

发光二极管照射对大鼠高糖视网膜血管内皮细胞的光生物调节作用及其机制

张凤久, 张丽敏, 王宏杰, 李海波, 王海明, 彭向东, 杨建玲

引用: 张凤久, 张丽敏, 王宏杰, 等. 发光二极管照射对大鼠高糖视网膜血管内皮细胞的光生物调节作用及其机制. 国际眼科杂志 2020;20(8):1339-1342

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.61465001); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (No.NJZY18214)

作者单位: (024005) 中国内蒙古自治区赤峰市, 赤峰学院附属医院眼科

作者简介: 张凤久, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 张凤久. zfj1237@126.com

收稿日期: 2019-11-19 修回日期: 2020-07-08

(No.61465001); Scientific Research Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region Higher Education Institutions (No.NJZY18214) Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Chifeng College, Chifeng 024005, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Correspondence to: Feng - Jiu Zhang. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Chifeng College, Chifeng 024005, Inner Mongolia Autonomous Region, China. zfj1237@126.com

Received: 2019-11-19 Accepted: 2020-07-08

摘要

目的: 观察发光二极管照射对大鼠高糖视网膜血管内皮细胞中的光生物调节作用及其机制。

方法: 大鼠视网膜血管内皮细胞随机分为三组: 正常对照组、高糖模型组、高糖模型发光二极管照射组, 高糖模型发光二极管组的细胞在造模 48h 后开始采用发光二极管对培养箱中的细胞进行照射。MTT 细胞凋亡实验检测各组细胞凋亡率; 激光共聚焦显微镜观察各组视网膜血管内皮细胞胞内钙离子变化; Western blot 法检测各组磷酸化丝氨酸-苏氨酸激酶 (P-AKT) 蛋白表达。

结果: 正常对照组、高糖模型组、高糖模型发光二极管照射组凋亡率分别为 $7.54\% \pm 2.67\%$, $31.69\% \pm 5.74\%$, $21.65\% \pm 3.52\%$ ($P < 0.05$)。正常对照组细胞质微弱 Ca^{2+} 荧光染色呈现出绿色的荧光, 其荧光像素值为 192.65 ± 50.54 ; 高糖模型组中, 细胞质呈现较强烈的绿色荧光, 其荧光像素值为 710.69 ± 100.38 ; 发光二极管照射组中, 绿色荧光像素值为 430.47 ± 80.67 , 明显高于正常对照组, 但明显低于高糖模型组。三组间细胞内 Ca^{2+} 荧光像素值有差异 ($P < 0.05$)。这三组细胞 P-AKT 蛋白量分别为 10.26 ± 2.47 , 2.35 ± 0.16 , 7.46 ± 1.64 ($P < 0.05$)。

结论: 高糖环境抑制苏氨酸激酶通路活性, 对大鼠视网膜血管内皮细胞钙稳态产生影响, 促使细胞凋亡, 低强度的发光二极管照射可激活苏氨酸激酶通路, 降低高糖引起的细胞凋亡率。

关键词: 发光二极管; 大鼠; 血管内皮细胞; 光生物; 机制

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.8.08

Photobiological regulation of high glucose retinal vascular endothelial cells in rats by light emitting diode irradiation and its mechanisms

Feng-Jiu Zhang, Li-Min Zhang, Hong-Jie Wang, Hai-Bo Li, Hai-Ming Wang, Xiang-Dong Peng, Jian-Ling Yang

Foundation items: National Natural Science Foundation of China

Abstract

• AIM: To observe the application of light emitting diode (LED) irradiation in rat retinal vascular endothelial cells with high glucose and its effect and mechanism on photobioregulation.

• METHODS: Rat retinal vascular endothelial cells were randomly divided into three groups: normal control group, high glucose model group, high glucose model light emitting diode irradiation group, and cells in the high glucose model light emitting diode group began to use light emitting diodes in the incubator 48h after modeling. The cells are irradiated. MTT cell apoptosis experiment was used to detect the apoptosis rate of each group; laser confocal microscope was used to observe the changes of intracellular calcium in retinal vascular endothelial cells; Western blot was used to detect the phosphorylated serine-threonine kinase (P-AKT) protein in each group expression.

