·实验论著·

阿魏酸钠对高糖环境下人视网膜内皮细胞表达的影响

程启琳,李　红,唐　虹,彭辉灿

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:程启琳,女,在读硕士研究生,研究方向:青光眼。
通讯作者:李红,教授,硕士研究生导师,研究方向:青光眼. lihong5056@ yahoo. com. cn
收稿日期: 2012-08-25　修回日期: 2012-12-11

Effects of sodium ferulate on expression of VEGF of human retinal capillary endothelial cells in high glucose environment

Qi-Lin Cheng, Hong Li, Hong Tang, Hui-Can Peng

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

Correspondence to: Hong Li. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China. lihong5056@ yahoo. com. cn
Received:2012-08-25　Accepted:2012-12-11

Abstract

• AIM: To study the effects of different concentrations of sodium ferulate (SF) on human retinal capillary endothelial cells (HRCEC) proliferation and vascular endothelial growth factor (VEGF) expressing with different concentrations *in vitro* conditions of high glucose.

• METHODS: The extracted from corneal transplantation HRSEC and cultured *in vitro*, which being good growth and at the 3- 4th generation were taken into experiment. The experimental were divided into blank control group, high glucose control, low glucose control group, high glucose control group, high glucose+different concentrations of SF (1mg/L, 2mg/L, 4mg/L) group. The result of SF with different concentrations on the proliferation of HRCEC for 48 hours was surveyed by MTT assay. The immunocytochemical method was used to detect low glucose control group, high glucose group and different concentrations of SF (1mg/L, 2mg/L, 4mg/L) group HRCEC of VEGF expression.

• RESULTS: The results of MTT colorimetric method showed that: different concentrations of SF in primary cultured HRCEC for 48 hours, cell proliferation inhibition rates were 46.97%, 61.55%, 76.91% and 83.47%. Within a certain range of concentrations of SF can restrain the proliferation of HRCEC in high glucose environment (P< 0.05), and in 48 hours was concentration dependent. Low glucose control group compared with the high glucose control group the differences were not statistically significant (P=0.067>0.05). Low glucose control group, high glucose group and SF in concentrations of 1mg/L, 2mg/L, 4mg/L in HRCEC for 48 hours, immunocytochemistry of background gray values with positive gray value difference were respectively 28.27±1.62, 93.67±0.81, 72.67±2.89, 53.73±1.70, 30.93±3.72. Compared to the high glucose control group, expression of VEGF was decreased significantly in experimental groups after 48 hours, the difference was statically significant (P< 0.05), in a dose - dependent manner. Compared to the low sugar glucose, VEGF in high glucose control group expression was significantly increased (P<0.05).

• CONCLUSION: SF can reduce the HRCEC proliferation and suppress the expression of VEGF in high glucose environment which were cultured *in vitro*.

• KEYWORDS: sodium ferulate; human retinal capillary endothelial cells; MTT; immunocytochemistry; VEGF

Citation: Cheng QL, Li H, Tang H, *et al*. Effects of sodium ferulate on expression of VEGF of human retinal capillary endothelial cells in high glucose environment. *Guoji Yanke Zazhi* (*Int Eye Sci*) 2013;13(1):42-45

摘要

目的:研究体外环境下高糖培养的人视网膜血管内皮细胞(human retinal capillary endothelial cells, HRCEC)经过不同浓度的阿魏酸钠(sodium ferulate,SF)作用后的增殖以及血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响。

方法:对眼科手术新鲜的人角膜移植术后眼球进行取材并进行 HRCEC 的原代培养。进行实验的为生长良好的第 3~4 代细胞,实验分为空白对照组、低糖对照组、高糖对照组、高糖+不同浓度阿魏酸(1mg/L,2mg/L,3mg/L,4mg/L)组, 用噻唑蓝比色法(MTT)检测 48h 后不同浓度的阿魏酸钠对其增殖的抑制作用。免疫细胞化学法用于检测低糖对照组、高糖对照组和不同浓度阿魏酸(1mg/L,2mg/L,4mg/L)组 HRCEC 中 VEGF 的表达。

