

胰岛素样生长因子 1 对人视网膜血管内皮细胞生物学行为的促进作用及其机制

王梦娇 刘高勤 徐静 李丹 陆培荣

215006 苏州大学附属第一医院眼科

通信作者:陆培荣,Email:lupeirong@suda.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.05.007

【摘要】 **背景** 抑制视网膜新生血管形成是目前相关眼病治疗的主要目标之一,而寻找视网膜新生血管形成过程中的干预靶点是研究的热点。研究表明,胰岛素样生长因子 1(IGF-1)可促进血管内皮细胞增生及抑制血管内皮细胞凋亡,但其是否可以作为视网膜新生血管类眼病的治疗靶点尚不清楚。**目的** 探讨 IGF-1 对体外培养的人视网膜血管内皮细胞(HRECs)的迁移、凋亡和管腔形成能力的作用及其机制。**方法** 对 HRECs 进行体外培养,取对数生长期的细胞进行实验。采用逆转录 PCR 法检测培养细胞中 IGF-1 受体(IGF-1R)mRNA 的表达。按照检测指标的不同分别于培养液中添加不同质量浓度 IGF-1 溶液培养细胞,待细胞生长至约 90% 融合后用无菌移液枪头垂直于培养板底划痕,用 Photoshop CS4 软件检测、计算和比较 0、10 和 200 ng/ml IGF-1 组划痕后 12 h 和 24 h 与划痕前 HRECs 迁移的面积差(试验前面积-试验后面积, ΔS);采用流式细胞术测定并比较 0 ng/ml IGF-1 组与 1 000 ng/ml IGF-1 组细胞培养后 24 h HRECs 凋亡比例的差异;采用 Matrigel 体外三维成型法检测并比较 0、10、100 和 200 ng/ml IGF-1 组细胞培养后 24 h 完整管腔的形成数量;采用实时荧光定量 PCR 法检测并比较 0、500 及 1 000 ng/ml IGF-1 组细胞培养后 6 h HRECs 中血小板衍生因子(PDGF)-BB 和 caspase-3 mRNA 的相对表达量。**结果** HRECs 培养后 2~3 d 达 90% 以上融合,细胞排列紧密,琼脂糖凝胶电泳结果显示 IGF-1R mRNA 呈阳性表达。划痕后 12 h 和 24 h,各组 HRECs 的 ΔS 随着 IGF-1 质量浓度的增加而逐渐增加,划痕后 24 h,200 ng/ml IGF-1 组 HRECs 的 ΔS 为 $(4.83 \pm 0.61) \times 10^5 \mu\text{m}^2$,较 0 ng/ml IGF-1 组的 $(3.28 \pm 0.64) \times 10^5 \mu\text{m}^2$ 明显增大,差异有统计学意义($t = -3.707, P = 0.021$)。0 ng/ml IGF-1 组与 1 000 ng/ml IGF-1 组凋亡细胞比例分别为 $(18.77 \pm 2.37)\%$ 和 $(12.05 \pm 0.88)\%$,差异有统计学意义($t = 2.869, P = 0.046$)。200 ng/ml IGF-1 组 HRECs 完整管腔形成数量为 (20.33 ± 2.83) 个/孔,数目高于 0 ng/ml IGF-1 组的 (17.94 ± 1.96) 个/孔,差异有统计学意义($t = -2.940, P = 0.042$)。与 0 ng/ml IGF-1 组比较,1 000 ng/ml IGF-1 组细胞中 PDGF-BB mRNA 的相对表达量明显升高,而 caspase-3 mRNA 的相对表达量明显降低,差异均有统计学意义($t = -3489, P = 0.025; t = 7.287, P = 0.002$)。**结论** IGF-1 促进体外培养 HRECs 的迁移和血管管腔形成,抑制 HRECs 凋亡,其作用机制可能与上调 HRECs 中 PDGF-BB 的表达及下调 caspase-3 的表达有关。

【关键词】 胰岛素样生长因子 1/代谢; 视网膜血管内皮细胞; 血管生成; 信使 RNA/分析; 迁移; 细胞凋亡; 人

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30972712); 国家自然科学基金青年基金项目(81200727); 江苏省医学重点人才项目(RC2011104); 苏州市科技计划项目(SYS201448)

The promoting effects of insulin-like growth factor 1 on the biological behaviour of human retinal vascular endothelial cells Wang Mengjiao, Liu Gaoqin, Xu Jing, Li Dan, Lu Peirong

