

胰岛素对人视网膜微血管内皮细胞 syndecan-1 的表达及细胞通透性和增殖的影响

胡永亮^{1*}, 王静波^{2*}, 周 历², 韩晓霞³, 师凌昊²

基金项目:北京市自然科学基金(No. 7173269);国家自然科学基金(No. 81100684);首都卫生发展科研专项(No. 2011-5007-02);总参军事医学和老年病科研基金项目(No. ZCWS14C19)

作者单位:(100091)中国北京市,解放军第309医院¹皮肤科;²眼科;³(301700)中国天津市,93735部队医院五官科

*:胡永亮和王静波对本文贡献一致。

作者简介:胡永亮,毕业于军事医学科学院,博士,主管技师,研究方向:细胞的增生与调控;王静波,毕业于第四军医大学,博士,副主任医师,研究方向:眼外伤及眼内细胞的增生与调控。

通讯作者:王静波. jingbowang01@sina.cn

收稿日期:2017-12-13 修回日期:2018-07-05

Regulations of insulin on syndecan - 1 expression, cellular permeability and proliferation in human retinal microvascular endothelial cells

Yong-Liang Hu^{1*}, Jing-Bo Wang^{2*}, Li Zhou², Xiao-Xia Han³, Ling-Hao Shi²

Foundation items: Beijing Natural Science Foundation (No. 7173269); National Natural Science Foundation of China (No. 81100684); Beijing Health Development Research Foundation, China (No. 2011-5007-02); Military Medicine and Geriatrics of the Headquarters of the General Staff (No. ZCWS14C19)

¹Department of Dermatology; ²Department of Ophthalmology, the 309th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China;

³Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, the 93735th Hospital of Chinese PLA, Tianjin 301700, China

* Co-first authors: Yong-Liang Hu and Jing-Bo Wang.

Correspondence to: Jing - Bo Wang. Department of Ophthalmology, the 309th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China. jingbowang01@sina.cn

Received:2017-12-13 Accepted:2018-07-05

Abstract

• **AIM:** To investigate the effects of insulin on syndecan-1 expression, cellular permeability and proliferation in human retinal microvascular endothelial cells.

• **METHODS:** Cells were treated with 100nmol/L and 1000nmol/L insulin for 48h respectively. Expression of protein and mRNA were detected by western blot and quantitative real - time polymerase chain reaction. Cellular proliferation and permeability were examined by methods of methylthiazolyl tetrazolium and horseradish peroxidase.

• **RESULTS:** With treatment of insulin, protein and

mRNA of syndecan-1 both increased obviously, and the effect of high level insulin was more significant. After treated with insulin, cellular proliferation and permeability both enhanced, and the effects of high level insulin were stronger.

• **CONCLUSION:** Insulin can up - regulate syndecan - 1 protein and mRNA in cultured human retinal microvascular endothelial cells, and increase cellular permeability and proliferation.

• **KEYWORDS:** retinal microvascular endothelial cell; syndecan-1; insulin; permeability; proliferation

Citation: Hu YL, Wang JB, Zhou L, *et al.* Regulations of insulin on syndecan-1 expression, cellular permeability and proliferation in human retinal microvascular endothelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(8):1381-1384

摘要

目的: 观察胰岛素对人视网膜微血管内皮细胞 syndecan-1 的表达及细胞的增殖和通透性的影响。

方法: 以低浓度(100nmol/L)和高浓度(1000nmol/L)胰岛素分别刺激细胞 48h 后,采用蛋白印迹和实时定量聚合酶链反应观察 syndecan-1 蛋白和 mRNA 的表达变化。分别以四甲基偶氮唑蓝法和辣根过氧化物酶法观察细胞的增殖性和通透性。

结果: 不同浓度的胰岛素刺激后,视网膜微血管内皮细胞 syndecan-1 蛋白和 mRNA 的表达均升高,且高浓度胰岛素的作用更显著。胰岛素刺激后,视网膜微血管内皮细胞的增殖水平和通透性均增高,且高浓度胰岛素的作用更强。

