

槲皮素通过整合素信号通路调控视网膜脉络膜新生血管生成的机制研究

岳岩坤 王海伟 邓禹 田沫 王寅琳 张恩魁

100038 北京,首都医科大学附属复兴医院眼科

通信作者:岳岩坤,Email:yueyk@sina.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.08.007

【摘要】 **目的** 探讨槲皮素体外、体内抑制视网膜新生血管及脉络膜新生血管(CNV)生成及发展的作用机制。**方法** 体外研究采用人脐静脉内皮细胞(HUVECs),体内研究采用氧诱导视网膜病变(OIR)动物模型及激光诱导的 CNV 动物模型。细胞学研究中分为正常对照组、血管内皮生长因子 165(VEGF-165)处理组和 VEGF-165+槲皮素处理组。利用细胞计数试剂盒 8(CCK8)及 Transwell 法检测 HUVECs 的增殖及迁移能力,采用 Western blot 法检测整合素 $\alpha 5$ 及整合素 $\beta 3$ 蛋白的表达。体内研究中利用 OIR 动物模型及激光诱导的 CNV 动物模型评估腹腔内注射槲皮素在抑制视网膜新生血管及 CNV 中的效果,C57 乳母鼠和 6~8 周龄 C57 小鼠各 18 只,均采用随机数字表法随机分为正常对照组、模型对照组和槲皮素处理组,每组 6 只,采用 Western blot 法检测各组视网膜中整合素 $\alpha 5$ 和整合素 $\beta 3$ 蛋白的表达。**结果** 在体外研究中,20 ng/ml VEGF-165 可以促进 HUVECs 的增殖及迁移,而 50 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素可以抑制 HUVECs 的增殖及迁移,正常对照组、VEGF-165 处理组以及 VEGF-165+槲皮素处理组细胞增殖值和穿过 Boyden 小室的细胞数量整体比较,差异均有统计学意义($F_{\text{分组}} = 18.51, P = 0.00; F = 85.74, P = 0.00$)。在体内研究中,槲皮素连续腹腔内注射 20 mg/(kg·d)可以减少 OIR 模型视网膜无血管灌注区面积,并减少激光诱导的 CNV 面积,与模型对照组相比,差异均有统计学意义($t = 6.02, P = 0.00; t = 5.79, P = 0.00$)。Western blot 检测显示,VEGF-165+槲皮素处理 24 h 组整合素 $\alpha 5$ 和整合素 $\beta 3$ 蛋白表达量均较 VEGF-165 处理组明显降低,差异均有统计学意义($t = 4.46, P < 0.05; t = 5.18, P < 0.01$)。VEGF-165+槲皮素处理 48 h 组整合素 $\alpha 5$ 和整合素 $\beta 3$ 蛋白的表达量较 VEGF-165+槲皮素处理 24 h 组有所升高,但与 VEGF-165 处理组相比仍降低,差异均有统计学意义($t = 6.54, P < 0.05; t = 7.17, P < 0.01$)。在 OIR 及 CNV 模型中,槲皮素可以抑制模型对照组中整合素 $\alpha 5$ 及整合素 $\beta 3$ 的表达,差异均有统计学意义($t = 5.44, 13.52, \text{均 } P = 0.00$)。**结论** 槲皮素可以通过调控整合素抑制视网膜新生血管的形成,为新生血管的治疗提供新的途径。

【关键词】 槲皮素; 视网膜新生血管; 脉络膜新生血管; 脐静脉内皮细胞; 整合素

The suppression mechanisms of quercetin in retinal and choroidal neovascularization through integrin signal pathway Yue Yankun, Wang Haiwei, Deng Yu, Tian Mo, Wang Yinlin, Zhang Enkui

Department of Ophthalmology, Fu Xing Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

Corresponding author: Yue Yankun, Email: yueyk@sina.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the mechanisms of quercetin in retinal angiogenesis via *in vitro* and *in vivo* studies. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was used in *in vitro* study, and oxygen-induced retinopathy (OIR) and laser-induced choroidal neovascularization (CNV) animal models were used in *in vivo* study. In the *in vitro* cell study, normal control group, VEGF-165 treatment group and VEGF-165 combined with quercetin treatment group were used. Cell counting kit-8 (CCK8) and Transwell were used to measure HUVECs cell viability, including proliferation and migration. OIR and CNV animal models were administrated through intraperitoneal injection of quercetin, and the non-perfusion area and CNV area were evaluated. Western blot assay was used to detect the expression of integrin $\alpha 5$ and integrin $\beta 3$ expression. In the animal study, 18 breastfeeding mice and 18 infant mice were randomly divided into normal control group, model control group and quercetin treatment group, 6 for each group. The animal feeding and use was in accordance with the standards set by the ARVO, and the experiment was approved by the Ethic Committee for Experimental Animal of Fu Xing Hospital, Capital Medical University (2016-KY-0036).

