

· 论 著 ·

VPA 对 VEGF 诱导的 HRMECs 成管能力的影响及其机制*

于明洲¹, 吴函书¹, 冷 瀛^{2△}

1. 中国人民解放军联勤保障部队第九六五医院眼科, 吉林吉林 132011;

2. 北华大学附属医院眼科, 吉林吉林 132011

摘要:目的 探讨组蛋白去乙酰化酶抑制剂丙戊酸(VPA)对血管内皮生长因子(VEGF)诱导的人视网膜微血管内皮细胞(HRMECs)成管能力的影响及其相关分子机制。方法 采用 CCK8 实验研究 VPA 对 HRMECs 增殖能力的影响, Transwell 小室迁移实验检测 40 $\mu\text{mol/L}$ VPA 处理后 HRMECs 迁移能力的改变, 基质胶体外成管实验检测 40 $\mu\text{mol/L}$ VPA 处理 HRMECs 48 h 后其在基质胶上形成管腔样结构的能力, Western blot 法观察 40 $\mu\text{mol/L}$ VPA 处理 48 h 对 HRMECs 中 VEGF 信号通路相关蛋白表达的变化。结果 VPA 能够在体外抑制 HRMECs 增殖, 其抑制作用在一定的浓度时间范围内与 VPA 呈正相关。在后续实验中使用 48 h 40 $\mu\text{mol/L}$ 作为 VPA 处理方式。VPA 处理后, HRMECs 迁移过膜的细胞数量较对照组明显减少, HRMECs 在基质胶上形成的管腔数较对照组明显减少, HRMECs 中磷酸化-血管内皮细胞生长因子受体 2(p-VEGFR2)及其下游的磷酸化-丝氨酸/苏氨酸激酶(p-AKT)及磷酸化-细胞外调节蛋白激酶 1/2(p-ERK1/2)的蛋白水平均降低。结论 VPA 能够在体外抑制 VEGF 诱导的 HRMECs 成管能力, 其机制可能通过下调 VEGF 诱导的 p-VEGFR2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的蛋白水平来实现的。

关键词: 糖尿病性视网膜病变; 丙戊酸; 人视网膜微血管内皮细胞; 血管内皮生长因子

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.13.005

中图法分类号: R587.2

文章编号: 1673-4130(2021)13-1554-04

文献标志码: A

Effect of VPA on VEGF-induced HRMECs tube forming ability and its mechanism*

YU Mingzhou¹, WU Shuhan¹, LENG Ying^{2△}

1. Department of Ophthalmology, the 956th Hospital of the People's Liberation Army Joint Service,

Jilin, Jilin 132011, China; 2. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Beihua

University, Jilin, Jilin 132011, China

Abstract: Objective To investigate the effect of histone deacetylase inhibitor VPA on VEGF-induced HRMECs tube formation ability and the related molecular mechanisms. **Methods** CCK8 experiment was used to study the effect of VPA on the proliferation ability of HRMECs. Transwell cell migration experiment was used to detect the change of the migration ability of HRMECs after 40 mol/L VPA treatment. The ability to form lumen-like structures on the matrix gel after 48 h treatment with 40 mol/L VPA was detected by matrix colloid external tube test. The changes of VEGF signaling pathway-related protein expression in HMECs cells after 48 h treatment with 40 mol/L VPA were observed by Western blot. **Results** VPA can inhibit the proliferation of HMECs in vitro, and the inhibitory effect is positively correlated with VPA within a certain concentration time range. In subsequent experiments, 40 mol/L of VPA was used for 48 h. After VPA treatment, the number of HRMECs migrated through the membrane was significantly reduced compared with the control group. The number of lumens formed by HRMECs on the matrix glue was significantly lower than that of the control group. The protein levels of phosphorylated vascular endothelial cell growth factor receptor 2 (p-VEGFR2) and its downstream phosphorylated serine/threonine kinase (p-AKT) and phosphorylated extracellular regulatory protein kinase 1/2 (p-ERK1/2) were decreased in HMECs. **Conclusion** VPA can inhibit VEGF-induced ducting ability of HRMECs in vitro, and the mechanism may be achieved by down-regulating the protein levels of p-VEGF-induced p-VEGFR2, p-AKT and p-ERK1/2.