结论: 胰岛素可上调人视网膜微血管内皮细胞 syndecan-1 的表达、增加细胞的通透性和促进细胞的增殖。

关键词: 视网膜微血管内皮细胞; syndecan-1; 胰岛素; 通透性; 增殖

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.8.05

引用: 胡永亮,王静波,周历,等. 胰岛素对人视网膜微血管内皮细胞 syndecan-1 的表达及细胞通透性和增殖的影响. *国际眼科杂志* 2018;18(8):1381-1384

0 引言

糖尿病视网膜病变是糖尿病的严重并发症之一,已成为发达国家和发展中国家工作人群的首位致盲性眼病。因而,糖尿病视网膜病变的防治已成为一个世界性的重要课题。研究发现,内层血-视网膜屏障功能的破坏

和崩溃是糖尿病视网膜病变进展的关键。血-视网膜屏障主要由视网膜微血管内皮细胞和细胞间的连接共同构成,以阻碍血液的渗透及其他物质在视网膜中的自由扩散,从而稳定视网膜内环境。研究表明,胰岛素在控制血糖的同时,可导致糖尿病视网膜病变的短期恶化^[1-8],其机制可能是胰岛素破坏了血-视网膜屏障^[5,9-10]。syndecan-1属于黏附分子整联蛋白跨膜硫酸蛋白多糖家族成员,是血管内皮细胞屏障的重要组成部分,调控细胞的黏附、移行和增殖^[11-21]。我们既往研究表明,syndecan-1可参与视网膜色素上皮细胞^[18]和视网膜的病理生理过程^[14,16-18]。本研究的目的是检测胰岛素刺激对视网膜微血管内皮细胞 syndecan-1 的表达变化及细胞的通透性和增殖的改变。

1 材料和方法

1.1 材料 主要试剂:内皮细胞培养基、胎牛血清、内皮细胞生长因子、青/链霉素购自美国 Sciencell 公司,蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自美国 Bimake 公司,实时定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂盒购自美国 Pierce 公司,胰蛋白酶和 OPTI-MEMI 培养基购自美国 Gibco 公司,PVDF 膜购自美国 Millipore 公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,反转录试剂盒购自美国 Promega 公司,四甲基偶氮唑蓝 (methylthiazolyl tetrazolium, MTT) 购自美国 Sigma 公司,生物合成人胰岛素注射液购自丹麦 Novo Nordisk 公司,兔抗人 syndecan-1 多克隆抗体购自美国 CST 公司,二羧基二喹啉蛋白定量试剂盒购自北京艾德莱公司,细胞裂解液和辣根过氧化物酶购自北京华佰泰生物科技有限公司,GAPDH 抗体和辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。syndecan-1 和 GAPDH 的引物由上海生工生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和刺激 正常人视网膜微血管内皮细胞由北京大学人民医院眼科中心、视网膜脉络膜诊治研究北京市重点实验室黎晓新课题组赠与。用含 5% 胎牛血清、1% 内皮细胞生长因子、1% 青/链霉素的内皮细胞培养基,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞消化后接种于培养板中,融合近 70% 时,换无血清培养液饥饿 6h 后,换为含胰岛素的无血清培养液,胰岛素终浓度分别为 100nmol/L 和 1000nmol/L^[22-23]。细胞刺激 48h 后,弃去培养液,换以磷酸盐缓冲液并轻柔晃动培养板 2 次,然后收集细胞,以备行 RNA 提取和蛋白提取。同时设未刺激的正常组,即为视网膜微血管内皮细胞更换无胰岛素的无血清培养液(作用时间与胰岛素刺激组相同)。

