

高糖对血管内皮细胞层粘连蛋白 $\alpha 1$ 的表达影响

林达 宋广伟 马歆琰 叶脉 郑海华

[摘要] **目的** 分析高糖对视网膜血管内皮细胞中层粘连蛋白 $\alpha 1$ (LAMA1)的影响。**方法** 体外培育视网膜血管内皮细胞(RF/6A),设置4种糖浓度培养液(5、15、25、35 mmol/L),其中5 mmol/L作为对照组,15、25、35 mmol/L作为高糖组。观察不同糖浓度培养液处理后的细胞生长情况,LAMA1的表达情况、检测细胞的迁移、增殖能力变化。**结果** 随着观察时间的延长,高糖环境下细胞的生长速度增加,糖浓度越高,相对应生长速度越快。免疫荧光法检测发现,在处理24、48 h后,LAMA1在细胞质中表达,在高糖组(25、35 mmol/L)中表达量较对照组减少。处理24 h时,高糖组(25、35 mmol/L)中LAMA1蛋白表达量低于对照组(t 分别=4.40、5.20, P 均 <0.05);处理48 h时,高糖组(35 mmol/L) LAMA1蛋白表达量和mRNA表达均低于对照组(t 分别=6.80、4.23, P 均 <0.05)。在处理48、72 h后,高糖组(15、25、35 mmol/L)细胞的迁移能力较对照组明显增加(t 分别=6.78、10.47、10.00、10.78、10.78、10.78, P 均 <0.05)。处理48、72、96 h后,高糖组(25、35 mmol/L)的细胞增殖能力明显高于对照组(t 分别=6.68、4.60、3.89、4.09、4.29、4.37, P 均 <0.05)。**结论** 高糖短期内刺激了细胞的生长、迁移、增殖,但抑制了LAMA1蛋白的表达,LAMA1可能参与了糖尿病视网膜病变的发生发展,并可能起到一定的保护作用。

[关键词] 高糖; 血管内皮细胞; 糖尿病视网膜病变; 层粘连蛋白 $\alpha 1$

Effect of high glucose on the expression of LAMA1 in vascular endothelial cells LIN Da, SONG Guangwei, MA Xinyan, et al. Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University & Yuying Children's Hospital, Wenzhou 325000, China.

[Abstract] **Objective** To analyze the effect of high glucose on the expression of LAMA1 in vascular endothelial cells. **Methods** Retinal vascular endothelial cells (RF/6A) were cultured in vitro, and four kinds of glucose concentrations were set up, among which 5 mmol/L as the control group, and 15 mmol/L, 25 mmol/L, 35 mmol/L as the high glucose group. The growth of cells, the expression of LAMA1, the migration and proliferation ability of cells were observed after being treated with different glucose concentrations. **Results** The growth rate of cells increased under high glucose environment, and the higher the glucose concentration, the faster the growth rate. Immunofluorescence detection showed that after 24h and 48h of treatment, LAMA1 was expressed in the cytoplasm, and the expression of LAMA1 in the high glucose group (25 mmol/L, 35 mmol/L) was lower than that in the control group. After 24 h of treatment, the protein expression of LAMA1 in the high glucose group (25 mmol/L, 35 mmol/L) was lower than that in the control group ($t=4.40, 5.20, P<0.05$). After 48 h of treatment, the protein and mRNA expressions of LAMA1 in the high glucose group (35 mmol/L) were lower than those in the control group ($t=6.80, 4.23, P<0.05$). After 48 h and 72 h of treatment, the migration ability of cells in the high glucose group (15 mmol/L, 25 mmol/L, 35 mmol/L) was significantly higher than that in the control group ($t=6.78, 10.47, 10.00, 10.78, 10.78, 10.78, P<0.05$). After 48h, 72h, 96h of treatment, the cell proliferation ability of the high glucose group (25 mmol/L, 35 mmol/L) was significantly higher than that of the control group ($t=6.68, 4.60, 3.89, 4.09, 4.29, 4.37, P<0.05$). **Conclusion** High glucose stimulates the growth, migration and proliferation of cells in the short

term, but inhibits the expression of LAMA1, which indirectly proves that LAMA1 may be involved in the occurrence and development of diabetic retinopathy, and may play a certain protective role.