• RESULTS: The apoptosis rates of normal control group, high glucose model group, and high glucose model light emitting diode irradiation group were $7.54\% \pm 2.67\%$, $31.69\% \pm 5.74\%$, and $21.65\% \pm 3.52\%$, respectively ($P < 0.05$). In the normal control group, the cytoplasm with weak Ca^{2+} fluorescence showed green fluorescence with a pixel value of 192.65 ± 50.54 . In the high-sugar model group, the cytoplasm showed a stronger green fluorescence with a fluorescent pixel value of 710.69 ± 100.38 . The green fluorescent pixel value was 430.47 ± 80.67 , which was significantly higher than the normal control group, but significantly lower than the high-sugar model group. The intra- Ca^{2+} fluorescence pixel values in the three groups were statistically significant ($P < 0.05$). The amount of phosphorylated serine-threonine kinase (P-AKT) protein in these three groups of cells was 10.26 ± 2.47 , 2.35 ± 0.16 , 7.46 ± 1.64 , respectively ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: High-glucose environment inhibits the

activity of threonine kinase pathway, which has an effect on calcium homeostasis of rat retinal vascular endothelial cells and promotes apoptosis. Low-intensity LED irradiation can activate threonine kinase pathway and reduce the apoptosis rate caused by high glucose, which is of great application value.

• KEYWORDS: light emitting diodes; rats; vascular endothelial cells; photobiology; mechanism

Citation: Zhang FJ, Zhang LM, Wang HJ, et al. Photobiological regulation of high glucose retinal vascular endothelial cells in rats by light emitting diode irradiation and its mechanisms. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(8):1339-1342

0 引言

在临床中,糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是致盲的主要疾病^[1]。为此,研究DR的发病机制、预后治疗手段等,成为临床普遍关注的重点。该疾病的发病机制较为复杂,影响因素较多。现阶段,在医学技术发展的新形势下,细胞学分析疾病的发病机制,已成为临床研究热点^[2-3]。光生物调节作用,借助低强度淡色光、激光等,对组织或是细胞具有非损伤的调节性作用。目前发光二极管(light emitting diode, LED)作为一种新型光源在医疗领域应用迅速发展,一定功率和能量密度的LED照射能激活靶细胞,发挥与相干光源类似的生物学效应。基于此,本研究为了明确LED对大鼠高糖视网膜血管内皮细胞的光生物调节作用,加以探究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 原代大鼠视网膜血管内皮细胞(美国Angio-proteomie公司)购自博士德生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 胎牛血清、D-Hanks液、胰蛋白酶、兔抗大鼠 β -actin单克隆抗体、兔抗大鼠p-Akt单克隆抗体、HRP标记山羊抗兔IgG二抗(美国Sigma公司)及其相关配套试剂、细胞凋亡试剂盒及其相关配套试剂、流式细胞仪、激光扫描共聚焦显微镜(美国DB公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 原代大鼠视网膜血管内皮细胞在培养瓶中培养48h后传代培养,以 5×10^5 /mL的密度接种于24孔细胞培养板中,培养时间为24h,细胞贴壁后使用无血清培养液。继续培养24h。根据实验方案分组:正常对照组、高糖模型组、发光二极管照射高糖组。各组均避光静置于培养箱内。高糖细胞模型组培养基葡萄糖浓度及干预时间采用我们前期研究的结果:25mmol/L葡萄糖浓度干预48h^[4]。

1.2.2 发光二极管照射 本组的细胞在造模48h后开始照射。将细胞放置于培养箱中,采用发光二极管红光光源对培养箱中的细胞进行照射,参照相关文献^[5]具体照射的参数值为最大功率1W,光源波长600nm,中心光功率密度 $6.52\text{mW}/\text{cm}^2$ 。光源与细胞要距离至少超过2cm,光斑的直径为2.0cm,连续照射时间为350s,12h后再次照射,共计照射次数为3次。

1.2.3 MTT细胞凋亡实验检测各组细胞凋亡率 将细胞制成 5×10^5 个/mL细胞悬液,按照 $100\mu\text{L}$ /孔接种至96孔板,按细胞分组处理各孔细胞,继续培养2~6h,直至细胞

完全贴附。按体积分数10%的比例加入MTT工作液,37℃孵育2h,将板中培养基倒掉,每孔加入 $200\mu\text{L}$ DMSO,酶标仪检测490nm波长下吸光度(A_{490})值,每组设6个复孔,重复测量3次,取平均值。

