

薏苡仁油对高糖环境下人视网膜血管内皮细胞增殖和 VEGF 表达的影响

李敏, 章运生, 李芳, 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: 李敏, 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: 2014-07-03 修回日期: 2014-11-21

Effects of Coix seed oil on human retinal capillary endothelial cells proliferation and VEGF expression in high glucose environment

Min Li, Yun-Sheng Zhang, Fang Li, Hui-Can Peng

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

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

Received: 2014-07-03 Accepted: 2014-11-21

Abstract

• **AIM:** To study the effects of different concentrations of Coix seed oil on human retinal capillary endothelial cells (HRCECs) proliferation and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in high glucose environment.

• **METHODS:** HRCECs extracted from human fresher eyeball and cultured in *vitro*, and ultimately used in the experiment were the growth of 3rd ~ 4th cells, the experimental were divided into blank control group, low glucose control group, high glucose control group, high glucose + (50 μL/mL, 100 μL/mL, 200 μL/mL) different concentrations Coix seed oil group. Detecting the multiplication of HRCECs by MTT, the immunocytochemical method was employed to detect the each group HRCECs of VEGF expression.

• **RESULTS:** MTT assay results showed that: different concentrations of coix seed oil acted at HRCECs for 48h, inhibition of cell proliferation was significant difference compared with high glucose control group ($P < 0.05$). Within 48h showed concentration dependence. There was no statistical difference between the low glucose group and high glucose control group ($P > 0.05$). Immunocytochemical assay showed that: 50 μL/mL, 100 μL/mL, 200 μL/mL Coix seed oil acted at HRCECs 48h, the expression of VEGF decreased significantly compared with the high glucose control group ($P < 0.05$), and in a dose-dependent manner. However, in high glucose control group, the expression of VEGF was obvious higher than that of low

glucose control group ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Coix seed oil can inhibit the HRCECs proliferation and suppress the VEGF expression in high glucose environment.

• **KEYWORDS:** Coix seed oil; vascular endothelial growth factor; human retinal capillary endothelial cells

Citation: Li M, Zhang YS, Li F, *et al.* Effects of Coix seed oil on human retinal capillary endothelial cells proliferation and VEGF expression in high glucose environment. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(12):2147-2150

摘要

目的: 研究不同浓度的薏苡仁油对体外高糖条件下培养的人视网膜血管内皮细胞(HRCECs)增殖及血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。

方法: 将新鲜人眼球提取的 HRCECs 进行体外培养, 最终用于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(50 μL/mL, 100 μL/mL, 200 μL/mL)薏苡仁油组。不同浓度的薏苡仁油对体外培养的 HRCECs 增殖的抑制作用是通过用噻唑蓝比色法(MTT)检测。各分组 HRCECs 中 VEGF 的表达由免疫细胞化学法检测。

结果: MTT 比色法结果显示: 不同浓度的薏苡仁油作用于体外培养的 HRCECs 48h, 其细胞增殖抑制与高糖对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)。48h 内呈浓度依赖性。而低糖对照组与高糖对照组差异无统计学差异($P > 0.05$)。免疫细胞化学检测法表明: 用 50, 100, 200 μL/mL 的薏苡仁油作用于高糖下 HRCECs 48h, 高糖+不同浓度薏苡仁油组与高糖对照组相比 VEGF 表达下降明显($P < 0.05$), 将高糖+不同浓度薏苡仁油组之间进行两两比较亦具有统计学意义($P < 0.05$)。且呈浓度依赖性。高糖对照组与低糖对照组相比, VEGF 表达明显($P < 0.05$)。

结论: 薏苡仁油可抑制高糖环境下 HRCECs 的增殖和 VEGF 的表达。

关键词: 薏苡仁油; 血管内皮生长因子; 人视网膜血管内皮细胞

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.12.10

引用: 李敏, 章运生, 李芳, 等. 薏苡仁油对高糖环境下人视网膜血管内皮细胞增殖和 VEGF 表达的影响. 国际眼科杂志 2014;14(12):2147-2150

