

sgp130 对糖尿病小鼠视网膜 p-STAT3 及 VEGF-A 表达的影响

刘光辉^{1,2*}, 史常旋^{3*}, 洪雅军³, 郑永征^{1,2}, 王 航^{2,3}, 孟 春^{2,3}

引用:刘光辉,史常旋,洪雅军,等. sgp130 对糖尿病小鼠视网膜 p-STAT3 及 VEGF-A 表达的影响. 国际眼科杂志 2023; 23(3): 375-378

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No.81774369);福建省卫生健康中青年科研重大项目(No.2021ZQNZD012)

作者单位:¹(350004)中国福建省福州市,福建中医药大学附属人民医院眼科;²(350004)中国福建省福州市,福建中医药大学中西医结合眼科研究所;³(350108)中国福建省福州市,福州大学生物科学与工程学院

*:刘光辉和史常旋对本文贡献一致。

作者简介:刘光辉,毕业于温州医科大学,博士,副主任医师,副教授,研究方向:新生血管性眼病;史常旋,毕业于福州大学,硕士,研究方向:眼用抗炎蛋白药物研发。

通讯作者:孟春,毕业于华东理工大学,博士,教授,研究方向:眼用抗炎蛋白药物研发. mengchun@fzu.edu.cn

收稿日期:2022-04-12 修回日期:2023-02-15

摘要

目的:观察可溶性糖蛋白 130(sgp130)对糖尿病(DM)小鼠视网膜 p-STAT3 及 VEGF-A 表达的影响,探讨 sgp130 防治糖尿病视网膜病变(DR)炎性损害的可能性。

方法:小鼠 45 只被随机分为正常组、DM 组和 sgp130 组。采用链脲佐菌素对 DM 组和 sgp130 组进行 DM 造模。正常组、DM 组不做特殊干预,sgp130 组在第 1、5wk 被给予 1.5mg/mL sgp130 2 μ L 进行玻璃体腔注射治疗。10wk 后处死所有小鼠,检查视网膜组织 IL-6、p-STAT3、VEGF-A 等蛋白的表达。

结果:在第 10wk 时,DM 组视网膜 IL-6、p-STAT3、VEGF-A 表达较正常组升高(均 $P < 0.01$)。sgp130 组 p-STAT3、VEGF-A 表达水平较 DM 组低(均 $P < 0.01$)。

结论:sgp130 可以选择性拮抗 IL-6 反式信号传导通路,下调下游炎症因子 VEGF-A 的表达,可以用于干预 DM 引起的 IL-6 相关性视网膜炎症性损害。

关键词:糖尿病视网膜病变;炎症;白介素 6;p-STAT3;血管内皮生长因子 A(VEGF-A);可溶性糖蛋白 130(sgp130)

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.3.05

Effects of soluble glycoprotein 130 on expression of p-STAT3 and vascular endothelial growth factor-A in retina of mice with diabetes mellitus

Guang-Hui Liu^{1,2*}, Chang-Xuan Shi^{3*}, Ya-Jun Hong³, Yong-Zheng Zheng^{1,2}, Hang Wang^{2,3}, Chun Meng^{2,3}

Foundation items: National Natural Science Foundation of China

(No. 81774369); Major Program for Middle-aged and Young Scientist of Fujian Health System (No.2021ZQNZD012)

¹Department of Ophthalmology, Affiliated People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, Fujian Province, China; ²Eye Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, Fujian Province, China; ³College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, Fujian Province, China

Co-first authors: Guang-Hui Liu and Chang-Xuan Shi

Correspondence to: Chun Meng. Eye Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, Fujian Province, China; College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350108, Fujian Province, China. mengchun@fzu.edu.cn

Received:2022-04-12 Accepted:2023-02-15

Abstract

• AIM: To observe the effect of soluble glycoprotein 130 (sgp130) on expression of p-STAT3 and vascular endothelial growth factor (VEGF)-A in retina of mice with diabetes mellitus (DM), and explore the possibility of sgp130 in interfering with inflammatory damage of diabetic retinopathy (DR).

• METHODS: A total of 45 mice were randomly divided into normal group, DM group and sgp130 group. DM models were made in DM group and sgp130 group with streptozotocin. No special intervention was given to normal group and DM group, but sgp130 group was given intravitreal injection of 1.5mg/mL sgp130 2 μ L at the 1 and 5wk. After 10wk, all the mice were sacrificed to assess the protein expression of interleukin 6 (IL-6), p-STAT3 and VEGF-A in the retina.

