

引用:曹平,苏露煜,仝警安,等. 大黄素甲醚对糖尿病视网膜病变模型大鼠的保护作用及机制[J]. 现代中医药,2023, 43(6):89-95.

大黄素甲醚对糖尿病视网膜病变模型大鼠的保护作用及机制^{*}

曹平^{1**} 苏露煜^{1***} 仝警安¹ 张唯¹ 韦玮²

(1. 陕西中医药大学附属医院,陕西 咸阳 712000;

2. 陕西中医药大学第一临床医学院,陕西 咸阳 712046)

摘 要:目的 探讨大黄素甲醚(physcion,PHY)对糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy,DR)大鼠的治疗作用及其可能机制。方法 将 SPF 级雄性 SD 大鼠分为 5 组($n=12$):空白组、模型组、PHY 低剂量组、PHY 中剂量组和 PHY 高剂量组,治疗 4 w 后,检测各组大鼠的空腹血糖(fasting plasma glucose,FPG)、糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin,HbA1c)、空腹胰岛素(fasting insulin,FINS)、白介素(interleukin,IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α ,TNF- α)和视网膜超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)、过氧化氢酶(Catalase,CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase,GSH-PX)和丙二醛(Malondialdehyde,MDA)的水平;对大鼠视网膜进行苏木精和伊红(Hematoxylin and eosin,HE)染色和原位末端转移酶标记技术(TdT-mediated dUTP nick-end labeling,TUNEL)染色;分析视网膜 BCL2 相关 X 蛋白(BCL2 Associated X Protein,BAX)、B 淋巴细胞瘤-2(BCL2)和血管内皮生长因子 A(Vascular endothelial growth factor A,VEGFA)mRNA 水平,视网膜细胞核因子红系 2 相关因子 2(Nuclear factor erythroid 2 related factor 2,NRF2)、Kelch 样 ECH 关联蛋白 1(Kelch like ECH associated protein 1,Keap1)和磷酸化核因子-kappa B p65(p-NF- κ B p65)蛋白表达水平。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠的 FPG、HbA1c 和 FINS 水平升高($P<0.05$),视网膜中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平升高($P<0.05$),视网膜中 SOD、CAT 和 GSH-PX 水平降低($P<0.05$),视网膜中 MDA 水平升高($P<0.05$);视网膜出现明显病变,视网膜 TUNEL 阳性率以及 BAX 和 VEGFA 的 mRNA 水平升高($P<0.05$),视网膜中 BCL2 的 mRNA 水平降低($P<0.05$);视网膜细胞核 NRF2 蛋白水平降低($P<0.05$),Keap1 和 p-NF- κ B p65 蛋白水平升高($P<0.05$)。与模型组比较,PHY 低剂量组、PHY 中剂量组和 PHY 高剂量组大鼠的 FPG、HbA1c 和 FINS 水平降低($P<0.05$),视网膜中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平降低($P<0.05$),视网膜中 SOD、CAT 和 GSH-PX 水平升高($P<0.05$),视网膜 MDA 水平降低($P<0.05$);视网膜病变减轻,视网膜中 TUNEL 阳性率以及 BAX 和 VEGFA 的 mRNA 水平降低($P<0.05$),视网膜中 BCL2 的 mRNA 水平升高($P<0.05$);视网膜细胞核 NRF2 蛋白水平升高($P<0.05$),Keap1 和 p-NF- κ B p65 蛋白水平降低($P<0.05$)。**结论** 大黄素甲醚可有效减轻 DR 大鼠视网膜损伤,其机制可能与抑制 VEGF 表达、NRF2 介导的氧化应激和 NF- κ B 介导的炎症反应有关。

关键词:大黄素甲醚;糖尿病视网膜病变;血管内皮生长因子;细胞凋亡;核因子红系 2 相关因子 2;磷酸化核因子-kappa B

中图分类号:R255.4 文献标识码:A

文章编号:1672-0571(2023)06-0089-07

DOI:10.13424/j.cnki.mtcm.2023.06.019

糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最严重的并发症之一,发病率不断升

高^[1]。抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)疗法是 DR 的主要疗法之

* 基金项目:陕西省优秀中医药人才研修项目(陕中医药函【2022】102 号);陕西省重点研发计划(2017SF-350);咸阳市科学技术研究计划项目(2015K04-17)

