1326

摘要

目的: 探讨羟基红花黄色素 A (HSYA) 对高糖培养下恒猴脉络膜血管内皮细胞 (RF/6A) 增殖及血管内皮生长因子 (VEGF) mRNA 表达的影响。

方法:取体外培养的 RF/6A 细胞,分为 NG + H0 组(含有 5.5mmol/L 葡萄糖, HSYA 的浓度为 0mg/L)及 HG + H0、HG + H18、HG + H37、HG + H73 组(各组中均含有 22mmol/L 葡萄糖, HSYA 的浓度分别为 0, 18, 37, 73mg/L)。培养 24, 48 和 72h, 分别使用噻唑盐比色法(MTT)检测细胞增殖的活性。采用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测各组中 RF/6A 细胞中 VEGF mRNA 的表达。

结果:MTT 检测结果表明, HSYA 作用 48h, HG + H37、HG + H73 组细胞吸光度值均明显低于 HG + H0 组($P < 0.01$), 随着 HSYA 浓度的增加, 各组吸光度值降低。作用 72h, HG + H18、HG + H37 和 HG + H73 组细胞吸光度值均明显低于 HG + H0 组($P < 0.01$), 随着 HSYA 浓度的增加, 各组吸光度值降低, HG + H73 组抑制作用最明显, 其细胞吸光度值明显低于 HG + H18 和 HG + H37 组(分别为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。RT-PCR 实验结果表明: 与 HG + H0 组相比, 作用 48h, HG + H37、HG + H73 对 RF/6A 细胞 VEGF mRNA 表达的抑制作用显著($P < 0.01$); 而作用 72h, HG + H18、HG + H37 和 HG + H73 对高糖诱导的 VEGF mRNA 的表达均有抑制作用($P < 0.01$)。

结论:HSYA 能够抑制高糖诱导的 RF/6A 细胞的增殖并下调高糖所致的 VEGF mRNA 表达升高, 提示其可能机制是通过 VEGF 途径来实现的。

关键词:糖尿病性视网膜病变; 视网膜微血管内皮细胞; 细胞增殖; 羟基红花黄色素 A

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 08. 005

黄沁园, 黄敏丽, 何纯刚. 羟基红花黄色素 A 对高糖作用下视网膜微血管内皮细胞增殖的影响. 国际眼科杂志 2011; 11(8): 1324-1326

0 引言

糖尿病视网膜病变的特征是视网膜微血管系统发生的进行性改变^[1], 是目前糖尿病致盲的主要原因。在糖尿病患者中, 缺氧、高糖等因素作用下, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达升高并刺激血管内皮细胞增殖和迁移, 从而导致视网膜新生血管生成。研究表明, 抑制内皮细胞增殖和迁移, 抑制生长因子特别是 VEGF, 是抑制视网膜新生血管形成的关键所在^[2]。羟基红花黄色素 A (HSYA) 为传统活血化瘀类中药红花的主要水溶性组分。研究表明^[3,4], HSYA 能剂量依赖性抑制大肠癌细胞培养液刺激下的脐静脉内皮细胞活性, 影响鸡胚尿囊膜毛细血管生成。本实验主要研究 HSYA 对高糖培养的恒河猴脉络膜血管内皮细胞增殖作用及其对 VEGF 表达的影响, 初步探索其可能的作用机制, 为糖尿病视网膜病变寻找新的治疗途径。

1 材料和方法

1.1 材料 恒河猴脉络膜血管内皮细胞株(RF/6A, 中科院上海细胞库)。RPMI 1640 干粉(Gibco 公司), 谷氨酰胺、D-葡萄糖粉(Sigma 公司), TBD 胎牛血清(天津灏洋生物公司)、凯基 MTT 检测试剂盒(南京凯基生物科技有限公司)、二甲基亚砜(Sanland 公司)、羟基红花黄色素 A (HSYA, 北京禾境科技发展公司)、Trizol Reagent(美国 Invitrogen 公司)、cDNA 逆转录试剂盒(Fermentas 公司)、Taq DNA 聚合酶(东盛集团)。酶联免疫检测仪(南京华