结果:MTT 比色法结果表明: 48h 后不同浓度的阿魏酸钠分别作用于原代培养的 HRCEC 细胞增生抑制率分别为 46.97%,61.55%,76.91% 和 83.47%。一定质量浓度范围内阿魏酸钠对高糖环境下 HRCEC 具有明显的增殖抑制作用(P<0.05)。低糖对照组与高糖对照组吸光度 A 结果相比,差异无统计学意义(P=0.068>0.05)。低糖对照组、高糖对照组与浓度分别为 1mg/L,2mg/L,4mg/L 的阿魏酸钠作用组作用于 HRCEC 48h 后免疫细胞化学背景灰度值与阳性灰度值之差分别为 28.27±1.62,93.67±0.81,72.67±2.89,53.73±1.70,30.93±3.72。通过 48h 后加药组和高糖对照组相比, VEGF 表达下降明显,且均有统计学意义(均为 P<0.05),具有质量浓度依赖性。与低糖对照组相比,高糖对照组 VEGF 的表达明显增加(P<0.05)。

结论:阿魏酸钠对体外培养的高糖环境下 HRCEC 的增殖及高糖引起 VEGF 表达具有抑制作用。

关键词:阿魏酸钠;人视网膜血管内皮细胞;MTT;免疫组化;VEGF
DOI:10.3980/j. issn. 1672-5123. 2013. 01. 08

引用:程启琳,李红,唐虹,等. 阿魏酸钠对高糖环境下人视网膜内皮细胞表达的影响. 国际眼科杂志 2013;13(1):42-45

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy,DR)是糖尿病最为常见并且最为严重的微血管并发症之一,也成为最主要致盲性眼病之一。据国际糖尿病联盟的糖尿病地图(Diabetes Atlas)数据显示,2010 年糖尿病患者人数约2.85 亿,基本占全世界成人的 7%[1]。持续的高血糖可继发引起视网膜的代谢及多种生理功能异常,从而激活血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF),并促使其与内皮受体结合,继而引起内皮细胞屏障功能损害,血液成分渗出增加及毛细血管闭塞等,导致视网膜广泛性的缺血缺氧、视网膜水肿,最终致使新生血管形成。在 DR 中,VEGF 的含量高于正常水平,且与 DR 的严重程度呈正相关[2],VEGF 以其具有促血管渗透性增加的作用,在糖尿病黄斑水肿(DME)中起到非常重要的作用[3]。那么,我们可以推理,抑制 VEGF 功能的因子则基本都可以阻止糖尿病引起的视网膜损害。阿魏酸钠(sodium ferulate, SF)因具有扩张血管、改善微循环、抗动脉粥样硬化等作用,已广泛纳入于心血管系统疾病的治疗[4-6]。本实验通过研究阿魏酸钠对人视网膜微血管内皮细胞(human retinal capillary endothelial cells, HRCECs)在高糖环境下的增殖抑制及 VEGF 表达的影响,进一步研究阿魏酸钠在抑制 DR 中病理性新生血管形成的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 阿魏酸钠(湖南五洲通药业有限责任公司);高糖 DMEM 培养液(美国 Hyclone 公司);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);胎牛血清 (杭州四季青公司);二甲基亚砜(DMSO)及噻唑蓝(MTT)均为(Amresco 公司);兔抗人Ⅷ因子-IgG (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)、培养皿、培养瓶以及无菌眼科器械。使用前用高糖 DMEM 配制成母液为 10mg/mL。

1.2 方法

1.2.1 HRCEC 培养 眼科手术新鲜的人角膜移植术后眼球进行取材并进行 HRCEC 的原代培养,培养方法参考国内外相关文献[7-8]。将培养瓶置于含 50mL/L CO_2、37℃及湿度为 95% 的恒温培养箱进行培养, 平均每 2 ~2.5d 换液约 1/3 ~1/2 ,待细胞生长汇合单细胞层后,按 1:2 进行传代继续培养。

1.2.2 HRCEC 鉴定 于 6 孔板内置入无菌盖玻片,细胞生长爬满玻片后, 倒置相差显微镜下观察原代培养的内皮细胞生物学形态特征,并对此内皮细胞进行免疫细胞化学方法检测-第Ⅷ因子抗原抗体的相关性检测,显微镜下观察细胞的表达。

1.2.3 实验分组 实验分为以下 5 组: S_0组:只加培养基不加细胞的调零组; S_L组:低糖对照组;S_H组:高糖对照组; S_1组:高糖+1mg/mL 阿魏酸钠组;S_2组:高糖+2mg/mL 阿魏酸钠组;S_3组:高糖+3mg/mL 阿魏酸钠组;S_4组:高糖+4mg/mL 阿魏酸钠组;药物阿魏酸钠的作用时间为 48h。高糖对照组的葡萄糖浓度 25mmol/L,低糖对照组的葡萄糖浓度为 5.5mmol/L。