** 作者简介:曹平,副主任医师,研究方向:眼底病的实验与临床研究。E-mail:124460063@qq.com

*** 通讯作者:苏露煜,主任医师。E-mail:643930005@qq.com

—^[2-4],但抗血管生成药物的半衰期较短,可引起眼内炎等不良反应,因此仍需要开发新型药物^[5]。大黄是一味传统中药,用于治疗糖尿病及相关并发症具有悠久历史。大黄中的蒽醌类物质具有多种药理和治疗作用,如抑制 α -葡萄糖苷酶^[6-7]和蛋白酪氨酸磷酸酶 1B^[8]活性。大黄素甲醚(phy-scion, PHY)是从中药大黄中得到的蒽醌类物质(分子量:284.26,分子式: $C_{16}H_{12}O_5$),具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗癌等活性^[9-11]。目前,虽然有学者报道了大黄素甲醚的抗糖尿病功效^[12-13],但尚无文献报道其对 DR 的治疗作用。因此,本研究主要探讨了大黄素甲醚对 DR 大鼠的治疗效果,并分析了可能的作用机制。

1 仪器与材料

1.1 仪器 7600 Series 日立生化分析仪(日本日立);VARIANT II TURBO 糖化血红蛋白测试系统(美国伯乐)。

1.2 试剂 大黄素甲醚(货号:17797,纯度: $\geq 98.0\%$)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ, 货号: S0130)、二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO, 货号: D2650)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;胰岛素(Insulin, INS, 货号: H203-1-1)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD, 货号: A001-3-2)、过氧化氢酶(Catalase, CAT, 货号: A007-1-1)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-PX, 货号: A005-1-2)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA, 货号: A003-1-2)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;白介素(Interleukin, IL)- 1β (货号: EK0393)和 IL-6(货号: EK0412)ELISA 试剂盒购自美国 Sciencell 公司;肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)(货号: YS05619B)ELISA 试剂盒购自美国 GTX 公司;苏木精和伊红(Hematoxylin and eosin, HE)染色试剂盒(货号: C0105M)、TUNEL 试剂盒(货号: C1088)、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(货号: P0028)购自碧云天生物技术研究;Primer-Script RT 试剂盒(货号: RR047A)、SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒(货号: RR820A)购自日本 TaKaRa 公司;核因子红系 2 相关因子 2(Nuclear factor erythroid 2 related factor 2, NRF2)(货号: 12721)、Kelch 样 ECH 关联蛋白 1(Kelch like ECH associat-

ed protein 1, KEAP1)(货号: 8047)、核因子-kappa B(Nuclear factor-kappa B, NF- κ B) p65(货号: 8242)、p-NF- κ B p65(货号: 3033)一抗购自美国 CST 公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(货号: ab8245)、核纤层蛋白 B1(Lamin B1)(货号: ab194109)一抗及 HRP 标记的二抗(ab6721)二抗购自美国 Abcam 公司。

1.3 实验动物 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠(300~350 g)购自陕西中医药大学,生产许可证: SCXK(陕)2021-001。大鼠在屏障环境中饲养($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\% \pm 5\%$ 、12 h: 12 h 循环照明)。本研究经过陕西中医药大学附属医院伦理委员会批准(批准号: 2022011432),实验中动物操作符合实验动物福利与伦理相关规范。

2 方法

2.1 DR 大鼠模型的建立 对大鼠禁食禁水 12 h,参考文献^[14]方法,一次性腹腔注射 STZ($60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)建立 1 型糖尿病大鼠模型,注射 STZ 2 w 后收集尾静脉血并检测空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG), $\text{FPG} \geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 表示 1 型糖尿病大鼠建模成功。将糖尿病大鼠继续饲养,饲养期间肉眼观察白内障的形成情况。1 型糖尿病大鼠建模 3 个月,随机处死 3 只大鼠,制作视网膜切片并进行 HE 染色,观察 DR 是否形成。

2.2 动物分组及处理 将 48 只 DR 模型建模成功的大鼠随机分为 4 组($n=12$):模型组、PHY 低剂量组($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、PHY 中剂量组($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和 PHY 高剂量组($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),另取正常饲养的 SD 大鼠作为空白组(正常组 $n=12$)。参考文献报道的剂量^[13],对 PHY 低剂量组、PHY 中剂量组和 PHY 高剂量组大鼠分别灌胃 2 mL 的 10、20、30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的大黄素甲醚(溶解于 5% DMSO 中)。空白组和模型组大鼠分别灌胃 2 mL 的 5% DMSO。各组大鼠均治疗 4 w。

2.3 大鼠空腹血糖、糖化血红蛋白和空腹胰岛素的检测 大鼠治疗结束后 1 d,采集大鼠尾静脉血,使用德国 Roche 血糖仪检测 FPG 含量,使用日本奥林巴斯全自动生化分析仪测定糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)含量,通过 ELISA 法检测空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)含量。

