

· 实验研究 ·

Hedgehog 蛋白对人视网膜微血管内皮细胞功能的影响及其可能的信号通路

李扬¹ 胡钦瑞¹ 王斌¹ 夏会卡² 张小虎¹

¹厦门大学附属厦门眼科中心 361001; ²北京大学人民医院眼科 100044

通信作者: 张小虎, Email: zhangxiaohudocor@163. com

【摘要】 目的 探讨 Hedgehog 蛋白对血-视网膜内屏障中人视网膜微血管内皮细胞(HRMEC)功能的影响及其可能的信号通路。方法 取在正常培养基中培养的 HRMEC, 分为正常对照组、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组, 分别加入终浓度为 0、0.5 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 Hedgehog 激动剂 purmorphamine; 取高糖培养基中培养的 HRMEC, 分为高糖对照组、1.5 $\mu\text{mol/L}$ 抑制剂组和 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 抑制剂组, 分别加入终浓度为 0、1.5 和 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Smoothed 抑制剂 Erismodegib。采用 MTS 细胞增生实验和 Transwell 细胞迁移试验检测各组 HRMEC 增生 A_{490} 值和相对迁移率。采用 Western blot 方法检测各组细胞鸟苷酸结合蛋白偶联受体(GPCRs)通路下游 PLC γ 1、Akt 和 Erk 蛋白磷酸化水平变化。结果 高糖对照组细胞 Hedgehog 蛋白相对表达量为 6.24 ± 0.11 , 明显高于正常对照组的 1.00 ± 0.00 , 差异有统计学意义 ($t = 667.573, P < 0.001$)。0.5 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组 A_{490} 值分别为 1.349 ± 0.050 和 1.422 ± 0.053 , 相对迁移率分别为 2.34 ± 0.14 和 3.59 ± 0.32 , 明显高于正常对照组的 1.203 ± 0.101 和 1.00 ± 0.00 , 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。1.5 $\mu\text{mol/L}$ 抑制剂组和 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 抑制剂组细胞 A_{490} 值分别为 0.849 ± 0.010 和 0.737 ± 0.030 , 相对迁移率分别为 0.43 ± 0.02 和 0.27 ± 0.01 , 明显低于高糖对照组的 1.000 ± 0.040 和 1.00 ± 0.00 , 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。0.5 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组 PLC γ 1 磷酸化比值、Akt 磷酸化比值和 Erk 磷酸化比值均明显高于正常对照组, 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 抑制剂组和 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 抑制剂组 PLC γ 1 磷酸化比值、Akt 磷酸化比值和 Erk 磷酸化比值均明显低于高糖对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。结论 高糖诱导 HRMEC 中 Hedgehog 蛋白表达, Hedgehog 蛋白可能通过调节 GPCRs 通路中 PLC γ 1、Akt 和 Erk 磷酸化水平来调节 HRMEC 的功能。

【关键词】 糖尿病视网膜病变; Hedgehog 蛋白; 鸟苷酸结合蛋白偶联受体通路; 人视网膜微血管内皮细胞

基金项目: 厦门市科技计划指导项目 (ZD2011S0335); 厦门市科技惠民计划项目 (3502Z20184023)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.09.005

Effect and potential signaling pathway of hedgehog protein on the function of human retinal microvascular endothelial cell

Li Yang¹, Hu Qinrui¹, Wang Bin¹, Xia Huika², Zhang Xiaohu¹

¹Xiamen Eye Centre of Xiamen University, Xiamen 361001, China; ²Department of Ophthalmology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

Corresponding author: Zhang Xiaohu, Email: zhangxiaohudocor@163. com

【Abstract】 Objective To explore the impact of Hedgehog protein on human retinal microvascular endothelial cell(HRMEC) and its signaling pathway. **Methods** The cultured HRMECs were divided into normal control group, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ agonist group and 1.0 $\mu\text{mol/L}$ agonist group, and were cultured in medium with final concentration of 0, 0.5 and 1.0 $\mu\text{mol/L}$ Hedgehog agonist, respectively; HRMECs cultured in high glucose medium were divided into high glucose control group, 1.5 $\mu\text{mol/L}$ inhibitor group and 2.5 $\mu\text{mol/L}$ inhibitor group. Erismodegib, the Smoothed inhibitor with final concentration of 0, 1.5 and 2.5 $\mu\text{mol/L}$ was added into corresponding group, respectively. MTS method and Transwell cell migration method were used to detect the proliferation (A_{490} value) and relative mobility of HRMEC. The phosphorylation of PLC γ 1, Akt and Erk proteins were detected by Western blot. **Results** The relative expression of Hedgehog protein in the high glucose control group was 6.24 ± 0.11 , which was significantly