[Key words] high glucose; vascular endothelial cells; diabetic retinopathy; laminin alpha 1

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2024.004.006

基金项目:温州市科学技术局(Y20210196)

作者单位:325000 浙江温州,温州医科大学附属第二医院、育英儿童医院眼科(林达、马歆琰、叶脉、郑海华);大连何氏眼科医院眼科(宋广伟)

糖尿病视网膜病变作为糖尿病最常见的微血管并发症,其发病率正在逐年攀升^[1]。目前发病机制尚不明确,可能与氧化应激、炎症、晚期糖基化终产物增加等有关^[2,3]。糖尿病视网膜病变的常见病理改变为内皮细胞功能障碍、基底膜增厚、新生血管形成^[4]。这些病理变化都涉及到细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的参与。层粘连蛋白作为重要的ECM组成和血管基膜的组成之一,通过与细胞膜表面受体结合,从而影响相关细胞的生物学行为,如黏附、分化、迁移等。其中层粘连蛋白 $\alpha 1$ (laminin alpha 1, LAMA1)在胚胎发育和促进神经突起生长过程中起着必不可少的作用。研究显示LAMA1在小鼠视网膜的内界膜和Bruch膜上表达,LAMA1缺失会引起细胞黏附和迁移的异常,进而导致玻璃体视网膜血管形成、永存性胚胎血管和视网膜前膜形成^[5]。LAMA1突变小鼠眼内增殖膜的形成与糖尿病性视网膜病变增殖膜的形成相似^[6]。本次研究拟探究高糖环境下内皮细胞中的LAMA1表达的影响,佐证其是否可能参与糖尿病的发生发展。

1 材料与方 法

1.1 材料和主要试剂 研究时间为2022年1月至2022年12月,本次研究在温州医科大学附属第二医院实验室完成,本研究已获得温州医科大学附属第二医院伦理委员会审批。猴视网膜血管内皮细胞RF/6A由中山大学中山眼科中心提供;DMEM培养基、胎牛血清、青链双抗、EDTA-胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液均由美国Life Technologies公司生产;逆转录试剂盒、qPCR反应试剂盒由日本Takara公司生产;LAMA1、内参引物由中国上海生工生物公司生产;细胞增殖检测试剂盒CCK-8由日本Dojindo公司生产;细胞划痕插件由德国ibidi公司生产;LAMA1抗体(sc-5582)由美国Santa Cruz公司生产;GAPDH抗体(ab8245)由美国Abcam公司生产。

1.2 RF/6A细胞株培养 复苏RF/6A细胞后,使用DMEM培养基培养后接种于培养瓶中,置于5% CO₂、37°C培养箱中培养,待细胞长至瓶底80%左右后,用含EDTA的0.25%的胰蛋白酶消化液进行消化,并以1:4进行传代。

1.3 高糖处理 将RF/6A细胞接种于6孔板后,使用常规5 mmol/L的培养液培养24 h,促使细胞贴壁,去除旧培养基后,用4种不同糖浓度(5、15、25、35 mmol/L)培养液继续进行培育,在培养皿底部限定好观察范围,每24小时观察记录细胞生长情况。

其中5 mmol/L作为对照组,15、25、35 mmol/L作为高糖组。

1.4 免疫荧光法检测LAMA1的表达变化 将处理24 h、48 h后的RF/6A细胞用多聚甲醛固定液固定10 min,封闭后于37 °C恒温箱中孵育1 h,滴加抗LAMA1抗体(浓度1:50),4 °C过夜处理。次日复温后加入荧光二抗(浓度1:1000),37 °C温箱孵育1 h,漂洗后加入DAPI,在室温下避光孵育10 min后漂洗,滴加20 μ L左右荧光淬灭剂,在荧光显微镜下观察记录。

1.5 蛋白印迹法检测LAMA1蛋白的表达情况 将处理24、48 h后的RF/6A细胞后用裂解液提取蛋白,按20 μ g的上样量,电泳仪恒压80V 30 min,然后转为100V 90 min,转膜后电转280 mA 240 min,封闭后按抗体说明稀释一抗兔抗LAMA1抗体(浓度1:200),4 °C过夜后,室温下孵育二抗(浓度1:10000) 2 h。使用ChemiDoc Touch Imaging System成像仪进行显影处理,Image J软件对显影的蛋白进行灰度分析。