Results In the *in vitro* study, VEGF-165 (20 ng/ml) promoted the proliferation and migration of HUVECs, while quercetin (50 $\mu\text{mol/L}$) inhibited HUVECs proliferation and migration significantly, comparing to the VEGF-165 treatment group (proliferation: $F_{\text{groups}} = 18.51, P = 0.00$; migration: $F = 85.74, P = 0.00$). In the *in vivo* studies, quercetin 20 mg/(kg·day) decreased the non-perfusion area and CNV area comparing to the untreated groups, with significant differences between them ($t = 6.02, P = 0.00; t = 5.79, P = 0.00$). Besides, quercetin down-regulated the expression of integrin $\alpha 5$ and integrin $\beta 3$ significantly both in the *in vitro* and *in vivo* studies. Western blot test showed

that integrin $\alpha 5$ and integrin $\beta 3$ in VEGF-165+quercetin processing 24 hours group were significantly decreased than those in the VEGF-165 group, with significant differences between them ($t = 4.46, P < 0.05$; $t = 5.18, P < 0.01$). Compared with the VEGF-165+quercetin 24 hours group, the integrin $\alpha 5$ and integrin $\beta 3$ in VEGF-165+quercetin processing 48 hours group were increased, but they were still significantly increased than those in the VEGF-165 group, with significant differences between them ($t = 6.54, P < 0.05$; $t = 7.17, P < 0.01$). For the animal studies, quercetin also inhibited the levels of integrin $\alpha 5$ and integrin $\beta 3$ in OIR and CNV models ($t = 5.44, 13.52$; both at $P = 0.00$). **Conclusions** Quercetin can inhibit the retinal and choroidal neovascularization through integrin pathway, which provides a new treatment strategy for clinical therapy.

[Key words] Quercetin; Retinal angiogenesis; Choroidal neovascularization; Umbilical vein endothelial cells; Integrin

视网膜新生血管及脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP)、湿性年龄相关性黄斑变性 (wet age-related macular degeneration, wAMD)、病理性近视、中心性渗出性脉络膜病变等眼病的首要致病因素^[1]。由于新生血管的管壁发育不完整、细胞连接疏松、血管脆性大, 极易发生渗出和破裂出血, 引起结缔组织增生, 进而形成瘢痕, 导致不可逆盲的发生^[2]。目前针对这一发病过程唯一有效的治疗途径是抑制新生血管的生成及发展。在新生血管的发病过程中, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的高表达在病变进程中发挥重要作用, 因此抗 VEGF 疗法成为该治疗领域的焦点, 与此同时这一治疗所引发的不良反应也日益受到重视^[3]。槲皮素又名槲皮黄素, 属于黄酮类化合物, 多以甙的形式存在, 广泛分布在蔬果中, 如芦丁、葡萄、苹果、洋葱等^[4]。既往研究显示, 槲皮素具有抑制肿瘤扩散、抑制眼病新生血管形成等作用, 但研究机制未明^[5-6]。本研究探讨槲皮素在体外、体内抑制视网膜新生血管及 CNV 生成及发展的作用机制, 为视网膜新生血管及 CNV 的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57 乳母鼠和 6~8 周龄、体质量 15~20 g 的 C57 小鼠各 18 只 (购自北京大学医学部动物中心), 其中 C57 乳母鼠用于氧诱导的视网膜病变动物 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 模型, C57 小鼠用于激光诱导的 CNV 动物模型。采用随机数字表法将 2 种实验动物均随机分为正常对照组、模型对照组和槲皮素处理组, 每组 6 只。实验动物的使用均遵循 ARVO 中有关动物使用的规定, 本研究通过首都医科大学附属复兴医院动物实验伦理委员会批准 (批文号: 2016-KY-0036)。

