

缺氧条件下高糖及高胰岛素对 Müller 细胞 VEGF 表达的影响

宋 鄂 王 瑜 王秋利 董 宇 鞠 胜 毕明超

Effects of hypoxia and high-concentration glucose and high-concentration insulin on VEGF expression in Müller cells

Song E, Wang Yu, Wang Qiuli, Dong Yu, Ju Sheng, Bi Mingchao. Department of Ophthalmology, First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China

Abstract Objective Retinal neovascularization is a main cause of blindness in diabetic retinopathy. Our previous study has proved the overexpression of VEGF in Müller cells in high glucose and insulin environment, but its mechanism is still unclear. This study was to investigate the change of VEGF released by cultured rabbit retinal Müller cells at high concentration glucose and high concentration insulin under hypoxia environment in vitro. **Methods** Rabbit's retina was cultured by tissue suspension culture method to establish the primary culture system to obtain and identify the cultured Müller cells by GFAP stain. Three gas incubator and low-flow sustained ventilation was used to control hypoxia environment. The cultured Müller cells were digested by 0.25% trypsin and suspended in H-DMEM containing 10% fetal bovine serum and then were treated under the hypoxia and further under the 50 mmol/L of glucose, 4 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ insulin or 50 mmol/L glucose + 4 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ insulin condition respectively for 1 day, 2 days and 3 days. The AO/EB stain was used to detect apoptotic Müller cells in different time points. Immunocytochemical stain was adopted to observe the effects of hypoxia, high concentration of glucose and high concentration of insulin on expression of VEGF in the Müller cells. **Results** 95% positive Müller cells for GFAP were obtained. The apoptotic Müller cells were 20% and 32% in the 3rd and 4th days under the hypoxia. The expression of VEGF in Müller cells was significantly increased in 50 mmol/L glucose and 4 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ insulin, 50 mmol/L glucose + 4 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ insulin group under the normoxia condition ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The statistically significant difference in VEGF expression was found between only hypoxic group and normal in the 2nd and 3rd day ($P < 0.05$). **Conclusion** High concentration of glucose or high concentration of insulin can stimulate VEGF expression more obviously under the hypoxia than normoxia condition.

Key words Müller cells; VEGF; hypoxia; diabetic retinopathy; high glucose; high insulin

摘要 目的 观察缺氧、高糖及高胰岛素对视网膜 Müller 细胞胞浆内血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。**方法** 采用组织块悬浮贴壁法原代培养兔视网膜 Müller 细胞,于正常和缺氧条件下分别分为对照组、高糖组、高浓度胰岛素组、高糖高浓度胰岛素组,通过 AO/EB 染色法观察不同缺氧时相 Müller 细胞的凋亡情况,免疫细胞化学染色测定各组 Müller 细胞胞浆内 VEGF 的表达。**结果** 免疫细胞化学技术测定结果显示缺氧条件下 1、2、3 d 各实验组与对照组相比 VEGF 表达量增加差异均有统计学意义($P < 0.05$)。缺氧 2 d、3 d 各实验组与正常条件下各实验组相比 VEGF 表达增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 缺氧条件下高糖及高胰岛素环境刺激 Müller 细胞 VEGF 表达作用增强。

关键词 Müller 细胞; 血管内皮生长因子; 缺氧; 糖尿病视网膜病变; 高糖; 高胰岛素

分类号 R 774 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)01-0001-04

本课题为国家自然科学基金资助(30571992)

作者单位:130021 长春,吉林大学第一医院眼科[宋鄂、王瑜(研究生,现在南京医科大学眼科医院 210029)、董宇、毕明超];130011 长春,吉林大学第四医院眼科(王秋利);136200 辽源市中医院眼科(鞠胜)

通讯作者:宋鄂(Email: songe23@163.com)

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是以新生血管形成为主要标志的糖尿病眼部并发症,其致盲率占眼科双眼盲的首位^[1]。众多的研究表明视网膜新生血管形成主要与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)有关^[2-4]。缺血缺氧