0 引言

糖尿病是一种多系统损害的慢性病, 其微血管并发症常见的有糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)。

其发病机制相当复杂,包括多元醇途径亢进,生长因子和黏附分子表达增加,蛋白激酶 C 激活,氧化应激增高^[1],最终促使糖尿病视网膜膜新生血管(retinal neovascularization, RNV)形成。其中 VEGF 被认为是促进 RNV 生成和视网膜黄斑水肿(DME)的主要生长因子之一^[2]。在 DR 患者中,VEGF 含量高于正常水平且与其严重程度呈正相关^[3]。我们由此推断抑制 VEGF 的表达可以降低糖尿病引起的视网膜损害。薏苡仁油具有降血糖,镇痛抗炎,抗肿瘤,抗病毒,增强肿瘤放化疗敏感性等作用^[4,5]。本实验通过研究薏苡仁油作用于人视网膜微血管内皮细胞(HRCECs)在高糖环境下的增殖抑制及 VEGF 的表达,从而了解薏苡仁油在 DR 中抑制新生血管的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 薏苡仁油注射液(KLT,浙江康莱特药业有限公司,批号 Z10970091)、胰蛋白酶、DMEM 培养基(Hyclone 公司)、二甲基亚砜 DMSO、噻唑蓝 MTT、DAB 显色试剂盒(长沙艾佳生物技术有限公司)、SABC(兔)-POD 试剂盒(长沙艾佳生物技术有限公司)、兔抗人Ⅷ因子-IgG(Gene Tex)、兔抗人 VEGF 抗体(Gene Tex)、胎牛血清、96 孔板、培养瓶。

1.2 方法

1.2.1 HRCECs 的培养 对新鲜眼球进行取材,参照其培养方法的相关文献^[6]对 HRCECs 进行原代培养,将培养瓶放置于 5% CO₂、温度为 37℃ 的恒温培养箱内,每 1~2d 换液 1 次,待细胞在培养瓶内长成致密单层后进行传代培养。

1.2.2 HRCECs 的鉴定 利用倒置相差显微镜观察 HRCECs 的形态特点,将无菌盖玻片 1cm×1cm 置于 6 孔培养板内等待内皮细胞长至融合状态时,利用第Ⅷ因子相关抗原抗体检测,在显微镜下观察其表达。

1.2.3 实验的分组 实验分组如下:A₀组只有培养基没有细胞的调零组;A_L组低糖对照组;A_H组高糖对照组;A₁组高糖+50μL/mL 薏苡仁油组;A₂组高糖+100μL/mL 薏苡仁油组;A₃组高糖+200μL/mL 薏苡仁油组。低糖组的葡萄糖浓度 5.5mmol/L,高糖组的葡萄糖浓度 25mmol/L。

1.2.4 MTT 检测薏苡仁油对 HRCECs 增殖的影响 取对数生长期的细胞,弃培养基,PBS 洗涤 2~3 遍,加胰蛋白酶消化约 1min,加入含胎牛血清的低糖或高糖 DMEM 培养液终止消化,分别吹打制成高糖和低糖的细胞悬浮液,调整细胞浓度为 5×10³个/mL,加入 96 孔板、200μL/孔。每组设 5 个复孔,共设 6 组(A₀,A_L,A_H,A₁,A₂,A₃)。将 96 孔板放置于 5% CO₂、温度为 37℃ 的恒温培养箱内,待细胞贴壁后取出、换液。A₁~A₃组分别加入 200μL 不同浓度的薏苡仁油,其终浓度为 50,100,200μL/mL,继续培养 48h 后,弃培养基,PBS 洗涤,加入含噻唑蓝的培养基 50μL,4h 后终止培养,弃液体,每孔加入 DMSO 200μL,震荡 10min,使蓝紫色结晶完全溶解,用波长为 490nm 自动酶标仪测定吸光度 A 值。上述操作重复 3 次,根据计算细胞存活率相关文献^[7]得出: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)×100%。

1.2.5 免疫细胞化学方法检测薏苡仁油对 HRCECs VEGF 表达的影响 将消毒灭菌并做好标记的盖玻片放入无菌的 6 孔板里,每孔接种密度为 4×10⁴个/mL 的细胞