1.2.2 实时定量 PCR 检测 syndecan-1 mRNA 的表达

按 Trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA 并测定浓度,反转录合成 cDNA。按照说明书加入 cDNA 及混合物在 PCR 仪上进行扩增,每组设置 3 个复孔。引物序列为:syndecan-1 上游 5'-GGCTGTAGTCTGCCAGAAG-3',下游 5'-GTCGTTGAGGCCTGATGAGT-3';GAPDH 上游 5'-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3',下游 5'-GAAGGCTGGGCTCATT-3'。GAPDH 作为内参,按照 2^{-ΔΔCt} 计算 syndecan-1 mRNA 的相对表达量。

1.2.3 蛋白印迹法检测 syndecan-1 蛋白的表达 收集的细胞加入适量的细胞裂解液于冰上反应 15min,提取细

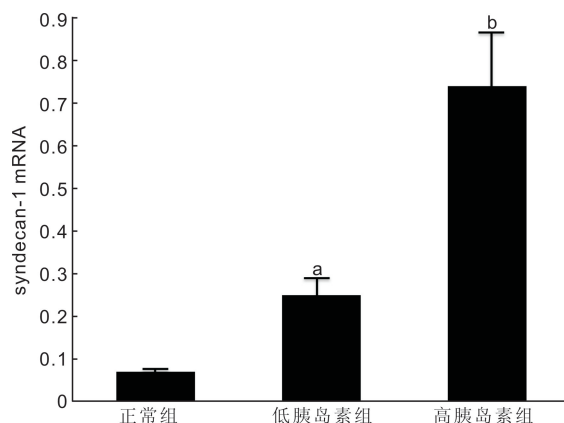


图1 视网膜微血管内皮细胞 syndecan-1 mRNA 的表达 (^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常组)。

胞总蛋白。二羧基二喹啉蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。取 30μg 总蛋白样品液进行 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,30mA 恒流转印 4h。5% 牛血清蛋白溶液室温孵育 1h,以封闭膜。加入 syndecan-1 抗体(稀释度 1:800)4℃ 过夜,含 0.05% 吐温的三乙醇胺缓冲液洗膜 3 次,每次 5min,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释度 1:1500),室温孵育 1h,含 0.05% 吐温的三乙醇胺缓冲液洗膜 3 次,每次 5min。增强化学发光显影。X 光片扫描后,用 Kodak Digital Science 1D 分析软件进行条带灰度分析,以 syndecan-1 的灰度值与 GAPDH 灰度值的比值代表 syndecan-1 蛋白的水平。

1.2.4 通透性的检测 将视网膜微血管内皮细胞接种于 Millicell 插入式细胞培养皿中,以辣根过氧化物酶作为示踪剂检测细胞的通透性。常规培养待细胞铺满单层,以胰岛素刺激细胞 48h 后,将 50mg/L 的辣根过氧化物酶加入上室,2min 后收集下室的液体,取 10μL 加入 96 孔板,每孔加入 200μL 底物 3,5,3',5'-四甲基联苯胺室温反应 15min,用 1mol/L 的硫酸终止反应,于 450nm 波长测定各组吸光度值。用吸光度反映内皮细胞的相对通透性。每组 6 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.5 细胞增殖水平的检测 将细胞接种于 96 孔板,待细胞融合近 70% 时,以胰岛素刺激 48h 后,每孔加入 5g/L MTT 溶液 20μL,继续孵育 4h,弃去培养液,每孔加入二甲基亚砜 150μL,振荡 10min,于 490nm 波长测吸光度。以吸光度表示细胞的增殖水平。每组 6 个复孔,实验重复 3 次。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计分析软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰岛素对细胞 syndecan-1 mRNA 表达的影响 与正常组相比,胰岛素刺激 48h 后,视网膜微血管细胞 syndecan-1 mRNA 表达升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),且高浓度胰岛素的作用尤明显 ($P < 0.01$,图 1)。

