

·实验研究·

本文引用: 钟 缘, 蒋鹏飞, 赵 盼, 谭 诗, 彭 俊, 彭清华. 基于 PI3K/AKT 信号通路探讨益气养阴活血利水方抑制早期糖尿病视网膜病变大鼠微血管周细胞凋亡的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(11): 2024–2033.

基于 PI3K/AKT 信号通路探讨益气养阴活血利水方抑制早期糖尿病视网膜病变大鼠微血管周细胞凋亡的作用机制

钟 缘^{1,2}, 蒋鹏飞^{1,3}, 赵 盼^{1,2}, 谭 诗^{1,2}, 彭 俊^{2,3}, 彭清华^{1,3*}

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.湖南省中医药防治眼耳鼻喉咽喉疾病与视功能保护工程技术研究中心,湖南 长沙 410208

[摘要] **目的** 观察益气养阴活血利水方对早期糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)大鼠视网膜微血管周细胞中磷酸肌醇 3-激酶蛋白(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(phospho-alpha serine/threonine-protein kinase, AKT)信号通路相关因子表达的影响,探讨益气养阴活血利水方抑制早期 DR 视网膜微血管周细胞凋亡的作用机制。**方法** 138 只雄性 SPF 级 SD 大鼠随机分成空白组(等体积蒸馏水),模型组,羟苯磺酸钙组[150 mg/(kg·d)],益气养阴活血利水方低剂量组[6.2 g/(kg·d)],中剂量组[12.4 g/(kg·d)],高剂量组[24.8 g/(kg·d)],每组 23 只。除空白组外,各组均采用链佐菌素腹腔注射并维持 10 周高血糖状态,诱导早期 DR 大鼠模型。造模成功后给药 4 周,取大鼠眼球进行检测。采用 HE 染色观察视网膜病理变化,采用 TUNEL 染色检测大鼠视网膜微血管周细胞凋亡,采用免疫组织化学及 RT-PCR 法检测 PI3K、AKT、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl2-associated X protein, Bax)、胱天蛋白酶-8(cysteine aspartic acid specific protease-8, Caspase-8)、胱天蛋白酶-3(cysteine aspartic acid specific protease-3, Caspase-3)、细胞凋亡死亡激动剂 BID 蛋白(apoptotic death agonist BID protein, Bid)在视网膜微血管周细胞中的蛋白和 mRNA 表达水平。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠血糖显著升高($P<0.01$),体质量显著降低($P<0.01$),视网膜层次结构不清,各层细胞排列疏松,可见大量凋亡细胞,视网膜中 PI3K、AKT mRNA 表达水平下降($P<0.01$),视网膜细胞凋亡数及 Bax、Caspase-8、Caspase-3、Bid mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$)。与模型组比较,益气养阴活血利水方中剂量、高剂量组大鼠血糖均降低($P<0.01$);羟苯磺酸钙组、益气养阴活血利水方各剂量组大鼠体质量均升高($P<0.01$);益气养阴活血利水方各剂量组大鼠视网膜组织层次结构较清楚,细胞排列相对紧密,视网膜微血管周细胞凋亡数下降($P<0.05$);益气养阴活血利水方高剂量组大鼠视网膜微血管周细胞中 PI3K、AKT 蛋白和 mRNA 表达水平均明显升高($P<0.01$),Bax、Caspase-8、Caspase-3、Bid 蛋白和 mRNA 表达水平均明显下降($P<0.05$)。**结论** 益气养阴活血利水方可能通过调控 PI3K/AKT 信号通路,上调 PI3K、AKT,下调 Bax、Caspase-8、Caspase-3、Bid 的表达,抑制早期 DR 大鼠视网膜微血管周细胞的凋亡,从而发挥其对早期 DR 视网膜微血管周细胞凋亡的保护作用。

[关键词] 糖尿病视网膜病变;益气养阴活血利水方;视网膜微血管周细胞;PI3K/AKT 信号通路;磷酸肌醇 3-激酶蛋白;丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.11.015

[收稿日期]2023-05-17

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(81804150);中医药防治五官科疾病湖南省重点实验室建设项目(2017TP1018);国家中医药管理局中医眼科学重点学科建设项目(ZK1801YK015);湖南省自然科学基金项目(2019JJ40226);湖南中医药大学中医学国内一流建设学科建设项目;中医药防治眼耳鼻喉咽喉疾病湖南省重点实验室;中医药防治眼病与视功能保护湖南省工程研究中心;湖南省教育厅科学研究优秀青年项目(19B430)。

[第一作者]钟 缘,女,硕士研究生,研究方向:中医药防治眼病研究。

[通信作者]* 彭清华,男,博士,二级教授,博士研究生导师,E-mail:pqh410007@126.com。

Mechanism of Yiqi Yangyin Huoxue Lishui Formula in inhibiting microvascular pericyte apoptosis in rats with early diabetic retinopathy

ZHONG Yuan^{1,2}, JIANG Pengfei^{1,3}, ZHAO Pan^{1,2}, TAN Shi^{1,2}, PENG Jun^{2,3}, PENG Qinghua^{1,3*}

