

基于 IP3-蛋白激酶 C 通路探讨人视网膜血管内皮细胞高糖性损伤的作用机制

刘 强^{1,2}, 俞 华², 董立红², 廖荣丰¹

(¹安徽医科大学第一附属医院眼科,合肥 230022;²安徽医科大学附属巢湖医院眼科,合肥 238000)

摘要 目的 探讨 IP3 蛋白激酶 C 通路在高糖条件对人视网膜血管内皮细胞的损伤作用。方法 取对数生长期的人视网膜血管内皮细胞,分为实验组(10 mmol/L、20 mmol/L 葡萄糖)和对照组(5 mmol/L 葡萄糖),在不同浓度葡萄糖培养基下观察细胞形态学变化,流式细胞仪检测人视网膜血管内皮细胞的凋亡情况,实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应检测 IP3-蛋白激酶 C(PKC)通路中 PKC 的 RNA 表达水平,蛋白质印迹法检测细胞中 PKC 的蛋白表达水平。结果 高糖条件下,人视网膜血管内皮细胞体积增大,伸展度减小,凋亡率增加,与对照组比较,20 mmol/L 葡萄糖组人视网膜血管内皮细胞凋亡率增加($P < 0.05$);20 mmol/L 葡萄糖组人视网膜血管内皮细胞 IP3 水平(587.9 ± 15.2)ng/ml 相较对照组 IP3 水平(738.9 ± 1.0)ng/ml 降低($P < 0.05$),高糖处理下,PKC mRNA 及蛋白表达水平增加($P < 0.05$)。结论 IP3-PKC 通路可能参与高糖条件下人视网膜血管内皮细胞的损伤过程,因此可能在糖尿病视网膜病变中起到作用。

关键词 人视网膜血管内皮细胞; IP3-蛋白激酶 C 通路;糖尿病视网膜病变;高糖;凋亡

中图分类号 R 774.1.02

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)12-2112-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.12.007

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病患者常见的并发症,可致盲,其主要特征是人视网膜血管内皮细胞损伤和血管异常,具体的分子机制尚不完全清楚^[1-3]。研究显示在糖尿病人群中,蛋白激酶 C(protein kinases, PKC)被过度激活,视网膜结构和功能发生变化,诱导了细胞内外变化,导致信号通路的改变^[4-6],而三磷酸肌醇(inositol triphosphate, IP3)作为细胞内重要的第二信使,是否参与了高糖诱导下的人视网膜血管内皮细胞损伤尚不清楚。该研究拟探讨高糖对人视网膜血管内皮细胞损伤的影响,并通过检测 IP3 浓度,PKC RNA 及蛋白含量,探讨 IP3-PKC 通路在高糖环境下对人视网膜血管内皮细胞的作用,以期为 DR 提供新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人视网膜血管内皮细胞,购自武汉钦

2024-10-22 接收

基金项目:安徽省高校科研项目(编号:2023AH050643);安徽医科大学校级科研项目(编号:2022xkj063)

作者简介:刘 强,男,博士研究生;

廖荣丰,男,教授,主任医师,博士生导师,通信作者, E-mail: liaorfyk@126.com

飞生物科技有限公司(货号:HUM-CELL-0138)。

1.1.2 主要试剂和仪器 ECM 培养基(美国 Sciencell Research Laboratories 公司,货号:1001)、SYBR-Green PCR 试剂盒(美国 ThermoFisher 公司,货号:F415XL)、逆转录试剂盒(美国 ThermoFisher 公司,货号:K1622)、RIPA 强效裂解液(上海碧云天生物技术股份有限公司,货号:P0013B)、ECL 发光液(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,货号:ECL-0011)、人 IP3 ELISA 试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号:MM-1524H1)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司,货号:P0010)、HRP, Goat Anti-Rabbit IgG(武汉亚科因生物技术股份有限公司,货号:A21020)、PKC-pan Antibody(江苏亲科生物研究中心有限公司,货号:AF6197)、Apoptosis Detection Kit(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号:A211-02);细胞培养箱(美国 ThermoFisher 公司,型号:Scientific 8000)、倒置光学显微镜(日本奥林巴斯公司,型号:CKX53)、Real-time 检测仪(美国 Applied Biosystems 公司,型号:7500)、酶标仪(美国 BIO-RAD 公司,型号:iMark)、流式细胞仪(美国 BECKMAN COULTER 公司,型号:CytoFLEX)