2.2 胰岛素对细胞 syndecan-1 蛋白表达的影响 与正常组相比,低浓度和高浓度的胰岛素刺激 48h 后,视网膜微血管细胞 syndecan-1 蛋白表达升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),且高浓度胰岛素的作用尤明显 ($P < 0.01$,图 2)。

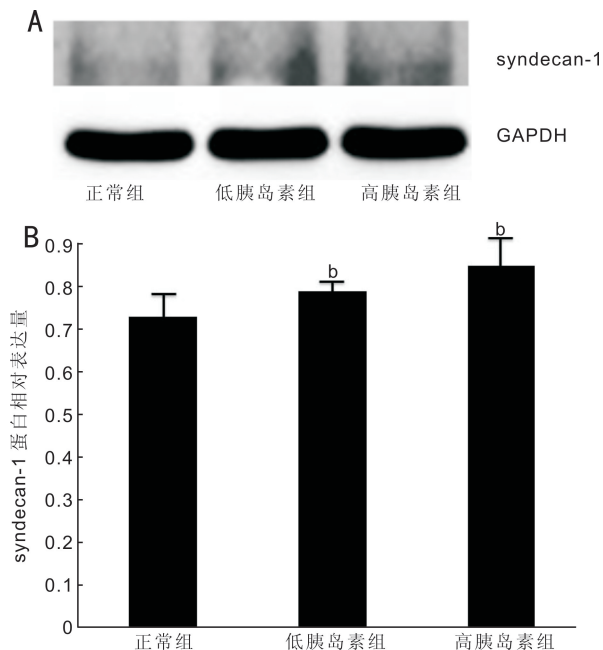


图2 视网膜微血管内皮细胞 syndecan-1 蛋白的表达 A: 蛋白印迹法检测各组细胞 syndecan-1 蛋白的表达; B: 各组细胞 syndecan-1 蛋白表达的直方图(^b $P < 0.01$ vs 正常组)。

2.3 胰岛素对细胞通透性的影响 正常组、低浓度胰岛素组和高浓度胰岛素组细胞的吸光度分别为 0.42 ± 0.02 、 0.81 ± 0.00 、 0.97 ± 0.02 ，三组比较差异有统计学意义 ($F = 68.81$, $P < 0.01$)。与正常组相比，不同浓度的胰岛素刺激 48h 后，细胞通透性升高，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，且高浓度胰岛素的作用尤为显著 ($P < 0.01$)。

2.4 胰岛素对细胞增殖水平的影响 正常组、低浓度胰岛素组和高浓度胰岛素组细胞的吸光度分别为 0.55 ± 0.03 、 0.62 ± 0.01 、 0.69 ± 0.02 。与正常组相比，不同浓度的胰岛素刺激 48h 后，细胞的增殖水平升高，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，其中高浓度胰岛素的作用更显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

糖尿病视网膜病变的基础是多种因素造成的血-视网膜屏障的破坏，该屏障的崩溃是病情进展的关键。视网膜微血管内皮细胞是构成血-视网膜屏障的主要细胞。糖萼是覆盖于血管内皮细胞表面的多糖蛋白复合物的总称，是内皮细胞表层的骨架结构，是血管内皮屏障的重要组成部分，也是血管内外液体平衡调控的关键环节，与血管通透性密切相关^[24]。糖萼损伤是血管内皮屏障功能受损的早期阶段^[24]。

syndecan 家族是糖萼的核心蛋白^[24]。syndecan-1 是 syndecan 家族的重要成员，覆盖于上皮细胞和血管内皮细胞的表面，调控细胞的分化、黏附、移行和增殖，参与炎症、脂质代谢、组织的损伤修复、组织器官分化发育、血管形成等一系列生理病理过程的调节^[11-21]。目前尚未有 syndecan-1 与视网膜微血管内皮细胞研究的报道。我们前期研究已证实，syndecan-1 参与视网膜色素上皮细胞的生理病理过程^[18]，参与糖尿病视网膜病变等眼病的发生发展^[14,16-18]。此外，我们研究发现，体外胰岛素可上调 2 型糖尿病患者血清 syndecan-1 的水平^[13]。