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 Engineering Technology Research Center for Prevention & Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases and Visual Function Protection with Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] Objective To observe the effects of Yiqi Yangyin Huoxue Lishui Formula (YQYYHXLFSF) on the expressions of phosphoinositol 3-kinases (PI3K)/phospho- α serine/threonine-protein kinase (AKT) signaling pathway-related factors in retinal microvascular pericytes of rats with early diabetic retinopathy (DR), and to investigate the mechanism of YQYYHXLFSF in inhibiting apoptosis of retinal microvascular pericytes in early DR. **Methods** A total of 138 male SPF SD rats were randomized into blank (equal-volume distilled water), model, calcium dobesilate [150 mg/(kg·d)], low-dose [6.2 g/(kg·d)], medium-dose [12.4 g/(kg·d)], and high-dose [24.8 g/(kg·d)] YQYYHXLFSF groups, with 23 rats in each group. Except for the blank group, all groups were injected intraperitoneally with streptozotocin and maintained a hyperglycemic state for 10 weeks to induce early DR rat models. After successful modeling, the eyeballs of rats were tested after 4 weeks of administration. HE staining was used to observe the pathological changes of retina, and TUNEL staining was used to check the apoptosis of retinal microvascular pericytes. Immunohistochemistry and RT-PCR were taken to examine the protein and mRNA expression levels of PI3K, AKT, Bcl2 associated X protein (Bax), cysteine aspartic acid specific protease-8 (Caspase-8), cysteine aspartic acid specific protease-3 (Caspase-3) and apoptotic death agonist BID protein (Bid) in retinal perivascular pericytes. **Results** Compared with blank group, the rats in model group showed a significant increase in blood glucose ($P<0.01$), a significant decrease in body mass ($P<0.01$), unclear retinal hierarchy, loose cell arrangement in each layer with a large number of apoptotic cells visible. The mRNA expression levels of PI3K and AKT in retina were lower ($P<0.01$), while the number of apoptotic cells of retinal cells and the mRNA expression levels of Bax, Caspase-8, Caspase-3, and Bid were significantly higher ($P<0.05$). Compared with model group, the medium-dose and high-dose YQYYHXLFSF groups showed a decrease in the blood glucose levels of rats ($P<0.01$); the calcium dobesilate group and all the YQYYHXLFSF groups showed an increase in the body mass of rats ($P<0.01$); all the YQYYHXLFSF groups manifested clear retinal tissue hierarchical structure of rats, relatively close cell arrangement, and decreased the number of apoptotic cells of retinal microvascular pericytes ($P<0.05$); and the protein and mRNA expression levels of PI3K and AKT in retinal microvascular pericytes of rats in high-dose YQYYHXLFSF group were significantly higher ($P<0.01$), the protein and mRNA expression levels of Bax, Caspase-8, Caspase-3, and Bid were significantly lower ($P<0.05$). **Conclusion** YQYYHXLFSF may inhibit the apoptosis of retinal microvascular pericytes in early DR rats by regulating the PI3K/AKT signaling pathways, including upregulating the expressions of PI3K and AKT and downregulating those of Bax, Caspase-8, Caspase-3, and Bid, thus exert its protective effect.

[Keywords] diabetic retinopathy; Yiqi Yangyin Huoxue Lishui Formula; retinal microvascular pericytes; PI3K/AKT signaling pathways; phosphatidylinositol 3-kinases; phospho- α serine/threonine-protein kinase

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病中常见的微血管并发症,是机体持续糖代谢紊乱和微循环障碍在眼部的表现,是20~60岁劳动人群致盲的首要原因,也是世界范围内重要的致盲眼病^[1]。目前,DR的治疗方法主要包括视网膜激光治疗、激素治疗、玻璃体内注药及玻璃体切割手术等^[2],但这些治疗措施主要应用于晚期增生性DR。对于早期DR,目前临床上尚无疗效确切的治疗方案。

中医药治疗早期DR具有独到优势,彭清华教授认为目络阻滞、血水溢出脉外是早期DR发病的重要病理因素,气阴两虚、目络瘀滞、血水溢出脉外是重要病机,并针对该病机创制了益气养阴活血利水方^[3]。全方由黄芪、黄精、生地黄、墨旱莲、茯苓、蒲黄、蛭螭、葛根、益母草、车前子、甘草组成,共奏益气养阴、活血利水之功。前期研究表明,益气养阴活血利水方能减轻早期DR患者的临床症状,能提高视

力、减少微血管瘤、减少眼底出血渗出、改善毛细血管通透性、降低血液黏稠度,从而改善微循环^[4]。

早期 DR 最具特征的组织学改变是视网膜微血管周细胞的选择性丧失^[5],周细胞丧失引起血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)受损无法修复,故应重视 DR 的早期干预治疗。早期防治的关键在于减少微血管周细胞的丢失,防止无细胞新生血管的形成,阻止病情进展^[6]。多项研究发现,磷酸肌醇 3-激酶蛋白(phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(phospho-alpha serine/threonine-protein kinase, AKT) 信号通路在维持 BRB 完整性、抑制视网膜新生血管生成和调控视网膜微血管周细胞凋亡等方面发挥重要作用,与 DR 的发生与发展关系密切^[7-9]。本研究拟在前期研究基础上,进一步以 PI3K/AKT 信号通路及其下游凋亡蛋白为切入点,探讨益气养阴活血利水方治疗早期 DR 的作用机制,以期为治疗早期 DR 找到有效的候选药物。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 138 只,体质量(200±20) g,购自湖南中医药大学动物实验中心,实验动物质量合格证号:ZS-202106150022。实验动物购入后饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心,实验单位使用许可证号:SYXK(湘)2020-0005。自由饮食饮水,12 h 昼夜节律。实验经湖南中医药大学动物实验伦理委员会批准(LL2021061607)。

1.2 主要药物与试剂

益气养阴活血利水方组成:黄芪 20 g、生地黄 10 g、黄精 10 g、墨旱莲 10 g、蒲黄 10 g(包煎)、蛭螬 3 g(磨粉冲服)、葛根 10 g、茯苓 10 g、益母草 10 g、车前子 10 g、甘草 5 g。总药量为 108 g,为 50 kg 体质量成人量。由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供,按传统工艺煎煮一次,并浓缩成 85 mL 的混悬液,浓度为 1.27 g/mL;羟苯磺酸钙胶囊(贵州天安药业股份有限公司,规格 0.5 g/粒,国药准字:H20110031,批号:14201658642)。

链脲佐菌素(streptozocin, STZ)(北京索莱宝科技有限公司,批号:301V021);柠檬酸、柠檬酸三钠(上

海展云化工有限公司,批号:01B221210、03A221023);伊红、苏木精染液(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号:06K230425、11Q230210);蛋白酶抑制剂(中国北京金泰宏达公司,批号:583794);Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl2-associated X protein, Bax)、胱天蛋白酶-8(cysteine aspartic acid specific protease-8, Caspase-8)、胱天蛋白酶-3(cysteine aspartic acid specific protease-3, Caspase-3)、细胞凋亡死亡激动剂 BID 蛋白(apoptotic death agonist BID protein, Bid)、PI3K、AKT 抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:AC220112006、AC210828016、AC220128020、AC210823018、AC211015003、AC220122010);mRNA 逆转录试剂盒、miRNA 逆转录试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号:09623、25722);Trizol(美国 Thermo 公司,批号:3877101223);琼脂糖(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号:02C230423)。

