

·实验研究·

本文引用: 胡卓瑜, 王 萱, 胡 齐, 刘 静, 黄栎蓉, 付美林, 刘志敏, 陈向东. 灯盏花素对大鼠糖尿病视网膜水肿 PKC β 及 VEGF 蛋白表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(10): 1762-1770.

灯盏花素对大鼠糖尿病视网膜水肿 PKC β 及 VEGF 蛋白表达的影响

胡卓瑜¹, 王 萱², 胡 齐¹, 刘 静³, 黄栎蓉³, 付美林², 刘志敏², 陈向东^{2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007;

3. 中医药防治眼耳鼻喉疾病湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

〔摘要〕目的 探讨灯盏花素对链脲霉素(streptozotocin, STZ)诱导视网膜水肿大鼠血-视网膜屏障的作用及对蛋白激酶 C β (protein kinases C β , PKC β)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白表达的影响。方法 除正常组正常饲养外,其他各组大鼠用 30 mg/kg 剂量一次性腹腔注射 STZ 联合高脂高糖饲料饮食诱导 SD 大鼠糖尿病模型。HE 染色及 OCT 观察视网膜组织形态,确立成功建立糖尿病视网膜水肿模型。造模成功后,随机分为模型组、安多明组及灯盏花素组,予以用药 4 周,观察大鼠的血糖、体质量变化,行 OCT 检查。通过 HE 染色观察视网膜组织形态组织学变化,Western blot 检测视网膜组织 VEGF、PKC β 蛋白的表达水平,ELISA 法检测血清 VEGF、PKC β 的表达水平,免疫组织化学检测视网膜 Claudin-5、Occludin 的表达水平。结果 与空白组对比,造模后 2、4、8 周以及给药后 1、2、4 周,模型组、安多明组、灯盏花素组血糖显著升高($P < 0.01$);且体质量增长缓慢($P < 0.01$),并有体质量下降趋势;视网膜神经节细胞呈空泡样改变,内丛状层、外丛状层排列紊乱,内核层、外核层细胞密度减少;视网膜厚度增加($P < 0.01$);视网膜组织及血清中 VEGF、PKC β 水平均显著上升($P < 0.01$);视网膜组织 claudin-5、occludin 的表达量下降($P < 0.01$)。给药 4 周后,与模型组对比,灯盏花素组层间水肿不明显,视网膜厚度减少($P < 0.01$);视网膜组织 PKC β 、VEGF 水平显著降低($P < 0.01$);血清 PKC β 、VEGF 水平显著降低($P < 0.01$);视网膜组织 claudin-5、occludin 的表达量上升($P < 0.05, P < 0.01$)。结论 灯盏花素可以下调 VEGF、PKC β 的表达水平,使得 claudin-5、occludin 的表达量升高,以修复 STZ 诱导糖尿病视网膜水肿大鼠的血-视网膜屏障损伤。

〔关键词〕 糖尿病视网膜水肿;灯盏花素;蛋白激酶 C β ;血管内皮生长因子;链脲霉素;血-视网膜屏障

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.10.003

Effects of scutellarin on protein expressions of PKC β and VEGF in rats with diabetic retinal edema

HU Zhuoyu¹, WANG Xuan², HU Qi¹, LIU Jing³, HUANG Longrong³, FU Meilin²,
LIU Zhimin², CHEN Xiangdong^{2*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Hunan Key Laboratory for Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

〔收稿日期〕 2023-03-23

〔基金项目〕 湖南省自然科学基金项目(2021JJ30520);湖南省中医药科研计划项目重点课题(C2022003);湖南省中医药科研计划项目一般指导课题(E2022044);湖南中医药大学研究生创新课题(2023CX09);湖南省教育厅科学研究重点项目(22A0250);湖南省中医药管理局重点项目(C2023013);湖南中医药大学研究生创新课题(2022CX150)。

〔第一作者〕 胡卓瑜,女,博士研究生,研究方向:中医防治眼底疾病。

〔通信作者〕 * 陈向东,男,博士,主任医师,博士研究生导师,E-mail:564259166@qq.com。

[Abstract] Objective To investigate the effects of scutellarin (Scu) on the blood-retinal barrier and the expressions of protein kinase C β (PKC β) and vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in rats with streptozotocin (STZ)-induced retinal edema. **Methods** In addition to normal feeding group, the SD rats in other groups were induced into diabetes model by intraperitoneal injection of STZ at a dose of 30 mg/kg in combination with a high-fat and high-sugar diet. HE staining and OCT were used to observe the retinal tissue morphology and a model of diabetes retinal edema was successfully established. After successful modeling, the rats were randomly divided into model group, andomin group, and scutellarin group. They were administered medications for 4 weeks to observe the changes in blood glucose and body weight, and were examined by OCT. In addition, HE staining was used to observe the retina. The protein expressions of VEGF and PKC β in retinal tissue were determined by Western blot, and expression levels of VEGF and PKC β in serum were examined by ELISA respectively. Immunohistochemistry was used to measure the expression levels of claudin-5 and occludin in the retina. **Results** Compared with the blank group, blood glucose levels significantly increased in model group, andomin group, and scutellarin group at 2, 4, and 8 weeks after modeling, as well as at 1, 2, and 4 weeks after administration ($P<0.01$). The body weight showed a slow growth ($P<0.01$) with a tendency to decrease; the retinal ganglion cells showed vacuolar changes, the inner plexiform layer and outer plexiform layer were in disorder, and the cell density of both inner and outer nuclear layers decreased; retinal thickness increased ($P<0.01$). The levels of VEGF and PKC β in retinal tissue and serum significantly increased ($P<0.01$); the expression levels of claudin-5 and occludin in retinal tissue decreased ($P<0.01$). After 4 weeks of administration, compared with the model group, the interlayer edema was not significant, the retinal thickness decreased ($P<0.01$), the levels of PKC β and VEGF in retinal tissue decreased ($P<0.01$), the levels of PKC β and VEGF in serum also significantly decreased ($P<0.01$), while the expression levels of claudin-5 and occludin in retinal tissue increased ($P<0.05$, $P<0.01$) in scutellarin group. **Conclusion** Scutellarin can down-regulate the expression levels of VEGF and PKC β , increase the expressions of claudin-5 and occludin, so as to repair the blood-retinal barrier damage in STZ-induced diabetic retinal edema rats.