* 基金项目: 吉林省卫生技术创新项目(2017J089); 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20180357KJ)。

作者简介: 于明洲, 男, 主治医师, 主要从事眼底病的诊疗与研究。△ 通信作者, E-mail: lengyingeye@126.com。

本文引用格式: 于明洲, 吴函书, 冷瀛. VPA 对 VEGF 诱导的 HRMECs 成管能力的影响及其机制[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(13):

Key words: diabetic retinopathy; valproic acid; human retinal endothelial cells; vascular endothelial growth factor

增殖型糖尿病性视网膜病变(PDR)中,异常新生的血管和结缔组织可能导致视网膜脱离并危及视力。有研究发现,PDR 中眼组织的新血管形成与血管内皮生长因子(VEGF)水平密切相关^[1]。目前,PDR 的标准治疗方法都集中在 PDR 的晚期,并存在潜在不良反应^[2-3]。丙戊酸(VPA)是一种能够抑制细胞增殖的组蛋白去乙酰化酶抑制剂^[4]。有研究报道,VPA 能够抑制内皮细胞的增殖及血管新生^[5-6]。本研究通过观察 VPA 对 VEGF 条件下人视网膜微血管内皮细胞(HRMECs)的影响,以期为 PDR 的治疗找到新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料 HRMECs 购自北京裕恒丰科技有限公司,RPMI 1640 细胞培养液及胎牛血清购自 Hyclone 公司(美国),磷酸盐缓冲液(PBS,0.1 mol/L,pH 7.4)购自武汉博士德生物公司,VPA 购自 Sigma 公司(美国),VEGF 购自 PeproTech 公司(美国),CCK8 试剂盒购自南京碧云天生物技术研究所,基质胶购自 BD 公司(美国),迁移小室(Transwell)及胰酶购自 Millipore 公司(美国),BCA 蛋白定量试剂盒购自北京百泰克生物公司,兔抗人磷酸化-血管内皮细胞生长因子受体 2(p-VEGFR2)、磷酸化-丝氨酸/苏氨酸激酶(p-AKT)、磷酸化-细胞外调节蛋白激酶 1/2(p-ERK1/2)购自 CST 公司(美国,货号 2478T、4060T、4370T)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液培养 HRMECs,置于 5% CO₂、37 °C 恒温细胞培养箱中培养。

1.2.2 细胞增殖能力检测 将对数生长期的 HRMECs 用 0.25% 的胰酶消化下来制成细胞悬液,并接种到 96 孔培养板中,每孔细胞悬液 200 μL,细胞浓度 1×10⁴ 个/孔。设置细胞对照组、试剂对照组、VPA 处理组(VPA 终浓度分别为 10、20、40、80、160 μmol/L),每孔均含 VEGF 10 ng/mL。在 5% CO₂、37 °C 孵箱中分别孵育 24 h 和 48 h,处理与培养结束后,各孔分别加入 10 μL CCK8 试剂,轻轻摇晃混匀,4 h 内用酶标仪检测 450 nm 波长下各孔的吸光度(A)值,计算各组细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = $[1 - (A_{\text{VPA处理组}} - A_{\text{试剂对照组}}) / (A_{\text{细胞对照组}} - A_{\text{试剂对照组}})] \times 100\%$ 。

1.2.3 细胞迁移能力检测 将处理后的各组 HRMECs 用胰酶消化,用 RPMI 1640 细胞培养液制成单细胞悬液,Transwell 上室内接种浓度为 5×10⁴

个/孔的 HRMECs。Transwell 下室内加入 10% 胎牛血清的内皮细胞培养基及终浓度为 50 ng/mL 的 VEGF 共 600 μL。经 20 h 共培养后取出 Transwell 小室,弃去上室培养液,上室内未迁移的细胞用棉签擦去,PBS 洗 3 遍。95% 的乙醇固定膜下表面细胞,取下 Transwell 小室膜,经结晶紫染色后置于载玻片上用中性树胶封片。在 100 倍光学显微镜下观察迁移细胞的数量,随机选取 5 个视野计数,计算平均迁移细胞数。

1.2.4 细胞体外成管能力检测 在冰上将预先 4 °C 过夜融化的基质胶与无血清培养基(含 100 ng/mL 的 VEGF)按 1:1 混合加入预冷的 24 孔板,每孔 300 μL,然后置于 37 °C 孵育 1 h 使其成胶。将处理好的各组 HRMECs 用含 10% 胎牛血清的培养基制成单细胞悬液,HRMECs 以 5×10⁴ 个/孔的密度接种于预置基质胶的 24 孔板内,37 °C 孵育 24 h,在 100 倍光学显微镜下观察,随机选取 3 处管腔密集处计数。

