

根皮苷对糖基化低密度脂蛋白诱导大鼠视网膜微血管内皮细胞表达乳脂肪球表皮生长因子 8 的影响

张世阳^a, 徐修才^b, 焦莉莉^a, 顾永昊^c, 谈敏^a

(安徽医科大学附属省立医院, a 老年医学科, b 中心实验室, c 眼科, 合肥 230001)

[摘要] **目的** 研究根皮苷(PHL)对糖基化低密度脂蛋白(gly-LDL)诱导大鼠视网膜微血管内皮细胞(RMVEC)表达乳脂肪球表皮生长因子 8(MFG-E8)的影响,探讨 PHL 治疗糖尿病视网膜病变(DR)的作用及其机制。**方法** 体外培养大鼠 RMVEC,分别进行不同浓度的 gly-LDL 与联合 PHL + gly-LDL 的处理。采用 TUNEL 方法观察不同处理条件下大鼠 RMVEC 的细胞凋亡。利用蛋白质免疫印迹方法(Western blotting)检测大鼠 RMVEC 表达 MFG-E8 的变化。**结果** 与对照组相比, gly-LDL 诱导大鼠 RMVEC 发生明显的细胞凋亡形态学变化,凋亡细胞的比例显著增多达到 36.52% ($P < 0.01$),预先经 PHL (800 $\mu\text{mol/L}$) 孵育后,细胞凋亡明显减少至 20.45% ($P < 0.01$);与对照组(蛋白表达灰度值 0.290 ± 0.008) 比较, gly-LDL 诱导组蛋白 MFG-E8 表达明显降低,并呈现浓度依赖性(蛋白表达灰度值分别为 0.215 ± 0.009 、 0.165 ± 0.002 、 0.117 ± 0.014 与 0.092 ± 0.004 , $P < 0.01$);经 PHL 预处理后, gly-LDL 诱导的 MFG-E8 表达明显升高,伴随 PHL 给药浓度的增加, MFG-E8 的表达逐渐上调,差异有统计学意义(蛋白表达灰度值分别为 0.343 ± 0.008 、 0.373 ± 0.002 与 0.404 ± 0.006 , $P < 0.01$)。**结论** PHL 可能通过显著改善蛋白 MFG-E8 的表达,从而抑制 gly-LDL 诱导的大鼠 RMVEC 的细胞凋亡,实现对 DR 的保护作用。

[关键词] 糖尿病视网膜病变;根皮苷;脂蛋白类, LDL;表皮生长因子;大鼠, Sprague-Dawley

中图分类号: R587.26 文献标识码: A DOI: 10.3969/J.issn.1672-6790.2017.04.029

Effects of phlorizin on the expression of MFG-E8 in rats retinal microvascular endothelial cells in response to glycated low density lipoproteins Zhang Shiyang*, Xu Xiucui, Jiao Lili, Gu Yonghao, Tan Min (* Department of Geriatrics, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, China)

Corresponding author: Xu Xiucui, Email: xuxiucui1972@163.com

[Abstract] **Objective** To study the effects of phlorizin on the expression of MFG-E8 in rats retinal microvascular endothelial cells (RMVEC) in response to glycated low density lipoproteins (gly-LDL). **Methods** The primary RMVEC in rats were cultured and identified in vitro. The apoptosis of RMVEC induced gly-LDL was estimated using TUNEL. The expressions of MFG-E8 in RMVEC in the absence or presence of phlorizin were determined by Western blotting. **Results** Gly-LDL caused an obvious apoptosis of RMVEC compared with the control group (36.52% VS. 1.24%, $P < 0.01$), while pretreatment with phlorizin attenuated gly-LDL mediated cells apoptosis significantly (20.45% VS. 36.52%, $P < 0.01$). Moreover, stimulation of RMVEC with different concentrations of gly-LDL (0, 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 $\mu\text{g/mL}$) resulted in a significant decrease in the expression of MFG-E8 ($P < 0.01$), while the pretreatment of RMVEC with different concentrations of phlorizin (200, 400, 800 $\mu\text{mol/L}$) significantly restored the gly-LDL induced decreased MFG-E8 levels in a dose dependent manner for 48h ($P < 0.01$). **Conclusions** Phlorizin could inhibit RMVEC apoptosis in response to gly-LDL, possibly by the up-regulation of the protein MFG-E8 expression.