东电子集团), 多通道 PCR 仪、Gel Doc 凝胶成像仪(Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 分为 NG + H0 组(含有 5.5mmol/L 葡萄糖, HSYA 的浓度为 0mg/L)及 HG + H0、HG + H18、HG + H37、HG + H73 组(各组中均含有 22mmol/L 葡萄糖^[5], HSYA 的浓度分别为 0, 18, 37, 73mg/L)。HSYA 液的配制参照文献^[4]。

1.2.2 MTT 检测 HSYA 对高糖作用下 RF/6A 细胞增殖的影响 参照文献[6]采用 96 孔板进行细胞培养, 按实验分组, 每孔分别加入各组培养基 180 μ L, 培养 24, 48, 72h (培养超过 24h 者, 每 24h 换液一次)后, 进行 MTT 实验, 波长 570nm 下测定各孔吸光度值(A 值), 并计算出抑制细胞增殖的抑制率, 抑制率 = (增殖对照组平均吸光度 A 值 - 药物组平均吸光度 A 值) / 增殖对照组平均吸光度 A 值 $\times 100\%$ 。

1.2.3 HSYA 对高糖作用下 RF/6A 细胞中 VEGFmRNA 表达的影响

1.2.3.1 细胞培养 取对数生长期的 RF/6A 细胞以 10mL/L 胎牛血清的 1 640 培养基制备为 2×10^4 个/mL 的细胞悬液, 以每孔 1000 μ L 分别接种于 6 孔培养板中置于 37 $^{\circ}$ C, 50mL/L CO₂ 培养箱中培养 24h 后换液, 分别加各处理组培养基, 分别培养 24, 48, 72h 后, 按说明采用 Trizol 试剂一步法提取细胞总 RNA, 经检测质量合格后采用 cDNA 逆转录试剂盒合成第一链 cDNA, -20 $^{\circ}$ C 冰箱冷藏备用。

1.2.3.2 RT-PCR 检测 VEGF mRNA 的表达 VEGF 引物: 上游: 5'-GTGCATTGGAGCCTTGCCCTTG-3', 下游 5'-ACTCGATCTCATCAGGGTACTC-3', 扩增片段 190bp; beta-actin 引物: 上游: 5'-CTTAGTTGCGTTACACCCTTCTTG-3', 下游: 5'-TGTCACCTTCACCGTTCCAGTTT-3', 扩增片段 149bp。VEGF 和 beta-actin RT-PCR 反应体系: 10 \times Buffer 2.5 μ L, 2.5mmol/L dNTP 1.5 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, Taq 酶(2.5U/ μ L) 0.3 μ L, c-DNA 模板 2 μ L, 加 ddH₂O 至 25 μ L。VEGF 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 5min 后, 进行 94 $^{\circ}$ C 50s, 65 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 45s 的循环, 循环 35 次后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 冷却至 8 $^{\circ}$ C。beta-actin 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 4min 后, 进行 94 $^{\circ}$ C 30s, 65 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s 的循环, 循环 28 次后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min, 冷却至 8 $^{\circ}$ C。于 25g/L 琼脂糖凝胶(含溴乙锭)电泳, 凝胶成像分析仪观察结果并拍照, 对 PCR 产物作半定量分析, 以 VEGF 与 beta-actin 灰度值的比值作为 VEGF mRNA 的相对含量。

统计学分析: 所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组 A 值、VEGF mRNA 相对含量比较采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 并采用 LSD-t 法进行两两比较, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 HSYA 对高糖作用下 RF/6A 细胞增殖的影响 除作用 24h 外, 作用 48, 72h, HG + H0 组细胞活性明显比 NG + H0 组高($P < 0.01$), 高糖作用下的 RF/6A 细胞活性随 HSYA 浓度的增高、作用时间的延长而明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中 HG + H73 组作用最明显, 且 72h 时 HG + H0 组与其它各组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 表 1)。作用 48, 72h, HSYA 对 HG 的抑制率随浓度的升高而增高, 其中 HG + H73 组抑制率最高, 分别与 HG + H18

