

# 莪术油对高糖下视网膜血管内皮细胞增殖及 VEGF 表达的影响

唐虹, 彭辉灿, 程启琳, 向文雯

作者单位: (421001) 中国湖南省衡阳市, 南华大学附属第二医院眼科

作者简介: 唐虹, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病学。

通讯作者: 彭辉灿, 教授, 硕士研究生导师, 《国际眼科杂志》编委, 研究方向: 眼底病基础与临床研究. penghuican@sina.com

收稿日期: 2012-08-03 修回日期: 2012-11-21

## Effects of Rhizoma Zedoariae on proliferation and expression of VEGF of human retinal capillary endothelial cells in high glucose environment

Hong Tang, Hui-Can Peng, Qi-Lin Cheng, Wen-Wen Xiang

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Correspondence to: Hui-Can Peng. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China. penghuican@sina.com

Received: 2012-08-03 Accepted: 2012-11-21

### Abstract

• AIM: To study the effects of different density of Rhizoma Zedoariae on the multiplication and apoptosis of human retinal capillary endothelial cells (HRCECs) and vascular endothelial multiplication factor (VEGF) in high glucose environment.

• METHODS: Fresh eyeballs HRCECs extracted just after cornea transplanting operation were cultivated *in vitro*. The third or fourth generation healthy cells for this experiment were obtained, and divided into three groups: low glucose, high glucose, high glucose plus different density of Rhizoma Zedoariae group (60, 80, 100, and 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). MTT was employed to detect the multiplication of HRCECs, and the HRCECs VEGF through immune cells was observed.

• RESULTS: MTT comparison: there was no obvious difference between high glucose and low glucose groups ( $P>0.05$ ), while there was significant difference between high glucose+ and high glucose groups ( $P<0.05$ ), and different density of glucose showed big difference. Immune cells: high glucose group had obvious affection compared with low glucose group, and there was significant difference between high glucose+ group and high glucose group in their affection on VEGF ( $P<0.05$ ), as well as in different density among high glucose group.

• CONCLUSION: Rhizoma Zedoariae can restrain the multiplication of HRCECs and VEGF in high glucose environment.

• KEYWORDS: Rhizoma Zedoariae; human retinal capillary endothelial cells; multiplication; apoptosis; vascular endothelial multiplication factor

Citation: Tang H, Peng HC, Cheng QL, *et al*. Effects of Rhizoma Zedoariae on proliferation and expression of VEGF of human retinal capillary endothelial cells in high glucose environment. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(12):2268-2271

### 摘要

目的: 研究不同浓度的莪术油对高糖条件下体外培养的人视网膜血管内皮细胞 (human retinal capillary endothelial cells, HRCECs) 增殖、凋亡及血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达的影响。

方法: 体外培养从角膜移植术后新鲜人眼球提取的 HRCECs。取生长良好的第 3~4 代细胞用于实验, 实验分为低糖对照组、高糖对照组、高糖+(60, 80, 100, 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 不同浓度莪术油组, 用噻唑蓝 (MTT) 比色法检测 HRCECs 的增殖, 通过免疫细胞化学法观察各分组 HRCECs 中 VEGF 的表达情况。

结果: MTT 比色法结果显示: 高糖对照组与低糖对照组没有显著差异 ( $P>0.05$ ), 用 60, 80, 100, 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的莪术油处理高糖下 HRCECs 作用 24h 高糖+不同浓度莪术油组与高糖对照组相比具有显著性差异 ( $P<0.05$ ), 高糖+不同浓度莪术油组之间呈时间和浓度的显著性差异 ( $P<0.05$ )。免疫细胞化学检测显示: 与低糖对照组相比, 高糖对照组 VEGF 表达明显 ( $P<0.05$ ), 用 80, 100, 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的莪术油处理高糖下 HRCECs 24h, 高糖+不同浓度莪术油组与高糖对照组相比 VEGF 表达有显著性差异 ( $P<0.05$ ), 高糖+不同浓度莪术油组之间两两比较均具有显著性差异 ( $P<0.05$ )。

结论: 莪术油可抑制高糖下人视网膜血管内皮细胞增殖和 VEGF 表达。

关键词: 莪术油; 视网膜血管内皮细胞; 增殖; 凋亡; 血管内皮细胞生长因子

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2012.12.06

引用: 唐虹, 彭辉灿, 程启琳, 等. 莪术油对高糖下视网膜血管内皮细胞增殖及 VEGF 表达的影响. 国际眼科杂志 2012; 12(12): 2268-2271