higher than 1.00 ± 0.00 in the normal control group ($t = 667.573, P < 0.001$). The A_{490} value was 1.349 ± 0.050 and 1.422 ± 0.053 , and the relative mobility rate was 2.34 ± 0.14 and 3.59 ± 0.32 in the $0.5 \mu\text{mol/L}$ agonist group and the $1.0 \mu\text{mol/L}$ agonist group, respectively, which were significantly higher than 1.203 ± 0.101 and 1.00 ± 0.00 in the normal control group (all at $P < 0.01$). The A_{490} value was 0.849 ± 0.010 and 0.737 ± 0.030 , and the relative mobility rate was 0.43 ± 0.02 and 0.27 ± 0.01 in the $1.5 \mu\text{mol/L}$ inhibitor group and the $2.5 \mu\text{mol/L}$ inhibitor group, respectively, which were significantly lower than 1.000 ± 0.040 and 1.00 ± 0.00 in the high glucose control group (all at $P < 0.01$). The phosphorylation ratios of PLC γ 1, Akt and Erk in the $0.5 \mu\text{mol/L}$ agonist group and the $1.0 \mu\text{mol/L}$ agonist group were significantly higher than those in the normal control group (all at $P < 0.01$). The phosphorylation ratios of PLC γ 1, Akt and Erk in the $1.5 \mu\text{mol/L}$ inhibitor group and the $2.5 \mu\text{mol/L}$ inhibitor group were significantly lower than those in the high glucose control group (all at $P < 0.01$). **Conclusions** High glucose induces the expression of Hedgehog protein in HRMEC. Hedgehog protein may regulate the function of HRMEC by regulating the phosphorylation of PLC γ 1, Akt and Erk in G Protein-coupled receptors pathway.

[Key words] Diabetic retinopathy; Hedgehog protein; G Protein-coupled receptors signaling pathway; Human retinal microvascular endothelial cell

Fund program: Science and Technology Guiding Program of Xiamen City (ZD2011S0335); Science and Technology Benefiting Program of Xiamen City (3502Z20184023)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.09.005

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是中国 50 岁以上糖尿病患者主要的致盲原因,其在糖尿病患者人群中的患病率为 24.7% ~ 35.7%,其中增生期 DR 占 3.3% ~ 7.4%^[1]。DR 早期病理改变为血-视网膜屏障的破坏,尤其是内屏障。内屏障由视网膜微血管内皮细胞 (human retinal microvascular endothelial cell, HRMEC) 及其间闭合小带和周细胞构成。屏障功能破坏可导致细胞增生迁移能力的改变,造成渗出、出血等严重的病理改变。Hedgehog 蛋白是一种调控胚胎发育和组织形成的蛋白,其信号通路的激活与肿瘤发生有关,属于异常增生现象,而视网膜新生血管形成也属于血管的异常增生。目前研究证实,多种细胞、细胞因子通过对胰岛素抵抗、葡萄糖代谢、氧化应激、炎症及生长因子等的影响促进 DR 的发生和发展^[2],但 DR 发生和发展的机制尚未完全阐明,治疗方法也在不断探索。目前已有关于 Hedgehog 蛋白与内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC)、角膜新生血管、脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV)、DR 等的研究,表明 Hedgehog 蛋白能够促进 EPC 的发育及角膜和 CNV 的形成^[3-7]。然而, Hedgehog 蛋白影响 DR 发生和发展的作用机制尚未完全明确。进一步阐明 DR 的发病机制并对其进行早期诊疗是目前的研究重点。本研究中检测 Hedgehog 蛋白激动剂及 Smoothed 抑制剂对 HRMEC 增生和迁移能力以及鸟苷酸结合蛋白偶联受体 (G Protein-Coupled Receptors, GPCRs) 通路下游 PLC γ 1、Akt 和 Erk 蛋白磷酸化表达的影响,探讨 Hedgehog 蛋白对 HRMEC 功能的影响及

其可能的信号通路机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 原代 HRMEC (美国 Angio-proteomie 公司) 购自上海复蒙生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 蛋白裂解液 (P0013B, 深圳 Beyotime 公司); Hedgehog 激动剂 purmorphamine (GC15064, 美国 GLP BIO 公司); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司); Smoothed 抑制剂 NVP-LDE225 (Erimodegib) (BCP02275, 上海瀚香生物科技有限公司); 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、兔抗人 β -actin 单克隆抗体 (#4970S)、兔抗人 PLC γ 1 单克隆抗体 (#5690S)、兔抗人 Akt 单克隆抗体 (#4691S)、兔抗人血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 单克隆抗体 (#9698S)、兔抗人 p-PLC γ 1 单克隆抗体 (#8713S)、兔抗人 p-Akt 单克隆抗体 (#4060S)、兔抗人 p-VEGF 单克隆抗体 (#2748S)、兔抗人 Erk 抗体 (#4370S)、HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (#7074S) (美国 CST 公司); ECL 发光液 (美国 PerkinElmer 公司)。酶标仪 (美国 Thermo 公司); DC 300F 正置荧光显微镜 (德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组处理 取培养至 3 ~ 6 代的 HRMEC, 正常培养基中葡萄糖浓度约为 4.5 mmol/L, 配制葡萄糖浓度为 30 mmol/L 的高糖培养基。取在正常培养基中培养 48 h 的细胞, 分为正常对照组、 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 激