[Keywords] diabetes retinal edema; scutellarin; protein kinase C β ; vascular endothelial growth factor; streptozotocin; blood-retinal barrier

糖尿病黄斑水肿(diabetic macular edema, DME)是高血糖环境下黄斑区血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)受损所导致的。黄斑区生成的水肿液压迫神经元,从而引起糖尿病患者视力丧失^[1-2]。而视网膜水肿是由于液体聚集在视网膜组织间隙中,在液体的压力下,神经细胞变性、坏死,加重组织缺血缺氧,损伤糖尿病患者的视功能。报道显示,糖尿病视网膜病变患者并发黄斑水肿的概率为2.7%~11%,其发病主要受糖尿病病程、血压以及糖化血红蛋白指数的影响^[3]。现阶段,欧洲视网膜专家协会指出DME的治疗主要以激光光凝治疗、抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)药物治疗、激素治疗和手术治疗为主。其中,抗VEGF药物的注射是目前的一线治疗方式,在提高视力、减轻黄斑水肿方面有效^[4],但其价格昂贵、周期长、需反复注射,并且会带来肾功能异常、血栓性微血管病变的风险,使得黄斑水肿患者在寻求治疗过程中望而却步^[5-6]。

糖尿病视网膜水肿的病理过程可概括为长期的

糖代谢紊乱下视网膜缺血、缺氧,糖基化终末产物(advanced glycosylation end product, AGE)与糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)结合发挥生物效应,同时高糖环境促使二酰甘油(diacylglycerol, DAG)水平的增高,激活蛋白激酶C(protein kinases C, PKC)^[7]。其中,蛋白激酶C β (PKC β)的活化被证实是糖尿病微血管病变的关键蛋白^[8]。同时,PKC通路能改变一氧化氮生物利用度、调控血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达,影响血管张力和通透性,导致内皮细胞损伤^[9]。另一方面,VEGF通过增加紧密连接蛋白的磷酸化促进内皮细胞繁衍增殖,造成BRB损伤,大大增加了血管的通透性,加快了大分子物质渗漏进入视网膜组织间,使积液聚集于视网膜内核层与外丛状层间,最终导致视网膜组织细胞间水肿^[10]。

近年来,中医药在治疗糖尿病视网膜水肿中颇有成就,具有改善视网膜微循环、减轻毛细血管通透性、减少微血管瘤数量的作用,可下调VEGF表达以

保护 BRB^[11]。前期研究发现,运用活血化瘀类中药可改善糖尿病视网膜病变患者眼底微循环,抑制炎症反应,以保持 BRB 的完整性和稳定性,抑制新生血管的生长^[12]。具有活血化瘀功能的中药灯盏花属于菊科飞蓬属的生草本植物,首载于《滇南本草》:“灯盏花……左瘫右痪,风湿疼痛……”^[13]主要应用于跌打损伤,具有活血止痛的作用。现代药理学发现,灯盏花素是从灯盏花中提取出的黄酮类有效成分,可以增加血流量,改善微循环,扩张血管,降低血液黏度,并在治疗糖尿病心肌病、糖尿病肾病、视网膜病变等方面卓有成效^[14]。本研究通过建立链脲霉素(streptozotocin, STZ)联合高糖高脂饮食诱导 SD 大鼠糖尿病模型,并结合光学相干断层成像术(optical coherence tomography, OCT)以及 HE 染色检测视网膜水肿程度,对灯盏花素减轻糖尿病视网膜水肿、潜在靶点蛋白及 BRB 的保护作用进行系统研究,为进一步临床实验提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只,鼠龄 8~10 周,体重(180±20) g,由湖南中医药大学 SPF 级动物中心提供。动物分笼饲养于湖南中医药研究院动物中心实验室,饲养温度 24~26 ℃,湿度 50%~70%。进行为期 1 周的适应性喂养,然后将 SD 大鼠随机分成正常组和造模组。本研究实验动物及条件符合国家科学技术委员会的《实验动物管理条例》相关规定,由湖南省中医药研究院动物实验福利伦理审查委员会批准(伦理审批号:2020-0061)。

1.2 主要试剂

羟苯磺酸钙(商品名:安多明,贵州天安药业股份有限公司,批号 H20010481);STZ、Tris(美国 Sigma 公司,批号:08E221108、V900483);灯盏花素(广州彼迪药业有限公司,批号:Z44023596);柠檬酸、柠檬酸钠(上海展云化工有限公司,批号:20201105、20210119)。HE 染色液、PBS(7.2~7.6)、枸橼酸盐缓冲液(Wellbio,批号:05A210219、11A210301、01A210302);RIPA 裂解液(中国上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0013B);APS、吐温-20(国药集团上海有限公司,批号:10002618、30189328);SDS(中国大连美伦生物技术有限公司,批号:MB2479);TEMED(中国上海阿

拉丁生化科技股份有限公司货号,批号:T105497);VEGF 抗体、PKC β 抗体、 β -actin 抗体、occludin 抗体、HRP 山羊抗鼠 IgG、HRP 山羊抗兔 IgG(美国蛋白技术集团公司,批号:19003-1-AP、12919-1-AP、66009-1-Ig、27260-1-AP、SA00001-1、SA00001-2);Claudin-5 抗体(赛默飞世尔科技有限公司,批号:35-3500)。

