

外源性 PGC-1 α 对人视网膜血管内皮细胞 VEGF 表达的影响

蒋 剑,夏晓波,张 露

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81000387)

作者单位:(410008)中国湖南省长沙市,中南大学湘雅医院眼科
作者简介:蒋剑,毕业于中南大学湘雅医院,博士,主治医师,研究方向:视网膜新生血管、青光眼、白内障。

通讯作者:夏晓波,博士,教授,博士研究生导师,博士后指导老师,主任,中南大学眼科研究所所长,研究方向:青光眼、白内障、干细胞. xbxia21@163.com

收稿日期:2014-12-19 修回日期:2015-01-22

Effect of exogenous PGC-1 α on VEGF expression in human retinal vascular endothelial cells

Jian Jiang, Xiao-Bo Xia, Lu Zhang

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81000387)

Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Correspondence to: Xiao-Bo Xia. Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. xbxia21@163.com

Received:2014-12-19 Accepted:2015-01-22

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of exogenous peroxisome-proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) on vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human retinal vascular endothelial cells (HRVEC).

• **METHODS:** Recombinant PGC-1 α protein was added to HRVEC, and no recombinant PGC-1 α protein was added to HRVEC as control group. After 24h of incubation, two groups of cells were then placed into a normoxic (20% O₂) or hypoxic (1% O₂) environment for another 16h. The expression of VEGF mRNA and protein were detected by real-time PCR, ELISA and immunofluorescence cytochemistry.

• **RESULTS:** VEGF mRNA and protein levels in the cells were significantly increased by recombinant PGC-1 α protein both under normoxia and hypoxia conditions as compared with control groups ($P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** PGC-1 α can upregulate the expression of VEGF in HRVEC under normoxia and hypoxia conditions.

• **KEYWORDS:** peroxisome - proliferator - activated receptor- γ coactivator-1 α ; vascular endothelial growth factor; recombinant proteins; normoxia; hypoxia

Citation: Jiang J, Xia XB, Zhang L. Effect of exogenous PGC-1 α on VEGF expression in human retinal vascular endothelial cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2015;15(2):198-200

摘要

目的:探讨外源性过氧化物酶增殖激活受体- γ 共激活子-1 α (peroxisome-proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α)对人视网膜血管内皮细胞(human retinal vascular endothelial cell, HRVEC)中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响。

方法:HRVEC加入重组PGC-1 α 蛋白,未加入重组蛋白的细胞作为对照组。加入重组蛋白24h后,将两组细胞分别置于常氧(20% O₂)和低氧(1% O₂)环境下继续培养16h,采用real-time PCR、酶联免疫吸附试验(ELISA)及免疫荧光细胞化学法分别检测VEGF mRNA和蛋白的表达变化。

结果:real-time PCR, ELISA和免疫荧光细胞化学法检测发现,常氧和低氧环境下HRVEC加入重组PGC-1 α 蛋白后,VEGF mRNA和蛋白的表达均较对照组上调,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

结论:PGC-1 α 在常氧和低氧环境中均能上调HRVEC中VEGF的表达。

关键词:过氧化物酶增殖激活受体- γ 共激活子-1 α ;血管内皮生长因子;重组蛋白质类;常氧;低氧

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.2.03

引用:蒋剑,夏晓波,张露. 外源性PGC-1 α 对人视网膜血管内皮细胞VEGF表达的影响. *国际眼科杂志* 2015;15(2):198-200

0 引言

缺血、缺氧刺激产生的各种血管生长因子是诱导新生血管形成的主要因素,视网膜新生血管就是在视网膜或/和脉络膜病理情况下,相关组织所分泌的一组细胞因子相互作用失衡的结果。研究发现过氧化物酶增殖激活受体- γ 共激活子-1 α (peroxisome-proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α)参与了组织缺氧时的细胞应答反应。缺血、缺氧时,鼠心肌细胞^[1]和脑^[2,3]、人类骨骼肌^[4,5]中PGC-1 α 的表达及转录调控功能明显增强。PGC-1 α 可上调包括VEGF在内的血管生成因子的表达,促进新生血管的形成^[6]。为了更好地证实PGC-1 α 与视网膜新生血管之间的关系,本研究选用人视网膜血管内皮细胞(human retinal vascular endothelial cells, HRVEC)为实验对象,观察外源性PGC-1 α 在常氧和低氧环境中对细胞血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人视网膜血管内皮细胞(中国武汉 PriCells 公司), PGC-1 α 重组蛋白(中国台湾 Abnova 公司), VEGF ELISA 试剂盒(美国 Usenk 公司), 鼠抗人 VEGF 一抗(美国 Abcam 公司), 细胞免疫荧光相关试剂及 DAPI(美国 Santa Cruz 公司), Trizol(美国 Invitrogen 公司), real-time