动剂组和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组,分别加入终浓度为 0、0.5 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 Hedgehog 激动剂 purmorphamine 继续培养 24 h。将在高糖培养基中培养 48 h 的细胞分为高糖对照组、1.5 $\mu\text{mol/L}$ 抑制剂组和 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 抑制剂组,分别加入终浓度为 0、1.5 和 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Smoothed 抑制剂 Erismodegib 继续培养 24 h,进行后续实验。

1.2.2 MTS 细胞增生实验检测各组细胞增生能力

将细胞制成 2×10^5 个/ml 细胞悬液,按照 100 μl /孔接种至 96 孔板,按细胞分组处理各孔细胞,继续培养 2~6 h,直至细胞完全贴附。按体积分数 10% 的比例加入 MTS 工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。酶标仪检测 490 nm 波长下吸光度 (A_{490}) 值,每组设 6 个复孔,重复测量 3 次,取平均值。

1.2.3 Transwell 细胞迁移试验检测各组细胞迁移能力

取各组细胞,饥饿处理 12 h,胰蛋白酶消化并用无血清培养基重悬。调整细胞密度至 2×10^5 个/ml,取细胞悬液 200 μl 加入 Transwell 小室。24 孔板下室加入 500 μl 含体积分数 5% BSA 的培养基,常规培养 6 h。DAPI 染核后,使用 DC 300F 正置荧光显微镜拍照并计数穿过膜并附着在膜下室侧的细胞数。分别选取各孔相同位置 5 个视野计数细胞个数。迁移率为迁移细胞数占细胞总数的比例,以对照组为参照,计算各组细胞相对迁移率。

1.2.4 Western blot 法检测各组蛋白表达

收集各组细胞,采用蛋白裂解液冰上振荡裂解 20 min。离心半径 13.5 cm,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,采用 BCA 蛋白定量法测量蛋白质质量浓度。按比例加入 1/4 体积的 4 倍上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min 进行变性,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,12 000 r/min 离心 5 min,取上清。按每孔 20 μg 蛋白上样量,用质量分数 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行电泳分离,再用湿法转膜将蛋白转印至 PVDF 膜上,用质量分数 1% BSA 封闭后,孵育一抗和相应二抗,其中一抗稀释倍数均为 1:1 000,二抗稀释倍数为 1:5 000;之后用 ECL 发光液及显影液定影液进行蛋白的显影定影,最终胶片读取数据,用 Image J 软件进行灰度分析。以 β -actin 为内参照,计算各目的蛋白相对表达水平,并计算 PLC γ 1、Akt 和 Erk 磷酸化比率。每个样本设置 6 个复孔,同一样本重复测量 3 次,取平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件和 Prism 5.0 统计作图软件进行统计分析并作图。本研究中计量资料经 W 检验呈正态分布,以 mean \pm SD 表示。正常对照组和

高糖对照组 Hedgehog 蛋白相对表达量比较采用独立样本 t 检验,正常培养条件下不同剂量 Hedgehog 激动剂组以及高糖培养条件下不同剂量 Smoothed 抑制剂组细胞增生值、相对迁移率、PLC γ 1 磷酸化比值、Akt 磷酸化比值和 Erk 磷酸化比值比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常和高糖条件下 Hedgehog 蛋白表达情况

正常对照组和高糖对照组细胞 Hedgehog 蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 和 6.24 ± 0.11 ,高糖对照组细胞 Hedgehog 蛋白相对表达量明显高于正常对照组,差异有统计学意义 ($t = 667.573, P < 0.001$) (图 1)。

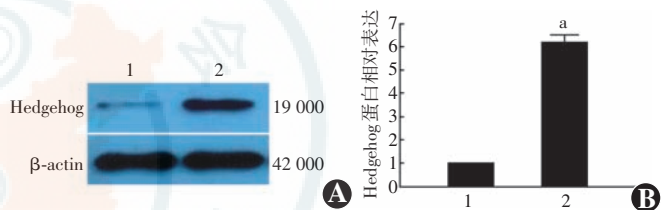


图 1 Western blot 法检测正常和高糖培养条件下 HRMEC 中 Hedgehog 蛋白表达 A: 各组 Hedgehog 蛋白表达电泳图 B: 各组 Hedgehog 蛋白相对表达量比较 与正常对照组比较, $^a P < 0.001$ (独立样本 t 检验, $n = 6$) 1: 正常对照组; 2: 高糖对照组