1.1.2 细胞来源及主要试剂 人脐静脉内皮细胞

(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 购自美国组织细胞库, 并根据说明书培养于含有体积分数 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Hyclone 公司) 的 DMEM 培养液中。槲皮素 ($C_{15}H_{10}O_7$; 相对分子质量为 302.24, 纯度 $\geq 95\%$) (美国 Sigma-Aldrich 公司); 整合素 $\alpha 5$ 抗体 (#98204, 1:1 000)、整合素 $\beta 3$ (#4702, CST, 1:1 000)、 β -actin (#4970S, 1:1 000) (美国 CST 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞计数试剂盒 8 法检测细胞增生能力 选择对数生长期的 HUVECs, 质量分数 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化细胞, 并以 1×10^4 /孔转移至 96 孔板。37 °C、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 4 h, 待细胞贴壁后, 将培养液换为含有 1% FBS 的 1640 同步化培养 12 h。将细胞分为正常对照组、VEGF-165 处理组和 VEGF-165+槲皮素处理组。在 VEGF-165 处理组中, 培养液更换为含有 VEGF-165 (20 ng/ml) 的 1640 培养液, VEGF-165+槲皮素处理组培养液更换为含有 20 ng/ml VEGF-165 和 50 μ mol/L 槲皮素的培养液。继续培养 24 h 和 48 h 后, 换液为 100 μ l 含质量分数 10% 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 的完全培养液。37 °C 培养 1 h, 利用酶标仪检测波长 450 nm 处的吸光度 (A_{450}) 值。每组设 5 个复孔, 根据 A 值均值计算各组细胞增生值。细胞增生值 = 实验组 A 值/对照组 A 值 $\times 100\%$ 。实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.2 Transwell 法检测细胞迁移能力 选择对数生长期的 HUVECs, 将细胞分为正常对照组、VEGF-165 处理组和 VEGF-165+槲皮素处理组。同步化后 VEGF-165 处理组和 VEGF-165+槲皮素处理组将培养液分别换成含有 20 ng/ml VEGF-165 和含有 20 ng/ml VEGF-165+50 μ mol/L 槲皮素的培养基继续培养 24 h。0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化细胞后, 根据计数结果以 100 μ l/小室 (含有 5×10^4 细胞) 转入 Boyden 小室的上室。在 Boyden 小室的下室加入含有 10% FBS 的 1640 培养液, 每孔 600 μ l。37 °C 培养 4 h 后, 取出 Boyden 小室并浸入含有质量分数 4% 多聚甲醛和 DAPI (1:1 000)

的 12 孔板 30 min。棉签轻拭小室内部附着的细胞,尽可能移除内侧 HUVECs。随后,将小室倒置于载玻片上,并用荧光显微镜拍照。随机选择 5 个不同视野照相并计数,取平均值。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次,取平均值。

1.2.3 OIR 动物模型的建立及分组处理 将 6 窝乳母鼠分为正常对照组、模型对照组和槲皮素处理组。将模型对照组和槲皮素处理组的 4 窝乳母鼠和出生后第 7 天(P7)的乳鼠置于含有体积分数(75±2)% O₂ 的氧箱中饲养 5 d。P12 取出乳母鼠和乳鼠,置于常氧环境中继续饲养 5 d,每窝选择状态较好的乳鼠 3 只进行后续实验。造模的 4 窝乳母鼠中,2 窝乳鼠作为模型对照组,另外 2 窝乳鼠按照 20 mg/kg 的剂量腹腔内注射槲皮素作为治疗组。未造模的 2 窝乳母鼠饲养于正常氧气环境作为正常对照组。P18 将所有乳鼠在麻醉条件下,经心脏灌注 50 mg 2×10⁶ FITC-葡聚糖(美国 Sigma 公司)0.5 ml,随后取出乳鼠眼球固定于 4% 多聚甲醛溶液中 30 min。在解剖显微镜下撕除乳鼠眼球的巩膜壁及脉络膜,暴露视网膜,同时将视网膜玻璃体面向上,平铺于载玻片上,在荧光显微镜下进行拍照。用 Image J 软件(National Institutes of Health, Bethesda, MD)计算视网膜无血管灌注区面积。视网膜无血管灌注区面积=无血管灌注区面积/全视网膜面积×100%。每组 6 只乳鼠,共 12 只视网膜。

1.2.4 激光诱导的 CNV 动物模型及处理 C57 小鼠扩瞳后使用质量分数 10% 水合氯醛腹腔内注射麻醉。利用激光(波长 532 nm,功率为 500 mW,光斑直径为 50 μm,曝光时间为 100 ms)方法诱导右眼 CNV。当进行视网膜激光光凝时,见到气泡产生时提示 Bruch 膜击破,判断为造模成功。造模成功后的 12 只小鼠应用随机数字表法随机分为 2 个组,每组各 6 只,其中槲皮素处理组的 6 只 CNV 小鼠连续给予腹腔内注射 20 mg/kg 槲皮素 14 d,模型对照组的 6 只小鼠给予腹腔内注射生理盐水。造模后第 15 天进行荧光素眼底血管造影(fluorescence fundus angiography, FFA)检查,利用 Phoenix Micron IV Retinal Imaging Microscope(美国 Phoenix 技术集团公司)记录,用 Image J 软件计算视网膜激光诱导 CNV 渗漏的面积,比较槲皮素处理组与模型对照组的差异。

1.2.5 Western blot 法检测 HUVECs 及视网膜中的整合素 α5 及整合素 β3 的相对表达量 HUVECs、OIR 模型和 CNV 模型视网膜用常规 Western blot 法处理,并提取总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度。配置质量分数 12% SDS-PAGE,每孔加入 30 μg 蛋白样品。

