

·方药研究·

本文引用:符超君,凌艳君,颜家朝,赵洪庆,秦裕辉.双丹明目胶囊对糖尿病视网膜病变大鼠视网膜 Ras-Raf-1-MEK-ERK 通路的调控作用[J].湖南中医药大学学报,2018,38(7):728-731.

双丹明目胶囊对糖尿病视网膜病变大鼠视网膜 Ras-Raf-1-MEK-ERK 通路的调控作用

符超君¹,凌艳君²,颜家朝¹,赵洪庆¹,秦裕辉^{1*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南省中医药研究院,湖南长沙 410006)

〔摘要〕目的 观察双丹明目胶囊对糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)大鼠视网膜组织 Ras-Raf-1-MEK-ERK 通路的调控作用,探讨其可能的作用机制。**方法** 取 60 只 SD 大鼠首先随机分为 2 组,即正常组(A 组,10 只)和糖尿病组(50 只),将 50 只糖尿病组大鼠经一次性尾静脉注射 STZ(50 mg/kg)诱导糖尿病模型,通过眼底荧光血管造影确诊 DR 模型后,选取其中 45 只大鼠再随机分为模型组(B 组)、阳性药物组(C 组)、双丹明目胶囊高剂量组(D 组)、双丹明目胶囊中剂量组(E 组)、双丹明目胶囊低剂量组(F 组),每组 9 只。所有大鼠均干预 30 d,末次给药后,检测所有大鼠空腹血糖值,Western-blot 法和 RT-PCR 法分别检测大鼠视网膜 Ras、Raf-1、MEK、ERK 蛋白和基因的表达。**结果** 与 A 组比较,B 组大鼠血糖显著升高,视网膜 Ras、Raf-1、MEK、ERK 蛋白和基因表达均显著上升($P<0.01$);双丹明目胶囊干预后,与 B 组比较,D 组大鼠血糖值下降,视网膜 Ras、Raf-1、MEK、ERK 蛋白和基因表达均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);同时,E 组也能使视网膜 Ras、Raf-1、ERK 蛋白表达降低、Raf-1、ERK 基因表达降低($P<0.05$)。**结论** 双丹明目胶囊能通过调控 Ras-Raf-1-MEK-ERK 通路而发挥治疗 DR 的作用。

〔关键词〕 双丹明目胶囊;糖尿病视网膜病变;Ras-Raf-1-MEK-ERK

〔中图分类号〕R289.5;R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.07.003

Effect of Shuangdan Mingmu Capsule on the Ras-Raf-1-MEK-ERK Pathway in Retinal Tissue in Rats with Diabetic Retinopathy

FU Chaojun¹, LING Yanjun², YAN Jiachao¹, ZHAO Hongqing¹, QIN Yuhui^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China)

〔Abstract〕 Objective To observe the regulatory effect of Shuangdan Mingmu Capsule on the Ras-Raf-1-MEK-ERK pathway in retinal tissue in rats with diabetic retinopathy (DR), and to investigate its possible mechanism of action. **Methods** Sixty Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: normal control group (group A, 10 rats) and diabetic group (50 rats). The rats in the diabetic group were given a single tail vein injection of STZ (50 mg/kg) to establish a DR model, which was confirmed by fundus fluorescein angiography, and then 45 rats were randomly selected and divided into model group (group B), positive drug group (group C), and high-, medium-, and low-dose Shuangdan Mingmu Capsule groups (groups D, E, and F), with 9 rats in each group. All rats were treated for 30 days. After the last administration, fasting blood glucose was measured in all rats. The mRNA and protein expression of Ras, Raf-1, MEK, and ERK was determined by RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** Compared with group A, group B showed significant increases in fasting blood glucose and the mRNA and protein

〔收稿日期〕2018-03-12

〔基金项目〕国家自然科学基金面上项目(81473737)。

〔作者简介〕符超君,男,在读博士研究生,研究方向:中医药防治糖尿病视网膜病变的机制研究。

〔通讯作者〕* 秦裕辉,男,教授,博士研究生导师,E-mail:dlqyh@sohu.com。

expression of Ras, Raf-1, MEK, and ERK in the retina ($P<0.01$). Compared with group B, group D showed significant reductions in fasting blood glucose and the mRNA and protein expression of Ras, Raf-1, MEK, and ERK in the retina ($P<0.05$ or $P<0.01$), and group E showed significant reductions in the protein expression of Ras, Raf-1, and ERK in the retina as well as the mRNA expression of Raf-1 and ERK ($P<0.05$). **Conclusion** Shuangdan Mingmu Capsule can play a role in the treatment of DR by regulating the Ras-Raf-1-MEK-ERK pathway.