1.3 主要仪器

光学相干断层扫描仪(德国海德堡公司,型号:Spec-CAM-05529-S2000);台式冷冻离心机(中国湖南湘仪实验仪器开发有限公司,型号:H1650R);全自动酶标洗板机、多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司,型号:PW-812、MB-530);电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器有限公司,型号:DHP-500);电泳仪、转膜仪、电泳槽(中国北京六一生物科技有限公司,型号:DYY-6C、DYCZ-40D、DYCZ-24DN);旋涡混合器、摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司,型号:GL-88B、TS-1)。

2 方法

2.1 糖尿病大鼠模型的制备

36 只 SD 雄性大鼠自由饮水饮食,适应性喂养 1 周后,禁食 14 h 后称重编号,随机分为正常组($n=9$)和造模组($n=27$)。造模组使用高脂高糖饲料(饲料为湖南中医药研究院动物实验中心提供)喂养 2 周,大鼠每天摄入饲料 30~40 g,控制其食量。待 2 周后,空腹 12 h 后称重编号,按 30 mg/kg 剂量一次性腹腔注射 STZ,正常组腹腔注射等量的生理盐水。STZ 腹腔注射 72 h 后取尾静脉血测 SD 大鼠空腹血糖,测得血糖稳定在 16.7 mmol/L 并表现为多饮、多食、多尿者则为建立糖尿病大鼠模型成功^[15]。若大鼠血糖<16.7 mmol/L,则追加注射等剂量 STZ,从模型建立成功 1 周后开始计算病程。

2.2 糖尿病视网膜水肿模型的制备与分组

自糖尿病模型造模开始时,每 4 周选择 1 只正常组大鼠与 1 只造模组大鼠,HE 染色观察大鼠视网膜是否存在组织紊乱不均的情况,并发现视网膜厚度高于(209.78±3.62) μm 即为造模成功^[16]。8 周时确认造模成功后,将糖尿病视网膜水肿大鼠随机分为模型组 9 只、安多明组 9 只、灯盏花素组 9 只。模型组大鼠给予 10 mL·kg⁻¹ 生理盐水灌胃。根据人与大

鼠体表面积换算,人的临床剂量换算为大鼠等效剂量灌胃安多明 $0.09 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,灯盏花素组给予 0.002 g/kg ,按 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃给药,均治疗 4 周。实验过程死亡大鼠严格按照上述造模方式补齐。

2.3 指标检测

2.3.1 大鼠的一般情况 观察大鼠的饮食情况、体质量、精神状态。造模前 1 周,造模后 2、4、8 周,以及用药后的 1、2、4 周后的早上,称取大鼠体质量、空腹血糖并记录。

2.3.2 HE 染色观察造模前后视网膜结构变化 正常组以及模型组的大鼠分别在造模后 4、8 周各处死 1 只,进行眼球的取材,然后进行 HE 染色,具体步骤如下:蒸馏水冲洗视网膜组织 10 min,PBS 返蓝;伊红染 3~5 min,蒸馏水冲洗;梯度乙醇(95%~100%)脱水,60 °C 烤片 1~2 h;切片脱蜡至水;二甲苯中放切片约 10 min,2 次,然后依次在 100%、100%、95%、85%和 75%乙醇中,每级放置 5 min。再用蒸馏水浸洗 5 min;苏木素染色 5 min。取出后置于二甲苯维持 10 min,2 次,中性树胶封片、显微镜观察。用药 4 周后以同法对各组视网膜结构进行 HE 染色。应用同法处理造模后大鼠的肾脏组织,观察其变化。

2.3.3 OCT 观察视网膜厚度变化 造模开始之前,麻醉机吸入 2 mL/L 异氯烷麻醉,符大鼠全身麻醉成功后,并用复方托吡卡胺滴眼液扩瞳,然后玻璃酸钠滴眼液滴眼,保持大鼠角膜湿润状态。待老鼠反应迟缓后,包裹全身,暴露待检鼠眼,用 OCT 对各组大鼠进行眼底检查。进行 OCT 检查时测量距离视盘上方、下方、鼻侧、颞侧 4 个方向 2 个视盘直径(disc diameter, DD)处的视网膜厚度(视网膜内界膜至视网膜色素上皮高反射层)并记录,检查完予以盐酸左氧氟沙星眼用凝胶预防角膜干燥。使用检测系统的自带软件手动测量视网膜厚度。于用药前(造模后 8 周)及用药 4 周后,以同法对各组进行 OCT 检查,观察视网膜厚度变化。

2.3.4 Western blot 检测 VEGF、PKC β 蛋白表达 分离眼后节视网膜组织,用 PBS 洗浴 1 次,制备 10% 分离胶及 4.8% 浓缩胶,取待测蛋白样本 80 μL 进行凝胶电泳。用 10% PAGE 负载蛋白,然后将其转移至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶进一步封闭 PVDF 膜,膜与

特异性一抗 VEGF、PKC β ,4 °C 杂交过夜。次日放置 30 min 后,加入兔抗大鼠 VEGF 一抗(1:1 000)、兔抗大鼠 PKC β 一抗(1:500)和小鼠抗大鼠 β -actin 一抗(1:5 000)孵育 90 min,结束后用 PBS 液冲洗 3 次。用 TBST 洗后将 PVDF 膜放入装有 HRP 标记的山羊抗鼠二抗(1:5 000)、山羊抗兔二抗(1:6 000)孵育 90 min,然后用 TBST 洗 3 次,每次 15 min。使用 ECL 化学发光液与膜孵育 1 min,用滤纸吸尽液体,用塑封膜将膜包裹杂交膜,在暗盒内与 X 胶片曝光 5~20 min;显影冲洗。并使用 Image J 软件进行分析,蛋白表达量以目的蛋白灰度值与 β -actin 灰度值的比值表示。

