· 实验研究 ·

丹参酮ⅡA 对缺氧状态下视网膜色素上皮细胞增生的抑制作用及其机制

雷祥　栗占荣　范珂

河南省人民医院眼科　河南省立眼科医院　河南省眼科研究所，郑州 450003

通信作者：范珂，Email：fksy_yk@163.com

【摘要】 **目的**　探讨丹参酮ⅡA 在缺氧条件下对人视网膜色素上皮（RPE）细胞增生的抑制作用及相关信号通路的影响。 **方法**　体外培养 ARPE-19 细胞，细胞分为空白对照组、缺氧对照组、不同质量浓度丹参酮ⅡA 干预组和缺氧诱导因子 1α（HIF-1α）抑制剂组。利用氯化钴（$CoCl_2$）建立缺氧环境，MTT 法检测各组细胞加药培养 24、48 和 72 h 后的增生抑制率，流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率及细胞周期分布情况，real-time PCR 及 Western blot 法检测各组 HIF-1α 和血管内皮生长因子（VEGF）mRNA 及蛋白表达情况。 **结果**　MTT 法检测结果显示，丹参酮ⅡA 可呈时间和质量浓度依赖性地抑制细胞增生，1、5、10 mg/L 丹参酮ⅡA 组细胞增生抑制率依次升高，两两比较差异均有统计学意义（均 $P<0.05$）。流式细胞术检测结果显示，1、5 和 10 mg/L丹参酮ⅡA 组细胞凋亡率依次升高，两两比较差异均有统计学意义（均 $P<0.05$）；缺氧对照组、1 mg/L 丹参酮ⅡA 组、5 mg/L丹参酮ⅡA 组、10 mg/L 丹参酮ⅡA 组 G_0/G_1 期细胞比例依次升高，S 期细胞比例依次降低，两两比较差异均有统计学意义（均 $P<0.05$）。RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示，空白对照组、缺氧对照组、1 mg/L 丹参酮ⅡA 组、5 mg/L 丹参酮ⅡA 组、10 mg/L 丹参酮ⅡA 组和 HIF-1α 抑制剂组中 VEGF mRNA、HIF-1α 蛋白和 VEGF 蛋白相对表达量的总体比较，差异均有统计学意义（均 $P<0.05$），其中缺氧对照组、1 mg/L 丹参酮ⅡA 组、5 mg/L 丹参酮ⅡA 组、10 mg/L 丹参酮ⅡA 组 VEGF mRNA、HIF-1α 蛋白、VEGF 蛋白相对表达量依次降低，两两比较差异均有统计学意义（均 $P<0.05$）。10 mg/L 丹参酮ⅡA 组与 HIF-1α 抑制剂组各检测指标比较，差异均无统计学意义（均 $P>0.05$）。 **结论**　丹参酮ⅡA 在缺氧条件下可以抑制 RPE 细胞增生，将细胞阻滞在 G_0/G_1 期，促进细胞凋亡，可能与其对 HIF-1α/VEGF 信号通路的抑制作用有关。

【关键词】 丹参酮ⅡA；视网膜色素上皮细胞；缺氧诱导因子 1α；血管内皮生长因子；增生

基金项目： 国家自然科学基金项目（U1304811）

DOI：10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.05.005

Inhibitory effect of Tanshinone ⅡA on the proliferation of human retinal pigment epithelial cells in hypoxia and its mechanism

Lei Xiang, Li Zhanrong, Fan Ke

Department of Ophtalmology, Henan Provincial People's Hospital, Henan Provincial Eye Hospital, Henan Provincial Ophthalmology Institute, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Fan Ke, Email: fksy_yk@163.com

[**Abstract**] **Objective**　To investigate the effect of Tanshinone ⅡA on the proliferation and the signaling pathway of human retinal pigment epithelial (RPE) cells in hypoxia. **Methods**　$CoCl_2$ (150 μmol/L) was used to simulate hypoxic condition and the ARPE-19 cells cultured *in vitro* were divided into blank control group, hypoxia control group, Tanshinone ⅡA group and hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) inhibitor group. The different doses of Tanshinone ⅡA were used to treat ARPE-19 for 24, 48 and 72 hours, respectively. The inhibitory rate of cell proliferation of different groups were detected by MTT after 24, 48 and 72 hours of administration cultured, and the apoptosis rate and the cell cycle distribution of cells in the hypoxia were analyzed by flow cytometry. Real-time PCR and Western blot were used to detect the expressions of mRNA and protein of HIF-1α and vascular endothelial growth factor (VEGF). **Results**　MTT assay showed that Tanshinone ⅡA could inhibit the proliferation of ARPE-19 cells in a dose- and time-dependent manner, and the proliferation inhibitory rate gradually increased in the 1, 5 and 10 mg/L Tanshinone ⅡA groups, with significant differences between any two groups (all at $P<0.05$). Flow cytometry showed that the apoptosis rate of ARPE-19 in 1, 5 and 10 mg/L Tanshinone ⅡA groups gradually increased with the elevation of Tanshinone ⅡA dosage, with significant differences between any two groups (all at $P<0.05$). The cell proportion in the G_0/G_1 phase gradually increased, while the cell proportion in the S phase gradually decreased along with the elevation of Tanshinone ⅡA concentration, significant differences were obtained among the hypoxia control group, 1, 5 and 10 mg/L Tanshinone ⅡA groups (all at $P<0.05$). RT-PCR and Western blot showed that the relative expression of VEGF mRNA, HIF-1α and VEGF protein in the the blank control group, hypoxia control group, 1, 5 and 10 mg/L Tanshinone ⅡA groups and HIF-1α inhibitor group were significantly different (all at $P<0.05$). The expression of

