

白藜芦醇对高糖环境下视网膜血管内皮细胞增殖及 HMGB1 乙酰化的影响

韦艳, 李红, 苏晓庆, 燕振国

作者单位: (730050) 中国甘肃省兰州市, 兰州军区兰州总医院眼科中心

作者简介: 韦艳, 女, 毕业于第四军医大学, 学士, 主治医师, 研究方向: 眼底病基础与临床研究。

通讯作者: 燕振国, 男, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 高原性眼病及眼屈光学. yanzhenguozy@163.com

收稿日期: 2015-07-08 修回日期: 2015-11-12

Effects of resveratrol on proliferation of retinal vascular endothelial cells and acetylated HMGB1 in high glucose environment

Yan Wei, Hong Li, Xiao-Qing Su, Zhen-Guo Yan

Department of Ophthalmology, General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Correspondence to: Zhen-Guo Yan. Department of Ophthalmology, General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. yanzhenguozy@163.com

Received: 2015-07-08 Accepted: 2015-11-12

Abstract

• AIM : To study potential mechanism and effects of resveratrol on the proliferation of human retinal vascular endothelial cells in high glucose environment.

• METHODS: Human retinal vascular endothelial cells were cultured in low glucose or high glucose environment. The MTT assay was used to detect the proliferation of each group to study the effects of resveratrol on the proliferation of human retinal vascular endothelial cells in high glucose environment. Detection of Sirtuin 1 (SIRT1) expression and acetylated high mobility group box - 1 protein 1 (HMGB1) was performed by western-blot and coimmunoprecipitation.

• RESULTS: Resveratrol inhibited the proliferation of human retinal vascular endothelial cells in high glucose in a dose-dependent manner. High glucose decreased SIRT1 expression and increase the degree of HMGB1 deacetylation, which can be reversed by resveratrol.

• CONCLUSION: Resveratrol may reverse proliferation of retinal vascular endothelial cells in high glucose through SIRT1-HMGB1 pathway.

• KEYWORDS: resveratrol; retinal vascular endothelial cells; proliferation; Sirtuin 1; high mobility group box - 1 protein 1

Citation: Wei Y, Li H, Su XQ, *et al.* Effects of resveratrol on proliferation of retinal vascular endothelial cells and acetylated HMGB1 in high glucose environment. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(12):2049-2051

摘要

目的: 探讨白藜芦醇对高糖环境下视网膜血管内皮细胞增殖的影响, 并对其机制进行探讨。

方法: 人视网膜血管内皮细胞培养于低糖或高糖环境, 通过 MTT 法测定各组细胞增殖, 研究白藜芦醇对高糖培养的视网膜血管内皮细胞增殖的影响。通过 Western-blot 及免疫共沉淀检测 SIRT1 表达及 HMGB1 的乙酰化。

结果: 白藜芦醇对高糖环境下的视网膜血管内皮细胞增殖具有显著抑制作用 ($P < 0.05$), 且随白藜芦醇剂量增加, 抑制作用增强。高糖抑制 SIRT1 表达, 提高 HMGB1 的乙酰化, 白藜芦醇能逆转上述改变。

结论: 白藜芦醇可能通过 SIRT1-HMGB1 通路抑制高糖环境下的视网膜血管内皮细胞增殖。

关键词: 白藜芦醇; 视网膜血管内皮细胞; 细胞增殖; SIRT1; HMGB1

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.12.06

引用: 韦艳, 李红, 苏晓庆, 等. 白藜芦醇对高糖环境下视网膜血管内皮细胞增殖及 HMGB1 乙酰化的影响. 国际眼科杂志 2015; 15(12):2049-2051