2.4 大鼠视网膜炎症和氧化应激指标检测 处死大鼠并摘除眼球,剥离视网膜后置于 pH 7.4 的预冷磷酸钠缓冲液中研磨制备匀浆。离心取上清,根据试剂盒说明书检测 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、SOD、CAT、GSH-Px 和 MDA 水平。

2.5 大鼠视网膜 HE 染色检测 4% 多聚甲醛固定大鼠眼球 48 h,常规制作 5 μ m 厚的视网膜石蜡切片,按试剂盒说明进行 HE 染色。

2.6 视网膜 TUNEL 染色 视网膜石蜡切片脱蜡、水化后滴加 20 μ g \cdot mL⁻¹ 不含 DNase 的蛋白酶 K,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。然后与 50 μ L 的 TUNEL 检测液于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min。抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察。

2.7 qRT-PCR 分析 使用 TRIzol 试剂提取大鼠视网膜总 RNA。按照 PrimeScript RT 试剂盒说明书进行逆转录反应。然后使用 SYBR Premix Ex Taq II 进行 PCR,仪器为在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪。扩增体系:95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,循环 40 次。GAPDH 为内参基因,通过 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算靶基因的相对表达水平。引物序列信息见表 1。

2.8 Western blot 分析 用细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒提取大鼠视网膜细胞核蛋白和细胞浆蛋白,用 RIPA 裂解液提取大鼠视网膜总蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白质浓度后,在 10% SDS-PAGE 上分离蛋白质并转移到 PVDF 膜上。Western 封闭液室温封闭膜 2 h。然后与 NRF2(1:5000 稀

释)、Keap1(1:5000 稀释)、NF- κ B p65(1:3000 稀释)、p-NF- κ B p65(1:3000 稀释)、GAPDH(1:5000 稀释)和 Lamin B1(1:3000 稀释)一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,第 2 天与 HRP 标记的二抗(1:5000 稀释)37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。ECL 显影。使用 Image J 软件分析条带灰度值。GAPDH 为总蛋白内参,Lamin B1 作为核蛋白内参。

表 1 qRT-PCR 反应引物序列

基因	序列(5'-3')
BAX	F:GGTCCCGAAGTAGGAAAGGA
	R:GAATTGGCGATGAACCTGGAC
BCL2	F:GACGGTAGCCACGAGAGAAG
	R:ATAACCGGAGATCGTGATG
VEGFA	F:GCACATAGAGAGAATGAGCTTCC
	R:CTCCGCTCTGAACAAGGCT
GAPDH	F:ACCACAGTCCATGCCATCAC
	R:TCCACCACCCTGTTGCTGTA

2.9 统计学方法 SPSS 22.0 软件用于数据分析。采用单因素方差分析及 LSD 检验分析组间差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大黄素甲醚对 DR 大鼠 FPG、HbA1c 和 FINS 的影响 与对照组比较,模型组大鼠的 FPG、HbA1c 和 FINS 水平均升高($P < 0.05$)。与模型组比较,PHY 低剂量、中剂量和高剂量组大鼠的 FPG、HbA1c 和 FINS 水平均呈大黄素甲醚剂量依赖性降低($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠 FPG、HbA1c 和 FINS 水平($\bar{x} \pm s$)

分组	FPG(mmol \cdot L ⁻¹)	HbA1c(%)	FINS(mU \cdot L ⁻¹)
空白组	4.56 \pm 0.53	3.97 \pm 0.28	20.63 \pm 0.91
模型组	23.22 \pm 2.34 *	7.99 \pm 1.21 *	39.62 \pm 3.36 *
PHY 低剂量组	14.06 \pm 1.17 *#	7.14 \pm 0.59 *#	33.74 \pm 3.18 *#
PHY 中剂量组	11.66 \pm 1.07 *#&	6.18 \pm 0.81 *#&	28.05 \pm 1.75 *#&
PHY 高剂量组	8.70 \pm 0.47 *#&▲	5.20 \pm 0.34 *#&▲	23.50 \pm 2.06 *#&▲
F	346.02	56.12	120.14
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与 PHY 低剂量组比较,& $P < 0.05$;与 PHY 中剂量组比较,▲ $P < 0.05$

3.2 大黄素甲醚对 DR 大鼠视网膜炎症因子水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠的视网膜中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平均升高($P < 0.05$)。与模型组比较,PHY 低剂量、中剂量、高剂量组大鼠的视网膜中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平均呈大黄素甲醚剂量依赖性降低($P < 0.05$)。见表 3。

