补肾活血中药复方对高糖及糖基化终末产物条件下视网膜 Müller 细胞的影响

谢学军[1] 宋明霞[2] 张 梅[3] 秦 伟[4] 万 李[2] 方 杨[2]

摘要 **目的** 应用血清药理学方法探讨补肾活血中药复方对体外培养的视网膜 Müller 细胞在高糖及糖基化终末产物(advanced glycation end products,AGEs)干预条件下乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)漏出量、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)以及 VEGF mRNA 表达的影响。**方法** 以改进酶消化法培养 SD 大鼠视网膜 Müller 细胞,将纯化的视网膜 Müller 细胞分别置于正常、高糖(50 mmol/L)以及 AGEs(50 mg/L、100 mg/L)条件下进行培养,并以补肾活血中药复方含药血清进行干预,以酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定 VEGF、LDH 漏出量,以反转录-聚合酶链法(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)测定 VEGF mRNA 相对表达量。**结果** 高糖组及高、低 AGEs 组 VEGF 和 VEGF mRNA 的表达量均较正常对照组升高($P<0.01$);高 AGEs 组 LDH 漏出量较正常对照组及高糖组增加($P<0.01$);补肾活血中药复方含药血清能减少高糖组及高、低 AGEs 组 LDH 漏出量、VEGF 与 VEGF mRNA 的表达量($P<0.05$, $P<0.01$),对正常条件下 LDH 漏出量、VEGF 及 VEGF mRNA 均无明显影响($P>0.05$)。**结论** AGEs 能明显降低视网膜 Müller 细胞膜的稳定性,高糖及 AGEs 均可致视网膜 Müller 细胞 VEGF mRNA、VEGF 的表达上调;补肾活血中药复方含药血清能增强高糖及 AGEs 条件下视网膜 Müller 细胞膜的稳定性、抑制 VEGF mRNA 的转录、进而减少 VEGF 蛋白表达,可能是其防治糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的重要作用机制之一。

关键词 糖基化终末产物;视网膜 Müller 细胞;血管内皮生长因子;乳酸脱氢酶;补肾活血

Effect of Bushen Huoxue Compound on Retinal Müller Cells in High Glucose or AGEs Conditions

XIE Xue-jun[1], SONG Ming-xia[2], ZHANG Mei[3], QIN Wei[4], WAN Li[2], and FANG Yang[2] *1 Department of Ophthalmology, School of Clinical Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu (610075), China; 2 School of Postgraduates, Chengdu University of TCM, Chengdu (610075), China; 3 College of Clinical Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu (610075), China; 4 Department of Ophthalmology, Sun Yat-sen Hospital, Guangzhou University of TCM, Guangdong (528400), China*

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of Bushen Huoxue Compound (BHC) on lactate dehydrogenase (LDH) leakage, expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF mRNA in retinal Müller cells under high glucose condition or advanced glycosylation end products (AGEs) condition by using serum pharmacological method. **Methods** The retinal Müller cells of 5-7 days postnatal Sprague Dawley (SD) rats were cultured with modified enzyme-digestion method. Purified retinal Müller cells were cultured in normal conditions, high glucose condition (50 mmol/L) or AGEs (50 mg/L and 100 mg/L) conditions, and BHC-containing serum was added to culture medium. The LDH leakage and VEGF expressions were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In addition, the relative expression of VEGF mRNA was tested by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with the normal control group, expressions of VEGF and VEGF mRNA were

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81072845);高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(No.20115132110000)

作者单位:1.成都中医药大学临床医学院眼科(成都 610075);2. 成都中医药大学研究生院(成都 610075);3.成都中医药大学临床药学院(成都 610075);4. 广州中医药大学附属中山医院眼科(广东 528400)