1.2.5 蛋白表达检测 收集处理好的各组 HRMECs,每组加入裂解液(RIPA 裂解液与 PMSF 以 100:1 的比例配制)100 μL,用移液枪反复吹打使细胞与裂解液充分接触,冰上静置 30 min,低温离心机中 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min 后,将上清液移至新的 EP 管中。用 BCA 法定量各组上清液中蛋白质浓度。在恒压条件下采用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质,然后以 250 mA 恒定电流将蛋白质转印至 PVDF 膜上。PVDF 膜放入 5% 的脱脂牛奶中 37 °C 下封闭 3 h 后,加入一抗 4 °C 孵育过夜,洗涤 3 次,加入二抗 37 °C 孵育 2 h,ECL 化学发光法显影,采集图像,用 Quantity One 图像分析软件测定灰度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VPA 对 VEGF 诱导的 HRMECs 增殖能力的影响 CCK8 实验结果显示,A 值随着 VPA 浓度的增高而减小,提示随着 VPA 浓度增高活细胞数减少,并且随着 VPA 作用时间的增加,其对 HRMECs 的增殖抑制增强,见图 1。结果表明,VPA 能够抑制 HRMECs 的增殖,且 VPA 在 0~160 μmol/L 的浓度范围内与 HRMECs 的增殖能力呈负相关。VPA 处理 24 h 和 48 h 的半效抑制浓度(IC₅₀ 值)分别为 160.37 μmol/L 和 78.95 μmol/L。因此,在后续实验

中以作用时间 48 h、浓度 40 $\mu\text{mol/L}$ 作为 VPA 处理方式(VAP 处理组),以不加药物的 HRMECs 作为对照组。

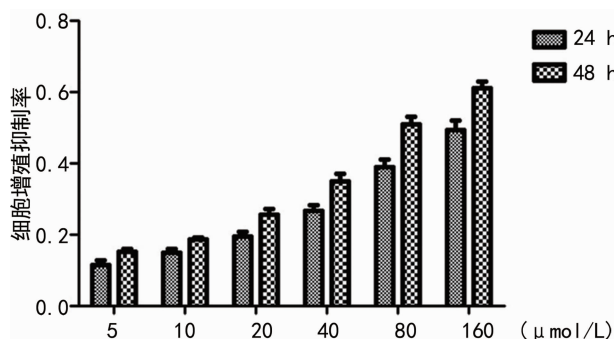
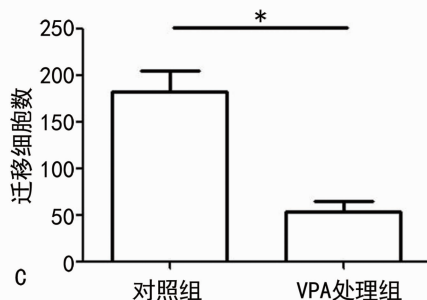
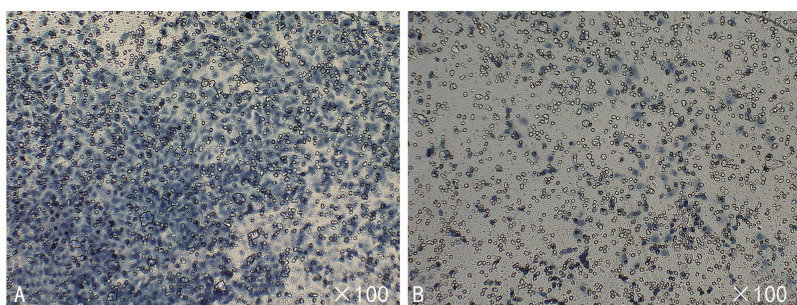


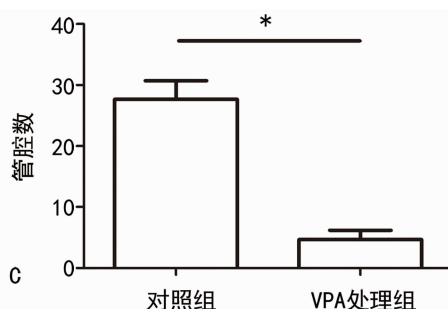
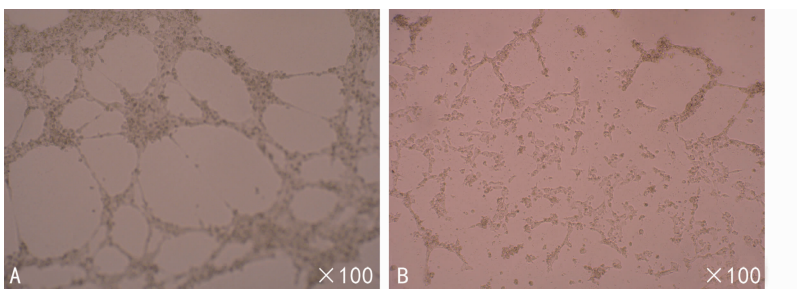
图 1 VPA 对 VEGF 诱导的 HRMECs 增殖能力的影响