3.3 大黄素甲醚对 DR 大鼠视网膜氧化应激的影响 与空白组比较,模型组大鼠的视网膜中 SOD、CAT 和 GSH-PX 水平均降低,MDA 水平升高($P < 0.05$)。与模型组比较,PHY 低剂量、中剂量、高剂量组大鼠的视网膜中 SOD、CAT 和 GSH-PX 水平均呈大黄素甲醚剂量依赖性升高,MDA 水平呈

大黄素甲醚剂量依赖性降低($P<0.05$)。见表 4。

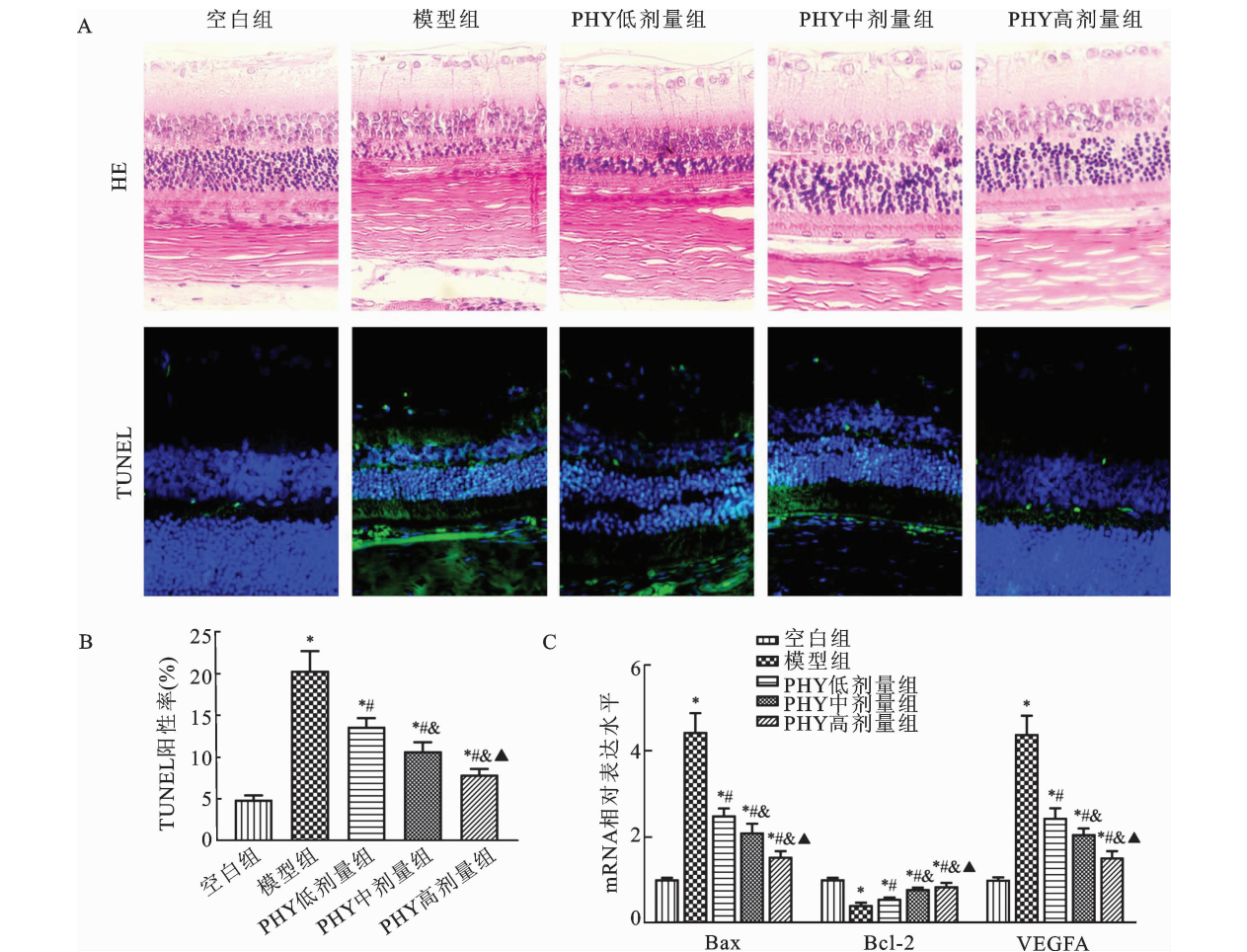
3.4 大黄素甲醚对 DR 大鼠视网膜形态、细胞凋亡和 VEGFA 的影响 视网膜 HE 染色显示,对照组大鼠视网膜形态正常,DR 组大鼠的视网膜神经节细胞层、内核层和外核层排列紊乱且伴有轻度水肿或变薄情况,PHY 低剂量、中剂量、高剂量组大鼠的视网膜病变相较 DR 组减轻。与对照组比