通讯作者:谢学军,Tel:028-87767279,E-mail:xxj8848@163.com

DOI:10.7661/CJIM.2015.06.0735

significantly increased in the high glucose group, the low dose AGEs group and the high dose AGEs group (all $P<0.01$). The LDH leakage was obviously increased in the high dose AGEs group, when compared with the normal control group and the high glucose group ($P<0.01$). The LDH leakage, expressions of VEGF and VEGF mRNA were obviously decreased by BHC-containing serum both in high glucose and AGEs conditions ($P<0.05$, $P<0.01$). BHC-containing serum had no significant effect on the LDH leakage and expressions of VEGF and VEGF mRNA in normal conditions ($P>0.05$). Conclusions　AGEs intervention could obviously lower the stability of Müller cell membrane. Up-regulated expressions of VEGF and VEGF mRNA in cultured Müller cells could be induced by AGEs or high glucose. BHC-containing serum could stabilize the stability of Müller cell membrane, inhibit the transcription of VEGF mRNA and decrease the protein expression of VEGF, which might be one of important mechanisms for preventing and treating diabetic retinopathy.

KEYWORDS　advanced glycosylation end products; retinal Müller cells; vascular endothelial growth factor; lactate dehydrogenase; Bushen Huoxue Compound

糖尿病(diabetes mellitus, DM)已成为21 世纪威胁人类健康的常见慢性疾病之一。2010 年报道显示,我国糖尿病患病率和糖尿病前期患病率分别为9.7% 和15.5%[1],糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是 DM 最常见的并发症之一,亦是一种世界性的主要致盲眼病[2]。慢性缺血缺氧是 DR 发生发展的一个重要环节,寻找这个过程中的靶点因子对于 DR 的防治具有重要意义,抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)已逐渐成为 DR 的一个主要治疗方案[3]。多项研究表明:糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)可通过细胞外信号调节激酶通路,引起 VEGF 及 VEGF mRNA 的表达明显增加[4,5]。但目前有关 DR 与 VEGF 关系的研究靶点大多集中于血管内皮细胞以及视网膜色素上皮细胞[6]。然而,视网膜 Müller 细胞是视网膜主要胶质细胞,是视网膜缺氧代谢的重要环节之一,也是 VEGF 表达的一个靶细胞,其在血管外作为支架构成血-视网膜屏障的一部分[7]。在 DR 发生发展过程中,视网膜 Müller 细胞表现如何? 目前这方面的研究受到越来越多的关注。因此在前期研究的基础上[8,9],本实验应用中药血清药理学方法,从高糖和 AGEs 角度研究补肾活血中药含药血清对体外培养的视网膜 Müller 细胞 VEGF、VEGF mRNA表达及乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性等方面的影响,以探讨补肾活血中药复方治疗 DR 的作用机制,为中医药治疗 DR 开辟新的思路和方法。

材料与方法

1　材料

1.1　动物　新生 7 天 SD 大鼠 5 只(细胞培养取材,雌雄不限,双眼未睁)及体重 120 ~ 150 g 的 SD 大鼠20 只(制备血清,雌雄各半),均由成都中医药大学动物实验中心提供,标准号为清洁级[动物生产合格证号:SCXK(川)20012 -11 号]。

1.2　药物　补肾活血中药复方由干地黄、丹参、人参、葛根组成,由成都中医药大学药学院提供,每日给药剂量为 11.67 g(生药)/kg,相当于临床用量 10 倍。

1.3　试剂及仪器　胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、波形蛋白(Vimentin),美国 Sigma 公司;AGEs,北京博奥森生物技术有限公司;VEGF 检测试剂、RT-PCR 试剂盒 IQ SYBR Green 超混合液均为美国 Bio-Rad 公司;总 RNA 提取液 Trizol(美国 INV 原装);荧光定量试剂盒,日本 TOYOBO 公司;引物,美国 INV。LDH 检测试剂盒,南京建成生物工程公司;DMEM 培养液,赛默飞世尔生物化学制品生物工程有限公司;青霉素、链霉素,华北制药股份公司。荧光定量 PCR 仪 CFX48、490 型酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司。