• RESULTS: The expressions of IL-6, p-STAT3 and VEGF-A in retina of DM group were higher than those of normal group at 10wk (all $P < 0.01$). The expression of p-STAT3 and VEGF-A in sgp130 group were lower than those in DM group (all $P < 0.01$).

• CONCLUSION: The sgp130 can selectively antagonize the trans signal transduction pathway of IL-6, down-regulate the expression of downstream inflammatory factors VEGF-A, and it may be used in the intervention of retinal inflammatory damage related with IL-6 in DM.

• KEYWORDS: diabetic retinopathy; inflammation; interleukin 6; p-STAT3; vascular endothelial growth factor-A(VEGF-A); soluble glycoprotein 130(sgp130)

Citation:Liu GH, Shi CX, Hong YJ, et al. Effects of soluble glycoprotein 130 on expression of p-STAT3 and vascular endothelial growth factor-A in retina of mice with diabetes mellitus. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2023;23(3):375-378

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)最常见的微血管并发症和全球主要的致盲性眼病之一。DR发病机制复杂,至今仍未完全阐明。研究认为DR与蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)激活、多元醇代谢异常、己糖胺途径增加、蛋白非酶糖基化等多因素有关^[1]。自1990年代以来,炎症因子在DR发病过程中的作用日益受到重视,越来越多的研究表明炎症反应异常激活在DR发病中起重要的作用^[2-3]。白介素6(interleukin 6, IL-6)作为炎症因子在DR的启动及发展中具有重要的地位^[4-5]。可溶性糖蛋白130(soluble glycoprotein 130, sgp130)是IL-6的游离受体,能够抑制IL-6反式信号转导通路介导的炎症^[6]。本研究观察了糖尿病小鼠视网膜中IL-6、p-STAT3和VEGF-A表达及sgp130的拮抗效应,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级6周龄ICR雄性小鼠45只,购买自上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号SCXK(沪)2017-0005]。实验动物的饲养及处理遵循国家科学技术委员会1988年颁布的《实验动物管理条例》执行。本实验通过福州大学实验动物伦理学委员会审查。

1.1.2 主要试剂及仪器 sgp130(福州大学生物科学与工程学院CHO-K1SP稳定细胞系表达并纯化),抗IL-6抗体(1:1000,美国abcam公司),抗p-STAT3抗体(1:1000,美国CST公司),抗VEGF-A抗体(1:1000,武汉爱博泰克生物科技有限公司),抗 β -actin抗体(1:1000,美国Proteintech),生物素标记的羊抗兔IgG(1:5000,美国abcam公司),链脲佐菌素(Streptozotoci, STZ;美国Thermo Fisher公司),RIPA裂解液、蛋白酶磷酸酶抑制剂(上海碧云天生物技术有限公司),G35注射器针头、纳升注射器(美国WPI公司),蛋白垂直电泳槽(北京六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型及分组干预 小鼠经简单数字随机法分为3组:正常组、DM组和sgp130组,每组各15只,其中DM组和sgp130组参考文献[7]的方法行DM造模。临用前以0.1mmol/L、pH4.5柠檬酸缓冲液溶解STZ,配制成1%溶液。小鼠禁食8h后,以STZ 60mg/kg进行腹腔注射,连续注射5d。造模结束3d后,取尾血行血糖测定,血糖 ≥ 11.1 mmol/L者为造模成功。造模成功后,连续喂养10wk。于第1、5wk的第1d对sgp130组小鼠进行sgp130玻璃体腔注射,浓度为1.5mg/mL,注射量2 μ L,注射后予氧氟沙星滴眼液点眼,每日4次,共7d。正常组、DM组小鼠予常规喂养,不做特殊干预。

1.2.2 蛋白免疫印迹法检测IL-6和p-STAT3及VEGF-A蛋白 造模成功并喂养10wk后,采用2%戊巴比妥腹腔注射,过量麻醉处死所有小鼠,提取各组小鼠视网膜组织,每次随机选取各组组内3只小鼠眼球做为1个蛋白样本,每组各计3个样本。参考文献[7]的方法进行蛋白免疫印迹法检测。加入含有RIPA裂解液对视网膜组织进行匀浆,4 $^{\circ}$ C条件下离心5min,取上清。以BSA为标准,用Bradford法对上清进行蛋白定量。取20 μ g蛋白样品,10% SDS-PAGE电泳,100V转移1h至硝酸纤维素薄膜,放入

