

神经生长因子对人视网膜血管内皮细胞的影响

王丁丁¹, 于强², 陈子林¹, 柳夏林^{2*}

(1. 惠州市中心人民医院眼科, 广东 惠州 516001;

2. 眼科学国家重点实验室//中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】观察神经生长因子(NGF)及 TrkA 阻断剂 K252a 对体外培养的人视网膜血管内皮细胞(HRCEC)增殖的影响。【方法】MTT 法检测不同因子(NGF 各浓度组、NGF + K252a 各浓度组、bFGF 组、bFGF + K252a 组和正常培养液组)对正常和缺氧条件下培养的 HRCEC 的影响。【结果】随 NGF 浓度增加(20、50、100 ng/ml), HRCEC 细胞数目明显增多(正常氧浓度 NGF 组分别为 0.254 ± 0.033 、 0.696 ± 0.029 、 1.136 ± 0.051 ; 缺氧条件相应各组为 0.422 ± 0.036 、 0.798 ± 0.044 、 1.376 ± 0.052 , P 均 < 0.05)。随 K252a 浓度增加(50、100、200 nmol/L), NGF + K252a 组正常氧浓度时分别为 0.864 ± 0.067 、 0.496 ± 0.025 、 0.202 ± 0.078 , 缺氧条件时相应为 1.042 ± 0.047 、 0.700 ± 0.065 、 0.401 ± 0.078 , 较同浓度 NGF(100 ng/ml)组 HRCEC 细胞数目减少($P < 0.05$), 随 K252a 浓度增加 HRCEC 细胞数目减少趋势愈加显著(P 均 < 0.05)。【结论】NGF 可促进 HRCEC 的增殖, 该作用可被特异性 TrkA 阻断剂 K252a 所阻断。

关键词: 神经生长因子(NGF); 人视网膜血管内皮细胞(HRCEC); TrkA 阻断剂 K252a

中图分类号: R776 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)01-0045-05

Effect of NGF on Cultured Human Retinal Capillary Endothelial Cells(HRCEC)

WANG Ding-ding¹, YU Qiang², CHEN Zi-lin¹, LIU Xia-lin^{2*}

(1. Department of Ophthalmology, Huizhou Central People's Hospital, Huizhou 516001, China;

2. State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】To observe NGF on cultured human retinal vascular endothelial cells (HRCEC) proliferation. 【Methods】The MTT assay was used to analyze the impact of culture HRCEC on different factors (NGF concentration groups, NGF + K252a concentration groups, bFGF group, bFGF + K252a groups, the normal culture medium groups) in normal and hypoxic condition. 【Results】With the increase of NGF concentration (20, 50, 100 ng/mL), HRCEC significantly increased (normal condition: 0.254 ± 0.033 , 0.696 ± 0.029 , 1.136 ± 0.051 ; hypoxic condition: 0.422 ± 0.036 , 0.798 ± 0.044 , 1.376 ± 0.052 , $P < 0.05$). Compared NGF + K252a group with the same concentration of NGF (100 ng/ml) group, HRCEC reduced ($P < 0.05$), with increasing the concentration of K252a (50, 100, 200 nmol/L), the trend of HRCEC decreasing is become more significant (normal condition: 0.864 ± 0.067 , 0.496 ± 0.025 , 0.202 ± 0.078 ; hypoxic condition: K252a 1.042 ± 0.047 , 0.700 ± 0.065 , 0.401 ± 0.078 , $P < 0.05$). 【Conclusion】NGF can promote the proliferation of HRCEC, the effect could be specifically blocked by TrkA inhibitor K252a.

Key words: nerve growth factor (NGF); human retinal vascular endothelial cells (HRCEC); TrkA inhibitor (K252a)

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(1):45-49]

糖尿病、视网膜中央静脉阻塞、早产儿视网膜病变等多种疾病最终均能引起视网膜新生血管的发生, 导致血管增殖性病变, 目前已成为最常见

的致盲眼底病之一。但缺血低氧促发大量视网膜异常新生血管形成造成视网膜损害的病理机制并不清楚。尽管血管生成因子 VEGF 被发现在视网

收稿日期: 2009-08-15

基金项目: 国家自然科学基金(30500554; 30740078)