PCR 试剂(美国 MBI 公司),real-time PCR 引物由中国上海生工生物工程有限公司合成,细胞培养基、胎牛血清(美国 HyClone 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及重组 PGC-1 α 蛋白的应用 HRVEC 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,预先在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 20% O₂ 环境中培养 24h,使细胞进入对数生长期后,更换新鲜培养液。将细胞分为常氧 PGC-1 α 组、常氧对照组、低氧 PGC-1 α 组和低氧对照组。常氧 PGC-1 α 组和低氧 PGC-1 α 组细胞均加入重组 PGC-1 α 蛋白:六孔板每孔 2mL 培养基,每孔加入 5 μ L(0.25 μ g/ μ L)重组 PGC-1 α 蛋白原液,混匀。常氧对照组和低氧对照组细胞六孔板不加入重组蛋白。四组细胞在常氧环境中培养 24h 后,将低氧 PGC-1 α 组和低氧对照组细胞置于低氧(1% O₂)环境中继续培养 16h,而常氧 PGC-1 α 组和常氧对照组细胞继续于常氧(20% O₂)环境中培养 16h。低氧培养是把细胞置于 1% O₂, 5% CO₂ 和 94% N₂ 混合气体的条件下培养。

1.2.2 Real-time PCR 检测人视网膜血管内皮细胞中 VEGF mRNA 表达的变化 采用 Trizol 一步法分别提取四组细胞的总 RNA,real-time PCR 检测 VEGF mRNA 的表达,以 β -actin 为内参。人 VEGF(124bp)引物序列为:上游:5'-CTGTCTAATGCCCTGGAGCC-3' 和下游:5'-ACGCCAGTCTGTGTTTTTGC-3'。人 β -actin(169bp)引物序列为:上游:5'-TCTGGCACCACACCTTCTAC-3' 和下游:5'-GATAGCACAGCCTGGATAGC-3'。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min;扩增循环条件为:94 $^{\circ}$ C 20s,58 $^{\circ}$ C 20s,72 $^{\circ}$ C 40s,共 40 个循环。每个反应管荧光信号值到达设定的阈值所经历的循环数即 Ct 值。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算 VEGF mRNA 的相对表达水平。

1.2.3 ELISA 检测人视网膜血管内皮细胞中 VEGF 蛋白表达的变化 在 real-time PCR 实验之前先分别收集四组细胞的培养上清。标准孔依次加入 100 μ L 不同浓度(1000,500,250,125,62.5,31.2,15.6pg/mL)的标准品,空白孔加 100 μ L 标准品稀释液(0pg/mL),余孔加待测样品 100 μ L,酶标板加上覆膜,37 $^{\circ}$ C 温育 2h。弃去液体,甩干。每孔加检测溶液 A 工作液 100 μ L,酶标板加上覆膜,37 $^{\circ}$ C 温育 1h。弃去液体,甩干。每孔加检测溶液 B 工作液 100 μ L,酶标板加上覆膜,37 $^{\circ}$ C 温育 30min。弃去液体,甩干。每孔加底物溶液 90 μ L,酶标板加上覆膜,37 $^{\circ}$ C 避光显色 20min。每孔加终止液 50 μ L,终止反应。立即用酶标仪在 450nm 波长处测量各孔的光密度。