2　方法

2.1　视网膜 Müller 细胞的纯化培养及鉴定　采用改进酶消化法培养新生 7 天 SD 大鼠视网膜 Müller 细胞,具体方法同本课题组前期实验[9]。采用视网膜 Müller 细胞骨架成分——细胞特征性蛋白 GFAP 和 Vimentin 免疫细胞化学染色方法鉴定细胞。

2.2　中药血清的制备　补肾活血中药血清的具体制法参照本课题组以往的研究[9]。补肾活血中药组及正常对照组所制备的 SD 鼠血清分别简称中药含药血清、空白血清。分离的血清以 56 ℃,30 min 灭活处理用,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌、5 mL 分装,-20 ℃保存备用。

2.3 实验分组 将第 2 代视网膜 Müller 细胞接种在 48 孔培养板中，密度为 2×10^6/mL，每孔 400 μL，在含有体积分数 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养 3 ~5 天，待细胞基本铺满孔底后，换用无血清的 DMEM 培养液（以排除胎牛血清干扰）孵育 24 h后，弃掉无血清的培养液，按下列分组情况换含有不同培养条件的培养液：正常对照组（含 20% 的空白血清 DMEM 液），正常中药干预组（含 20% 的中药含药血清 DMEM 液）；高糖组（含 20% 空白血清及终浓度为 50 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养液），高糖中药干预组（含 20% 中药含药血清及终浓度为 50 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养液）；低 AGEs 组（含 20% 空白血清及终浓度为 50 mg/L AGEs 的 DMEM 培养液），低 AGEs 中药干预组（含 20% 中药含药血清及终浓度为 50 mg/L AGEs 的 DMEM 培养液）；高 AGEs 组（20% 空白血清及终浓度为 100 mg/L AGEs 的 DMEM 培养液），高 AGEs 中药干预组（含 20% 中药含药血清及终浓度为 100 mg/L AGEs 的 DMEM 培养液）。每组设 6 个复孔，干预 48 h 后检测各项指标。

2.4 ELISA 法检测视网膜 Müller 细胞 LDH 漏出量 收集培养基上清液 50 μL，迅速加入 LDH 检测试剂（具体操作参照 LDH 试剂盒说明书），490 型酶标仪（美国 Bio-Rad 公司）440 nm 波长下检测吸光度（OD）值的变化，最后计算 LDH 值、单位为 U/L。

2.5 ELISA 法检测视网膜 Müller 细胞 VEGF 蛋白表达量 收集培养基上清液 50 μL，迅速加入 VEGF 检测试剂（具体操作参照 VEGF 试剂盒说明书）、生物素标记二抗和酶标试剂，37 ℃反应 60 min，洗板5 次，加入显色液 A、B，37 ℃显色10 min，加入终止液，10 min 内测 OD 值，计算 VEGF 蛋白表达量，单位为 ng/mL。

2.6 RT-PCR 检测 VEGF mRNA 表达量

2.6.1 RNA 的抽提 每 2×10^6 个细胞中加入 1 000 μL Trizol 至 1.5 mL 离心管中、以玻璃匀浆器将细胞破碎、静置 5 min；加 200 μL 氯仿、旋涡振荡 10 s，静置 5 min；12 000 r/min、4 ℃、离心 15 min；将上清液转移至新的 1.5 mL 离心管中，加入等体积的异丙醇，混合均匀，室温静置 10 min；12 000 r/min、4 ℃、离心 10 min，见少量 RNA 沉淀；弃上清液，将异丙醇除尽，加 75% 无水乙醇 1 000 μL，12 000 r/min、4 ℃、离心 5 min；弃上清液，室温干燥 RNA 沉淀 5 ~10 min，待沉淀干燥后加入 DEPC 水溶解 RNA 沉淀，-70 ℃保存。

