

川芎嗪对高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞增殖的影响

晏妮, 李振龙*

1. 鄂东医疗集团黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院) 眼科, 湖北 黄石 435000

2. 鄂东医疗集团黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院) 心内科, 湖北 黄石 435000

摘要: 目的 观察川芎嗪对高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞(HRCECs)增殖的影响。方法 将HRCECs细胞分为对照(生理盐水)组、模型(25 mmol/L 葡萄糖)组和川芎嗪低、中、高浓度(50、100、200 μ mol/L)组, 培养48 h后, MTT细胞毒实验检测细胞增殖变化, 流式细胞技术检测细胞周期, ELISA法检测血管内皮生长因子(VEGF)表达。结果 与对照组比较, 高糖对HRCECs细胞增殖、分裂(M)期比例、上清VEGF浓度均具有显著促进作用($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 低、中、高浓度川芎嗪对高糖诱导的HRCECs细胞增殖、分裂(M)期比例、上清VEGF浓度均发挥显著抑制作用($P < 0.05, 0.01$), 且呈浓度相关性。结论 川芎嗪可能通过抑制高糖诱导的HRCECs细胞VEGF高表达, 阻滞细胞周期, 发挥抑制HRCECs细胞增殖的作用。

关键词: 川芎嗪; 视网膜血管内皮细胞; 细胞周期; 血管内皮生长因子(VEGF); 细胞增殖

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)10-1414-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.10.009

Effects of Ligustrazine on proliferation of human retinal vascular endothelial cells induced by high glucose

YAN Ni, LI Zhen-long

1. Department of Ophthalmology, Huangshi Central Hospital, Affiliated Hospital of Hubei polytechnic University, Edong Healthcare Group, Huangshi, 435000, China

2. Department of Cardiovascular, Huangshi Central Hospital, Affiliated Hospital of Hubei polytechnic University, Edong Healthcare Group, Huangshi, 435000, China

Abstract: Objective To observe the effects of Ligustrazine on proliferation of human retinal vascular endothelial cells (HRCECs) induced by high glucose. **Methods** HRCECs cells were divided into control (saline) group, model (25 mmol/L glucose) group, ligustrazine low, medium, high concentration (50, 100 and 200 mol/L) group, cultured for 48 h. Cell proliferation was detected by MTT cytotoxicity assay. Flow cytometry was used to detect cell cycle, and the expression of VEGF was detected by ELISA analysis. **Results** Compared with control group, HRCECs cell proliferation, cell division (M) phase ratio and supernatant of VEGF concentration in model group increased significantly ($P < 0.05, 0.01$). Compared with model group, cell proliferation, M phase ratio and supernatant of VEGF in Ligustrazine low, medium and high concentration groups decreased significantly ($P < 0.05, 0.01$), and showed a concentration dependence. **Conclusion** Ligustrazine can inhibit the expression of VEGF in HRCECs cells induced by high glucose to block cell cycle and inhibit the proliferation of HRCECs cells.

Keywords: Ligustrazine; retinal vascular endothelial cells; cell cycle; VEGF; cell proliferation

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是晚期糖尿病患者特有的微血管并发症, 占了糖尿病患者的35%~60%^[1], 是我国目前成人主要的致盲性眼病。新血管的形成是DR的主要病理特点,

而血管内皮细胞增生是血管形成的前提^[2], 糖尿病患者血糖升高带来的氧化应激, 会增加促炎、促血管生成因子的释放, 进一步刺激视网膜毛细血管内皮细胞增生, 是DR形成的病理生理机制^[3], 抑制

收稿日期: 2017-03-31

作者简介: 晏妮(1975—), 女, 本科, 中级职称, 研究方向为眼科临床。E-mail: nini1234532@163.com

*通信作者 李振龙(1973—), 男, 本科, 副主任医师, 研究方向为心内科。

新血管生成有望成为 DR 治疗的新方向^[4]。川芎嗪(四甲基吡嗪)是川芎中主要的生物碱类活性物质,其药理活性广泛^[5],近期的研究显示,川芎嗪可以诱导肿瘤细胞凋亡、自噬,抑制肿瘤新血管的生成,发挥抗肿瘤的作用。本文观察了川芎嗪对高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞(HRCECs)增殖的影响。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

川芎嗪(北京市燕京药业有限公司,批号201501220,质量分数99%);胰酶、DMSO、PI、葡萄糖、胎牛血清、青霉素和链霉素(美国Sigma公司);L-DMEM培养基(美国Gibco公司产品);血管内皮生长因子(VEGF)ELISA检测试剂盒(上海捷瑞公司)。

1.2 细胞

HRCECs细胞,购自美国ATCC细胞库,培养于含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和链霉素的L-DMEM培养基中,放入含5%CO₂的培养箱中,37℃培养并稳定传代。

