

雌激素对缺氧视网膜 Müller 细胞 PEDF 和 VEGF 表达的影响

穆 华, 张晓梅, 冯卓蕾, 王业青

基金项目: 黑龙江省青年基金资助项目 (No. QC08C24)

作者单位: (150001) 中国黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院眼科医院

作者简介: 穆华, 女, 博士, 副主任医师, 副教授, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 张晓梅, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 眼底病。

zhangxm66@tom.com

收稿日期: 2012-06-15 修回日期: 2012-10-18

Effect of estrogen on the expression of PEDF and VEGF in cultured retinal Müller cells under hypoxic condition

Hua Mu, Xiao-Mei Zhang, Zhuo-Lei Feng, Ye-Qing Wang

Foundation item: Youth Foundation of Heilongjiang Province, China (No. QC08C24)

Eye Hospital of the First Clinical Medicine College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Xiao-Mei Zhang. Eye Hospital of the First Clinical Medicine College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. zhangxm66@tom.com

Received: 2012-06-15 Accepted: 2012-10-18

Abstract

• AIM: To explore the effects of estrogen on the expression of pigment epithelium derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the cultured rat retinal Müller cells under hypoxia.

• METHODS: Effects of estrogen on the expression of PEDF and VEGF in the cultured rat retinal Müller cells were investigated with the methods of RT-PCR and Western blotting analysis.

• RESULTS: The levels of PEDF mRNA and protein decreased and VEGF mRNA and protein increased when the Müller cells were under hypoxic condition for 24 hours. Estrogen had protective effect on Müller cells.

• CONCLUSION: Estrogen can regulate the expression of PEDF which may play an important role on retinal neovascularization.

• KEYWORDS: estrogen; pigment epithelium derived factor; vascular endothelial growth factor; Müller cells; hypoxia

Citation: Mu H, Zhang XM, Feng ZL, et al. Effect of estrogen on the expression of PEDF and VEGF in cultured retinal Müller cells under hypoxic condition. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012; 12 (11): 2066-2068

摘要

目的: 探讨雌激素对缺氧视网膜 Müller 细胞色素上皮衍生因子 (PEDF) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 表达的影响。

方法: 采用反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 和 Western-blot 印迹分析方法分别测定不同浓度雌二醇 (E_2) 作用于缺氧 Müller 细胞后, 细胞内 PEDF mRNA, VEGF mRNA 及相应的蛋白表达水平。

结果: 缺氧 24h 后 PEDF mRNA 及蛋白表达明显降低, 10^{-5} mmol/L 和 10^{-6} mmol/L E_2 作用于 Müller 细胞后可明显缓解由于缺氧引起的细胞内 PEDF mRNA 及蛋白表达的降低, 并与 E_2 的浓度有关。缺氧 24h 后 VEGF mRNA 及蛋白表达明显升高, 10^{-5} mmol/L 和 10^{-6} mmol/L E_2 作用于 Müller 细胞后可以明显降低细胞内 VEGF mRNA 及蛋白表达水平, 并与 E_2 的浓度有关。

结论: 雌激素可以调控缺氧条件下视网膜 Müller 细胞内 PEDF 和 VEGF 的表达, 对视网膜病理性新生血管的形成具有保护作用。

关键词: 雌激素; 色素上皮衍生因子; 血管内皮生长因子; Müller 细胞; 缺氧

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.11.06

引用: 穆华, 张晓梅, 冯卓蕾, 等. 雌激素对缺氧视网膜 Müller 细胞 PEDF 和 VEGF 表达的影响. 国际眼科杂志 2012; 12 (11): 2066-2068