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

Corresponding author: Lu Peirong, Email: lupeirong@suda.edu.cn

[Abstract] **Background** The suppression of retinal angiogenesis is one of primary treatment targets for retinal vascular diseases, so seeking the intervention targets of retinal neovascularization is a hot research. Studies showed that insulin-like growth factor 1 (IGF-1) can promote the growth and restrain the apoptosis of vascular

endothelial cells. However, whether IGF-1 is an intervention target for the treatment of retinal vascular diseases is unelucidated. **Objective** This study was to address the effects of IGF-1 on the migration, apoptosis and capillary tube formation of human retinal vascular endothelial cells (HRECs) and mechanism. **Methods** HRECs were cultured *in vitro*, and the cells in the exponential phase were prepared for subsequent experiments. The expression of IGF-1R mRNA in the cells was examined using reverse transcriptase PCR assay. Different concentrations of IGF-1 were added in the medium based on the difference of tests. The relative free-cell area difference (ΔS) after test was measured by Photoshop CS4 software and compared among 0, 10 and 200 ng/ml IGF-1 groups 12 and 24 hours after cell scratching, respectively. The cell apoptotic rate was assayed by flow cytometry and compared between 0 ng/ml IGF-1 group and 1 000 ng/ml IGF-1 group, and the number of capillary tubes was examined by Matrigel test and assessed among 0, 10, 100 and 200 ng/ml IGF-1 groups 24 hours after addition of IGF-1. The expressions of platelet derived growth factor (PDGF)-BB mRNA and caspase-3 mRNA in the cells of the 0, 500 and 1 000 ng/ml IGF-1 groups were detected by real-time fluorescence quantitative PCR after adding IGF-1 for 6 hours. **Results** Cultured cells grew well and attached 90% confluence 2-3 days after incubation, and IGF-1R mRNA was positively expressed in the cells. In 12 and 24 hours after scratching, the relative migrating area of the cells was gradually reduced with the increase of IGF-1 contents. The ΔS was $(4.83 \pm 0.61) \times 10^5 \mu\text{m}^2$ in the 200 ng/ml IGF-1 group, which was significantly larger than $(3.28 \pm 0.64) \times 10^5 \mu\text{m}^2$ in the 0 ng/ml IGF-1 group 24 hours after stretching ($t = -3.707$, $P = 0.021$). The apoptotic rate in the 0 ng/ml IGF-1 group and 1 000 ng/ml IGF-1 group was $(18.77 \pm 2.37)\%$ and $(12.05 \pm 0.88)\%$, with a significant difference between them ($t = 2.869$, $P = 0.046$). The number of intact tubes was significantly increased in the 200 ng/ml IGF-1 group compared with the 0 ng/ml IGF-1 group ($[20.33 \pm 2.83]/\text{well}$ vs. $[17.94 \pm 1.96]/\text{well}$; $t = -2.940$, $P = 0.042$). Compared with 0 ng/ml IGF-1 group, the relative expression level of PDGF-BB mRNA was elevated and that caspase-3 mRNA was evidently reduced in the 1 000 ng/ml IGF-1 group ($t = -3.489$, $P = 0.025$; $t = 7.287$, $P = 0.002$). **Conclusions** IGF-1 can promote the migration and angiogenesis of HRECs and inhibit the apoptosis of HRECs. These effects of IGF-1 probably are associated with the up-regulation of PDGF-BB and down-regulation of caspase-3 in the cells.

[Key words] Insulin-like growth factor 1/metabolism; Retinal vascular endothelial cells; Angiogenesis; RNA, messenger/analysis; Migration; Apoptosis; Human

Fund program: National Natural Science Foundation of China (30972712, 81200727); Medical Key Talent Project in Jiangsu Province (RC2011104); Suzhou Science and Technology Plan Project (SYS201448)

视网膜新生血管与正常血管在组织结构、生长部位及功能上均有所不同,虽能够为周围组织有效地供血和供氧,但其通透性的异常改变可引起视网膜出血或渗出,破坏正常的视网膜组织结构,进而影响视功能^[1]。探讨视网膜新生血管的发病机制,寻找有效的干预方法是目前眼科学研究领域的热点课题^[2]。胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 是一种活性蛋白多肽物质,在促进细胞有丝分裂、分化成熟和创伤愈合过程等方面发挥重要作用。有研究认为,IGF-1 与其受体 IGF-1R 结合后可激活细胞内相应的信号转导通路,发挥促进血管内皮细胞增生及抑制血管内皮细胞凋亡的作用,从而影响肿瘤的生长及疾病的预后^[3-5],但目前关于 IGF-1 在视网膜新生血管形成过程中是否发挥作用的报道尚少。本研究观察不同质量浓度 IGF-1 对体外培养的人视网膜血管内皮细胞 (human retinal vascular endothelial cells, HRECs) 的

迁移、凋亡及管腔形成能力的影响,探讨视网膜新生血管的发病机制,为寻找视网膜新生血管相关疾病的治疗靶点提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