2.6.2 RNA 反转录 将溶解后的 RNA 用 DEPC 水稀释 10 倍，最终浓度为 1 μg/μL。取 5 μL RNA 稀释液置于灭菌的无 RNA 酶的 Eppendorf 管中，分别加入 50 μmol/L Oligo（d_T）引物 0.5 μL，随机引物 0.5 μL，10 mmol dNTP 混合物 1 μL，DEPC 水 5 μL，总反应体积为 12 μL，此时得到混合物Ⅰ。将混合物Ⅰ在 65 ℃温浴 5 min，然后立即放入冰中 1 min；在混合物Ⅰ中分别加入如下成分：5 × First-Strand Buffer 4 μL，0.1 mol/L d TT 2 μL，RNase-out 40 U/μL 1 μL，SuperScrip Ⅲ RT（200 U/μL）1 μL，此时得到混合物Ⅱ。将反应管置于 PCR 仪，反转录 25 ℃处理 5 min，50 ℃处理 60 min，70 ℃处理 15 min，然后立即放置到冰上。此时得到的模板 cDNA，离心管分装，-20 ℃保存。

2.6.3 RT-PCR 反应扩增 取模板 cDNA 稀释液 1 μL 置于 0.5 mL 离心管中，每 1 μL 模板 cDNA 稀释液分别加入 H_2O 12.3 μL，10 × PCR Buffe 2 μL，Mg^{2+}（25 mmol/L）2 μL，dNTPs（25 mmol/L）0.5 μL，SYBR（20 ×）1 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 0.5 μL，Taq Polymerase 0.2 μL，反应液总体积为 20 μL，将反应管置于 PCR 仪，扩增反应 95 ℃预变性 2 min，进入 95 ℃变性 10 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，共 40 个循环。

基因引物序列为：GAPDH：上游：5′-GGTGCTGAGTATGTCGTGGAGT-3′ 下游：5′-GCGGAGATGATGACCCTTTT-3′，VEGF：上游：5′-GCAGATGTGAATGCAGACCAA-3′，下游：5′-TCTCCGCTCTGAACAAGGCT-3′ 从 72 ℃到 95 ℃每上升 0.5 ℃取一次荧光值，最后生成溶解曲线，所有的样本均重复检测 3 次，最后计算出 Ct 值。VEGF mRNA 的表达量采用△△Ct 计算方法进行计算分析，是通过计算目的基因相对于参照因子的倍数来比较 mRNA 的表达差异。看家基因 GAPDH 作为内参基因。△△Ct =（待测样品目的基因 Ct 平均值 - 待测样本内参基因 Ct 平均值）-（对照样品目的基因 Ct 平均值 - 对照样本内参基因 Ct 平均值）。目的基因相对拷贝量 $F = 2^{-\triangle\triangle Ct}$。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，相同指标多组间比较，采用单因素方差分析，多组间两两比较，采用 q 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 视网膜 Müller 细胞的培养与鉴定 倒置相差

显微镜下观察原代培养的视网膜 Müller 细胞，接种 24 h后，见少许细胞开始贴壁呈伸展状，2 天后基本贴壁，胞质丰富，胞体狭长，两端突起，呈梭形或不规则形状。生长 5 天后细胞达到 80% 融合，呈单层生长。本实验均选用第 2 ~3 代视网膜 Müller 细胞作为实验细胞。GFAP 免疫细胞化学荧光染色鉴定（图 1）：纯化培养原代视网膜 Müller 细胞，85% 以上细胞 GFAP 染色阳性，表现为胞浆内呈棕黄色的丝网状结构。第 2 代与第 1 代细胞具有相似的细胞形态，5 天左右细胞融合，90% 以上细胞 GFAP 染色阳性。Vimentin 免疫细胞化学荧光染色鉴定（图 2）：纯化培养原代视网膜 Müller 细胞，85% 以上细胞 GFAP 染色阳性，表现为胞浆内呈棕黄色的丝网状结构，90% 以上细胞 GFAP 染色阳性。