较,DR 组大鼠的视网膜 TUNEL 阳性率以及 BAX 和 VEGFA 的 mRNA 水平均升高,BCL2 的 mRNA 水平降低($P<0.05$)。与 DR 组比较,PHY 低剂量、中剂量、高剂量组视网膜 TUNEL 阳性率以及 BAX 和 VEGFA 的 mRNA 水平均呈大黄素甲醚剂量依赖性降低,BCL2 的 mRNA 水平呈大黄素甲醚剂量依赖性升高($P<0.05$)。见图 1。

表 3 各组大鼠视网膜 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平($\bar{x}\pm s$,pg \cdot mg $^{-1}$)

分组	IL-1 β	IL-6	TNF- α
空白组	19.53 \pm 2.41	155.30 \pm 11.05	151.89 \pm 14.23
模型组	67.76 \pm 5.74 [*]	396.67 \pm 31.81 [*]	464.90 \pm 25.40 [*]
PHY 低剂量组	48.96 \pm 4.07 ^{*#}	296.76 \pm 31.51 ^{*#}	299.60 \pm 31.06 ^{*#}
PHY 中剂量组	39.22 \pm 4.66 ^{*#&}	260.63 \pm 26.85 ^{*#&}	244.40 \pm 35.03 ^{*#&}
PHY 高剂量组	30.02 \pm 2.67 ^{*#&▲}	203.49 \pm 17.38 ^{*#&▲}	167.38 \pm 17.01 ^{*#&▲}
F	243.06	162.64	287.98
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与 PHY 低剂量组比较,[&] $P<0.05$;与 PHY 中剂量组比较,[▲] $P<0.05$



注:A. 视网膜 HE 和 TUNEL 染色,放大倍数为 400 倍;B. TUNEL 阳性率;C. Bax、Bcl-2 和 VEGFA 的 mRNA 相对水平;与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与 PHY 低剂量组比较,[&] $P<0.05$;与 PHY 中剂量组比较,[▲] $P<0.05$

图 1 大黄素甲醚对 DR 大鼠视网膜形态、细胞凋亡和 VEGFA 的影响

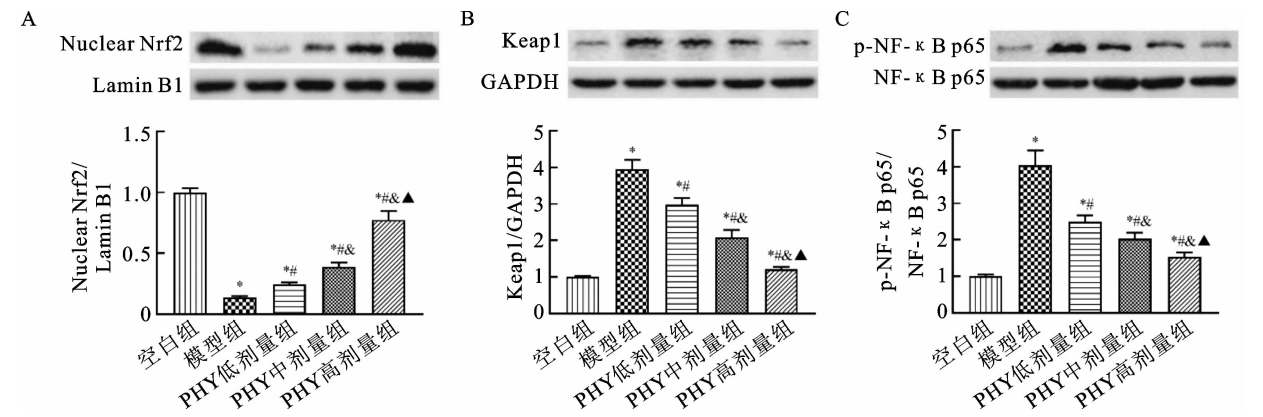
表 4 各组大鼠视网膜中 SOD、CAT、GSH-PX 和 MDA 水平($\bar{x} \pm s$)

