

金雀异黄素衍生物对糖基化终产物损伤猴视网膜血管内皮细胞的保护作用

夏旭光 汪 佶 尹 峥

Protective effects of 7-difluoromethyl-5, 4'-dimethoxy genistein on AGEs-induced impairment of monkey retinal endothelial cell

Xia Xuguang, Wang Ji, Yin Zheng. Department of Ophthalmology, Nanhua Hospital of Nanhua University, Hengyang 421002, China

Abstract Objective Advanced glycation end products (AGEs) can promote cellular apoptosis and inhibit the cellular regeneration. 7-difluoromethyl-5, 4'-dimethoxy genistein (dFMGEN) has been determined to have a protective effect on the oxygen stress-induced injury of human umbilical vein endothelial cells. This study aimed to explore the protective effect of dFMGEN on AGE-induced impairment of monkey endothelial cells. **Methods** The choroidal and retinal vascular endothelial cells of monkey (RF/6A strain) were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% fetal bovine serum. 20, 40, 80, 160 and 320 mmol/L of AGE-BSA was added into 96-well culture plate to create the AGEs-induced injury model, and then 1, 3, 10, 30 and 100 μmol/L dFMGEN were used in medium to assess the effects of dFMGEN on the cells. The inhibitory rates of AGE-BSA to the RF/6A cells was evaluated by detecting the optical absorbance value of the cells. The effects of dFMGEN to AGEs-induced injury model was assessed by MTT assay. The apoptosis rate of the cells was detected by LDH assay flow cytometry. **Results** The A_{570} of the different concentrations of dFMGEN was obviously reduced in AGE-BSA model compared with normal cultured RF/6A cells. The inhibitory rate of AGE-BSA to cultured RF/6A cells was significantly enhanced from 80 mmol/L through 320 mmol/L AGE groups at a concentration-dependent manner in 48 hours after addition of AGEs. However, the inhibitory rate of cellular proliferation was gradually decreased in different concentrations of dFMGEN groups compared with AGE groups ($P < 0.05$). The cellular apoptosis rate showed the same tendency in dFMGEN group. The 100 μmol/L dFMGEN presented the better protective effectiveness on the injured cells. **Conclusion** AGEs over 80 mmol/L can result in the injury of RF/6A. dFMGEN can offer the protection to AGEs-induced impairment of monkey endothelial cells.

Key words genistein; 7-difluoromethyl-5, 4'-dimethoxy genistein; advanced glycation end products; retina; vascular endothelial cell

摘要 目的 研究 7-二氟亚甲基-5, 4'-二甲烷氧基异黄酮 (dFMGEN) 对糖基化终产物损伤的猴视网膜血管内皮细胞的影响。**方法** 制备 RF/6A 细胞糖基化终产物损伤模型, 用不同浓度的 dFMGEN (1, 3, 10, 30, 100 μmol/L) 进行干预, MTT 法观察 dFMGEN 对细胞生长增生的影响, 流式细胞术检测 dFMGEN 对细胞凋亡的影响。**结果** 糖基化终产物孵育 RF/6A 细胞 48 h, 可明显抑制细胞生长, 促进凋亡; dFMGEN 与糖基化终产物共同孵育 RF/6A 细胞 48 h, 能有效降低增生抑制率, 减少凋亡, 并呈浓度依赖性。100 μmol/L dFMGEN 比相同浓度的先导化合物金雀异黄素 (GEN) 和阳性药物 Vit B1 作用更强。**结论** dFMGEN 对糖基化终产物引起的视网膜血管内皮细胞的损伤具有保护作用。

关键词 金雀异黄素; 7-二氟亚甲基-5, 4'-二甲烷氧基异黄酮; 糖基化终产物; 视网膜; 血管内皮细胞

分类号 R 774.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808 (2009)04-0312-04

维持正常血 - 视网膜屏障功能的内皮细胞在糖尿

病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 的早期即可发生凋亡损伤, 进而导致一系列视网膜循环异常^[1]。其机制尚未完全清楚, 但近年的研究发现, 慢性高血糖所致机体蛋白质非酶糖基化终产物 (advanced glycation

本课题为湖南省教育厅基金项目资助 (08C738)