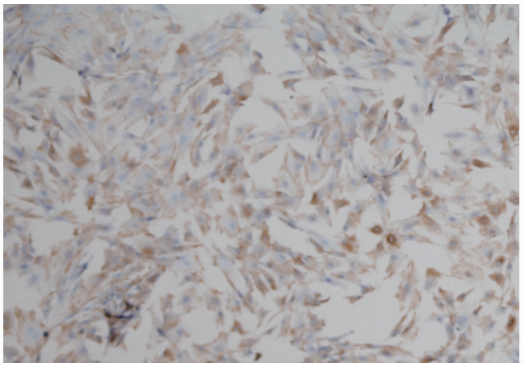

图 1　视网膜 Müller 细胞　（GFAP 染色，×100）

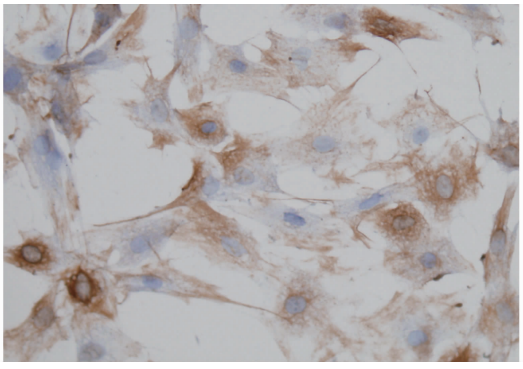

图 2　视网膜 Müller 细胞　（Vimentin 染色，×400）

2　各组视网膜 Müller 细胞的 LDH 漏出量、VEGF 及 VEGF mRNA 表达量比较

2.1　各组视网膜 Müller 细胞 LDH 漏出量、VEGF 及 VEGF mRNA 表达量比较（表 1）　高 AGEs 组的 LDH 漏出量较正常对照组及高糖组升高，差异有统计学意义（$P<0.01$），高糖组及高、低 AGEs 组的 VEGF 及 VEGF mRNA 表达量均较正常对照组增加，差异亦有统计学意义（$P<0.01$）。

表 1　各组视网膜 Müller 细胞 LDH 漏出量、VEGF 及 VEGF mRNA 表达量比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	LDH（U/L）	VEGF（ng/mL）	VEGF mRNA
正常对照	6	3.57 ±0.33	532.25 ±19.92	1.35 ±0.31
高糖	6	3.76 ±0.14	566.66 ±24.98 *	2.26 ±0.68 *
低 AGEs	6	3.83 ±0.31	590.56 ±29.73 *	2.00 ±0.57 *
高 AGEs	6	4.12 ±0.26 *△	593.65 ±16.34 *	2.06 ±0.76 *
F		6.414	17.813	11.688
P		0.002	0.000	0.001

2.2　中药血清对正常条件下视网膜 Müller 细胞 LDH 漏出量、VEGF 及 VEGF mRNA 表达量比较（表 2）　中药血清对正常条件下 LDH、VEGF 及 VEGF mRNA 均无明显影响（$P>0.05$）。

表 2　中药血清对正常条件下 LDH、VEGF 及 VEGF mRNA 的影响　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	LDH（U/L）	VEGF（ng/mL）	VEGF mRNA
正常对照	6	3.57 ±0.33	532.25 ±19.92	1.35 ±0.31
正常中药干预	6	3.68 ±0.31	530.02 ±18.10	0.94 ±0.36
t		−0.443	0.298	2.808
P		0.553	0.887	0.142

2.3　中药血清对高糖条件下视网膜 Müller 细胞的 LDH 漏出量、VEGF 及 VEGF mRNA 表达量比较（表 3）　中药血清能减少高糖组 LDH 漏出量、VEGF 与 VEGF mRNA 的表达量，其差异均有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。

