

· 实验研究 ·

二甲双胍对炎症状态下人视网膜血管内皮细胞生物学行为的保护作用及其机制

韩静 闫小龙 Xiaoxi Qiao

710038 西安,第四军医大学唐都医院眼科 Eye Care Service, Henry Ford Hospital, MI 48202, US
(韩静); 710038 西安,第四军医大学唐都医院胸腔外科(闫小龙); Eye Care Service, Henry Ford Hospital, MI 48202, US (Xiaoxi Qiao)

通信作者: 韩静, Email: hanjing.cn@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.07.002

【摘要】背景 研究表明炎性过程参与糖尿病视网膜病变(DR)的发生和发展,而炎症作用的靶细胞为视网膜血管内皮细胞(RVECs)。二甲双胍是临幊上常用的降血糖药物,近年来表明其可发挥保护心血管、预防肿瘤和保护血-脑屏障等多重生物学效应,但其对炎症状态诱导的人视网膜血管系统异常是否具有防护作用尚不清楚。**目的** 观察二甲双胍对肿瘤坏死因子- α (TNF- α)刺激下人视网膜血管内皮细胞(RVECs)增生、移行以及分泌单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和白细胞介素-8(IL-8)的影响,探讨二甲双胍对炎症环境中人RVECs生物学行为的保护作用。**方法** 对原代 RVECs 进行培养和传代并分为正常对照组、5 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α (2.5 ng/ml)组、TNF- α +不同浓度(5、10、20、40 mmol/L)二甲双胍组,分别按照分组方法在培养液中添加相应药物处理 24 h。分别于处理前及处理后 24 h 采用 Image-Pro Plus Software 7.0 软件计数各组细胞数目;采用 MTS 法检测各组 RVECs 的吸光度(A_{490})值以评价细胞的代谢活力;采用 Transwell 小室法检测各组迁移细胞数;采用 ELISA 法检测各组细胞上清液中 MCP-1 和 IL-8 质量浓度,并对各组间检测结果进行比较。**结果** 正常对照组、5 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α 组、TNF- α +5 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α +10 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α +20 mmol/L 二甲双胍组和 TNF- α +40 mmol/L 二甲双胍组细胞数目总体比较差异有统计学意义($F=189.31, P<0.01$);各组细胞代谢活力(A_{490} 值)分别为 $0.32\pm0.02, 0.32\pm0.03, 0.97\pm0.02, 0.90\pm0.05, 0.76\pm0.15, 0.74\pm0.05$ 和 0.41 ± 0.03 ;各组细胞移行数目分别为 $(1214\pm49), (1200\pm45), (1648\pm43), (1309\pm48), (1279\pm73), (961\pm60)$ 和 (942 ± 106) /视野;各组细胞上清液中 MCP-1 质量浓度分别为 $(0.385\pm0.050), (0.362\pm0.060), (2.285\pm0.200), (1.131\pm0.180), (0.622\pm0.120), (0.537\pm0.090)$ 和 $(0.492\pm0.130)\mu\text{g}/\text{ml}$, IL-8 质量浓度分别为 $(0.385\pm0.080), (0.390\pm0.120), (1.123\pm0.130), (0.899\pm0.180), (0.680\pm0.060), (0.417\pm0.090)$ 和 $(0.335\pm0.100)\mu\text{g}/\text{ml}$, 组间 A_{490} 值、移行细胞数、MCP-1 质量浓度和 IL-8 质量浓度的总体比较差异均有统计学意义差异($F=73.31, 103.89, 150.92, 268.32$, 均 $P<0.01$), TNF- α 组细胞数目、 A_{490} 值、移行细胞数、MCP-1 质量浓度和 IL-8 质量浓度均明显高于正常对照组, TNF- α +10 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α +20 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α +40 mmol/L 二甲双胍组细胞数目、 A_{490} 值、移行细胞数、MCP-1 质量浓度和 IL-8 质量浓度均明显低于 TNF- α 组, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** 二甲双胍对 TNF- α 诱导的人 RVECs 增生、移行及分泌 MCP-1、IL-8 的能力均有抑制作用, 从而可能对炎症环境中的 RVECs 发挥保护作用。