1.2.4 MTT 检测 HRCEC 的增殖 取第 4 或第 5 代对数生长期生长良好的细胞进行实验,弃培养基, PBS 洗涤 2 次,2.5g/L 胰蛋白酶消化,加入含 100mL/L 胎牛血清低糖或者高糖 DMEM 培养液,各自配置成低糖及高糖的细胞悬液,配置密度约为 3.3×10^4个/mL 的细胞悬液,均匀接种于 96 孔板中,调零组 1 组、低糖组 1 组、高糖组及加药组 4 组,共 7 组, 每组设 6 个平行复孔样本,每孔 200μL,置入恒温、恒湿细胞培养箱培养约 12h。待细胞贴壁稳定后,S_1 ~ S_4 各组分别加入终浓度为 1mg/mL,2mg/mL,3mg/mL,4mg/mL 阿魏酸钠各 200μL;继续培养 48h,结束前 4h(约 44h 时),弃去培养基,PBS 洗 2 次,加入无血清的培养基 200μL 后,每孔加入 20μL MTT(5mg/mL)溶液,4h 后中止培养,仔细吸去各个孔内培养基上清液,加入 DMSO 原液 150μL,室温下微量振晃 10min,使紫蓝色结晶充分溶解,使用波长为 570nm 自动酶标仪进行比色法分析并测定吸光度(*A* 值),观察 HRCEC 在药物阿魏酸钠作用下的增殖。同样条件下上述实验重复进行 3 次。参照相关文献[9]计算细胞存活率及细胞抑制率(细胞存活率% =实验组平均 *A* 值/对照组平均 *A* 值×100% ,细胞抑制率% =1-细胞存活率)。

1.2.5 免疫细胞化学方法检测内皮细胞 VEGF 的表达 将高温消毒灭菌好的玻片置入 6 孔板中(孔板无菌),配成密度约为 4.5×10^4个/mL 的内皮细胞悬液, 每孔接种悬液 2000μL,孵育 12h 细胞贴壁稳固,设置分组 5 组。依次分为:含 100mL/L 胎牛血清的低糖 DMEM 的低糖对照组 S_L;含 100mL/L 胎牛血清的高糖 DMEM 的高糖对照组 S_H;含 100mL/L 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基以及终浓度分别为 1mg/mL,2mg/mL,4mg/mL 阿魏酸钠加药组;各组设相同条件的 2 个复孔。经 48h 继续培养后,轻轻取出盖玻片,使用 PBS 液洗涤 3 次, 室温下使用 40g/L 多聚甲醛固定 20min,内源性过氧化物酶用 30mL/L H_2O_2-甲醇得以封闭, PBS 液洗涤,其中一孔加入兔抗人 VEGF-IgG 一抗(1:100), PBS 液加入另一复孔作为阴性对照组,4℃冰箱中冷藏过夜,次日 37℃温箱,PBS 液洗涤,加入二抗,SABC 法染色,PBS 液洗涤,DAB 显色,自来水冲洗,苏木素再次染色。梯度浓度的乙醇依次进行脱水,最后中性树脂封片处理。细胞内可见棕黄色颗粒染色即为阳性结果。各组进行灰度值测定处理,每组灰度值为阳性灰度值与背景灰度之差[9]。

统计学分析:各组实验数据均采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示,使用 SPSS 13.0 软件处理。运用单因素方差分析对多组间均数的差异性进行分析讨论,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学差异。

2 结果

2.1 HRCEC 的培养和鉴定 显微镜下观察内皮细胞生物学形态:呈单层铺路石样生长,并贴壁铺满瓶底(图 1)。免疫化学法鉴定内皮细胞: 第Ⅷ因子相关抗原抗体着染后,细胞胞浆中呈棕黄色着染,阴性对照组中胞浆却未见棕黄色着色或染色,由此推论体外可培养出 HRCEC。