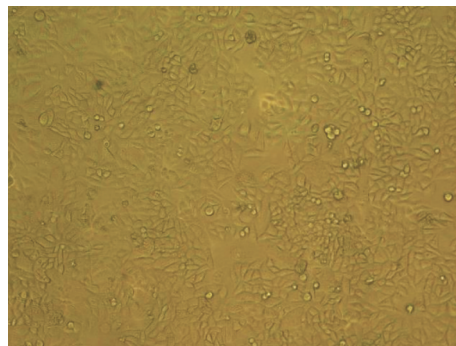


图 1 HRCECs 融合成单层,如铺路石样(x200)。

悬液 2mL,放入 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 24h,弃去培养基。分 5 组,A_L组含低糖 DMEM 的低糖对照组,A_H组含高糖 DMEM 的高糖对照组,其余为高糖 DMEM 培养基加终浓度分别为 50,100,200μL/mL 的薏苡仁油加药组,每组 2 个复孔,每孔 2mL,继续培养 48h,取出盖玻片,PBS 液洗涤 2~3 遍,4% 多聚甲醛室温固定 30min,再次 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,再次 PBS 液洗涤,之后加入 5% BSA 温盒中室温封闭 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作为阴性对照,温度为 4℃ 温盒中过夜,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,中性树脂胶封片,镜下观察。以上实验重复 3 次。阳性染色为棕色或者棕褐色颗粒。对各组进行灰度值测定(背景灰度值-阳性灰度值)。阳性染色越多,其值越小。

统计学分析:采用 SPSS 18.0 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融合成单层如铺路石样贴壁生长(图 1)。运用免疫细胞化学方法,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。说明体外培养 HRCECs 成功。

2.2 薏苡仁油对体外培养的 HRCECs 增生的影响 MTT 比色法检测显示:在相同培养时间条件下,高糖对照组与低糖对照组相比,无统计学意义($P<0.05$)。而不同质量浓度薏苡仁油处理 HRCECs 48h,各浓度薏苡仁油对 HRCECs 有增殖抑制作用,并存在浓度的依赖性($P<0.05$,表 1)。

2.3 薏苡仁油对体外培养的 HRCECs 中 VEGF 表达的影响 免疫细胞化学检测结果显示:VEGF 主要定位于细胞的胞膜和胞浆,阳性染色为棕色或者棕褐色颗粒。各组灰度值结果见表 2。相比于高糖对照组,低糖对照组的 VEGF 表达明显受到抑制($P<0.05$,图 2A,B)。不同浓度的加药组与高糖组比较,其表达明显减少($P<0.05$)且呈浓度依赖性。随着其浓度的增加,胞浆和胞膜的棕色或者棕黄色颗粒反而逐渐减少,其颜色也逐渐变淡(图 2C~E),VEGF 灰度值逐渐增大。不同浓度的加药组两两进行比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