### 0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病最常见微血管并发症之一。DR 可致盲——糖尿病眼

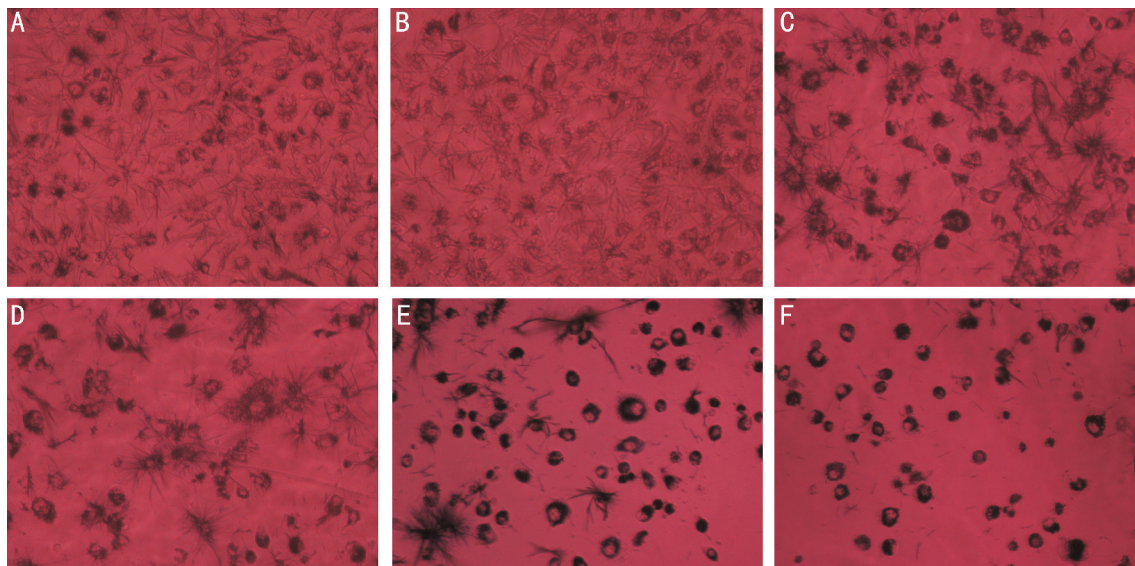


图1 噻唑蓝比色法测定莪术油对 HRCECs 增生的影响 A:  $T_0$ 组; B:  $T_{II}$ 组; C:  $T_1$ 组; D:  $T_2$ 组; E:  $T_3$ 组; F:  $T_4$ 组。

病最严重的并发症,且为不可逆性,其主要由视网膜新生血管(retinal neovascularization, RNV)的形成引起,因此,预防 RNV 的形成尤为重要。大量研究表明,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在新生血管生成的过程中扮演非常重要的角色,其在正常视网膜组织中表达很低,当出现缺血缺氧时,表达增高,能有效刺激视网膜血管内皮细胞的增殖和迁移,促使新生血管的形成。莪术的有效成分为莪术酮、莪术醇和榄香烯等,有研究表明莪术油能通过对肿瘤血管调控因子及其作用环节进行干预,调节血管生成因子的表达,从而抑制血管生成。本研究通过莪术油作用于体外培养的高糖下人视网膜血管内皮细胞(human retinal capillary endothelial cells, HRCECs)增殖与血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响,观察莪术油对其增殖、VEGF 表达的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2.5g/L 胰蛋白酶(碧云天)、高糖和低糖 DMEM 培养基(Hyclone)、胎牛血清(杭州四季青公司)、96 孔板(Nunclon)、6 孔板(Nunclon)、第Ⅷ因子相关抗原抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)、兔抗人 VEGF 抗体(北京博奥森生物技术有限公司)、SABC(兔 IgG)-POD 试剂盒(免疫检测试剂盒,武汉博士德生物公司)、DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物公司)、噻唑蓝(MTT)和二甲基亚砜(DMSO)(Solarbio)、莪术油注射液(苏州长征一欣凯制药有限公司,规格:10mL:莪术油 0.1g)。

## 1.2 方法

**1.2.1 人视网膜微血管内皮细胞培养** 取材于手术室角膜移植术后新鲜人眼球,参考国内外文献[1,2]的培养方法进行 HRCECs 原代培养。将培养瓶置于 50mL/L  $CO_2$ , 37℃ 培养箱内,每 2d 换液 1/3 ~ 1/2,待细胞长满瓶底约 80%,按 1:2 传代。