严格控制血糖是减缓糖尿病并发症的有效措施。胰岛素是公认的控制血糖的强大武器，但它是一把双刃剑，

在控制血糖的同时可促进部分患者糖尿病视网膜病变的发生发展^[1-7]，且胰岛素治疗是糖尿病性黄斑水肿的一个独立的危险因素^[7]。胰岛素加重糖尿病视网膜病变发生发展的机制包括促进细胞的增殖、破坏血-视网膜屏障、促进新生血管的形成、影响谷氨酸代谢及诱导氧自由基的产生等^[5]。

本研究发现，人视网膜微血管内皮细胞表达 syndecan-1 分子，且外源性胰岛素可上调该分子的表达，增加细胞的通透性和增殖水平。而细胞通透性和增殖性的增加可导致血-视网膜屏障的破坏，这提示胰岛素可损害血-视网膜屏障，与其他学者的研究结果一致。外源性胰岛素上调体外培养的人视网膜微血管内皮细胞 syndecan-1 的表达与我们的前期临床研究结果一致^[13]。研究表明，胰岛素作用于细胞后，可快速刺激胸腺嘧啶核苷进入 DNA，以剂量依赖的方式显著地促进恒河猴视网膜血管内皮细胞的增殖^[25]。我们的研究同样表明，体外胰岛素可促进人视网膜微血管内皮细胞的增殖，且高浓度胰岛素的作用更强。syndecan-1 通过其硫酸乙酰肝素链与细胞外基质、生长因子、酶和酶抑制物等结合，参与细胞与细胞外基质的黏附，促进细胞-细胞间的黏附。syndecan-1 表达增加后，细胞间及细胞与基质间的黏附功能紊乱，细胞丧失生长接触抑制功能，导致细胞过度增殖^[11-21]。我们分析，胰岛素促视网膜微血管内皮细胞增殖与 syndecan-1 表达的增加有一定关系，但这需要进一步深入的研究来证实。此外，syndecan-1 介导黏附，维持正常的内皮细胞结构稳定和细胞的通透性，从而维持血管正常的渗透功能，细胞表面 syndecan-1 减少或缺失可增加细胞的通透性，导致细胞组成的屏障破坏^[11-21]。我们的研究表明，胰岛素在上调 syndecan-1 表达的同时而增加了视网膜微血管内皮细胞的通透性，这是两种相悖的作用，因此我们推测，胰岛素增加细胞通透性的作用超越了 syndecan-1 表达上调对通透性的影响。

我们的研究表明，胰岛素可上调体外培养的人视网膜微血管内皮细胞 syndecan-1 的表达，可增加细胞的通透性和促进细胞的增殖。胰岛素发挥功能是通过与细胞膜上的胰岛素受体结合而实现的，胰岛素受体是一种跨膜糖蛋白，那么，胰岛素受体与 syndecan-1 两种跨膜糖蛋白之间是何种关系？二者是如何调控的？这还需要后续更深入的研究来阐明。

参考文献

- 1 The Diabetes Control and Complications Trial. The effect of intensive diabetes treatment on the progression of diabetic retinopathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol* 1995;113(1):36-51
- 2 Chantelau E, Frystyk J. Progression of diabetic retinopathy during improved metabolic control may be treated with reduced insulin dosage and/or somatostatin analogue administration -- a case report. *Growth Horm IGF Res* 2005;15(2):130-135
- 3 Zhang P, Liu N, Wang Y. Insulin may cause deterioration of proliferative diabetic retinopathy. *Med Hypotheses* 2009; 72 (3): 306-308
- 4 Nelson RG, Wolfe JA, Horton MB, et al. Proliferative retinopathy in NIDDM. Incidence and risk factors in Pima Indians. *Diabetes* 1989;38(4):435-440
- 5 郑彦, 过贵元. 胰岛素在糖尿病视网膜病变中的研究进展. *国际眼科杂志* 2012;12(3):461-463
- 6 The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Early worsening of diabetic retinopathy in the Diabetes Control and