0 引言

糖尿病视网膜病变是一种严重的糖尿病微血管病变, 长期的高糖环境损伤视网膜血管内皮, 导致微血管瘤、渗出、新生血管、视网膜脱离甚至失明。由于其发病机制复杂, 目前的治疗方法疗效有限。白藜芦醇 (Resveratrol, RSV) 是多酚类化合物, 具有减轻缺血再灌注损伤和抗肿瘤作用。近期的研究表明, 白藜芦醇能抑制肺癌、乳腺癌和神经胶质瘤新生血管生成^[1]。李雯霖等^[2]发现白藜芦醇能抑制缺氧诱导的视网膜血管内皮细胞增殖及 VEGF 的表达。然而, 在高糖环境下, 白藜芦醇是否能减轻视网膜血管内皮细胞增殖, 目前尚不清楚。本文探讨白藜芦醇对高糖环境下的视网膜血管内皮细胞增殖的影响及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人视网膜血管内皮细胞 (HREC 6530) 购自上海复蒙基因生物科技有限公司, 白藜芦醇购自 Sigma 公司。SIRT1 和 HMGB1 抗体购自 CST 公司。Tubulin (内参) 与羊抗兔二抗购自康为世纪生物有限公司。DMEM 培养液与胎牛血清均购自 Gibco 公司。MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自碧云天生物技术公司, 免疫共沉淀试剂盒购自 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 白藜芦醇对高糖作用下人视网膜血管内皮细胞增殖的影响 取对数生长期的 HREC 6530 细胞,以含 1% 胎牛血清的 DMED 培养基制备为 2×10^4 个/mL 的细胞悬液,接种 96 孔培养板,每孔 $100 \mu\text{L}$,置于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 24h 后换新鲜培养液。分为 NG+H0 组(含有 1g/L 葡萄糖,白藜芦醇的浓度分别为 0)及 HG+H0、HG+H10、HG+H50、HG+H100 组(各组中均含有 4.5g/L 葡萄糖,白藜芦醇的浓度分别为 0、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$),细胞培养 24h 后,每孔加入 5mg/mL MTT 溶液 $10 \mu\text{L}$ 继续培养 4h,弃上清。每孔加入 $100 \mu\text{L}$ Formazan 溶解液,在细胞培养箱内再继续孵育,直至 Formazan 全部溶解。自动酶标读数仪 570nm 处测定各孔吸光度(A)值。每组设 3 个复孔,根据 MTT 的吸光度(A)值计算出白藜芦醇对视网膜血管内皮细胞的增殖抑制率。细胞抑制率计算:计算公式:增殖抑制率 = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。

1.2.2 Western-blot 检测白藜芦醇对高糖条件下人视网膜内皮细胞 SIRT1 表达的影响 6 孔板中培养人视网膜血管内皮细胞至 40% ~ 50%,分为低糖 DMEM 培养组(1g/L 葡萄糖),高糖 DMED 培养组(4.5g/L 葡萄糖),高糖 DMEM + 白藜芦醇组(50 $\mu\text{mol/L}$)。24h 后每孔加入 $100 \mu\text{L}$ RIPA 细胞裂解液(含 1mmol/L PMSF),将细胞刮下,吸取细胞裂解液置于 1.5mL Ep 管中,15000g 离心 5min,吸取上清,BCA 法测定蛋白浓度。加入 $5 \times$ loading buffer, 100°C 加热煮沸 10min。制作 10% SDS-PAGE 凝胶,每孔上样量为 $40 \mu\text{g}$ 。300mA 转膜 90min,5% BSA 封闭 2h, 4°C 冰箱转筒孵育 SIRT1 单克隆抗体过夜,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗检测目的蛋白。应用 Quantity-one 软件分析 SIRT1 与内参 Tubulin 蛋白的表达。

1.2.3 免疫共沉淀检测 HGMB1 的乙酰化 用 $500 \mu\text{L}$ $1 \times$ 交联缓冲液预洗 Protein A/G 磁珠 2 次,与通用的乙酰化抗体 $5 \mu\text{g}$ 结合 15min,再用交联缓冲液洗磁珠 3 次。用 DSS 进行抗体与磁珠的交联 30min 后 $100 \mu\text{L}$ 洗脱液漂洗磁珠 3 次,再用 $200 \mu\text{L}$ 免疫沉淀裂解缓冲液洗磁珠 2 次。室温下孵育 1 ~ 2h,用 $500 \mu\text{L}$ 免疫沉淀裂解缓冲液洗磁珠 2 次,之后用 $500 \mu\text{L}$ 纯水洗脱结合的抗原,用通用的乙酰化抗体和 HMGB1 抗体进行 Western-blot 检测 HMGB1 的乙酰化程度。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,各组间实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数的比较用单因素方差分析,组间均数的比较用 SNK-q 检验,相关性采用 Spearman 相关分析,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 白藜芦醇对高糖环境下的视网膜血管内皮细胞增殖的影响 MTT 比色法检测显示:与低糖培养组比较,高糖培养组细胞增殖率略有升高。细胞高糖培养液中分别加入 0、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇后,视网膜血管内皮细胞增殖的抑制率分别为 8.73%、15.69% 和 43.43%,存在剂量依赖性($r_s = 1.000, P < 0.01$,表 1)。