HRECs 细胞系 (上海雅吉生物科技有限公司)。人重组 IGF-1 蛋白 (美国 R&D Systems 公司); DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、PBS (美国 Hyclone 公司); 微量 RNA 抽提试剂盒、逆转录试剂盒、DNase 纯化剂 (德国 Qiagen 公司); PCR 试剂盒、DNA 标准相对分子质量、SYBR Premix Ex Taq™ (大连 Takara 生物技术公司); 细胞凋亡试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); Matrigel (美国 BD 公司)。倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); 逆转录 PCR 仪、实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养及传代 按照文献[6]的实验方法,将 HRECs 置于含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养液,在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中常规培养。细胞培养 3~4 d 后按照 1:4 比例传代,于倒置相差显微镜下观察细胞的形态,取生长活跃、处于对数生长期的 HRECs 进行后续实验。

1.2.2 逆转录 PCR 法检测 HRECs 中 IGF-1R mRNA 的表达 收集 HRECs,参照文献[7-8]中的实验方法,利用微量 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA,用 DNase 催化清除总 RNA 中残留的 DNA 杂质,将总 RNA 逆转录成 cDNA,于 -20 °C 保存。IGF-1R 引物序列:上游引物为 5'-TGTCCAGGCCAAAACAGGAT-3',下游引物为 5'-CATTCCCCAGCCTGCTGTTA-3',产物长度为 140 bp;GAPDH 上游引物为 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游引物为 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3',产物长度为 452 bp(南京金思瑞生物科技有限公司设计合成)。扩增条件:94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环;72 °C 再延伸 10 min。扩增产物经质量分数 2% 琼脂糖凝胶电泳后,于凝胶成像仪上拍照。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测 HRECs 中血小板衍生因子-BB mRNA 和 caspase-3 mRNA 的表达 分别在 2 ml 细胞培养液中添加 2 μg/ml IGF-1 0、0.5 和 1.0 ml,配制成 IGF-1 蛋白质量浓度为 0、500 和 1 000 ng/ml 培养液,培养细胞 6 h,各组细胞总 RNA 提取、cDNA 的逆转录和保存方法同 1.2.2。GAPDH 引物序列:上游引物为 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游引物为 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3',产物长度为 452 bp;PDGF-BB 引物序列:上游引物为 5'-GGCTGAGCTGGACTTGAACATGA-3',下游引物为 5'-TCTTTGCGACAATCTCAATCTTTCTC-3',产物长度为 314 bp;caspase-3 引物序列:上游引物 5'-TGCATACTCCACAGCACCTG-3',下游引物 5'-TCTGTTGCCACCTTTCGGTT-3',产物长度 153 bp(南京金思瑞生物科技有限公司设计合成)。扩增条件:94 °C 反应 15 s,60 °C 反应 15 s,共 40 个循环,重复测量 3 次,取平均值,按 2^{-ΔΔCt} 法计算各组细胞中血小板衍生因子(platelet derived growth factor, PDGF)BB mRNA 和 caspase-3 mRNA 的相对表达值。

1.2.4 细胞划痕法测定 IGF-1 对 HRECs 迁移的影响 将 HRECs 接种于 6 孔板,每孔约 1.5×10⁵ 个细胞。参照文献[7]的方法,待细胞生长至约 90% 融合后,用无菌的 200 μl 移液枪头垂直于培养板底划出 3 条水平

直线;用无菌 PBS 洗涤 3 次,去除漂浮细胞;按照分组不同分别加入含 0、10 和 200 ng/ml IGF-1 的 10% FBS-DMEM 培养基,每组设 3 个复孔,置于恒温细胞培养箱中培养,分别于处理前及处理后 12 h 和 24 h 在倒置相差显微镜下拍照,用 Photoshop CS4 软件测量不同时间点细胞划痕区的面积(S_n),处理前与处理后划痕区面积的差值即为细胞迁移的相对面积(ΔS)。

1.2.5 流式细胞术检测 IGF-1 对 HRECs 凋亡的影响 参照文献[9-10]的方法,取对数生长期的 HRECs 悬液接种于 6 孔板,每孔约 1×10⁵ 个细胞,待细胞生长至 90% 融合后,以无菌移液管吸除原培养液,按照分组不同分别加入含 0、1 000 ng/ml IGF-1 的 10% FBS-DMEM 培养液,每组设 3 个复孔。细胞继续培养 24 h 后收集细胞,用 PBS 洗涤 3 遍,每个样本加入 100 μl 1 倍 Annexin V 结合缓冲液、5 μl Annexin V 和 1 μl 碘化丙啶荧光素(propyl iodide, PI)工作液,室温下避光孵育 15 min,加入 400 μl 的 1 倍 Annexin V 结合缓冲液,混合均匀。用流式细胞仪进行分析,激发波长为 488 nm,用波长为 530 nm 的通道滤器检测异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)的荧光面积所占比例,以波长为 575 nm 的通道滤器检测 PI 荧光面积的比例。