[**Keywords**] Shuangdan Mingmu Capsule; diabetic retinopathy; Ras-Raf-1-MEK-ERK

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最严重的微血管并发症之一,发病率高且危害性大,是患者视力下降甚至失明的主要原因。据报道,约20%~40%的糖尿病患者有不同程度的视网膜病变情况,且DR的发生率随着糖尿病病程的发展而明显增高^[1]。目前,DR的治疗尚缺乏特效药物,临床治疗多用西药羟苯磺酸钙,但考虑到其依赖性高、副作用较大等缺点以及中药的品种优势,寻找一种能有效控制DR发生发展的中药复方具有重要的临床价值。双丹明目胶囊是湖南中医药大学秦裕辉教授结合多年临床经验及现代研究成果而研发的国家准字号新药(国药准字Z20080062),主治肝肾阴虚、瘀血阻络所致的糖尿病视网膜病变,经临床验证,其疗效显著,临床使用安全^[2-3]。课题组前期研究表明,双丹明目胶囊能有效缓解DR大鼠视网膜各层结构水肿、坏死情况,改善DR大鼠血糖血脂紊乱、血液流变异常状态,降低血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其含激酶插入区受体(kinase insert domain containing receptor, KDR)的表达,保护视网膜组织^[4-7]。然而,双丹明目胶囊缓解视网膜损伤的确切机制尚未进行研究。本研究拟在前期基础上,进一步以VEGF下游因子Ras-Raf-1-MEK-ERK为切入点,探讨双丹明目胶囊治疗DR的作用机制,这将对于DR的发病机制研究及其临床防治都具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 药物

双丹明目胶囊由女贞子、旱墨莲、三七、山茱萸、山药、牡丹皮、茯苓、红土茯苓、牛膝、丹参、泽泻11味药材组成,原药材购买于湖南上药九旺医药有限公司。羟苯磺酸钙胶囊购自湖南省中医药研究院附属医院,规格:500 mg/粒*20粒,批号:170603,国药准字H20010795。

1.2 实验动物

SPF级雄性SD大鼠60只,体质量220~240 g,购自湖南斯莱克景达实验动物公司,生产许可证号:SCXK(湘)2013-0004,饲养于湖南省中医药研究院 SPF级实验动物中心。大鼠购入后先适应性喂养5 d,期间自由摄食饮水。

1.3 试剂与主要仪器

兔抗大鼠Ras、Raf-1、MEK、ERK一抗(美国R&D);STZ(美国Sigma);血糖测量仪、血糖试纸(美国Johnson);RIPA裂解液、BCA试剂盒、Trizol(美国Thermo);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(武汉博士德);SYBR MasterMix、反转录试剂盒(日本Takara);5417R低温高速离心机(德国Eppendorf);电泳槽、电泳仪、凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad);超微量核酸蛋白测定仪(英国BioDrop);Lightcycler 480 II实时荧光定量PCR仪(瑞士Roche)。

1.4 造模与给药

60只SD大鼠首先随机分为2组,即正常组(A组,10只)和糖尿病组(50只)。糖尿病组在高脂灌胃14 d后,采用一次性尾静脉注射STZ(50 mg/kg)方法建立糖尿病模型,于STZ注射72 h后测定所有大鼠空腹血糖值。根据血糖测定结果,选取血糖 ≥ 16.70 mmol/L的大鼠作为糖尿病模型大鼠。继续饲养1周后,对所有糖尿病大鼠进行眼底荧光血管造影,具有视网膜病变的大鼠视为DR模型成功。糖尿病组大鼠造模成功后,选取45只DR大鼠随机分为模型组(B组)、阳性药物组(C组)、双丹明目胶囊高剂量组(D组)、双丹明目胶囊中剂量组(E组)、双丹明目胶囊低剂量组(F组),每组9只。阳性药物为羟苯磺酸钙胶囊,等效给药浓度为5.8 Mg/kg,双丹明目胶囊高、中、低剂量组给药浓度分别为11.2、5.6、2.8 g/kg(临床等效2、1、0.5倍剂量),正常组与模型组均给予等量的蒸馏水,持续给药30 d(双丹明目胶囊1个疗程)。末次给药后,所有动物均进行血糖值测定,而后麻醉大鼠,取右眼视网膜组织保存于4%多聚甲醛溶液中用于病理检测,左眼视网膜组织于液氮中冻存待用。