1.2.4 免疫荧光细胞法测定人视网膜血管内皮细胞中 VEGF 蛋白的荧光强度变化 细胞 4% 多聚甲醛固定 30min,PBS 洗 5min;0.1% Triton-X100 作用 10min,PBS 洗 3 次,每次 3min;正常山羊血清封闭 15min;弃去正常山羊血清,滴加 VEGF 一抗(1:100),湿盒内 4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 振洗 3 次,每次 3min;滴加 Cy3 荧光二抗(1:200),37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1h;PBS 振洗 3 次,每次 10min;加入 2 μ g/mL DAPI 进行染核 5min;PBS 振洗 3 次,每次 10min;荧光显微镜观察,拍照。采用 Image-pro plus 6.0 图像分析软件对各组细胞 VEGF 免疫荧光细胞化学染色结果进行图像分析,高倍镜(\times 400)下随机选取 5 个视野,测定细胞荧光强度平均值,阳性表达越强,则荧光强度值越高。

统计学分析:应用 SPSS 18.0 统计软件包对实验数据进行统计学分析。各组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

表 1 各组 HRVEC 中 VEGF mRNA 的表达

分组	VEGF/ β -actin	$\bar{x} \pm s$
常氧 PGC-1 α 组	5.99 \pm 1.02	
常氧对照组	2.98 \pm 0.84 ^b	
低氧 PGC-1 α 组	11.93 \pm 1.14 ^{b,d}	
低氧对照组	6.05 \pm 0.94 ^{a,d,f}	

^a $P > 0.05$,^b $P < 0.01$ vs 常氧 PGC-1 α 组;^d $P < 0.01$ vs 常氧对照组;^f $P < 0.01$ vs 低氧 PGC-1 α 组。

表 2 各组 HRVEC 中 VEGF 蛋白的表达

分组	VEGF 蛋白	$\bar{x} \pm s$
常氧 PGC-1 α 组	0.48 \pm 0.08	
常氧对照组	0.22 \pm 0.05 ^b	
低氧 PGC-1 α 组	0.90 \pm 0.09 ^{b,d}	
低氧对照组	0.50 \pm 0.07 ^{a,d,f}	

^a $P > 0.05$,^b $P < 0.01$ vs 常氧 PGC-1 α 组;^d $P < 0.01$ vs 常氧对照组;^f $P < 0.01$ vs 低氧 PGC-1 α 组。

2 结果

2.1 人视网膜血管内皮细胞中 VEGF mRNA 表达的变化

四组细胞间 VEGF mRNA 的表达,差异具有统计学意义($F = 42.92$, $P < 0.01$)。Real-time PCR 检测发现常氧对照组细胞 VEGF mRNA 有表达,常氧 PGC-1 α 组表达较常氧对照组增强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。低氧对照组 VEGF mRNA 相比于常氧对照组表达明显上调,差异有统计学意义($P < 0.01$)。低氧 PGC-1 α 组较低氧对照组和常氧 PGC-1 α 组 VEGF mRNA 表达均增强,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。低氧对照组与常氧 PGC-1 α 组相比,差异无统计学意义($P > 0.01$,表 1)。

2.2 人视网膜血管内皮细胞中 VEGF 蛋白表达的变化

ELISA 检测发现,四组细胞间 VEGF 蛋白的表达,差异具有统计学意义($F = 49.401$, $P < 0.01$)。VEGF 蛋白在常氧对照组细胞中有表达,而常氧 PGC-1 α 组表达明显上调,与常氧对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。低氧对照组 VEGF 蛋白相比于常氧对照组表达明显上调,差异有统计学意义($P < 0.01$)。低氧 PGC-1 α 组较低氧对照组和常氧 PGC-1 α 组 VEGF 蛋白表达均增强,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。低氧对照组与常氧 PGC-1 α 组相比,差异无统计学意义($P > 0.01$,表 2)。

2.3 人视网膜血管内皮细胞中 VEGF 蛋白的荧光强度变化

VEGF 免疫荧光细胞化学染色反应产物定位于细胞胞浆,为红色荧光,DAPI 细胞核染色为蓝色(图 1)。VEGF 蛋白的表达强弱,四组细胞间差异具有统计学意义($F = 1845.333$, $P < 0.01$)。VEGF 蛋白在常氧对照组细胞中有红色荧光表达,而常氧 PGC-1 α 组表达明显增强,与常氧对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。低氧对照组 VEGF 蛋白相比于常氧对照组表达明显增强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。低氧 PGC-1 α 组较低氧对照组和常氧 PGC-1 α 组 VEGF 蛋白表达均增强,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。低氧对照组与常氧 PGC-1 α 组相比,差异无统计学意义($P > 0.01$,表 3)。