表1 HSYA对高糖培养的RF/6A细胞增殖的影响 $\bar{x} \pm s$

组别	A值		
	24h	48h	72h
NG + H0	0.057 ± 0.011	0.117 ± 0.007	0.226 ± 0.024
HG + H0	0.058 ± 0.006	0.151 ± 0.012	0.281 ± 0.024
HG + H18	0.057 ± 0.007	0.146 ± 0.015 ^b	0.237 ± 0.031
HG + H37	0.055 ± 0.090	0.135 ± 0.012 ^a	0.230 ± 0.017
HG + H73	0.055 ± 0.008	0.130 ± 0.006	0.218 ± 0.019 ^{c,d}

^a $P < 0.05$ vsHG + H73, ^b $P < 0.01$ vsHG + H37, ^c $P < 0.05$ vsHG + H37, ^d $P < 0.01$ vsHG + H18。

表2 HSYA对高糖诱导的RF/6A细胞增殖的抑制率

组别	抑制率 ($\bar{x} \pm s, \%$)		
	24h	48h	72h
HG + H18	1.73 ± 0.06 ^b	3.30 ± 0.58	15.55 ± 2.52
HG + H37	5.73 ± 0.81	10.40 ± 0.17 ^d	17.96 ± 1.04
HG + H73	5.18 ± 0.18	13.72 ± 0.18 ^f	22.35 ± 0.45 ^{a,h}

^a $P < 0.05$ vsHG + H37, ^b $P < 0.01$ vsHG + H37, ^d $P < 0.01$ vsHG + H18, ^f $P < 0.01$ vsHG + H37, ^h $P < 0.05$ vsHG + H18。

表3 HSYA对高糖培养的RF/6A细胞VEGF mRNA表达的影响 $\bar{x} \pm s$

组别	VEGF相对表达量		
	24h	48h	72h
NG + H0	0.422 ± 0.041 ^{a,b}	0.479 ± 0.023 ^{c,d}	0.576 ± 0.059
HG + H0	0.508 ± 0.022	1.032 ± 0.189 ^{e,f}	1.142 ± 0.167
HG + H18	0.495 ± 0.018	0.926 ± 0.110 ^e	0.730 ± 0.130
HG + H37	0.482 ± 0.021	0.784 ± 0.122	0.627 ± 0.048
HG + H73	0.477 ± 0.027	0.697 ± 0.048	0.561 ± 0.062

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vsHG + H0和HG + H18; ^c $P < 0.05$ vsHG + H73; ^d $P < 0.01$ vsHG + H0, HG + H18和HG + H37; ^e $P < 0.05$ vsHG + H37; ^f $P < 0.01$ vsHG + H73; ^g $P < 0.05$ vsHG + H73。

组、HG + H37组比较,差异有统计学意义(分别为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。各浓度的HSYA组对HG的抑制率随作用时间的延长而增高($P < 0.01$,表2)。

2.2 HSYA对高糖作用下RF/6A细胞中VEGF mRNA表达的影响 RF/6A细胞体外培养24,48,72h,NG + H0组RF/6A细胞VEGF mRNA有一定的表达,HG + H0组在3个时间点VEGF mRNA表达均明显高于NG + H0组($P < 0.01$,表3)。作用48h,HG + H37组、HG + H73组VEGF mRNA的表达明显下降,其表达量均明显比HG + H0组的表达量低(分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),HSYA对RF/6A细胞的抑制作用随浓度的增加而加强,HG + H73组VEGF mRNA的表达量下降最明显,与HG + H18组和HG + H37组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),但未下降到NG + H0组VEGF mRNA的表达水平($P < 0.05$);培养72h后,HG + H18组、HG + H37组、HG + H73组与HG + H0组比较,VEGF mRNA的表达量明显降低($P < 0.01$),并达到NG + H0组水平($P > 0.05$,表3)。