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

VEGF mRNA, HIF-1α and VEGF protein decreased successively in the 1, 5 and 10 mg/L Tanshinone ⅡA groups, with significant differences between them (all at $P<0.05$). There were no significant differences between 10 mg/L Tanshinone ⅡA and the HIF-1α inhibitor group of all the test indexes (all at $P>0.05$). **Conclusions** Tanshinone ⅡA can inhibit the proliferation of RPE cells, induce apoptosis by arresting cells at G_0/G_1 phase. The mechanism is related to the suppression of HIF-1α/VEGF signaling pathway.

[**Key words**] Tanshinone ⅡA; Retinal pigment epithelial cells; Hypoxia-inducible factor-1α; Vascular endothelial growth factor; Proliferation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (U1304811)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.05.005

视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞是位于脉络膜和视网膜神经皮层之间的单层细胞,是血-视网膜屏障的重要组成成分,对视网膜的结构和功能具有调节作用[1]。在缺血缺氧状态下,RPE 细胞能够异常增生、活化,并分泌缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α, HIF-1α)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等多种因子,诱导脉络膜新生血管的形成,促进增生性玻璃体视网膜病变等眼部疾病的发生。因此抑制缺氧环境中 RPE 细胞的增生并抑制相关新生血管形成信号通路的表达是防治增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)类疾病的关键[2-4]。丹参酮ⅡA 是丹参的主要成分,具有抗感染、抗炎及调节免疫应答等多重作用,同时对多种细胞具有抑制增生、诱导凋亡、抑制肿瘤血管生成等作用。研究表明,丹参酮ⅡA 对糖尿病视网膜病变具有一定的治疗作用,能够有效清除氧自由基,改善视网膜微循环[5-6],但丹参酮ⅡA 对缺氧状态下 RPE 细胞的增生是否具有抑制作用尚不清楚。本研究通过化学缺氧诱导剂 $CoCl_2$ 模拟 ARPE-19 细胞缺氧环境,探讨丹参酮ⅡA 对缺氧条件下 RPE 细胞增生的抑制作用及其机制。

1　材料与方法

1.1　材料

ARPE-19 细胞株(美国 ATCC 公司);丹参酮ⅡA(中国药品生物制品检定所);DMEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);HIF-1α 抑制剂 LW6(美国 Selleck Chemicals 公司);MTT、Trizol 裂解液、蛋白酶抑制剂 PMSF 和裂解液 RIPA(美国 Sigma 公司);real-time PCR 试剂盒、兔抗人 HIF-1α 多克隆抗体(#PA1-184)、兔抗人 VEGF 多克隆抗体(#P802)及羊抗兔或羊抗鼠多克隆二抗(#A32723、#A32732)(美国 Thermo 公司)。凝胶图像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2　方法

1.2.1　ARPE-19 细胞的培养及预处理　采用含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/ml(商品单位)青霉素和 100 mg/ml 链霉素的 DMEM/F12 培养基于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养 ARPE-19 细胞,待细胞生长至 80% 融合时,采用质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化,1∶2 传代,选取状态良好的对数生长期细胞进行接种。

1.2.2　实验分组及分组处理　将 ARPE-19 细胞分为空白对照组、缺氧对照组、不同质量浓度丹参酮ⅡA 干预组和 HIF-1α 抑制剂组,其中空白对照组不做任何处理。参照文献[7],缺氧对照组、丹参酮ⅡA 干预组和 HIF-1α 抑制剂组细胞均用含 150 μmol/L $CoCl_2$ 的 DMEM/F12 培养基进行缺氧诱导培养 12 h,建立细胞化学缺氧模型。不同质量浓度丹参酮ⅡA 干预组分别加入终质量浓度为 1、5 和 10 mg/L 丹参酮ⅡA, HIF-1α 抑制剂组加入终浓质量度为 1 mg/L HIF-1α 抑制剂 LW6。常规培养 24、48 和 72 h 后进行后续实验。