表 3　中药血清对高糖条件下 LDH、VEGF 及 VEGF mRNA 的影响　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	LDH（U/L）	VEGF（ng/mL）	VEGF mRNA
高糖	6	3.76 ±0.14	566.66 ±24.98	2.26 ±0.68
高糖中药干预	6	3.57 ±0.32	496.33 ±25.28	0.60 ±0.54
t		1.123	4.706	1.6118
P		0.043	0.000	0.000

2.4　中药血清对 AGEs 条件下视网膜 Müller 细胞 LDH 漏出量、VEGF 及 VEGF mRNA 表达量比较（表 4、5）　中药血清能减少高、低 AGEs 组 LDH 漏出量、VEGF 与 VEGF mRNA 表达量，其差异均有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。

表 4　中药血清对低 AGEs 组 LDH、VEGF 及 VEGF mRNA 的影响　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	LDH（U/L）	VEGF（ng/mL）	VEGF mRNA
低 AGEs	6	3.83 ±0.31	590.56 ±29.73	2.00 ±0.57
低 AGEs 中药干预	6	3.42 ±0.23	522.63 ±28.31	1.11 ±0.36
t		6.100	4.895	3.101
P		0.022	0.000	0.002

中国中西医结合杂志

表 5 中药血清对高 AGEs 组 LDH、VEGF 及 VEGF mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LDH(U/L)	VEGF(ng/mL)	VEGF mRNA
高 AGEs	6	4.12 ±0.26	593.65 ±16.34	2.06 ±0.76
高 AGEs 中药干预	6	3.50 ±0.14	496.89 ±36.70	0.61 ±0.39
t		4.808	5.242	3.543
P		0.001	0.000	0.000

讨 论

长期慢性高血糖是 DR 发生发展的重要原因。体外培养细胞时,25 mmol/L 葡萄糖水平可近似等同于糖尿病时体内的高血糖状态[6]。然而,视网膜 Müller 细胞在单纯高糖条件下其葡萄糖转运载体蛋白表达增强,对短间高糖有一定耐受性[9],体外培养细胞不能达到长期慢性高糖状态。AGEs 是机体在长期慢性高血糖状态下而形成的一种不可逆的终末产物,研究资料显示,AGEs 在糖尿病慢性并发症的发生发展中具有重要作用,在高血糖患者的血清、血管壁上可检测到 AGEs 的高表达,视网膜病变程度与 AGEs 含量呈正相关,星形胶质细胞有 AGEs 受体的表达[5,10],而视网膜 Müller 细胞是视网膜最主要的星形胶质细胞,是视网膜缺氧代谢的一个重要环节,视网膜 Müller 细胞上存在 VEGF 受体[7]。然而,目前有关 AGEs 诱导体外培养的视网膜 Müller 细胞分泌 VEGF 鲜有报道,但有关 AGEs 对视网膜 Müller 细胞的 VEGF、VEGF mRNA 以及 LDH 有何影响以及补肾活血中药对其有何干预作用尚未见报道。因此,本实验首次以视网膜 Müller 细胞为靶细胞,将高糖(50 mmol/L)以及 AGEs(50 mg/L、100 mg/L)设为实验干预条件,研究补肾活血中药对正常、高糖(50 mmol/L)以及 AGEs(50 mg/L、100 mg/L)不同条件下视网膜 Müller 细胞的 VEGF、VEGF mRNA 及 LDH 有何干预作用,为临床更好应用补肾活血中药治疗 DR 提供一定的实验依据。