【关键词】 二甲双胍/药理作用; 人; 视网膜血管内皮细胞/药效; 炎症; 细胞增生; 细胞移行; 肿瘤坏死因子- α ; 单核细胞趋化蛋白-1; 白细胞介素-8

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81200617); 陕西省自然科学基金项目(2012JM4055)

Protection effects of metformin on biological behaviour of human vascular endothelial cells under inflammatory conditions Han Jing, Yan Xiaolong, Xiaoxi Qiao

Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China; Eye Care Service, Henry Ford Hospital, MI 48202, US (Han J); Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China (Yan XL); Eye Care Service, Henry Ford Hospital, MI 48202, US (XX Qiao)

Corresponding author: Han Jing, Email: hanjing.cn@163.com

[Abstract] **Background** Studies showed that inflammatory process participates in the pathogenesis and development of diabetic retinopathy targeting retinal vascular endothelial cells (RVECs). A growing body of evidence

revealed that metformin reduces the risk of micro- and macro-vascular complications by protecting blood-brain barrier, however, whether it plays a protective effect on human retinal vascular by similar mechanism is still unelucidated.

Objective This study was to investigate the effects of metformin on the proliferation, migration and secreting monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8) of human retinal vascular endothelial cells (RVECs) under the stimulation of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). **Methods** RVECs were cultured and divided into normal control group, metformin (5 mmol/L) group, TNF- α 2.5 ng/ml group, and TNF- α +metformin (5, 10, 20 and 40 mmol/L, respectively) groups. Corresponding drugs were added into medium according to grouping for 24 hours. Cell numbers were calculated before and after treatment. The metabolic activity (absorbancy) of RVECs was measured with MTS assay. Cell migration of RVECs was assessed with transwell migration assay. The MCP-1 and IL-8 concentrations in the cell supernatant were detected by ELISA assay. **Results** The number of the cells was significantly different among the normal control group, metformin group, TNF- α group, and TNF- α +metformin (5, 10, 20 and 40 mmol/L, respectively) groups ($F = 189.31, P < 0.01$). The metabolic activities of RVECs were $0.32 \pm 0.02, 0.32 \pm 0.03, 0.97 \pm 0.02, 0.90 \pm 0.05, 0.76 \pm 0.15, 0.74 \pm 0.05$ and 0.41 ± 0.03 ; migrated cell numbers were $(1.214 \pm 49), (1.200 \pm 45), (1.648 \pm 43), (1.309 \pm 48), (1.279 \pm 73), (961 \pm 60)$ and $(942 \pm 106)/\text{field}$; the concentrations of MCP-1 were $(0.385 \pm 0.050), (0.362 \pm 0.060), (2.285 \pm 0.200), (1.131 \pm 0.180), (0.622 \pm 0.120), (0.537 \pm 0.090)$ and $(0.492 \pm 0.130) \mu\text{g}/\text{ml}$, and those of IL-8 were $(0.385 \pm 0.080), (0.390 \pm 0.120), (1.123 \pm 0.130), (0.899 \pm 0.180), (0.680 \pm 0.060), (0.417 \pm 0.090)$ and $(0.335 \pm 0.100) \mu\text{g}/\text{ml}$ in the normal control group, metformin group, TNF- α group, and TNF- α +metformin (5, 10, 20 and 40 mmol/L, respectively) groups, showing significant differences among the groups ($F = 73.31, 103.89, 150.92, 268.32$, all at $P < 0.01$). The cell number, cell metabolic activity, migrated cell number, and MCP-1 and IL-8 levels in the cell supernatant were evidently increased in the TNF- α group compared with the normal control group, and those in the TNF- α +10 mmol/L metformin group, TNF- α +20 mmol/L metformin group and TNF- α +40 mmol/L metformin group were significantly decreased in comparison with the TNF- α group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Metformin can inhibit TNF- α -induced proliferation, migration and MCP-1 and IL-8 secretion of the cells, and therefore plays a protective role on RVECs in the inflammatory environment.