1.2.6 Matrigel 体外三维成型法检测 IGF-1 对 HRECs 管腔形成能力的影响 参照文献[11]的实验方法,于 96 孔板中加入 60 μl 液态 Matrigel 胶/孔,铺平后置 37 °C 恒温培养箱中孵育 30 min 使其凝固;取对数生长期的细胞悬液,按照 1×10⁴/孔加入到 Matrigel 固态孔中,按照分组不同分别加入含 0、10、100、200 ng/ml IGF-1 的 10% FBS-DMEM 培养液,每组设 3 个复孔,于 37 °C 恒温细胞培养箱中孵育 12 h,用倒置相差显微镜观察管腔形成情况,于培养后 24 h 拍照,用 Image J 软件分析各组图片中管腔形成数目。以每孔完整管腔的形成数量表示细胞的血管形成能力。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计学软件进行统计分析。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,经 Levene 检验证实组间方差齐(均 $P > 0.05$)。采用均衡分组单因素干预多水平实验设计,不同质量浓度 IGF-1 组间 HRECs、管腔形成数量、细胞中 PDGF-BB mRNA 和 caspase-3 mRNA 相对表达量的总体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验;0 ng/ml IGF-1 组与 1 000 ng/ml IGF-1 组间细胞凋亡率的差异比较采用独立样本 t 检验。采用双尾检验法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养细胞的形态

倒置相差显微镜下可见培养的 HRECs 呈梭形,大小均匀,细胞质透亮,细胞核居中且清晰可见,细胞增生活跃,培养后 2~3 d 细胞密度即达 90% 以上,细胞排列紧密且规则(图 1)。

2.2 细胞中 IGF-1R mRNA 的表达

逆转录 PCR 检测可见 HRECs 中扩增出的反应条带,表达条带的位置与引物设计长度相符,提示扩增产物为 IGF-1R(图 2)。

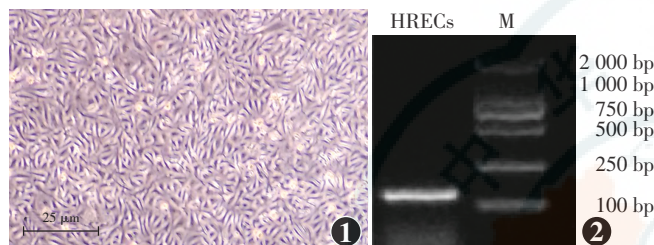


图 1 培养 HRECs 的形态($\times 40$, 标尺 = $25 \mu\text{m}$) 倒置相差显微镜下可见 HRECs 呈梭形,细胞排列紧密,并可见透亮的细胞质和居中的细胞核 图 2 逆转录 PCR 法测定的细胞中 IGF-1R mRNA 的表达 HRECs:人视网膜血管内皮细胞;M:标准 DNA 相对分子质量

2.3 不同质量浓度 IGF-1 组 HRECs 迁移相对面积

划痕后 12 h 和 24 h, 0 ng/ml IGF-1 组细胞移动相对面积接近, 10 ng/ml IGF-1 组细胞移动相对面积均明显大于相应时间点的 0 ng/ml IGF-1 组, 而各时间点 200 ng/ml IGF-1 组细胞移动相对面积最大(图 3)。0 ng/ml IGF-1 组、10 ng/ml IGF-1 组及 200 ng/ml IGF-1 组在划痕后 12 h 时细胞相对移动面积值接近, 划痕后 24 h 随着 IGF-1 质量浓度的增加细胞移动相对面积逐渐增大, 总体比较差异有统计学意义($F_{\text{分组}} = 36.754$,

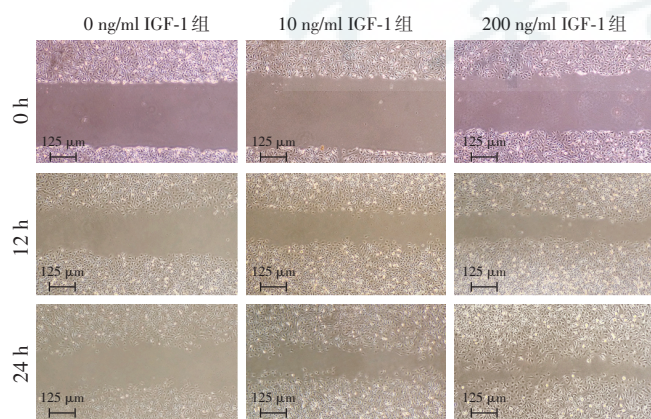


图 3 不同质量浓度 IGF-1 作用后不同时间 HRECs 的迁移情况($\times 400$, 标尺 = $125 \mu\text{m}$) 倒置相差显微镜下可见随着时间的延长和 IGF-1 质量浓度的增加, 各组细胞相对移动面积逐渐缩小 IGF: 胰岛素样生长因子