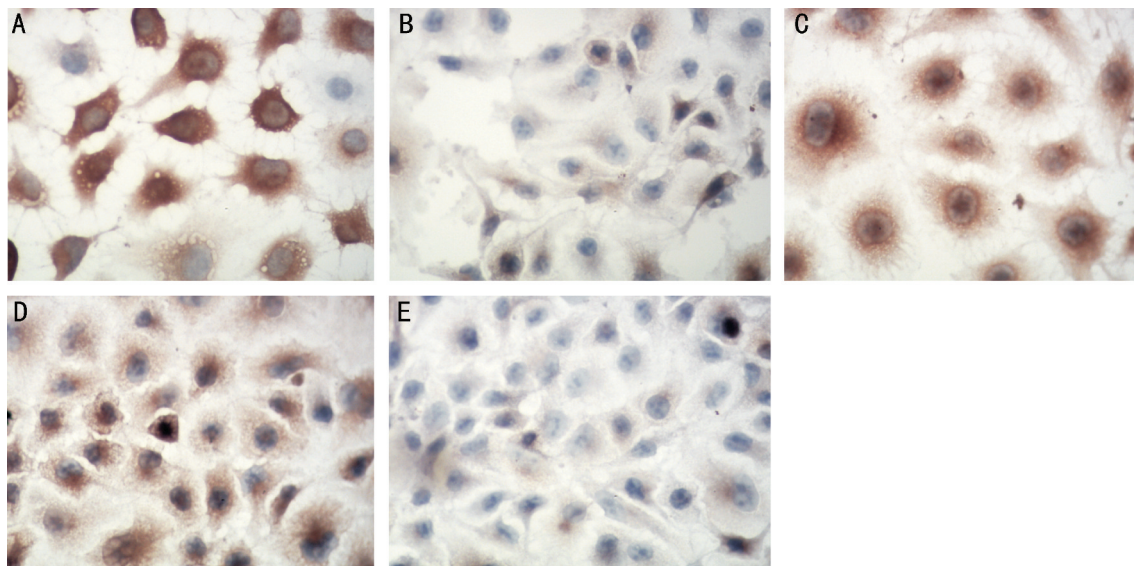


图2 HRCECs 中 VEGF 的表达 (SABC×400) A: A₀组; B: A_{II}组; C: A_I组; D: A₂组; E: A₃组。

表1 薏苡仁油对外培养的 HRCECs 增生的影响

组别	A ₄₉₀ 值	抑制率(%)
A ₀	0.0046±0.0008	-
A _{II}	0.6515±0.0242	-
A _I	0.6414±0.0259 ^c	-
A ₁	0.5542±0.0287 ^{a,c}	14.91
A ₂	0.4232±0.0393 ^{a,c}	35.03
A ₃	0.3560±0.0313 ^{a,c}	45.35

注:^aP<0.05 vs A_{II}组;^cP<0.05; A₁ ~ A₃ 各组两两比较;^eP>0.05 vs A_{II}组。

表2 薏苡仁油对外培养的 HRCECs 中 VEGF 表达的影响

组别	VEGF 灰度值
A _{II}	92.76±2.69 ^c
A _I	154.66±3.97
A ₁	111.66±7.44 ^{a,c}
A ₂	134.24±4.35 ^{a,c}
A ₃	161.38±3.30 ^{a,c}

注:^aP<0.05 vs A_{II}组;^cP<0.05 vs A_I组;^eP<0.05; A₁ ~ A₃ 各组两两比较。

3 讨论

糖尿病的微血管并发症之一——糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR),其分为非增殖性和增殖性。两型的区别在于后者有视网膜新生血管(retinal neovascularization, RNV)的形成,新生血管生成可引起视网膜脱离、玻璃体出血等并发症。故增殖性视网膜病变对视力的危害性更大,严重者可致失明。RNV 形成是一个高度复杂和协调的过程,查阅文献^[8]得知:它首先发生血管扩张,血管通透性增加,然后经过血管壁基底膜酶的降解,内皮细胞的迁移、有丝分裂和周细胞的相互作用,导致血管腔形成。多种细胞因子参与其中,如肿瘤坏死因子(TNF)、VEGF、表皮生长因子(EGF)^[9]。其中 VEGF 是一种分子量为 34 ~ 50kDa 的糖蛋白,广泛分布于各组织的

血管内皮细胞中,它功能强大、能产生多种生物学效应:(1)促进血管内皮细胞增殖;(2)增加血管通透性;(3)促进血管支持物的生成;(4)抑制肿瘤细胞的凋亡。故 VEGF 被认为是形成新生血管最重要和最关键的生长因子^[10]。加之糖尿病是以高血糖为特征的慢性疾病,姚毅等^[11]研究发现,当视网膜在高糖缺氧的情况下 VEGF 表达明显增加。亦使 VEGF 的生物学效应增强。所以抑制 VEGF 及其受体的表达,可以减少 RNV 的形成。从而治疗 DR^[12]。