3 讨论

视网膜新生血管性疾病是世界范围最严重的致盲性眼病之一,随着社会老龄化及生活水平的提高,发病率已呈上升趋势,严重危害人们的身心健康及生活质量。此类疾病包括增殖型糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑病变、视网膜静脉阻塞、早产儿视网膜病变等,常因玻璃体积

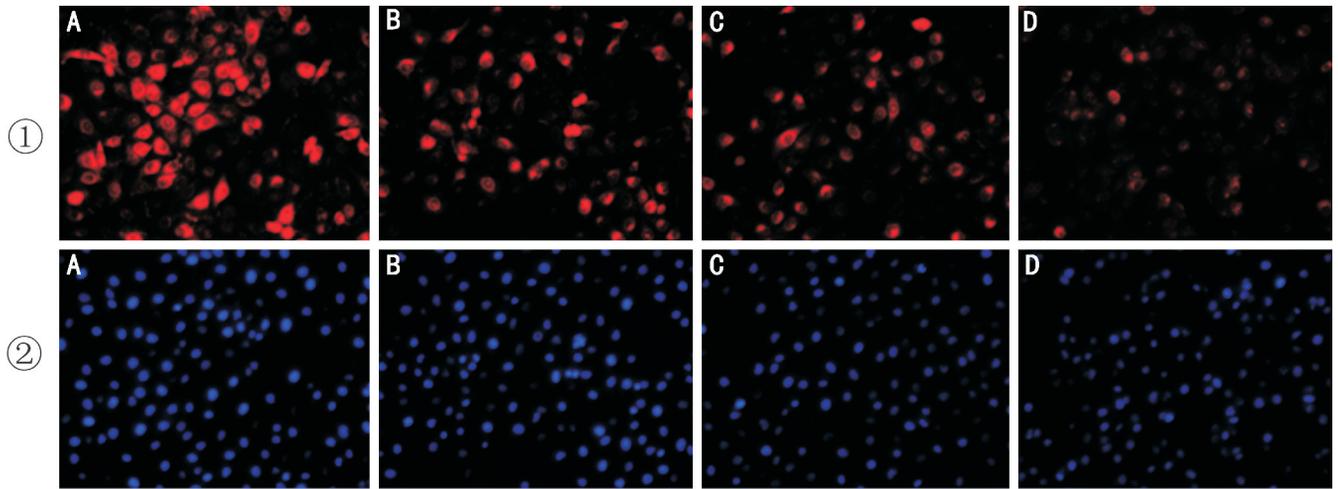


图1 各实验组细胞 VEGF 免疫荧光细胞化学法结果($\times 400$) A:低氧 PGC-1 α 组;B:低氧对照组;C:常氧 PGC-1 α 组;D:常氧对照组;①:细胞浆为红色荧光;②:细胞核染色为蓝色。

表3 免疫荧光细胞化学法检测各组细胞中 VEGF 蛋白的表达

分组	视野	VEGF 蛋白 $\bar{x} \pm s$
常氧 PGC-1 α 组	5	81.38 \pm 3.08
常氧对照组	5	43.55 \pm 2.10 ^b
低氧 PGC-1 α 组	5	165.85 \pm 3.30 ^{b,d}
低氧对照组	5	82.75 \pm 2.02 ^{a,d,f}

^a $P > 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 常氧 PGC-1 α 组; ^d $P < 0.01$ vs 常氧对照组; ^f $P < 0.01$ vs 低氧 PGC-1 α 组。

血、玻璃体腔和视网膜表面增殖组织对视网膜产生牵拉致视网膜脱离而严重影响视功能,甚至出现视力丧失。视网膜新生血管的形成是一个复杂且有多种因子参与的过程^[7]。缺血、缺氧是诱导视网膜新生血管形成的重要因素,通过刺激调控血管生成的关键基因 VEGF 的表达升高,促进新生血管的形成^[8]。