100 V 恒压电泳 1.5 h 后进行 PVDF 转膜。用质量分数 0.5% 脱脂奶粉(TBST 溶液)封闭后加入整合素 α5 及整合素 β3 一抗,4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,加入相应二抗孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次,通过化学发光免疫印迹法检测目的蛋白,以 β-actin 为内参蛋白。目的蛋白的相对表达量(%)=目的蛋白的表达量/对照组蛋白的表达量。Image J 软件分析蛋白的灰度,比较槲皮素处理组与对照组(体外细胞学实验中的对照组为空白对照及 VEGF-165 处理组;体内动物实验中的对照组为模型对照组)差异。每组实验重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计学软件和 Graphpad Prism 6.0(Graphpad software Inc, San Diego, CA, USA)进行统计分析和作图。本研究中测量指标的数据资料经正态检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组细胞培养不同时间后 HUVECs 细胞增殖值比较采用两因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 检验。3 个组穿过细胞数量、无灌注区面积、新生血管渗漏面积、整合素 α5 和整合素 β3 相对表达量的整体比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Post Hoc 检验。各模型对照组与槲皮素处理组整合素 α5 和整合素 β3 蛋白相对表达量的差异比较采用独立样本 *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 槲皮素抑制 HUVECs 细胞增殖

各组细胞培养不同时间后 HUVECs 细胞增殖值比较,差异均有统计学意义($F_{\text{分组}} = 18.51, P = 0.00$; $F_{\text{时间}} = 13.45, P < 0.01$),其中 VEGF-165 处理组 HUVECs 细胞增殖值明显高于同时间点正常对照组,VEGF-165+槲皮素处理组 HUVECs 细胞增殖值明显低于同时间点 VEGF-165 处理组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(表 1)。

表 1 各组细胞培养不同时间后 HUVECs 细胞增殖值比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	培养不同时间后 HUVECs 细胞增殖值	
		24 h	48 h
正常对照组	3	100.0±0.0	100.0±0.0
VEGF-165 处理组	3	125.7±1.9 ^a	136.4±3.0 ^a
VEGF-165+槲皮素处理组	3	101.4±2.5 ^b	112.6±2.8 ^b

注: $F_{\text{分组}} = 18.51, P = 0.00$; $F_{\text{时间}} = 13.45, P < 0.01$ 。与同时间点正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与同时间点 VEGF-165 处理组比较,^b $P < 0.01$ (两因素方差分析, Bonferroni 检验) HUVECs:人脐静脉血管内皮细胞; VEGF:血管内皮生长因子

2.2 槲皮素抑制 HUVECs 细胞移行

正常对照组中穿过小室的 HUVECs 细胞数量极少, VEGF-165 处理组中可穿过小室的细胞数量明显增多, 而经过槲皮素处理后穿过小室的细胞数量明显减少(图 1A ~ C)。正常对照组、VEGF-165 处理组以及 VEGF-165+槲皮素处理组穿过小室的细胞数量分别为 4.4 ± 0.7 、 72.3 ± 5.6 和 35.89 ± 2.9 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 85.74, P = 0.00$), 其中 VEGF-165 处理组穿过小室的细胞数量较正常对照组明显增多, VEGF-165+槲皮素处理组穿过小室的细胞数量较 VEGF-165 处理组明显减少, 但仍较正常对照组增多, 差异均有统计学意义 ($t = 17.43, P = 0.00; t = 5.76, P = 0.00; t = 9.92, P = 0.00$) (图 1D)。

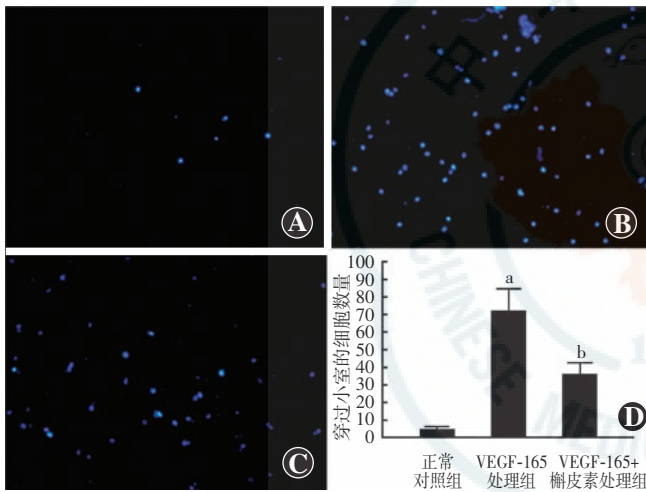


图 1 Boyden 小室 Transwell 法检测各组细胞迁移能力 A: 荧光显微镜下可见正常对照组穿过小室的细胞数量极少 (DAPI ×20) B: 荧光显微镜下可见 VEGF-165 处理组穿过小室的细胞数量明显增加 (DAPI ×20) C: 荧光显微镜下可见 VEGF-165+槲皮素处理组较 VEGF-165 相比减少 (DAPI ×20) D: 各组穿过小室的细胞数量的量化比较 $F = 85.74, P = 0.00$ 。与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 VEGF-165 处理组比较, ^b $P < 0.01$ (单因素方差分析, Post Hoc 检验, $n = 3$) 注: VEGF: 血管内皮生长因子