1.2.4 激光共聚焦显微镜观察视网膜血管内皮细胞内钙离子变化 Fluo-4/AM负载入细胞:取出培养4d的视网膜血管内皮细胞,激光共聚焦培养皿皿底及周围用DMEM培养液润洗3~4次,滴加Fluo-4/AM($5\mu\text{mol}/\text{L}$)与0.02% Pluronic F127的混合溶液。细胞置于37℃恒温培养,避光,孵育30min;取出后加入少量DMEM培养基覆盖细胞;用激光共聚焦显微镜对钙离子进行实时检测。其方法为:用不含酚红的DMEM培养基洗涤3次,每次3min后,继续稳定20min;检测荧光强度,设置激发波长488nm,绿色荧光接收通道BP:500~550nm,红色荧光接收通道LP>580nm。

1.2.5 Western blot法检测各组磷酸化丝氨酸-苏氨酸激酶(P-AKT)蛋白表达 收集各组细胞,采用蛋白裂解液冰上振荡裂解20min。4℃条件下,12000r/min离心15min,收集上清液,采用BCA蛋白定量法测量蛋白质质量浓度。按比例加入1/4体积的4倍上样缓冲液,100℃煮沸5min进行变性,4℃条件下,12000r/min离心5min,取上清。按每孔 $20\mu\text{g}$ 蛋白上样量,用质量分数10%聚丙烯酰胺凝胶电泳进行电泳分离,再用湿法转膜将蛋白转印至PVDF膜上,用质量分数1%BSA封闭后,孵育一抗和相应二抗,其中一抗稀释倍数均为1:1000,二抗稀释倍数为1:5000;之后用ECL发光液及显影液定影液进行蛋白的显影定影,最终胶片读取数据,用Image J软件进行灰度分析。以 β -actin为内参照,计算各目的蛋白相对表达水平,并计算Akt磷酸化比率。每个样本设置6个复孔,同一样本重复测量3次,取平均值。

统计学分析:使用SPSS19.0统计软件对统计数据进行处理,计量资料使用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间的比较使用单因素方差分析,组间的两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LED照射对细胞凋亡的影响 三组细胞凋亡率比较差异有统计学意义($F = 16.891, P < 0.01$)。正常对照组的细胞凋亡率显著低于高糖模型组、发光二极管照射组,差异有统计学意义($t = 12.063, P < 0.01; t = 10.099, P < 0.01$);发光二极管照射组的细胞凋亡率显著低于高糖模型组,差异有统计学意义($t = 4.715, P < 0.01$),见表1。

2.2 LED照射对细胞内 Ca^{2+} 浓度变化的影响 正常对照组中细胞质微弱 Ca^{2+} 荧光染色,呈绿色荧光,细胞核为蓝色荧光;高糖模型组中,细胞质呈现较强烈的绿色荧光;发光二极管照射组中,绿色荧光明显的高于正常对照组,但明显低于高糖模型组,见图1,经荧光像素分析三组间细胞内 Ca^{2+} 荧光像素值具有统计学意义($F = 15.846, P < 0.05$)。正常对照组的 Ca^{2+} 荧光像素值显著低于高糖模型组、发光二极管照射组,差异有统计学意义($t = 14.577, P < 0.01; t = 7.900, P < 0.01$);且发光二极管照射组内 Ca^{2+} 荧光像素值显著低于高糖模型组,差异有统计学意义($t = 6.881, P < 0.01$),见表1。