细胞膜是细胞与外界环境进行交换的物质结构。细胞的代谢障碍,首先是细胞膜的通透性发生障碍。有学者认为糖尿病患者细胞膜系统异常是发生并发症的重要基础,是导致细胞内外环境改变的基本条件[11]。LDH 是活细胞内的标志酶,当细胞膜的通透性发生障碍时,细胞外 LDH 漏出量则明显增多,其累计漏出量与受损细胞数量呈正相关[12]。即 LDH 漏出量越多,细胞膜越不稳定。因此,细胞外 LDH 漏出量可成为反映视网膜 Müller 细胞在 DR 早期功能受损的一个敏感指标。本实验的结果显示在终浓度为100 mg/L的 AGEs 干预条件下,体外培养视网膜 Müller 细胞通透性明显增加,细胞活力下降,并且终浓度为 100 mg/L 的 AGEs 对视网膜 Müller 细胞通透性的损伤比50 mmol/L 的高糖更明显。因此笔者认为,补肾活血中药复方含药血清能提高在高糖及 AGEs 条件下视网膜 Müller 细胞膜稳定性、降低细胞膜通透性,增强其细胞活力可能是其防治 DR 的药物干预途径之一。

VEGF 是目前已知最关键的血管生成促进因子,VEGF 在 DR 发病中的作用是在 1994 年首次被提出[13],VEGF 是 DR 发生发展过程中的一个重要因子,是 DR 新生血管形成的主要刺激因子,VEGF 蛋白在糖尿病患者眼内大量存在。糖尿病患者的视网膜组织中高糖和 AGEs 的积累,增加 VEGF 基因转录,上调 VEGF 表达产物,导致眼内 VEGF 蛋白的积累,激活血管化过程,VEGF 水平和 DR 严重程度有直接显著的关系[13-17]。在眼内,视网膜血管内皮细胞、周细胞、视网膜色素上皮细胞、神经节细胞、视网膜 Müller 细胞以及感光细胞均可表达 VEGF[17,18]。为排除体内各种混杂因素的干扰,叶辉等[7]用体外细胞培养中添加高浓度的 AGEs 来模拟体内糖尿病环境,观察该培养条件视网膜 Müller 细胞增殖活性的变化,及其 VEGF 分泌功能的影响,研究结果显示:AGEs 能够促进培养的视网膜 Müller 细胞高表达 VEGF;证实了高浓度 AGEs 可做为一个独立的刺激条件,促进培养的视网膜 Müller 细胞异常增殖,并大量表达 VEGF。穆华等[19]研究体外培养大鼠视网膜 Müller 细胞内色素上皮衍生因子(pigment epithelium derived factor, PEDF)与 VEGF 的相互作用结果显示:在 Müller 细胞内,PEDF 对 VEGF 表达具有抑制作用,VEGF 对表达 PEDF 也具有抑制作用,二者的负反馈调节作用可能视网膜病理性新生血管中起重要作用。Treins C[4]等研究提示 AGEs 可通过细胞外信号调节激酶通路,引起低氧诱导因子 -1α(hypoxia-inducible factor, HIF-1α)蛋白增加与堆积,刺激 VEGF 表达增加。本课题组同期研究[20]显示,在 AGEs 以及高糖条件下体外纯化培养的视网膜 Müller 细胞 HIF-1α 介导的低氧传导通路被激活,诱导其下游基因 VEGF 表达,进而增加 VEGF mRNA 的转录;并且 AGEs 比高糖更能诱导视网膜 Müller 细胞 HIF-1α 的高表达,HIF-1α 的表达强度与 AGEs 浓度有关。本实验结果提示在高糖(50 mmol/L)及 AGEs (50 mg/L、100 mg/L)条件下,视网膜 Müller 细胞的 VEGF mRNA 转录明显增强、VEGF 蛋白增加;本实验结果亦显示,补肾活血中药复方含药血清能明显降低高糖(50 mmol/L)及 AGEs(50 mg/L、100 mg/L)条件下视网膜 Müller 细

胞 VEGF 及 VEGF mRNA 表达强度($P<0.05$),降低 Müller 细胞的 LDH 漏出量,使细胞膜稳定性增加。因此笔者认为,补肾活血中药复方含药血清抑制高糖以及 AGEs 条件下视网膜 Müller 细胞 VEGF mRNA 转录、进而减少 VEGF 蛋白表达,增强 Müller 细胞膜的稳定性可能是其防治 DR 的重要作用机制之一。既然 VEGF 是 HIF-1α 下游基因,那么补肾活血中药复方含药血清抑制高糖以及 AGEs 条件下视网膜 Müller 细胞 VEGF 蛋白表达的另一个途径可能是抑制了 HIF-1α 的高表达,相关的研究结果笔者将在以后报告中讨论。

参 考 文 献

[1] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090 -1101.

