

加减驻景方含药血清对 AKT 基因转染后 ARPE-19 细胞表达 VEGF 的影响

褚文丽 陈水龄 亢泽峰 张丛青 李维义 刘 健

摘 要 **目的** 探讨加减驻景方含药血清对 AKT 基因转染后人视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19) 细胞表达 VEGF 的影响。**方法** 制备 SD 大鼠加减驻景方含药血清及空白血清, 建立 AKT 基因转染 ARPE-19 细胞模型, 体外培养, 分为 5 个组, 正常组为 ARPE-19 细胞常规培养, 转染模型组 (模型细胞, 常规条件培养), 含药血清组 (模型细胞, 给予含药血清干预培养)、空白血清组 (模型细胞, 给予空白血清干预培养) 和阳性对照组 (模型细胞, 给予康柏西普干预培养)。设立不同时间和不同浓度, 通过 CCK-8 法检测各组血清及阳性组药物对细胞毒性、增殖的影响; 通过 ELISA 检测各组细胞上清液中 VEGF 的表达。**结果** 蛋白印迹法 (Western blot) 显示, 转染模型组与正常组比较, AKT 蛋白的表达量明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。CCK-8 示, 细胞培养 24、48h 后, AKT 基因转染可促进 ARPE-19 细胞增殖 ($P < 0.05$), 培养 72h 后, 对细胞增殖影响不大 ($P > 0.05$)。10、20 $\mu\text{g/ml}$ 康柏西普及 5%、10% 的含药血清对模型细胞的增殖有抑制作用 ($P < 0.05$), 各浓度空白血清组对模型细胞组的增殖影响不大 ($P > 0.05$)。酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测显示: 转染模型组细胞上清液中 VEGF 表达量高于正常组 ($P < 0.05$), 康柏西普组与含药血清组均显著低于模型组 ($P < 0.05$), 其中康柏西普组低于含药血清组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。空白血清组与模型组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** AKT 基因转染后可诱导 ARPE-19 细胞的增殖, 促进 VEGF 的表达。加减驻景方含药血清对 AKT 基因转染后 ARPE-19 细胞的增殖及 VEGF 的表达有抑制作用。加减驻景方可能通过抑制 VEGF 的过度表达发挥干预 CNV 生成的作用。

关键词 加减驻景方 含药血清 ARPE-19 细胞 基因转染 血管内皮生长因子

中图分类号 R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.12.014

Effects of Jiajianzhujiang Decoction Containing Serum on Expression of VEGF of ARPE-19 Cells Transfected with AKT Gene. Chu Wenli, Chen Shuiling, Kang Zefeng, et al. Eye Hospital, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of addition and subtraction of sera containing medicinal herbs on the expression of VEGF in human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) cells after AKT gene transfection. **Methods** SD rats serum containing the prescription of Jiajianzhujiang and the content of distilled water in serum were prepared. AKT gene transfected ARPE-19 cell model was established and Western blot method was used to verify the successful construction. The effects of the prescription and distilled water in serum at different concentration (2.5%, 5%, 10%) and Conbercept (5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$) cell vitality was observed by cell counting kit (CCK-8) assay. The effect of serum and Conbercept on the expression of VEGF in model cells was assessed by ELISA. **Results** Result of Western blot assay confirmed that: compared with the normal group, the expression of AKT protein increased significantly in the model group ($P < 0.05$). Results of CCK-8 measure confirmed that After be cultured for 24h and 48h, AKT gene transfection can increase the value of ARPE-19 cells ($P < 0.05$), but after cultured for 72h, there was little difference ($P > 0.05$). While the 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ of Conbercept group and 5% and 10% contained serum group, were lower than model cells group ($P < 0.05$). After cultured for 72h, there was little or no difference in proliferation between model cell and control group ($P > 0.05$). Results of the expression of VEGF in the supernatant of cells detected by ELISA shown that the model group was higher than that of normal cells group ($P < 0.05$), serum and Conbercept group were significantly lower than the model group ($P < 0.05$), no statistically significant difference between the blank serum group and model group cell difference ($P > 0.05$). **Conclusion** The AKT gene transfection can induce proliferation of ARPE-19 cells and promote the expression of VEGF. The modified Zhu Jing Fang medicated serum has inhibitory effect on the proliferation and VEGF expression of ARPE-19 cells transfected with AKT gene. The effect of intervention on the generation of CNV may be played by suppressing the overexpression of

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (面上项目) (81574032)

作者单位: 100040 北京, 中国中医科学院眼科医院

通讯作者: 亢泽峰, 主任医师, 教授, 博士生导师, 电子信箱: zefeng2531@163.com

VEGF.