2.3 槲皮素减少 OIR 模型中视网膜无灌注区面积

正常对照组中血管分支清晰, 仅在视神经附近可见极少部分无灌注区; OIR 模型组血管迂曲及玻璃体血管, 在视神经向外延伸可见大面积无血管区域; 槲皮素处理组视网膜血管无灌注区明显减少(图 2A ~ C)。正常对照组、OIR 模型组和槲皮素处理组无灌注区面积百分比分别为 $(1.9 \pm 0.4)\%$ 、 $(41.5 \pm 2.3)\%$ 和 $(23.3 \pm 2.0)\%$, 整体比较差异有统计学意义 ($F = 32.16, P < 0.01$), 其中 OIR 模型组无灌注区面积较正常对照组明显增大, 槲皮素处理组无灌注区面积较 OIR 模型组明显减小, 但仍较正常对照组增大, 差异均有统计学意义 ($t = 27.36, P = 0.00; t = 6.02, P = 0.00;$

$t = 13.18, P = 0.00$) (图 2D)。

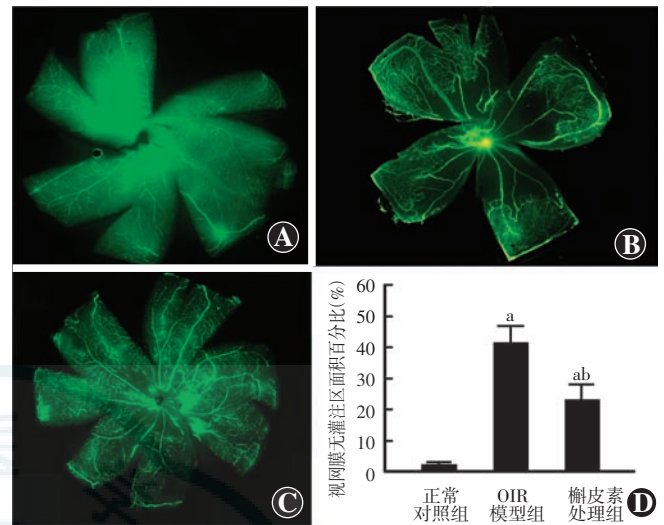


图 2 各组 OIR 模型视网膜无灌注区比较 A: 荧光显微镜下正常对照组仅在视神经附近可见无灌注区 B: 荧光显微镜下 OIR 模型组可见大面积无灌注区 C: 荧光显微镜下槲皮素处理组视网膜无灌注区明显减少 D: 各组 OIR 模型视网膜无灌注区的量化比较 $F = 32.16, P < 0.01$ 。与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 OIR 模型组比较, ^b $P < 0.01$ (单因素方差分析, Post Hoc 检验, $n = 12$) 注: OIR: 氧诱导视网膜病变

2.4 槲皮素抑制激光诱导的 CNV 形成

槲皮素腹腔内注射可以明显抑制激光诱导的 CNV 的生成及发展, 其中 CNV 模型对照组新生血管渗漏面积为 (197.5 ± 16.2) 像素, 槲皮素处理组渗漏面积明显缩小, 为 (95.17 ± 7.2) 像素, 2 个组比较差异有统计学意义 ($t = 5.79, P = 0.00$) (图 3)。

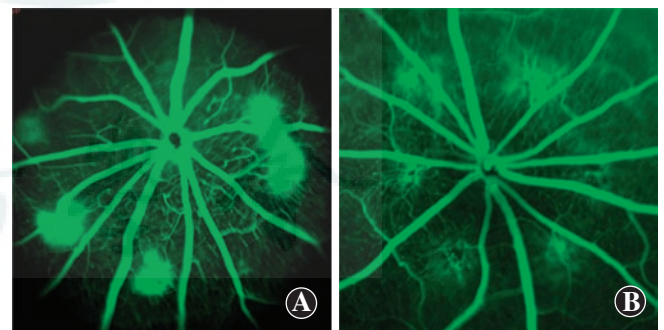


图 3 FFA 检查 CNV 模型对照组和槲皮素处理组新生血管渗漏面积比较 A: 模型对照组可见激光斑处 5 个 CNV 渗漏点 B: 槲皮素处理组中渗漏明显减少, 仅见激光斑处血管影

2.5 槲皮素抑制体外及体内整合素 α5 及整合素 β3 的表达

VEGF 可以诱导整合素 α5 及整合素 β3 的表达升高。在 OIR 和 CNV 模型中, 整合素 α5 及整合素 β3 在视网膜中的表达升高, 而槲皮素腹腔内注射可以部分抑制整合素的表达(图 4)。VEGF-165 处理组、VEGF-165+槲皮素处理 24 h 组和 VEGF-165+槲皮素