是引起 DR 的中心环节,高糖高胰岛素环境下 Müller 细胞分泌 VEGF 增多^[5],2 型糖尿病胰岛素抵抗患者 DR 进展尤其显著^[6]。本研究测定正常条件和缺氧条件下,高糖及高胰岛素对视网膜 Müller 细胞胞浆内 VEGF 表达的影响,为预防和治疗 DR 寻找新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物来源 健康成年大耳白兔(吉林大学动物中心提供),雌雄不限。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);标准胎牛血清和胰蛋白酶(美国 HyClone 公司);兔抗 VEGF 多克隆抗体、免疫组织化学 SP 试剂盒、DAB 显色剂(武汉博士德公司);AO/EB 染色剂(北京鼎国公司);TritonX-100(美国 Promega 公司)。

1.1.3 主要仪器 缺氧恒温培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 原热电集团);CO₂ 恒温培养箱(日本 SANYO 公司);倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司);FV500 激光共聚焦显微镜(日本 OLYMPUS 公司);计算机图像分析仪(日本 OLYMPUS 公司);微量电子天平、KR-20000T 高速低温离心机(美国 Sartorius 公司);SKHG-01 电热恒温干燥箱(湖北黄石公司);SW-CJ-1F 超净工作台(苏州安泰公司);低温冰箱(-20℃)(日本 SANYO 公司)。

1.2 方法

1.2.1 Müller 细胞的原代、传代培养及鉴定 组织块悬浮法原代培养兔视网膜 Müller 细胞及其鉴定方法参见文献[7]。

1.2.2 缺氧条件的建立 缺氧条件组细胞置于 37℃ 缺氧恒温培养箱中(5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂),持续低流量通气,达到所需时间后取出固定,中间不换液。

1.2.3 AO/EB 染色检测 Müller 细胞在缺氧条件下的凋亡情况 取 P₂ 融合生长的 Müller 细胞,0.25% 胰蛋白酶消化,1 200 r/min 离心 6 min,弃上清。用 10% 胎牛血清的 H-DMEM 培养液重新悬浮,加入不同的 24 孔板,每孔加 1 mL 细胞悬液。培养板置于 37℃,5% CO₂ 孵箱继续培养。3~4 d 后,细胞生长旺盛,融合达到 70% 时,放入缺氧培养箱中继续培养。分别在缺氧 1、2、3、4 d 取出 24 孔板,吸出原培养液,加入 0.25% 胰蛋白酶消化,转入 EP 管 1 200 r/min 离心 6 min,弃上清。加入 0.1 mol/L PBS 重新悬浮,离心弃上清。加入 0.5 mL PBS 悬浮细胞后,分别加入 AO 及 EB 各 5 μL 混匀,490 nm 激发波长的荧光显微镜下观察细胞形态并计数。结果判定:活细胞:核染色质着绿色荧

光,且形态结构正常;早期凋亡细胞:核染色质虽也着绿色荧光,但形态呈固缩状、圆珠状或新月状;晚期凋亡细胞:核染色质着橘红色荧光,形态也呈固缩状或圆珠状;非凋亡死细胞:核染色质着橘红色荧光,但形态结构尚正常。每组观察 3 张片子,每张随机计数 200 个细胞,重复 3 次,结果以百分率表示。细胞凋亡率 = (活细胞 + 晚期凋亡细胞) / (活细胞 + 非凋亡死细胞 + 早期凋亡细胞 + 晚期凋亡细胞) × 100%。选择细胞凋亡率在 25% 以下的缺氧时间进行研究。

1.2.4 实验分组 取 P₂ 代培养细胞供实验用,将处理过的 10 mm × 10 mm 盖玻片置于 24 孔板中,将细胞按照 10⁶ 个/mL 均匀加 1 mL 至各孔,做好标记,至细胞达到 80% 底面积时,吸出含血清 DMEM 培养液,换无血清培养液培育 1 d;吸出无血清培养液,按不同实验条件换液,做好标记。正常和缺氧条件下分别分组。空白对照组:无血清 DMEM 培养液;高糖组:50 mmol/L 高浓度葡萄糖 DMEM 培养液;4 μmol/(min · L) 胰岛素组;4 μmol/(min · L) 胰岛素 DMEM 培养液;高糖高胰岛素组:50 mmol/L 葡萄糖 + 4 μmol/(min · L) 胰岛素 DMEM 培养液。各组换液后在缺氧或正常条件下继续培养 1、2、3 d。