[Key words] Metformin/pharmacology; Human; Retinal vascular endothelial cell/drug effect; Inflammation; Cell proliferation; Cell migration; Tumor necrosis factor- α ; Monocyte chemotactic protein-1; Interleukin-8

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81200617); Natural Science Foundation of Shanxi Province (2012JM4055)

炎症参与糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的病理过程。炎性因子和炎性介质存在于DR所引起的病理改变中,并可导致持续的低水平炎症反应,诱导白细胞的聚集、视网膜血管结构的损害和新生血管的形成^[1-2]。关于DR防治的临床和基础研究均致力于寻找炎症诱导DR的作用靶点及效果持续且不良反应小的靶向治疗措施。二甲双胍是临幊上常用的降血糖药物,近年来发现其还具有保护心血管结构和功能、预防肿瘤发生和进展等多重生物学效应^[3-4]。二甲双胍与抑制炎症过程密切相关,对炎症引起的血-脑屏障损伤也可发挥防治作用^[5-6]。DR为微血管病变导致的血-视网膜屏障的破坏,而二甲双胍对血-视网膜屏障损伤是否也具有防护作用尚不清楚。本研究拟观察在模拟肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)引起的炎症环境中二甲双胍对人视网膜血管内皮细胞(retinal vascular endothelial cells, RVECs)生物学行为的影响,为进一步研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

原代人 RVECs(美国 Cell Systems Corporation 公司);细胞培养液 EGM™-2 BulletKit(美国 Lonza 公司);二甲双胍溶液(美国 Sigma-Aldrich 公司);重组 TNF- α 蛋白(美国 Life Technologies 公司);MTS 试剂盒(美国 Promega 公司);单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8) ELISA 试剂盒、细胞示踪剂(美国 Invitrogen 公司);Transwell 小室(美国 Corning 公司)。倒置相差显微镜(美国 Leica DM IRB 公司)。

1.2 方法

1.2.1 RVECs 的培养和处理 原代 RVECs 置于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 的细胞培养箱内,用含体积分数 10% 胎牛血清的 EGM™-2 细胞培养液培养细胞。细胞贴壁生长至覆盖 80% 的瓶底时用质量分数 0.25% 胰蛋白酶按 1:2 比例消化传代,选用 5~7 代细胞进行实验。将细胞分为正常对照组、二甲双胍

(5 mmol/L) 组、TNF- α (2.5 ng/ml) 组和 TNF- α +二甲双胍组, 二甲双胍浓度分别为 5、10、20、40 mmol/L。各组细胞分别培养 24 h 后进行后续检测。

1.2.2 细胞数目的计算 将 RVECs 以 4 000 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱内培养, 分别于药物处理前及处理后 24 h 在倒置显微镜下照相, 并采用 Image-Pro Plus Software 7.0 软件计数各孔中细胞数目。每组设 4 个复孔, 实验重复 3 次。

1.2.3 MTS 检测细胞代谢活力 将 RVECs 以 4 000 个/孔的密度接种于 96 孔板中, 在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱内培养, 各实验组均于培养后 24 h 更换新鲜培养液 100 μl/孔, 每孔加入 20 μl CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent 试剂, 继续培养 2 h, 使用酶联检测仪在波长 490 nm 处检测各孔的吸光度 (A) 值, 设定正常对照组 A 值为 100%, 计算其他各组细胞代谢活力值。每组设 4 个复孔, 实验重复 3 次。

1.2.4 Transwell 小室法检测细胞的移行 将 RVECs 细胞悬液以 4 000 个/孔的密度接种于 Transwell 上室, 下室中加入含不同药物的培养液, 作用后 24 h 每孔加入 10 μl, 继续作用 1 h 后更换新鲜无血清 EGM™-2 培养液, 荧光显微镜下观察细胞的迁移情况, 分别选取上、下、左、右、中间 5 个视野进行移行细胞的计数, 取平均值。