PGC-1 α 是最近发现的一种核转录协同刺激因子,属于 PGC-1 基因家族,它有多种核激素受体的结合位点,对多种组织和细胞的氧化反应和线粒体能量代谢具有高度调节作用^[9]。Arany 等^[6] 研究发现,PGC-1 α 另一重要功能就是上调包括 VEGF 在内的血管生成因子的表达,并促进骨骼肌组织新生血管的形成。虽然已有大量研究围绕视网膜新生血管而开展,但其形成机制依然未完全阐明。PGC-1 α 既然能在其他组织新生血管的形成中发挥作用,那么它是否也能调控视网膜新生血管的形成?为了探讨 PGC-1 α 是否能促进视网膜新生血管的形成,本研究首先选择 HRVEC 作为实验对象,采用低氧培养模拟体内缺氧环境,观察外源性 PGC-1 α 对细胞 VEGF 表达的影响。

由于 PGC-1 α 受缺氧的调控,我们将细胞分别置于常氧和低氧环境中培养,观察 PGC-1 α 的表达变化。另外,为了观察重组 PGC-1 α 蛋白在常氧和低氧环境中发挥的作用是否有不同,因此我们将细胞分为四组,常氧和低氧环境下其中两组细胞加入重组 PGC-1 α 蛋白,另两组细胞作为对照组。本研究中,HRVEC 在低氧环境中生长情况良好,未见明显细胞死亡情况。说明低氧培养不影响细胞的状态。低氧环境下,常氧对照组和低氧对照组细胞 VEGF mRNA 和蛋白的表达均上调,与以往的研究结果一致。若要观察某个基因的功能,主要是采取过表达和表达

抑制两种方法进行研究,本研究采取的是过表达方法。当细胞中加入重组 PGC-1 α 蛋白后,不管是在常氧环境还是低氧环境下细胞生长情况依然良好,说明此方法是可行的。细胞经重组 PGC-1 α 蛋白干预后,VEGF mRNA 和蛋白的表达均上调,包括常氧和低氧环境,进一步验证了 PGC-1 α 对 VEGF 表达的调控,以及 PGC-1 α /VEGF 信号通路在常氧和低氧环境中均发挥作用。本研究首次在体外实验中验证了 HRVEC 中 PGC-1 α 对 VEGF 的调控。因此,PGC-1 α 在常氧和低氧环境中均能上调 HRVEC 中 VEGF 的表达,进一步证实了 PGC-1 α 与 VEGF 的关系。

参考文献

- Mascareno E, Manukyan I, Das DK, et al. Downregulation of cardiac lineage protein (CLP-1) expression in CLP-1 +/- mice affords cardioprotection against ischemic stress. *J Cell Mol Med* 2009;13(8B): 2744-2753
- Fu B, Zhang J, Zhang X, et al. Alpha-lipoic acid upregulates SIRT1-dependent PGC-1 α expression and protects mouse brain against focal ischemia. *Neuroscience* 2014;281C:251-257
- Chen SD, Lin TK, Yang DI, et al. Protective effects of peroxisome proliferator-activated receptors gamma coactivator-1 alpha against neuronal cell death in the hippocampal CA1 subfield after transient global ischemia. *J Neurosci Res* 2010; 88(3): 605-613
- Yamaguchi T, Omori M, Tanaka N, et al. Distinct and additive effects of sodium bicarbonate and continuous mild heat stress on fiber type shift via calcineurin/NFAT pathway in human skeletal myoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013;305(3): C323-333
- Yamaguchi T, Suzuki T, Arai H, et al. Continuous mild heat stress induces differentiation of mammalian myoblasts, shifting fiber type from fast to slow. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;298(1):C140-148
- Arany Z, Foo SY, Ma Y, et al. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature* 2008;451(7181): 1008-1012
- Stütt AW, O'Neill CL, O'Doherty MT, et al. Vascular stem cells and ischaemic retinopathies. *Prog Retin Eye Res* 2011;30(3):149-166
- Jo DH, Kim S, Kim D, et al. VEGF-binding aptides and the inhibition of choroidal and retinal neovascularization. *Biomaterials* 2014; 35(9): 3052-3059
- Chaillou T, Koulmann N, Meunier A, et al. Effect of hypoxia exposure on the recovery of skeletal muscle phenotype during regeneration. *Mol Cell Biochem* 2014;390(1-2):31-40