1.2.3　MTT 法检测细胞增生抑制率　取各组对数期细胞,以 5×10^3/ml 细胞密度接种于 96 孔板中,每孔加入 150 μl 培养基培养 24 h。每组设 6 个复孔。分别于加药后 24、48 和 72 h,更换培养基,每孔加入5 mg/ml 的 MTT 20 μl 继续培养 4 h,弃培养基,每孔加入 200 μl DMSO,振荡至结晶溶解完全。采用酶标仪测定波长 570 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞的增生抑制率。增生抑制率(%)=(缺氧对照组 A 值-实验组 A 值)/缺氧对照组 A 值×100%。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.4　流式细胞术检测细胞凋亡率　采用流式细胞术 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡率。取各组对数期生长的细胞,以 1×10^6/ml 密度接种于 24 孔板中,每孔加入 1 ml 培养基培养 24 h。每组设 3 个复孔。加药后 48 h,离心半径 13.5 cm,2 000 r/min离心5 min,收集细胞,PBS 重悬洗涤,2 000 r/min离心5 min。待收集足够的细胞,加入 500 μl 结合缓冲液悬浮细胞,加入 2 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 混匀后,室温下避光孵育 5 min。流式细胞仪检测细胞凋亡情况。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.5　流式细胞术检测细胞周期　离心收集各组加药培养后 48 h 细胞(方法及时间点同 1.2.4),采用预

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

冷的 PBS 漂洗细胞 2 次，加入预冷的体积分数 70% 乙醇，4 ℃固定过夜。弃上清，PBS 洗涤后，加入含有体积分数 0.2% Triton-X100 的 PBS 溶液 200 μl 和 0.25 mg/ml RNaes 酶 2 μl，再加入 50 μg/ml PI 染液 500 μl，室温下避光孵育 30 min，用流式细胞仪进行细胞周期分析。

1.2.6 Real-time PCR 法检测 HIF-1α 和 VEGF mRNA 的表达　收集加药培养 24 h 后的细胞，采用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA。紫外分光光度计测定 RNA 的浓度，采用逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA，-80 ℃保存备用。以逆转录得到的 cDNA 为模板，逆转录 PCR 扩增目的基因。HIF-1α 上游引物为 5'-TCCGATGGAAGCACTAGACA-3'，下游引物为 5'-TGGTGACAACTGATCGAAGG-3'，扩增片段长度为 243 bp；VEGF 上游引物为 5'-AAGGAGGAGGGCAGAATCAT-3'，下游引物为 5'-ATCTGCATGGTGATGTTGGA-3'，扩增片段长度为 226 bp；内参 β-actin 上游引物为 5'-GGCATCCTCACCCTGAAGTA-3'，下游引物为 5'-GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA-3'，扩增片段长度为 203 bp。采用实时荧光定量 PCR 仪进行扩增，反应条件：95 ℃预变性 10 s；95℃变性 5 s，60 ℃退火及延伸 30 s，反应 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各目的基因相对表达量。

1.2.7 Western blot 法检测 HIF-1α 及 VEGF 蛋白的表达　收集各组加药培养 48 h 细胞，分别加入适量含 PMSF 的 RIPA 裂解液，于冰上裂解 30 min，4 ℃条件下离心，14 000 r/min 离心 10 min，提取细胞总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μg 蛋白样品进行 SDS 凝胶电泳分离蛋白，4 ℃环境下将蛋白转移至 PVDF 膜上，质量分数 5% 脱脂奶粉封闭过夜。分别加入 HIF-1α 抗体（1∶500）、VEGF 抗体（1∶1 000）、β-actin 抗体（1∶2 000），室温下孵育 2 h，加入相应碱性磷酸酶标记的羊抗鼠或羊抗兔二抗，室温下孵育 1 h。采用电化学发光剂显色，曝光。采用凝胶图像分析系统计算灰度值，以 β-actin 为内参，计算目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 W 检验证实呈正态分布，以 mean±SD 表示，经 Levene 检验证实方差齐性，各组细胞不同作用时间细胞增生抑制率的比较采用两因素方差分析，两两比较采用 LSD-*t* 检验；各组细胞凋亡率、细胞周期分布、HIF-1α 和 VEGF mRNA 及蛋白表达的比较采用单因素方差分析，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 各组细胞增生情况比较

MTT 法检测结果显示，缺氧对照组细胞的增生率（*A* 值）明显高于空白对照组，而各丹参酮ⅡA 组细胞的增生抑制率随着丹参酮ⅡA 质量浓度的升高和作用时间的延长而升高，差异均有统计学意义（$F_{组间}=72.747$，$P<0.01$；$F_{时间}=24.206$，$P<0.01$），其中 1、5 和 10 mg/L丹参酮ⅡA 组细胞增生抑制率依次升高，两两比较差异均有统计学意义（均 $P<0.05$）；10 mg/L 丹参酮ⅡA 组与 HIF-1α 抑制剂组细胞增生抑制率比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）（图 1，表 1）。