作者简介: 王丁丁, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 眼底病的防治, E-mail: wdd_29@yahoo.com.cn; * 通信作者: 柳夏林, 副教授, 研究方向: 白内障的防治, E-mail: xialinliu@gmail.com

膜新生血管病变的发生中有重要作用,而且抗VEGF的药物已经开始在临床应用^[1],但疗效并不满意。近年来研究发现神经生长因子(nerve growth factor,NGF)可通过与血管内皮细胞表面的NGF的高亲和受体TrkA (tyrosine kinase receptor A)结合促进脐静脉、大动脉血管内皮细胞的增殖^[2],加强血管增生的活性,推测神经组织可能介导并积极参与了新生血管形成。然而目前关于NGF对于人视网膜血管内皮细胞(human retinal capillary endothelial cells,HRCEC)的作用鲜有研究报道。本研究通过观察NGF对体外培养的HRCEC的影响,探讨其促血管形成作用,并由此推测视网膜的神经组织可能由于缺血低氧导致了大量神经营养因子的释放,而这些神经营养因子可能作为新的强血管生成因子而引导了视网膜新生血管的形成。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜人尸体眼球(2只,2008年12月中山大学中山眼科中心手术室获得,供角膜移植术后眼球)。5 mL/L CO₂培养箱(德国HERARUS公司),倒置相差显微镜(德国Leica公司),酶标仪(美国Bio-tex公司),纤维连接蛋白(美国Invitrogen公司),人内皮细胞培养液(HE-SFM BGM,美国Gibco公司),胰岛素-转铁蛋白-硒添加物(ITS,美国Gibco公司),兔抗人第Ⅷ因子相关抗原单克隆抗体(武汉Boster公司),氯化钴CoCl₂(天津科密欧公司),噻唑蓝(MTT)(美国Sigma公司),二甲基亚砜(DMSO)(美国Sigma公司),人神经生长因子(美国Peprotech公司),人碱性成纤维细胞生长因子(美国Peprotech公司),TrkA阻断剂K252a(美国Biosource公司),小牛血清(四季青公司)。

1.2 方法

1.2.1 HRCEC的分离和原代培养及传代 无菌条件下沿赤道剪开眼球,去除眼前节组织,小心分离视网膜组织和玻璃体组织,取出视网膜神经层,D-Hanks液清洗2次后剪碎,去除肉眼可见的大血管组织,用2%胰蛋白酶室温消化视网膜30 min,边消化边吹打视网膜,加入体积分数5%小牛血清的DMEM培养液终止消化,1 500 r/min × 5 min离心去上清(离心半径 $r = 9$ cm),收集细胞。

用I型胶原酶室温消化15 min,加入体积分数5%的小牛血清的DMEM培养液终止消化后1 500 r/min × 5 min离心,去上清收集细胞,加入10%胎牛血清的内皮细胞培养液混匀,培养液内添加ITS和 β -ECGF,用200目滤网过滤,取滤液接种于预先涂有纤维连接蛋白(0.5 μ g/ml)的培养瓶内,置于37℃含5 mL/L CO₂培养箱内培养细胞。每48~72 h换液一次,去除崩解的视网膜碎片及死亡细胞。待细胞融合成单细胞层后,2 g/L胰蛋白酶消化,1 500 r/min离心5 min,按1:4传代。采用DAB染色法及荧光染色法进行HRCEC的组织化学鉴定。

1.2.2 MTT法观察正常或缺氧培养条件下HRCEC的增殖生长曲线 取第3代融合培养的HRCEC,0.2%胰蛋白酶消化后,以1 000细胞/孔接种于2块96孔板,分为正常条件下和缺氧条件下培养细胞。正常条件下细胞在37℃含体积分数5% CO₂培养箱中培养,培养基为前述完全培养基;缺氧条件下细胞也在37℃含5 mL/L CO₂培养箱中培养,培养基为干预时使用含125 μ mol/L氯化钴的完全培养基。干预后的第1、2、3、4天,每天同一时间加MTT(5 mg/mL)20 μ L,置于5% CO₂、37℃培养箱内培养4 h,弃上清,加入150 μ L二甲基亚砜(DMSO),室温振摇10 min,于酶标仪以490 nm波长终点法检测各孔光吸收值 $D(490\text{ nm})$ 。每个时间点每组设6个复孔,以上实验重复3次,取平均值。以时间为横轴、平均 $D(490\text{ nm})$ 为纵轴绘制细胞增殖生长曲线。