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将购置的人视网膜血管

内皮细胞水浴解冻,离心(1 000 r/min,5 min),弃去上清液,过夜;细胞传代:加入消化液于培养瓶中,置于培养箱并观察细胞消化情况,加含 10% 血清的完全培养基终止消化,将细胞悬液按 1:5 的比例分到新的培养皿中;细胞分为 3 组:5 mmol/L 葡萄糖组,10 mmol/L 葡萄糖组,20 mmol/L 葡萄糖组。3 组分别加入常规培养基,孵育 24 h 进行后续检测。使用倒置光学显微镜观察人视网膜血管内皮细胞的形态学变化。

1.2.2 细胞凋亡检测 待细胞长至密度为 80% ~ 90% 时进行 6 孔板细胞铺板,细胞孵育过夜后,进行质粒转染,去除培养基,PBS 洗 1 遍,加入 1 ml 胰酶,消化完成,再加入含血清培养基终止消化,细胞离心(8 000 r/min,5 min),加入 3 ml PBS 重悬细胞,离心(8 000 r/min,5 min),去除上清液,加入 100 μ l 1 \times binding buffer 重悬细胞。每个样本加入 5 μ l AnnexinV 和 PI 染色液,轻轻混匀后避光孵育 15 min。每个样本再加入 400 μ l 1 \times Binding Buffer,混匀后,进行上机检测。应用 Flowj 软件处理数据。

1.2.3 qPCR 检测细胞 PKC mRNA 的表达水平 RNA 抽提,裂解液裂解细胞,加氯仿离心(12 000 r/min,15 min),RNA 沉淀,溶解 RNA 后保存。逆转录 cDNA,第一链 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA,以其为模板进行 qPCR。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s 40 个循环,反应结束后,根据熔解曲线确定该 C_T 值是否有效,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析目的基因在对照组和各浓度组之间的表达差异,计算公式如下: $\Delta C_T = C_{T_{目的基因}} - C_{T_{内参}}$,再求得对照组 ΔC_T 的平均值,记为 $\Delta C_{T_{对照平均}}$,用各组的 ΔC_T 分别减去 $\Delta C_{T_{对照平均}}$,求得 $\Delta\Delta C_T$ 值,即 $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T_{样本}} - \Delta C_{T_{对照平均}}$,再计算各组 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 值,即为各组中基因的相对表达量。引物信息详见表 1。

表 1 引物序列表

Tab.1 Primer sequences

| 引物名称 | 引物序列(5'-3') |
|---------------------|------------------------|
| H-PRKCA-F | CCATCCGCTCCACACTAAAT |
| H-PRKCA-R | GATCCAGTCCCAGATTCTAC |
| H- β -actin-F | GGAAATCGTCCGTGACATTAAG |
| H- β -actin-R | AGCTCGTAGCTCTCTCCA |

1.2.4 免疫印迹法检测人视网膜血管内皮细胞蛋白表达水平 RIPA 裂解液裂解样品,严格按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定样品浓度,SDS-PAGE 电泳分离目的蛋白,PVDF 纤维膜转膜,一抗

(PKC-pan Antibody,稀释比 1:1 000)室内孵育过夜,二抗(HRP,Goat Anti-Rabbit IgG,稀释比 1:10 000)室温孵育 40 ~ 60 min,孵育好的 PVDF 膜清洗后滴加显影液,置于曝光仪显影记录并保存,并对显影结果灰度扫描,行灰度值分析统计。

1.3 统计学处理 实验数据采用 SPSS25.0 统计软件分析,符合正态分布的数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数间的比较采用 t 检验,多组均数比较采用单因素方差分析,事后两两比较采用 Bonferroni 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖状况下细胞形态学变化情况 倒置显微镜观察可见,正常对照组人视网膜血管内皮细胞形态结构清晰,贴壁生长,而在 10 mmol/L 葡萄糖组和 20 mmol/L 葡萄糖组,人视网膜血管内皮细胞呈现出细胞形态学改变,包括细胞体积增大、伸展度减小等。见图 1。