1.6 荧光定量PCR检测LAMA1 mRNA的表达情况 按照试剂盒指示说明使用Trizol提取RNA,在微量紫外分光光度计上,对提取的RNA进行吸光度分析,测量RNA浓度及纯度,通常纯度A260/A280在1.8~2.0之间。参照试剂盒说明书配制反转录反应液。根据Oligo软件设计提供LAMA1基因碱基序列,由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成(序列详见表1)。合成后使用RNase Free H₂O稀释引物至10 μ mol/L。参照说明书配置样品反应液(SYBR Premix Ex Taq™ II, Takara RR820A),放入罗氏LightCyber 480荧光PCR仪中,设置好反应程序,对LAMA1的核酸水平表达进行相对定量分析。

表1 引物序列

引物	序列
LAMA1 正向	5'- GTT TCG AAC CTC CTC GCA GA-3'
负向	5'- CTT GCC GTC CAC AAG CTC TAG T-3'
GAPDH 正向	5'- GAT TCC ACC CAT GGC AAA TT-3'
负向	5'- TCT CGC TCC TGG AAG ATG GT-3'

1.7 血管内皮细胞迁移功能检测 制备好约6 \times 10⁵cell/mL密度的细胞悬液,将插件置于6孔板中,向插件孔中加入细胞悬液110 μ L,37 °C培养24 h,次日取出插件,即可获得4条相邻宽度为500 μ m的划痕,去掉旧培养基,磷酸盐缓冲液洗涤后用4种浓

度的糖培养基继续培育,分别于0、24、48、72 h拍照记录,用Image-Pro Plus软件对划痕面积进行分析。

1.8 血管内皮细胞增殖能力的检测 使用Cell Counting Kit-8试剂盒,将细胞接种在96孔板上,每孔100 μ L,预设五组(4种糖浓度处理组+空白组),每组样品5个复孔,置于培养箱培育24 h,次日磷酸盐缓冲液清洗后,加入100 μ L 4种浓度的糖培养基,每24小时评估1次细胞的增殖情况,加入CCK-8溶液10 μ L,继续培养90 min,用酶标仪(SynergyH1,由美国BioTek公司生产)测定吸光度值(450 nm处)分析内皮细胞增殖情况。

1.9 统计学方法 采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间计量资料比较采用单因素方差分析(ANOVA)和 t 检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖对血管内皮细胞生长情况影响见图1

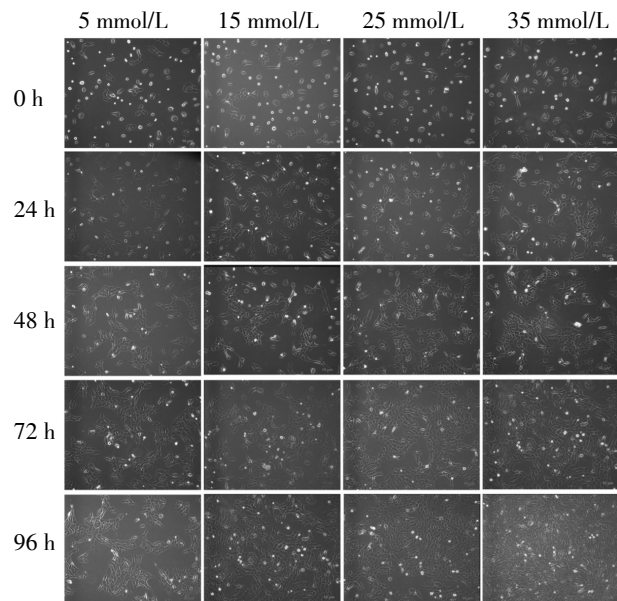


图1 4种糖浓度下不同时间的细胞生长情况

由图1可见,在培养24 h后,各组间细胞生长情况并无明显差异,随培育时间的推移,高糖组(15、25、35 mmol/L)的细胞生长速度明显快于对照组(5 mmol/L),糖浓度越高,相对生长速度越快。

2.2 高糖对血管内皮细胞LAMA1的表达影响见图2

由封二图1可见,通过免疫荧光法检测发现,LAMA1主要在细胞质中表达(绿色部分),在处理24、48 h后,可见LAMA1在细胞质中表达,在高糖组(25、35 mmol/L)中表达量较对照组(5 mmol/L)减