2.3 LED照射对细胞中P-AKT蛋白表达的影响 三组细胞中P-AKT蛋白表达明显不同,差异有统计学意义

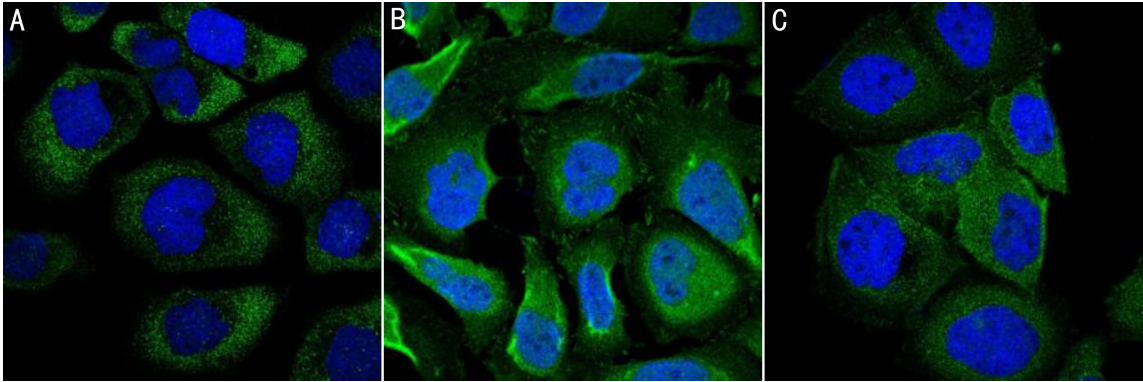


图1 LED照射对细胞内Ca²⁺浓度变化的影响(×400) A:正常对照组;B:高糖模型组;C:发光二极管照射组。

表1 三组间细胞凋亡率和Ca²⁺浓度变化及P-AKT蛋白表达量比较

组别	样本量	细胞凋亡率(%)	Ca ²⁺ 浓度变化	P-AKT蛋白表达量
正常对照组	10	7.54±2.67	192.65±50.54	10.26±2.47
高糖模型组	10	31.69±5.74	710.69±100.38	2.35±0.16
发光二极管照射组	10	21.65±3.52	430.47±80.67	7.46±1.64
<i>F</i>		16.891	15.846	12.694
<i>P</i>		<0.01	<0.05	<0.01

($F=12.694, P<0.01$)。正常对照组的P-AKT蛋白表达高于高糖模型组、发光二极管照射组,差异有统计学意义($t=9.114, P<0.01; t=2.773, P=0.014$);发光二极管照射组的P-AKT蛋白表达高于高糖模型组,差异有统计学意义($t=9.807, P<0.01$),见表1。

3 讨论

高血糖是DM最基本的病理生理状态,在DM血管并发症的发生发展中起着重要作用。高血糖导致的血管渗透性增加,炎症和内皮细胞损伤是DR发生发展的基础。在DM的进展过程中,高血糖导致慢性微血管损伤,使得约1/10的患者出现增生性DR(proliferative DR, PDR)或糖尿病性黄斑水肿,严重威胁患者视力^[6]。但针对DR目前仍缺乏有效的治疗方法或药物。通过现阶段临床研究发现发光二极管照射方式对一些组织细胞的光生物调节作用较为明显^[7-8]。为此,本研究重点分析了发光二极管的价值。

在本次研究中,通过分析发光二极管照射对大鼠高糖视网膜血管内皮细胞的光生物调节作用及其机制,发现上述照射方式,对光生物调节的作用较为显著。通过对本次研究结果的分析,发现以模拟的方式,对体外与体内高血糖状态加以评估,能够了解到在25mmol/L的葡萄糖培养基下,可实现对抗凋亡P-AKT蛋白通路的抑制,且对视网膜血管内皮细胞钙稳态产生较大的影响。一般来说,细胞在人体可能会出现钙超载情况,此种现象会导致细胞代谢异常^[9-10]。多种细胞的生存、凋亡信号,主要是利用P-AKT蛋白信号途径的抑制进行传导的。P-AKT蛋白参与调节细胞的分裂活动、分化活动或是凋亡活动中。苏氨酸激酶是磷酸化丝氨酸的下游靶蛋白,多种细胞因子能够与受体相结合,产生P-AKT蛋白亚单位,从而实现对苏氨酸激酶活化的诱导。在维持细胞正常结构、功能过程中,钙起到了十分重要的作用。在正常状态时,细胞借助系列性的转运机制,可保障患者体内低钙情况。而多种外在因素的影响致使钙失衡,对细胞膜与线粒体造成的响应