1.2.5 ELISA 法检测细胞上清液中 MCP-1、IL-8 质量浓度 细胞培养同 1.2.1, 将 RVECs 分别以每孔 1 × 10⁶/ml 的密度接种于 6 孔板, 每孔 2 ml。待细胞进入对数生长期后, 去血清饥饿培养 12 h。于细胞培养后 24 h 取各组细胞上清液, 收集至 Eppendorf 管中, 离心半径 6 cm, 4 °C 条件下 7 500 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书测定细胞上清液中 MCP-1、IL-8 的质量浓度。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件 (IBM-SPSS, Chicago, IL) 进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间数据资料经 Levene 检验证实方差齐。采用均衡分组单因素干预多水平实验设计, 正常对照组、5 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α 组、TNF- α +5 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α +10 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α +20 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α +40 mmol/L 二甲双胍组间细胞数目、细胞代谢活力 (A) 值、移行细胞数目、细胞培养液中 MCP-1 和 IL-8 蛋白质量浓度的总体差异比较均采用

单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-t 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 RVECs 的增生情况

2.1.1 各组细胞数目的比较 正常对照组、5 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α 组、TNF- α +5 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α +10 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α +20 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α +40 mmol/L 二甲双胍组间细胞数目分别为 (714 ± 49)、(706 ± 54)、(1 548 ± 43)、(1 309 ± 48)、(1 179 ± 73)、(961 ± 60) 和 (842 ± 106) 个, 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 189.31, P < 0.01$), 其中 TNF- α 组 RVECs 的细胞数较正常对照组增加 30.5%, 差异有统计学意义 ($P = 0.02$); 与 TNF- α 组比较, TNF- α +5 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α +10 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α +20 mmol/L 二甲双胍组和 TNF- α +40 mmol/L 二甲双胍组细胞数目分别减少 22.7%、23.8%、43.1% 和 46.1%, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 1)。

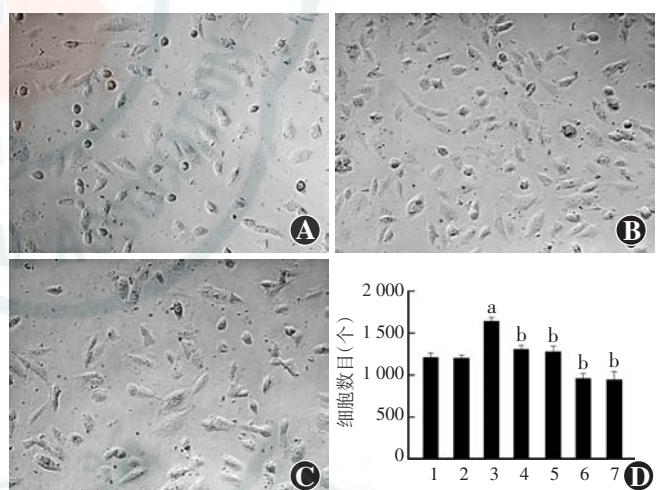


图 1 各组 RVECs 细胞数目的比较 A: 正常对照组细胞数目 ($\times 200$) B: TNF- α 组细胞数目明显多于正常对照组 ($\times 200$) C: TNF- α +40 mmol/L 二甲双胍组细胞数目少于 TNF- α 组 ($\times 200$) D: 各组 RVECs 细胞数目的量化比较 $F = 189.31, P < 0.01$ 。与正常对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与 TNF- α 组相比, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-t 检验, $n=4$) 1: 正常对照组 2: 5 mmol/L 二甲双胍组 3: TNF- α 组 4: TNF- α +5 mmol/L 二甲双胍组 5: TNF- α +10 mmol/L 二甲双胍组 6: TNF- α +20 mmol/L 二甲双胍组 7: TNF- α +40 mmol/L 二甲双胍组