mW 分组	SOD(U · mg ⁻¹)	CAT(U · mg ⁻¹)	GSH-PX(U · mg ⁻¹)	MDA(nmol · mg ⁻¹)
空白组	16.33 ± 1.46	12.76 ± 1.24	22.09 ± 1.75	5.96 ± 0.75
模型组	4.94 ± 0.37 *	4.97 ± 0.37 *	10.86 ± 1.12 *	20.57 ± 2.39 *
PHY 低剂量组	8.01 ± 1.04 *#	7.82 ± 0.90 *#	14.99 ± 1.38 *#	12.09 ± 1.38 *#
PHY 中剂量组	10.82 ± 1.11 *#&	9.87 ± 1.12 *#&	16.68 ± 2.03 *#&	10.24 ± 1.21 *#&
PHY 高剂量组	12.92 ± 1.00 *#&▲	11.89 ± 1.13 *#&▲	19.57 ± 1.54 *#&▲	8.04 ± 0.97 *#&▲
F	206.71	119.33	87.65	180.12
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与 PHY 低剂量组比较,& $P < 0.05$;与 PHY 中剂量组比较,▲ $P < 0.05$

3.5 大黄素甲醚对 DR 大鼠视网膜 NRF2 和 NF-κB 信号通路的影响 与对照组比较,模型组大鼠的视网膜细胞核 NRF2 蛋白表达水平降低,Keap1 和 p-NF-κB p65 蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。与模型组比较,PHY 低、中和高剂量组大鼠的视网

膜细胞核 NRF2 蛋白表达水平呈大黄素甲醚剂量依赖性升高,Keap1 和 p-NF-κB p65 蛋白表达水平均呈大黄素甲醚剂量依赖性降低($P < 0.05$)。见图 2。



注:A~C:Nuclear Nrf2、Keap1 和 p-NF-κB p65 蛋白相对表达量;与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与 PHY 低剂量组比较,& $P < 0.05$;与 PHY 中剂量组比较,▲ $P < 0.05$

图 2 大黄素甲醚对 DR 大鼠视网膜 NRF2 和 NF-κB 信号通路的影响

4 讨论

目前,虽然抗 VEGF 疗法已经临床应用,但其主要作用是抗血管生成,无法从根本机制上阻止 DR 的进展,并且抗 VEGF 疗法可引起眼内炎等不良反应^[5]。大黄中的蒽醌类物质具有抗糖尿病功效^[6-8]。大黄蒽醌类物质大黄素甲醚也具有抗糖尿病作用^[12-13],但相关研究较少,且无文献报道其在治疗 DR 方面的潜力。因此,本研究的意义是揭示大黄素甲醚治疗 DR 的效果及可能的作用机制。

研究表明,3 个剂量的大黄素甲醚均有效降低了 DR 大鼠 FPG、HbA1c 和 FINS 水平。其他文献已经报道,大黄素甲醚具有良好的抗高血糖活性^[6]。体外 α-葡萄糖苷酶活性测定和体内小鼠研究表明,大黄素甲醚可能降低餐后血糖水平^[15]。

另外,大黄素甲醚可以防治非肥胖糖尿病小鼠的 1 型糖尿病^[12]。Inalegwu 等^[13]使用不同剂量的大黄素甲醚(10、20、30 mg · kg⁻¹)治疗糖尿病大鼠模型,给药 4 w 后大鼠 FBG 和胰岛素抵抗降低,且无明显毒性。支持本研究结果。

慢性低度炎症伴随 DR 的发病过程。IL-1β、IL-6、TNF-α 等炎性细胞因子水平与 DR 的严重程度相关^[16]。高糖可激活小胶质细胞,导致 IL-6、TNF-α、VEGF 的分泌增加^[17]。氧化应激与 DR 的发病机制有关。活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的过度生成可引起代谢异常^[18]。抗氧化剂可减轻 DR 大鼠模型的视网膜氧化损伤。抑制氧化应激是减轻 DR 的重要策略^[19]。研究表明,3 个剂量的大黄素甲醚均有效降低了 DR 大鼠视网

膜 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平,升高了视网膜 SOD、CAT 和 GSH-PX 水平均呈大黄素甲醚剂量依赖性升高,降低了视网膜 MDA 水平,有效抑制了视网膜炎症和氧化应激。据报道,大黄素甲醚在糖尿病大鼠中表现出了良好的抗炎和抗氧化作用^[13]。此外,大黄素甲醚降低了氧糖剥夺/复氧复糖(Oxygen-glucose deprivation and reoxygenation, OGD/R)处理的 SH-SY5Y 细胞的炎症反应,表现为促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 水平的降低,并且减弱了 SY-SY5Y 细胞的氧化应激,表现为 SOD 和 GSH 水平升高,ROS 和 MDA 水平降低^[20]。支持本研究结果。