[Key words] Diabetic retinopathy; Phlorhizin; Lipoproteins, LDL; Epidermal growth factor; Rats, sprague-dawley

基金项目: 安徽省自然科学基金 (1408085MH208)

作者简介: 张世阳, 副主任医师, Email: shiyangzhang73@163.com

通信作者: 徐修才, 副主任技师, Email: xuxiucui1972@163.com

糖尿病视网膜病变(DR)是糖尿病最常见的微血管并发症之一,也是成年人群中视力损害与致盲的主要病因。DR的发病机制非常复杂,有研究认为,糖尿病环境中长期的高血糖以及脂质代谢异常导致低密度脂蛋白过度的糖基化,后者介导与促进血管内皮细胞的凋亡与内皮功能障碍是DR发生与发展的重要病理生理机制^[1-3]。乳脂肪球表皮生长因子8(MFG-E8)最初认为是小鼠乳腺上皮细胞表面分泌的一种外周蛋白,晚近的研究发现MFG-E8参与了细胞凋亡、细胞外基质重塑以及炎症介导等多种生物学功能^[4]。前期的蛋白质组学研究表明^[5],蛋白MFG-E8在db/db糖尿病小鼠视网膜组织表达明显下调,提示MFG-E8可能与DR密切相关。根皮苷(PHL)是一种来源于苹果类植物的天然药物,其治疗DR的作用已有多项基础研究结果证实^[6-7]。本实验研究PHL对于糖基化低密度脂蛋白(gly-LDL)诱导大鼠视网膜微血管内皮细胞(RMVEC)表达MFG-E8的影响,以探讨PHL治疗DR的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物、试剂与药品 雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠来源于常州卡文斯实验动物有限公司, RPMI1640、M199培养基来源于美国 Hyclone 公司、TUNEL 试剂盒购自瑞士 Biotool 公司、BCA 蛋白定量试剂盒购自江苏凯基公司、鼠 MFG-E8 抗体购自英国 Abcom 公司、兔抗大鼠因子Ⅷ多克隆抗体与兔抗大鼠 CD31 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, PHL 购自中国天津尖峰天然药物研究开发有限公司(批号:1005004-19,纯度98%)。

1.1.2 仪器 细胞培养箱(Thermo Scientific 8000)、倒置拍照显微镜(Leica DMI3000B)、电泳仪(Bio-Rad Mini Protean 3 Cell)、电转仪(大连竞迈 PS-9)与酶标仪(Thermo MK3)。

1.2 方法

1.2.1 体外分离、培养与鉴定大鼠 RMVEC 体外分离大鼠视网膜以及体外培养大鼠 RMVEC 方法同文献^[8],利用倒置显微镜观察原代 RMVEC 的细胞形态。

1.2.2 大鼠 RMVEC 的体外鉴定 将培养的 RMVEC 接种于放油载玻片的培养皿中,至细胞爬满载玻片 80% 时弃培养液,取出培养皿,加入 PBS 300 μ L 清洗 2 遍,加入 150 μ L 4% 多聚甲醛固定液,室

温固定 30 min。加入 150 μ L 0.1% Triton x-100,室温静置 15 min。再加入 300 μ L 的 PBS,静置 5 min。然后加入 200 μ L 5% BSA 封闭液,置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱 1 h。分别加入 50 μ L 兔抗大鼠 CD31 多克隆抗体(1:50 稀释)和兔抗大鼠因子Ⅷ多克隆抗体(1:50 稀释),4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。PBS 洗涤后滴加 FITC 标记的羊抗兔二抗(1:50 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBS 甘油封片后荧光显微镜下观察。RMVEC 纯度 = 免疫阳性细胞数/细胞总数。

1.2.3 gly-LDL 的制备 LDL 的糖基化制备方法参考文献^[9]。制备的 gly-LDL 分装 EP 管氮气密封 4 $^{\circ}$ C 避光保存。

1.2.4 细胞凋亡的检测 RPMI1640 完全培养基将 PHL 稀释为 800 μ mol/L,将 gly-LDL 稀释为 100 μ g/mL 进行实验。PHL 提前与 RMVEC 预先孵育 4 h,然后加入 gly-LDL 孵育 48 h。实验分 3 组:对照组、gly-LDL 组以及 gly-LDL 联合 PHL 组。TUNEL 操作参考 Biotool 试剂盒说明书,软件 ImageJ 计算各组 RMVEC 细胞凋亡率。