0 引言

新生血管形成是许多眼病的共同特征, 如增生型糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞、早产儿视网膜病变等。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和色素上皮衍生因子 (pigment epithelium derived factor, PEDF) 之间动态的平衡在新生血管形成过程中起着重要的作用。近年来, 关于雌激素在视网膜血管生成调控方面的作用的研究越来越多, 有研究表明在不同的病理条件下, 雌激素可以使视网膜的新生血管形成维持在相对比较正常的水平。目前, 关于雌激素对 PEDF 和 VEGF 的调控作用研究较少, 因此, 我们通过研究雌激素对缺氧视网膜 Müller 细胞 PEDF 和 VEGF 表达的影响, 探讨雌激素对视网膜新生血管的调控机制。

1 材料和方法

1.1 材料 出生 5~7d 的健康 Sprague-Dwley (SD) 大鼠 50 只, 雌雄不限, 由哈医大一院动物实验中心提供。Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM), 特级胎牛血清, Trizol 试剂, 青霉素和链霉素均购于美国 Gibco 公司; 17β -雌二醇 ($17\beta-E_2$) 购自美国 Sigma 公司。PEDF, VEGF 多克隆抗体来自美国 Santa Cruz 公司。化学发光 (ECL) Western 检测系统购自美国 Amersham Biotech 公司; RNA PCR 套包购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞鉴定 采用胰蛋白酶消化法^[1]培养 Müller 细胞。采用多种方法对传代后第 3 代细胞联合鉴定,包括光学显微镜及透射电子显微镜观察,以及用卵白素-生物素-过氧化物酶复合物技术(ABC 法)进行神经胶质酸性蛋白(GFAP)染色,以在细胞胞膜、胞浆或胞核部位出现棕黄色颗粒者判定为阳性,阳性细胞在盖玻片上分布需均匀一致。

1.2.2 实验分组 第 3 代细胞用于实验,当细胞接近 80% 融合时,弃掉含有血清的培养液,换无血清培养液培育 24h,再弃掉无血清培养液。细胞分 5 组:正常对照组,细胞中加入 DMEM 培养液后,于正常条件下培养;缺氧对照组,加入 DMEM 培养液后,细胞置于 5% CO₂, 94% N₂ 和 1% O₂ 的湿房内;缺氧+E₂组,DMEM 培养液中分别预先加入不同浓度的 E₂(10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ mmol/L),然后将细胞置于 5% CO₂, 94% N₂ 和 1% O₂ 的湿房内。24h 后收集 5 组细胞分别用于 RT-PCR 和 Western-blot 分析。每种条件准备 3 份,实验至少获得 3 次可重复性结果。

1.2.3 RT-PCR 检测 Müller 细胞中 PEDF mRNA 和 VEGF mRNA 的表达 RNA 分离系统提取全部 RNA,使用美国 Invitrogen 公司逆转录酶及 PEDF 引物进行逆转录反应。PEDF 上游引物为 5'-TACTCCTCTGGACTGGAGCC-3', 下游引物 5'-CTATCGGAGGTTGCCACTG-3', 目的片断大小为 499bp 碱基对。目的基因 PEDF 的 PCR 条件为 95℃ 2min, 94℃ 1min, 60℃ 1min, 72℃ 45s, 25 个循环后 72℃ 延伸 10min。VEGF 上游引物 5'-TGCTCTCTTGGGTGCACTGG-3', 下游引物为 5'-TTCTCCGCTCTGAACAAGGC-3', 目的片断大小为 509bp, 目的基因 VEGF 的 PCR 条件为: 95℃ 2min, 94℃ 1min, 58℃ 45s, 72℃ 45s, 25 个循环后 74℃ 延伸 10min。循环结束后, 15g/L 琼脂糖凝胶电泳。紫外透射灯下观察结果,用凝胶图像扫描分析系统进行分析,通过目的基因与内参基因 β-actin 条带的光密度的比值,做 PEDF mRNA 和 VEGF mRNA 的相对含量分析。