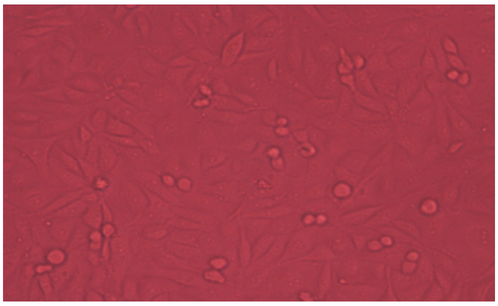

图 1　视网膜内皮细胞呈单层铺路石样贴壁生长(×200)。

表 1　阿魏酸钠对 HRCEC 增殖的影响

分组	A_{570}值($\bar{x}\pm s$)	抑制率(%)
0	0.121767±0.1269	-
S_L	0.66191±0.018635	-
S_H	0.805946±0.010435	-
S_1	0.484589±0.023324	46.97
S_2	0.384867±0.024498	61.55
S_3	0.279767±0.002268	76.91
S_4	0.234889±0.014093	83.47

2.2 MTT 法检测 HRCEC 在不同浓度阿魏酸钠作用下增殖的表达　MTT 比色法检测表明:在同样的培养环境下,对数生长期的内皮细胞经不同质量浓度的阿魏酸钠处理 48h 后,高糖对照组 *A* 值与低糖对照组比较,差异无统计学意义($P=0.067$,表 1)。加药组与高糖对照组相比,*A* 值依次明显降低,差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$),内皮细胞的存活率随着阿魏酸钠药物浓度的逐渐提高反而逐渐下降,细胞抑制率得到逐渐升高,推断不同浓度的阿魏酸钠对 HRCEC 的增殖有明显抑制作用,并且加药组各组之间两两比较,差异也均有统计学意义(均 $P<0.05$)。

2.3 阿魏酸钠对 HRCEC 中 VEGF 表达的影响　VEGF 主要在血管内皮细胞的胞膜和胞浆集中表达,棕黄色颗粒提示为阳性部分表达,培养 HRCEC 48h 后,低糖对照组、高糖对照组及阿魏酸钠浓度分别为 1mg/mL,2mg/mL,4mg/mL+高糖各组,免疫细胞的化学背景灰度值与其阳性灰度值之差分别为 28.27±1.62,93.67±0.81,72.67±2.809508,53.73±1.70,30.93±3.72。培养 48h 后,随药物浓度逐渐增加,胞浆中的棕黄色颗粒逐渐减少(并且颜色趋于变淡),即认为加药组的血管内皮细胞中的 VEGF 的表达减少,加药组和高糖对照组比较,结果分析比较具有显著性差异,各组间的结果也具有统计学差异(均 $P<0.05$,图 2)。和高糖对照组相比较,低糖对照组胞膜以及胞浆内的阳性颗粒相对稀疏,颜色比较淡。VEGF 的表达明显降低,结果比较具有统计学差异($P<0.05$,图 3)。

3 讨论

DR 是糖尿病晚期微血管严重的慢性并发症之一,亦是主要的致盲性疾病之一,但其发病机制目前尚未阐明,大多认为高血糖导致微血管病变与糖基化终产物形成的增多、多元醇通路活性增高、蛋白激酶 C 的激活以及氨基己糖通路活性增高有关[10,11]。多种细胞因子如 VEGF,HIF-1(缺氧诱导因子)、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)、TNF(肿瘤坏死因子)等在糖尿病新生血管的形成中起重要作用[12]。而 VEGF 则被认为是最重要的血管生长因子,起着关键性的作用[13]。增生性糖尿病视网膜病变