1.2.5 RMVEC 细胞表达蛋白 MFG-E8 的检测 分别进行两个阶段的独立实验检测不同处理条件下细胞蛋白 MFG-E8 的表达。实验分组一分为 5 组:空白对照组、gly-LDL 12.50、25.00、50.00 与 100.00 mg/L 四个药物浓度组。实验分组二分为 5 组:空白对照组(CK)以及 CK + gly-LDL、CK + gly-LDL + PHL 200 μ mol/L、CK + gly-LDL + PHL 400 μ mol/L 与 CK + gly-LDL + PHL 800 μ mol/L(实验分组二中各组 gly-LDL 浓度均为 100 mg/L)。按照 Western blotting 常规操作,包括各组细胞总蛋白提取浓度测定、SDS-PAGE 制备上样电泳、转膜、目标蛋白抗体孵育以及显色等标准流程检测各相应分组 RMVEC 细胞 MFG-E8 蛋白表达的变化。并利用各显色条带的灰度值进行半定量分析。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代大鼠 RMVEC 的形态学特征 原代培养的 RMVEC 在 24 h 细胞贴壁生长,形状为梭形、三角形或多角形。5 d 左右形成细胞集落。10 d 后细胞融合,呈现铺路石样生长,见图 1。

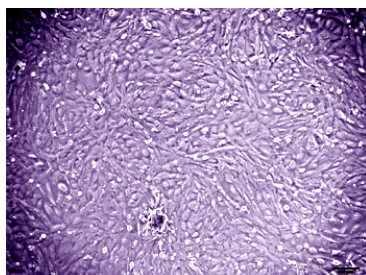


图 1 原代大鼠 RMVEC 的形态学特征 (×100)

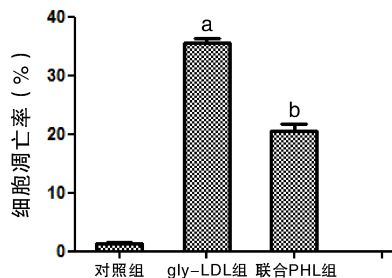
2.2 原代大鼠 RMVEC 的体外鉴定 免疫荧光细胞染色显示,因子Ⅷ免疫荧光染色,细胞核周围出现较强的黄绿色荧光反应。CD31 因子免疫荧光染色,细胞呈现特异性黄绿色荧光。大部分活细胞为免疫阳性细胞,纯度达到 90% 以上。见图 2。

2.3 gly-LDL 对大鼠 RMVEC 细胞凋亡的作用以及 PHL 的影响 对照组 RMVEC 细胞凋亡率为 1.24%, gly-LDL (100 mg/L) 诱导 48h 的 RMVEC 细胞凋亡率达到 36.52%, 经 χ^2 检验,差异有统计学意义 ($P < 0.01$), gly-LDL (100 mg/L) 诱导组的细胞凋亡率显著高于对照组。PHL (800 μ mmol/L) 预先孵育后 RMVEC 细胞凋亡率为 20.45%, 与 gly-LDL (100 mg/L) 诱导组细胞凋亡率比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$), PHL (800 μ mmol/L) 预先孵育 RMVEC 可显著降低细胞的凋亡。见图 3。

2.4 gly-LDL 对大鼠 RMVEC 细胞表达 MFG-E8 的影响 与对照组比较, gly-LDL 处理 48 h 可导致 RMVEC 细胞表达 MFG-E8 显著下调,随着 gly-LDL 浓度的增加, MFG-E8 的表达逐渐下调,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 4。

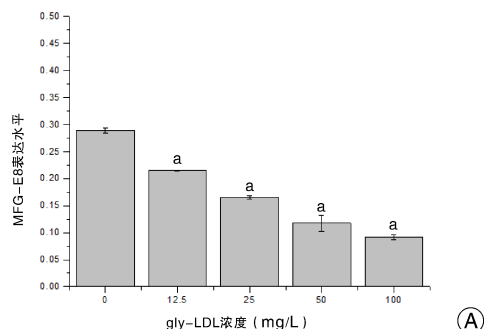
2.5 PHL 对大鼠 RMVEC 表达 MFG-E8 的影响 与对照组 (CC) 比较, gly-LDL 诱导明显下调 RMVEC 细胞的 MFG-E8 表达 ($P < 0.01$), PHL 预先孵育 48 h