1.2.4 Western-blot 检测 PEDF 及 VEGF 蛋白质的表达

0.01mol/L 磷酸缓冲溶液(PBS)冲洗细胞后,置于冷水浴的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液中溶解,细胞脱离培养瓶后,通过 26G 针头 15 次使形成均质的混悬液,细胞碎片 4℃ 下离心, 10000r/min×5min, 离心半径 15cm, 收集上清液,考马斯亮蓝染色法测定蛋白质含量。细胞溶解液蛋白(50μg)在十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶上电泳,半干式电转膜,封闭后分别加入 1:1000 稀释的单克隆抗体(鼠抗人 PEDF 抗体 I-15, 美国 Santa Cruz 公司;鼠抗人 VEGF 抗体), 4℃ 下孵化过夜,洗膜后加入结合辣根过氧化物酶的二抗 1:1000, 室温孵育 1h, 洗膜后应用 ECL 显色剂显影,洗片进行图像分析,检测密度扫描值。同法检测辣根过氧化物酶标记的 β-肌动蛋白(β-actin)内参照蛋白,以目的基因与内参基因条带的光密度的比值作为 PEDF 及 VEGF 蛋白质的相对含量分析。

统计学分析:应用 SPSS 11.0 软件,每组光密度比值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对缺氧+E₂组各组与缺氧对照组间进行方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞鉴定结果 原代细胞接种 14d 后,细胞基本融合。传至 3 代时细胞稳定且纯度较高,GFAP 免疫细胞化学鉴定,95% 以上为阳性细胞,细胞浆内可见棕黄色的丝

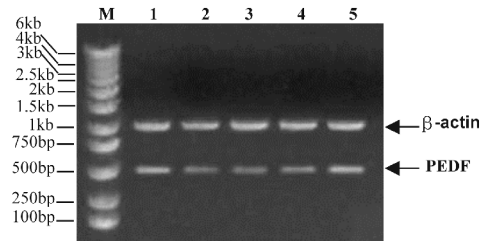


图 1 PEDF mRNA RT-PCR 电泳像 M: Marker, 1: 正常对照组; 2: 缺氧对照组; 3: 缺氧 + E₂(10⁻⁷ mmol/L) 组; 4: 缺氧 + E₂(10⁻⁶ mmol/L) 组; 5: 缺氧 + E₂(10⁻⁵ mmol/L) 组。

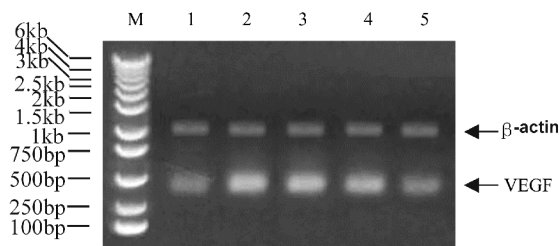


图 2 VEGF mRNA RT-PCR 电泳像 M: Marker, 1: 正常对照组; 2: 缺氧对照组; 3: 缺氧 + E₂(10⁻⁷ mmol/L) 组; 4: 缺氧 + E₂(10⁻⁶ mmol/L) 组; 5: 缺氧 + E₂(10⁻⁵ mmol/L) 组。

网状结构。透射电子显微镜下可见 Müller 细胞内特征性的中间丝。随着进一步传代,细胞逐渐失去原有形态。本研究采用第三代(P₃代)细胞作为实验细胞。

2.2 RT-PCR 检测 Müller 细胞中 PEDF mRNA 和 VEGF mRNA 的表达

2.2.1 RT-PCR 检测 Müller 细胞中 PEDF mRNA 的表达

与正常对照组相比,缺氧对照组 PEDF mRNA 表达明显降低($P < 0.01$)。与缺氧对照组相比,10⁻⁶ mmol/L E₂ 组和 10⁻⁵ mmol/L E₂ 组 PEDF mRNA 表达明显升高,分别为缺氧对照组的 2.27 倍($P < 0.01$)、2.82 倍($P < 0.01$), 10⁻⁷ mmol/L E₂ 组与缺氧组相比则无明显差异($P > 0.05$, 图 1)。