2.2 VPA 对 VEGF 诱导的 HRMECs 迁移能力的影响



注:A 为对照组;B 为 VPA 处理组;C 为两组定量分析结果;与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 VPA 对 VEGF 诱导的 HRMECs 迁移能力的影响



注:A 为对照组;B 为 VPA 处理组;C 为两组定量分析结果;与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 VPA 对 VEGF 诱导的 HRMECs 体外成管能力的影响

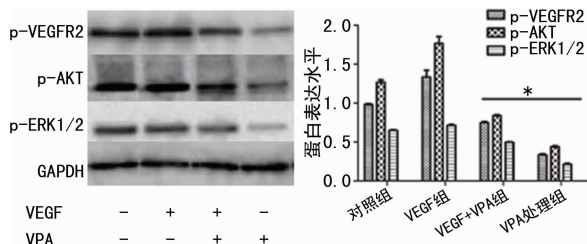
2.4 VPA 对 HRMECs 蛋白表达的影响

Western blot 结果表明, VEGF 组较对照组 p-VEGFR2、p-AKT 以及 p-ERK1/2 的蛋白水平均有升高,而 HRMECs 经 40 $\mu\text{mol/L}$ VPA 处理 48 h 后,细胞中 VEGF 介导的信号通路相关蛋白的水平发生变化。其中, p-VEGFR2 及其下游的 p-AKT 及 p-ERK1/2 的蛋白水平均降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4。结果表明,VPA 能引起存在于内皮细胞表面的 VEGFR2 磷酸化水平降低,以及降低内皮细胞增殖及迁移相关蛋白 AKT、ERK1/2 的磷酸化水平。

Transwell 小室迁移实验结果显示,HRMECs 经 40 $\mu\text{mol/L}$ VPA 处理 48 h 后,穿过 Transwell 小室膜的细胞数目明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),结果表明 HRMECs 的迁移能力明显降低,见图 2,提示 VPA 能抑制 VEGF 诱导的 HRMECs 细胞迁移。

2.3 VPA 对 VEGF 诱导的 HRMECs 体外成管能力的影响

基质胶体外成管能力实验结果表明,HRMECs 经 40 $\mu\text{mol/L}$ VPA 处理 48 h 后,HRMECs 在基质胶上形成的管腔样结构的数量明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 3。结果提示,VPA 能够抑制 VEGF 诱导的 HRMECs 体外形成管腔的能力。



注:A 为 Western blot 检测蛋白表达结果;B 为蛋白定量分析结果;与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 VPA 对 HRMECs 蛋白表达的影响

3 讨论

糖尿病性视网膜病变是糖尿病性微血管病变中最重要的表现,PDR 中新生血管生长影响并通过多种

因素导致严重视力下降,甚至完全失明。血管新生是一个由内皮细胞构成新血管的复杂过程。血管内皮基质降解、内皮细胞迁移、内皮细胞增殖、内皮细胞管道化分支形成血管环等步骤是血管生成的主要过程^[7]。本研究结果发现,组蛋白去乙酰化酶抑制剂 VPA 明显抑制了 VEGF 诱导的 HRMECs 增殖,并且这种抑制能力于一定的时间和剂量范围内呈正相关。此外,VPA 也能够抑制 VEGF 诱导的 HRMECs 细胞体外成管及细胞迁移。以上结果表明,VPA 具有抑制 VEGF 引起的 HRMECs 血管新生作用。