处理 48 h 组 HUVECs 中整合素 $\alpha 5$ 和整合素 $\beta 3$ 的表达整体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 27.63, P = 0.00; F = 34.16, P = 0.00$)。VEGF-165+槲皮素处理 24 h 组整合素 $\alpha 5$ 和整合素 $\beta 3$ 蛋白表达量均较 VEGF-165 处理组明显降低, 差异均有统计学意义 ($t = 4.46, P < 0.05; t = 5.18, P < 0.01$)。VEGF-165+槲皮素处理 48 h 组整合素 $\alpha 5$ 和整合素 $\beta 3$ 蛋白的表达量较 VEGF-165+槲皮素处理 24 h 组有所升高, 但与 VEGF-165 处理组相比仍降低, 差异均有统计学意义 ($t = 6.54, P < 0.05; t = 7.17, P < 0.01$) (表 2)。槲皮素处理组整合素 $\alpha 5$ 及整合素 $\beta 3$ 相对表达量均较 OIR 模型对照组明显降低, 差异均有统计学意义 ($t = 5.44、13.52, 均 P = 0.00$) (表 3)。槲皮素处理组视网膜中整合素 $\alpha 5$ 及整合素 $\beta 3$ 相对表达量均较 CNV 模型对照组明显降低, 差异均有统计学意义 ($t = 11.70、9.52, 均 P = 0.00$) (表 3)。

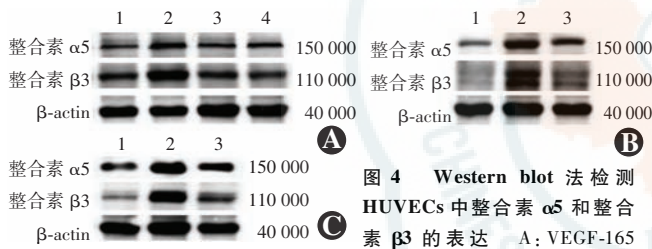


图 4 Western blot 法检测 HUVECs 中整合素 $\alpha 5$ 和整合素 $\beta 3$ 的表达 A: VEGF-165 处理组整合素 $\alpha 5$ 和整合素 $\beta 3$ 表达升高最为明显, 槲皮素处理 24 h 后表达最低, 随着处理时间的延长, 整合素 $\alpha 5$ 和整合素 $\beta 3$ 表达略有升高 1: 正常对照组 2: VEGF-165 处理组 3: VEGF-165+槲皮素处理 24 h 组 4: VEGF-165+槲皮素处理 48 h 组 B: OIR 模型组整合素 $\alpha 5$ 和整合素 $\beta 3$ 表达明显升高, 槲皮素处理蛋白表达降低 1: 正常对照组 2: OIR 模型对照组 3: 槲皮素处理组 C: CNV 模型对照组整合素 $\alpha 5$ 和整合素 $\beta 3$ 表达明显升高, 槲皮素处理组蛋白表达降低 1: 正常对照组 2: CNV 模型对照组 3: 槲皮素处理组

表 2 各组 HUVECs 中整合素 $\alpha 5$ 和整合素 $\beta 3$ 的表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	整合素 $\alpha 5$	整合素 $\beta 3$
VEGF-165 处理组	3	2.16±0.18	3.41±0.32
VEGF-165+槲皮素处理 24 h 组	3	1.69±0.23 ^a	1.74±0.26 ^a
VEGF-165+槲皮素处理 48 h 组	3	1.94±0.36 ^a	1.61±0.22 ^a
F 值		27.63	34.16
P 值		0.00	0.00

注: 与 VEGF-165 处理组比较, ^a $P < 0.01$ (单因素方差分析, Post Hoc 检验) HUVECs: 人脐静脉血管内皮细胞; VEGF: 血管内皮生长因子

表 3 OIR 模型对照组和槲皮素处理组整合素 $\alpha 5$ 及整合素 $\beta 3$ 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	整合素 $\alpha 5$	整合素 $\beta 3$
OIR 模型对照组	12	5.22±0.31	6.41±0.64
槲皮素处理组	12	3.17±0.23	2.41±0.36
t 值		5.44	13.52
P 值		0.00	0.00

注: OIR: 氧诱导视网膜病变 (独立样本 t 检验)

表 4 CNV 模型对照组和槲皮素处理组整合素 $\alpha 5$ 及整合素 $\beta 3$ 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	整合素 $\alpha 5$	整合素 $\beta 3$
CNV 模型对照组	6	4.24±0.27	5.21±0.52
槲皮素处理组	6	2.17±0.11	2.76±0.46
t 值		11.70	9.52
P 值		0.00	0.00

注: CNV: 脉络膜新生血管 (独立样本 t 检验)