可以显著上调 gly-LDL 诱导的 RMVEC 细胞 MFG-E8 表达,随着 PHL 给药浓度的增加, MFG-E8 的表达逐渐上调,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 5。

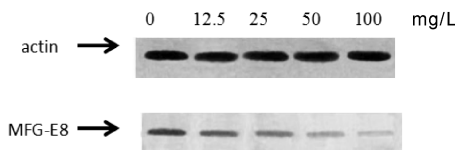


与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 gly-LDL 组比较, ^b $P < 0.01$

图 3 gly-LDL (100 mg/L) 对大鼠 RMVEC 细胞凋亡的作用以及 PHL (800 μ mmol/L) 的影响



与对照组比较, ^a $P < 0.01$



A: 柱状图; B: 电泳图

图 4 不同浓度 gly-LDL 对大鼠 RMVEC 细胞表达 MFG-E8 的影响

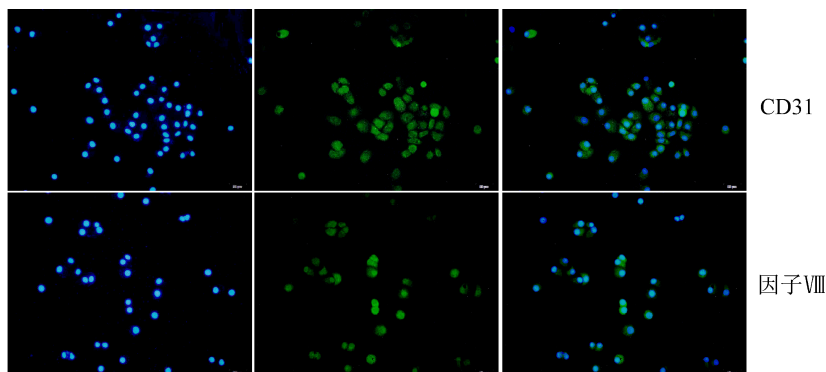
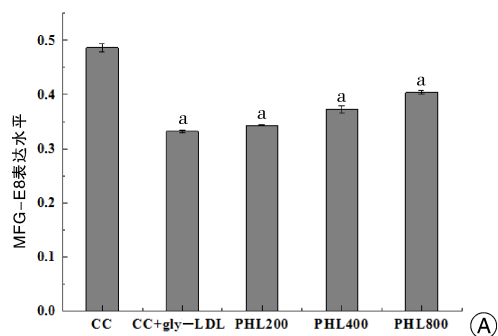


图 2 原代大鼠 RMVEC 的体外鉴定 (免疫荧光细胞染色, ×200)



CC 组为对照组; CC + gly-LDL 组为 gly-LDL 诱导组; PHL 200 组为联合 PHL 200 $\mu\text{mmol/L}$ 组; PHL 400 组为联合 PHL 400 $\mu\text{mmol/L}$ 组; PHL 800 组为联合 PHL 800 $\mu\text{mmol/L}$ 组; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$

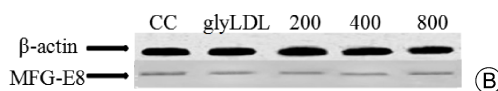


图5 PHL对大鼠RMVEC表达MFG-E8的影响

3 讨论

DR 是糖尿病在眼部的最重要并发症, 现已成为成年人中视力渐进性损害与致盲的主要病因。随着全球范围内糖尿病患病率的日益升高以及糖尿病病程的自然延长, DR 给患者、家庭以及社会带来更多的危害与负担。研究^[10]表明, 严格的血糖控制能显著减低 DR 进展的风险, 但在临床实践中长期控制血糖达标并非易事, 而可能发生低血糖事件带来的危害更有可能抵消血糖良好控制的获益。激光光凝治疗 DR 效果确切, 仍是中晚期阶段 DR 治疗的重要方法, 但存在很多局限性与不良反应, 如导致视力减退、视野损伤、暗适应和对比敏感度下降等, 从而限制了其在临床上的广泛应用。因此, 探讨 DR 早期的病理生理机制并寻找有效安全的干预药物具有重要的意义。