2.1.2 各组细胞活力的比较 正常对照组、5 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α 组、TNF- α +5 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α +10 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α +20 mmol/L 二甲双胍组、TNF- α +40 mmol/L 二甲双胍组细胞活力 (A) 值分别为 0.32 ± 0.02 、 0.32 ± 0.03 、 0.97 ± 0.02 、 0.90 ± 0.05 、 0.76 ± 0.15 、 0.74 ± 0.05 和 0.41 ± 0.03 , 组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 73.31, P < 0.01$),

其中5 mmol/L二甲双胍组细胞代谢活力与正常对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)，TNF- α 组细胞代谢活力较正常对照组升高近3倍，差异有统计学意义($P<0.001$)，TNF- α +10 mmol/L二甲双胍组、TNF- α +20 mmol/L二甲双胍组细胞 A_{490} 值较TNF- α 组分别下降21.6%和22.9%，差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)，TNF- α +40 mmol/L二甲双胍组较TNF- α 组下降了58.4%，差异有统计学意义($P<0.001$)(图2)。

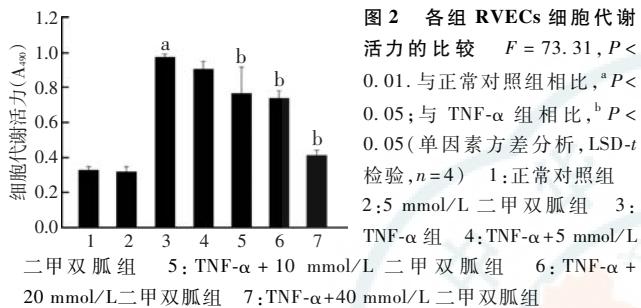


图2 各组RVECs细胞代谢活力的比较 $F = 73.31, P < 0.01$ 。与正常对照组相比,^a $P < 0.05$;与TNF- α 组相比,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-t检验,n=4) 1:正常对照组 2:5 mmol/L二甲双胍组 3:TNF- α +5 mmol/L二甲双胍组 4:TNF- α +10 mmol/L二甲双胍组 5:TNF- α +20 mmol/L二甲双胍组 6:TNF- α +40 mmol/L二甲双胍组

2.2 各组RVECs移行细胞数目的比较

正常对照组、5 mmol/L二甲双胍组、TNF- α 组、TNF- α +5 mmol/L二甲双胍组、TNF- α +10 mmol/L二甲双胍组、TNF- α +20 mmol/L二甲双胍组和TNF- α +40 mmol/L二甲双胍组移行细胞数目分别为(1 214±49)、(1 200±45)、(1 648±43)、(1 309±48)、(1 279±73)、(961±60)和(942±106)个/视野,组间总体比较差异有统计学意义($F = 103.89, P < 0.01$),其中5 mmol/L二甲双胍组移行细胞数与正常对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);TNF- α 组移行细胞数是正常对照组的2.15倍,TNF- α +5 mmol/L二甲双胍组移行细胞数较TNF- α 组减少15.3%,TNF- α +10 mmol/L二甲双胍组较TNF- α 组减少22.4%,TNF- α +20 mmol/L二甲双胍组较TNF- α 组减少41.7%,TNF- α +40 mmol/L二甲双胍组较TNF- α 组减少48.2%,差异均有统计学意义($P<0.001, P=0.05, P<0.001$)(图3)。

2.3 各组细胞上清液中MCP-1和IL-8蛋白质量浓度

正常对照组、5 mmol/L二甲双胍组、TNF- α 组、TNF- α +5 mmol/L二甲双胍组、TNF- α +10 mmol/L二甲双胍组、TNF- α +20 mmol/L二甲双胍组和TNF- α +40 mmol/L二甲双胍组细胞上清液中MCP-1蛋白质量浓度分别为(0.385±0.050)、(0.362±0.060)、(2.285±0.200)、(1.131±0.180)、(0.622±0.120)、(0.537±0.090)和(0.492±0.130) $\mu\text{g}/\text{ml}$;各组细胞上清液中IL-8蛋白质量浓度分别为(0.385±0.080)、(0.390±0.120)、(1.123±0.130)、(0.899±0.180)、(0.680±0.060)、(0.417±0.090)和(0.335±0.100) $\mu\text{g}/\text{ml}$,组