少,而在高糖组(15 mmol/L)中较对照组(5 mmol/L)无明显变化。

2.3 高糖对血管内皮细胞LAMA1蛋白的表达结果见图2和表2

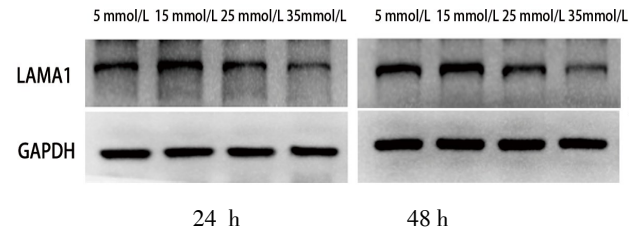


图2 处理24、48 h后各组LAMA1蛋白表达情况

由图2可见,通过Western blot进行灰度分析后发现,处理24、48 h后高糖组(15、25、35 mmol/L)较对照组(5 mmol/L)呈现先升高后降低的趋势。

表2 不同糖浓度处理24、48 h后LAMA1蛋白表达情况

处理时间	5 mmol/L	15 mmol/L	25 mmol/L	35 mmol/L
24 h	1.11 \pm 0.08	1.15 \pm 0.08	0.87 \pm 0.05*	0.65 \pm 0.13*
48 h	0.79 \pm 0.07	0.86 \pm 0.04	0.64 \pm 0.04	0.45 \pm 0.05*

注:*:与同时间5 mmol/L糖浓度比较, $P < 0.05$ 。

由表2可见,4种不同糖浓度处理24、48 h后LAMA1蛋白表达量比较,差异均有统计学意义(F 分别=13.76、34.26, P 均 < 0.05),处理24 h时,高糖组(25、35 mmol/L)LAMA1蛋白表达量较对照组减少(t 分别=4.40、5.20, P 均 < 0.05);处理48 h时,高糖组(35 mmol/L)LAMA1蛋白表达量低于对照组($t = 6.80$, $P < 0.05$),而高糖组(15 mmol/L)组LAMA1蛋白表达量与对照组比较,差异无统计学意义($t = 1.50$, $P > 0.05$)。

2.4 高糖对血管内皮细胞LAMA1的mRNA表达结果见表3

表3 不同糖浓度处理24、48 h后各组LAMA1的mRNA表达情况

处理时间	5 mmol/L	15 mmol/L	25 mmol/L	35 mmol/L
24 h	1.00 \pm 0.10	1.07 \pm 0.16	0.85 \pm 0.10	0.72 \pm 0.07
48 h	1.00 \pm 0.10	1.26 \pm 0.14	0.91 \pm 0.06	0.65 \pm 0.10*

注:*:与同时间5 mmol/L糖浓度比较, $P < 0.05$ 。

由表3可见,不同糖浓度处理24 h后,各组间LAMA1的mRNA表达比较,差异无统计学意义($F = 5.43$, $P > 0.05$)。经过高糖处理48 h后,各组间LAMA1的mRNA表达,差异有统计学意义($F = 10.47$, $P < 0.05$),其中高糖组(35 mmol/L)LAMA1的

mRNA 表达明显低于对照组($t=4.23, P<0.05$)。

2.5 高糖对血管内皮细胞迁移功能的影响见表4

表4 不同糖浓度、不同时间点下内皮细胞迁移能力/%

处理时间	5 mmol/L	15 mmol/L	25 mmol/L	35 mmol/L
24 h	26.40±5.91	37.12±4.83	45.52±4.37*	49.77±2.35*
48 h	44.96±4.56	63.42±2.98*	75.01±3.49*	80.79±5.53*
72 h	71.44±5.29	99.94±0.01*	99.94±0.01*	99.94±0.01*

注: *: 与同时间5 mmol/L糖浓度比较, $P<0.05$ 。

由表4可见,不同时间段各组间迁移能力比较,差异均有统计学意义(F 分别=18.31、36.69、33.16, P 均 <0.05);在24 h时,高糖组(25、35 mmol/L)细胞的迁移能力较对照组(5 mmol/L)明显增加(t 分别=5.20、7.34, P 均 <0.05);在处理48、72 h后,高糖组(15、25、35 mmol/L)细胞的迁移能力较对照组(5 mmol/L)明显增加(t 分别=6.78、10.47、10.00、10.78、10.78、10.78, P 均 <0.05)。

2.6 高糖对血管内皮细胞增殖功能的影响见表5

表5 不同糖浓度、不同时间下内皮细胞增殖情况(吸光度值)

处理时间	5 mmol/L	15 mmol/L	25 mmol/L	35 mmol/L
24 h	0.37±0.02	0.39±0.05	0.42±0.04	0.39±0.03
48 h	0.47±0.04	0.51±0.07	0.57±0.03*	0.56±0.04*
72 h	0.58±0.07	0.67±0.13	0.78±0.13*	0.8±0.14*
96 h	0.69±0.10	0.85±0.10*	0.88±0.10*	0.9±0.11*