封闭液中37 $^{\circ}$ C封闭1h,一抗4 $^{\circ}$ C过夜。同时,另1张用不含抗体TBS-T液孵育,作为阴性对照。反复洗膜后,将膜与抗IgG抗体孵育,室温轻摇1h,洗膜后,用Western blotting印迹观察。以 β -actin作为内参,采用Gel-Pro Analyzer 4分析条带光密度值,获取目的蛋白相对表达量。

统计学分析:采用Graphad 6进行数据处理,采用单因素方差分析进行多组间比较,进一步的两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 sgp130对IL-6和p-STAT3蛋白表达的影响 各组间IL-6、p-STAT3表达差异具有统计学意义($F = 37.085$ 、 137.370 ,均 $P < 0.01$)。DM组(1.234 ± 0.154)和sgp130组(1.190 ± 0.212)IL-6的表达水平较正常组(0.271 ± 0.055)均显著升高,差异具有统计学意义($t = 2.674$, $P = 0.01$; $t = 3.902$, $P = 0.002$)。DM模型鼠中,sgp130组和DM组IL-6的表达水平差异无统计学意义($t = 0.379$, $P = 0.784$),见图1A、D。DM组STAT3磷酸化增加,p-STAT3表达水平(0.989 ± 0.030)较正常组(0.582 ± 0.026)显著升高,差异具有统计学意义($t = 0.22$, $P < 0.01$)。sgp130组p-STAT3表达水平(0.492 ± 0.055)较正常组差异无统计学意义($t = 2.736$, $P = 0.061$),较DM组显著降低,差异具有统计学意义($t = 1.861$, $P < 0.01$),见图1B、D。

2.2 sgp130对VEGF-A蛋白表达的影响 各组间VEGF-A表达差异具有统计学意义($F = 96.780$, $P < 0.01$)。DM组(0.509 ± 0.047)和sgp130组(0.345 ± 0.309)VEGF-A表达水平较正常组(0.140 ± 0.008)均显著升高,差异具有统计学意义($t = 3.447$, 3.754 ,均 $P < 0.01$)。DM模型鼠中,sgp130组VEGF-A表达水平较DM组低,差异具有统计学意义($t = 0.362$, $P = 0.007$),见图1C、D。

3 讨论

高度慢性炎症是DR发生发展中重要的因素,炎症因子在糖尿病视网膜微血管损害中具有重要的作用^[2-3]。IL-6是人体中主要的炎症因子之一,主要由单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等分泌产生。在生理条件下,健康个体血液中IL-6的浓度几乎检测不到;在炎症病理条件下,IL-6水平可显著上升^[8]。临床研究表明,DR患者的血清、房水和玻璃体中IL-6水平均有升高,并参与了DR的进程^[9-10]。基础研究结果提示,IL-6可诱导视网膜血管内皮细胞炎症性损害,引发视网膜慢性炎症等连锁反应^[7]。

IL-6的炎症效应主要由IL-6反式信号传导通路介导,即IL-6与游离IL-6受体R(soluble IL-6 receptor, sIL-6R)结合形成活化的IL-6/sIL-6R复合物,复合物再与gp130结合,引起gp130的二聚体化,从而启动细胞内信号传导^[11]。在病理情况下,IL-6和sIL-6R表达量将急剧增长,形成大量的IL-6/sIL-6R聚合体,通过反式途径将IL-6信号传入胞内,再通过JAK/STAT信号通路诱导炎症信号传导因子STAT3磷酸化。并介导VEGF等下游炎症因子的过表达,诱发炎症损害^[12]。

动物研究显示,糖尿病模型动物视网膜组织中IL-6及STAT3过表达,p-STAT3和VEGF明显增加^[13-14]。临床观察表明,DR患者的血清和房水IL-6和sIL-6R浓度显著升高^[15];DR患者房水中IL-6水平随着DR病变的严重程度增加,且与眼内VEGF的表达量呈正向相关性^[16]。本研究结果显示,DM小鼠视网膜组织较正常组在第10wk