作者单位: 421002 衡阳, 南华大学附属南华医院眼科

通讯作者: 汪佶 (Email: sallyjoya135@yahoo.com.cn)

end products, AGEs) 的生成和堆积能促进血管内皮细胞凋亡并减少再生^[2-3]。金雀异黄素 (genistein, GEN) 是一种取自豆类植物的活性成分, 具有血管内皮细胞保护作用 and 拮抗其凋亡的活性^[4]。但其水溶性和脂溶性均很差, 生物利用度低^[5-6]。但对 GEN 进行化学改造, 引入二氟亚甲基和二甲烷氧基异黄酮合成的衍生物 7-二氟亚甲基-5, 4'-二甲烷氧基异黄酮 (7-difluoromethyl-5, 4'-dimethoxy genistein, dFMGEN) 可明显增加亲脂活性。Fu 等^[5]已证实 dFMGEN 对人脐静脉内皮细胞的氧化应激损伤具有保护作用。本文将研究新合成的 GEN 衍生物对外源性 AGEs 损伤体外培养视网膜血管内皮细胞的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 药物与试剂 dFMGEN 由湖南师范大学药理学系曹建国教授惠赠, 湖南大学分析检测中心鉴定, 分子式为 $C_{18}H_{14}O_5F_2$, 相对分子质量为 348, 98% 纯度, 淡黄色结晶状粉末。RPMI-1640 培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (天津灏洋生物有限公司); 胰蛋白酶 (上海碧云天生物技术研究所); Genistein、MTT (美国 Sigma 公司)。

1.1.2 细胞培养 猴脉络膜视网膜血管内皮细胞 (RF/6A) 株购自中国科学院上海生命科学研究所以含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基于 5% CO_2 的混合气体、95% 饱和湿度的培养箱里 37 °C 培养, 取对数生长期细胞用于实验。

1.1.3 糖基化终产物 - 牛血清白蛋白 (advanced glycation end products-bovine serum albumin, AGE-BSA) 的制备 参照文献 [7] 的方法制备外源性 AGEs。

1.2 实验方法

1.2.1 建立 AGEs 损伤模型 取对数生长期细胞, 以 1.5×10^4 /孔的密度每孔 180 μ L 接种于 96 孔培养板中培养 6 h, 待细胞贴壁后分组, 每组复设 6 个孔。(1) 正常对照组; (2) AGE-BSA 组: 分别加入 20、40、80、160、320 mmol/L 的 AGE-BSA, 使每孔终体积为 200 μ L。处理 48 h 后, 加入 5 g/L 的 MTT, 每孔 20 μ L, 继续培养 4 h, 吸去培养基, 加入 DMSO, 每孔 100 μ L, 震荡 10 min 使紫蓝色沉淀充分溶解; 用酶标仪 (ELX-800 型) 570 nm 测吸光度值 (A 值)。按 $IR = (1 - \text{用药组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}) \times 100\%$, 计算细胞增生抑制率, 并按寇氏改良孙氏综合算法计算半数有效抑制浓度 (IC_{50})。

1.2.2 MTT 法 细胞接种于 96 孔板, 分为 6 个组, 每

组复设 6 个孔。(1) 正常对照组; (2) 100 mmol/L AGE-BSA 损伤组; (3) dFMGEN 组, 浓度分别为 1、3、10、30、100 μ mol/L; (4) 100 μ mol/L GEN 组; (5) 阳性对照 100 μ mol/L 维生素 B_1 组; (6) 0.1% DMSO 组。其中 (3) ~ (5) 组在细胞接种培养 6 h 后加入上述化合物, 之后 30 min 再分别加入 100 mmol/L AGE-BSA, 按 1.2.1 的方法计算细胞增生抑制率。

1.2.3 流式细胞术分析细胞凋亡 用含 1% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养 RF/6A 细胞 24 h, 使细胞周期同步化, 按 1.2.2 的分组方法分别处理 48 h 后, 收集细胞, 用 PBS 吹打细胞成单细胞悬液, 800 r/min 离心 7 min, 冷 PBS 洗 2 遍, 用 70% 乙醇 4 °C 固定 24 h 后, 经碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色, 用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计学软件进行统计学分析。各组实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组测量数据用 Levene 检验表明方差齐。不同浓度的 AGE 组和 dFMGEN 干预组的 RF/6A 细胞的 A 值和平均细胞凋亡率比较采用单因素方差分析, 各浓度 AGE 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 AGE-BSA 对 RF/6A 细胞增生活性的影响