1.3 主要仪器

电子天平(美国双杰,型号:JJ224BC);精密 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司,型号:PHS-3C);手术显微镜(苏州六六视觉科技股份有限公司,型号:YZ20T4);超薄切片机(中国浙江金华益迪医疗设备有限公司,型号:YD-315);包埋机(常州市中威电子仪器有限公司,型号:BMJ-A);实时荧光定量 PCR 仪、LD5-10B 低速离心机、荧光 PCR 板(美国 Thermo 公司,型号:PIKOREAL96,Fresco 17,TSPL0960);紫外可见分光光度计(上海 Spectrum 公司,型号:SP-752);台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650R);恒温水浴箱(河南金博仪器制造有限公司,型号:THH-S2)。

1.4 分组、造模及给药

SPF 级 SD 雄性大鼠 138 只,适应性饲养 7 d 后随机分成 6 组,空白组、模型组、羟苯磺酸钙组及益气养阴活血利水方低、中、高剂量组。每组 23 只,并进行编号。除空白组外,其余各组进行早期 DR 模型造模。

参照高玉等^[10]早期 DR 模型建立方法。除空白组外,其余各组均以 1% STZ 溶液按照 60 mg/kg 体质量腹腔注射,72 h 后尾静脉采血测定其空腹血糖值(每次测血糖前禁食过夜),血糖 ≥ 16.7 mmol/L 提示糖尿病模型造模成功,血糖不达标或死亡大鼠

予以剔除。空白组大鼠腹腔注射相同剂量的柠檬酸钠缓冲液。造模成功后,维持高血糖状态 10 周。检测大鼠血糖和体质量变化,每周检测 1 次。灌胃 4 周后再次测量,记录所有大鼠的血糖及体质量。

在模型组、羟苯磺酸钙组及益气养阴活血利水方低、中、高剂量组维持高血糖 10 周后,益气养阴活血利水方低、中、高剂量组予以不同浓度益气养阴活血利水方混悬液连续干预 4 周,每日灌胃 1 次。给药剂量计算方式参照《中医科研设计与统计学》^[11]中实验动物给药方法部分, $D_2=D_1 \times R_2/R_1$ (D_1 为 50 kg 成人的剂量(108 g),查表得 R_2 为 200 g 大鼠对应体表面积(7.040), R_1 为 50 kg 成人对应体表面积(307.00),计算得到 D_2 约为 12.4 g/(kg·d)。结合文献及实际给药合理性^[12],低剂量组、高剂量组以中剂量组的 1/2 倍、2 倍剂量给药,分别为 6.2、24.8 g/(kg·d)。空白组、模型组给予 3 mL 蒸馏水灌胃,羟苯磺酸钙组予羟苯磺酸钙 150 mg/(kg·d)灌胃治疗,实验过程中出现死亡的大鼠予以剔除并根据要求进行补充。

1.5 取材

药物干预 4 周后开始取材,以 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射后处死大鼠,取带有视神经的大鼠眼球,用 4%多聚甲醛固定 12 h 以上,于 -80 °C 液氮下冷冻储存。

1.6 指标检测

1.6.1 HE 染色观察视网膜组织形态结构 各组取材后,置于多聚甲醛固定,蔗糖脱水后置于石蜡中包埋,将包埋视网膜的石蜡块切成 4 μm 的切片,经二甲苯和梯度乙醇常规脱蜡至水,自来水冲洗,经苏木精初染 5 min 和伊红复染 4 min,中性树胶封片,光学显微镜下观察视网膜组织形态结构。

1.6.2 TUNEL 染色检测视网膜微血管周细胞凋亡

取大鼠眼球,将组织进行脱水、透明、浸蜡、包埋,制成石蜡切片,对其进行 TUNEL 染色。根据细胞凋亡检测试剂盒说明书,将切片进行脱蜡、润洗等步骤后,苏木精复染核,梯度乙醇脱水,二甲苯 15 min 透明,中性树胶封片,置于光学显微镜下观察并采集图像,凋亡细胞的阳性细胞核呈棕褐色,计数每平方毫米微血管周细胞凋亡数目。

1.6.3 免疫组织化学法检测视网膜血管 Bax、Caspase-8、Caspase-3、Bid、PI3K、AKT 表达 切片经脱

蜡、复水、通透及抗原修复后行标准的免疫组织化学染色,使用单克隆抗平滑肌肌动蛋白抗体标记周细胞。每张切片随机取 2 个视野,应用 MIAS 2000 型图像分析系统测定 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-8、PI3K 及 AKT 在视网膜血管周细胞的免疫反应强度(灰度值)。

1.6.4 RT-PCR 检测视网膜组织 Bax、Caspase-8、Caspase-3、Bid、PI3K、AKT mRNA 表达 取各组大鼠眼球,剥离视网膜,采用 Trizol 法提取总 RNA,通过逆转录制备 cDNA,聚合酶链反应扩增 cDNA。反应条件:95 °C 预变性 2 min,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s。Bax、Caspase-8、Caspase-3、Bid、PI3K、AKT 引物序列如下。Bax:正向 5'-ACGCATCCACCAAGAAGC-3',反向 5'-GCCACACGGAAGAAGACC-3';Caspase-8:正向 5'-CACCCGGACCAGAATACC-3',反向 5'-TGTTGCTGGTGAAGTGTG-CATT-3';Caspase-3:正向 5'-TTAATAAAGGTATCCATGGA-3',反向 5'-TTAGTGATAAAAATAGAGTT-3';Bid:正向 5'-TGGTCTCGGTGCTCTTGGA-3',反向 5'-CGTTGTTGGTCGGGATTTG-3';PI3K:正向 5'-AATGGCGACGATTTGCGG-3',反向 5'-CAGCCATAGGGGAGCATTCG-3';AKT:正向 5'-CAGACCCACGACCGCCTC-3',反向 5'-GACACAATCTCCGCACCGTAG-3';内参 β -actin:正向 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3',反向 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'。采用琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad 凝胶成像系统进行灰度扫描,分别记录 Bax、Caspase-8、Caspase-3、Bid、PI3K、AKT 及相应 β -actin 的光密度值(A),以 β -actin 为内参进行半定量,分析 Bax、Caspase-8、Caspase-3、Bid、PI3K、AKT mRNA 表达。

1.7 统计学方法

本实验数据采用 SPSS 26.0 统计软件进行处理。符合正态分布的计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用 t 检验;非正态分布的计量数据采用 Wilcoxon 秩和检验;计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 益气养阴活血利水方对大鼠体质量的影响