视网膜血管内皮细胞、血管周细胞以及神经元、神经胶质细胞等凋亡是 DR 早期的重要病理学基础, 氧化应激损伤在促进细胞凋亡作用中发挥着重要作用^[11]。PHL 是一种天然的多酚类化合物, 其主要来源于苹果类的植物种属。人类认识 PHL 已有近百年的历史, 最初 PHL 用于治疗发热以及感染性疾病, 随后的研究发现, PHL 及其衍生物作为钠-葡萄糖协同转运蛋白 (SGLT) 抑制剂作用于肾小管 SGLT 蛋白促进葡萄糖在肾脏的排泄, 因此 PHL 具有调节血糖的效应以及被作为中介研究肾脏代谢功能。晚近的研究还发现^[12-13], PHL 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、保肝以及类雌激素样作用。相关报道与

研究为 PHL 在 DR 上的应用奠定了实验与理论基础。目前已有多个基础研究深入探讨 PHL 对于 DR 的影响与作用。Wakisaka 等^[7]报道, 体外培养的牛视网膜血管周细胞在高糖诱导后出现周细胞内葡萄糖过量积聚、胶原蛋白水平升高、DNA 合成减少以及周细胞胞体的肿胀等血管周细胞形态与功能学的异常, PHL 的干预可以显著改善高糖刺激下的周细胞损伤。我们前期的研究在体内动物整体层面观察了 PHL 对于糖尿病视网膜损害的影响, 选择 C57BLKS/J db/db 品系小鼠模拟并建立 2 型糖尿病 DR 动物模型并采用 PHL 干预治疗, 结果发现 PHL 处理能够明显减少 db/db 小鼠视网膜神经元细胞的凋亡以及神经胶质细胞的增生^[5]。本研究模拟糖尿病内环境即利用 gly-LDL 刺激下体外培养的大鼠 RMVEC 导致细胞凋亡显著增加, PHL 预先干预明显改善 RMVEC 的细胞凋亡, 该实验结果报道了 PHL 可以改善 gly-LDL 诱导的大鼠 RMVEC 细胞凋亡, 实现 PHL 对于 DR 的早期保护作用。然而, PHL 治疗 DR 的作用分子机制研究尚未阐明。

MFG-E8 蛋白即乳脂肪球上皮细胞生长因子, 是乳凝集素家族的重要成员。研究发现 MFG-E8 参与了细胞迁移、细胞增殖、细胞凋亡、细胞信号转导、细胞外基质重塑以及炎症介质等多种生物学功能, 并可能在衰老、糖尿病等动脉粥样硬化性相关疾病中扮演着重要角色。前期基于 iTRAQ 的蛋白质组定量研究视网膜差异蛋白组发现, db/db 糖尿病小鼠视网膜组织表达蛋白 MFG-E8 较健康对照组明显下调, PHL 干预后该蛋白显著回调, 提示 MFG-E8 的代谢失调可能与 DR 的发生有着密切关系^[5]。本研究在离体培养大鼠 RMVEC 细胞层面研究 gly-LDL 刺激下 MFG-E8 蛋白表达的变化, 结果显示 RMVEC 细胞在不同浓度的 gly-LDL 诱导均导致表达 MFG-E8 的下调, MFG-E8 的下调程度且与 gly-LDL 的浓度呈现剂量依赖性, 给予 RMVEC 预处理 PHL 可明显改善 gly-LDL 诱导的 MFG-E8 表达下调, 并且随着 PHL 浓度的升高, 该蛋白 MFG-E8 的表达呈现剂量一致的恢复。MFG-E8 介导的 PHL 保护糖尿病视网膜损伤的详细作用机制并不清楚。在真实世界的慢性阻塞性肺疾病、系统性红斑狼疮以及类风湿关节炎等患者血清中 MFG-E8 水平明显降低, 且与患者的病变严重程度成正相关, MFG-8 可能通过炎症介导参与了炎症相关性疾病的发生与进展^[14-16]。MFG-E8 作为连接巨噬细胞与凋亡细胞的

桥梁分子在细胞凋亡的过程中发挥着独特而重要的作用。Ait-Oufella 等^[17]研究发现,缺乏 MFG-E8 基因表达的小鼠其体内凋亡细胞被吞噬明显减少,导致凋亡细胞呈现碎片化的堆积,促进了小鼠血管病变的发生与发展。凋亡是 DR 的发生的病理生理学基础,氧化应急损伤以及炎症在 DR 的进展中也发挥着举足轻重的作用,MFG-E8 是否通过凋亡、炎症介导或其他机制参与 DR 的发展以及介导 PHL 对于 DR 的保护作用,后续研究将基于 RNA 干扰技术沉默目的基因深入探讨。