2.2 不同剂量 Hedgehog 激动剂对正常培养条件下 HRMEC 增生和迁移能力的影响

正常对照组、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组细胞增生能力 A_{490} 值分别为 1.203 ± 0.101 、 1.349 ± 0.050 和 1.422 ± 0.053 ,总体比较差异有统计学意义 ($F = 27.59, P < 0.001$)。0.5 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组 A_{490} 值明显高于正常对照组,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 2)。正常对照组、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组细胞相对迁移率分别为 1.00 ± 0.00 、 2.34 ± 0.14 和 3.59 ± 0.32 ,总体比较差异有统计学意义 ($F = 473.53, P < 0.001$)。0.5 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组细胞相对迁移率较正常对照组明显升高,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 3)。

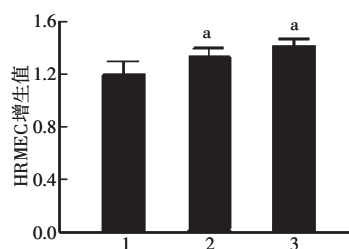


图 2 不同剂量 Hedgehog 激动剂组细胞增生值比较 $F = 27.59, P < 0.001$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 6$) 1: 正常对照组; 2: 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组; 3: 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 激动剂组

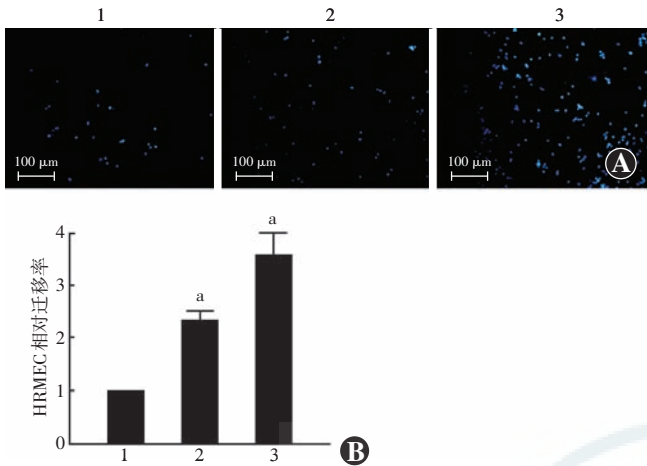


图 3 不同剂量 Hedgehog 激动剂对正常培养条件下 HRMEC 迁移能力的影响 A: 荧光显微镜观察不同剂量 Hedgehog 激动剂组细胞迁移情况 (DAPI, 标尺 = 100 μm) 0.5 μmol/L 激动剂组和 1.0 μmol/L 激动剂组细胞迁移数多于正常对照组 B: 不同剂量 Hedgehog 激动剂组细胞相对迁移率比较 $F=473.53, P<0.001$. 与正常对照组比较, $^aP<0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=6$) 1: 正常对照组; 2: 0.5 μmol/L 激动剂组; 3: 1.0 μmol/L 激动剂组

2.3 不同剂量 Hedgehog 激动剂对正常条件下培养的细胞中 PLCγ1 和 Akt、Erk 蛋白磷酸化水平的影响

正常对照组、0.5 μmol/L 激动剂组和 1.0 μmol/L 激动剂组细胞 PLCγ1 磷酸化比值分别为 1.00 ± 0.00 、 1.59 ± 0.13 和 2.94 ± 0.47 , Akt 磷酸化比值分别为 1.00 ± 0.00 、 2.07 ± 0.27 和 2.37 ± 0.05 , Erk 磷酸化比值分别为 1.00 ± 0.00 、 1.25 ± 0.02 和 1.57 ± 0.02 , 各组 PLCγ1 磷酸化比值、Akt 磷酸化比率和 Erk 磷酸化比值总体比较, 差异均有统计学意义 ($F=64.68, 59.70, 22.81$, 均 $P<0.05$)。0.5 μmol/L 激动剂组和 1.0 μmol/L 激动剂组细胞 PLCγ1 磷酸化比值、Akt 磷酸化比率和 Erk 磷酸化比率均明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (图 4)。

2.4 不同剂量 Smoothed 抑制剂对高糖条件下细胞增生和迁移能力的影响

高糖对照组、1.5 μmol/L 抑制剂组和 2.5 μmol/L 抑制剂组细胞增生能力分别为 1.000 ± 0.040 、 0.849 ± 0.010 和 0.737 ± 0.030 , 细胞相对迁移率分别为 1.00 ± 0.00 、 0.43 ± 0.02 和 0.27 ± 0.01 , 各组细胞增生值和相对迁移率总体比较差异均有统计学意义 ($F=12.826, 22.743$, 均 $P<0.05$)。1.5 μmol/L 抑制剂组和 2.5 μmol/L 抑制剂组细胞增生值和相对迁移率均较高糖对照组明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (图 5, 6)。