2.3.5 ELISA 法检测 VEGF、PKC β 含量 全麻下分离腹主动脉采血,用肝素抗凝管采血。将室温血液自然凝固 10~20 min,离心约 20 min(3 000 r/min),取上清液进行检测;或进行分装,并将标本放于 -20 °C 或 -80 °C 保存,禁止反复冻融。解冻后的样品应再次离心,然后依据试剂盒步骤检测 VEGF、PKC β 的表达量。

2.3.6 免疫组织化学检测 claudin-5、occludin 蛋白表达水平 采用两步法,眼球组织标本(取 3 只大鼠标本)石蜡包埋,制成 4 μm 常规切片,脱蜡及梯度脱水后,经 3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性,高压修复抗原后,滴加兔抗鼠 occludin、小鼠抗大鼠 claudin-5 抗体(稀释浓度分别为 1:100、1:100)置于湿盒,4 °C 冰箱过夜。次日复温后滴加抗-兔、兔-IgG 抗体-HRP 多聚体,于 37 °C 温箱孵育 30 min。经 DAB 显色,苏木素复染,二甲苯透明封片。所有切片用滨松 Nano Zoomer 2.0RS 扫描成像,每个切片图像 400 倍放大后截取 3 个视野,采用 IPP 6.0 进行图像分析,分析结果为总光密度,取平均值为蛋白表达强度。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计处理,两组进行比较,满足正态分布及方差齐性,采用独立样本 t 检验;否则采用秩和检验。多组数据进行比较时,满足正态分布及方差齐性,采用方差分析;否则采用 *Kruskal-Wallis* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况变化

注射 STZ 后,模型组、安多明组及灯盏花素组的大鼠大鼠体质量增长缓慢,并有体质量下降趋势。在造模后 2、4、8 周以及给药后 1、2、4 周,与空白组对比,模型组、安多明组、灯盏花素组体质量增长较慢($P<0.01$);在给药后 1 周,与模型组对比,安多明组体质量增长较少($P<0.05$);在给药后 2 周,与安多明组对比,灯盏花素组体质量增长较多($P<0.01$);在给药后 4 周,与模型组、安多明组对比,灯盏花素组体质量增长较多($P<0.01$)(图 1)。注射 STZ 后,与空白组对比,其他组大鼠血糖 >16.7 mmol/L(图 2)。在造模后 2、4、8 周以及给药后 1、2、4 周,与正常组对比,模型组、安多明组、灯盏花素组血糖显著升高($P<0.01$)。在给药后 2 周,与模型组对比,灯盏花素组血糖降低($P<0.05$)(图 2)。

3.2 视网膜形态组织学改变

4 周后正常组大鼠视网膜层间结构清晰,排列整齐致密(图 3A);而造模 4 周后造模组视网膜结构较为疏松(图 3B);造模 8 周后造模组细胞排列紊乱,可见明显疏松,数目减少,内界膜、神经纤维层、内外核状层肿胀,细胞呈空泡样改变(图 3D);而正常组未见明显的异常(图 3C)。

用药 4 周后,与正常组对比,模型组可见视网膜神经节细胞呈空泡样改变,内丛状层、外丛状层排列

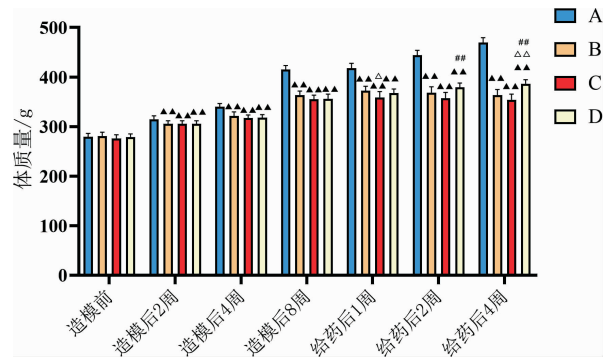


图 1 大鼠体质量变化图($\bar{x}\pm s, n=9$)

注:A.正常组;B.模型组;C.安多明组;D.灯盏花素组;与正常组比较,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与安多明组比较,## $P<0.01$ 。

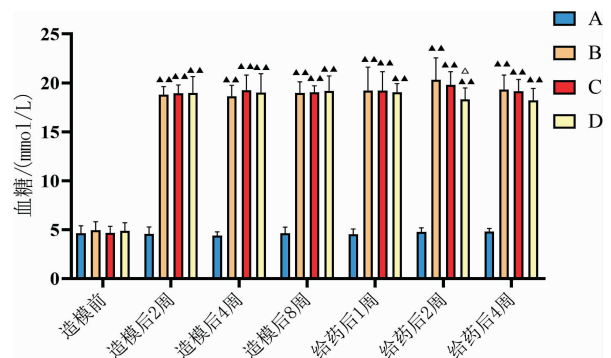


图 2 大鼠血糖浓度变化图($\bar{x}\pm s, n=9$)

注:A.正常组;B.模型组;C.安多明组;D.灯盏花素组。与正常组比较,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$ 。

紊乱,内核层、外核层细胞密度减少,排列疏松(图 4B)。安多明组视网膜神经节细胞仍呈空泡样改变,内核层、外核层的水肿未见明显改变(图 4C)。灯盏花素组视网膜结构较安多明组紧密,层间水肿不明显,层次结构清晰(图 4D)。