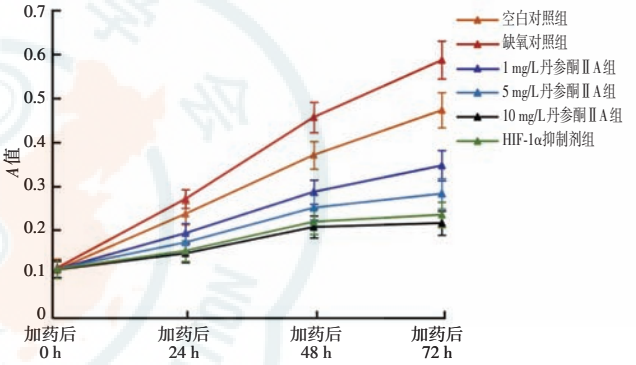

图 1　各组细胞生长曲线　缺氧对照组细胞的增生率（*A* 值）明显高于空白对照组，各丹参酮ⅡA 组细胞的增生率（*A* 值）随着丹参酮ⅡA质量浓度的升高和作用时间的延长而明显降低　注：HIF：缺氧诱导因子

表 1　各组细胞作用不同时间细胞增生抑制率比较（%，mean±SD）

组别	样本量	不同时间细胞增生抑制率		
		24 h	48 h	72 h
1 mg/L 丹参酮ⅡA 组	6	26.33±1.33	36.69±1.99	44.78±1.79
5 mg/L 丹参酮ⅡA 组	6	35.02±1.61[a]	45.22±1.55[a]	55.14±1.74[a]
10 mg/L 丹参酮ⅡA 组	6	47.67±1.23[ab]	56.98±1.56[ab]	67.79±1.63[ab]
HIF-1α 抑制剂组	6	46.65±1.37[ab]	53.17±2.05[ab]	63.29±2.07[ab]

注：$F_{组间}=72.747$，$P<0.01$；$F_{时间}=24.206$，$P<0.01$. 与 1 mg/L 丹参酮ⅡA 组比较，[a]$P<0.05$；与 5 mg/L 丹参酮ⅡA 组比较，[b]$P<0.05$（两因素方差分析，LSD-*t* 检验）　HIF：缺氧诱导因子

2.2 各组细胞的凋亡情况比较

流式细胞术检测各组 ARPE-19 细胞的凋亡情况，结果发现空白对照组和缺氧对照组细胞凋亡率比较无明显差别，丹参酮ⅡA 组细胞凋亡率随着丹参酮ⅡA 质量浓度的升高而逐渐升高，HIF-1α 抑制剂组细胞细胞凋亡率与 10 mg/L 丹参酮ⅡA 组比较无明显差别（图 2）。空白对照组、缺氧对照组、1 mg/L 丹参酮ⅡA 组、5 mg/L丹参酮ⅡA 组、10 mg/L 丹参酮ⅡA 组和

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

HIF-1α抑制剂组细胞凋亡率总体比较，差异有统计学意义（$F=84.754$，$P=0.000$），其中缺氧对照组、1 mg/L 丹参酮ⅡA 组、5 mg/L 丹参酮ⅡA 组、10 mg/L丹参酮ⅡA组细胞凋亡率依次升高，两两比较差异均有统计学意义（均 $P<0.05$）；10 mg/L 丹参酮ⅡA组细胞凋亡率与 HIF-1α 抑制剂组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）（表 2）。

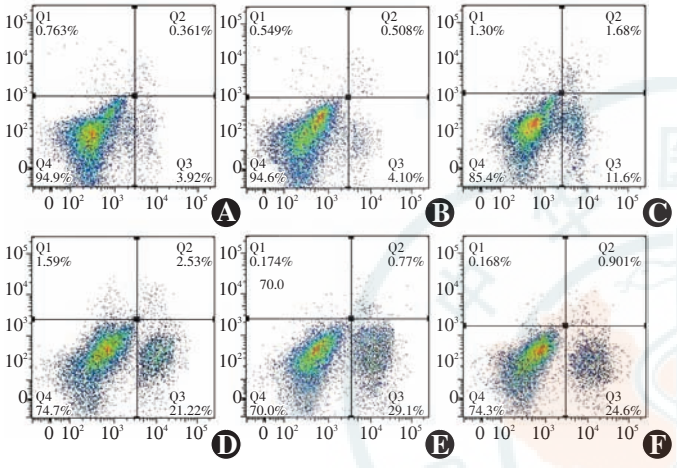

图 2　流式细胞检测细胞凋亡率图　空白对照组和缺氧对照组细胞的凋亡率无明显差异，丹参酮ⅡA 干预组细胞的细胞凋亡率随着丹参酮ⅡA 质量浓度的升高而逐渐升高　A：空白对照组　B：缺氧对照组　C：1 mg/L 丹参酮ⅡA 组　D：5 mg/L 丹参酮ⅡA 组　E：10 mg/L 丹参酮ⅡA 组　F：HIF-1α 抑制剂组

表 2　各组细胞凋亡率比较（%，mean±SD）

组别	样本量	细胞凋亡率
空白对照组	3	4.17±1.34
缺氧对照组	3	3.91±1.36
1 mg/L 丹参酮ⅡA 组	3	12.49±2.45[a]
5 mg/L 丹参酮ⅡA 组	3	21.13±3.12[ab]
10 mg/L 丹参酮ⅡA 组	3	29.46±3.42[abc]
HIF-1α 抑制剂组	3	25.41±2.99[abc]
F 值		84.754
P 值		0.000