总之,本研究发现 gly-LDL 诱导大鼠 RMVEC 后,能够导致细胞的凋亡以及细胞表达 MFG-E8 蛋白的下调,PHL 的预处理至少可能通过改善细胞 MFG-E8 表达的失调抑制 RMVEC 细胞的凋亡实现对于 DR 的保护作用。

参考文献

- [1] JEON WS, PARK SE, RHEE EJ, et al. The association of serum glycated albumin with the prevalence of diabetic retinopathy in Korean patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2016, 116(1): 46-53.
- [2] TURK Z, CAVLOVIĆ-NAGLIĆ M, TURK N. Relationship of methylglyoxal-adduct biogenesis to LDL and triglyceride levels in diabetics[J]. *Life Sci*, 2011, 89(13/14): 485-490.
- [3] ZHANG SX, WANG JJ, DASHTI A, et al. Pigment epithelium-derived factor mitigates inflammation and oxidative stress in retinal pericytes exposed to oxidized low-density lipoprotein[J]. *J Mol Endocrinol*, 2008, 41(3): 135-143.
- [4] WANG M, WANG HH, LAKATTA EG. Milk fat globule epidermal growth factor VIII signaling in arterial wall remodeling[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2013, 11(5): 768-776.
- [5] ZHANG SY, LI BY, LI XL, et al. Effects of phlorizin on diabetic retinopathy according to the iTRAQ-based proteomics in db/db mice[J]. *Mol Vis*, 2013, 5(19): 812-821.
- [6] WAKISAKA M, KITAZONO T, KATO M, et al. Sodium-coupled glucose transporter as a functional glucose sensor of retinal microvascular circulation[J]. *Circ Res*, 2001, 88(11): 1183-1188.
- [7] WAKISAKA M, YOSHINARI M, ASANO T, et al. Normalization of glucose entry under the high glucose condition by phlorizin attenuates the high glucose-induced morphological and functional changes of cultured bovine retinal pericytes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1453(1): 83-91.
- [8] 胡健艳, 吴强, 宋蓓雯, 等. 大鼠视网膜微血管内皮细胞的原代培养及鉴定改进[J]. *眼科*, 2012, 21(4): 261-264.
- [9] LI XL, LI BY, CHENG M, et al. PIMT prevents the apoptosis of endothelial cells in response to glycated low density lipoproteins and protective effects of grape seed procyanidin B2[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69979.
- [10] YUN SH, ADELMAN RA. Recent developments in laser treatment of diabetic retinopathy[J]. *Middle East Afr J Ophthalmol*, 2015, 22(2): 157-163.
- [11] COUCHA M, ELSHAER SL, ELDAHSHAN WS, et al. Molecular mechanisms of diabetic retinopathy: potential therapeutic targets[J]. *Middle East Afr J Ophthalmol*, 2015, 22(2): 135-144.
- [12] KATSUDA Y, SASASE T, TADAKI H, et al. Contribution of hyperglycemia on diabetic complications in obese type 2 diabetic SDT fatty rats: effects of SGLT inhibitor phlorizin[J]. *Exp Anim*, 2015, 64(2): 161-169.
- [13] OSORIO H, CORONEL I, ARELLANO A, et al. Sodium-glucose cotransporter inhibition prevents oxidative stress in the kidney of diabetic rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012(3): 542042.
- [14] ZHANG S, XIE JG, SU BT, et al. MFG-E8, a clearance glycoprotein of apoptotic cells, as a new marker of disease severity in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2015, 48(11): 1032-1038.
- [15] ALBUS E, SINNINGEN K, WINZER M, et al. Milk fat globule-epidermal growth factor 8 (mfg-e8) is a novel anti-inflammatory factor in rheumatoid arthritis in mice and humans[J]. *J Bone Miner Res*, 2016, 31(3): 596-605.
- [16] KRUSE K, JANKO C, URBONAVICIUTE V, et al. Inefficient clearance of dying cells in patients with SLE: anti-dsDNA autoantibodies, MFG-E8, HMGB-1 and other players[J]. *Apoptosis*, 2010, 15(9): 1098-1113.
- [17] AIT-OUFELLA H, KINUGAWA K, ZOLL J, et al. Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice[J]. *Circulation*, 2007, 115(16): 2168-2177.

(收稿日期: 2016-11-16)