2.5 不同剂量 Smoothed 抑制剂对高糖条件下培养的细胞 PLCγ1、Akt 和 Erk 蛋白磷酸化水平的影响

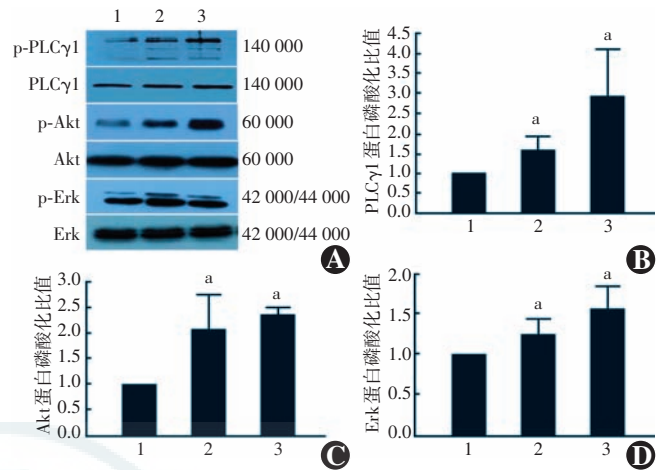


图 4 Western blot 法检测不同剂量 Hedgehog 激动剂组细胞中 PLCγ1、Akt 和 Erk 蛋白磷酸化水平 A: 各组细胞磷酸化 PLCγ1、Akt 和 Erk 蛋白表达电泳图 B: 不同剂量 Hedgehog 激动剂组 PLCγ1 磷酸化比值比较 $F=64.68, P=0.027$. 与正常对照组比较, $^aP<0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=6$) C: 不同剂量 Hedgehog 激动剂组 Akt 磷酸化比值比较 $F=59.70, P=0.033$. 与正常对照组比较, $^aP<0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=6$) D: 不同剂量 Hedgehog 激动剂组 Erk 磷酸化比值比较 $F=22.81, P=0.007$. 与正常对照组比较, $^aP<0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=6$) 1: 正常对照组; 2: 0.5 μmol/L 激动剂组; 3: 1.0 μmol/L 激动剂组

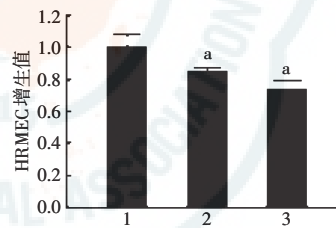


图 5 不同剂量 Smoothed 抑制剂组细胞增生值比较 $F=12.826, P=0.03$. 与高糖对照组比较, $^aP<0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=6$) 1: 高糖对照组; 2: 1.5 μmol/L 抑制剂组; 3: 2.5 μmol/L 抑制剂组

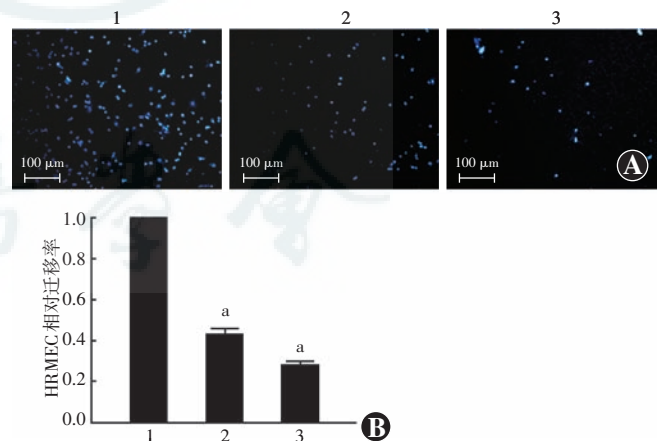


图 6 不同剂量 Smoothed 抑制剂对高糖培养条件下 HRMEC 迁移能力的影响 A: 荧光显微镜观察不同剂量 Smoothed 抑制剂组细胞迁移情况 (DAPI, 标尺 = 100 μm) 1.5 μmol/L 抑制剂组和 2.5 μmol/L 抑制剂组细胞迁移数明显少于高糖对照组 B: 不同剂量 Smoothed 抑制剂组细胞相对迁移率比较 $F=22.743, P=0.0347$. 与高糖对照组比较, $^aP<0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n=6$) 1: 高糖对照组; 2: 1.5 μmol/L 抑制剂组; 3: 2.5 μmol/L 抑制剂组