2.2.2 RT-PCR 检测 Müller 细胞中 VEGF mRNA 的表达

与正常对照组相比,缺氧对照组 VEGF mRNA 表达明显升高($P < 0.01$)。与缺氧对照组相比,10⁻⁶ mmol/L E₂ 组和 10⁻⁵ mmol/L E₂ 组 VEGF mRNA 表达明显降低,分别为缺氧对照组的 0.74 倍($P < 0.01$)、0.41 倍($P < 0.01$), 10⁻⁷ mmol/L E₂ 组与缺氧对照组相比则无明显差异($P > 0.05$, 图 2)。

2.3 Western-blot 检测 PEDF 及 VEGF 蛋白质的表达

2.3.1 Western-blot 检测 PEDF 蛋白质的表达

Western-blot 法分析对比 PEDF 蛋白水平结果显示,与正常对照组相比,缺氧对照组 PEDF 蛋白表达明显降低($P < 0.01$)。与缺氧对照组相比,10⁻⁶ mmol/L E₂ 组和 10⁻⁵ mmol/L E₂ 组 PEDF 蛋白表达明显升高,分别为缺氧对照组的 1.29 倍($P < 0.01$)、1.40 倍($P < 0.01$), 10⁻⁷ mmol/L E₂ 组与缺氧对照组相比则无明显差异($P > 0.05$, 图 3)。

2.3.2 Western-blot 检测 VEGF 蛋白质的表达

Western-blot 法分析对比 VEGF 蛋白水平结果显示,与正常对照组相比,缺氧对照组 VEGF 蛋白表达明显升高($P < 0.01$)。与缺氧对照组相比,10⁻⁶ mmol/L E₂ 组和 10⁻⁵ mmol/L E₂ 组 VEGF 蛋白表达明显降低,分别为缺氧对照组的 0.33 倍($P < 0.01$)、0.32 倍($P < 0.01$), 10⁻⁷ mmol/L E₂ 组与缺氧对照组相比则无明显差异($P > 0.05$, 图 4)。

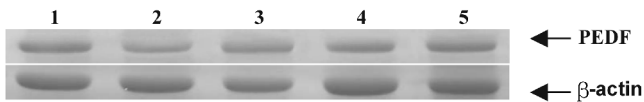


图3 PEDF Western-blot 图像 1:正常对照组;2:缺氧对照组;3:缺氧+ E_2 (10^{-7} mmol/L)组;4:缺氧+ E_2 (10^{-6} mmol/L)组;5:缺氧+ E_2 (10^{-5} mmol/L)组。

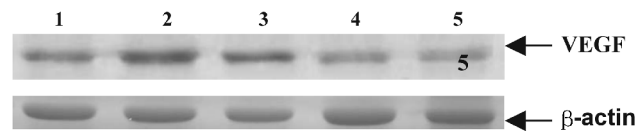


图4 VEGF Western-blot 图像 1:正常对照组;2:缺氧对照组;3:缺氧+ E_2 (10^{-7} mmol/L)组;4:缺氧+ E_2 (10^{-6} mmol/L)组;5:缺氧+ E_2 (10^{-5} mmol/L)组。

3 讨论

雌激素是一类维持机体正常生理状态的重要性激素,在体内通过与雌激素受体(ER)结合而发挥生理功能^[2]。近年研究发现ER除分布于性器官外,在眼组织也发现有明显分布,尤其是视网膜和葡萄膜,Müller细胞膜上也发现有ER的存在^[2]。近几年,雌激素在眼底疾病中的作用逐渐受到重视,雌激素对视网膜血管生成具有调控作用^[3]。在不同的病理条件下,雌激素可以使视网膜的新生血管形成维持在相对比较正常的水平。Miyamoto等^[4]研究发现,低氧条件下雌激素可以降低血管内皮生长因子(VEGF)的表达,抑制视网膜新生血管过度生成。具体机制是:在低氧状态下,VEGF基因表达水平升高, E_2 降低低氧诱导因子(HIF-1)结合到VEGF启动子的活性,使VEGF及其受体合成减少,并且这种作用与 E_2 浓度有关。