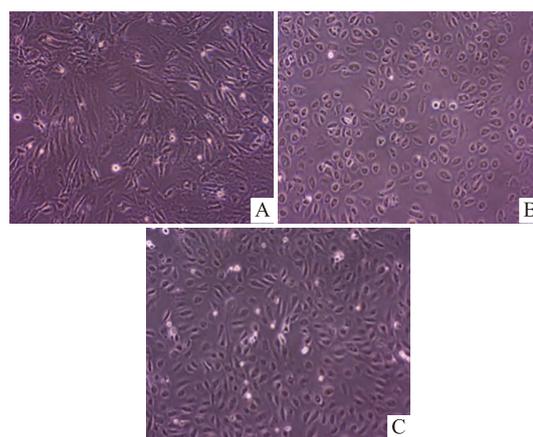


图 1 倒置显微镜下观察人视网膜血管内皮细胞在不同浓度葡萄糖下的白光照片 $\times 100$

Fig. 1 Bright field images of human retinal vascular endothelial cells observed under an inverted microscope under different concentrations of glucose $\times 100$

A: Control group (5 mmol/L glucose); B: 10 mmol/L glucose group; C: 20 mmol/L glucose group.

2.2 不同浓度葡萄糖下人视网膜血管内皮细胞的凋亡率 与对照组人视网膜血管内皮细胞凋亡率相比(3.53 ± 0.48)%,10 mmol/L 葡萄糖诱导下人视网膜血管内皮细胞凋亡率(4.36 ± 1.00)% 增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$),而 20 mmol/L 葡萄糖诱导下的人视网膜血管内皮细胞凋亡率(5.47 ± 0.59)% 明显增加($t = 3.61, P < 0.05$),表明高糖可以促进人视网膜血管内皮细胞的凋亡。见图 2。

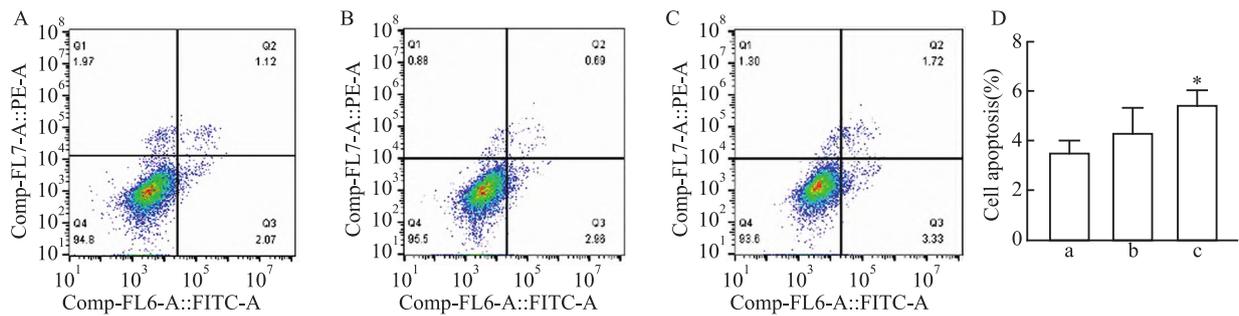


图2 流式细胞术分析不同浓度葡萄糖下对人视网膜血管内皮细胞凋亡的影响

Fig. 2 Flow cytometry analysis of the effect of different concentrations of glucose on the apoptosis of human retinal vascular endothelial cells

A: Apoptosis of human retinal vascular endothelial cells treated with 5 mmol/L glucose; B: Apoptosis of human retinal vascular endothelial cells treated with 10 mmol/L glucose; C: Apoptosis of human retinal vascular endothelial cells treated with 20 mmol/L glucose; D: Quantitative analysis of the percentage of apoptotic cells of human retinal vascular endothelial cells under three different concentrations of glucose; a: Control group (5 mmol/L glucose); b: 10 mmol/L glucose group; c: 20 mmol/L glucose group; * $P < 0.05$ vs Control group.