**1.2.2 人视网膜微血管内皮细胞鉴定** 用相差显微镜观察细胞的生物学形态特征;将盖玻片放入 6 孔板内,细胞爬片后,运用免疫细胞化学方法检测第Ⅷ因子相关抗原抗体,显微镜下观察其表达。

**1.2.3 实验分组和药物浓度** 实验分为: $T_0$ 组:不加细胞

只加高糖培养基的调零组; $T_I$ 组:低糖对照组; $T_{II}$ 组:高糖对照组; $T_1$ 组:高糖+60 $\mu$ g/mL 莪术油组; $T_2$ 组:高糖+80 $\mu$ g/mL 莪术油组; $T_3$ 组:高糖+100 $\mu$ g/mL 莪术油组; $T_4$ 组:高糖+120 $\mu$ g/mL 莪术油组。高糖葡萄糖浓度为 25mmol/L,低糖葡萄糖浓度为 5.5mmol/L。

## 1.2.4 噻唑蓝比色法测定莪术油对 HRCECs 增生的影响

取对数生长良好常规培养的细胞用于实验,弃培养基, PBS 洗 3 次,2.5g/L 胰酶消化,加含 100mL/L 胎牛血清高糖或低糖 DMEM 培养液终止消化,吹打分别制成高糖和低糖细胞悬液,调整细胞浓度为  $3.0 \times 10^4$  个/mL,加入到 1 个 96 孔板中,分为 7 组, $T_0$ 组、 $T_I$ 组、5 个高糖组( $T_{II}$ 组、 $T_1$ 组、 $T_2$ 组、 $T_3$ 组、 $T_4$ 组,高糖细胞悬液),每组 6 个复孔,每孔 200 $\mu$ L。将 96 孔板置于 50mL/L  $CO_2$ , 37℃ 培养箱内,12h 待细胞贴壁后取出 96 孔板,吸出孔中液体进行换液, $T_I$ 组 ~  $T_4$ 组分别加入 200 $\mu$ L 不同浓度莪术油,使莪术油终浓度为 60, 80, 100, 120 $\mu$ g/mL。培养 20h 后取出 96 孔板,每孔加入 5g/L 噻唑蓝(MTT)液 20 $\mu$ L,培养 4h 后终止培养(图 1),用 1mL 注射器吸干液体,每孔加 150 $\mu$ L DMSO,振荡 10min,待蓝紫色结晶完全溶解后,用自动酶标仪 570nm 波长测吸光度 A 值。上述条件下重复实验 2 次。抑制率(%) = [(实验组平均吸光度值-对照组平均吸光度值)/对照组平均吸光度值]  $\times$  100%。

## 1.2.5 免疫细胞化学检测莪术油对 HRCECs 及 VEGF 表达的影响

将消毒灭菌并标记好的医用盖玻片放入无菌的 6 孔板中,细胞制成密度为  $4.5 \times 10^4$  个/mL 的细胞悬液,接种于 6 孔板中,每孔 2mL,孵育 24h 后弃液,分组 5 组, $T_I$ 组、 $T_{II}$ 组、 $T_2$ 组、 $T_3$ 组、 $T_4$ 组,分别加入培养液及莪术油,每组 2 复孔,使  $T_2$  ~  $T_4$ 组终浓度分别为 80, 100, 120 $\mu$ g/mL,每孔 2mL。继续培养 24h 后取出盖玻片, PBS 液洗涤,4% 多聚甲醛室温固定 30min, PBS 液洗涤,3% 过氧化氢-甲醇室温浸泡 15min,以封闭内源性过氧化物酶, PBS 液洗涤后加入 5% BSA 湿盒中室温封闭 20min,滤纸吸去多余液体,加入一抗(兔抗人 VEGF 1:200),并以磷酸盐缓冲液代替一抗为阴性对照,4℃ 湿盒中过夜,37℃ 复温 45min, PBS 液洗涤,滴加二抗 37℃ 孵育 30min, SABC 法染色, DAB 显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,镜下观察。阳性染色以胞浆或胞膜有棕黄