注: *: 与同时间5 mmol/L糖浓度比较, $P<0.05$ 。

由表5可见,在24 h时,各组之间细胞增殖情况比较,差异无统计学意义($F=3.74, P>0.05$);在处理48、72、96 h后,各组间细胞增殖情况比较,差异均有统计学意义(F 分别=14.01、8.09、8.20, P 均 <0.05),在48、72 h,高糖组(25、35 mmol/L)的细胞增殖能力明显高于对照组(5 mmol/L)(t 分别=6.68、4.60、3.89、4.09, P 均 <0.05),在96 h时,高糖组(15、25、35 mmol/L)细胞增殖能力均高于对照组(5 mmol/L),差异均有统计学意义(t 分别=3.62、4.29、4.37, P 均 <0.05)。

3 讨论

糖尿病视网膜病变作为全球常见的致盲性眼病,严重影响患者眼部健康。目前其发病机制尚不明确,可能发生机制有:多元醇途径、晚期糖基化终产物、PKC的活化、炎症、氧化应激等^[7]。近年来,对糖尿病视网膜病变的研究多集中于血管内皮生长因子,而对ECM的关注甚少,ECM对视网膜血管的

发育和病理性新生血管形成尤为重要。层粘连蛋白是重要的ECM成分之一,与胶原蛋白一起形成血管的基底膜。其中LAMA1在眼睛结构中高度表达,特别是在视网膜血管和晶状体中^[8]。

本次研究结果显示,LAMA1主要在细胞基质中表达,高糖环境可以降低LAMA1在细胞层面的表达,同时在蛋白层面,在高糖作用下LAMA1呈现出轻微增高后逐渐下降的趋势,并且随着处理时间的延长,LAMA1的表达量进一步下降,这表明高糖环境可以抑制LAMA1的分泌表达。既往研究表明,LAMA1基因的突变缺失促进了玻璃体视网膜血管和视网膜前膜的形成,导致玻璃体纤维增生和异常血管的形成,这种变化与糖尿病视网膜病变非常相似^[9]。Edwards等^[10]的研究发现,LAMA1基因突变导致玻璃体视网膜血管形成,永存胚胎血管,并形成小鼠视网膜前膜。

本次研究结果还显示,高糖环境促使血管内皮细胞的生长和增殖,加速了细胞的迁移,为血管的新生、纤维增殖提供了物质基础,与Beltramo等^[11]的研究相一致。但也有研究认为,高糖环境下抑制了内皮细胞的增殖,促使细胞的凋亡,从而引起内皮细胞的损伤,最终导致糖尿病相关的血管并发症^[12]。所以高糖在诱导血管内皮细胞引起糖尿病视网膜病变的发生中存在不同的作用机制。在糖尿病视网膜病变的发生过程中,涉及多种因素共同参与,而非单一的过程,不同阶段存在不同的病理变化。

既往研究表明,高糖可以通过TGF- β /Smad和PI3K/AKT等信号通路诱导ECM中层粘连蛋白表达^[13]。TGF- β 是一种分泌型信号分子,具有成纤维作用,调节细胞增殖、分化、迁移和凋亡功能。因此推测高血糖可能通过TGF- β -LAMA1轴影响视网膜血管内皮细胞的增殖,LAMA1的表达在高糖环境中先代偿性地增加,然后开始下降,负调节TGF- β 信号传导,诱导了细胞增殖和迁移,这一假设机制是否成立尚需进一步研究论证。本次研究结果仅仅是通过体外实验佐证LAMA1可能参与了糖尿病视网膜病变的发生,具体的作用路径、作用机制并不明确。

综上所述,高糖环境可在体外促进血管内皮细胞的增殖、迁移,通过某些特定的信号通路下调LAMA1蛋白的表达,提示LAMA1可能在糖尿病视网膜病变的发生中发挥一定保护作用,或许将来可作为糖尿病视网膜病变一个新的研究方向或者治疗靶点。

(下转第335页)