随着 AGE-BSA 浓度的增加, AGE-BSA 组 A_{570} 值明显降低。对照组为 0.845 ± 0.034 , AGE-BSA 组分别为 0.785 ± 0.046 、 0.672 ± 0.031 、 0.429 ± 0.060 、 0.263 ± 0.057 、 0.152 ± 0.033 。20 mmol/L 和 40 mmol/L AGE-BSA 对 RF/6A 细胞增生抑制率分别为 7% 和 20.4%, 与对照组相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。80、160、320 mmol/L 组的抑制率则分别为 49.2%、68.8%、82.0%, 呈剂量依赖性。 IC_{50} 值为 100 mmol/L, AGE-BSA 浓度过高, 则会导致细胞过度损伤。本研究选取 100 mmol/L 的 AGE-BSA 建立损伤模型 (图 1)。

2.2 dFMGEN 对 RF/6A 细胞增生活性的影响

10、30、100 μ mol/L dFMGEN 组的 A_{570} 值为 0.552 ± 0.017 、 0.628 ± 0.028 、 0.763 ± 0.027 , 对应的增生抑制率分别是 36.86%、28.16%、12.65%, 与 100 mmol/L AGE-BSA 的 50.92% (A_{570} 值为 0.429 ± 0.019) 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。100 μ mol/L dFMGEN 组的增生抑制率 12.65% 较 100 μ mol/L GEN 组的 23.52% (A_{570} 值为 0.668 ± 0.010) 低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2)。

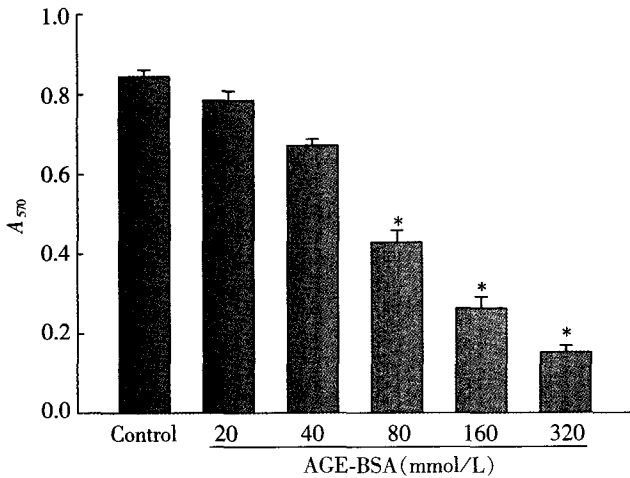


图1 AGE-BSA 抑制猴视网膜 RF/6A 细胞的增殖活性 (A_{570} 值) $F = 116.39, P = 0.002$; 与空白组比较 $* P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

Fig.1 AGE-BSA inhibits the regeneration of RF/6A cells (A_{570}) $F = 116.39, P = 0.002$; $* P < 0.05$ vs control group (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

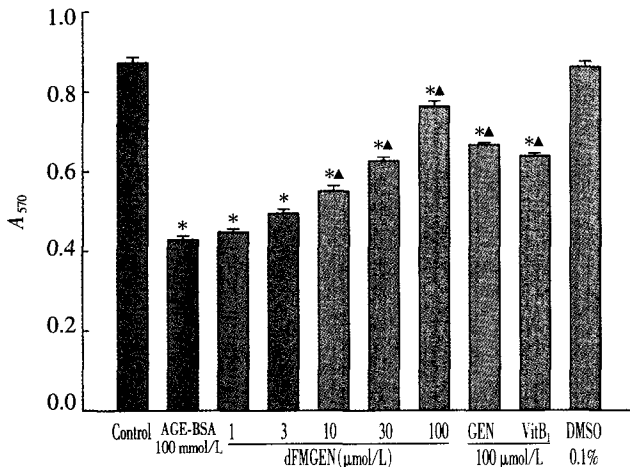


图2 MTT 法测定 dFMGEN 对 RF/6A 细胞增殖活性的影响 $F = 218.71, P = 0.003$; 与空白对照组比较 $* P < 0.05$, 与 AGEs 组比较 $\blacktriangle P < 0.05$, 空白对照组与溶媒组比较 $P > 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

Fig.2 Proreective effects of dFMGEN on the regeneration of RF/6A cells by MTT assay $F = 218.71, P = 0.003$; $* P < 0.05$ vs control group, $\blacktriangle P < 0.05$ vs AGEs group, control group vs DMSO group; $P > 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

2.3 流式细胞术分析 dFMGEN 对 RF/6A 细胞增殖活性的影响

PI 染色流式细胞术分析结果表明,细胞凋亡率随 dFMGEN 浓度的升高而降低。10、30、100 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 的凋亡率分别为 $(30.16 \pm 2.24)\%$ 、 $(22.10 \pm 2.19)\%$ 、 $(12.23 \pm 0.89)\%$, 与 100 mmol/L AGE-BSA 的 45.2% 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