1.2.5 VEGF 免疫细胞化学染色 在 24 孔培养板中预置盖玻片,待传代细胞生长接近融合时取出,用 D-Hank 液清洗,4% 多聚甲醛固定 20 min,0.3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶 20 min,正常山羊血清封闭 20 min,加兔抗人 VEGF(稀释度 1:100),阴性对照组加 PBS(0.01 mol/L, pH 7.2),4℃ 保湿过夜,PBS 洗脱,分别加生物素标记羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记卵白素,DAB 显色,以胞浆内出现棕黄色的丝网状结构为阳性。结果判定:每张切片任选 5 个视野进行分析,每个视野选定阳性细胞范围,测定灰度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行统计学处理。计量资料所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同条件下 Müller 细胞中 VEGF 表达的总体比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜 Müller 细胞的鉴定

苏木精-伊红染色见胞体呈长椭圆形,胞浆丰富;胞核位于胞体中央,椭圆形,染色淡,2 个或 2 个以上核仁(图 1)。GFAP 免疫细胞化学染色法鉴定原代培养细胞,80% 以上为阳性细胞,表现为胞浆内出现棕黄

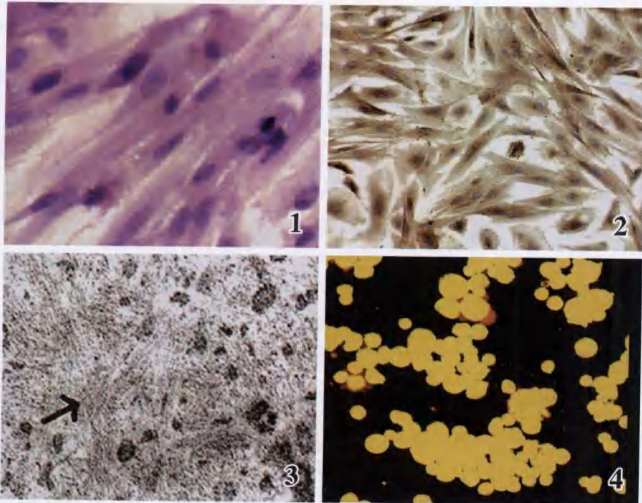


图 1 Müller 细胞苏木精 - 伊红染色 (×400) 图 2 培养的 Müller 细胞 GFAP 免疫细胞化学染色阳性 (×400) 图 3 培养的 Müller 细胞在透射电镜下可见 8~10 nm 特征性中间丝 (×2500) 图 4 正常对照组 Müller 细胞 AO/EB 染色 (×40)

Fig. 1 HE staining of cultured Müller cells (×400) Fig. 2 Müller cells show Brown-yellow meshy structure in the cytoplasm by GFAP staining (×400) Fig. 3 Müller cells present 8-10 nm intracellular filaments under the transmission electron microscope (×2500) Fig. 4 Majority of Müller cells show the normal yellow staining by AO/EB staining in normal control group (×40)

色的丝网状结构,传代后细胞(P₁和 P₂)与原代细胞具有相似的细胞形态,5~7 d 细胞融合,GFAP 鉴定为 95% 以上阳性细胞(图 2)。透射电镜可见,视网膜 Müller 细胞核大、不规则,2 个或 2 个以上核仁,胞质丰富,内含糖原颗粒,可见粗面内质网、滑面内质网、线粒体、高尔基复合体、游离核糖体和微丝等细胞器,胞质中可见特征性的 8~10 nm 的中间丝(图 3)。