治疗前,与空白组比较,其余各组大鼠体质量均

明显降低($P<0.01$)。治疗 4 周后,与模型组比较,各用药组大鼠体质量均明显上升($P<0.01$);与羟苯磺酸钙组、益气养阴活血利水方低剂量组比较,益气养阴活血利水方中、高剂量组大鼠体质量明显增加($P<0.01$);与益气养阴活血利水方中剂量组比较,益气养阴活血利水方高剂量组大鼠体质量明显增加($P<0.01$)。详见表 1。

表 1 各组大鼠体质量比较($\bar{x}\pm s, g, n=23$)

组别	治疗前	治疗 4 周后
空白组	231.63±10.29	309.20±9.58
模型组	189.65±4.81**	204.97±6.62**
羟苯磺酸钙组	186.93±5.45**	217.05±9.08** [#]
益气养阴活血利水方低剂量组	186.65±7.98**	220.03±9.75** [#]
益气养阴活血利水方中剂量组	187.34±8.93**	231.62±8.99** [#] △□□
益气养阴活血利水方高剂量组	187.07±6.79**	245.70±9.04** [#] △□□■

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与羟苯磺酸钙组比较,△ $P<0.01$;与益气养阴活血利水方低剂量组比较,□ $P<0.01$;与益气养阴活血利水方中剂量组比较,■ $P<0.01$ 。

2.2 益气养阴活血利水方对大鼠血糖的影响

治疗前,与空白组比较,其余各组大鼠血糖明显升高($P<0.01$)。治疗 4 周后,与模型组比较,益气养阴活血利水方中、高剂量组血糖明显降低($P<0.01$);与羟苯磺酸钙组比较,益气养阴活血利水方中、高剂量组血糖明显降低($P<0.05$);与益气养阴活血利水方低剂量组比较,益气养阴活血利水方高剂量组血糖明显降低($P<0.05$)。详见表 2。

2.3 益气养阴活血利水方对大鼠视网膜组织结构的影响

空白组大鼠视网膜各层结构清晰,视网膜各层细胞连续,细胞核数量正常;模型组大鼠视网膜各层紊乱变性;羟苯磺酸钙组大鼠视网膜各层结构紊乱;益气养阴活血利水方低、中剂量组大鼠视网膜结构较模型组清晰;益气养阴活血利水方高剂量组大鼠

表 2 各组大鼠血糖比较($\bar{x}\pm s, \text{mmol/L}, n=23$)

组别	治疗前	治疗 4 周后
空白组	3.25±0.66	3.55±0.86
模型组	26.55±2.01**	26.03±2.64**
羟苯磺酸钙组	25.59±3.25**	26.14±1.69**
益气养阴活血利水方低剂量组	26.23±1.746**	25.09±1.26**
益气养阴活血利水方中剂量组	25.84±2.05**	23.85±1.96** [#] △
益气养阴活血利水方高剂量组	26.13±1.78**	22.49±2.09** [#] △□

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与羟苯磺酸钙组比较,△ $P<0.05$;与益气养阴活血利水方低剂量组比较,□ $P<0.05$ 。

视网膜连续,各层视网膜结构较清晰。详见图 1。

2.4 益气养阴活血利水方对大鼠视网膜周细胞凋亡的影响

空白组大鼠视网膜微血管未见明显周细胞凋亡;模型组大鼠视网膜可见大量周细胞凋亡,呈棕褐色;羟苯磺酸钙组及益气养阴活血利水方低、中剂量组大鼠视网膜周细胞凋亡数虽高于空白组,但较模型组有减少;益气养阴活血利水方高剂量组大鼠视网膜微血管周细胞凋亡数较模型组明显减少。详见图 2。

与空白组比较,模型组凋亡细胞数增加($P<0.05$);与模型组比较,各用药组凋亡细胞数减少($P<0.05$);与羟苯磺酸钙组比较,益气养阴活血利水方低、中、高剂量组凋亡细胞数减少($P<0.05$);与益气养阴活血利水方低、中剂量组比较,益气养阴活血利水方高剂量组凋亡细胞数减少($P<0.05$)。详见表 3。

2.5 益气养阴活血利水方对大鼠视网膜微血管周细胞中 PI3K、AKT 蛋白表达水平的影响

与空白组比较,模型组、羟苯磺酸钙组及益气养阴活血利水方低、中剂量组大鼠视网膜微血管周细胞中 PI3K、AKT 蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$);与模型组相比,益气养阴活血利水方低、中、高剂量

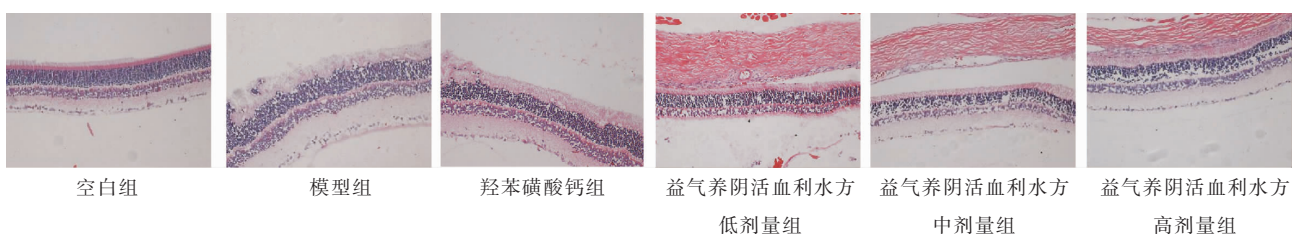


图 1 各组大鼠视网膜 HE 染色结果($\times 400$)

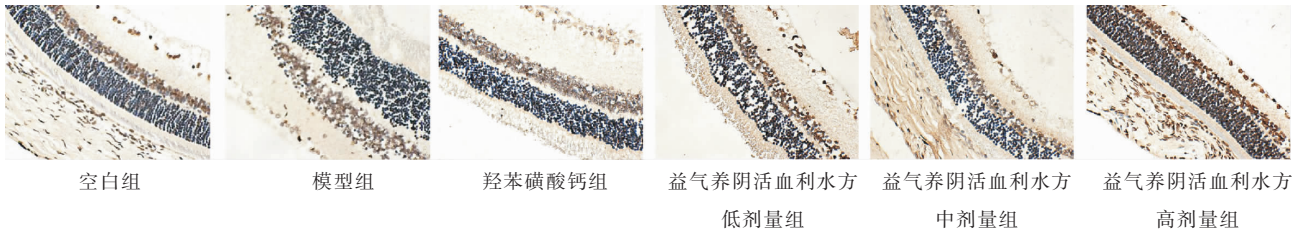


图2 各组大鼠视网膜 TUNEL 染色结果(×400)