注：与缺氧对照组比较，[a]$P<0.05$；与 1 mg/L 丹参酮ⅡA 组比较，[b]$P<0.05$；与 5 mg/L 丹参酮ⅡA 组比较，[c]$P<0.05$（单因素方差分析，LSD-*t* 检验）　HIF：缺氧诱导因子

2.3　各组细胞不同细胞周期的分布比较

流式细胞术检测结果显示，空白对照组和缺氧对照组细胞在 G_0/G_1、S 和 G_2/M 期的细胞比例无明显差别；随着丹参酮ⅡA 质量浓度的增加，丹参酮ⅡA 干预组细胞进入 S 期的细胞逐渐减少，G_0/G_1 期的细胞数量逐渐增加；HIF-1α 抑制剂组细胞在 G_0/G_1、S 和 G_2/M 期的细胞比例与 10 mg/L 丹参酮ⅡA 组比较无明显差别（图 3）。空白对照组、缺氧对照组、1 mg/L 丹参酮ⅡA 组、5 mg/L 丹参酮ⅡA 组、10 mg/L 丹参酮ⅡA 组、HIF-1α 抑制剂组 G_0/G_1 期和 S 期的细胞比例总体比较，差异均有统计学意义（$F=119.847$、124.286，均 $P=0.000$），其中缺氧对照组、1 mg/L丹参酮ⅡA 组、5 mg/L丹参酮ⅡA 组、10 mg/L 丹参酮ⅡA 组 G_0/G_1 期细胞比例依次升高，S 期细胞比例依次降低，两两比较差异均有统计学意义（均 $P<0.05$）；10 mg/L 丹参酮ⅡA组与 HIF-1α 抑制剂组 G_0/G_1 期和 S 期细胞比例比较，差异均无统计学意义（均 $P>0.05$）。各组 G_2/M 期细胞比例总体比较，差异无统计学意义（$F=1.733$，$P=0.302$）（表 3）。

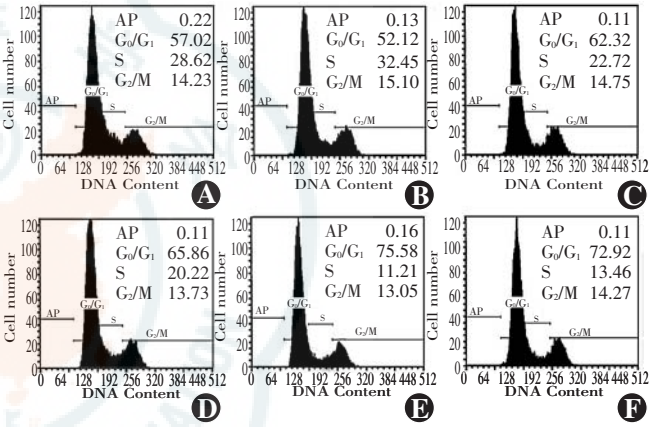

图 3　流式细胞术检测细胞周期分布　空白对照组和缺氧对照组 G_0/G_1、S 和 G_2/M 期细胞比例比较无明显差别，丹参酮ⅡA 组 S 期细胞比例随着丹参酮ⅡA 质量浓度的升高而降低，G_0/G_1 期细胞比例随着丹参酮ⅡA 质量浓度的升高而逐渐升高　A：空白对照组　B：缺氧对照组　C：1 mg/L 丹参酮ⅡA 组　D：5 mg/L 丹参酮ⅡA 组　E：10 mg/L丹参酮ⅡA 组　F：HIF-1α 抑制剂组

表 3　各组不同细胞周期细胞比例比较（%，mean±SD）

组别	样本量	不同周期细胞比例		
		G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
空白对照组	3	54.84±1.96	30.09±2.04	15.07±2.31
缺氧对照组	3	52.71±2.19	32.34±2.47	15.97±3.04
1 mg/L 丹参酮ⅡA	3	61.37±2.71[a]	24.53±2.67[a]	14.10±2.21
5 mg/L 丹参酮ⅡA	3	67.58±2.52[ab]	18.14±2.34[ab]	14.28±2.87
10 mg/L 丹参酮ⅡA	3	74.21±2.38[abc]	11.84±2.07[abc]	13.95±2.63
HIF-1α 抑制剂组	3	72.48±2.06[abc]	13.87±2.03[abc]	13.65±2.49
F 值		119.847	124.286	1.733
P 值		0.000	0.000	0.302

注：与缺氧对照组比较，[a]$P<0.05$；与 1 mg/L 丹参酮ⅡA 组比较，[b]$P<0.05$；与 5 mg/L 丹参酮ⅡA 组比较，[c]$P<0.05$（单因素方差分析，LSD-*t* 检验）　HIF：缺氧诱导因子