VEGF 水平在很大程度上影响糖尿病性视网膜病变患者眼组织新血管形成。高葡萄糖水平对血管内皮细胞的损害作用引起一些血管闭塞导致缺氧和局部缺血^[8]。而通过缺氧产生的低氧诱导因子-1 诱导的 VEGF 是眼新血管形成的关键调节剂,并且在视网膜内皮细胞和周细胞上存在高亲和力的 VEGF 受体^[9-10]。VEGF 是一类由细胞产生的能够引起血管生成的信号蛋白,它与生理状态下及病理状态下的血管新生有着密切联系^[11]。过度表达的 VEGF 可能引起视网膜和身体其他部位的血管疾病。VEGF 与周围血管壁静止内皮细胞表面的 VEGFR2 结合,触发内皮激活和下游血管生成的信号通路^[12]。当 VEGF 与内皮细胞膜上的 VEGFR2 结合,引起受体自身磷酸化,从而进一步引发内皮细胞中 AKT 和 ERK 的磷酸化,诱导内皮细胞增生,进而引起一系列的血管生成进程^[13]。此外,VEGFR2 介导的 AKT 和 ERK 的磷酸化对内皮细胞的迁移能力具有关键的调节作用^[14-15]。因此,VEGF 对新生血管形成的促进作用可能是通过磷酸化 VEGFR2 进而引起下游 AKT、ERK 的磷酸化水平增高来实现的。本研究结果发现,VPA 能够抑制 HRMECs 的增殖、迁移及体外成管能力,VPA 能够降低 VEGF 诱导的 p-VEGFR2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的蛋白水平。因此,可以推测 VPA 对 HRMECs 增殖、迁移及成管能力的抑制可能是通过下调 VEGF 诱导的 p-VEGFR2、p-AKT 和 p-ERK1/2 的蛋白水平来实现的。

组蛋白去乙酰化酶抑制剂 VPA 能够在体外抑制 VEGF 诱导的 HRMECs 的增殖、迁移及成管能力,其可能的机制为 VPA 抑制了 VEGF 介导的 VEGFR2 磷酸化水平及其下游 AKT/ERK 信号通路。

参考文献

[1] HONASOGE A, NUDLEMAN E, SMITH M, et al. Emerging insights and interventions for diabetic retinopathy[J]. *Curr Diab Rep*, 2019, 19(10):100.

[2] STEWART M W. A review of ranibizumab for the treatment of diabetic retinopathy[J]. *Ophthalmol Ther*, 2017, 6:33-47.

[3] BERROCAL M H, ACABA L A, CHENWORTH M L.

Surgical innovations in the treatment of diabetic macular edema and diabetic retinopathy[J]. *Curr Diab Rep*, 2019, 19(10):106.

[4] MOTTET D, Castronovo V. Histone deacetylases: a new class of efficient anti-tumor drugs[J]. *Med Sci (Paris)*, 2008, 24:742-746.

[5] IIZUKA N, MORITA A, KAWANO C, et al. Anti-angiogenic effects of valproic acid in a mouse model of oxygen-induced retinopathy[J]. *J Pharmacol Sci*, 2018, 138(3):203-208.

[6] MONGA V, SWAMI U, TANAS M, et al. A phase I / II study targeting angiogenesis using bevacizumab combined with chemotherapy and a histone deacetylase inhibitor (valproic acid) in advanced sarcomas[J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(2):53.

[7] LAPLANE L, DULUC D, LARMONIER N, et al. The multiple layers of the tumor environment [J]. *Trends Cancer*, 2018, 4:802-809.

[8] AL-KHARASHI A S. Role of oxidative stress, inflammation, hypoxia and angiogenesis in the development of diabetic retinopathy[J]. *Saudi J Ophthalmol*, 2018, 32(4):318-323.

[9] BAHRAMI B, HONG T, GILLES M C, et al. Anti-VEGF therapy for diabetic eye diseases[J]. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*, 2017, 6:535-545.

[10] WEI J, JIANG H, GAO H, et al. Blocking mammalian target of rapamycin (mTOR) attenuates HIF-1alpha pathways engaged-vascular endothelial growth factor (VEGF) in diabetic retinopathy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40:1570-1577.

[11] MELINCOVICI C S, BOSCA A B, SUSMAN S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF): key factor in normal and pathological angiogenesis[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2018, 59(2):455-467.

[12] PEACH C J, MIGNONE V W, ARRUDA M A, et al. Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: binding and signalling at VEGFR2[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4):1264.

[13] SHI H, BI H, SUN X, et al. Antitumor effects of tubimoside-1 in NCI-H1299 cells are mediated by micro RNA-126-5p-induced inactivation of VEGF-A/VEGFR-2/ERK signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3):4327-4336.

[14] KIM G D. Kaempferol inhibits angiogenesis by suppressing HIF-1alpha and VEGFR2 activation via ERK/p38 MAPK and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in endothelial cells[J]. *Prev Nutr Food Sci*, 2017, 22:320-326.

[15] CHENG S, ZHANG X, FENG Q, et al. Astragaloside IV exerts angiogenesis and cardioprotection after myocardial infarction via regulating PTEN/PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Life Sci*, 2019, 227:82-93.