损伤等,均会在一定程度上加快细胞的不可逆性死亡。而高糖对于P-AKT蛋白信号通路作用的抑制机制,尚需要深入探究。

依据本研究结果,发光二极管照射对大鼠高糖视网膜血管内皮细胞的光生物调节作用机制加以总结。其作用机制突出体现为,利用线粒体、信号转导表达的方式,能有效实现光生物的调节^[11]。通常情况下,对于功能不正常的组织、细胞等,光生物具有一定的调节作用。但是,对于正常功能的组织或是细胞来说,光生物调节并不能够起到较好的作用和影响。也就是说,仅在较为特定的状况下,选择相对合理的参数,使细胞康复作用得以发挥。发光二极管是亮度较高、效率较高且寿命较长的固体性光源,具有新颖性。目前,多项研究认为低强度的发光二极管,光生物调节作用较为明显^[12-13]。现阶段对于光生物学的调节作用剂量关系,对于照射的剂量、时间和强度等,均具有明显的差异。本次研究中结果显示,正常对照组的细胞凋亡率显著低于高糖模型组、发光二极管照射组,发光二极管照射组的细胞凋亡率显著低于高糖模型组。正常对照组的P-AKT蛋白表达高于高糖模型组、发光二极管照射组,发光二极管照射组的P-AKT蛋白表达高于高糖模型组。可以证实,低强度的发光二极管照射,在一定程度上激活了抗凋亡的P-AKT蛋白通路,细胞凋亡数目有所减少,且细胞膜离子通道得以开启,可对钙信号传导产生直接性的影响。此外,经过低强度发光二极管照射,高糖模型组、正常对照组的差距比较明显。分析其原因,高糖细胞模型组在照射实验中,采用的培养基为25mmol/L的葡萄糖,这与我们前期研究工作相一致^[4]。

目前,光生物调节治疗的临床研究较为广泛,但是在DR患者治疗的应用,尚且存在不够深入现象。本次研究中,通过对低强度发光二极管照射对大鼠高糖视网膜血管内皮细胞光生物调节作用的观察,可明确高糖对于P-AKT蛋白表达的抑制、视网膜血管内皮细胞钙稳态均

具有较大的影响,促使细胞凋亡,激活 P-AKT 蛋白的同时,可将其看作 DR 的辅助治疗手段。

综上所述,高糖环境可有效抑制苏氨酸激酶通路活性,对视网膜血管内皮细胞钙稳态产生影响,促使细胞凋亡,低强度的发光二极管照射可激活苏氨酸激酶通路,降低高糖引起的细胞凋亡率。

参考文献

- 1 刘荣,李斌,胡维琨,等.高糖环境诱导视网膜细胞衰老的实验研究.中华实验眼科杂志 2014;32(11):970-974
- 2 Sun Q, Kim HE, Cho H, *et al.* Red light-emitting diode irradiation regulates oxidative stress and inflammation through SPHK1/NF- κ B activation in human keratinocytes. *J Photochemistry Photobiol B Biol* 2018; 186(5):55-56
- 3 陆骏,秦瑜,肖文玮,等.FOXO4 对高糖环境下视网膜血管内皮细胞氧化应激和凋亡的影响.国际眼科杂志 2018;18(12):2146-2150
- 4 张凤久,张丽敏,林安岭,等.视网膜血管内皮细胞高糖模型糖浓度及培养时间的筛选.国际眼科杂志 2017;17(1):30-33
- 5 尚林,吴华,王翔宇,等.发光二极管红光照射对骨髓间充质干细胞增殖的影响.中华物理医学与康复杂志 2019;41(10):727-730
- 6 李扬,胡钦瑞,王斌,等.Hedgehog 蛋白对人视网膜微血管内皮细

胞功能的影响及其可能的信号通路.中华实验眼科杂志 2019;37(9):713-718

7 张丽敏,张凤久,林安岭,等.发光二极管照射对高糖培养的视网膜神经元凋亡的光生物调节作用及其机制.中华实验眼科杂志 2017;35(7):591-596

8 李彦红,张继刚,徐艳峰,等.发光二极管 630nm 红光和 460nm 蓝光照射对日本大耳白兔皮肤创面愈合的影响.中国医学科学院学报 2017;39(3):301-306

9 赵铭,贾航欢,徐曼,等.内质网-细胞膜连接对细胞内钙稳态的影响及其在心血管疾病中的意义.生理学报 2016;68(4):517-524

10 Kemper F, Beckert E, Eberhardt R, *et al.* Light filter tailoring - the impact of light emitting diode irradiation on the morphology and optical properties of silver nanoparticles within polyethylenimine thin films. *RSC Adv* 2017; 7(66):41603-41609

11 邱明丽,傅雪莲,崔璨.光生物调节在糖尿病中的应用研究进展.中华糖尿病杂志 2019;11(7):496-499

12 刘江,范广涵,刘承宜.用于细胞及组织培养的低强度 LED 生物光源.激光杂志 2003;24(4):78-80

13 赵子君,张国龙,王秀丽.低强度光在皮肤病治疗中的研究进展.国际皮肤性病学期刊 2017;43(5):273-276