2.4　各组细胞中 HIF-1α 和 VEGF mRNA 和蛋白表达情况比较

空白对照组、缺氧对照组、1 mg/L 丹参酮ⅡA 组、5 mg/L 丹参酮ⅡA 组、10 mg/L 丹参酮ⅡA 组、HIF-1α

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

抑制剂组 HIF-1α mRNA 相对表达量总体比较，差异无统计学意义（$F=3.438$，$P=0.091$），VEGF mRNA、HIF-1α 蛋白、VEGF 蛋白相对表达量总体比较，差异均有统计学意义（$F=82.841$、89.739、79.935，均 $P=0.000$），其中缺氧对照组、1 mg/L 丹参酮ⅡA 组、5 mg/L丹参酮ⅡA 组和10 mg/L丹参酮ⅡA 组 VEGF mRNA、HIF-1α 蛋白和 VEGF 蛋白相对表达量依次降低，两两比较差异均有统计学意义（均 $P<0.05$）；10 mg/L丹参酮ⅡA 组与 HIF-1α 抑制剂组 VEGF mRNA、HIF-1α 蛋白和 VEGF 蛋白相对表达量比较，差异均无统计学意义（均 $P>0.05$）（表 4，5）。

表 4　各组细胞中 HIF-1α 和 VEGF mRNA 相对表达量比较（mean±SD）

组别	样本量	HIF-1α mRNA 相对表达量	VEGF mRNA 相对表达量
空白对照组	3	1.00±0.07	0.99±0.08
缺氧对照组	3	0.99±0.05	1.35±0.07
1 mg/L 丹参酮ⅡA	3	0.98±0.05	0.94±0.05[a]
5 mg/L 丹参酮ⅡA	3	0.96±0.05	0.83±0.05[ab]
10 mg/L 丹参酮ⅡA	3	0.95±0.06	0.73±0.06[abc]
HIF-1α 抑制剂组	3	0.95±0.05	0.75±0.04[abc]
F 值		3.438	82.841
P 值		0.091	0.000

注：与缺氧对照组比较，[a]$P<0.05$；与 1 mg/L 丹参酮ⅡA 组比较，[b]$P<0.05$；与 5 mg/L 丹参酮ⅡA 组比较，[c]$P<0.05$（单因素方差分析，LSD-*t* 检验）HIF：缺氧诱导因子；VEGF：血管内皮生长因子

表 5　各组细胞中 HIF-1α 和 VEGF 蛋白相对表达量比较（mean±SD）

组别	样本量	HIF-1α 蛋白相对表达量	VEGF 蛋白相对表达量
空白对照组	3	1.01±0.06	1.02±0.06
缺氧对照组	3	1.42±0.05	1.31±0.06
1 mg/L 丹参酮ⅡA 组	3	0.95±0.06[a]	0.91±0.05[a]
5 mg/L 丹参酮ⅡA 组	3	0.84±0.05[ab]	0.80±0.04[ab]
10 mg/L 丹参酮ⅡA 组	3	0.62±0.05[abc]	0.59±0.04[abc]
HIF-1α 抑制剂组	3	0.65±0.04[abc]	0.61±0.05[abc]
F 值		89.739	79.935
P 值		0.000	0.000

注：与缺氧对照组比较，[a]$P<0.05$；与 1 mg/L 丹参酮ⅡA 组比较，[b]$P<0.05$；与 5 mg/L 丹参酮ⅡA 组比较，[c]$P<0.05$（单因素方差分析，LSD-*t* 检验）HIF：缺氧诱导因子；VEGF：血管内皮生长因子

3　讨论

RPE 细胞在 PVR 发生中发挥重要作用，抑制 RPE 细胞的增生是防治 PVR 类疾病的关键。现有抑制 RPE 细胞增生的药物，如阿霉素等由于毒性、个体代谢动力的差异等限制了其在临床上的应用，因此寻找新的、有效且安全的药物对 PVR 的治疗具有重要意义。现有研究证实，丹参酮ⅡA 对肝癌细胞、胃癌细胞、成纤维细胞等多种细胞均具有抑制生长、诱导凋亡等作用[8-10]，且可以抑制视网膜组织 Müller 细胞的增生[5-6]，改善非增生性糖尿病视网膜病变患者的视网膜血流动力学状态及视网膜微循环[11]，因此推测丹参酮ⅡA 对于 PVR 发病中 RPE 细胞的增生可能具有抑制作用。

缺氧环境是促进 RPE 细胞增生并分泌血管内皮生长因子的敏感因素之一，是视网膜增生性反应的启动因素，也是 PVR 发生的关键[12-13]。因此本研究采用缺氧诱导的 RPE 细胞异常增生模拟 PVR 病程中 RPE 细胞的增生反应，并采用不同质量浓度的丹参酮ⅡA 进行干预，结果发现丹参酮ⅡA 能够呈质量浓度和时间依赖性地抑制缺氧诱导 RPE 细胞的异常增生；流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞周期结果发现，缺氧条件下，丹参酮ⅡA 能够呈质量浓度依赖性地促进 RPE 细胞凋亡，将大多数细胞抑制在 G_0/G_1 期，提示丹参酮ⅡA 能够有效抑制 RPE 细胞增生。