1.3 主要仪器

Biosciences FACS Aria III流式细胞仪,美国BD公司;Forma™310 CO₂培养箱,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;SpectraMax i3x多功能酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司。

2 方法

2.1 对HRCECs细胞增殖的影响

胰酶消化对数生长期的HRCECs细胞,含1%胎牛血清的L-DMEM培养基重悬细胞至浓度为 3×10^4 /mL,取100 μL接种于96孔培养板,37℃、5%CO₂培养箱环境中继续培养12 h。将细胞分为对照(生理盐水)组、模型(25 mmol/L葡萄糖)组和川芎嗪低、中、高浓度(25 mmol/L葡萄糖造模同时,分别加入50、100、200 μmol/L川芎嗪)组,培养48 h后,每孔加入0.25 mg/mL MTT,反应4 h,吸弃上清,DMSO溶解结晶,570 nm处测定各孔吸光度(A_{570})值。计算促增殖率和抑制率。

$$\text{促增殖率} = (A_{570} \text{模型组} / A_{570} \text{对照组} - 1)$$

$$\text{抑制率} = (1 - A_{570} \text{川芎嗪组} / A_{570} \text{模型组})$$

2.2 细胞周期的检测

胰酶消化对数生长期的HRCECs细胞,含1%胎牛血清的L-DMEM培养基重悬细胞至浓度为 1×10^5 /mL,取1 mL接种于6孔培养板,37℃、

5%CO₂培养箱环境中继续培养12 h,细胞分组及给药操作同“2.1”项,继续培养48 h后,每孔无水乙醇固定过夜,加入PI染色,流式细胞仪检测各组细胞周期的分布。

2.3 上清VEGF浓度测定

细胞培养及分组给药操作同“2.2”项,继续培养48 h后取上清,ELISA法检测各组VEGF浓度,严格按照试剂盒说明书操作。

2.4 统计学分析

应用SPSS 16.0统计软件对数据进行统计学处理,计量资料使用 t 检验,多组样本均数比较使用方差分析,组间比较使用SNK- q 检验,计数资料使用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 对高糖诱导的HRCECs细胞增殖的抑制作用

与对照组比较,高糖对HRCECs细胞增殖具有显著促进作用($P < 0.01$),促增殖率为 $(44.01 \pm 6.52)\%$;与模型组比较,低、中、高浓度川芎嗪对高糖诱导的HRCECs细胞增殖均发挥显著抑制作用($P < 0.05$ 、 0.01),抑制率分别为 $(9.71 \pm 1.26)\%$ 、 $(22.30 \pm 3.14)\%$ 、 $(37.41 \pm 5.02)\%$,呈浓度相关性。结果见表1。

表1 川芎嗪对HRCECs细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Table 1 Effect of ligustrazine on proliferation of HRCECs cells ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	A_{570}
对照	—	0.467 ± 0.076
模型	—	$0.834 \pm 0.137^{**}$
川芎嗪	50	$0.753 \pm 0.115^{**\#}$
	100	$0.648 \pm 0.096^{\#}$
	200	$0.522 \pm 0.083^{*\#\#}$

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

$P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

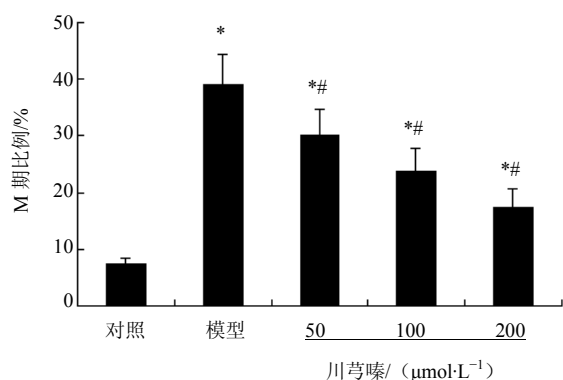
3.2 对高糖诱导的HRCECs细胞周期的影响

与对照组比较,模型组HRCECs细胞分裂(M)期比例显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,低、中、高浓度川芎嗪对高糖诱导的HRCECs细胞M期比例均发挥显著抑制作用($P < 0.05$),且呈浓度相关性。结果见图1。

3.3 对HRCECs细胞上清VEGF浓度的影响

与对照组比较,模型组HRCECs细胞上清中

VEGF 浓度显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 低、中、高浓度川芎嗪显著降低高糖诱导的 HRCECs 细胞上清中 VEGF 浓度 ($P < 0.05, 0.01$), 且呈浓度相关性。结果见表 2。



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图 1 川芎嗪对高糖诱导的 HRCECs 细胞的细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 1 Effect of Ligustrazine on cell cycle of HRCECs cells induced by high glucose ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