1.2.3 MTT比色法分析不同培养条件下HRCEC的增殖情况 如上分为正常和缺氧条件下培养细胞。取第3代融合培养HRCEC,2 g/L胰蛋白酶消化细胞后用完全培养基配成单细胞悬液,以每孔 1×10^3 个细胞接种于96孔培养板上,置37℃含5 mL/L CO₂培养箱中培养。接种后24 h按如下分组加入干预液:NGF各浓度组(20 μ L)20、50、100 ng/mL;NGF + K252a各浓度组:NGF 100 ng/mL 0 μ L + K252a 20 μ L(50、100、200 nmol/L);bFGF 50 ng/mL组20 μ L; bFGF 50 ng/mL 20 μ L + K252a 200 nmol/L 20 μ L组;对照组 HE-SFM BGM 20 μ L。继续培养24 h后吸去孔内上清液,每孔加入150 μ L DMSO,室温轻柔振摇10 min,在酶标仪上测定 $D(490\text{ nm})$ 。实验重复3次。

1.2.4 统计学方法 用SPSS 11.0软件对所有数

据进行统计学处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)及 t 检验分析统计数据资料,两指标间的关系采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 表示差别具有统计学意义。

2 结果

2.1 HRCEC 分离、培养和传代

刚培养的人视网膜微血管内皮细胞液含有大量的杂细胞,如红细胞、胶质细胞、周细胞等,接种后 24 ~ 48 h 可见有内皮细胞贴壁,在铺上

纤维连接蛋白的培养瓶内能较好的贴附、生长,外形可呈扁椭圆或竹叶形,6 d 左右形成细胞集落呈放射状展开,细胞聚集成团,呈短梭形,8 d 左右梭形内皮细胞铺满培养瓶(图 1A)。15 d 左右细胞继续生长融合成单细胞层。第Ⅷ因子相关抗原抗体免疫组化 DAB 染色,可见细胞浆内有棕色的免疫沉积物呈阳性染色(图 1B),阴性对照组(视网膜色素上皮细胞)无着色(图 1C)。免疫荧光染色也可见细胞浆内第Ⅷ因子相关抗原阳性(图 1D),阴性对照组仅见 Hoechst 核染蓝色(图 1E)。

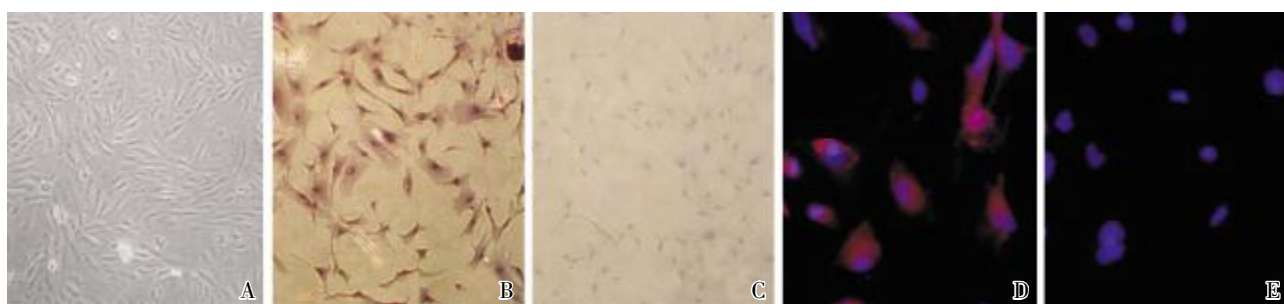


图 1 人视网膜血管内皮细胞培养及鉴定

Fig.1 HRECEC culture and identification

A: HRCEC under a light microscope, $\times 40$; B: Positive expression of HRCEC by immunohistochemical staining, $\times 40$; C: Negative control by immunohistochemical staining, $\times 40$; D: Positive expression of HRCEC under fluorescence microscopy, $\times 100$; E: Negative control under fluorescence microscopy, $\times 100$