在缺氧条件下，REP 细胞异常增生，同时上调 HIF-1α 表达水平，使其与 HIF-1β 形成二聚体 HIF-1，激活 VEGF 下游基因的转录和表达，调节 RPE 细胞增生微环境的同时诱发视网膜组织新生血管的形成，引起眼底结构及功能变化，最终导致视网膜病变等多种眼部疾病的发生[14-17]。因此推测 HIF-1α/VEGF 信号通路不仅是促新血管生成的机制，同时与 RPE 细胞的增生密切相关。Wu 等[18]研究证实，女贞子能够通过抑制 HIF-1α/VEGF 信号通路来抑制缺氧诱导的视网膜血管生成。而 Liu 等[19]研究表明，雷帕霉素能够抑制缺氧诱导的 RPE 细胞增生，其机制可能与 mTOR/HIF-1α/VEGF 信号通路密切相关。因此抑制 HIF-1α/VEGF 信号通路的表达对于 RPE 细胞异常增生的抑制具有重要作用。本研究中发现，缺氧诱导的 RPE 细胞中 HIF-1α 蛋白和 VEGF mRNA 及蛋白的表达水平升高，而丹参酮ⅡA 呈质量浓度依赖性地降低其表达水平，且 10 mg/L 丹参酮ⅡA 的抑制作用与 HIF-1α 抑制剂效果一致。因此推测丹参酮ⅡA 能够抑制缺氧诱导的 RPE 细胞的增生，其可能是通过抑制 HIF-1α 及 VEGF 的表达来实现的。已知 HIF-1α 抑制剂 LW6 在缺氧环境下可降解 HIF-1α，有效抑制其过度积累，但并不影响 HIF-1α mRNA 水平，本研究结果中各组间 HIF-1α mRNA 相对表达量比较，差异无统计学意义，因此推测丹参酮ⅡA 具有与 HIF-1α 抑制剂 LW6 同样

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

的作用,即在转录后水平调控 HIF-1α 的表达,对 HIF-1α mRNA 的表达水平无影响。

本研究仍存在一定的局限性,如仅在体外细胞研究中探究了丹参酮ⅡA 的疗效及相关信号机制,但关于丹参酮ⅡA 是否能在活体内具有同样的效果,及丹参酮是否比其他药物干预成分,如雷公藤红素、银杏叶提取物等具有更好的效果,仍需要进一步的在体研究进行验证;同时丹参酮是否能够通过信号通路发挥同样的功能还有待后续实验进行验证。

综上所述,本研究结果表明丹参酮ⅡA 在缺氧条件下可以抑制 RPE 细胞的增生,促进细胞凋亡,其机制可能与其在缺氧环境下对 HIF-1α 蛋白及其下游因子 VEGF 的抑制作用有关。该结论为临床 PVR 的防治提供了一定的研究基础,但关于丹参酮ⅡA 对 RPE 细胞中其他信号通路、生物学特性及细胞毒性等的影响还有待进一步的研究证实。

参考文献

[1] Zhang J, Zhao J, Bai Y, et al. Effects of p75 neurotrophin receptor on regulating hypoxia-induced angiogenic factors in retinal pigment epithelial cells[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 398(1-2): 123-134. DOI: 10.1007/s11010-014-2212-2.

[2] Badiola I, Olaso E, Crende O, et al. Discoidin domain receptor 2 deficiency predisposes hepatic tissue to colon carcinoma metastasis[J]. Gut, 2012, 61(10): 1465-1472. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300810.

[3] 刘丽娅,马景学,安建斌,等. 姜黄素、丹参单体和苦参碱抑制 IL-1β 诱导下兔 RPE 细细胞增生的体外实验研究[J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(8): 699-704. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.006.
Liu LY, Ma JX, An JB, et al. Inhibitory effect of curcumin, salvia miltiorrhiza and matrine on IL-1β-induced proliferation of rabbit RPE cells *in vitro*[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(8): 699-704. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.006.

[4] Chen H, Wang H, An J, et al. Plumbagin induces RPE cell cycle arrest and apoptosis via p38 MARK and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways in PVR[J/OL]. BMC Complement Altern Med, 2018, 18(1): 89[2018-09-02]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5851073/. DOI: 10.1186/s12906-018-2155-3.

[5] 李杨,徐秒,陈换飞,等. 丹参提取物对糖基化终末产物/缺氧条件下视网膜 Müller 细胞低氧诱导因子-1α 作用的谱效关系研究[J]. 中草药, 2017, 48(11): 2231-2236.

[6] 刘美琳,徐秒,董佳悦,等. 丹参脂溶性成分对 AGEs 条件下视网膜 Müller 细胞 HIF-1 及谷氨酰胺合成酶表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(2): 99-102.