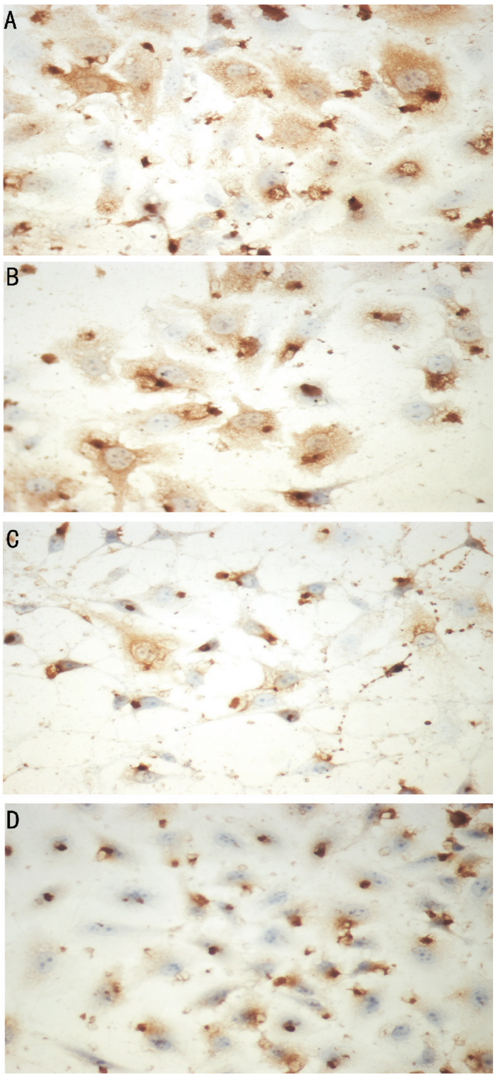

图 2　阿魏酸钠及高糖对 HRCEC 中 VEGF 表达的影响(SABC 法×400)　A:S_1组;B:S_2组;C:S_4组;D:S_H组。

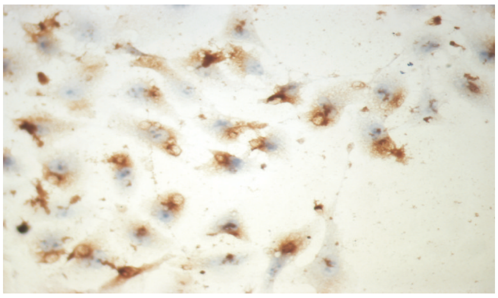

图 3　低糖对 HRCEC 中 VEGF 表达的影响(SABC×400)。

(proliferative diabetic retinopathy ,PDR)被认为是 DR 致盲的主要原因,晚期视网膜新生血管的形成是其标志性的病理改变。VEGF 是一种具有高度特异性的血管内皮细胞促有丝分裂素。有研究表明其是最直接的眼内新生血管形成因子[14],可以破坏血-视网膜屏障(blood retinal barrier, BRB),导致视网膜血管的通透性增加并引起组织缺血缺氧,致使毛细血管闭塞及微血栓形成,进一步引起视网膜渗出、出血以及黄斑水肿;另一方面可诱导血管生成素(angiogenin)生成的增加, 协同促使视网膜新生血管的形成, 造成视力损害并最终导致新生血管形成[15,16],VEGF 还可诱导血管内皮细胞高表达细胞因子 ICAM-1,引起白细胞淤滞, 更加重视网膜的缺血缺氧,并形成恶性

循环[17];VEGF 在视网膜缺血缺氧与增生性视网膜病变的新生血管形成之间发挥关键性的桥梁作用,介导缺血性视网膜血管增生,而 VEGF 与其受体的结合,又是其行使各项功能的主要途径[18]。若阻断 VEGF 与其受体结合, 则可以抑制白细胞淤滞、视网膜细胞间黏附分子-1 的表达以及血-视网膜屏障(blood retinal barrier, BRB)的破坏,并减少视网膜微血管的渗漏, 从而有效治疗 DR[19]。

阿魏酸钠具有扩张血管、改善微循环、抗动脉粥样硬化[6]及抑制肿瘤血管生长[20]等作用,已广泛应用于心脑血管系统疾病及肿瘤系统疾病的治疗;已证实 1g/L 阿魏酸钠滴眼液能有效地抑制角膜新生血管的生长[21]。因此,本研究中我们探讨了阿魏酸钠对高糖条件下 HRCECs 增殖和 VEGF 表达的影响,以进一步阐明对 DR 的作用。