$P = 0.035$; $F_{\text{时间}} = 146.031$, $P = 0.000$)。划痕后 12 h 0 ng/ml IGF-1 组、10 ng/ml IGF-1 组及 200 ng/ml IGF-1 组随着 IGF-1 质量浓度的增加细胞移动相对面积增加, 但组间比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$); 划痕后 24 h, 与 0 ng/ml IGF-1 组比较, 10 ng/ml IGF-1 组细胞移动相对面积有所增加, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 200 ng/ml IGF-1 组细胞移动相对面积明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 不同质量浓度 IGF-1 组细胞迁移相对面积($\bar{x} \pm s, \times 10^5, \mu\text{m}^2$)

组别	样本量	细胞培养不同时间点 ΔS 值	
		12 h	24 h
0 ng/ml IGF-1 组	6	2.14 ± 0.25	3.28 ± 0.64
100 ng/ml IGF-1 组	6	2.63 ± 1.18	4.73 ± 0.83
200 ng/ml IGF-1 组	6	2.92 ± 1.24	4.83 ± 0.61^a

注: $F_{\text{分组}} = 36.754$, $P = 0.035$; $F_{\text{时间}} = 146.031$, $P = 0.000$. 与各自时间点 0 ng/ml IGF-1 组比较, $^a P < 0.05$ (两因素方差分析, LSD- t 检验)
IGF: 胰岛素样生长因子; ΔS : 细胞迁移相对面积

2.4 不同质量浓度 IGF-1 组 HRECs 的凋亡率

流式细胞术检测结果显示, 0 ng/ml IGF-1 组与 1 000 ng/ml IGF-1 组凋亡细胞比例分别为 (18.77 ± 2.37)% 和 (12.05 ± 0.88)%, 差异有统计学意义($t = 2.869$, $P = 0.046$)(图 4)。

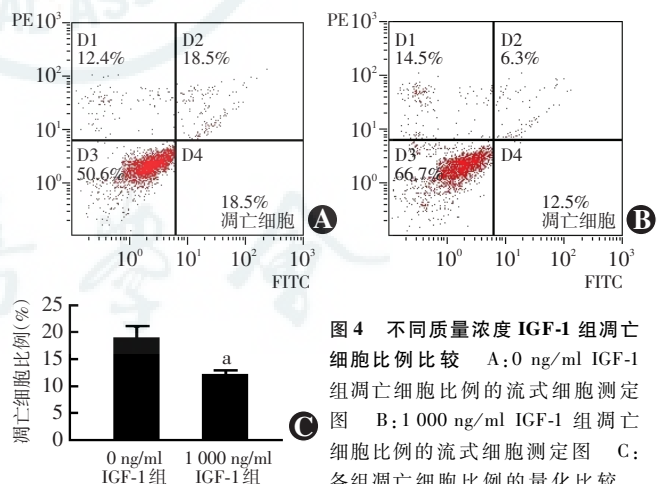


图 4 不同质量浓度 IGF-1 组凋亡细胞比例比较 A: 0 ng/ml IGF-1 组凋亡细胞比例的流式细胞测定图 B: 1 000 ng/ml IGF-1 组凋亡细胞比例的流式细胞测定图 C: 各组凋亡细胞比例的量化比较与 0 ng/ml IGF-1 组比较, $^a P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 5$) IGF: 胰岛素样生长因子

2.5 不同质量浓度 IGF-1 组 HRECs 管腔形成的数量

Matrigel 体外三维成型法检测结果显示, 随着 IGF-1 质量浓度的增加, HRECs 管腔形成能力逐渐增强, 200 ng/ml IGF-1 组 HRECs 形成的管腔更为密集(图 5A~D)。0 ng/ml IGF-1 组、10 ng/ml IGF-1 组、100 ng/ml IGF-1 组及 200 ng/ml IGF-1 组完整管腔形

成数目分别为 (17.94±1.96)、(18.56±2.12)、(19.39±2.04)、(20.33±2.83) 个/孔, 组间总体比较差异有统计学意义 ($F=0.260, P=0.048$)。与 0 ng/ml IGF-1 组比较, 10 ng/ml IGF-1 组和 100 ng/ml IGF-1 组 HREC 完整管腔的形成数量逐渐增加, 但差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$), 而 200 ng/ml IGF-1 组 HREC 完整管腔的形成数量明显增多, 差异有统计学意义 ($t=-2.940, P=0.042$) (图 5E)。