2.2 白藜芦醇对 SIRT1 蛋白表达的影响 培养的人视网膜血管内皮细胞(HREC 6530),分为 NG 组(低糖 DMEM 培养组)、HG 组(高糖 DMED 培养组)、HG+RSV 组(高糖 DMEM+50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇)。24h 后,提取细胞总蛋白,

表 1 白藜芦醇人视网膜血管内皮细胞增殖的影响

分组	白藜芦醇浓度($\mu\text{mol/L}$)	A 值($\bar{x} \pm s$)	增殖抑制率(%)
NG+H0 组	0	0.853 \pm 0.0313	-
HG+H0 组	0	0.905 \pm 0.0277	-
HG+H10 组	10	0.826 \pm 0.0245	8.73
HG+H50 组	50	0.763 \pm 0.0309	15.69
HG+H100 组	100	0.512 \pm 0.0221	43.43

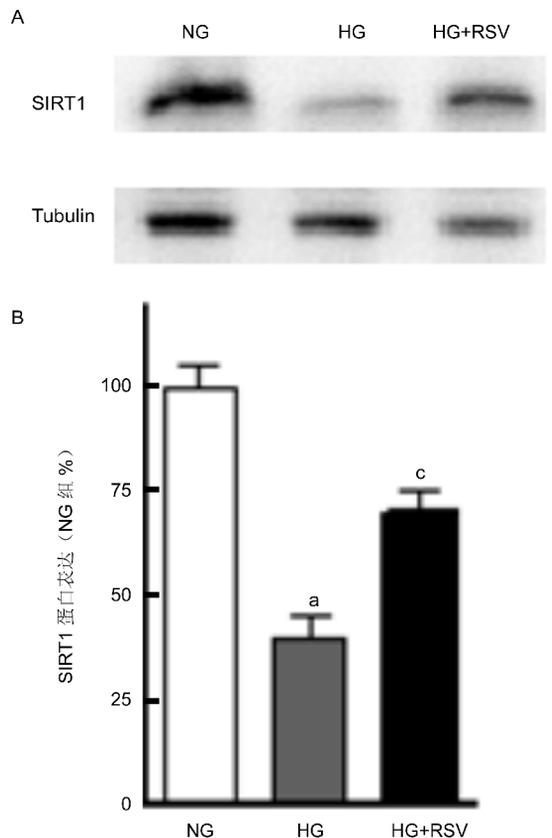


图 1 白藜芦醇对高糖培养的 HREC 6530 中 SIRT1 表达的影响 A: Western-blot 检测细胞 SIRT1 蛋白表达;B: 柱状图显示 SIRT1 蛋白表达差异。^a $P < 0.05$ vs NG 组;^c $P < 0.05$ vs HG 组。

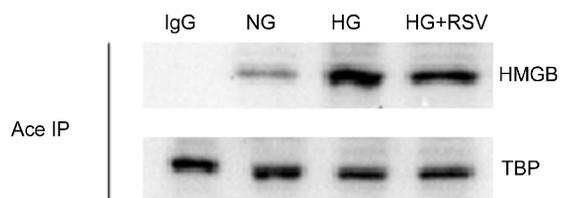


图 2 白藜芦醇对高糖培养的 HREC 6530 中 HMGB1 乙酰化的影响。

Western-blot 检测细胞 SIRT1 蛋白表达,结果显示(图 1):高糖能显著抑制 SIRT1 蛋白表达,而加入白藜芦醇能恢复 HREC 6530 中 SIRT1 的表达,组间差异具有统计学意义($F = 33.523, P < 0.05$)。

2.3 白藜芦醇对 HMGB1 乙酰化的影响 培养的人视网膜血管内皮细胞(HREC 6530),分为 NG 组(低糖 DMEM 培养组)、HG 组(高糖 DMED 培养组)、HG+RSV 组(高糖 DMEM+50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇)。24h 后,免疫共沉淀检测细胞 HMGB1 蛋白表达,TATA 结合蛋白(TBP)为内参。结果显示(图 2):NG 组 HMGB1 乙酰化程度较低,HG 组

乙酰化增加,而RSV能明显降低HG组HMGB1的乙酰化程度,组间差异具有统计学意义($F=13.411, P<0.05$)。

3 讨论

糖尿病影响视网膜的微循环,导致一系列的结构改变,包括渗出、内皮细胞增殖、水肿以及新生血管形成,最终导致失明^[3]。但目前治疗方法有限,对其发病机制及新的治疗方法的探索有重要价值。