表3 各组视网膜周细胞凋亡细胞数比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	凋亡细胞数/个
空白组	12.27±1.24
模型组	36.85±6.71*
羟苯磺酸钙组	30.56±8.42*#
益气养阴活血利水方低剂量组	26.27±7.21*#△
益气养阴活血利水方中剂量组	27.84±5.19*#△
益气养阴活血利水方高剂量组	19.56±4.33*#△□■

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与羟苯磺酸钙组比较,△ $P<0.05$;与益气养阴活血利水方低剂量组比较,□ $P<0.05$;与益气养阴活血利水方中剂量组比较,■ $P<0.05$ 。

组大鼠视网膜微血管周细胞中 AKT 蛋白相对表达量升高($P<0.01$),益气养阴活血利水方高剂量组大鼠视网膜微血管周细胞中 PI3K 蛋白相对表达量升高($P<0.01$);与益气养阴活血利水方低、中剂量组比较,益气养阴活血利水方高剂量组大鼠视网膜微血管周细胞中 AKT 蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$)。详见表 4、图 3—4。

表4 各组大鼠视网膜微血管周细胞 PI3K、AKT 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	PI3K	AKT
空白组	0.38±0.03	0.44±0.04
模型组	0.30±0.03*	0.29±0.04*
羟苯磺酸钙组	0.31±0.12*	0.32±0.11*
益气养阴活血利水方低剂量组	0.33±0.03*	0.36±0.03*#
益气养阴活血利水方中剂量组	0.33±0.05*	0.36±0.03*#
益气养阴活血利水方高剂量组	0.35±0.03*#	0.40±0.04*#□■

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.01$;与益气养阴活血利水方低剂量组比较,□ $P<0.05$;与益气养阴活血利水方中剂量组比较,■ $P<0.05$ 。

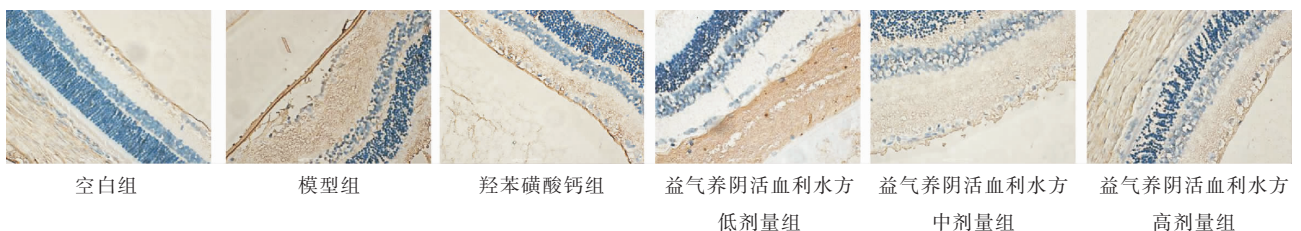


图3 各组大鼠视网膜 PI3K 表达情况(免疫组织化学,×400)

2.6 益气养阴活血利水方对大鼠视网膜微血管周细胞 PI3K、AKT mRNA 表达水平的影响

与空白组比较,模型组、羟苯磺酸钙组及益气养阴活血利水方低、中剂量组大鼠视网膜微血管周细胞 PI3K、AKT mRNA 相对表达量明显降低($P<0.01$);与模型组比较,羟苯磺酸钙组大鼠视网膜微血管周细胞 AKT mRNA 相对表达量升高($P<0.05$),益气养阴活血利水方低、中、高剂量组大鼠视网膜微血管周细胞中 PI3K、AKT mRNA 相对表达量明显升高($P<0.01$);与益气养阴活血利水方低、中剂量组比较,益气养阴活血利水方高剂量组大鼠视网膜微血管周细胞中 PI3K、AKT mRNA 相对表达量明显升高($P<0.05$)。详见表 5。

表5 各组大鼠视网膜微血管周细胞 PI3K、AKT mRNA 相对表达量比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	PI3K	AKT
空白组	0.54±0.21	1.59±0.46
模型组	0.12±0.03**	0.36±0.10**
羟苯磺酸钙组	0.14±0.05**	0.55±0.16**#
益气养阴活血利水方低剂量组	0.29±0.07*#	0.68±0.23*#
益气养阴活血利水方中剂量组	0.31±0.06*#	0.64±0.26*#
益气养阴活血利水方高剂量组	0.42±0.11*#□■	1.25±0.44*#□■

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,# $P<0.01$;与益气养阴活血利水方低剂量组比较,□ $P<0.05$;与益气养阴活血利水方中剂量组比较,■ $P<0.05$ 。

2.7 益气养阴活血利水方对大鼠视网膜微血管周细胞 Bax、Caspase-8、Caspase-3、Bid 蛋白表达水平的影响

与空白组比较,模型组、羟苯磺酸钙组及益气养

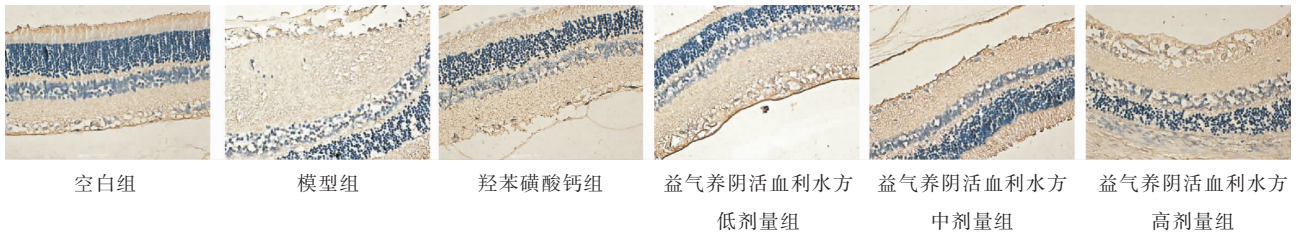


图 4 各组大鼠视网膜 AKT 表达情况(免疫组织化学,×400)