2.2 正常或缺氧培养条件下 HRCEC 的增殖生长曲线

从图 2 中可以看出正常或缺氧培养条件下 HRCEC 均呈现持续增长趋势。第 1 天 2 组 HRCEC 细胞数目无明显差别($P > 0.05$),第 2 天缺氧组较正常组细胞数目有增加($P < 0.05$),第 3、4 天数目显著增多($P < 0.05$)。

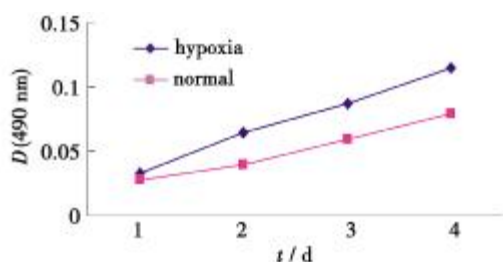


图 2 正常和缺氧条件下 HRCEC 增殖生长曲线

Fig.2 Growth curve of HRCEC under normal and hypoxic condition

2.3 不同因子对正常和缺氧条件下培养的 HRCEC 增殖的影响

结果如表 1。正常和缺氧条件下培养结果一致,可见,①加入干预后第 3 天 NGF 各组细胞均较阴性对照组(正常培养液)增多(P 均 < 0.05),细胞吸光度与 NGF 浓度有一定的正相关性(正常氧组: $r = 0.902$;缺氧组: $r = 0.965$, $P < 0.01$),说明随 NGF 浓度增加 HRCEC 细胞数目有明显增多趋势;②NGF + K252a 组较同浓度 NGF(100 ng/mL)组 HRCEC 细胞数目减少($P < 0.05$),细胞吸光度与 K252a 浓度有一定的负相关性(正常氧组: $r = -0.978$;缺氧组: $r = -0.983$, $P < 0.01$),说明随 K252a 浓度增加 HRCEC 细胞数目减少趋势愈加显著;③bFGF 组与阴性对照组比较细胞数目明显增多($P < 0.05$),细胞数目明显多于 NGF 20 ng/mL 及 NGF 50 ng/mL 组(P 均 < 0.05),稍多于 NGF 100 ng/mL 组($P > 0.05$);④bFGF + K252a 组与 bFGF 组比较细胞数目无明显区别($P > 0.05$)。

表 1 MTT 法测定的各组 HRCEC 的 $D(490\text{ nm})$
Table 1 $D(490\text{ nm})$ of HRCEC among different groups
by MTT

	normoxia	hypoxia
NGF 20 ng/mL ¹⁾	0.254 ± 0.033	0.422 ± 0.036
NGF 50 ng/mL ²⁾	0.696 ± 0.029	0.798 ± 0.044
NGF 100 ng/mL ³⁾	1.136 ± 0.051	1.376 ± 0.052
NGF + K252a 50 nmol/L ⁴⁾	0.864 ± 0.067	1.042 ± 0.047
NGF + K252a 100 nmol/L ⁵⁾	0.496 ± 0.025	0.699 ± 0.065
NGF + K252a 200 nmol/L ⁶⁾	0.202 ± 0.078	0.401 ± 0.078
bFGF 50 ng/mL ⁷⁾	1.257 ± 0.081	1.667 ± 0.061
bFGF + K252a 200 nmol/L ⁸⁾	1.209 ± 0.073	1.599 ± 0.074
Control ⁹⁾	0.061 ± 0.014	0.087 ± 0.027

1)2)3) compared with 9), $P < 0.05$, any two groups among 1) 2) 3), $P < 0.05$; 4) 5) 6) compared with 3), $P < 0.05$, any two groups among 4) 5) 6), $P < 0.05$; 7) compared with 1) 2) 9), $P < 0.05$, and compared with 3) 8), $P > 0.05$.

3 讨 论

3.1 HRCEC 培养的意义

随着对视网膜血管疾病研究的不断深入,人们发现视网膜新生血管是糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变、视网膜静脉阻塞等多种疾病导致视力严重降低甚至丧失的主要病理改变^[3]。新生血管过程复杂^[4],每一个步骤都受到严格而复杂的调控,其中血管内皮细胞在血管生成过程中起着主导作用。因此培养视网膜血管内皮细胞进行体外研究,对于研究视网膜血管疾病发病机制及治疗具有重要的作用。