[2] Lam DW, LeRoith D. The worldwide diabetes epidemic[J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obesity, 2012, 19(2): 93 -96.

[3] Deissler H, Deissler H, Lang S, et al. VEGF-induced effects on proliferation, migration and tight junctions are restored by *Ranibizumab* (Lucentis) in microvascular retinal endothelial cells[J]. Br J Ophthalmol, 2008, 92(6): 839 -843.

[4] Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by advanced glycation end products [J]. J Biol Chem, 2001, 276(47): 43836 -43841.

[5] Yokoi M, Yamagishi SI, Takeuchi M, et al. Elevations of AGE and regular endothelial growth factor with decreased total antioxidant status in the vitreous fluid of diabetic patients with retinopathy [J]. Br J Ophthalmol, 2005, 89(6): 673 -675.

[6] 李加,吴雅臻, 刘辉,等. 糖基化终末产物对视网膜色素上皮细胞表达 NK-κB 及 VEGF 的影响[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(3): 325 -328.

[7] 叶辉,徐格致, 王文吉.体外 AGEs 诱导培养的视网膜 Müller 细胞增殖活性和分泌 VEGF 的改变, 国际眼科杂志, 2008, 8(11): 2217 -2218.

[8] 马殿伟,谢学军,李晓微,等. TGF-β_2 干预的缺氧状态下补肾活血剂对 Müller 细胞及谷氨酰胺合成酶活性的影响[J].眼科研究, 2010, 28 (5): 407 -411.

[9] 谢学军,李芳梅,张梅,等. 补肾活血法对 Müller 细胞谷氨酸摄取功能的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2008, 18(1): 19 -22.

[10] Thoralley PJ. Cell activation by glycated proteins, AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGE[J]. Cell Mol Biol, 1998, 44(10): 1013 -1023.

[11] 杨培增,陈家祺,葛坚主编. 眼科学基础与临床[M].北京:人民卫生出版社, 2006:800 -806.

[12] Kon JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay [J]. Neurochem Meurochem Methods, 1987, 20 (1): 83 -87.

[13] Frank RN. Vascular endothelial growth factor -its role in retinal vascular proliferation[J]. N Engl J Med, 1994, 331(22): 1519 -1520.

[14] Szaflik JP, Wysocki T, Kowalski M, et al. An association between vascular endothelial growth factor gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2008, 246(1): 39 -43.

[15] Boyd SR, Tan D, Bunee C, et al.Vascular endothelial growth factor is elevation ocular fluids of eyes harbouring uveal melanoma: identification of a potential therapeutic window[J]. Br J Ophthalmol, 2002, 86(4): 448 -452.

[16] 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[J].国际眼科杂志, 2011, 11(2): 282 -285.

[17] Gupta N, Mansoor S, Sharma A, et al. Diabetic retinopathy and VEGF[J]. Open Ophthalmol J, 2013, 7(1): 4 -10.

[18] Eerrare N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress[J]. Endocr Rev, 2004, 25(4): 582 -611.

[19] 穆华,董莉,冯卓蕾,等. Müller 细胞内色素上皮衍生因子与血管内皮生长因子的相互作用[J]. 眼科新进展, 2010, 30(10): 924 -927.

[20] 宋明霞,谢学军,万李,等. 高糖及糖基化终末产物对视网膜 Müller 细胞缺氧诱导因子-1α 介导缺氧信号通路的影响[J]. 眼科新进展, 2013, 33(12): 1106 -1110.

(收稿:2013 -11 -26　修回:2015 -03 -05)

中国中西医结合杂志