阴活血利水方低、中剂量组大鼠视网膜微血管周细胞 Bax、Bid 蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$),各用药组大鼠视网膜微血管周细胞 Caspase-8、Caspase-3 蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$);与模型组比较,羟苯磺酸钙组大鼠视网膜周细胞 Bid、Caspase-3 蛋白相对表达量降低($P<0.05$),益气养阴活血利水方低、中、高剂量组大鼠视网膜周细胞中 Bax、Caspase-8、Caspase-3、Bid 蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$);与益气养阴活血利水方低剂量组比较,益气养阴活血利水高剂量组大鼠视网膜微血管周细胞 Bax、Bid 蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$);与

益气养阴活血利水方中剂量组比较,益气养阴活血利水方高剂量组大鼠视网膜微血管周细胞中 Caspase-3 蛋白相对表达量明显下降($P<0.05$)。详见表 6、图 5—8。

2.8 益气养阴活血利水方对大鼠视网膜微血管周细胞 Bax、Caspase-8、Caspase-3、Bid mRNA 相对表达水平的影响

与空白组比较,其余各组大鼠视网膜微血管周细胞中 Bax、Caspase-8、Caspase-3、Bid mRNA 相对表达量明显升高($P<0.05$);与模型组比较,羟苯磺酸钙组大鼠视网膜微血管周细胞 Bax、Caspase-8 mRNA

表 6 各组大鼠视网膜微血管周细胞 Bax、Caspase-8、Caspase-3、Bid 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	Bax	Caspase-3	Caspase-8	Bid
空白组	0.31±0.02	0.30±0.02	0.29±0.03	0.28±0.04
模型组	0.42±0.02*	0.39±0.03*	0.44±0.04*	0.41±0.04*
羟苯磺酸钙组	0.38±0.06*	0.35±0.04*#	0.38±0.07*	0.36±0.03*#
益气养阴活血利水方低剂量组	0.35±0.03*#	0.35±0.04*#	0.36±0.03*#	0.37±0.03*#
益气养阴活血利水方中剂量组	0.36±0.06*#	0.37±0.03*#	0.35±0.07*#	0.37±0.06*#
益气养阴活血利水方高剂量组	0.32±0.02 [□]	0.33±0.03*# [■]	0.33±0.04*#	0.32±0.04 [□]

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与益气养阴活血利水方低剂量组比较,[□] $P<0.05$;与益气养阴活血利水方中剂量组比较,[■] $P<0.05$ 。

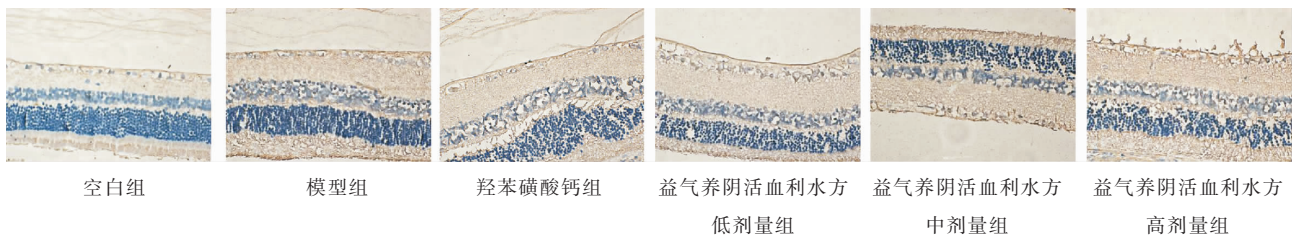


图 5 各组大鼠视网膜 Bax 表达情况(免疫组织化学,×400)

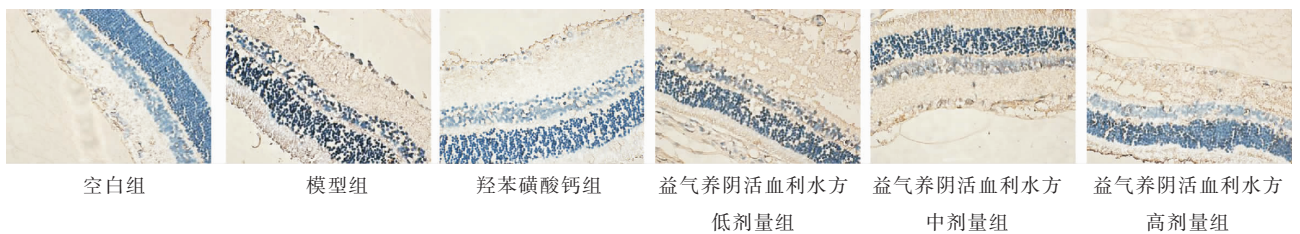


图 6 各组大鼠视网膜 Caspase-3 表达情况(免疫组织化学,×400)

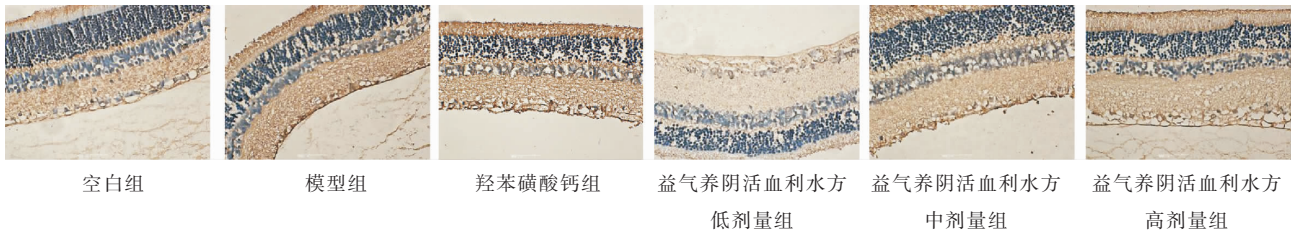


图7 各组大鼠视网膜 Caspase-8 表达情况(免疫组织化学,×400)

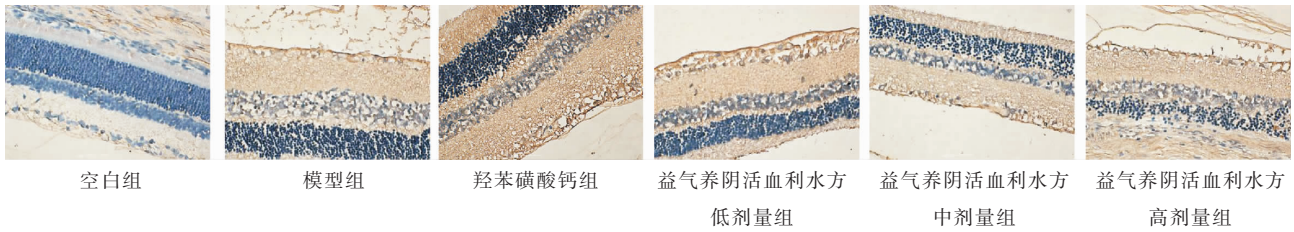


图8 各组大鼠视网膜 Bid 表达情况(免疫组织化学,×400)