2.2 AO/EB 染色检测 Müller 细胞在缺氧条件下细胞凋亡情况

AO/EB 染色后在荧光显微镜下观察各组培养细胞的形态(图 4~6)。结果显示:正常对照组 AO/EB 染色,大部分细胞形态结构正常,呈黄色荧光;缺氧 1 d,细胞形态结构发生变化,并且

核染色质出现橘红色荧光,提示出现早期凋亡细胞;随着缺氧时间的延长,凋亡细胞逐渐增多。在缺氧 1 d 及 2 d,细胞凋亡率分别为 12% 和 16%,表明缺氧 2 d 内凋亡细胞增加不明显;缺氧 3 d 凋亡细胞达到 20%,缺氧 4 d 后活细胞变少,大部分为凋亡细胞和坏死细胞。说明缺氧超过 4 d 后细胞凋亡明显。

2.3 免疫细胞化学染色法检测各组 Müller 细胞 VEGF 的表达情况

免疫细胞化学染色结果显示,缺氧 1、2、3 d 的高糖组、高浓度胰岛素组、高糖高浓度胰岛素组分别与同一缺氧时间对照组比较 VEGF 表达增多,差异均有统计学意义($P < 0.05$),缺氧条件 1 d 时高糖组、高浓度胰岛素组、高糖高浓度胰岛素组分别与正常条件下 1 d 时各组比较 VEGF 表达差异均无统计学意义($P > 0.05$),缺氧 2 d 及 3 d 的高糖组、高浓度胰岛素组、高糖高浓度胰岛素组分别与正常条件相同培养时间的各组比较 VEGF 表达增多,差异均有统计学意义($P < 0.05$)(图 7~9,表 1)。

3 讨论

新生血管的形成与视网膜局部组织缺血、缺氧、高血糖关系密切。视网膜组织在缺血缺氧损伤时产生一

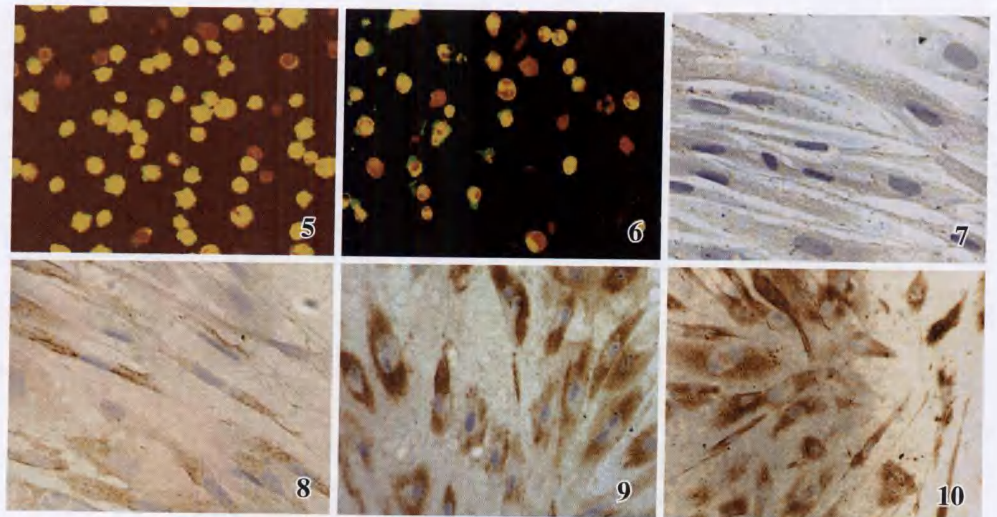


图 5 缺氧 1 d 组 Müller 细胞 AO/EB 染色 (×400) 图 6 缺氧 3 d 组 Müller 细胞 AO/EB 染色 (×400) 图 7 Müller 细胞 VEGF 免疫化学染色的阴性对照 (×400) 图 8 正常条件 1 d 高糖组 Müller 细胞 VEGF 免疫组织化学染色 (×400) 图 9 缺氧 2 d 高糖组 Müller 细胞 VEGF 免疫组织化学染色 (×400) 图 10 缺氧 3 d 高糖组 Müller 细胞 VEGF 免疫组织化学染色 (×400)