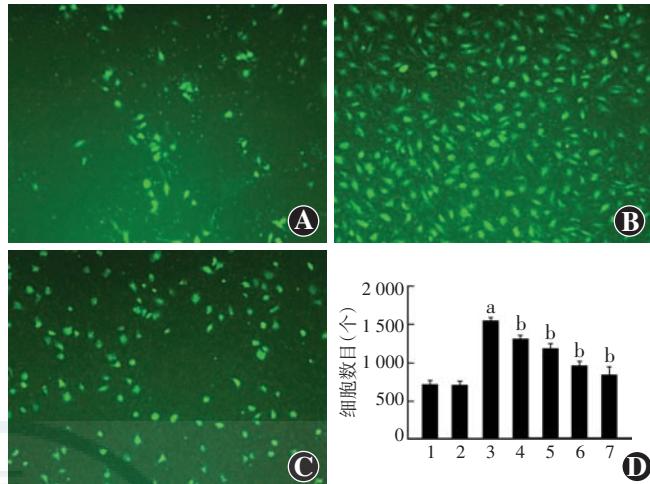


图3 各组移行细胞数目的比较 A: 移行细胞呈绿色荧光,正常对照组移行细胞数目较少($\times 200$) B: TNF- α 组移行细胞数目明显多于正常对照组($\times 200$) C: TNF- α +40 mmol/L二甲双胍组细胞数目少于TNF- α 组($\times 200$) D: 各组移行细胞数目的量化比较 $F = 103.89, P < 0.01$ 。与正常对照组相比,^a $P < 0.05$;与TNF- α 组相比,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-t检验,n=4) 1:正常对照组 2:5 mmol/L二甲双胍组 3:TNF- α 组 4:TNF- α +5 mmol/L二甲双胍组 5:TNF- α +10 mmol/L二甲双胍组 6:TNF- α +20 mmol/L二甲双胍组 7:TNF- α +40 mmol/L二甲双胍组

间总体比较差异均有统计学意义($F = 150.92, 268.32$,均 $P<0.01$),其中5 mmol/L二甲双胍组细胞上清液中MCP-1和IL-8蛋白质量浓度与正常对照组比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),TNF- α 组细胞上清液中MCP-1和IL-8蛋白质量浓度较正常对照组分别升高了5.75倍和2.89倍,差异均有统计学意义($P=0.001, 0.003$),TNF- α +5 mmol/L二甲双胍组细胞上清液中MCP-1质量浓度较TNF- α 组降低约50%,TNF- α +10 mmol/L二甲双胍组、TNF- α +20 mmol/L二甲双胍组和TNF- α +40 mmol/L二甲双胍组细胞上清液中MCP-1蛋白质量浓度均降低约80%,IL-8质量浓度均降低约72.7%,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)(图4,5)。

3 讨论

在DR发展中多种炎性介质参与,这些炎性介质主要作用于RVECs和周细胞,从而诱导血管炎性反应,造成视网膜血管内屏障的破坏,引起渗漏、微血管阻塞和组织缺血^[7]。TNF- α 可启动炎症反应和诱导血管生成^[8-9]。RVECs是视网膜内屏障的重要组成部分,也是炎症攻击的主要靶细胞。因此,本研究中采用TNF- α 作为刺激物模拟炎症环境,结果发现TNF- α 作用后RVECs增生和移行活跃,分泌MCP-1和IL-8的量显著升高。MCP-1和IL-8均为重要的炎性因子,其表达水平升高是活动性炎症反应的指标之一,并能进