Key words Jiajian Zhujiang prescription; Containing serum; ARPE - 19; Gene transfection; VEGF

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是多种眼底疾病共同的终末病理环节, 可造成中心视力严重下降而致盲^[1]。CNV 的形成是一个多细胞、多因子协同参与的复杂病理过程, 其中血管内皮生长因子 (vascular endothelium growth factor, VEGF) 是目前已知促进 CNV 生成的最关键因子, VEGF 通过激活内皮细胞的有丝分裂与迁徙, 诱导毛细血管瘤形成来促进新生血管生成。近年研究显示, AKT 相关信号通路可能是直接调节 VEGF 基因表达的重要信号通路, 启动其相关通路的关键在于 AKT 因子的激活^[2]。课题组前期临床研究证实, 证实中药加减驻景方能有效地促进高度近视黄斑出血的吸收, 减轻遮挡感, 提高视力, 并能抑制 CNV 的形成^[3]。现为进一步探讨该方的作用机制, 拟通过体外实验, 以阳离子脂质体介导的 AKT 基因转染 ARPE - 19 为细胞模型, 观察加减驻景方对其表达 VEGF 的影响, 为临床应用该方提供实验依据。

材料与方法

1. 主要仪器: 体积分数 5% CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司), 全自动酶标仪 (德国 Katyo 公司); 5417R 型台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); IX 81 型荧光倒置显微镜 (美国 Olympus 公司); 电泳仪 (北京市六一仪器厂); 超净工作台 (西安永乐精密机械有限公司) 等。

2. 主要试剂: ARPE - 19 细胞 (购于上海富衡生物科技有限公司), MEM 细胞培养液 (美国 Hyclone 公司), 胎牛血清 (美国 Gibco 公司), AKT 质粒 (购于北京博奥森生物技术有限公司), 阳离子脂质体 Lipofectamine2000 (美国 Invitrogen 公司), AKT 山羊多克隆 IgG 抗体 (国药控股股份有限公司 Sinopharm Group CO. LTD.), HRP - 山羊抗兔 IgG (H + L) (艾美捷科技公司), HRP - 山羊抗鼠 IgG (H + L) (艾美捷科技公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (江苏碧云天生物研究所), CCK - 8 试剂盒 (日本同仁化学研究所), 血管内皮生长因子 ELISA 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司)。SD 大鼠由北京市维通利华实验动物技术有限公司提供。

3. 方法: (1) 含药血清的制备: 8 周龄清洁级 SD 大鼠 20 只, 按数字表法随机分为空白血清组和加减驻景方含药血清组。加减驻景方主要由楮实子、枸杞

子、黄芪、当归、茯苓、三七粉等药物组成, 加减驻景方组中药煎制与灌胃方法参考已建立的方法执行^[4]。含药血清组通过灌胃给药, 给予浓度为 0.525g/ml 的加减驻景方中剂量药液, 相当于成人 (60kg) 临床用量的 10 倍, 以 20ml/kg 为灌胃体积, 每日分两次灌服, 连续灌胃 3 天。空白血清组给予等量的蒸馏水。末次灌胃 1h 后腹腔注射麻醉液 (盐酸赛拉嗪 5mg/kg 和盐酸氯胺酮 35mg/kg 的混合物), 在无菌条件下腹主动脉采血, 将所取血在室温下静置 3h, 然后离心机离心 (3000r/min, 15min), 将离心后的上清液水浴灭菌 0.5h, 最后用 0.22μm 微孔滤膜过滤除菌, 于 -20℃ 保存备用。(2) 细胞培养: 将 ARPE - 19 细胞接种至 25cm² 培养瓶中加入培养液, 常规培养。取对数生长期的细胞, 胰蛋白酶消化, 细胞重悬, 计数, 接种于 96 孔板用于实验。(3) 转染模型细胞的制备: 参照 Lipofectamine 试剂盒说明进行。以 2 × 10⁵ 个/孔接种 ARPE - 19 细胞于 96 孔板, 待细胞状态稳定后更换无双抗 DMEM 培养液。细胞培养 12h 后, 将阳离子脂质体 (μl) 用量与质粒 (μg) 用量以 2.5:1 比例配置转染反应体系, 每孔转染 0.2μg 的 AKT 质粒, 6h 后换含双抗的完全细胞培养液继续培养 24h 后用于下一步实验。(4) Western blot 法检测转染模型 AKT 蛋白的含量: 收集各组细胞, 用蛋白提取液常规提取蛋白质, BCA 法测定蛋白质量浓度。各取蛋白样本 24μg 至 2ml EP 管中, 加入等容积上样缓冲液混匀, 煮沸 5min, 冰上放置 2min, 10000r/min 离心 5min, 吸出上清液备用。行 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 每泳道上样量为 24μg 蛋白样品, 浓缩胶恒压 90V, 约 20min, 分离胶恒压 120V, 电泳停止时间通过预染蛋白 marker 确定。电泳结束后采用湿转法, 转膜至 PVDF 膜上, 将 PVDF 膜从转印夹层中取出, 然后于含有 5% 脱脂奶粉封闭液中将其浸入, 水平摇床孵育 1h。用封闭液稀释一抗 AKT, 置杂交袋中与膜杂交, 4℃ 水平摇床孵育过夜。取出 PVDF 膜, 洗膜 3 次, 加入封闭液稀释的二抗, 室温孵育 40min。膜稍微晾干后将 ECL 滴加到 PVDF 膜的蛋白面反应 3min, 迅速用保鲜膜包好后置于暗盒内, X 线胶片曝光 (1 ~ 5min)。扫描图片, 使用图像分析软件对图像灰度进行分析, 以 β - actin 作为内参, 以目的蛋白与 β - actin 的比值代表蛋白相对表达水平并计算表达