Fig. 5 The apoptotic Müller cells show the red staining for AO/EB in hypoxia for 1 day group (×400) Fig. 6 There are more red stained cells in hypoxia environment for 3 days group than control group (×400) Fig. 7 Immunocytochemical staining of VEGF in Müller cells in negative control group (×400) Fig. 8 VEGF shows weak positive expression in cytoplasm of Müller cells cultured at high glucose environment for 1 day (×400) Fig. 9 VEGF shows strong positive expression in cytoplasm of Müller cell cultured at hypoxia and high glucose for 2 days (×400) Fig. 10 VEGF shows strong positive expression in cytoplasm in hypoxia and high glucose for 3 days (×400)

表 1 Müller 细胞 VEGF 免疫细胞化学染色结果 (IOD 值) ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The results of VEGF immunocytochemistry on cultured Müller cells (IOD value) ($\bar{x} \pm s$)

Group	VEGF expression in different time		
	1 d	2 d	3 d
Normal control	20 826.97 ± 7 551.49	15 055.73 ± 4 445.96	20 185.35 ± 11 795.53
Normoxia high glucose	37 283.18 ± 14 640.77 ^c	34 202.07 ± 12 933.13 ^c	26 890.44 ± 11 004.92
Normoxia high insulin	35 073.38 ± 14 073.99 ^b	31 595.05 ± 10 659.26 ^c	39 951.52 ± 15 139.67 ^c
Normoxia high glucose + high insulin	37 475.29 ± 17 106.79 ^c	30 980.73 ± 7 948.11 ^c	24 053.53 ± 8 682.493
Hypoxic control	13 446.79 ± 16 087.68	20 131.62 ± 19 729.75	28 351.54 ± 16 562.75
Hypoxic high glucose	30 650.31 ± 17 022.77 ^b	56 848.60 ± 27 436.59 ^{ef}	104 622.90 ± 67 234.48 ^{ce}
Hypoxic high insulin	29 196.83 ± 9 943.65 ^b	43 444.29 ± 12 014.83 ^{ce}	105 949.30 ± 99 518.57 ^{ce}
Hypoxic high glucose + high insulin	32 954.43 ± 14 694.24 ^c	46 342.97 ± 16 106.08 ^{ef}	83 364.02 ± 23 798.28 ^{ef}
F	5.479	9.306	5.185
P	0.002	0.000	0.003

^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs respective normal control group; ^e $P < 0.05$,

^f $P < 0.01$ vs respective normoxia group

系列代偿性和适应性的变化,目前研究已经证明 DR 时 Müller 细胞分泌 VEGF 增多^[8],因此我们可以通过研究刺激 Müller 细胞 VEGF 分泌增多的因素寻找控制 DR 新生血管形成的有效途径。本实验中缺氧可以使体外培养的视网膜 Müller 细胞 VEGF 表达增加,而且随着缺氧时间延长,VEGF 表达增加更明显,这可能与缺血性视网膜病变的新生血管生成密切相关。朱向红等^[9]曾采用不同浓度的 CoCl_2 作为缺氧诱导剂作用于 Müller 细胞,虽也证实缺氧能诱导 VEGF mRNA 蛋白的表达,但是缺氧程度不易控制,而且 CoCl_2 本身对细胞的毒性也不容忽视。本研究采用三气培养箱,可直接调整到合适的氧气浓度,不仅方便,而且稳定,对细胞影响小,有恒定的温度和湿度,利于细胞生长,减少了实验误差。采用 AO/EB 染色检测 Müller 细胞在缺氧条件下的细胞凋亡情况,第 4 d 凋亡细胞明显比第 3 d 增多,活细胞数量减少,细胞形态发生改变。我们选择缺氧 3 d 以内的细胞进行研究,排除了缺氧时间过长造成的细胞凋亡对实验结果的影响。