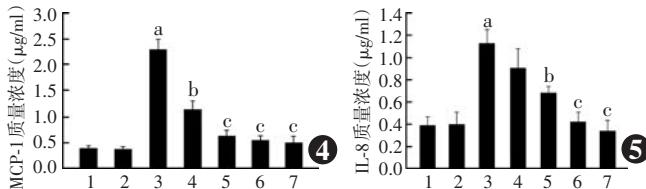


图4 各组细胞上清液中MCP-1质量浓度的比较 $F=150.92, P<0.01$ 。与正常对照组相比,^a $P<0.05$;与TNF- α 组相比,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ (单因素方差分析,LSD-t检验,n=3) 1:正常对照组 2:5 mmol/L二甲双胍组 3:TNF- α 组 4:TNF- α +5 mmol/L二甲双胍组 5:TNF- α +10 mmol/L二甲双胍组 6:TNF- α +20 mmol/L二甲双胍组 7:TNF- α +40 mmol/L二甲双胍组 MCP:单核细胞趋化蛋白

图5 各组细胞上清液中IL-8质量浓度的比较 $F=268.32, P<0.01$ 。与正常对照组相比,^a $P<0.05$;与TNF- α 组相比,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ (单因素方差分析,LSD-t检验,n=3) 1:正常对照组 2:5 mmol/L二甲双胍组 3:TNF- α 组 4:TNF- α +5 mmol/L二甲双胍组 5:TNF- α +10 mmol/L二甲双胍组 6:TNF- α +20 mmol/L二甲双胍组 7:TNF- α +40 mmol/L二甲双胍组 IL:白细胞介素

一步诱导内皮细胞周围单核细胞的聚集和黏附,本实验结果符合细胞在炎症刺激下生物学活性的变化,一定程度上反映了TNF- α 诱导的hRVECs的炎症状态。传统观点认为二甲双胍是通过活化AMPK降低肝糖原的生成、提高周围组织对葡萄糖的利用度来降低血糖的,近年研究发现二甲双胍具有多重效应,如减少糖尿病患者大血管和微血管的并发症以及肿瘤的发生率^[3],这些效应与抑制炎症及其他因素诱发的新血管密切相关^[5,10]。细胞增生和移行是血管内皮细胞在炎症环境中新生血管生成早期的病理特征,本结果显示,单独给予5 mmol/L二甲双胍对RVECs的细胞数目、细胞增生活力和细胞移行均未发生显著影响,说明在低剂量药物作用下,细胞生物学活性均未发生显著改变,然而>10 mmol/L的二甲双胍以剂量依赖的方式抑制TNF- α 诱导RVECs的生物学行为,证实药物对炎症刺激的细胞增生有抑制作用。本研究中发现,低剂量二甲双胍对RVECs分泌MCP-1和IL-8的能力无显著影响,随着剂量增加,其对TNF- α 诱导RVECs分泌MCP-1和IL-8的抑制作用增强。糖尿病可引起视网膜局部和全身多种炎性因子和细胞因子的增加,其中包括IL-8和MCP-1^[11-12]。因此,二甲双胍可能对糖尿病患者暴露于炎症环境中的RVECs发挥保护作用。二甲双胍通过激活AMPK抑制I κ Bs激酶(I κ B kinase,I κ K)的活性,进而导致核转录因子κB(nuclear factor-κB,NF-κB)通路受抑制^[13]。NF-κB作为转录因子可介导MCP-1、IL-8等多种细胞因子的调控^[14-15],因此本研究中观察到的二甲双胍对MCP-1和IL-8的抑制作用可能与AMPK-NF-κB通路有关,尚有待进一步研究。