量。(5)实验分组:本实验分 5 组:①正常对照组:ARPE-19 细胞,正常条件培养;②转染模型组:AKT 基因转染 ARPE-19 细胞,正常条件培养;③含药血清组:转染模型细胞,给予含药血清培养,体积分数分别为 2.5%、5%、10%;④空白血清组:转染模型细胞,给予空白血清干预培养,体积分数分别为 2.5%、5%、10%;⑤康柏西普组:转染模型细胞,给予 5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ 的康柏西普干预培养。(6)CCK-8 法检测各干预分组对模型细胞增殖的影响:取对数生长期的转染模型 ARPE-19 细胞,接种至 96 孔培养板,密度为 $3 \times 10^4/\text{ml}$,每孔 200 μl ,每组每体积分数设 5 个复孔,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 24h 后弃上清,加入 MEM 培养液 100 μl 继续培养,12h 后去 MEM 培养液,根据分组分别加入 100 μl 干预药物,即 2.5%、5%、10% 的含药血清和空白血清,100 μl 的 5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ 的康柏西普注射液,以正常条件培养的正常细胞作为正常对照组。继续培养 24、48 和 72h 后,将 20 μl CCK-8 加入,每孔继续孵育 4h,于 450nm 波长处用酶标仪测各孔吸光度值(A 值)。(7)ELISA 法检测各组细胞上清液中 VEGF 的表达:各干预组细胞于孵箱中培养 24、48h,将细胞培养上清液收集于离心管内,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 存储备用。检测按照 Human VEGF ELISA 检测试剂盒步骤进行:向标准品孔中每孔加入 100 μl 标准品,15min 内,分别加入 50 μl 的检测缓冲液、细胞培养上清液和检测抗体,室温孵育洗涤,加入链霉亲和素孵育洗涤,然后将 100 μl 显色底物加入,避光条件下孵育 30min,加入终止液 100 μl ,测 A 值,绘制标准曲线,计算样品的相应浓度。

4. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行统计分析,测定指标的数据资料经 W 检验均呈正态分布,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间两两比较采用 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 蛋白质印迹(Western blot)法检测转染组 AKT 蛋白表达情况:转染细胞组与正常细胞组均可见 AKT 蛋白表达,其中正常组 AKT 蛋白表达为内源性 AKT,其在模型组(1.386 ± 0.057)中的表达量较正常对照组(0.125 ± 0.014)明显增加,相对灰度值分析与正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 AKT 基因转染 ARPE-19 细胞模型构建成功(图 1)。
2. 各组干预对模型细胞活性增殖影响的比较:

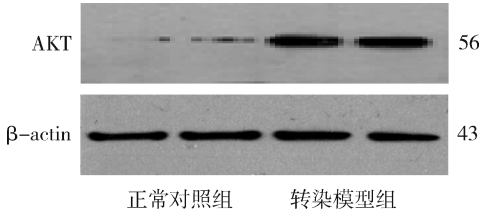


图 1 Western blot 法检测两组 AKT 蛋白结果

CCK-8 法检测显示,模型细胞组常规培养 24h、48h 后,A 值显著高于正常组($P < 0.05$),常规培养 72h 后,与正常组 A 值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),说明 AKT 基因转染培养 24、48h 可促进 ARPE-19 细胞的增殖,培养 72h 后,模型组与正常组 A 值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),可能和脂质体瞬时转染质粒随表达时间增长逐渐减退有关,故后续实验取各组干预培养 24、48h 细胞活性最高时进行实验。在药物干预方面,结果显示,含药血清组(5%、10%)及康柏西普组(10、20 $\mu\text{g/ml}$)与转染模型组比较,A 值显著低于转染模型组($P < 0.05$);各浓度空白血清组与转染模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);故后续实验取干预血清浓度为浓度 5%、10%,康柏西普浓度为 10、20 $\mu\text{g/ml}$ (表 1、图 2)。