2.3 不同浓度葡萄糖下细胞传导通路中 IP3 浓度及 PKC 蛋白表达水平 不同浓度葡萄糖组 IP3 浓度及 PKC 蛋白表达水平差异有统计学意义 ($F = 131.6, 215.0$, 均 $P < 0.05$)。与对照组相比, 10 mmol/L 葡萄糖组中 IP3 虽水平略微降低, 但差异无统计学意义 (Bonferroni 校正后 $P > 0.05$), 而 20 mmol/L 葡萄糖组 IP3 水平降低, 差异有统计学意义 (Bonferroni 校正后 $P < 0.001$), 见图 3A, 表明高糖处理能够使 IP3-PKC 通路中 IP3 水平降低, 推测高糖可以抑制 IP3 的表达。此外, 对照组 PKC mRNA 的相对表达量为 1.000 ± 0.090 , 10 mmol/L 葡萄糖组为 1.868 ± 0.024 , 20 mmol/L 葡萄糖组为 2.685 ± 0.191 。高糖处理后, 随着葡萄糖水平的升高, 细胞中 PKC 的 mRNA 表达水平呈增加的趋势 ($F_{趋势} = 413.20, P < 0.05$), 见图 3B。表明高糖

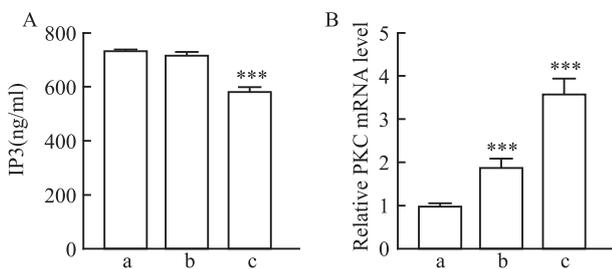


图3 高糖处理对人视网膜血管内皮细胞的 IP3-PKC 通路影响

Fig. 3 Effects of high glucose treatment on the IP3-PKC pathway of human retinal vascular endothelial cells

A: The IP3 concentration in human retinal vascular endothelial cells under different concentrations of glucose; B: Changes in the expression level of PKC mRNA in retinal vascular endothelial cells under different concentrations of glucose; a: Control group (5 mmol/L glucose); b: 10 mmol/L glucose group; c: 20 mmol/L glucose group; *** $P < 0.001$ vs Control group.

可以激活 PKC 基因转录表达。

2.4 不同浓度葡萄糖下人视网膜血管内皮细胞的 PKC 蛋白表达水平 不同浓度葡萄糖组 PKC 蛋白表达水平差异具有统计学意义, 且 PKC 蛋白水平随葡萄糖浓度增加而增加 ($F_{趋势} = 143.20, P < 0.05$)。表明高糖可以诱导人视网膜血管内皮细胞的 PKC 通路的蛋白表达。见图 4。

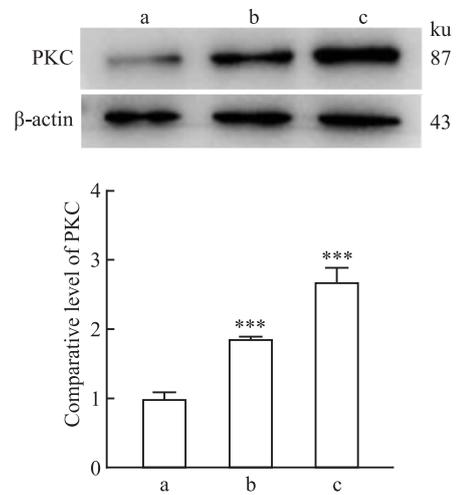


图4 不同葡萄糖浓度下人视网膜血管内皮细胞中 PKC 蛋白表达及统计图

Fig. 4 The expression of PKC protein in human retinal vascular endothelial cells under different glucose concentrations and the statistical chart

a: Control group (5 mmol/L glucose); b: 10 mmol/L glucose group; c: 20 mmol/L glucose group; *** $P < 0.001$ vs Control group.

3 讨论

本研究采用不同浓度的葡萄糖培养人视网膜血管内皮细胞, 探究高糖对人视网膜血管内皮细胞形

态和 PKC 蛋白表达的影响。通过形态学观察,发现高糖处理组人视网膜血管内皮细胞形态发生改变,高糖处理能够使人视网膜血管内皮细胞凋亡率增加;IP3-PKC 通路中 IP3 水平降低,PKC 蛋白表达水平增加,进一步验证了 IP3-PKC 通路可能在高糖对人视网膜血管内皮细胞的损伤中起到作用。