综上所述,二甲双胍可阻断TNF- α 诱导的人RVECs增生和移行以及细胞因子MCP-1、IL-8的上调,

从而可能对炎症环境中的RVECs发挥保护作用。本研究结果为探索二甲双胍对视网膜血管内屏障是否具有保护作用提供实验依据,为DR的防治提供新的思路。

参考文献

- [1] Guariguata L. By the numbers: new estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2012, 98 (3) : 524-525. DOI:10.1016/j.diabres.2012.11.006.
- [2] Lee R, Wong TY, Sabanayagam C. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss [J/OL]. Eye Vis (Lond), 2015, 2 : 17 [2017-02-11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4657234/. DOI:10.1186/s40662-015-0026-2.
- [3] Leone A, Di GE, Buzzese F, et al. New perspective for an old antidiabetic drug: metformin as anticancer agent [J]. Cancer Treat Res, 2014, 159 : 355-376. DOI:10.1007/978-3-642-38007-5_21.
- [4] Almabrouk TA, Ewart MA, Salt IP, et al. Perivascular fat, AMP-activated protein kinase and vascular diseases [J]. Br J Pharmacol, 2014, 171 (3) : 595-617. DOI:10.1111/bph.12479.
- [5] Tan BK, Adya R, Chen J, et al. Metformin decreases angiogenesis via NF-κB and Erk1/2/Erk5 pathways by increasing the antiangiogenic thrombospondin-1 [J]. Cardiovasc Res, 2009, 83 (3) : 566-574. DOI:10.1093/cvr/cvp131.
- [6] Xavier DO, Amaral LS, Gomes MA, et al. Metformin inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model [J]. Biomed Pharmacother, 2010, 64 (3) : 220-225. DOI:10.1016/j.biopha.2009.08.004.
- [7] Tomić TJ, Savić AM, Vidaković AS, et al. Arm assist robotic system versus matched conventional therapy for poststroke upper limb rehabilitation: a randomized clinical trial [J/OL]. Biomed Res Int, 2017, 2017 : 7659893 [2017-02-12]. https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/7659893/. DOI:10.1155/2017/7659893.
- [8] Thapa D, Lee JS, Park MA, et al. Inhibitory effects of clotrimazole on TNF-alpha-induced adhesion molecule expression and angiogenesis [J]. Arch Pharm Res, 2009, 32 (4) : 593-603. DOI:10.1007/s12272-009-1416-6.
- [9] Chen DY, Su GF. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis association with proliferative diabetic retinopathy and promotes proliferation and collagen synthesis in retinal ARPE-19 cells [J]. Genet Mol Res, 2016, 15 (1) : 1-11. DOI:10.4238/gmr.15016920.
- [10] Esfahanian N, Shakiba Y, Nikbin B, et al. Effect of metformin on the proliferation, migration and MMP-2 and -9 expression of human umbilical vein endothelial cells [J]. Mol Med Rep, 2012, 5 (4) : 1068-1074. DOI:10.3892/mmr.2012.753.
- [11] 马燕. 炎症反应和炎性因子与糖尿病视网膜病变的研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31 (1) : 86-90. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.01.021.
- Ma Y. Research advance in the relationship of inflammatory reaction and inflammatory factor with diabetic retinopathy [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31 (1) : 86-90. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.01.021.
- [12] Kaštelan S, Tomić M, Gverović AA, et al. Inflammation and pharmacological treatment in diabetic retinopathy [J/OL]. Mediators Inflamm, 2013, 2013 : 213130 [2017-02-19]. https://www.hindawi.com/journals/mi/2013/213130/. DOI:10.1155/2013/213130.
- [13] Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, et al. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor κB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells [J]. Hypertension, 2006, 47 (6) : 1183-1188. DOI:10.1161/01.HYP.000221429.94591.72.
- [14] Hu DN, Bi M, Zhang DY, et al. Constitutive and LPS-induced expression of MCP-1 and IL-8 by human uveal melanocytes in vitro and relevant signal pathways [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55 (9) : 5760-5769. DOI:10.1167/iovs.14-44685.
- [15] 张淑锐, 谢平, 袁冬青, 等. 实验性脉络膜新生血管形成过程中巨噬细胞及单核细胞趋化蛋白-1的作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33 (12) : 1095-1101. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.12.009.
- Zhang SK, Xie P, Yuan DQ, et al. Effects of macrophages and monocyte chemoattractant protein-1 during experimental choroidal neovascularization [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33 (12) : 1095-1101. DOI:10.3760/cma.j.issn.20950160.2015.12.009.

(收稿日期:2017-04-12)

(本文编辑:尹卫婧 杜娟)