高糖引起的视网膜代谢功能紊乱在 DR 发病早期可导致毛细血管变性、闭塞,继而引发视网膜缺氧,诱导新生血管形成。此外,视网膜炎症因子高表达和氧化应激可引起线粒体功能损伤和细胞凋亡。本研究表明,3 个剂量的大黄素甲醚均有效抑制了 DR 大鼠视网膜细胞凋亡和降低了 VEGFA 水平。VEGF 是 DR 进展过程中的关键血管生成调控因子^[21]。DR 患者的玻璃体中 VEGF 的表达明显升高^[22]。抗 VEGF 疗法是 DR 治疗的重要疗法,抗 VEGF 药物(如雷珠单抗)在 DR 临床治疗中效果显著^[24]。提示大黄素甲醚不仅有抗 VEGF 作用,而且可减轻 DR 大鼠视网膜细胞凋亡,可能是一种防治 DR 的潜在天然药物。

NRF2 是一种抗氧化基因的转录调节因子,通过与 Keap1 在细胞质中结合而处于未激活状态。当 ROS 增多时,Keap1 被氧化或共价修饰,NRF2 随后被释放出来并易位至细胞核启动抗氧化剂基因的转录^[23]。NRF2 是视网膜抗氧化系统的重要调节因子^[24]。因此,激活 NRF2 是治疗 DR 的潜在手段^[25-26]。本研究表明,3 个剂量的大黄素甲醚均有效激活了 DR 大鼠视网膜 NRF2 信号通路。其他文献报道,大黄素甲醚通过激活 NRF2 信号通路抑制人脐静脉内皮细胞氧化应激^[27]。因此,大黄素甲醚在 DR 中的抗氧化作用与激活 NRF2 信号通路有关。

NF- κ B 是重要的炎症因子。在细胞质中,NF- κ B 通过与其抑制亚基 I κ B 结合形成二聚体。受到刺激后,I κ B 被泛素化降解,NF- κ B 被释放出来并移位到细胞核。NF- κ B p50/p65 是最丰富的

NF- κ B 异二聚体,p65 的 C 端存在反式激活结构域,可激活目标基因,而 p50 并不能激活基因转录。研究表明,3 个剂量的大黄素甲醚均有效抑制了 DR 大鼠视网膜 NF- κ B 信号通路。其他文献报道,大黄素甲醚可通过抑制 NF- κ B 信号通路来改善特异性皮炎样皮肤损伤^[28]。大黄素甲醚可抑制脑缺血再灌注大鼠脑组织和 OGD/R 处理的 SH-SY5Y 细胞中 NF- κ B 信号通路的激活^[20]。因此,大黄素甲醚在 DR 中的抗炎作用与抑制 NF- κ B 信号通路有关。

综上所述,本研究表明大黄素甲醚可有效减轻 DR 大鼠视网膜损伤,其机制与抑制 VEGF 表达、NRF2 介导的氧化应激和 NF- κ B 介导的炎症反应有关。

参考文献

- [1] Leasher JL, Bourne RRA, Flaxman SR, et al. Global estimates on the number of people blind or visually impaired by diabetic retinopathy: a meta-analysis from 1990 to 2010 [J]. *Diabetes Care*, 2016, 39(9): 1643-1649.
- [2] Barmas-Alamdari D, D'Souza HS, Kapoor KG, et al. Intravitreal ziv-aflibercept: a comprehensive review [J]. *Seminars in Ophthalmology*, 2019, 34(6): 420-435.
- [3] Giuliani GP, Guel DA, Gonzalez VH. Pegaptanib sodium for the treatment of proliferative diabetic retinopathy and diabetic macular edema [J]. *Current Diabetes Reviews*, 2009, 5(1): 33-38.
- [4] Stahl A, Lepore D, Fielder A, et al. Ranibizumab versus laser therapy for the treatment of very low birthweight infants with retinopathy of prematurity (RAINBOW): an open-label randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2019, 394(10208): 1551-1559.
- [5] Network DRCR, Elman MJ, Aiello LP, et al. Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema [J]. *Ophthalmology*, 2010, 117(6): 1064-1077. e35.
- [6] Arvindkar A, More T, Payghan PV, et al. Evaluation of anti-diabetic and alpha glucosidase inhibitory action of anthraquinones from *Rheum emodi* [J]. *Food & Function*, 2015, 6(8): 2693-2700.
- [7] Jung HA, Ali MY, Choi JS. Promising inhibitory effects of anthraquinones, naphthopyrone, and naphthalene glycosides, from *Cassia obtusifolia* on α -glucosidase and human protein tyrosine phosphatases 1B [J]. *Molecules*, 2016, 22(1): 28.