3 讨论

糖尿病视网膜病变是后天非创伤性致盲的主要病因,其主要特征是视网膜新生血管的形成^[7]。糖尿病视网膜病变的发生和发展与生长因子过度表达密切相关^[8]。有研究发现^[5,9],高糖可引起内皮细胞VEGF mRNA表达增加,高糖为22mmol/L时VEGF mRNA表达达到最高峰,44mmol/L时下降。本实验也证实,高糖(22mmol/L)可明显促进RF/6A细胞增殖,同时促进培养的内皮细胞VEGF mRNA表达增加,提示高糖促进血管内皮细胞增殖可能与其诱导VEGF mRNA表达增加的作用有关,与文献报告一致^[5]。

本实验发现,不同浓度的HSYA对高糖培养的RF/6A细胞增殖均有不同程度的抑制作用,随时间延长,其抑制作用越明显,培养72h后各处理组细胞活力与正常糖组(NG + H0)无明显差异($P > 0.05$)。其中HG + H73组作用最明显。各浓度HSYA组对细胞增殖的抑制随浓度的增加其抑制作用有增强趋势,此外,对不同浓度的HSYA对高糖培养的RF/6A细胞增殖的抑制率比较也发现,各HSYA浓度的处理组对细胞增殖的抑制强度随着时间的增加、药物浓度的增加而逐渐增强(除作用24h外),提示HSYA在高糖下如糖尿病视网膜病变中可能抑制新生血管的生成,有望成为糖尿病视网膜病变的有效治疗药物。

为了进一步探讨HSYA对高糖下RF/6A细胞增殖抑制的机制,本实验研究发现,不同浓度梯度的HSYA均能下调高糖(22mmol/L)培养的RF/6A细胞VEGF mRNA的表达,且随着作用时间的延长,VEGF mRNA表达的下调越明显。提示HSYA抑制高糖诱导的RF/6A细胞增殖可能与其抑制VEGF的表达有关。

本实验为研究HSYA对糖尿病视网膜病变的治疗提供了理论基础,但对HSYA抗新生血管作用的机制研究尚有限,有关HSYA下调高糖作用下的视网膜内皮细胞VEGF表达的信号通路及其调控点等尚待进一步研究。

参考文献

- Spinetti G, Kraenkel N, Emanuelli C, et al. Diabetes and vessel wall remodelling: from mechanistic insights to regenerative therapies. *Cardiovasc Res* 2008;78(2):265-273
- Bhisitkul RB. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol* 2006;90(12):1542-1547
- 张前,张玮,解华,等. 羟基红花黄色素A对大肠癌细胞株刺激下内皮细胞增殖的抑制作用. *中华中医药杂志* 2007;增刊:57-60
- 张前,牛欣,闫妍,等. 羟基红花黄色素A抑制新生血管形成的机制研究. *北京中医药大学学报* 2004;27(3):25-29
- 张继红,马存根,吕秀梅,等. 高糖对脐静脉内皮细胞血管内皮生长因子mRNA表达的影响. *临床和实验医学杂志* 2007;6(10):40-41
- 黄敏丽,罗国容,陈维平,等. Tumorstatin 肽对视网膜微血管内皮细胞增殖及ERK蛋白表达的影响. *广东医学* 2008;29(12):1955-1958
- Crawford TN, Alfaro DV 3rd, Kerrison JB, et al. Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Curr Diabetes Rev* 2009;5(1):8-13
- Zakareia FA, Alderees AA, Al Regaiy KA, et al. Correlation of electroretinography b-wave absolute latency, plasma levels of human basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, soluble fatty acid synthase, and adrenomedullin in diabetic retinopathy. *J Diabetes Complications* 2010;24(3):179-185
- 蒋瑶祁,彭辉灿,肖启国,等. 苦参碱对大鼠视网膜微血管内皮细胞的增生及VEGF表达的影响. *眼科研究* 2008;26(1):48-52