- 病急救医学,2021,33(11):1353-1357.
- 8 俞丹,刘茗,方晓明,等.反馈式呼吸电刺激训练对中重度稳定期慢性阻塞性肺疾病患者康复的影响[J].实用临床医药杂志,2022,26(21):8-13.
 - 9 范慧,胡双,邓冲,等.短期呼吸肌训练联合无创正压通气对慢性阻塞性肺疾病急性加重患者的疗效[J].武汉大学学报(医学版),2023,44(2):192-195.
 - 10 晋发,潘霞,卢鑫,等.经鼻高流量氧疗辅助治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期合并Ⅱ型呼吸衰竭临床观察[J].山东医药,2023,63(13):77-80.
 - 11 顾明豪,郭忠,程梓晗.肺功能测试参数联合CAT评分对老年慢性阻塞性肺疾病患者急性发作的预测价值[J].海军医学杂志,2023,44(12):1232-1236.
 - 12 马晶,曹梅,张晓燕,等.呼吸肌训练用于重症监护病房机械通气获得性肌无力患者的临床观察[J].中华保健医学杂志,2023,25(3):261-264.
 - 13 陆云霞,冯悦,姜金霞,等.早期活动联合电刺激神经肌肉改善重症肺炎患者ICU获得性衰弱[J].基础医学与临床,2024,44(2):242-246.
 - 14 张迪.基于ABCDEF集束化护理策略联合足底按摩对重症肺炎机械通气患者ICU获得性谵妄发生率及睡眠质量的影响[J].现代中西医结合杂志,2019,28(34):3846-3850.
 - 15 毛静,朱妍.基于ABCDEF集束化护理模式对重症肺炎机械通气患者ICU获得性谵妄发生率、睡眠质量及肺功能的影响[J].国际护理学杂志,2023,42(18):3413-3416.
- (收稿日期 2024-03-24)
(本文编辑 高金莲)

(上接第310页)

参考文献

- 1 Vujosevic S, Aldington SJ, Silva P, et al. Screening for diabetic retinopathy: New perspectives and challenges[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2020, 8(4): 337-347.
 - 2 Taurone S, Ralli M, Nebbioso M, et al. The role of inflammation in diabetic retinopathy: A review[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(20): 10319-10329.
 - 3 Valdez Guerrero AS, Quintana-Pérez JC, Arellano-Mendoza MG, et al. Diabetic retinopathy: Important biochemical alterations and the main treatment strategies[J]. Can J Diabetes, 2021, 45(6): 504-511.
 - 4 Filippov VM, Petrachkov DV, Budzinskaya MV, et al. Modern concepts of pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. Vestn Oftalmol, 2021, 137(2): 306-313.
 - 5 Aldinger KA, Mosca SJ, Tétreault M, et al. Mutations in LAMA1 cause cerebellar dysplasia and cysts with and without retinal dystrophy[J]. Am J Hum Genet, 2014, 95(2): 227-234.
 - 6 Yurchenco PD, McKee KK, Reinhard JR, et al. Laminin-deficient muscular dystrophy: Molecular pathogenesis and structural repair strategies[J]. Matrix Biol, 2018, 71(2): 174-187.
 - 7 Gui F, You Z, Fu S, et al. Endothelial dysfunction in diabetic retinopathy[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2020, 11: 591.
 - 8 Vilboux T, Malicdan MC, Chang YM, et al. Cystic cerebellar dysplasia and biallelic LAMA1 mutations: A lamininopathy associated with tics, obsessive compulsive traits and myopia due to cell adhesion and migration defects[J]. J Med Genet, 2016, 53(5): 318-329.
 - 9 Riederer I, Bonomo AC, Mouly V, et al. Laminin therapy for the promotion of muscle regeneration[J]. FEBS Lett, 2015, 589(22): 3449-3453.
 - 10 Edwards MM, McLeod DS, Grebe R, et al. Lama1 mutations lead to vitreoretinal blood vessel formation, persistence of fetal vasculature, and epiretinal membrane formation in mice[J]. BMC developmental biology, 2011, 11(14): 60.
 - 11 Beltramo E, Lopatina T, Berrone E, et al. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells induce features of diabetic retinopathy in vitro[J]. Acta Diabetol, 2014, 51(6): 1055-1064.
 - 12 Kang H, Ma X, Liu J, et al. High glucose-induced endothelial progenitor cell dysfunction[J]. Diabetes Vasc Dis Res, 2017: 1479164117719058.
 - 13 Qin D, Zhang GM, Xu X, et al. The PI3K/Akt signaling pathway mediates the high glucose-induced expression of extracellular matrix molecules in human retinal pigment epithelial cells[J]. J Diabetes Res, 2015: 920280.
- (收稿日期 2023-04-07)
(本文编辑 高金莲)