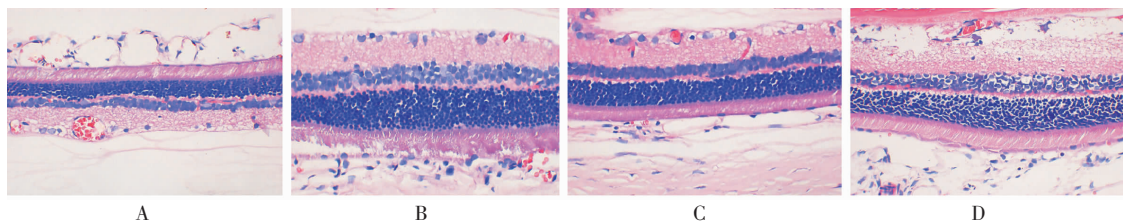


图 3 造模后正常组与造模组的 HE 染色图($\times 400$)

注:A.正常组 4 周;B.造模组造模后 4 周;C.正常组 8 周;D.正常组造模后 8 周。

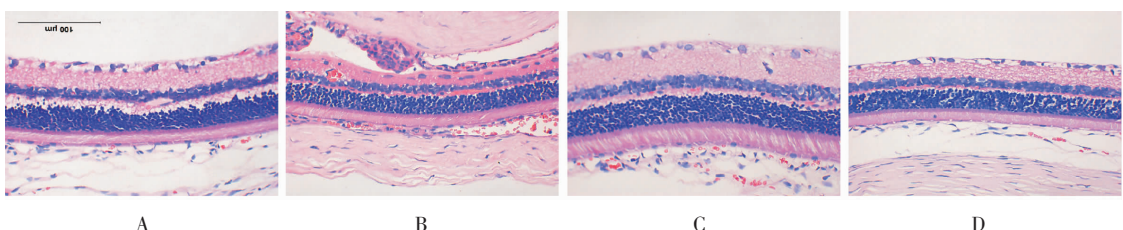


图 4 用药 4 周后各组的 HE 染色图($\times 400$)

注:A.正常组;B.模型组;C.安多明组;D.灯盏花素组。

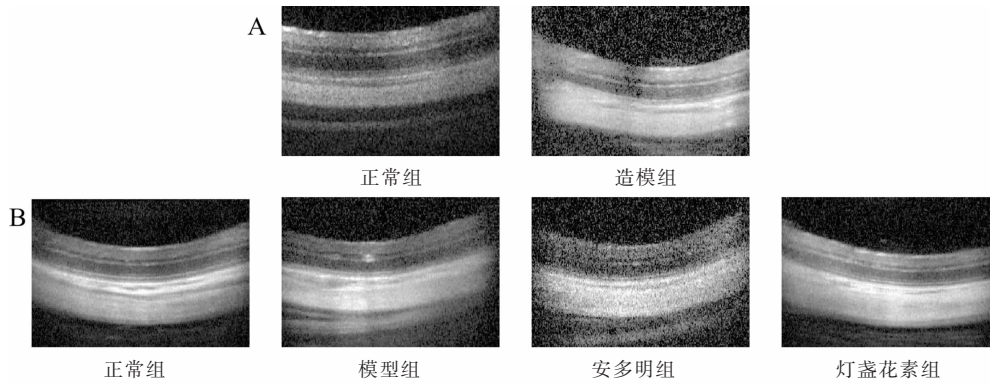


图5 用药前后视网膜厚度 OCT 对比

注:A.用药前 OCT;B.用药后 OCT。

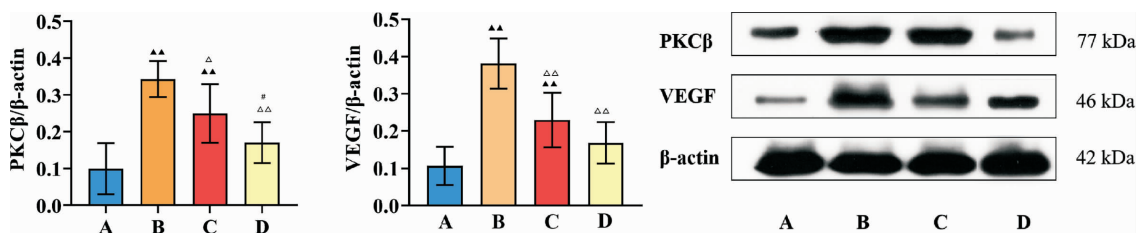


图6 各组视网膜组织 PKCβ、VEGF 的表达情况 ($\bar{x}\pm s$)

注:A.正常组;B.模型组;C.安多明组;D.灯盏花素组。与正常组比较, $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$;与模型组比较, $\triangle P<0.01$, $\triangle\triangle P<0.01$;与安多明组比较, $*P<0.05$ 。

3.3 各组视网膜厚度变化

给药前,与正常组对比,模型组视网膜厚度增加 ($P<0.01$),表明出现视网膜水肿(图 5A)。给药后,安多明组、灯盏花素组与模型组对比,视网膜厚度均下降 ($P<0.01$)(图 5B2—4)。给药 4 周后,灯盏花素组大鼠视网膜厚度接近于正常水平(表 1)。由于后期部分大鼠出现白内障或屈光间质不清,故 OCT 检查成像模糊或窥不清。

表 1 各组大鼠给药前后视网膜厚度比较 ($\bar{x}\pm s, \mu\text{m}$)

组别	n	给药前	给药后
正常组	9	198±3.53	200.89±3.00
模型组	9	218.33±2.58 $\blacktriangle\blacktriangle$	220.44±4.47 $\blacktriangle\blacktriangle$
安多明组	9	219.77±4.94 $\blacktriangle\blacktriangle$	213.11±4.63 $\blacktriangle\blacktriangle\triangle\triangle$
灯盏花素组	9	218.67±2.71 $\blacktriangle\blacktriangle$	209.78±3.08 $\blacktriangle\blacktriangle\triangle\triangle$
F 值		61.701	35.11
P 值		$P<0.01$	$P<0.01$