本研究中,20 mmol/L 葡萄糖组的细胞凋亡率较对照组明显增加,表明高浓度葡萄糖可导致人视网膜血管内皮细胞损伤。PKC 是一类重要的信号转导蛋白,在细胞增殖、凋亡、炎症、血管通透性等生物学过程中发挥重要作用^[7-9]。研究^[10-11]表明,PKC 蛋白可能在 DR 中起到作用,高糖条件下甘油二酯的增加介导 PKC 的激活和合成,刺激氧化应激和炎症,导致内皮细胞功能受损^[12-13]。本研究进一步实验显示 PKC 蛋白表达水平在 20 mmol/L 葡萄糖组中增多,进一步表明高糖可以促进 PKC 蛋白表达。与其他学者研究成果一致^[13-14]。

IP3 是重要的胞内第二信使,本研究中 IP3 水平在 20 mmol/L 葡萄糖组中显著降低,表明高糖条件下,人视网膜血管内皮细胞中 IP3 水平出现了抑制性表达。研究^[15]发现缺氧通过激活 IP3R - [Ca²⁺]_c/VDAC-[Ca²⁺]_m 信号通路诱导内皮细胞凋亡,此研究针对心肌内皮细胞的 IP3 受体,而对视网膜内皮细胞的相关研究较少。

在 DR 发病机制中,人视网膜血管内皮细胞是 DR 中的关键病变细胞,在细胞因子、免疫、炎症及缺氧等方面研究较多,而相关通路研究较少。本文通过检测 IP3-PKC 通路中 IP3 浓度及 PKC 蛋白表达,揭示了 IP3-PKC 通路在人视网膜血管内皮细胞高糖损伤中的可能作用,有利于进一步研究 DR 的发病机制及药物治疗靶点。

针对 DR 的治疗方式较为局限,本研究提示,IP3-PKC 通路可能作为治疗靶点,通过抑制 PKC 的活性,减轻高糖对人视网膜血管内皮细胞的损伤,从而减缓 DR 的发展。本研究能够为 DR 的治疗提供更多的理论依据。

本研究存在不足之处,首先研究未通过干预 IP3-PKC 通路证实其调控作用;其次人视网膜血管内皮细胞仅代表视网膜组织的一部分,而人体内 DR 中激活的 PKC 通路更加的复杂。这些不足将会在以后的研究中进一步探索和完善。

综上所述,本研究初步探讨了 IP3-PKC 通路在高糖环境下对人视网膜血管内皮细胞的影响,揭示了其在 DR 发生发展中的潜在作用。进一步研究了

IP3-PKC 通路的具体机制和调控网络,有助于深入理解 DR 的发生发展过程,为寻求相关的治疗提供新的靶点和理论依据。

参考文献

- [1] Cho N H, Shaw J E, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045[J]. Diabetes Res Clin Pract,2018,138:271-81. doi:10.1016/j.diabres.2018.02.023.
- [2] Feldman E L, Callaghan B C, Pop-Busui R, et al. Diabetic neuropathy[J]. Nat Rev Dis Primers,2019,5(1):42. doi:10.1038/s41572-019-0097-9.
- [3] Muramatsu K. Diabetes mellitus-related dysfunction of the motor system[J]. Int J Mol Sci,2020,21(20):7485. doi:10.3390/ijms21207485.
- [4] Zhang M, Zhou M, Cai X, et al. VEGF promotes diabetic retinopathy by upregulating the PKC/ET/NF-κB/ICAM-1 signaling pathway[J]. Eur J Histochem,2022,66(4):3522. doi:10.4081/ejh.2022.3522.
- [5] Kang Q, Yang C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications[J]. Redox Biol,2020,37:101799. doi:10.1016/j.redox.2020.101799.
- [6] Hu G, Gu L, Wang R, et al. Ethanolamine as a biomarker and biomarker-based therapy for diabetic retinopathy in glucose-well-controlled diabetic patients[J]. Sci Bull (Beijing),2024,69(12):1920-35. doi:10.1016/j.scib.2023.12.053.
- [7] Sun J K, Glassman A R, Beaulieu W T, et al. Rationale and application of the protocol S anti-vascular endothelial growth factor algorithm for proliferative diabetic retinopathy[J]. Ophthalmology,2019,126(1):87-95. doi:10.1016/j.ophtha.2018.08.001.
- [8] 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):10319-29. doi:10.26355/eurrev_202010_23379.
- [9] Xu X, Lai Y, Hua Z C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials[J]. Biosci Rep,2019,39(1):BSR20180992. doi:10.1042/BSR20180992.
- [10] 张佑靖,杨明. 红景天苷通过激活 PI3K/AKT 通路抑制氧化应激和免疫炎症反应减轻糖尿病大鼠视网膜病变[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2023,39(5):404-9. doi:10.13423/j.cnki.cjemi.009545.
- [10] Zhang Y J, Yang M. Salidroside alleviates retinopathy in diabetes rats by inhibiting oxidative stress and immune inflammation through activating PI3K/AKT pathway[J]. Chin J Cell Mol Immunol,2023,39(5):404-9. doi:10.13423/j.cnki.cjemi.009545.
- [11] Giordano R, Nasrallah G K, Posadino A M, et al. Resveratrol-elicited PKC inhibition counteracts NOX-mediated endothelial to mesenchymal transition in human retinal endothelial cells exposed to