薏苡仁油是从禾本科植物薏苡的成熟种仁中提取出来的,1995 年薏苡仁油注射用乳剂,即康莱特注射液(KLT)被国家正式批准用于临床治疗。主要用于抗癌治疗,其抗癌机制包括:(1)诱导癌细胞的凋亡和抑制癌细胞的增殖,Lu 等^[13]研究发现康莱特诱导细胞凋亡来抑制肝癌细胞生长,这可能是通过激活 Fas/FasL 途径。(2)增强放化疗的敏感性。(3)抑制肿瘤血管的生成。冯刚等^[14]建立动物肿瘤模型检测 KLT 对其抑瘤率、肿瘤内血管密度、瘤体 bFGF 和 VEGF 表达的影响。结果表明 KLT 可抑制 S180 肉瘤生长和下调 S180 瘤体内 VEGF 和 bFGF 的表达。说明 KLT 抑制肿瘤血管形成的机制可能是降低 VEGF 和 bFGF 的表达。

张霞等^[15]建立大鼠角膜碱烧伤模型,得出薏苡仁油抑制大鼠角膜碱烧伤后角膜新生血管(CNV)的形成与降低 CNV 的 VEGF 表达有关。所以本实验探讨了薏苡仁油对高糖环境下 HRCECs 增殖和 VEGF 表达的影响,以进一步阐明其对 DR 的治疗作用。本次实验 MTT 检测显示:不同浓度的薏苡仁油对高糖下培养的 HRCECs 的增殖抑制,并呈浓度依赖性,免疫细胞化学检测显示在高糖环境下的 HRCECs 中 VEGF 的表达增加,但是经过薏苡仁油处理后,高糖环境下 HRCECs 中 VEGF 表达明显下降。因此我们推理认为,薏苡仁油抑制高糖环境下 HRCECs 的增殖可能是通过下调 VEGF 的表达来实现但目前对薏苡仁油下调 VEGF 表达的信号通路以及具体调控点仍不清楚,需进一步探讨研究。

总而言之,在 RNV 的形成过程中,VEGF 起着关键的作用,我们的实验研究显示:薏苡仁油能抑制高糖培养下 HRCECs 的增殖和下调 VEGF 的表达,从中得到提示:该药在 DR 的防治中具有潜在的应用价值。

参考文献

- 1 易茜露,于明香.糖尿病视网膜病变的发病机制.复旦学报(医学版)2010;37(5):604-607
- 2 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
- 3 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
- 4 Wu LQ, Lu Y, Lu HJ, et al. Efficacy of intratumor injection of Kang-Lai-Te intreating transplanted hepatoma in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004;3(4):580-584
- 5 Dong QH, Zhong X, Zheng S. Effect of Kanglaite injection on cyclooxygenase activity in lung carcinoma A549 cell. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2005;30(20):1621-1623,1633
- 6 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
- 7 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

- 8 Distler H, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, et al. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 2003;47(3):149-161
- 9 Lee YM, Bae MH, Lee OH, et al. Synergistic induction of *in vivo* angiogenesis by the combination of insulin-like growth factor- II and epidermal growth factor. *Oncol Rep* 2004;12(4):843-848
- 10 Arevalo JF, Garcia Amaris RA. Intravitreal bevacizumab for diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 2009;5(1):39-46
- 11 姚毅,关明,赵秀琴,等.缺氧和高浓度葡萄糖对体外培养人视网膜色素上皮衍生因子表达的影响.中华医学杂志 2003;83(22):1989-1992
- 12 Deissler HL, Lang GE. Effect of VEGF165 and the VEGF aptamerpegaptanib (Macugen) on the protein composition of tight junctions in microvascular endothelial cells of the retina. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2008;225(10):863-867
- 13 Lu Y, Wu LQ, Dong Q, et al. Experimental study on the effect of kang-Lai-Te induced apoptosis of human hepatoma carcinoma cell HepG2. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009;8(3):267-272
- 14 冯刚,孔志庆,黄冬生,等.薏苡仁注射液对小鼠移植性 S180 肉瘤血管形成抑制的作用.肿瘤防治研究 2004;31(4):229-230
- 15 张霞,黄明汉,曾静.薏苡仁提取液抑制大鼠角膜新生血管的实验研究.广西医科大学学报 2011;28(1):35-38