Complications Trial. Arch Ophthalmol 1998;116(7):874-886

7 Aroca PR, Salvat M, Fernández J, et al. Risk factors for diffuse and focal macular edema. *J Diabetes Complications* 2004;18(4):211-215

8 王静波, 张琳. 不同的降血糖治疗方案对无眼底并发症的糖尿病患者黄斑部视网膜厚度的影响. *国际眼科杂志* 2016;16(8):1541-1542

9 Poulaki V, Qin W, Joussen AM, et al. Acute intensive insulin therapy exacerbates diabetic blood-retinal barrier breakdown via hypoxia-inducible factor-1alpha and VEGF. *J Clin Invest* 2002;109(6):805-815

10 Jiang ZY, He Z, King BL, et al. Characterization of multiple signaling pathways of insulin in the regulation of vascular endothelial growth factor expression in vascular cells and angiogenesis. *J Biol Chem* 2003;278(34):31964-31971

11 Wang JB, Zhang YJ, Guan J, et al. Enhanced syndecan-1 expression on neutrophils in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2012;49(1):41-46

12 Wang JB, Zhang YJ, Zhang Y, et al. Negative correlation between serum syndecan-1 and apolipoprotein A1 in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2013;50(2):111-115

13 Wang JB, Guan J, Shen J, et al. Insulin increases shedding of syndecan-1 in the serum of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;86(2):83-88

14 Wang JB, Tian CW, Guo CM, et al. Increased levels of soluble syndecan-1 in the subretinal fluid and the vitreous of eyes with rhegmatogenous retinal detachment. *Curr Eye Res* 2008;33(1):101-107

15 王静波. 糖尿病大鼠肝脏 syndecan-1 和蛋白激酶 C 的表达变化. *中国老年学杂志* 2014;34(13):3673-3675

16 王静波, 宋宗明, 孙吉君. syndecan-1 在视网膜脱离患者玻璃体液中的表达. *中国耳鼻咽喉科杂志* 2013;13(6):357-358,364

17 王静波, 宋宗明, 孙吉君. 糖尿病视网膜病变患者玻璃体液中 syndecan-1 及上皮中性粒细胞活化肽 78 的表达. *临床眼科杂志* 2013;21(6):481-483

18 王静波, 余欢龙. syndecan-1 在糖尿病视网膜膜中的表达. *国际眼科杂志* 2013;13(4):660-662

19 王静波, 关娟, 张妍, 等. syndecan-1 在 2 型糖尿病患者白细胞表面表达的研究. *中国糖尿病杂志* 2013;21(1):57-59

20 王静波, 惠延年, 韩泉洪, 等. 细胞因子对人视网膜色素上皮细胞 syndecan-1 的影响. *中华眼底病杂志* 2006;22(2):113-116

21 Alexopoulou AN, Mulhaupt HA, Couchman JR. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(3):505-528

22 邱海翔, 夏欣, 刘莹, 等. 胰岛素对正常糖和高糖浓度下牛视网膜微血管内皮细胞血管内皮生长因子表达的影响. *中华眼科杂志* 2008;44(7):640-644

23 宋鄂, 王越晖, 徐琪, 等. 高浓度胰岛素对兔视网膜 Müller 细胞表达血管内皮生长因子表达的影响. *中华眼科杂志* 2004;40(1):40-44

24 戴跃龙, 胡森, 窦永起. 血管内皮糖萼损伤机制与保护药物的研究进展. *感染、炎症、修复* 2016;17(1):118-121

25 周赛君, 陈松, 于佩, 等. 胰岛素经 VEGF-A/VEGFR2 途径促进恒河猴视网膜血管内皮细胞的血管新生. *中华内分泌代谢杂志* 2010;26(10):891-893