3 讨论

眼底新生血管是指已存在的正常视网膜和脉络膜毛细血管在各种病理因素的刺激下, 经历出芽、迁移、增生、基质重塑等过程而产生的新生毛细血管床, 主要见于 ROP、wAMD、病理性近视、中心性渗出性脉络膜病变等眼病。由于新生血管的管壁发育不完整、血管脆性大, 易发生渗出和破裂出血, 继而出现结缔组织增生形成瘢痕, 最终导致不可逆性盲的发生^[1-2]。深入研究眼底新生血管的生成机制, 探索抑制其发生及发展的有效措施, 是中国防盲和公共卫生工作的重点及难点之一。本研究中证实了槲皮素具有以下作用: (1) 抑制 HUVECs 的增生、移行功能; (2) 抑制 OIR 模型视网膜无血管灌注区的形成, 减少激光诱导的 CNV 形成; (3) 抑制体外、体内新生血管模型中整合素 $\alpha 5$ 及整合素 $\beta 3$ 蛋白的表达。这一发现为眼底新生血管的治疗拓展了新的思路。

槲皮素及其衍生物是自然界中广泛分布的黄酮类化合物之一, 广泛存在于蔬菜和水果中, 包括葡萄、苹果等。同时, 大量的研究也发现中草药中也含有槲皮素, 如丹皮、菊花、车前子、刺五加、鱼腥草等^[4]。槲皮素不仅分布广泛, 还具有重要的药理作用, 如抗氧化、抗病毒、免疫抑制、降压等^[7]。近年来的研究表明, 槲皮素可以抑制多种肿瘤细胞的增生, 且能够抑制视网膜血管内皮细胞的增生^[8-9]。本研究中进一步证实, 槲皮素可以时间依赖性地抑制 HUVECs 的增生和移行, 与上述研究相符, 证实了槲皮素在血管新生中的细胞行为学改变。

以往研究表明, 槲皮素可以通过 HMGB1、JAK-STAT、SEK1-JNK1/2、MEK1-ERK1/2 等通路抑制肿瘤的发生和发展^[7]。Balakrishnan 等^[6]和陈宜等^[10]的研究也证实了槲皮素可以通过抑制 VEGF 及其下游的 EGFR/VEGFR-2 通路的表达, 进而抑制视网膜新生血管和乳腺癌新生血管的形成。但是, 槲皮素对于新生血管细胞骨架的作用尚不清楚。本研究中检测了槲皮素在体外脐静脉内皮细胞和体内 OIR 及 CNV 动物模

型中对细胞骨架相关的整合素 $\alpha 5$ 及整合素 $\beta 3$ 的作用,并证实了无论在 VEGF 诱导的 HUVECs 增生,还是体内视网膜新生血管及 CNV 模型中,槲皮素均能够明显抑制这 2 种因子的表达。

整合素由 α 和 β 亚单位形成异二聚体,广泛存在于动物和植物细胞膜的表面,是一个普遍表达的黏附分子受体家族。整合素介导细胞与细胞间的相互作用及细胞与细胞外基质间的相互作用,具有调节细胞增生、迁移、凋亡、分化和基因表达等功能,在生理和病理条件下均发挥重要作用^[11-12]。有报道显示,整合素在肿瘤的发生和发展中,特别是对肿瘤的浸润、血管新生起到重要调控作用^[11,13]。整合素家族中迄今已发现 18 种 α 亚单位和 9 种 β 亚单位,它们按不同的组合构成 24 种整合素^[14]。作为整合素家族中最重要的一员,整合素 $\alpha 5\beta 3$ 的作用尤为重要^[15]。整合素 $\alpha 5\beta 3$ 可以表达于多种细胞类型,并与多细胞活动过程中的多种配体结合,参与肿瘤的血管生成,侵袭转移、炎症、伤口愈合和凝血等病理过程,也表达于多种新生血管内皮细胞,对血管生成起着重要作用,因此,近年来整合素 $\alpha 5\beta 3$ 成为许多抗肿瘤血管生成药物的靶点^[11,16-17]。在视网膜血管新生过程中,整合素在毛细血管基底膜和基质的降解、芽生的管腔相互融合成环状血管分支形成三维管状结构、新生血管管腔末端闭合等血管生成过程的关键步骤具有调控作用^[18]。本研究结果证实,槲皮素能够抑制体外 VEGF 诱导的整合素 $\alpha 5$ 及整合素 $\beta 3$ 表达增加,同时,能够通过槲皮素腹腔内注射的方式抑制 OIR 模型及激光诱导 CNV 模型视网膜中整合素 $\alpha 5$ 及整合素 $\beta 3$ 的高表达。

综上所述,本研究结果表明槲皮素可以通过调控整合素抑制视网膜新生血管的形成,为新生血管的治疗提供新途径。虽然本研究为视网膜新生血管的治疗提供了新的思路及解决方案,但槲皮素药理作用复杂,进一步探寻其在抑制新生血管中的作用机制将为临床应用奠定坚实基础。

参考文献

[1] Das A, McGuire PG. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2003, 22(6): 721-748.

[2] 黎晓新,白玉婧. 新生血管性年龄相关性黄斑变性药物治疗的进步和展望 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30(1): 1-6. DOI: 10. 3760/ cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 01. 001.