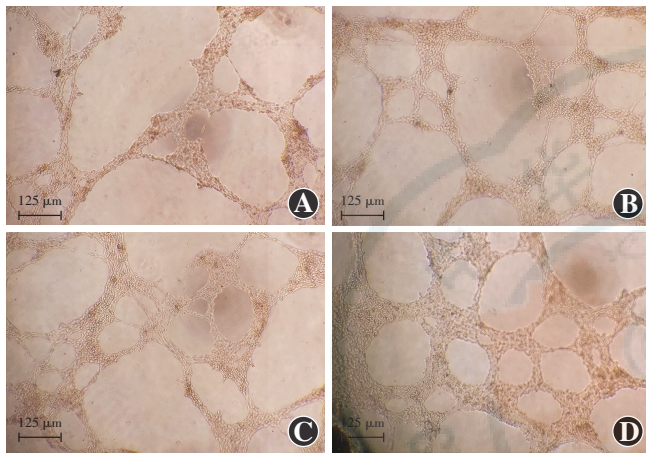


图 5 不同质量浓度 IGF-1 组 HREC 完整管腔的形成情况 A: 0 ng/ml IGF-1 组细胞形成的管腔较大, 数量较少 ($\times 400$, 标尺 = 125 μm) B: 10 ng/ml IGF-1 组细胞管腔形成形态接近 0 ng/ml IGF-1 组 ($\times 400$, 标尺 = 125 μm) C: 100 ng/ml IGF-1 组细胞形成的管腔管径变小 ($\times 400$, 标尺 = 125 μm) D: 200 ng/ml IGF-1 组细胞形成的管腔管径变小, 数量增多 ($\times 400$, 标尺 = 125 μm) E: 不同质量浓度 IGF-1 组 HREC 完整管腔形成数量的比较 $F=0.260, P=0.048$ 。与 0 ng/ml IGF-1 组比较, $^*P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=6$) IGF: 胰岛素样生长因子

2.6 不同质量浓度 IGF-1 组 HREC 中 PDGF-BB mRNA 及 caspase-3 mRNA 的表达

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 0 ng/ml IGF-1 组、500 ng/ml IGF-1 组及 1 000 ng/ml IGF-1 组细胞中 PDGF-BB mRNA 相对表达量分别为 1.07 ± 0.04 、 0.97 ± 0.09 和 1.51 ± 0.12 , caspase-3 mRNA 相对表达量分别为 0.96 ± 0.02 、 0.92 ± 0.03 和 0.72 ± 0.07 ; 组间总体比较差异均有统计学意义 ($F=25.543, P=0.032$; $F=34.468, P=0.024$); 其中 1 000 ng/ml IGF-1 组 PDGF-BB mRNA 相对表达量显著高于 0 ng/ml IGF-1 组, 而 caspase-3 mRNA 相对表达量显著低于 0 ng/ml IGF-1 组, 差异均有统计学意义 ($t=-3.489, P=0.025$; $t=7.287, P=0.002$) (图 6)。

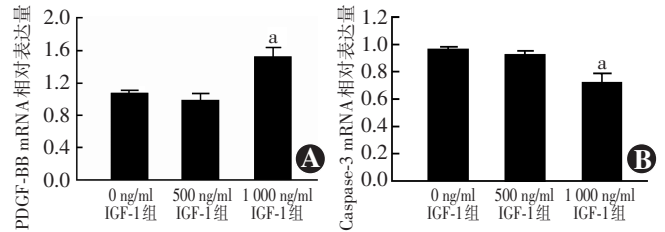


图 6 实时荧光定量 PCR 法检测各组 HREC 中 PDGF-BB mRNA 和 caspase-3 mRNA 的相对表达量 A: 各组 HREC 中 PDGF-BB mRNA 相对表达量比较 $F=25.543, P=0.032$ 。与 0 ng/ml IGF-1 组比较, $^*P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) B: 各组 HREC 中 caspase-3 mRNA 相对表达量比较 $F=34.468, P=0.024$ 。与 0 ng/ml IGF-1 组比较, $^*P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) PDGF: 血小板衍生生长因子; IGF: 胰岛素样生长因子