PEDF是眼部最有效的新生血管抑制因子,它能抑制血管内皮细胞增生和迁移的作用,有效的减少新生血管形成^[5,6]。在多种新生血管性眼病中,均有PEDF表达的明显减少^[7,8]。以往研究表明,Müller细胞是视网膜内主要的胶质细胞,它通过分泌多种细胞生长因子,参与视网膜病理性新生血管的形成^[9,10]。Wolfram等^[11]证实,Müller细胞可以分泌一定量的PEDF,在缺氧条件下,Müller细胞内VEGF mRNA及蛋白表达升高,PEDF mRNA及蛋白表达降低,引起视网膜新生血管的形成。我们的研究也证实了这一点。我们在实验中还发现,在体外 10^{-7} mmol/L浓度的 E_2 对缺氧的Müller细胞并没有保护作用,PEDF mRNA及蛋白质表达并没有明显改变,而 10^{-5} mmol/L、 10^{-6} mmol/L E_2 作用24h后,可明显缓解由缺氧引起的视网膜Müller细胞PEDF mRNA及蛋白质表达的降低,且缓解程度与 E_2 的浓度有关,这表明雌激素可以调控PEDF的表达,且这种调控发生在转录水平。我们又研究了雌激素对Müller细胞VEGF的表达,发现雌激素可以明显降低由缺氧引起的

视网膜Müller细胞VEGF mRNA及蛋白质表达的升高,且降低程度与 E_2 的浓度有关,这表明雌激素可以调控VEGF的表达,由此我们推测,雌激素对视网膜新生血管形成具有一定保护作用,雌激素通过降低VEGF的表达,升高PEDF的表达,从而减少视网膜新生血管的形成。Müller细胞膜上有ER的存在,推测雌激素的作用可能是通过Müller细胞膜上的ER介导来实现的。

总之,雌激素可以调控缺氧引起的视网膜Müller细胞VEGF和PEDF的表达,这为进一步研究Müller细胞在视网膜新生血管中的作用以及雌激素的应用提供了新的理论基础和实验依据。

参考文献

- 1 Cao W, Wen R, Li F. Induction of basic fibroblast growth factor mRNA by basic fibroblast growth factor in Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:1358-1366
- 2 Gudino G, Nieto M. Estrogen receptor immunoreactivity in Schwann-like brain macroglia. *J Neurobiol* 1999;40:458-470
- 3 Ruohola JK, Valve EM, Karkkainen MJ. Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 1999;149:29-40
- 4 Miyamoto N, Mandai M, Takagi H. Contrasting effect of estrogen on VEGF induction under different oxygen status and its role in murine ROP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2007-2014
- 5 Matsui T, Nishino Y, Maeda S, et al. PEDF-derived peptide inhibits corneal angiogenesis by suppressing VEGF expression. *Microvasc Res* 2012;84:105-108
- 6 Wakusawa R, Abe T, Sato H, et al. Suppression of choroidal neovascularization by vasohibin-1, a vascular endothelium-derived angiogenic inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(6):3272-3280
- 7 Matsuoka M, Ogata N, Minamino K. Expression of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in fibrovascular membranes from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Jpn J Ophthalmol* 2006;50:116-120
- 8 Tong JP, Chan WM, Liu DT. Aqueous humor levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor in polypoidal choroidal vasculopathy and choroidal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 2006;141:456-462
- 9 Nishimura M, Ikeda T, Ushiyama M. Increased vitreous concentrations of human hepatocyte growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:659-662
- 10 Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* 2002;8:349-357
- 11 Eichler W, Yafai Y, Wiedemann P, et al. PEDF derived from glial Müller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis. *Exp Cell Res* 2004;299(1):68-78