Li XX, Bai YJ. Current progression and prospect in the targeting therapy of age-related macular degeneration [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2012, 30(1): 1-6. DOI: 10. 3760/ cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 01. 001.

[3] 雷春燕,雷博. 眼科新一代抗血管内皮生长因子药物的基础研究和临床试验进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(10): 938-942. DOI: 10. 3760/ cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 10. 016.

Lei CY, Lei B. Curative effect and safety of the new generation of anti-vascular endothelial growth factor drugs in neovascular eye diseases [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(10): 938-942. DOI: 10. 3760/ cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 10. 016.

[4] Anand DAV, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of biological importance of quercetin; a bioactive flavonoid [J]. *Pharmacogn Rev*, 2016, 10(20): 84-89. DOI: 10. 4103/0973-7847. 194044.

[5] Murya AK, Vinayak M. Quercetin attenuates cell survival, inflammation, and angiogenesis via modulation of Akt signaling in murine T-cell lymphoma [J]. *Nutr Cancer*, 2017, 69(3): 470-480. DOI: 10. 1080/01635581. 2017. 1267775.

[6] Balakrishnan S, Bhat FA, Raja SP, et al. Gold nanoparticle-conjugated quercetin inhibits epithelial-mesenchymal transition, angiogenesis and invasiveness via EGFR/VEGFR-2-mediated pathway in breast cancer [J]. *Cell Prolif*, 2016, 49(6): 678-697. DOI: 10. 1111/cpr. 12296.

[7] Harris Z, Donovan MG, Branco GM, et al. Quercetin as an emerging anti-melanoma agent: a four-focus area therapeutic development strategy [J/OL]. *Front Nutr*, 2016, 3: 48 [2018-01-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5086580/>. DOI: 10. 3389/fnut. 2016. 00048.

[8] Khan F, Niaz K, Maqbool F, et al. Molecular targets underlying the anticancer effects of quercetin; an update [J/OL]. *Nutrients*, 2016, 8(9): 529 [2018-03-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5037516/>. DOI: 10. 3390/nu8090529.

[9] Choi EJ, Bae SM, Ahn WS. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(10): 1281-1285. DOI: 10. 1007/ s12272-001-2107-0.

[10] 陈宜,李方焯,孟宪芬,等. 槲皮素对小鼠视网膜新生血管影响的实验观察 [J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(14): 1113-1115. DOI: 10. 3760/ cma. j. issn. 0376-2491. 2015. 14. 018.

Chen Y, Li FT, Meng XF, et al. Suppression of retinal angiogenesis by quercetin in a rodent model of retinopathy of prematurity [J]. *Nat Med J China*, 2015, 95(14): 1113-1115. DOI: 10. 3760/ cma. j. issn. 0376-2491. 2015. 14. 018.

[11] Demircioglu F, Hodivala-Dilke K. $\alpha v\beta 3$ Integrin and tumour blood vessels-learning from the past to shape the future [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2016, 42: 121-127. DOI: 10. 1016/j. ceb. 2016. 07. 008.

[12] Golestani R, Jung JJ, Sadeghi MM. Molecular imaging of angiogenesis and vascular remodeling in cardiovascular pathology [J/OL]. *J Clin Med*, 2016, 5(6): 57 [2018-03-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4929412/>. DOI: 10. 3390/jem5060057.

[13] Pozzi A, Yurchenco PD, Iozzo RV. The nature and biology of basement membranes [J]. *Matrix Biol*, 2017, 57: 58: 1-11. DOI: 10. 1016/j. matbio. 2016. 12. 009.

[14] Manninen A, Varjosalo M. A proteomics view on integrin-mediated adhesions [J/OL]. *Proteomics*, 2017, 17(3-4) [2018-01-23]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/pmic.201600022>. DOI: 10. 1002/pmic. 201600022.

[15] Davis PJ, Lin HY, Sudha T, et al. Nanotetrac targets integrin $\alpha v\beta 3$ on tumor cells to disorder cell defense pathways and block angiogenesis [J]. *Oncol Targets Ther*, 2014, 7: 1619-1624. DOI: 10. 2147/OTT. S67393.

[16] Hu L, Wang J, Wang Y, et al. An integrin $\alpha v\beta 3$ antagonistic modified peptide inhibits tumor growth through inhibition of the ERK and AKT signaling pathways [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(4): 1953-1962. DOI: 10. 3892/or. 2016. 4994.

[17] Zhuang Y, Peng H, Mastej V, et al. MicroRNA regulation of endothelial junction proteins and clinical consequence [J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 5078627 [2018-02-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5143735/>. DOI: 10. 1155/2016/5078627.

[18] Bishop PN. The role of extracellular matrix in retinal vascular development and preretinal neovascularization [J]. *Exp Eye Res*, 2015, 133: 30-36. DOI: 10. 1016/j. exer. 2014. 10. 021.

(收稿日期:2018-02-13 修回日期:2018-06-25)

(本文编辑:刘艳)