本次实验 MTT 比色法检测结果表明,原代培养的 HRCECs 在不同质量浓度的阿魏酸钠作用 48h 后,呈现出明显的增殖抑制作用,并且抑制率具有质量浓度依赖性。免疫细胞化学方法检测结果提示 HRCECs 在高糖环境下中 VEGF 的表达增加,但是经过阿魏酸钠作用后,高糖环境下 HRCECs 中 VEGF 表达反而下降,而以浓度达到 4mg/mL 时下调作用最为突出。因此我们推理认为,阿魏酸钠抑制高糖环境下 HRCECs 的增殖作用可能是通过下调胞浆中 VEGF 的表达来实现。但我们需要进一步研究证实阿魏酸钠下调 VEGF 表达的信号通路以及具体作用调控点。

综上所述,阿魏酸钠对体外培养的高糖条件下人 HRCECs 的增殖及 VEGF 的表达具有抑制作用。说明对于早期预 RNV 的形成、发展,阿魏酸钠具有重要的作用,同时提示该药在 DR 的防治中具有潜在的应用价值。

参考文献

1 Unwin N, Gan D, Whiting D. The IDF Diabetes Atlas: Providing evidence, raising awareness and promoting action. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;87(1): 2-3

2 Selim KM, Sahan D, Muhittin T, *et al.* Increased levels of vascular endothelial growth factor in the aqueous humor of patients with diabetic retinopathy. *Indian J Ophthalmol* 2010;58(5): 375-379

3 谢秀雯, 周建强, 崔红平. VEGF 在糖尿病视网膜病变发病机制中作用的研究新进展. 国际眼科杂志 2011;11(2):282-285

4 Mathew S, Abraham TE. Ferulic acid an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Crit Rev Biotechnol* 2004;24(2-3):59-83

5 Wang BH, Ou-Yang JP. Pharmacological actions of sodium ferulate in cardiovascular system. *Cardiovasc Drug Rev* 2005;23(2):161-172

6 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 上海:上海科学技术出版社 1998:1341

7 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

8 Capetandes A, Gerritsen ME. Simplified methods for consistent and selective culture of bovine retinal endothelial cells and percyes. *Invest Ophthamlol Vis Sci* 1990;31(9):1738-1744

9 李梅,彭辉灿. 丙丁酚对高糖环境下人视网膜血管内皮细胞增值及 VEGF 表达的影响. 眼科新进展 2011;32(3):228-231

10 Lipinski MJ, Fuster V, Fisher EA, *et al.* Technology Insight : targeting of biological molecules for evaluation of high-risk atherosclerotic laques. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2004; (1):48-55

11 Guzik TJ, Mussa S, GastaldiD, *et al.* Mechanisms of increased vascular sueroxide production in human diabetes mellitus : role of NAD (P)H ox idase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002;105(14): 1656-1662

12 Jenchitr W, Sotthornwit N, Srisuwanporn S, *et al.* Diabetic retinopathy in Priest Hospital. *Med Assoc Thai* 2008;91 (Suppl 1): 119-129

13 Arevalo JF, GarciaAmaris RA. Intravitreal bevacizumab for diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 2009;5(1):39-46

14 朱鸿,施彩虹. 糖尿病视网膜病变的相关诊断技术展望. 国际眼科杂志 2005;5(5):1016-1019

15 Kamiuchi K, Haseqawa G, Obayashi H, *et al.* Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) polymorphism is associated with diabetic retinopathy in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2002;19(5):371-376

16 LiH, Hu XL . Role of vascular endothelial growth factor in the progress of diabetic retinopathy . *Int J Ophthalmol* (*Guoji Yanke Zazhi*) 2008;8(5):990-993

17 Moore TC, Moore JE, Kaji Y, *et al.* The role of advanced glycationend products in retinal micro vascular leukostasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(10):4457-4464

18 赵荫,陈美娟,朱红军. 糖尿病视网膜病变药物治疗现状. 眼科新进展 2010;3(30):297-300

19 Deissler HL , Lang GE. Effect of VEGF165 and the VEGF aptamer pegaptanib (Macugen) on the protein composition of tight junctions in microvascular endothelial cells of the retina . *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2008;225(10):863-867

20 陈伟海,徐晓玉,胡益勇,等. 阿魏酸钠对小鼠 H22 肝癌生长的抑制作用及其机制研究. 北京中医药大学学报 2006;29(10):690-695

21 陈丽华,江萍,罗彤,等. 阿魏酸钠对大鼠角膜新生血管的抑制作用研究. 眼科研究 2008;26(7):526-529