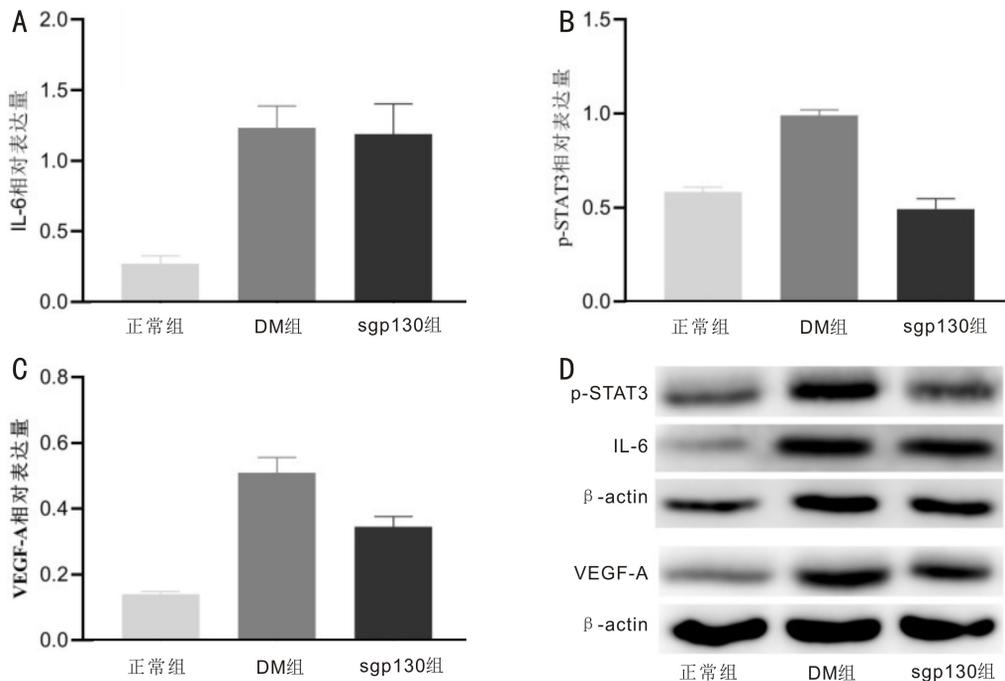


图1 各组小鼠视网膜组织中 IL-6 和 p-STAT3 及 VEGF-A 蛋白的表达情况 A:IL-6;B:p-STAT3;C:VEGF-A;D:各组蛋白条带。

即可出现 IL-6 表达增高,STAT3 磷酸化水平也升高,提示存在炎症传导通路的激活,且下游炎症效应因子 VEGF-A 表达增强,与既往研究报道一致。因此,拮抗 IL-6 反式信号传导通路抑制炎症信号的传递可作为 DR 的一种潜在治疗手段。

sgp130 是 IL-6 反式信号传导通路的天然拮抗剂。sgp130 作为 IL-6 受体 gp130 的可溶性形式,广泛分布于全身。其能与 IL-6/sIL-6R 结合,使 IL-6/sIL-6R 失活^[6],在不影响经典信号转导的情况下选择性阻断 IL-6 反式信号转导,可起到负性调节的作用。已有研究证实,中和 IL-6 及 IL-6R 对风湿性关节炎、哮喘、炎症肠病等多种炎症疾病均有改善作用^[17]。因此,增加外源性 sgp130 拮抗 IL-6/sIL-6R 可抑制 IL-6 引起的视网膜炎症性损害。Valle 等^[18]体外研究结果表明 sgp130-Fc 可以抑制 IL-6 反式信号通路,减轻视网膜血管内皮细胞炎症和内皮屏障破坏。本研究从体内实验角度揭示了 sgp130 能够拮抗 DM 小鼠 IL-6 反式信号通路,下调 STAT3 磷酸化,降低 p-STAT3 的表达和下游炎症因子 VEGF-A 的表达。VEGF 是 DM 导致视网膜损害的一个重要炎症因子,sgp130 能够降低 VEGF 的表达,意味着 sgp130 能够拮抗 DM 引起的视网膜炎症损伤。然而,本研究也观察到 sgp130 并不能完全阻断 VEGF 表达水平的升高,提示 VEGF 的表达除了 IL-6 反式信号传导通路外,可能还存在着其他信号通路的调控。