目前在国内外由于人视网膜血管内皮细胞来源有限,培养方法复杂困难,多采用牛、猪的视网膜血管内皮细胞或脐静脉内皮细胞进行研究^[5]。但由于不同组织和器官获得的内皮细胞具有不同的特性,尤其是脑和视网膜的微血管内皮细胞具有内屏障功能,用其他细胞来代替并不合适。我们利用含 10%胎牛血清的人内皮细胞培养基,添加内皮细胞生长因子和胰岛素-转铁蛋白-硒添加物,并用纤维连接蛋白包被培养瓶,简单有效地培养出人视网膜微血管内皮细胞,对开展有关视网膜新生血管疾病的各项研究有积极意义。

3.2 NGF 促进新生血管形成的研究

1951 年 Levi-Montalcini 和 Hamburger 在小鼠肉瘤细胞内发现了 NGF 的存在^[6],此后 NGF 在神

经营养因子的研究领域中一直占有领先地位。NGF 是一种蛋白质,其生物学作用非常广泛,分神经系统和非神经系统两类。近年来越来越多的研究发现 NGF 可作用于血管内皮细胞促进新生血管的形成。Tanaka 等^[7]研究发现大鼠主动脉内皮细胞可产生并释放 NGF,从而确认血管内皮细胞是 NGF 的又一重要来源。此外,Lad 等^[8]研究还发现血管内皮细胞产生并释放 NGF 的同时,还可表达 NGF 的高亲和受体 TrkA 和低亲和受体 P75NTR (p75 neurotrophin receptor)。Myung-Jin 等^[2]研究发现 NGF 可促进人脐静脉血管内皮细胞和人皮肤微血管内皮细胞体外增殖和迁移,作用呈浓度依赖性,并且该作用可被 NGF 特异性 TrkA 阻断剂 K252a 所阻断。然而目前关于 NGF 对于人视网膜血管内皮细胞的作用鲜有研究报道。我们仅查阅到 2003 年 Steinle 等^[9]研究认为 NGF 可明显促进脉络膜血管内皮细胞的增殖、迁移,对视网膜血管内皮细胞的增殖、迁移有作用但不明显,为什么有这种差异文章中并未作出解释。我们对此抱有疑问,既然 NGF 可促进人脐静脉、皮肤微血管、大动脉血管内皮细胞、脉络膜血管内皮细胞的增殖,为什么不能作用于人视网膜血管内皮细胞呢?为了回答这个问题,我们培养了 HRCEC,并设计了该部分实验。

首先我们采用 MTT 比色法观察在正常培养和缺氧条件下 HRCEC 的生长曲线。HRCEC 的生长曲线显示正常组和缺氧组细胞随时间的延长而增多,缺氧组细胞数目多于正常组,这种差别在第 1 天不明显在随后 3 d 差别显著。临床证实缺血、缺氧可诱发眼内新生血管形成,我们模拟缺氧环境发现缺氧组人视网膜血管内皮细胞在第 2、3、4 天数目显著增加,这说明缺氧环境能刺激培养的人视网膜血管内皮细胞增殖。

在 HRCEC 培养的第 3 天细胞数目差别显著较第 2 天明显,因此我们选择干预后第 3 天测量各组的 $D(490\text{ nm})$ 值。通过 MTT 比色法观察到,在正常或缺氧培养条件下,加入干预后第 3 天 NGF 3 个浓度组细胞数目明显增多,而且增多趋势有浓度依赖性,实验结果显示 NGF 有促进 HRCEC 增殖的作用,其促增殖作用有浓度依赖性。我们的实验结果证实了 NGF 不但促进人脐静脉、皮肤微血管、大动脉及脉络膜血管内皮细胞的增殖,同样可促进人视网膜血管内皮细胞增殖,而且其促增殖作用同样有浓度依赖性。我们与

Steinle等^[9]研究结果不同是否与实验室研究条件等有关尚不清楚。

碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是一种强的新生血管诱导剂,bFGF参与视网膜新生血管的形成已知多年了^[10]。因此我们选择bFGF做为NGF的阳性对照组。实验结果显示bFGF 50 ng/mL组促进HRCEC增殖的作用强于NGF 20 ng/mL和50 ng/mL组,与NGF 100 ng/mL组促增殖作用强度相当。该结果说明NGF具有促进HRCEC增殖的作用,但作用弱于bFGF。