表 1 各组干预对 AKT 转染后 ARPE-19 细胞活性的影响(A 值, $\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	24h	48h	72h
正常细胞组	0.779 $\pm$ 0.030	0.803 $\pm$ 0.027	0.827 $\pm$ 0.038
转染模型组	0.848 $\pm$ 0.064 [▲]	0.913 $\pm$ 0.015 [▲]	0.785 $\pm$ 0.087
2.5% 含药血清组	0.783 $\pm$ 0.030	0.856 $\pm$ 0.059	0.698 $\pm$ 0.025
5% 含药血清组	0.694 $\pm$ 0.026 [*]	0.762 $\pm$ 0.047 [*]	0.636 $\pm$ 0.076 [*]
10% 含药血清组	0.635 $\pm$ 0.033 [*]	0.594 $\pm$ 0.072 [*]	0.644 $\pm$ 0.058 [*]
2.5% 空白血清组	0.832 $\pm$ 0.028	0.921 $\pm$ 0.065	0.720 $\pm$ 0.050
5% 空白血清组	0.796 $\pm$ 0.095	0.896 $\pm$ 0.033	0.678 $\pm$ 0.042
10% 空白血清组	0.807 $\pm$ 0.042	0.864 $\pm$ 0.032	0.752 $\pm$ 0.039
5 $\mu\text{g/ml}$ 康柏西普组	0.825 $\pm$ 0.068	0.885 $\pm$ 0.034	0.758 $\pm$ 0.092
10 $\mu\text{g/ml}$ 康柏西普组	0.725 $\pm$ 0.090 [*]	0.793 $\pm$ 0.023 [*]	0.719 $\pm$ 0.047 [*]
20 $\mu\text{g/ml}$ 康柏西普组	0.674 $\pm$ 0.025 [*]	0.638 $\pm$ 0.016 [*]	0.635 $\pm$ 0.034 [*]

与转染模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与正常组比较,[▲] $P < 0.05$

3. 各组干预对模型细胞表达 VEGF 的影响:各组细胞培养上清液中 VEGF 表达量比较:转染模型组较正常细胞组显著增高($P < 0.05$),较空白血清组,差异无统计学意义($P > 0.05$),说明 AKT 基因转染可促进 ARPE-19 细胞中 VEGF 蛋白的表达。康柏西普组与含药血清组较转染模型组显著降低($P < 0.05$)。其中,10% 含药血清组较 5% 组 VEGF 的表达

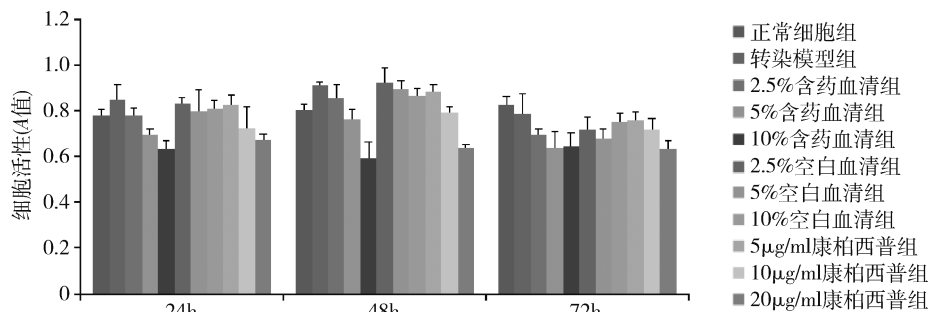


图2 各组干预对 AKT 转染后 ARPE - 19 细胞活性的影响

比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),20 $\mu\text{g/ml}$ 康柏西普组与10 $\mu\text{g/ml}$ 组 VEGF 表达比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明康柏西普及含药血清均可抑制 AKT 过表达后 ARPE - 19 细胞中 VEGF 的生成,且10% 含药血清组、20 $\mu\text{g/ml}$ 康柏西普组抑制作用较强,20 $\mu\text{g/ml}$ 康柏西普组抑制作用强于10% 含药血清组(表2、图3)。