NA 相对表达量降低 ($P < 0.05$), 益气养阴活血利水方低、中、高剂量组大鼠视网膜微血管周细胞中 Bax、Caspase-8、Caspase-3 mRNA 相对表达量明显降低 ($P < 0.05$), 益气养阴活血利水方高剂量组大鼠视网膜微血管周细胞 Bid mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$); 与益气养阴活血利水方低剂量组比较, 益气养阴活血利水方高剂量组大鼠视网膜微血管周细胞 Bax、Caspase-8、Caspase-3 mRNA 相对表达量明显降低 ($P < 0.05$); 与益气养阴活血利水方中剂量组比较, 益气养阴活血利水方高剂量组大鼠视网膜微血管周细胞中 Bax、Caspase-3 mRNA 相对表达量明显降低 ($P < 0.05$)。详见表 7。

3 讨论

随着物质生活水平的提升以及人口老龄化比例的不断升高, 糖尿病发病率逐年增加^[13], 糖尿病人群中 DR 患病率达 31.8%^[14], DR 的致盲率也呈上升趋势^[15], 早期防治 DR 显得尤为重要。研究表明, DR 早期

的组织学病理改变之一是视网膜微血管周细胞的消失^[5], 且周细胞缺失引起的 BRB 功能受损是永久性的^[16]。因此, 靶向减少微血管周细胞的丢失是治疗早期 DR 的关键。目前对于早期 DR 尚无疗效确切的药物。前期临床研究表明, 益气养阴活血利水方能有效改善早期 DR 患者的临床症状^[4]。

DR 属中医学“视瞻昏渺”“云雾移睛”等内障眼病范畴。消渴病久伤阴, 气阴亏虚, 气虚帅血无力, 无力运化水湿, 阴虚血行滞涩, 脉络不畅, 致眼部血络瘀阻或血溢脉外, 引起微血管瘤、渗出、出血、水肿等眼底改变。根据早期 DR 的病机特点, 彭清华教授提出在辨证上须抓住“虚、瘀、水”三要点, 以益气养阴活血利水方加减治疗。方中黄芪补脾益气利水, 气行则血行, 生地黄滋肾养阴, 黄精平补气阴, 三药合为君药, 共奏益气养阴、补脾益肾之功; 臣以葛根生津活血, 蛭螭活血通络, 蒲黄活血止血, 墨旱莲滋补肝肾、凉血止血; 佐以茯苓健脾利水, 益母草活血利水, 车前子利水渗湿, 甘草调和诸药。全方共奏益气养

表7 各组大鼠视网膜微血管周细胞 Caspase-8、Caspase-3、Bax、Bid mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Bax	Caspase-3	Caspase-8	Bid
空白组	0.07±0.02	0.09±0.02	0.06±0.02	0.11±0.04
模型组	0.92±0.33*	1.28±0.36*	1.29±0.42*	0.73±0.27*
羟苯磺酸钙组	0.57±0.24**	0.94±0.41*	0.87±0.26**	0.66±0.24*
益气养阴活血利水方低剂量组	0.39±0.12**	0.44±0.20**	0.54±0.15**	0.53±0.17*
益气养阴活血利水方中剂量组	0.32±0.15**	0.39±0.16**	0.43±0.11**	0.52±0.21*
益气养阴活血利水方高剂量组	0.14±0.07**■	0.25±0.07**■	0.35±0.09**□	0.23±0.08**

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, ** $P < 0.05$; 与益气养阴活血利水方低剂量组比较, □ $P < 0.05$; 与益气养阴活血利水方中剂量组比较, ■ $P < 0.05$ 。

阴、活血利水之功^[4]。

PI3K/AKT 信号通路是调控胰岛素传导信号的经典途径之一^[17],其下游多种靶蛋白参与调节视网膜微血管周细胞的凋亡,现已证实调控该通路靶基因的表达能在一定程度上预防 DR 的进展^[18]。PI3K/AKT 信号通路在视网膜微血管周细胞中被激活后,驱动血管内皮生长因子的细胞因子信号,介导内皮细胞增殖、迁移及新生血管生成过程,导致 DR 进展^[19]。同时,PI3K/AKT 信号激活后可作用于下游靶基因和靶蛋白,调控细胞凋亡^[20]。田丽珍等^[21]发现,大黄廑虫丸能够上调 PI3K、AKT,降低 Caspase-9 的表达,抑制糖尿病大鼠视网膜微血管周细胞的凋亡。CHENG 等^[18]证实,DR 小鼠模型中发生了早发性周细胞丢失和细胞凋亡水平增加,并发现地诺前列素可以通过激活 PI3K/AKT 信号通路来改善周细胞凋亡,阻止疾病进展。

细胞凋亡主要由外源性和内源性两种途径启动^[22],其中执行凋亡的关键元素为 Caspase 家族和 Bcl-2 家族。Caspase-8 是外源性途径中关键的启动型蛋白酶,而 Caspase-3 是最终的凋亡执行因子^[23],可被多种因素活化,引起激酶级联反应,促进细胞凋亡。Bcl-2 家族成员则在内源性细胞凋亡途径中发挥重要作用^[24],凋亡级联中 Bcl-2 蛋白活化,激活下游 Caspase 家族蛋白,作用于相应底物,引起细胞凋亡。Bax 和 Bid 是 Bcl-2 家族促凋亡成员代表,Bax 通过与线粒体上的膜通道结合,促使细胞色素 C 的释放而促进凋亡,并可与 Bcl-2 形成异二聚体阻断其抗凋亡作用,另一方面,凋亡过程启动后,被激活的 Caspase-8 将 Bid 切割为活性 tBid,进入线粒体后使得细胞色素 C 高效释放,细胞色素 C 与胞浆中的凋亡酶激活因子结合,活化 Caspase-9,进而激活 Caspase-3,促使细胞凋亡^[25]。