Sone 等^[10]发现 VEGF 可以通过蛋白激酶 C 途径刺激葡萄糖转运载体由细胞质移位到细胞膜,增加葡萄糖的转运,导致细胞内葡萄糖水平增高,从而进一步刺激 Müller 细胞分泌 VEGF 的增多,促进血管新生。也有学者认为高糖可以造成视网膜血管周细胞凋亡,血管壁功能下降,转化生长因子对内皮细胞的抑制作用丧失,导致内皮细胞的大量增生,促进血管新生^[11-12]。目前对胰岛素促进 DR 新生血管形成的研究较少,Berweck 等^[13]认为胰岛素有可能通过激活视网膜周细胞的 K^+ 通道,使膜出现去极化,引起周细胞

收缩,减少血流,导致视网膜缺血、缺氧,并使毛细血管通透性增强,刺激 VEGF 分泌,促进 DR 进展。胰岛素还可刺激微血管内皮细胞 DNA 的合成,加速内皮细胞增生,促进血管芽的形成,导致血管新生^[14]。本实验中当缺氧与高糖或高浓度胰岛素条件同时存在时,视网膜 Müller 细胞较单一影响因素下 VEGF 表达量显著增加,而且随着时间延长 VEGF 表达急剧增加。说明高糖和高胰岛素以及缺氧是诱发新生血管生成的重要因素,它们的共同作用很可能促使 DR 迅速进展。

了解影响刺激视网膜 Müller 细胞分泌 VEGF 增多的主要因素,我们就可以积极改善视网膜缺氧状态,控制糖尿病患者血糖,同时合理使用胰岛素。但目前这些影响因素刺激 VEGF 表达的具体机制尚不清楚。

参考文献

- 1 杨钧,主编.现代眼科手册[M].第2版.北京:人民卫生出版社,1997:597
- 2 Forrester JV,Shafiq A,Schroder S, et al. The role of growth factors in proliferative diabetic retinopathy[J]. Eye,1993,7:276-287
- 3 Miller JW, Adamis AP, Shima DT, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model[J]. Am J Pathol,1994,145(3):574-584
- 4 Skopinski P,Duda Krol B,Lip inska A, et al. Angiogenic activity and VEGF level in sera of diabetic patients with nonproliferative retinopathy[J]. Klin Oczna,2004,106(1):421-423
- 5 王越晖,王心蕊,朱向红,等.高糖高胰岛素对视网膜 Müller 细胞血管内皮生长因子表达的影响[J].中华糖尿病杂志,2004,12(4):277-280
- 6 徐积兄,周欣,刘建英.胰岛素抵抗与 2 型糖尿病增生型视网膜病变的相关性研究[J].中华眼底病杂志,2006,22(1):50-51
- 7 王越晖,宋鄂,冷瀛,等.兔视网膜 Müller 细胞原代培养[J].吉林大学学报(医学版),2003,29(3):367-369
- 8 Song E,Dong Y,Han LN, et al. Diabetic retinopathy: VEGF, bFGF and retinal vascular pathology[J]. Chin Med J(Engl),2004,117(2):247-251
- 9 朱向红,王越晖,王心蕊.高糖和缺氧对体外培养视网膜 Müller 细胞 VEGF 表达的影响[J].吉林大学学报,2003,29(2):131-134
- 10 Sone H,Deo BK,Kumagai AK. Enhancement of glucose transport by vascular endothelial growth factor in retinal endothelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2000,41(7):1876-1884
- 11 Li W,Yanoff M,Liu X, et al. Retinal capillary pericyte apoptosis in early human diabetic retinopathy[J]. Chin Med J(Engl),1997,110(9):659-663
- 12 张承芬.糖尿病视网膜病变的临床与发病机制的研究进展[J].中国实用眼科杂志,1998,16(4):198-201
- 13 Berweck S,Thieme H,Lepple-Wienhues A, et al. Insulin-induced hyperpolarization in retinal capillary pericytes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,1993,34:3402-3407
- 14 Smith LE,Shen W,Perruzzi C, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor dependent retinal neovascularization by insulin like growth factor-1 receptor[J]. Nat Med,1999,5:1390-1395

(收稿:2008-09-29 修回:2008-10-27)

(本文编辑:胡纯钢 刘艳)