IL-6 也是一个多效因子,其对组织还具有保护和抗炎效应,这种效应主要是通过 IL-6 的经典信号传导通路来实现的。因此,完全阻断包含 IL-6 经典途径在内的信号传递可能带来不良的副反应,如增加细菌或病毒感染风险等^[6]。理论上 sgp130 可以选择性拮抗 IL-6 反式信号通路,避免上述缺点。本研究的结果显示,sgp130 对糖尿病小鼠视网膜中 IL-6 的表达并无显著影响,这可能与以下因素有关:(1)在 DM 状态下,视网膜中 IL-6 升高主要归因于 IL-6 系统性升高^[7-8];(2)sgp130 对单独的 IL-6

没有可测量的亲和力^[6],玻璃体腔注射 sgp130 失活的为 IL-6/sIL-6R 复合物,调控下游炎症因子的表达,作用范围局限于眼内,而对全身影响较小。研究还观察到 sgp130 并未完全阻断 STAT3 的磷酸化,这意味着外源性 sgp130 可以在不影响经典信号传导通路的情况下,实现选择性拮抗 IL-6 反式信号传导通路抑制炎症信号的传递,避免既往广谱阻断 IL-6 或 IL-6R 带来的副作用。这或将成为 sgp130 拮抗 DR 炎症损害的优势所在。

综上所述,sgp130 可以选择性拮抗 IL-6 反式信号传导通路,降低 DM 小鼠视网膜 STAT3 的磷酸化,下调下游炎症因子 VEGF-A 的表达,可以用于干预 DM 引起的视网膜微血管的炎症损伤。

参考文献

- 1 Kang Q, Yang C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Redox Biol* 2020;37:101799
- 2 Semeraro F, Cancarini A, dell'Omo R, et al. Diabetic retinopathy: vascular and inflammatory disease. *J Diabetes Res* 2015;2015:582060
- 3 Semeraro F, Morescalchi F, Cancarini A, et al. Diabetic retinopathy, a vascular and inflammatory disease: therapeutic implications. *Diabetes Metab* 2019;45(6):517-527
- 4 Arjamaa O, Pöllönen M, Kinnunen K, et al. Increased IL-6 levels are not related to NF- κ B or HIF-1 α transcription factors activity in the vitreous of proliferative diabetic retinopathy. *J Diabetes Complications* 2011;25(6):393-397
- 5 Jung BJ, Lee MY, Jeon S. Systemic factors related to intraocular levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol* 2019;2019:4831967
- 6 Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest* 2011;121(9):3375-3383
- 7 Robinson R, Srinivasan M, Shanmugam A, et al. Interleukin-6 trans-signaling inhibition prevents oxidative stress in a mouse model of early diabetic retinopathy. *Redox Biol* 2020;34:101574
- 8 Kang SJ, Narazaki M, Metwally H, et al. Historical overview of the

interleukin-6 family cytokine. *J Exp Med* 2020;217(5):e20190347

9 Funatsu H, Yamashita H, Noma H, *et al.* Aqueous humor levels of cytokines are related to vitreous levels and progression of diabetic retinopathy in diabetic patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243(1):3-8

10 马高恩, 焦云娟, 马萧萧, 等. 血清 IL-6、TGF- β 1 在糖尿病视网膜病变患者中的表达及意义. *中国卫生工程学* 2020;19(2):305-306

11 Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci* 2012;8(9):1237-1247

12 Yun JH, Park SW, Kim KJ, *et al.* Endothelial STAT3 activation increases vascular leakage through downregulating tight junction proteins: implications for diabetic retinopathy. *J Cell Physiol* 2017;232(5):1123-1134

13 杨馥宇, 刘辉, 苏杰, 等. IL-6、STAT3 在糖尿病视网膜病变大鼠中的表达及曲克芦丁水溶液治疗对其水平的影响. *解放军医药杂志*

2022;34(6):7-10

14 Cho CH, Roh KH, Lim NY, *et al.* Role of the JAK/STAT pathway in a streptozotocin-induced diabetic retinopathy mouse model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2022;260(11):3553-3563

15 Chen H, Zhang XZ, Liao NY, *et al.* Increased levels of IL-6, sIL-6R, and sgp130 in the aqueous humor and serum of patients with diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2016;22:1005-1014

16 周林, 康建芳, 冯军, 等. 糖尿病视网膜病变患者房水 VEGF 和 IL-6 水平的测定及其临床意义. *中国实用眼科杂志* 2011;29(1):21-24

17 Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol* 2018;18(12):773-789

18 Valle ML, Dworshak J, Sharma A, *et al.* Inhibition of interleukin-6 trans-signaling prevents inflammation and endothelial barrier disruption in retinal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2019;178:27-36