1.5 空腹血糖值测定

测定前所有大鼠禁食6 h,采用剪尾取血法剪取大鼠尾部根部动脉血,血糖仪测定各组大鼠的空腹血糖值。

1.6 Western-blot实验

每组随机选取4只大鼠的视网膜组织,加入一定量RIPA裂解液,冰上匀浆后于4℃、12 000 r/min条件下离心15 min,取上清液制备组织蛋白提取液,BCA试剂盒法测定组织蛋白含量。按照

Western-blot 实验步骤分别检测大鼠视网膜中 Ras、Raf-1、MEK、ERK 的蛋白表达量,根据目的蛋白和内参蛋白对应灰度值的比值计算蛋白的相对表达水平。

1.7 RT-PCR 实验

每组随机选取 4 只大鼠的视网膜组织,加入一定量 Trizol 试剂提取组织总 RNA,检测含量合格后按反转录试剂盒操作要求将 RNA 逆转录成 cDNA,PCR 反应扩增 Ras、Raf-1、MEK、ERK 基因产物,以 β -actin 基因为内参。引物由深圳华大基因公司合成,具体序列见表 1。

表 1 各基因引物序列

基因	上下游	引物序列(5'-3')
Ras	上游	TCTTCGTGCTCGGTGATG
	下游	GGACCTCTGACCCAAATG
Raf-1	上游	CTACGCGCTGTGACA
	下游	GACCACGCATTATTACTC
MEK	上游	GGGAGAGTTGAAGGATGATGAC
	下游	ATCTCGCCCTCACTGTAGAAG
ERK	上游	TCATAGGCATCCGAGACATCC
	下游	CGCAGGTGCTGTGATAAGC
β -actin	上游	CACCCGCGAGTACAACCTTC
	下游	CCCATACCCACCATCACACC

1.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,计量数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间差异比较采用单因素方差分析和 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠空腹血糖值检测结果

与 A 组比较,B 组大鼠空腹血糖值显著升高($P<0.01$);给予药物干预后,与 B 组比较,D 组大鼠空腹血糖值显著下降($P<0.05$),而 C、E、F 组无明显降糖效果($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠空腹血糖值比较 ($\bar{x}\pm s$, mmol/L)

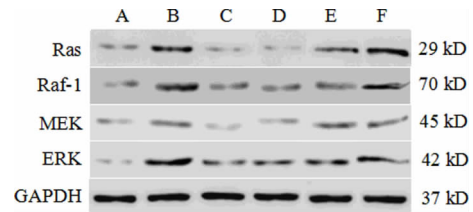
组别	n	空腹血糖
A 组	9	5.9 \pm 0.5
B 组	9	27.5 \pm 2.8**
C 组	9	27.1 \pm 2.4
D 组	9	21.5 \pm 3.0 [#]
E 组	9	24.5 \pm 3.1
F 组	9	26.7 \pm 2.9
F 值		143.7
P 值		0.000

注:与 A 组比较,** $P<0.01$;与 B 组比较,[#] $P<0.05$ 。

2.2 各组大鼠视网膜 Ras、Raf-1、MEK、ERK 蛋白表达结果

与 A 组比较,B 组大鼠视网膜 Ras、Raf-1、MEK、

ERK 蛋白表达均显著升高($P<0.01$);与 B 组比较,D 组和 C 组大鼠视网膜上述蛋白表达均明显降低($P<0.01$),同时,E 组也能使大鼠视网膜 Ras、Raf-1、ERK 蛋白表达降低($P<0.05$)。见图 1、表 3。



注:A.正常组;B.模型组;C.阳性药物组;D.双丹明目胶囊高剂量组;E.双丹明目胶囊中剂量组;F.双丹明目胶囊低剂量组。

图 1 各组大鼠视网膜 Ras、Raf-1、MEK、ERK 蛋白表达情况

表 3 各组大鼠视网膜 Ras、Raf-1、MEK、ERK

组别	蛋白相对表达量 ($\bar{x}\pm s, n=4$)			
	Ras/GAPDH	Raf-1/GAPDH	MEK/GAPDH	ERK/GAPDH
A 组	0.51 \pm 0.06	0.43 \pm 0.06	0.42 \pm 0.04	0.33 \pm 0.05
B 组	0.78 \pm 0.09**	0.85 \pm 0.11**	0.70 \pm 0.06**	0.67 \pm 0.08**
C 组	0.48 \pm 0.05 ^{##}	0.49 \pm 0.05 ^{##}	0.48 \pm 0.05 ^{##}	0.41 \pm 0.04 ^{##}
D 组	0.54 \pm 0.06 ^{##}	0.48 \pm 0.06 ^{##}	0.52 \pm 0.06 ^{##}	0.42 \pm 0.05 ^{##}
E 组	0.61 \pm 0.07 [#]	0.62 \pm 0.06 [#]	0.60 \pm 0.06	0.48 \pm 0.07 [#]
F 组	0.71 \pm 0.08	0.76 \pm 0.08	0.67 \pm 0.07	0.56 \pm 0.06
F 值	34.8	38.7	24.9	37.4
P 值	0.002	0.001	0.005	0.001