白藜芦醇是一种生物性很强的天然多酚类物质,能够提高SIRT1的活性。近年来的研究表明:高糖诱导牛视网膜血管内皮细胞炎症基因、NF- κ B、促凋亡基因Bax表达,SIRT1高表达能通过LKB1/AMPK/ROS途径,抑制NF- κ B和Bax表达^[4]。另外,Zhong等发现糖尿病氧化应激抑制SIRT1,增加P65乙酰化,促进MMP-9表达,损伤视网膜线粒体而激活凋亡,但白藜芦醇能够逆转上述改变,抑制糖尿病视网膜病变的发展^[5]。本研究中,我们发现高糖环境下视网膜内皮细胞增殖略有升高,而白藜芦醇能够抑制高糖环境下视网膜内皮细胞的增殖,并随着给药剂量的增加,抑制效果也随之增加。而且,我们发现在视网膜内皮细胞中,白藜芦醇能恢复高糖环境所致SIRT1表达的降低。

HMGB1(High-mobility group box 1)是一种普遍存在的、由215个氨基酸构成的核蛋白,与DNA结合维持染色体稳定,控制自噬;还能通过调节HSP27的转录清除缺陷的线粒体。除此之外,HMGB1可从坏死和损伤细胞中释放,作为一种促炎症因子。在急性肾损伤动物模型中,肾静脉HMGB1水平升高;LPS处理的内皮细胞中,HMGB1核质穿梭增加,乙酰化程度增加^[6]。重要的是,HMGB1在增生性糖尿病视网膜病变患者的玻璃体液和视网膜前膜中的表达也上调,通过下游信号通路引起炎症,破坏血-视网膜屏障,增加视网膜细胞的凋亡。另外,大鼠玻璃体注射HMGB1能够增加SDF-1受体CXCR4、HIF-1 α 和VEGF的表达,促进血管生成^[7]。

HMGB1乙酰化程度与其活性和核质穿梭有关,而SIRT1是重要的去乙酰化酶。在本研究中,我们发现高糖培养抑制视网膜血管内皮细胞的SIRT1的表达,并增加HMGB1的乙酰化,可能通过激活HMGB1而增加炎症反应,促进视网膜血管内皮细胞的增殖。白藜芦醇是SIRT1的激动剂,能提高视网膜内皮细胞的SIRT1表达,并降低HMGB1的乙酰化,抑制了下游VEGF等信号分子的释放,从而抑制了内皮细胞的增殖。

综上所述,我们认为高糖环境带来的氧化应激抑制了视网膜内皮细胞中SIRT1的表达,从而增加HMGB1的乙酰化,增加促炎、促血管生成因子的释放,从而增加内皮细胞增殖及新生血管形成;而白藜芦醇可能通过SIRT1-HMGB1-VEGF通路抑制了HMGB1的活性,降低VEGF的表达,从而减轻糖尿病视网膜病变的发生。本研究对糖尿病视网膜病变发生的机制进行了有益的探索,并为白藜芦醇治疗糖尿病视网膜病变提供了更多的实验依据。

参考文献

- 1 Chen Y, Tseng SH. Review. Pro- and anti-angiogenesis effects of resveratrol. *In Vivo* 2007;21(2):365-370
- 2 李雯霖,张莉,张越骊.白藜芦醇对视网膜血管内皮细胞增殖及VEGF表达的影响. *国际眼科杂志* 2008;8(6):1087-1090
- 3 Shin ES, Sorenson CM, Sheibani N. Diabetes and retinal vascular dysfunction. *J Ophthalmic Vis Res* 2014;9(3):362-373
- 4 Zheng Z, Chen H, Li J, et al. Sirtuin 1-mediated cellular metabolic memory of high glucose via the LKB1/AMPK/ROS pathway and therapeutic effects of metformin. *Diabetes* 2012;61(1):217-228
- 5 Kowluru RA, Santos JM, Zhong Q. Sirt1, a negative regulator of matrix metalloproteinase-9 in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(9):5653-5660
- 6 Rabadi MM, Xavier S, Vasko R, et al. High-mobility group box 1 is a novel deacetylation target of Sirtuin1. *Kidney Int* 2015;87(1):95-108
- 7 Abu El-Asrar AM, Mohammad G, Nawaz MI, et al. High-Mobility Group Box-1 Modulates the Expression of Inflammatory and Angiogenic Signaling Pathways in Diabetic Retina. *Curr Eye Res* 2015;40(11):1141-1152