注:与正常组比较, $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$;与模型组比较, $\triangle\triangle P<0.01$ 。

3.4 Western blot 检测视网膜 PKCβ、VEGF 的表达情况

与正常组对比,模型组、安多明组视网膜组织中 PKCβ、VEGF 水平显著升高 ($P<0.01$);与模型组相比,安多明组、灯盏花素组的 PKCβ、VEGF 水平显著

降低 ($P<0.05, P<0.01$),其中安多明组 PKCβ 差异有统计学意义 ($P<0.05$),安多明组 VEGF 水平和灯盏花素组的 PKCβ、VEGF 水平差异具有显著统计学意义 ($P<0.01$);与安多明组相比,灯盏花素组 PKCβ 水平下降 ($P<0.05$)。详见图 6。

3.5 ELISA 检测血清 PKCβ、VEGF 的表达情况

与正常组对比,模型组、安多明组、灯盏花素组血清中 PKCβ、VEGF 水平显著升高 ($P<0.01$);与模型组相比,安多明组、灯盏花素组的 PKCβ、VEGF 水平显著降低 ($P<0.01$);与安多明组相比,灯盏花素组 PKCβ、VEGF 水平下降 ($P<0.05$)。详见图 7。

3.6 免疫组织化学法检测视网膜 claudin-5、occludin 的表达情况

给药 4 周后,模型组的组内界膜、色素上皮层、内外丛状层细胞胞浆中 claudin-5 的染色较浅,且视网膜组织排列紊乱,结构稀疏,安多明组染色与模型组相比相对较深。灯盏花素组的视网膜组织 claudin-5、occludin 表达呈阳性,排列相对整齐,结构致密。与正常组对比,模型组、安多明组及灯盏花素组视网膜组织中 claudin-5、occludin 水平显著降低 ($P<0.01$);与模型组相比,安多明组的 claudin-5、occludin

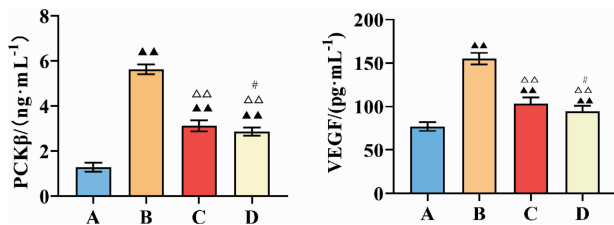


图7 各组血清 PKC β 、VEGF 的表达情况($\bar{x}\pm s$)

A.正常组;B.模型组;C.安多明组;D.灯盏花素组。与正常组对比,▲▲ $P<0.01$;与模型组对比,△△ $P<0.01$;与安多明组比较,# $P<0.05$ 。

水平升高($P<0.05$)。与模型组对比,灯盏花素组的 occludin 水平显著升高($P<0.01$),claudin-5 水平升高($P<0.05$)。详见图 8 和表 2。

4 讨论

在糖尿病视网膜病变发展过程中由于血管通透性的改变,液体聚集在有限空间内,使得视网膜外丛状层形成囊样改变,导致黄斑水肿的发生。DME 的发生机制尚未阐明,其本质是视网膜毛细血管内皮细胞受损,内皮细胞通透性增大,使得血-视网膜屏障功能破坏,涉及氧化应激、炎性因子及 VEGF 的积累,从而加重黄斑区水肿^[17-18]。PKC 是 VEGF 促进血管形成的信号转导分子,可增加血管内皮细胞通透性,改变视网膜血管血流状态。当机体处于糖代谢紊乱情况,视网膜血管组织的 DAG 水平升高,从而激活 PKC 及下游多条通路,改变血管通透性、促进血管生成及细胞因子反应^[19];AGE 与 RAGE 受体相互作用可激活 PKC^[20];活性氧激活 PARP 并与己糖胺和 PKC 通路共同作用,促进氧化应激反应,诱发慢性炎症损害^[21]。研究表明,PKC 参与细胞生长与分化相关的基因表达的调控,在 DME 的发展过程中发挥重要作用,PKC β 抑制剂的应用能有效降低患者致

表2 各组大鼠视网膜 claudin-5、occludin 的表达情况($\bar{x}\pm s$)

组别	n	claudin-5	occludin
正常组	3	0.027 5 \pm 0.003 4	0.149 5 \pm 0.008 0
模型组	3	0.009 1 \pm 0.000 7▲▲#	0.052 0 \pm 0.002 0▲▲
安多明组	3	0.014 1 \pm 0.001 0▲▲▲	0.088 8 \pm 0.021 4▲▲▲
灯盏花素组	3	0.014 1 \pm 0.001 7▲▲▲	0.102 0 \pm 0.014 2▲▲▲▲
F 值		69.62	32.45
P 值		<0.01	<0.01

注:与正常组比较,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与安多明组比较,# $P<0.05$ 。

盲率,缓解视网膜水肿^[22-23],因此,PKC β 抑制剂广泛应用于治疗糖尿病诱发的黄斑及视网膜水肿。

VEGF 是最强的促血管生长因子,其表达水平与微血管形成数呈正相关,广泛存在于玻璃体、视网膜中,正常情况下,促进血管生成因子与抑制血管生成因子相互协调,使机体达到平衡状态^[24]。若个体长期处于糖代谢紊乱状态,正常的机体功能受损后激活 PKC,活化的 PKC 介导 VEGF 生成,促使血管生成因子占据主导地位,抑制紧密连接的表达^[25-26]。生长因子会介导血管通透性增大,紧密连接结构变得紊乱无序,因此,VEGF 是破坏 BRB 的重要介质,具诱发视网膜水肿、血管渗漏的元凶^[27]。