注:与 A 组比较,** $P<0.01$;与 B 组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠视网膜 Ras、Raf-1、MEK、ERK 基因表达结果

与 A 组比较,B 组大鼠视网膜 Ras、Raf-1、MEK、ERK 基因表达均显著升高($P<0.01$);而在给予双丹明目胶囊或阳性药物干预后,与 B 组比较,D 组和 C 组大鼠视网膜组织的 Ras、Raf-1、MEK、ERK 基因表达均显著降低($P<0.01$),同时,E 组也能使大鼠视网膜 Raf-1、ERK 基因表达降低($P<0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠视网膜 Ras、Raf-1、MEK、ERK

组别	基因相对表达量 ($\bar{x}\pm s, n=4$)			
	Ras/ β -actin	Raf-1/ β -actin	MEK/ β -actin	ERK/ β -actin
A 组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.01	1.01 \pm 0.01	1.00 \pm 0.01
B 组	2.41 \pm 0.34**	2.47 \pm 0.28**	2.18 \pm 0.26**	2.21 \pm 0.28**
C 组	1.37 \pm 0.16 ^{##}	1.35 \pm 0.15 ^{##}	1.47 \pm 0.18 ^{##}	1.40 \pm 0.24 ^{##}
D 组	1.57 \pm 0.24 ^{##}	1.58 \pm 0.20 ^{##}	1.63 \pm 0.21 ^{##}	1.51 \pm 0.18 ^{##}
E 组	2.15 \pm 0.27	1.89 \pm 0.26 [#]	1.89 \pm 0.28	1.67 \pm 0.17 [#]
F 组	2.30 \pm 0.31	2.24 \pm 0.28	2.08 \pm 0.21	1.96 \pm 0.26
F 值	47.3	49.1	31.4	32.7
P 值	0.000	0.000	0.001	0.001

注:与 A 组比较,** $P<0.01$;与 B 组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

3 讨论

糖尿病视网膜病变(DR)是糖尿病微血管病变中最常见、也是最严重的并发症之一,临床多以视网膜微血管生成、出血、水肿、渗出等为主要特征^[8]。DR的中医病机可理解为肝肾阴虚、瘀血阻络,其中阴虚为本、肾虚为根、血瘀为标。中医治疗DR以滋阴、补肾、活血为基本法则,双丹明目胶囊则是基于此理法并结合多年临床经验而成方,临床疗效显著。前期研究表明,双丹明目胶囊能有效改善DR大鼠视网膜微血管改变,缓解视网膜各层结构水肿、坏死情况,改善DR大鼠血糖血脂紊乱、血液流变异常状态,并抑制视网膜VEGF/KDR环路的表达^[4-7]。本研究在前期基础上,进一步以VEGF/KDR下游信号通路Ras-Raf-1-MEK-ERK为靶点,探讨双丹明目胶囊抑制DR大鼠微血管生成的分子机制。

本实验采用一次性尾静脉注射STZ(50 mg/kg)的方法建立DR大鼠模型,通过检测大鼠血糖值并观察视网膜眼底荧光血管造影结果,证实模型建立成功。血糖值作为糖尿病的核心指标,与糖尿病患者视网膜病变的发生率密切相关,DR多发生于长时间未能有效控制血糖值的情况下^[9]。然而,西医治疗DR的临床首选药物羟苯磺酸钙无降糖效果,而中药立足于整体,能多环节、多途径作用于疾病,改善患者依从性,增加用药安全。本研究发现,双丹明目胶囊能有效降低DR大鼠血糖值,抑制微血管生成,进而保护视网膜组织。血管通透性增加以及新血管生成是DR发生的重要原因,血管生成刺激因子和血管生成抑制因子之间平衡的打破是微血管生成的关键机制^[10]。研究发现,VEGF/KDR环路在内皮祖细胞参与血管生成的作用过程中扮演了重要角色^[11-12]。Ras-Raf-1-MEK-ERK通路属于VEGF/KDR环路直接调控的下游信号,是一个小GTP结合蛋白连接活化的受体酪氨酸激酶和胞浆蛋白激酶级联反应^[13]。Ras在细胞外信号刺激下,转化为激活态,激活型Ras磷酸化激活Raf,Raf活化后继续激活下游分子MEK,促使MEK磷酸化^[14];MEK属于少有的双重特异性激酶,通过Tyr和Thr两个调节位点磷酸化而激活ERK,活化的ERK入核,启动相应转录子的转录^[15]。Raf激酶借此将细胞外刺激信号传至细胞内,引起一系列细胞反应,从而调控细胞增殖、分化、凋亡、转移等功能^[16-17]。本研究结果显示,DR大鼠视网膜Ras、Raf-1、MEK、ERK蛋白和基因表达均明显增加;在给予双丹明目胶囊干预后,上述趋势得到有效逆转,说明该药物能够降低Ras、Raf-1、MEK、ERK的表达而抑制新血管生成,保护视网膜组织。