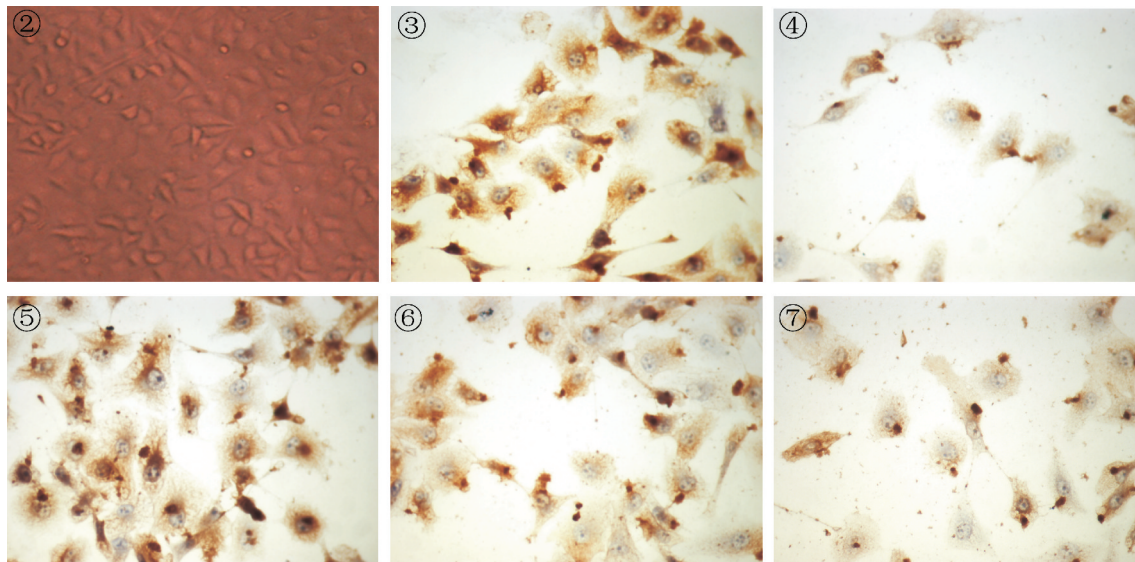


图2 原代培养14d,视网膜血管内皮细胞融合成单层,犹如铺路石样( $\times 200$ )。  
 图3  $T_H$ 组视网膜血管内皮细胞明显表达 VEGF (DAB $\times 400$ )。  
 图4  $T_L$ 组视网膜血管内皮细胞 VEGF 未见明显表达(DAB $\times 400$ )。  
 图5  $T_2$ 组视网膜微血管内皮细胞 VEGF 表达(DAB $\times 400$ )。  
 图6  $T_3$ 组视网膜微血管内皮细胞 VEGF 表达(DAB $\times 400$ )。  
 图7  $T_4$ 组视网膜微血管内皮细胞 VEGF 表达(DAB $\times 400$ )。

或棕褐色颗粒状物质沉积者。对各组进行灰度值测定,以背景灰度值与阳性灰度值之差作为每组灰度值。以上实验重复2次。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,各组实验数据以  $\bar{x} \pm s$  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,以  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

**2.1 HRCECs 的培养与鉴定** 在倒置相差显微镜下观察细胞形态:细胞呈现铺路石样单层贴壁生长(图2)。运用免疫细胞化学方法鉴定:经第 VIII 因子相关抗原抗体染色,HRCECs 胞浆中有棕色着色,阴性对照组无着色。均证实体外成功培养出 HRCECs。

**2.2 MTT 检测对 HRCECs 增殖的影响** MTT 比色法检测显示不同质量浓度莪术油处理对数生长期的内皮细胞培养 24h,实验组各浓度莪术油对 HRCECs 增殖有抑制影响,并存在时间和浓度的依赖性( $P < 0.05$ ),而高糖组和低糖对照组没有统计学意义( $P > 0.05$ ,表1)。

**2.3 免疫细胞化学检测莪术油对 HRCECs 中 VEGF 表达的结果** 阳性表现为胞浆膜有棕黄或棕褐色颗粒,各组灰度值测定结果见表2。高糖对照组与低糖对照组相比,细胞内阳性颗粒较多,颜色较深,VEGF 表达明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与高糖对照组相比,各浓度加药组对 HRCECs 作用 24h VEGF 表达均降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且呈浓度依赖性,细胞内阳性颗粒随药物浓度的增加而减少,颜色逐渐变淡(图3~7)。

## 3 讨论

DR 是糖尿病最常见的微血管病变之一,最终可致盲,尽管眼科治疗在不断提高,但仍是主要的致盲原因之一<sup>[3]</sup>。视网膜新生血管在 DR 致盲中起了关键作用,VEGF 是促新生血管形成的主要因子之一,会降低血管内