- high glucose[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(2):224. doi: 10.3390/antiox10020224.
- [12] Jubaidi F F, Zainalabidin S, Taib I S, et al. The role of PKC-MAPK signalling pathways in the development of hyperglycemia-induced cardiovascular complications[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15):8582. doi:10.3390/ijms23158582.
- [13] Xiao Q, Wang D, Li D, et al. Protein kinase C: a potential therapeutic target for endothelial dysfunction in diabetes[J]. *J Diabetes Complications*, 2023, 37(9):108565. doi:10.1016/j.jdiacomp.2023.108565.
- [14] Jalgaonkar M P, Parmar U M, Kulkarni Y A, et al. SIRT1-FOX-Os activity regulates diabetic complications[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 175:106014. doi:10.1016/j.phrs.2021.106014.
- [15] Zhu H, Jin Q, Li Y, et al. Melatonin protected cardiac microvascular endothelial cells against oxidative stress injury *via* suppression of IP3R - [Ca²⁺]c/VDAC-[Ca²⁺]m axis by activation of MAPK/ERK signaling pathway [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2018, 23(1):101-13. doi:10.1007/s12192-017-0827-4.

Exploring the mechanism of high glucose-induced damage of human retinal vascular endothelial cells based on the IP3-protein kinase C pathway

Liu Qiang^{1,2}, Yu Hua², Dong Lihong², Liao Rongfeng¹

(¹*Dept of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;*

²*Dept of Ophthalmology, Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Hefei 238000)*

Abstract Objective To explore the damaging effect of the IP3-protein kinase C pathway on human retinal vascular endothelial cells under high glucose conditions. **Methods** Human retinal vascular endothelial cells in the logarithmic growth phase were taken and divided into the experimental group (10 mmol/L glucose and 20 mmol/L glucose) and the control group (5 mmol/L glucose). The morphological changes of cells were observed under different concentrations of glucose culture medium. The apoptosis of human retinal vascular endothelial cells was detected by flow cytometry. Real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction was used to detect the RNA expression level of PKC in the IP3-protein kinase C (PKC) pathway, and Western blot was used to detect the protein expression level of PKC in cells. **Results** Under high glucose conditions, the volume of human retinal vascular endothelial cells increased, the degree of extension decreased, and the apoptosis rate increased. Compared with the control group, the apoptosis rate of human retinal vascular endothelial cells in the 20 mmol/L glucose group increased ($P < 0.05$); the IP3 level of human retinal vascular endothelial cells in the 20 mmol/L glucose group (587.9 ± 15.2) ng/ml was lower than that of the control group (738.9 ± 1.0) ng/ml ($P < 0.05$). Under high glucose treatment, the expression levels of PKC mRNA and protein increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The IP3-PKC pathway may be involved in the damage process of human retinal vascular endothelial cells under high glucose conditions, and thus may play a role in diabetic retinopathy.

Key words human retinal vascular endothelial cells; IP3-protein kinase C pathway; diabetic retinopathy; high glucose; apoptosis

Fund programs Scientific Research Project of Universities in Anhui Province (No. 2023AH050643); Scientific Research Project of Anhui Medical University (No. 2022xkj063)

Corresponding author Liao Rongfeng, E-mail: liaorfayyk@126.com