高糖对照组、1.5 μmol/L 抑制剂组和 2.5 μmol/L 抑制剂组 PLCγ1 磷酸化比值分别为 1.00 ± 0.00 、 $0.47 \pm$

0.01 和 0.21 ± 0.00 , Akt 磷酸化比值分别为 1.00 ± 0.00 、 0.75 ± 0.05 和 0.37 ± 0.02 , Erk 磷酸化比值分别为 1.00 ± 0.00 、 0.60 ± 0.03 和 0.24 ± 0.00 , 各组 PLC γ 1 磷酸化比值、Akt 磷酸化比值和 Erk 磷酸化比值总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 22.272$ 、 38.242 、 18.628 , 均 $P < 0.01$)。1.5 $\mu\text{mol/L}$ 抑制剂组和 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 抑制剂组 PLC γ 1 磷酸化比值、Akt 磷酸化比值和 Erk 磷酸化比值均明显低于高糖对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 7)。

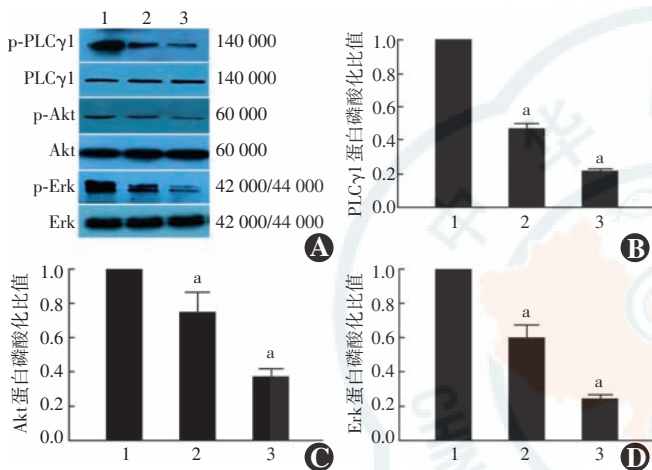


图 7 Western blot 法检测不同剂量的 Smoothed 抑制剂组中 PLC γ 1、Akt 和 Erk 蛋白磷酸化水平 A: 各组细胞磷酸化 PLC γ 1、Akt 和 Erk 蛋白表达电泳图 B: 不同剂量 Smoothed 抑制剂组 PLC γ 1 磷酸化比值比较 $F = 22.272$, $P = 0.009$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 6$) C: 不同剂量 Smoothed 抑制剂组 Akt 磷酸化比值比较 $F = 38.242$, $P = 0.005$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 6$) D: 不同剂量 Smoothed 抑制剂组 Erk 磷酸化比值比较 $F = 18.628$, $P = 0.010$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 6$) 1: 高糖对照组; 2: 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 抑制剂组; 3: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 抑制剂组

3 讨论

哺乳动物中存在 Sonic Hedgehog、Indian Hedgehog 和 Desert Hedgehog 3 个 Hedgehog 的同源基因, 分别编码 Shh、Ihh 和 Dhh 蛋白。Hedgehog 信号传递受靶细胞膜上 2 种受体 Patched (Ptc) 和 Smoothed (Smo) 的控制, 其中 Smo 是 Hedgehog 信号传递所必需的受体。Purmorphamine 是第一个针对 Smoothed 蛋白开发的小分子激动剂^[8]。Purmorphamine 能够激活 Hedgehog 信号通路, 导致其下游靶基因的上调和下调。Erismodegib 是一种选择性的具有生物活性的 Smo 拮抗剂, 能够通过拮抗 Smo 受体来抑制 Hedgehog 信号通路的活性^[9]。

GPCRs 是一类膜受体超家族, 广泛存在于真菌和

哺乳生物中, 其结构特点是细胞膜内段有 G 蛋白的结合位点, 可通过与 G 蛋白偶联向细胞内传递信号^[10-11]。vGPCR 有 α 、 β 和 γ 3 个亚基, 其中 α 亚基可激活 PLC γ 的活性, 从而激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 通路, Erk 蛋白表达增加, γ 亚基可激活磷酸肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、p38 和 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 通路的活性, 最终导致核转录因子 κB (nuclear transcription factor- κB , NF- κB) 激活。GPCRs 与大部分人类疾病相关, 因此, 其一直被视为最好的药物治疗靶点^[12]。目前已报道的参与 DR 的 GPCRs 大多属于视紫红质类受体亚家族及卷曲蛋白 (Frizzled) 受体亚家族, 而 Shh 蛋白恰巧属于 Frizzled 受体亚家族, 并且通过作用于其下游的蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 等来影响 PI3K 和 GPCRs 信号通路的活性。因此, 本研究筛选了与血管新生相关的 PI3K 和 GPCRs 信号通路, 验证 Hedgehog 蛋白是否也通过这 2 个信号通路机制来发挥促进 DR 发生和发展的作用。