[7] Rosen R, Vagaggini T, Chen Y, et al. Zeaxanthin inhibits hypoxia-induced VEGF secretion by RPE cells through decreased protein levels of hypoxia-inducible factors-1α[J/OL]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 687386[2018-09-02]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4320873/. DOI: 10.1155/2015/687386.

[8] 刘丽璇,吴灵飞,邓巍,等. 丹参酮ⅡA 对低氧条件下人肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响及与 HIF-1α、VEGF 和野生型 P53 蛋白表达的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2014, (12): 2155-2160. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2014.12.007.
Liu LX, Wu LF, Deng W, et al. Effects of tanshinone ⅡA on proliferation, apoptosis and expression of HIF-1α, VEGF and wild-type P53 in human hepatoma HepG2 cells under hypoxia[J]. Chin J Pathophysiol, 2014, (12): 2155-2160. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2014.12.007.

[9] 赵雪峰,魏敬妙,李勇,等. 丹参酮ⅡA 对胃癌细胞的抑制作用及其与 NF-κB 信号通路的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(4): 483-487. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.016.
Zhao XF, Wei JM, Li Y, et al. Inhibitory effect of tanshinone ⅡA on gastric cancer cells and involvement of NF-B signaling pathway[J]. Chin J General Surg, 2014, 23(4): 483-487. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.016.

[10] Zhu Z, Wang Y, Liang D, et al. Sodiumtanshinone ⅡA sulfonate suppresses pulmonary fibroblast proliferation and activation induced by silica: role of the Nrf2/Trx pathway[J]. Toxicol Res (Camb), 2016, 5(1): 116-125. DOI: 10.1039/c5tx00291e.

[11] 刘国安,叶瑞珍,赖江琼. 丹参酮ⅡA 磺酸钠对 NPDR 患者视网膜血流动力学的影响[J]. 临床眼科杂志, 2015, 23(5): 389-391. DOI: 10.3969/j.issn.1006-8422.2015.05.002.
Liu GA, Ye RZ, Lai JQ. Effects of sulfotanshinone sodium on retinal hemodynamics in non-proliferative diabetic retinopathy patients[J]. J Clin Ophthalmol, 2015, 23(5): 389-391. DOI: 10.3969/j.issn.1006-8422.2015.05.002.

[12] Wang H, Geisen P, Wittchen ES, et al. The role of RPE cell-associated $VEGF_{189}$ in choroidal endothelial cell transmigration across the RPE[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(1): 570-578. DOI: 10.1167/iovs.10-5595.

[13] 范妍,路宏,侯定善,等. 缺氧条件下 1-磷酸鞘氨醇对人视网膜色素上皮细胞的促增生和抗凋亡作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(1): 33-37. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.01.007.
Fan Y, Lu H, Hou DS, et al. Promoting proliferation and inhibiting apoptosis effects of sphingosine-1-phospate on human retinal pigment epithelium cells under the hypoxic condition[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(1): 33-37. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.01.007.

[14] 马洪梅,孙凤海,贾健. 视网膜色素上皮细胞的生理功能及其参与的病变[J]. 国际眼科杂志, 2015, 15(7): 1184-1186. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.7.17.
Ma HM, Sun FH, Jia J. Function and pathology of the retinal pigment epithelium[J]. Int Eye Sci, 2015, 15(7): 1184-1186. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.7.17.

[15] Vadlapatla RK, Vadlapudi AD, Pal D, et al. Ritonavir inhibits HIF-1α-mediated VEGF expression in retinal pigment epithelial cells *in vitro*[J]. Eye (Lond), 2014, 28(1): 93-101. DOI: 10.1038/eye.2013.240.

[16] Lin CH, Li CH, Liao PL, et al. Silibinin inhibits VEGF secretion and age-related macular degeneration in a hypoxia-dependent manner through the PI-3 kinase/Akt/mTOR pathway[J]. Br J Pharmacol, 2013, 168(4): 920-931. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02227.x.

[17] Chen MC, Lee CF, Huang WH, et al. Magnolol suppresses hypoxia-induced angiogenesis via inhibition of HIF-1α/VEGF signaling pathway in human bladder cancer cells[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(9): 1278-1287. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.02.009.

[18] Wu J, Ke X, Fu W, et al. Inhibition of hypoxia-induced retinal angiogenesis by specnuezhenide, an effective constituent of *Ligustrum lucidum* Ait., through suppression of the HIF-1α/VEGF signaling pathway[J/OL]. Molecules, 2016, 21(12): 1756[2018-09-04]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6272965/. DOI: 10.3390/molecules21121756.

[19] Liu NN, Zhao N, Cai N. Suppression of the proliferation of hypoxia-induced retinal pigment epithelial cell by rapamycin through the/mTOR/HIF-1α/VEGF/signaling[J]. IUBMB Life, 2015, 67(6): 446-452. DOI: 10.1002/iub.1382.

(收稿日期:2018-11-28　修回日期:2019-04-03)

(本文编辑:刘艳)

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?