表2 各干预组培养液中 VEGF 的蛋白浓度 (ng/ml, $\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	24h	48h
正常细胞组	37.591 $\pm$ 5.230	37.782 $\pm$ 1.570
转染模型组	91.033 $\pm$ 0.588 [▲]	126.199 $\pm$ 1.682 [▲]
5% 含药血清组	70.624 $\pm$ 2.086 [*]	114.767 $\pm$ 0.898 [*]
10% 含药血清组	67.138 $\pm$ 2.678 ^{* &}	92.013 $\pm$ 1.033 ^{* &}
5% 空白血清组	94.176 $\pm$ 3.844	122.079 $\pm$ 4.088
10% 空白血清组	92.805 $\pm$ 5.320	125.495 $\pm$ 2.567
10 $\mu\text{g/ml}$ 康柏西普组	59.395 $\pm$ 3.753 [*]	84.201 $\pm$ 5.438 [*]
20 $\mu\text{g/ml}$ 康柏西普组	51.199 $\pm$ 2.214 ^{* #Δ}	73.281 $\pm$ 3.527 ^{* #Δ}
<i>F</i>	103.899	324.774
<i>P</i>	0.000	0.000

与正常细胞组比较, [▲] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与5% 含药血清组比较, [&] $P < 0.05$; 与10 $\mu\text{g/ml}$ 康柏西普组比较, [#] $P < 0.05$; 与10% 含药血清组比较, ^Δ $P < 0.05$

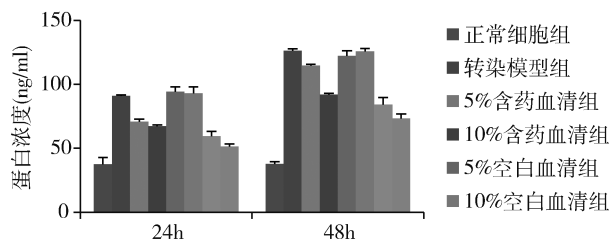


图3 各干预组培养液中 VEGF 的蛋白浓度比较

讨 论

CNV 是多种眼底疾病的共同病理环节,是目前严重影响老年人群和年轻工作人群不可逆视力损害及致盲的主要原因之一,其发病机制尚不完全明确。

研究显示,CNV 的形成是一个多细胞、多因子协同参与的复杂病理过程,如 RPE 细胞、血管内皮细胞、VEGF、AKT 等,其中 VEGF 是目前已知促进 CNV 生成的最关键因子^[5,6]。近年来研究显示,AKT 是调节 VEGF 表达的主要上游因子之一,在 CNV 形成过程中发挥着重要的作用^[2,7,8]。目前玻璃体腔注射抗 VEGF 药物(如康柏西普、雷珠单抗等)被认为是 CNV 的主要方法,但存在其价格昂贵,复发率高,远期疗效尚未确定等不足^[9,10]。中医药以其整体观念和辨证论治特色在 CNV 相关等难治性眼病中的应用具有一定作用,中西医协同治疗,具有增加疗效的优势。

加减驻景方是中医眼科名家亢泽峰教授在眼科名方驻景丸基础上提炼优化而成,亢教授认为 CNV 属中医眼科“瞳神络病”范畴,多因肝肾亏虚或视久伤血,气血津液代谢失常,湿浊内阻,日久煎熬成痰或瘀,“邪阻”目络,反复日久,则成“病络”(新生血管)^[4,11]。病络易损而血溢络外,出现视力障碍。方中菟丝子、枸杞子共为君药,补益肝肾明目治其本,黄芪与当归合以健脾益气补血,目得血而能视;茯苓与桂枝合用温通经脉、助阳化气利水;三七、三棱等活血行气、散瘀止血,全方共达补肾明目、益气养血、散瘀利水之效。前期临床研究证实该方能有效地促进高度近视黄斑出血的吸收,改善视功能,并能抑制 CNV 的形成^[3]。本研究从体外实验出发,应用转染技术构建常氧状态下 AKT 过表达的 ARPE - 19 为细胞模型,以抗 VEGF 药物为阳性干预对照组,观察中药加减驻景方含药血清对细胞模型表达 VEGF 的影响,从而探讨该方对 CNV 的作用机制。

研究中首先成功地建立了 AKT 基因转染 ARPE - 19 细胞模型,采用 CCK - 8 法检测各组干预因素不同时间对模型细胞增殖能力的影响,显示干预培养 24、48h 后,AKT 基因转染可促进 ARPE - 19 细胞的增殖,加减驻景方含药血清组(5%、10%)及康