表1 莪术油对 HRCECs 增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	$A_{570}$ 值	抑制率 (%)
$T_0$	0.0809 $\pm$ 0.0022	-
$T_L$	0.9066 $\pm$ 0.02	-
$T_H$	0.9221 $\pm$ 0.0266 <sup>c</sup>	-
$T_1$	0.8234 $\pm$ 0.0198 <sup>a</sup>	11.73
$T_2$	0.7071 $\pm$ 0.0211 <sup>a</sup>	25.56
$T_3$	0.5962 $\pm$ 0.0270 <sup>a</sup>	38.74
$T_4$	0.3259 $\pm$ 0.0296 <sup>a</sup>	61.26

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs  $T_0$ 组; $T_0$  vs  $T_L$ 组:<sup>c</sup> $P > 0.05$ ;  $T_1 \sim T_4$ 各组间两两比较: $P < 0.05$  (One-way ANOVA,  $q$ -test)。

表2 免疫细胞化学检测莪术油对 HRCECs 中 VEGF 的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	VEGF 灰度值
$T_L$ 组	20.25 $\pm$ 4.25
$T_H$ 组	82.77 $\pm$ 8.25 <sup>c</sup>
$T_2$ 组	67.52 $\pm$ 7.44 <sup>a,c</sup>
$T_3$ 组	50.87 $\pm$ 7.29 <sup>a,c</sup>
$T_4$ 组	32.18 $\pm$ 4.48 <sup>a,c</sup>

注:<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs  $T_H$ 组;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs  $T_L$ 组;<sup>e</sup> $P < 0.05$   $T_1 \sim T_4$ 各组间两两比较。

皮细胞间的紧密连接蛋白表达,参与血管炎症反应、增加血管通透性和促进新生血管形成<sup>[4]</sup>。有研究表明,DR 患者眼内液中的 VEGF 含量增高,与微血管异常、新生血管及玻璃体体积血密切相关<sup>[5,6]</sup>。有临床研究显示,DR 患者房水、玻璃体内 VEGF 的浓度显著增高,且随视网膜病变程度恶化而增加,VEGF 在 DR 患者中进行性增高和超表达,提示 VEGF 是影响眼内血管生成而导致疾病发生的重要原因<sup>[7-10]</sup>。

莪术油的主要成分是莪术醇、 $\beta$ -榄香烯、莪术二酮和吉玛酮等,研究发现莪术油具有抗癌作用,有文献报道<sup>[11]</sup>,莪术油对肝癌细胞的生长有明显地抑制作用,经100mg/kg 莪术油灌胃给药,能显著抑制小鼠肝癌 HepA 细胞的生长,降低肝癌 HepA 细胞 DNA 光密度值、核面积及 DNA 指数,提高肝癌细胞中二倍体细胞的比例及降低超五倍体细胞比例。此外,莪术及其提取物还有抗早孕、抗癫痫和保肝、抗凝、抗血小板、抗氧化、调脂等广泛的心血管药理作用<sup>[12-15]</sup>。莪术的抗血管生成作用正在进一步的研究当中。

叶兰等<sup>[16]</sup>观察莪术对人工皮下移植海绵内新生肉芽组织生长及其新生血管的影响,通过免疫组化法进行内皮细胞特异性 VIII 因子、血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 染色, RT-PCR 检测 VEGF mRNA 表达。证实莪术可抑制海绵内新生肉芽组织的血管新生,其机制可能与抑制新生血管表达 VEGF 有关。Chen 等<sup>[17]</sup>在活体及体外实验中研究莪术油抗血管再生作用,发现 20 及 40 $\mu$ g/mL 莪术油在鸡胚胎膜形成血管的离体实验中表现出显著的抑制血管增生作用;且不同浓度莪术油在灌胃黑色素瘤模型小鼠 34d 后,小鼠瘤体内的血管生成显著减少,黑色素瘤的肺转移也相应减少,提示黑色素瘤生长受到抑制,可能与巨噬细胞分泌基质金属蛋白酶 (metalloproteinases, MMPs) 的表达下调有关。高承贤等<sup>[18]</sup>在姜黄素对牛血清促进的牛内皮细胞及人肝癌细胞 SGC-7901 增殖的影响研究中证实:姜黄素具有抗血管生成作用,潜在机制可能是抑制内皮细胞增殖和迁移,表明姜黄素是一种特异性血管生成抑制剂。莪术油能够有效的降低 DMBA 诱导大鼠乳腺癌前病变组织中 VEGF mRNA 表达强度,抑制血管生成<sup>[19]</sup>。