3 讨论

IGF-1 是由神经细胞、肝细胞等多种细胞分泌的活性蛋白多肽物质, 在人体内通过自分泌和旁分泌的途径发挥促进细胞分化和有丝分裂等生物学功能^[12]。研究表明, IGF-1 与其受体 IGF-1R 结合后, 可通过磷脂酰肌醇 (-3) 激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 和丝裂原活化蛋白激酶-细胞外信号调节激酶 (mitogen-activated protein kinase-extracellular signal-regulated kinase, MAPK-ERK) 等信号途径促进多发性骨髓瘤细胞的增生、侵袭和血管生成, IGF-1 能够通过促进新生血管的形成和骨骼肌的再生而加快伤口的愈合速度^[13-14]。目前关于 IGF-1 在眼部新生血管性眼病发病过程中作用的报道不多, 为了进一步研究 IGF-1 在新生血管性眼病中的具体作用及其机制, 本研究中在体外培养 HREC 时用人重组 IGF-1 蛋白进行干预, 观察 IGF-1 对 HREC 迁移、凋亡、管腔形成、血管生成相关因子分泌等生物学行为的影响。

视网膜血管内皮细胞在视网膜新生血管的形成中扮演重要角色, 任何影响其生物学功能的因素均可直接影响新生血管的发生和发展过程^[15]。逆转录 PCR 检测证实 HREC 中存在着 IGF-1R mRNA 的表达, 提示 IGF-1 和 IGF-1R 信号通路可能参与 HREC 的生物学行为。血管内皮细胞的迁移、增生和组织重构是血管发生的重要因素。本研究中利用划痕法检测 IGF-1 对 HREC 迁移能力的影响, 发现 IGF-1 能明显促进 HREC 的迁移, 与以往报道的 IGF-1 能促进人类脐静脉内皮细胞迁移的结果一致^[16]。本研究流式细胞术检测结果表明, IGF-1 能够明显抑制 HREC 的凋亡, 验证了以往报道的 IGF-1 通过其抗凋亡效应促进毛发生长的结果^[17]。Matrigel 体外三维成型法检测结果表明, 随着 IGF-1 质量浓度的增加, HREC 形成完整、致密管腔的数目增多, 提示 IGF-1 增强 HREC 管腔形成

能力。上述结果提示 IGF-1 促进 HREC 管腔形成可能与其促进 HREC 迁移和抑制 HREC 凋亡有关。

PDGF 家族包括 PDGF-AA、PDGF-BB 及 PDGF-AB 等亚型,其中 PDGF-BB 可募集周细胞至血管内皮周围而稳定原始血管网,并且在促新生血管形成方面与 VEGF 有协同作用^[18-19]。Caspase-3 是重要的凋亡相关因子,研究表明,IGF-1 可通过促进诱导型一氧化氮合酶的表达而抑制肺动脉平滑肌细胞的凋亡^[20]。因此本研究中利用实时荧光定量 PCR 法检测在 IGF-1 作用后 HREC 中 PDGF-BB 和 caspase-3 mRNA 的相对表达量,显示 IGF-1 能促进 HREC 中 PDGF-BB mRNA 的表达,同时明显抑制 caspase-3 mRNA 的表达,提示 IGF-1 促进 HREC 迁移和增强 HREC 管腔形成能力的作用可能与上调 PDGF-BB 的表达和下调 caspase-3 的表达,进而抑制 HREC 凋亡有关。

综上所述,本研究提示 IGF-1 能够通过上调 HREC 中 PDGF-BB 的表达来增强 HREC 的迁移,通过下调细胞中 caspase-3 的表达来抑制 HREC 的凋亡,从而发挥促血管生成作用。本研究为临床寻求 IGF-1 拮抗剂等治疗新生血管性眼病,特别是视网膜新生血管性眼病提供了理论依据。