本研究发现,在益气养阴活血利水方干预 4 周后,与模型组比较,益气养阴活血利水方中、高剂量组大鼠血糖均降低;益气养阴活血利水方各剂量组大鼠体质量均升高,大鼠视网膜微血管周细胞凋亡数减少;益气养阴活血利水方高剂量组大鼠视网膜微血管周细胞中 PI3K、AKT 蛋白和 mRNA 表达水平均升高,Bax、Caspase-8、Caspase-3 及 Bid 蛋白和 mRNA 表达水平均降低。说明益气养阴活血利水方

能够降低早期 DR 大鼠血糖、稳定体质量,上调早期 DR 大鼠视网膜微血管中 PI3K、AKT 表达,下调 Bax、Caspase-8、Caspase-3 及 Bid 表达,从而减少周细胞的凋亡,改善视网膜组织结构紊乱。

综上所述,本研究结果表明,益气养阴活血利水方能够减少早期 DR 大鼠视网膜微血管周细胞的凋亡,改善视网膜组织结构紊乱,延缓 DR 视网膜微血管病变的发生发展,可能是通过激活 PI3K/AKT 通路,下调 Bax、Caspase-8、Caspase-3 及 Bid 基因表达水平发挥作用。DR 的发病机制极为复杂,本研究通过动物实验明确了益气养阴活血利水方对 PI3K/AKT 信号通路的部分调控作用,希望能为未来 DR 的早期防治提供实践依据。

参考文献

- [1] 2019 Blindness and Vision Impairment Collaborators GBD, Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: The Right to Sight: An analysis for the Global Burden of Disease Study[J]. *The Lancet Global Health*, 2021, 9(2): e144-e160.
- [2] LIN K Y, HSIH W H, LIN Y B, et al. Update in the epidemiology, risk factors, screening, and treatment of diabetic retinopathy[J]. *Journal of Diabetes Investigation*, 2021, 12(8): 1322-1325.
- [3] 蒋鹏飞,李书楠,刘培,等.益气养阴活血利水法在眼科疾病中的应用[J].*中华中医药杂志*,2021,36(12):7423-7425.
- [4] 熊静,彭清华,吴权龙,等.益气养阴活血利水法治疗单纯性糖尿病视网膜病变临床研究[J].*中国中医眼科杂志*,2009,19(6):311-315.
- [5] SEO E J, CHOI J A, KOH J Y, et al. Aflibercept ameliorates retinal pericyte loss and restores perfusion in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 2020, 8(1): e001278.
- [6] YUN J H. Interleukin-1 β induces pericyte apoptosis via the NF- κ B pathway in diabetic retinopathy[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 546: 46-53.
- [7] YANG Q, ZHANG C Y, XIE H, et al. Silencing Nogo-B improves the integrity of blood-retinal barrier in diabetic retinopathy via regulating Src, PI3K/Akt and ERK pathways[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 581: 96-102.
- [8] ZHANG Y, WANG W J, YANG A H. The involvement of ACO3 protein in diabetic retinopathy through the PI3k/Akt signaling pathway[J]. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*,

- 2022, 31(4): 407–416.
- [9] LI Y J, TANG Y L, SHI S R, et al. Tetrahedral framework nucleic acids ameliorate insulin resistance in type 2 diabetes mellitus via the PI3K/Akt pathway[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(34): 40354–40364.
- [10] 高玉, 吴晋晖, 柳林. 链脲佐菌素诱发性糖尿病大鼠早期视网膜病变模型的建立[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31(10): 1053–1059.
- [11] 贺石林, 王键, 王净净. 中医科研设计与统计学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2005: 48–49.
- [12] 袁丽莎, 张宁, 刘世巍, 等. 芪黄益肾方调控 Lnc RNA MALAT1 及 Wnt/ β -catenin 通路抑制糖尿病视网膜病变大鼠上皮-间质转化的作用[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(5): 2403–2408.
- [13] CHEN J Q, ZHU Y T, LI Z D, et al. Trends in prevalence rates of blindness among patients with diabetic retinopathy in high-income countries from 1990 to 2019: A joinpoint regression analysis[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2023, 202: 110823.
- [14] LIU J, HU H, QIU S H, et al. The prevalence and risk factors of diabetic retinopathy: Screening and prophylaxis project in 6 provinces of China[J]. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 2022, 15: 2911–2925.
- [15] XU Y F, WANG A H, LIN X L, et al. Global burden and gender disparity of vision loss associated with diabetes retinopathy[J]. *Acta Ophthalmologica*, 2021, 99(4): 431–440.
- [16] HUANG H. Pericyte-endothelial interactions in the retinal microvasculature[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(19): 7413.
- [17] 常盛. PI3K/Akt 信号通路与胰岛素抵抗的研究进展[J]. *中医药导报*, 2008(7): 113–116.
- [18] CHENG Y, PENG L Y, DENG X Q, et al. Prostaglandin F₂ α protects against pericyte apoptosis by inhibiting the PI3K/Akt/GSK3 β / β -catenin signaling pathway[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2021, 9(12): 1021.
- [19] WANG L, LIU W X, HUANG X G. microRNA-199a-3p inhibits angiogenesis by targeting the VEGF/PI3K/AKT signalling pathway in an in vitro model of diabetic retinopathy[J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 2020, 116: 104488.
- [20] 路颖慧, 尚津锋, 黄贵金凤, 等. 芳香族-L-氨基酸脱羧酶在脑缺血再灌注中的促凋亡作用及相关机制研究[J]. *湖北中医药大学学报*, 2023, 25(5): 5–9.
- [21] 田丽珍, 郭承伟, 郭超红. 大黄廋虫丸对糖尿病大鼠视网膜毛细血管 PI3K-AKT 信号通路相关因子的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(9): 4191–4194.
- [22] KASHYAP D, GARG V K, GOEL N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis[J]. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 2021, 125: 73–120.
- [23] WANG H J, ZHU J, JIANG L P, et al. Mechanism of Heshouwu Yin inhibiting the Cyt c/Apaf-1/Caspase-9/Caspase-3 pathway in spermatogenic cell apoptosis[J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2020, 20(1): 180.
- [24] 张静玲, 王克利, 闫双宝. 槲皮素对骨肉瘤细胞 MG-63 细胞色素 C、Bcl-2 及 bax 表达影响[J]. *中国实验诊断学*, 2018, 22(9): 1629–1631.
- [25] 彭俊, 王英, 蒋鹏飞, 等. 枸杞丹参对 RCS 大鼠视网膜组织中 Bcl-2、Bid 表达的影响[J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2020, 22(4): 1166–1175.

(本文编辑 周旦)