本实验 MTT 检测显示不同浓度的莪术油对高糖下培养的 HRCECs 的增殖抑制,并呈浓度依赖性。莪术油抑制 HRCECs 增殖抗血管形成作用可能与调节物质代谢、阻断内皮细胞膜受体与血管形成因子结合、抑制内皮细胞迁移、通过下调增殖期血管内皮细胞相关生长因子受体的表达等有关。我们在实验中通过免疫细胞化学法分别对低糖、高糖培养的细胞及高糖环境下不同浓度莪术油培养的细胞进行检测,证实与低糖相比高糖条件下内皮细胞 VEGF 的表达明显增加,而莪术油能下调 VEGF 的表达,并呈浓度依赖性。

新生血管与 VEGF 在 DR 的发生发展中都起着重要的作用,而我们的实验研究表明莪术油能抑制高糖条件下 HRCECs 的增殖和 VEGF 的表达,提示该药在糖尿病视网

膜病变的防治中有潜在的应用价值。

#### 参考文献

- 1 李斌,唐仕波,张革,等. 人类视网膜血管内皮细胞的培养与鉴定. 眼科研究 2005;23(1):20-22
- 2 Capetandes A, Gerritsen WE. Simplified methods for consistent and selective culture of bovine retinal endothelial cells and pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1738-1744
- 3 Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC, et al. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004;122(4):477-485
- 4 孔宇,袁军,陈鹏. 血清 VEGF 和 TNF- $\alpha$  水平与糖尿病视网膜病变关系. 国际论坛杂志 2009;28(18):32-33
- 5 Hidetaka N, Hideharu F, Hidetoshi Y, et al. Regulation of angiogenesis in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1075-1080
- 6 Cui L, Lu H. Alteration of intraocular pigment epithelium - derived factor and vascular endothelial growth factor in patients with diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2007;7(1):23-26
- 7 Peter S, Cree IA, Alexander R, et al. Angiopoietin modulation of vascular endothelial growth factor: Effects on retinal endothelial cell permeability. *Cytokine* 2007;40(2):144-150
- 8 Cavusoglu AC, Bilgili S, Alaluf A, et al. Vascular endothelial growth factor level in the serum of diabetic patients with retinopathy. *Ann Ophthalmol Skokie* 2007;39(3):205-208
- 9 吴子东,钟昌宝,钟景贤. 血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  和血管内皮生长因子与糖尿病视网膜病变. 国际眼科杂志 2008;8(10):2032-2033
- 10 张昌莲,邹洪胜,李艳丽. 血管内皮生长因子与糖尿病视网膜病变的相关性研究. 中国医疗前沿 2010;5(7):58,79
- 11 Wu WY, Luo YJ, Chen JH, et al. Image cytometric DNA analysis of hepatocarcinomas carried by mice treated by curcuma aromatica oil. *Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis* 2009;9(1):18-20
- 12 钱伟,赵福海,史大卓. 莪术及其提取物的心血管药理研究进展. 中国中西医结合杂志 2012;32(4):575-576
- 13 钟锋,顾健,张亮亮,等. 莪术药理作用的现代研究进展. 中国民族民间医药 2010;19(13):67-68
- 14 曹利娟,刘华钢,刘丽敏,等. 莪术油近五年的研究进展. 医学综述 2010;16(3):447-450
- 15 龙明智,陈磊磊. 姜黄素的药理作用. 国外医学中医中药分册 2003;25(5):270-287
- 16 叶兰,徐晓玉,李荣亨,等. 三棱、莪术对大鼠皮下移植人工海绵新生血管的影响研究. 中国药房 2008;19(21):1610-1612
- 17 Chen W, Lu Y, Gao M, et al. Anti-angiogenesis effect of essential oil from *Curcuma zedoaria* in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* 2011;133(1):220-226
- 18 高承贤,丁志山,梁冰冰,等. 姜黄素对血管生成影响的实验研究. 中药材 2003;26(7):499-502
- 19 宋爱莉,许振国. 莪术油对大鼠乳腺癌前病变组织中 VEGF mRNA 表达的影响. 中华中医药学刊 2012;30(4):679-681