参考文献

- [1] 蒋晓萌,唐宁.血管生成素在视网膜新生血管中的作用[J].医学综述,2009,15(15):2267-2270.
Jiang XM, Tang N. Role of angiogenin in retinal neovascularization[J]. Med Recapitulate, 2009, 15(15): 2267-2270.
- [2] 宋徽,任兵,高晓唯.视网膜新生血管的药物治疗研究进展[J].国际眼科杂志,2008,8(2):358-360.
Song H, Ren B, Gao XW. Advance in medicine therapy for retinal neovascularization[J]. Int J Ophthalmol, 2008, 8(2): 358-360.
- [3] Ma W, Zhang T, Pan J, et al. Assessment of insulin-like growth factor 1 receptor as an oncogene in esophageal squamous cell carcinoma and its potential implication in chemotherapy[J]. Oncol Rep, 2014, 32(4): 1601-1609. DOI:10.3892/or.2014.3348.
- [4] Samani AA, Yakar S, LeRoith D, et al. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights[J]. Endocr Rev, 2007, 28(1): 20-47. DOI:10.1210/er.2006-0001.
- [5] Tang X, Zhang Q, Shi S, et al. Bisphosphonates suppress insulin-like growth factor 1-induced angiogenesis via the HIF-1alpha/VEGF signaling pathways in human breast cancer cells[J]. Int J Cancer, 2010, 126(1): 90-103. DOI:10.1002/ijc.24710.
- [6] Chen Z, Liu G, Xiao Y, et al. Adrenomedullin22-52 suppresses high-glucose-induced migration, proliferation, and tube formation of human retinal endothelial cells[J]. Mol Vis, 2014, 20: 259-269.
- [7] 肖艳辉,刘高勤,陈志刚,等.重组干扰素诱导蛋白-10对视网膜血管内皮细胞增生、迁移及管腔形成的影响[J].中华眼底病杂志,2013,29(1):58-61. DOI:10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2013.01.014.
Xiao YH, Liu GQ, Chen ZG, et al. Effects of interferon-inducible protein-10 on proliferation, migration and capillary tube formation of retinal vascular endothelial cells[J]. Chin J Ocul Fundus Dis, 2013, 29(1): 58-61. DOI:10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2013.01.014.
- [8] 刘高勤,吴敬,陈志刚,等. ADP-核糖基化因子抑制剂在实验性烧伤诱导角膜新生血管中的作用及其机制[J].中华实验眼科杂志,2014,32(2):101-106. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.02.002.
Liu GQ, Wu J, Chen ZG, et al. The effect of ADP-ribosylation factor antagonist on alkali-burn induced corneal neovascularization[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(2): 101-106. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.02.002.
- [9] Cheng R, Li C, Li C, et al. The artemisinin derivative artesunate inhibits corneal neovascularization by inducing ROS-dependent apoptosis in vascular endothelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(5): 3400-3409. DOI:10.1167/iovs.12-11068.
- [10] 刘高勤,赫雪飞,陈志刚,等.紧密连接蛋白对实验性角膜新生血管发生中的抑制作用[J].中华实验眼科杂志,2014,32(9):773-779. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.09.002.
Liu GQ, He XF, Chen ZG, et al. Inhibitory effect of tight junction protein on experimental corneal neovascularization[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(9): 773-779. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.09.002.
- [11] 赫雪飞,刘高勤,陈志刚,等. CCR3拮抗剂对视网膜血管内皮细胞管腔形成的影响及机制[J].眼科新进展,2013,33(12):1106-1109,1114.
He XF, Liu GQ, Chen ZG, et al. Effects and mechanism of CCR3 antagonist on tube formation of retinal vascular endothelial cells[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2013, 33(12): 1106-1109, 1114.
- [12] Lowe WL, Adamo M, Werner H, et al. Regulation by fasting of rat insulin-like growth factor I and its receptor. Effects on gene expression and binding[J]. J Clin Invest, 1989, 84(2): 619-626. DOI:10.1172/JCI114207.
- [13] Menu E, Kooijman R, Van Valekenborgh E, et al. Specific roles for the PI3K and the MEK-ERK pathway in IGF-1-stimulated chemotaxis, VEGF secretion and proliferation of multiple myeloma cells: study in the 5T33MM model[J]. Br J Cancer, 2004, 90(5): 1076-1083. DOI:10.1038/sj.bjc.6601613.
- [14] Han JK, Kim HL, Jeon KH, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- δ activates endothelial progenitor cells to induce angiogenesis through matrix metalloproteinase-9-mediated insulin-like growth factor-1 paracrine networks[J]. Eur Heart J, 2013, 34(23): 1755-1765. DOI:10.1093/eurheartj/ehr365.
- [15] Mirshahi F, Pourtau J, Li H, et al. SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis in *in vitro* and *in vivo* models[J]. Thromb Res, 2000, 99(6): 587-594.
- [16] Hu Y, Deng F, Song J, et al. Evaluation of miR-29c inhibits endothelial cell migration and angiogenesis of human endothelial cells by suppressing the insulin like growth factor 1[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(5): 866-877.
- [17] Ahn SY, Pi LQ, Hwang ST, et al. Effect of IGF-I on hair growth is related to the anti-apoptotic effect of IGF-I and up-regulation of PDGF-A and PDGF-B[J]. Ann Dermatol, 2012, 24(1): 26-31. DOI:10.5021/ad.2012.24.1.26.
- [18] Hellström M, Kalén M, Lindahl P, et al. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse[J]. Development, 1999, 126(14): 3047-3055.
- [19] Dong A, Seidel C, Snell D, et al. Antagonism of PDGF-BB suppresses subretinal neovascularization and enhances the effects of blocking VEGF-A[J]. Angiogenesis, 2014, 17(3): 553-562. DOI:10.1007/s10456-013-9402-5.
- [20] Jin C, Guo J, Qiu X, et al. IGF-1 induces iNOS expression via the p38 MAPK signal pathway in the anti-apoptotic process in pulmonary artery smooth muscle cells during PAH[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2014, 34(4): 325-331. DOI:10.3109/10799893.2014.903417.

(收稿日期:2016-04-13)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)