细胞的增生迁移能力反映了细胞的活性状态及其在屏障功能中的稳定性。本研究中结果显示, Hedgehog 激动剂可增强正常培养条件下的 HRMEC 增生和迁移能力, Smoothed 抑制剂可减弱高糖培养条件下的 HRMEC 增生和迁移能力, 推测 Hedgehog 蛋白在 HRMEC 屏障功能中发挥一定的调控作用。

Qin 等^[3] 研究结果显示, AKT/GSK-3 β 介导的 Shh 通路可调控糖尿病中 EPC 的功能, 激活 Shh 信号通路能够增加 1 型糖尿病小鼠 EPC 的数量和功能, 并且加速新生血管形成。Wang 等^[13] 研究发现, Shh 信号通路参与调节病理性视网膜血管生成。van Tuyl 等^[14] 研究显示, DR 大鼠模型中 Shh 信号通路活性增强, Shh、VEGF 及功能性跨膜蛋白受体 Pthcd1 表达均升高。VEGF 是 Shh 信号通路介导新生血管形成的下游靶基因之一^[15]。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 信号通路在 DR 的发生和发展过程中起着重要作用^[6,16]。Shh 和 MAPK 信号通路是多种生长因子和细胞因子调控细胞增生、迁移的重要途径。Tomlinson 等^[17] 研究表明, 外源性 Shh 可降低高糖条件下 Müller 细胞中 ERK1/2 通路的表达, 同时 PI3K 通路的活性增强, 然而对 p38MAPK 信号通路却无明显影响; 其作用机制可能为糖尿病所致的高血糖、缺血、缺氧等的微环境激活了 ERK1/2 通路, 致使 Müller 细胞表达 VEGF 和神经胶质纤维酸性蛋白增多, 从而促进视网膜血管细胞的增生, 抑制细胞凋亡。本研究结果也显示, Hedgehog 蛋白激动剂上调

了正常条件下培养细胞 GPCRs 通路下游 PLC γ 1 和 Akt 蛋白的磷酸化水平, GPCRs 信号通路被激活, 从而促进 HRMEC 的增生和迁移; 而 Smoothed 蛋白抑制剂使高糖环境中培养的细胞 GPCRs 通路下游 PLC γ 1 和 Akt 蛋白的磷酸化水平降低, 减弱了高糖条件下 HRMEC 的增生和迁移能力。Zhang 等^[18] 研究还发现, 视网膜血管病变并不是一个独立的病理生理过程, 而是合并视网膜神经病变及神经胶质细胞病变出现的。在正常 C57BL/6 小鼠的视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 中 Shh 蛋白低表达, 而在高糖、缺氧、炎症等的刺激下, Shh 表达增加, 并促进 RGCs 的损伤, 加速 DR 的发生和发展^[19]。内源性和外源性 Shh 蛋白均能抑制糖尿病模型 SD 大鼠 RGCs 的凋亡, 从而发挥细胞保护作用。然而, 糖尿病视网膜神经损害的发生机制非常复杂, 推测 Shh 蛋白可能参与多种细胞信号通路, 进而发挥协同保护的作用, 其具体机制仍有待进一步研究。

本研究尚存在一定的局限性, 未进行在体功能学实验, 其次细胞实验的观察时间点较单一, 对各指标间相互的作用机制缺乏更加系统深入的对照研究。今后可考虑应用多种方法对 GPCRs 通路中激动剂及抑制剂的调控作用进行检测, 观察细胞功能的改变, 同时设立通路中更多的蛋白作为观察指标, 以更准确地阐述高糖状态下 HRMEC 中 Hedgehog 蛋白表达变化机制和对内皮细胞屏障功能的影响。

综上所述, 本研究结果表明高糖培养可诱导 HRMEC 中 Hedgehog 蛋白的表达, Hedgehog 蛋白通过调节 GPCRs 信号通路蛋白的磷酸化水平来促进 HRMEC 的增生和迁移。本研究为 Hedgehog 蛋白在 DR 中作用的深入研究提供了实验基础。