表 2 川芎嗪对 HRCECs 细胞上清 VEGF 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effects of ligustrazine on VEGF concentration in HRCECs cells supernatant ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	VEGF/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
对照	—	2.16 $\pm$ 0.32
模型	—	19.85 $\pm$ 2.74**
川芎嗪	50	15.38 $\pm$ 2.26**#
	100	10.13 $\pm$ 1.59***
	200	6.42 $\pm$ 0.16***

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ *** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ *** $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

糖尿病眼病是后天性致盲的主要原因, DR 是糖尿病眼病发生发展的病理机制之一, 视网膜微血管系统受损是 DR 的主要发病机制^[6], 毛细血管内皮细胞增殖介导的视网膜新生血管形成是 DR 微血管系统受损的前提^[7]。本研究的细胞增殖分析显示, 高糖对 HRCECs 细胞的促增殖率达到 40% 以上, 说明这个模型可以用于后续研究。本研究用浓度梯度的川芎嗪处理高糖环境下的 HRCECs 细胞, 结果显

示, 高糖诱导的 HRCECs 细胞增殖受到剂量相关性的抑制。李喆等^[8]的研究观察到川芎嗪可以抑制缺氧诱导的内皮细胞增殖, 与本结果一致。

细胞周期是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程, 分为细胞分裂间期和 M 期, 分裂间期为细胞静止阶段, M 期是细胞增殖活跃阶段^[9]。本研究观察到模型组 M 期比例显著增加, 说明了细胞增殖活跃, 在浓度梯度的川芎嗪作用下高糖诱导的 HRCECs 细胞 M 期比例逐渐减少, 反应了川芎嗪可以抑制细胞增殖。

VEGF 是血管内皮细胞增殖的一个必要生长因子, VEGF 与内皮细胞表面的受体结合, 激活细胞膜上的受体磷酸化, 进一步激活下游的信号分子, 促进细胞周期的进行^[10-11]。本研究的 ELISA 分析显示, 模型组细胞上清 VEGF 浓度显著高于对照组, 说明高糖通过诱导 VEGF 高表达来促进细胞增殖, 在浓度梯度的川芎嗪作用下, 高糖诱导的 HRCECs 细胞 VEGF 高表达得到浓度相关性地抑制。结果表明, 川芎嗪抑制内皮细胞增殖与抑制内皮细胞 VEGF 表达相关。

本研究结果表明, 川芎嗪可能通过抑制高糖诱导的 HRCECs 细胞 VEGF 表达, 阻滞细胞周期, 发挥抑制细胞增殖的作用, 有可能应用于 DR 的防治。

参考文献

- [1] Chew E Y. Screening for diabetic retinopathy in Youth-Onset diabetes [J]. Ophthalmology, 2017, 124(4): 422-423.
- [2] Li B, Wang H S, Li G G, et al. The role of endoplasmic reticulum stress in the early stage of diabetic retinopathy [J]. Acta Diabetol, 2011, 48(2): 103-111.
- [3] 秦秀虹, 卢建民, 邵明阳, 等. Notch 信号对高糖诱导人视网膜血管内皮细胞凋亡的保护作用 [J]. 眼科新进展, 2015, 35(9): 806-809, 815.
- [4] 韦 艳, 李 红, 苏晓庆, 等. 白藜芦醇对高糖环境下视网膜血管内皮细胞增殖及 HMGB1 乙酰化的影响 [J]. 国际眼科杂志, 2015, 15(12): 2049-2051.
- [5] 邢淑芳, 王 琳. 川芎嗪对大鼠脑损伤后保护作用的研究 [J]. 实用药物与临床, 2016, 19(5): 545-548.
- [6] Ponnalagu M, Subramani M, Jayadev C, et al. Retinal pigment epithelium-secretome: A diabetic retinopathy perspective [J]. Cytokine, 2017, 95(1): 126-135.

- [7] 余增洋, 龚陈媛, 张国庆, 等. 氧诱导新生小鼠视网膜病变中血管新生和氧应激相关基因表达的变化 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(10):1397-1401.
- [8] 李 喆, 刘 娜, 王 雪, 等. 川芎水提取物与川芎嗪对氯化钴诱导的缺氧内皮细胞的作用比较 [J]. 河南中医, 2017, 37(3): 423-424.
- [9] 刘 逸, 彭辉灿, 唐 虹. 青蒿琥酯对高糖环境下人视网膜微血管内皮细胞增殖及 VEGF 表达的影响 [J]. 国际眼科杂志, 2013, 13(2): 252-255.
- [10] 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 [J]. 国际眼科杂志, 2014, 14(12): 2147-2150.
- [11] Vingolo E M, Fragiotta S, Mafirci M, et al. Vitreous and plasma changes of endothelin-1, adrenomedullin and vascular endothelium growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(4): 662-668.