BRB 正常功能的发挥主要依赖于紧密连接蛋白的完整性,claudin-5、occludin 及 ZO-1 是 3 种研究最为广泛的紧密连接蛋白。其中 occludin 及 claudin 为跨膜蛋白,同时具有胞内环和胞外环,胞外环通过“拉链”状形式连接细胞并产生细胞旁封闭,与胞内 ZO 蛋白共同形成紧密连接,参与维持和调节极性细胞的屏障功能^[28]。而 STZ 诱导下会使得糖尿病大鼠视网膜 claudin-5、occludin、ZO-1 蛋白减少,微血管通透性增大,破坏 BRB 的屏障功能^[15,29]。实验研

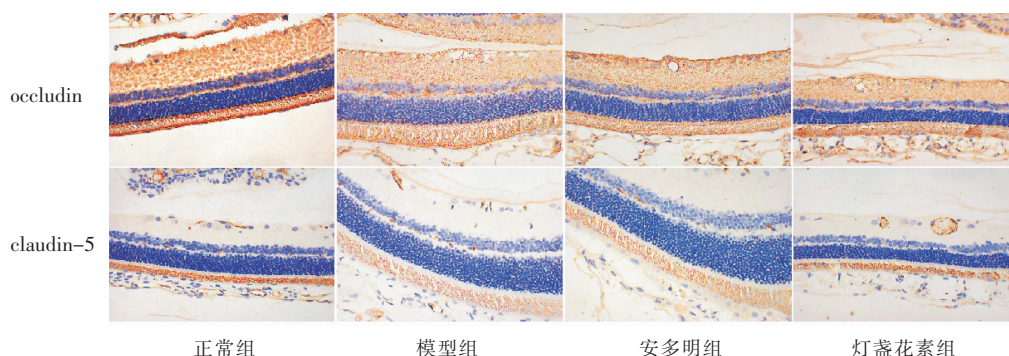


图8 各组大鼠视网膜 claudin-5 与 occludin 的表达情况

究表明,玻璃体腔注射 VEGF 抑制剂能有效抑制 claudin-5、occludin 的表达下调,保护 SD 大鼠的 BRB 功能^[30]。可见,糖尿病视网膜水肿的发生可能与高糖环境下激活 PKC 信号通路相关,活化的 PKC 介导 VEGF 上调,VEGF 磷酸化紧密连接蛋白进一步破坏 BRB,通过阻断 PKC 的激活可以减少水肿的发生。

临床研究与实验研究显示,灯盏花素具有较强的抗新生血管的作用,能有效增加血流量,扩张血管,降低血液黏度,抑制血小板聚集和血栓形成^[31],同时也扮演着 PKC 抑制剂的重要角色^[32],为糖尿病微血管病变的治疗开辟新思路。灯盏花素能调控人视网膜色素上皮细胞 VEGF 及其受体 VEGFR2 下游相关蛋白,阻止丝裂原活化蛋白激酶通路的激活^[33],通过抑制 p-ERK、p-FAK 和 p-Src 蛋白的表达^[34],发挥抑制新生血管的作用,阻止糖尿病视网膜病变进一步发展,减少黄斑水肿、出血、渗出的风险。

本研究通过 STZ 联合高糖高脂饲料诱导 DM 大鼠模型,并于造模后 4、8 周联合 OCT、HE 染色观察视网膜水肿的情况,用药后观察灯盏花素对 STZ 诱导糖尿病视网膜水肿大鼠视网膜组织的影响。本实验结果显示,与模型组对比,用药后视网膜组织以及血清中 VEGF、PKC β 的表达量不同程度下降,视网膜组织中 occludin、claudin-5 水平上调,视网膜水肿得到不同程度缓解,以灯盏花素组最为明显,说明灯盏花素可能通过下调 VEGF、PKC β 的表达水平,同时上调 claudin-5、occludin 的表达以保护 BBB。

综上所述,灯盏花素可以通过影响 VEGF、PKC β 的表达量以抑制新生血管的形成,保护 BBB,改善视网膜水肿。灯盏花素可增加微循环,改善血管通透性,调整 PKC β 、VEGF 与紧密连接相关蛋白的平衡,是灯盏花素治疗糖尿病视网膜水肿的作用机制之一,这对于今后深入研究糖尿病视网膜水肿打下坚实的基础。本实验对象仅限于动物,而且关于糖尿病视网膜水肿的生成因素只考虑了 PKC-VEGF 通路的某些蛋白,实际上其发病机制繁杂,涉及多种通路及细胞因子,是多种因素相互作用的结果。灯盏花素对 STZ 诱导的视网膜水肿及 VEGF、PKC β 蛋白的调控具体机制亟待进一步深入研究。