3.3 K252a抑制NGF促进血管内皮细胞增殖的作用

NGF通过与细胞表面的高亲和力受体TrkA^[11]结合发挥生物学效应。K252a是一种从诺卡土壤菌属中提取的生物碱性质的化合物,可特异性阻断TrkA。NGF促进HRCEC增殖的作用是否也可被K252a阻断呢?我们在NGF 100 ng/mL组中分别加入不同浓度K252a,结果显示K252a明显抑制NGF体外促HRCEC的增殖作用,其抑制作用呈浓度依赖性。在bFGF组中加入K252a细胞数目与单独加bFGF组无明显区别,实验结果证明K252a没有抑制bFGF促细胞增殖的作用。目前研究认为,NGF促进血管内皮细胞增生和迁移的机制不完全相同,但NGF首先需与其TrkA受体结合,然后启动细胞内信号转导途径^[12]。我们推测人视网膜血管内皮细胞上有NGF的高亲和受体TrkA,K252a特异性地与TrkA结合后阻断了NGF与TrkA受体的结合使细胞内信号转导途径无法启动从而抑制了NGF促进内皮细胞增殖的能力。bFGF必须与其受体FGFR相结合才能实现其生物效应^[13],K252a不能与FGFR结合从而无法阻断bFGF促进HRCEC增殖的作用。

综上所述,NGF可促进人视网膜内皮细胞的增殖,该作用可被特异性TrkA阻断剂K252a所阻断;NGF促HRCEC增殖作用及K252a抑制NGF的作用呈浓度依赖性;NGF促进HRCEC增殖和血管管腔形成的作用弱于bFGF,K252a无法阻断bFGF的作用。

参考文献:

[1] Conrad PW, Zacks DN, Johnson MW. Intravitreal bevacizumab has initial clinical benefit lasting eight weeks in eyes with neovascular age-related macular degeneration [J]. *Clin Ophthalmol*, 2008,2(4):727-

733.

- [2] Myung-Jin P, Hee-Jin K, Hyung-Chahn L, et al. Nerve growth factor induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and AP-2 transcription factor [J]. *J Biol Chem*, 2007,282(42):30485-30496.
- [3] Hamanaka T, Akabane N, Yajima T, et al. Retinal ischemia and angle neovascularization in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Am J Ophthalmol*, 2001,132(5):648-658.
- [4] Risau W. Mechanisms of angiogenesis [J]. *Nature*, 1997,386(17):671-674.
- [5] Deissler H, Deissler H, Lang S, et al. VEGF-induced effects on proliferation, migration and tight junctions are restored by ranibi-Zumab (Lucentis) in microvascular retinal endothelial cells [J]. *Br J Ophthalmol*, 2008,92(6):839-843.
- [6] Levi-Montalcini R. Nerve growth factor 35 years later [J]. *Science*, 1987,237(4819):1154-1162.
- [7] Tanaka A, Wakita U, Kambe N, et al. An autocrine function of nerve growth factor for cell cycle regulation of vascular endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004,313(4):1009-1014.
- [8] Lad SP, Peterson DA, Bradshaw RA, et al. Individual and combined effects of TrkA and p75NTR nerve growth factor (NGF) receptors: a role for the high affinity receptor site [J]. *J Biol Chem*, 2003,278(27):24808-24817.
- [9] Steinle JJ, Granger HJ. Nerve growth factor regulates human choroidal, but not retinal, endothelial cell migration and proliferation [J]. *Auton Neurosci*, 2003,108(1-2):57-62.
- [10] 梁小玲,高汝龙,李绍珍,等.生长因子在视网膜增殖膜的表达[J].*中山医科大学学报*,1998,19(4):273-276.
- [11] Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, et al. The trk protooncogene product: A signal transducing receptor for nerve growth factor [J]. *Science*, 1991,252(5005):554-558.
- [12] Steinle JJ, Meininger CJ, Wu G, et al. Eph B4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the PI3K pathway [J]. *J Biol Chem*, 2002,277(46):43830-43835.
- [13] Moy FJ, Safran M, Seddon AP, et al. Properly oriented heparin-decaacetyl-haride-induced dimmers are the biologically active form of basic fibroblast growth factor [J]. *Biochemistry*, 1997,36(16):4782-4791.

(编辑 刘清海)