综上所述,本研究发现双丹明目胶囊能通过调控Ras-Raf-1-MEK-ERK通路而发挥治疗DR的作

用,为DR的临床防治提供了实验基础,下一步拟进行更深入的疗效机制研究。

参考文献:

- [1] HUANG O S, TAY W T, ONG P G, et al. Prevalence and determinants of undiagnosed diabetic retinopathy and vision-threatening retinopathy in a multiethnic Asian cohort: the Singapore Epidemiology of Eye Diseases (SEED) study[J]. *Br J Ophthalmol*, 2015, 99(12):1614-1621.
- [2] 涂良钰,王文长,王育良,等.双丹明目胶囊治疗糖尿病视网膜病变的临床研究[J].*中国新药杂志*,2009,24(18):2331-2336.
- [3] 秦裕辉,李芳,涂良钰,等.双丹明目胶囊治疗糖尿病视网膜病变的多中心临床研究[J].*湖南中医药大学学报*,2010,30(1): 46-51.
- [4] 秦裕辉,李文娟,张熙,等.双丹明目胶囊对糖尿病视网膜病变大鼠视网膜VEGF和VEGFR蛋白表达的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2015,35(6):1-3.
- [5] 秦裕辉,李文娟,张熙,等.双丹明目胶囊对糖尿病视网膜病变大鼠血糖及视网膜功能的影响[J].*国际眼科杂志*,2014,14(11):1943-1945.
- [6] 符超君,凌艳君,颜家朝,等.双丹明目胶囊对糖尿病视网膜病变大鼠血糖血脂及血液流变学的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2018,38(5):489-492.
- [7] 彭俊,潘坤,刘峥嵘,等.双丹明目胶囊对糖尿病模型大鼠视网膜VEGF-a、VEGF-b表达的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2018,38(6):635-640.
- [8] DOW C, MANCINI F, RAJAABELINA K, et al. Diet and risk of diabetic retinopathy: a systematic review[J]. *Eur J Epidemiol*, 2018, 33(2):141-156.
- [9] 生侠,谢青,刘彩霞,等.糖尿病视网膜病变患者血糖及凝血指标的变化[J].*中国现代医学杂志*,2017,27(12):133-136.
- [10] KASAI A, ISHIMARU Y, HIGASHINO K, et al. Inhibition of apelin expression switches endothelial cells from proliferative to mature state in pathological retinal angiogenesis [J]. *Angiogenesis*, 2013, 16(3):723-734.
- [11] LI Q, WANG Y, ZHANG L, et al. Naringenin exerts anti-angiogenic effects in human endothelial cells: Involvement of ERK α /VEGF/KDR signaling pathway[J]. *Fitoterapia*, 2016, 111: 78-86.
- [12] ZHENG Q, DU J, ZHANG Z, et al. Association study between of Tie2/angiopoietin-2 and VEGF/KDR pathway gene polymorphisms and vascular malformations[J]. *Gene*, 2013,523(2):195-198.
- [13] 蒋成英,戴广海.Ras-Raf-Mek-Erk信号传导通路在肝细胞癌发生中的作用机制及在靶向治疗中的应用[J].*中国肿瘤临床*,2008,23(11):1377-1380.
- [14] ILLARIO M, CAVALLO AL, BAYER KU, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II binds to Raf-1 and modulates integrin-stimulated ERK activation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(46):45101-45108.
- [15] PEACOCK J D, PRIDGEON M G, TOVAR E A, et al. Genomic status of MET potentiates sensitivity to MET and MEK inhibition in NF1-related malignant peripheral nerve sheath tumors[J]. *Cancer Res*, 2018, doi: 10.1158/0008-5472.
- [16] 韩园芳,冀林华.Ras/Raf/MEK/ERK通路和低氧性疾病关系的研究进展[J].*重庆医学*,2016,45(21):3004-3007.
- [17] DURRANT D E, MORRISON D K. Targeting the Raf kinases in human cancer: the Raf dimer dilemma[J]. *Br J Cancer*, 2017, 118(1):3-8.