100 $\mu\text{mol/L}$ dFMGEN 的凋亡率仅为 12.23%, 明显低于 GEN 组及 VitB₁ 组 (18.59%, 19.30%) (图 3)。

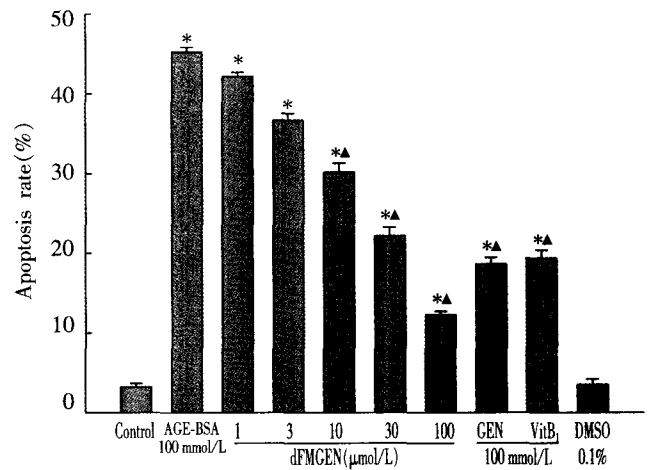


图3 流式细胞术分析 dFMGEN 作用 RF/6A 细胞 48 h 凋亡率 $F = 343.32, P = 0.006$; 与空白对照组比较 $* P < 0.05$, 与 AGEs 组比较 $\blacktriangle P < 0.05$, 空白对照组与溶媒组比较 $P > 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

Fig.3 The effects of dFMGEN on the apoptosis rate of RF/6A cells by flow cytometry $F = 343.32, P = 0.006$; $* P < 0.05$ vs control group, $\blacktriangle P < 0.05$ vs AGEs group, control group vs DMSO group; $P > 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

3 讨论

研究表明, GEN 作为酪氨酸蛋白激酶阻滞剂, 能发挥雌激素样效应^[8], 具有抗氧化、抑制炎症因子表达、刺激 NO 生成等血管保护作用^[9-10]。在 DR 血管病变中, AGEs 的累积能通过降低血管内皮细胞释放 NO 的活性、促进氧自由基的形成及发挥直接毒性作用等破坏血-视网膜屏障, 从而导致微血管瘤、出血、渗出、新生血管等一系列病理改变^[11-12]。Nakjima 等^[10]在给实验性糖尿病大鼠长期喂食 GEN 后发现, GEN 可以有效减少 DR 中的视网膜血管渗透性。刘学政等^[13]利用 AGE-BSA 诱导牛视网膜微血管内皮细胞内吞模型发现 GEN 可以抑制其内吞行为, 证实 GEN 在 DR 中起微血管内皮细胞保护及血-视网膜屏障渗漏防治作用。

选择性地将亲脂基团引入 GEN, 还能使其化学性质、物理性质和生物活性得到进一步改善^[14]。本研究以猴视网膜血管内皮细胞 RF/6A 为实验对象, 利用 AGE-BSA 诱导建立细胞糖尿病损伤模型, 探讨金雀异黄酮衍生物 dFMGEN 对糖基化终末产物损伤的内皮细胞的保护作用。MTT 法中, A_{570} 值可以间接反映活细胞数量, 一定细胞数范围内, A_{570} 值越小, 说明细胞被

抑制的越明显。其结果表明在 AGE-BSA 环境下, dFMGEN 较 GEN 有更强的减轻细胞增生抑制的作用。流式细胞术测定细胞凋亡率的结果显示, 与正常培养基相比, 用 AGE-BSA 培养的 RF/6A 细胞易发生损伤, 生长增生受到抑制, 程度随其浓度的提高而增加。dFMGEN 则可有效地降低 AGE-BSA 造成的细胞增生抑制, 减少凋亡, 并呈浓度依赖性。其中 100 $\mu\text{mol/L}$ 的凋亡率明显较相同浓度的 GEN 和阳性药物 VitB₁ 的低, 提示 dFMGEN 具有保护内皮细胞的作用, 并且强于 GEN 和 VitB₁。

综上所述, 本研究证实以 GEN 为母体获得的衍生物, 较 GEN 具有更强的拮抗 AGEs 对内皮细胞的损伤作用, 可达到保护微血管内皮细胞的活性作用。目前 DR 防治的原则主要是控制血糖, 在此基础上, 结合使用保护和改善微血管功能的药物是必要的辅助治疗手段^[15]。因此, dFMGEN 是一种具有广阔开发前景的 DR 治疗新型候选药物, 但其相关作用机制还有待深入研究。