参考文献

- [1] YOSHIDA S, MURAKAMI T, NOZAKI M, et al. Review of clinical studies and recommendation for a therapeutic flow chart for diabetic macular edema[J]. *Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, 2021, 259(4): 815-836.
- [2] 王红燕,朱卫华,刘小峰. 补阳还五汤加减联合激光治疗糖尿病性黄斑水肿临床研究[J]. *陕西中医*, 2021, 42(7): 896-899.
- [3] BROWNING D J, STEWART M W, LEE C. Diabetic macular edema: Evidence-based management[J]. *Indian Journal of Ophthalmology*, 2018, 66(12): 1736-1750.
- [4] 邵毅,周琼. 糖尿病视网膜病变诊治规范: 2018 年美国眼科学会临床指南解读[J]. *眼科新进展*, 2019, 39(6): 501-506.
- [5] ZHAO Y, SINGH R P. The role of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) in the management of proliferative diabetic retinopathy[J]. *Drugs in Context*, 2018, 7: 212532.
- [6] DARCHE M, COSSUTTA M, CARUANA L, et al. Antagonist of nucleolin, N6L, inhibits neovascularization in mouse models of retinopathies[J]. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2020, 34(4): 5851-5862.
- [7] XU J, CHEN L J, YU J, et al. Involvement of advanced glycation end products in the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 2018, 48(2): 705-717.
- [8] ALSHAMMARI R A, ALEANIZY F S, ALDARWESH A, et al. Retinal delivery of the protein kinase C- β inhibitor ruboxistaurin using non-invasive nanoparticles of polyamidoamine dendrimers[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(7): 1444.
- [9] JIANG Y D, ZHANG Q H, STEINLE J J. Beta-adrenergic receptor agonist decreases VEGF levels through altered eNOS and PKC signaling in diabetic retina[J]. *Growth Factors*, 2015, 33(3): 192-199.
- [10] LALLY D R, SHAH C P, HEIER J S. Vascular endothelial growth factor and diabetic macular edema[J]. *Survey of Ophthalmology*, 2016, 61(6): 759-768.
- [11] 胡卓瑜,王莹,蒲玫伶,等. 基于气血水同治理论探讨黄斑水肿治疗[J]. *国际中医中药杂志*, 2022, 44(5): 582-585.
- [12] 胡卓瑜,王莹,蒲玫伶,等. 活血化瘀法对糖尿病视网膜病变血-视网膜屏障的保护作用及应用研究进展[J]. *河北中医*, 2021, 43(1): 162-165, 171.
- [13] 兰茂. 滇南本草[M]. 昆明: 云南人民出版社, 2017.
- [14] 徐丽娇,张旭,陈荣昌,等. 灯盏花素防治糖尿病并发的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(7): 218-224.
- [15] 陈向东,孙淑铭,聂辅娇,等. 链脲佐菌素诱导 Brown Norway

- 大鼠糖尿病视网膜病变模型的建立[J]. 中医药导报, 2018, 24(18): 15-19.
- [16] 孙伟, 林少芬, 李涛, 等. FFA 及 OCT 对 STZ 诱导的早期糖尿病大鼠视网膜的活体观察[J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(4): 318-323.
- [17] MATEOS-OLIVARES M, GARCÍA-ONRUBIA L, VALENTÍN-BRAVO F J, et al. Rho-kinase inhibitors for the treatment of refractory diabetic macular oedema[J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1683.
- [18] AMOAKU W M, GHANCHI F, BAILEY C, et al. Diabetic retinopathy and diabetic macular oedema pathways and management: UK Consensus Working Group[J]. *Eye*, 2020, 34(1): 1-51.
- [19] 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.
- [20] KANG Q Z, YANG C X. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications[J]. *Redox Biology*, 2020, 37: 101799.
- [21] TAURONE S, RALLI M, NEBBIOSO M, et al. The role of inflammation in diabetic retinopathy: A review[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2020, 24(20): 10319-10329.
- [22] 何跃, 陈洁, 吕红彬. 蛋白激酶 C- β 抑制剂 Ruboxistaurin 治疗糖尿病视网膜病变的研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(37): 3540-3542.
- [23] AL-ONAZI A S, AL-RASHEED N M, ATTIA H A, et al. Ruboxistaurin attenuates diabetic nephropathy via modulation of TGF- β 1/Smad and GRAP pathways[J]. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2016, 68(2): 219-232.
- [24] ALTIOK E I, SANTIAGO-ORTIZ J L, SVEDLUND F L, et al. Multivalent hyaluronic acid bioconjugates improve sFlt-1 activity in vitro[J]. *Biomaterials*, 2016, 93: 95-105.
- [25] 梁堂钰, 曾惠红, 江文良, 等. 不同抗 VEGF 注射液联合视网膜光凝术治疗糖尿病性黄斑水肿的疗效比较[J]. 解放军预防医学杂志, 2019, 37(4): 162-163.
- [26] KU Y H, CHO B J, KIM M J, et al. Rosiglitazone increases endothelial cell migration and vascular permeability through Akt phosphorylation[J]. *BMC Pharmacology & Toxicology*, 2017, 18(1): 62.
- [27] LELEY S P, CIULLA T A, BHATWADEKAR A D. Diabetic retinopathy in the aging population: A perspective of pathogenesis and treatment[J]. *Clinical Interventions in Aging*, 2021, 16: 1367-1378.
- [28] 刘求明, 朱杰, 郭晓红. 紧密连接的构成、装配及其调控研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2018, 48(3): 287-296.
- [29] 周进华, 解正高. 重组人血管内皮抑素对早期糖尿病大鼠视网膜屏障相关蛋白的影响[J]. 中华实验眼科杂志, 2020, 38(9): 740-745.
- [30] LIU X W, DREFFS A, DÍAZ-CORÁNGUEZ M, et al. Occludin S490 phosphorylation regulates vascular endothelial growth factor-induced retinal neovascularization[J]. *The American Journal of Pathology*, 2016, 186(9): 2486-2499.
- [31] GAO J L, CHEN G, HE H Q, et al. Therapeutic effects of breviscapine in cardiovascular diseases: A review[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8: 289.
- [32] JIANG W B, LI Z W, ZHAO W, et al. Breviscapine attenuated contrast medium-induced nephropathy via PKC/Akt/MAPK signalling in diabetic mice[J]. *American Journal of Translational Research*, 2016, 8(2): 329-341.
- [33] 王竞男, 杨立群, 邓宇斌. 灯盏花素对人视网膜色素上皮细胞和糖尿病大鼠视网膜 VEGF 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(5): 900-905.
- [34] LONG L L, LI Y B, YU S, et al. Scutellarin prevents angiogenesis in diabetic retinopathy by downregulating VEGF/ERK/FAK/src pathway signaling[J]. *Journal of Diabetes Research*, 2019, 2019: 4875421.

(本文编辑 苏维)