参考文献

- [1] 中华医学会眼科学会眼底病学组. 我国糖尿病视网膜病变临床诊疗指南 (2014 年) [J]. 中华眼科杂志, 2014, 50 (11) : 851-865. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2014.11.014.
- [2] 马燕, 姜燕荣. 炎症反应和炎症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.
- [3] Ma Y, Jiang YR. Research advance in the relationship of inflammatory reaction and inflammatory factor with diabetic retinopathy [J]. Chin J Ophthalmol, 2013, 31 (1) : 86-90. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.01.021.
- [4] Qin Y, He YH, Hou N, et al. Sonic hedgehog improves ischemia-induced neovascularization by enhancing endothelial progenitor cell function in type 1 diabetes [J]. Mol Cell Endocrinol, 2016, 423 : 30-39. DOI:10.1016/j.mce.2016.01.005.
- [5] Huang H, He J, Johnson D, et al. Deletion of placental growth factor prevents diabetic retinopathy and is associated with Akt activation and HIF1 α -VEGF pathway inhibition. diabetes 2015; 64 : 200-212 [J]. Diabetes, 2015, 64 (3) : 1067. DOI:10.2337/db15-er03.
- [6] Nochioka K, Okuda H, Tatsumi K, et al. Hedgehog signaling components are expressed in choroidal neovascularization in laser-induced retinal lesion [J]. Acta Histochem Cytochem, 2016, 49 (2) : 67-74. DOI:10.1267/ahc.15036.
- [7] Surace EM, Balaggan KS, Tessitore A, et al. Inhibition of ocular neovascularization by hedgehog blockade [J]. Mol Ther, 2006, 13 (3) : 573-579. DOI:10.1016/j.ymthe.2005.10.010.
- [8] Yao Q, Renault MA, Chapouly C, et al. Sonic hedgehog mediates a novel pathway of PDGF-BB-dependent vessel maturation [J]. Blood, 2014, 123 (15) : 2429-2437. DOI:10.1182/blood-2013-06-508689.
- [9] Sinha S, Chen JK. Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened [J]. Nat Chem Biol, 2006, 2 (1) : 29-30. DOI:10.1038/nchembio753.
- [10] Fendrich V, Wiese D, Waldmann J, et al. Hedgehog inhibition with the orally bioavailable Smo antagonist LDE225 represses tumor growth and prolongs survival in a transgenic mouse model of islet cell neoplasms [J]. Ann Surg, 2011, 254 (5) : 818-823. DOI:10.1097/SLA.0b013e318236bc0f.
- [11] Lohse MJ, Maiello I, Calebiro D. Kinetics and mechanism of G protein-coupled receptor activation [J]. Curr Opin Cell Biol, 2014, 27 : 87-93. DOI:10.1016/j.ceb.2013.11.009.
- [12] Manglik A, Kobilka B. The role of protein dynamics in GPCR function: insights from the β 2AR and rhodopsin [J]. Curr Opin Cell Biol, 2014, 27 : 136-143. DOI:10.1016/j.ceb.2014.01.008.
- [13] Dror RO, Pan AC, Arlow DH, et al. Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108 (32) : 13118-13123. DOI:10.1073/pnas.1104614108.
- [14] Wang LC, Liu ZY, Gambardella L, et al. Regular articles: conditional disruption of hedgehog signaling pathway defines its critical role in hair development and regeneration [J]. J Invest Dermatol, 2000, 114 (5) : 901-908. DOI:10.1046/j.1523-1747.2000.00951.x.
- [15] van Tuyl M, Groenman F, Wang J, et al. Angiogenic factors stimulate tubular branching morphogenesis of sonic hedgehog-deficient lungs [J]. Dev Biol, 2007, 303 (2) : 514-526. DOI:10.1016/j.ydbio.2006.11.029.
- [16] Wan TT, Li XF, Sun YM, et al. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic retinopathy [J]. Biomed Pharmacother, 2015, 74 : 145-147. DOI:10.1016/j.biopha.2015.08.002.
- [17] 王竞男, 杨立群, 邓宇斌. 灯盏花素对人视网膜色素上皮细胞和糖尿病大鼠视网膜 VEGF 表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31 (5) : 900-905. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2015.05.023.
- [18] Wang JN, Yang LQ, Deng YB. Effect of scutellarin on VEGF expression in human retinal pigment epithelial cells and retinas of diabetic rats [J]. 2015, 31 (5) : 900-905. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2015.05.023.
- [19] Tomlinson DR. Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications [J]. Diabetologia, 1999, 42 (11) : 1271-1281. DOI:10.1007/s001250051439.
- [20] Zhang F, Li C, Wang R, et al. Activation of GABA receptors attenuates neuronal apoptosis through inhibiting the tyrosine phosphorylation of NR2A by Src after cerebral ischemia and reperfusion [J]. Neuroscience, 2007, 150 (4) : 938-949. DOI:10.1016/j.neuroscience.2007.09.070.
- [21] Kim NH, Oh JH, Seo JA, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF receptor FLT-1 in diabetic nephropathy [J]. Kidney Int, 2005, 67 (1) : 167-177. DOI:10.1111/j.1523-1755.2005.00067.x.

(收稿日期:2019-01-21 修回日期:2019-07-28)

(本文编辑:张宇)