参考文献

- 任彦新, 卫玉彩. 糖尿病视网膜病变发病机制和治疗的研究进展[J]. 临床荟萃, 2006, 21(17): 1285 - 1287
- Wautier JL, Guillausseau PJ. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy[J]. Diab Metabol, 2001, 27(5): 535 - 542
- Singh R, Barden A, Mori T, et al. Advanced glycation end products: a review[J]. Diabetologia, 2001, 44: 129 - 146
- Tuo QH, Wang C, Yan FX, et al. MAPK pathway mediates the protective effects of onychin on oxidative stress-induced apoptosis in ECV304 endothelial cells[J]. Life Sci, 2004, 76(5): 487 - 497
- Fu XH, Wang L, Zhao H, et al. Synthesis of genistein derivatives and determination on their protective effects against vascular endothelial cell damages caused by hydrogen peroxide[J]. Bioorgan Med Chem Lett, 2008, 18: 513 - 517
- Kroom PA, Clifford MN, Crozier A. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro[J]. Am J Clin Nutr, 2004, 80: 15 - 21
- 周桂华, 李才, 苗春生. 糖基化终产物诱导肾系膜细胞 CTGFmRNA 表达的规律[J]. 吉林大学学报, 2004, 30(5): 690 - 692
- Palkowski K, Mazurek AP. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data[J]. Acta Pol Pharm, 2000, 57: 135 - 155
- Chang YC, Nair MG, Nitiss JL. Metabolites of daidzein and genistein and their biological activities[J]. J Nat Prod, 1995, 58: 1901 - 1903
- Nakajima M, Cooney MJ, Tu AH, et al. Normalization of retinal vascular permeability in experimental diabetes with genistein[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42: 2110 - 2114
- Yokoi M, Yamagishi S, Takeuchi M, et al. Elevations of AGE and vascular 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
- Huebschmann G, Regensteiner JG, Helen V, et al. Diabetes and advanced glycoxidation end products[J]. Diabet Care, 2006, 29: 1420 - 1432
- 刘学政, 伍刚, 王大江, 等. Genistein 影响 AGE-BSA 诱导牛视网膜微血管内皮细胞内吞的实验研究[J]. 锦州医学院学报, 2003, 24(6): 4 - 8
- O'Hagan D, Schaffrath C, Cobb SL, et al. Biochemistry: biosynthesis of an organofluorine molecule[J]. Nature, 2002, 416(6878): 279
- Yam CS, Kwok KH. Update on the treatment of diabetic retinopathy[J]. Hong Kong Med J, 2007, 13: 46 - 60

(收稿: 2008-10-29 修回: 2009-02-26)

(本文编辑: 王莉红)

消息

2009 年第十一届全国视觉生理大会征文(第二轮)

由中华医学会眼科学分会视觉生理学组主办的第十一届全国视觉生理大会将于 2009 年 7 月 3 日~6 日在祖国的东方明珠上海市召开, 同期举行临床视觉电生理学习班。本次会议将邀请国内外知名的视觉生理和相关眼科领域专家就视觉生理基础和临床的最新进展、视觉生理检测技术的临床应用、眼科相关新技术、神经生理、疑难病例等作相关专题讲座和讨论, 欢迎全国眼科医师及同道踊跃投稿并参会。会议征文信息如下。

- 征文要求: 未在国内杂志或全国性眼科学术会议发表的论文, 提供 800 字以内摘要一份, 包括目的、方法、结果、结论及关键词, 采用 4 号宋体字。请写明文章题目、作者姓名、作者单位、详细地址、邮政编码、联系电话以及 E-mail 地址。
- 投稿方式: 网上投稿至: ruijinyk@yahoo.com.cn, 邮寄稿件寄至: 上海市瑞金二路瑞金医院眼科张士胜收, 邮政编码: 200025; 来稿请分别在主题栏或信封上注明“会议征文”字样。
- 截稿日期: 2009 年 5 月 31 日(以邮戳为准)截止, 过期恕不受理。请自留底稿, 恕不退稿。
- 大会会务: 联系人: 李翠萍, 电话: 021-64370045/601133; 传真: 021-64374104; Email: epli@rjeye.com
- 本次会议录用的论文将收入大会论文汇编。优秀论文推荐在《中华眼底病杂志》或《眼科研究》发表。会议将授予国家级 I 类继续教育学分。大会将评选出优秀论文, 获一等奖者将由高视远望公司资助参加 2010 年 ISCEV 或 ARVO。