[8] Lee W, Yoon G, Hwang YR, et al. Anti-obesity and hypo-lipidemic effects of Rheum undulatum in high-fat diet-fed C57BL/6 mice through protein tyrosine phosphatase 1B inhibition[J]. BMB Reports, 2012, 45(3) : 141-146.

[9] Ayoub AM, Gutberlet B, Preis E, et al. Parietin cyclodextrin-inclusion complex as an effective formulation for bacterial photoinactivation [J]. Pharmaceutics, 2022, 14 (2) : 357.

[10] Mugas ML, Calvo G, Marioni J, et al. Photosensitization of a subcutaneous tumour by the natural anthraquinone parietin and blue light [J]. Scientific Reports, 2021, 11 (1) : 23820.

[11] Liu YJ, Chu SF, Yang SW, et al. Physcion and physcion 8-O- β -glucopyranoside: a review of their pharmacology, toxicities and pharmacokinetics [J]. Chemico-Biological Interactions, 2019, 310:108722.

[12] Shen MY, Liu YJ, Don MJ, et al. Combined phytochemistry and chemotaxis assays for identification and mechanistic analysis of anti-inflammatory phytochemicals in Fallopia japonica [J]. PLoS One, 2011, 6(11) : e27480.

[13] Inalegwu AE, Aimola IA, Mohammed A. Physcion ameliorates pancreatic β -cell dysfunction and diabetes-related oxidative stress markers in type 2 diabetes rat model [J]. Phytomedicine Plus, 2021, 1(4) : 100114.

[14] 段惠惠, 黄建梅, 于素云, 等. STZ 糖尿病大鼠视网膜病变模型的再评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23 (5) : 12-18, 79.

[15] Chan LY, Takahashi M, Lim PJ, et al. Eurotium cristatum fermented okara as a potential food ingredient to combat diabetes [J]. Scientific Reports, 2019, 9:17536.

[16] Boss JD, Singh PK, Pandya HK, et al. Assessment of neurotrophins and inflammatory mediators in vitreous of patients with diabetic retinopathy [J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2017, 58(12) : 5594-5603.

[17] Abcouwer SF. Müller cell-microglia cross talk drives neuroinflammation in diabetic retinopathy [J]. Diabetes, 2017, 66(2) : 261-263.

[18] Cao Y, Li X, Shi P, et al. Effects of L-carnitine on high glucose-induced oxidative stress in retinal ganglion cells [J]. Pharmacology, 2014, 94(3/4) : 123-130.

[19] Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E. The role of mitochondria in metabolism and cell death [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 482(3) : 426-431.

[20] Dong XB, Wang L, Song GR, et al. Physcion protects rats against cerebral ischemia-reperfusion injury via inhibition of TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. Drug Design, Development and Therapy, 2021, 15:277-287.

[21] Lupo G, Motta C, Giurdanella G, et al. Role of phospholipases A₂ in diabetic retinopathy: in vitro and in vivo studies [J]. Biochemical Pharmacology, 2013, 86 (11) : 1603-1613.

[22] Li JM, Wang JJ, Yu Q, et al. Inhibition of reactive oxygen species by Lovastatin downregulates vascular endothelial growth factor expression and ameliorates blood-retinal barrier breakdown in db/db mice; role of NADPH oxidase 4 [J]. Diabetes, 2010, 59(6) : 1528-1538.

[23] Marco E, Jha J, Sharma A, et al. Are reactive oxygen species still the basis for diabetic complications? [J]. Clinical Science, 2015, 129(2) : 199-216.

[24] Hui QY, Karlstetter M, Xu ZH, et al. Inhibition of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction protects retinal cells and ameliorates retinal ischemia-reperfusion injury [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2020, 146: 181-188.

[25] Sharma A, Rizky L, Stefanovic N, et al. The nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) activator dh404 protects against diabetes-induced endothelial dysfunction [J]. Cardiovascular Diabetology, 2017, 16(1) : 33.

[26] Tan SM, Sharma A, Stefanovic N, et al. Derivative of bardoxolone methyl, dh404, in an inverse dose-dependent manner lessens diabetes-associated atherosclerosis and improves diabetic kidney disease [J]. Diabetes, 2014, 63 (9) : 3091-3103.

[27] Wang YH, Liu YP, Zhu JQ, et al. Physcion prevents high-fat diet-induced endothelial dysfunction by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress pathways [J]. European Journal of Pharmacology, 2023, 943: 175554.

[28] Moon PD, Han NR, Lee JS, et al. Use of physcion to improve atopic dermatitis-like skin lesions through blocking of thymic stromal lymphopoietin [J]. Molecules, 2019, 24 (8) : 1484.