

红景天苷抑制 cAMP/PKA/CREB 通路减轻高糖诱导的视网膜神经节细胞损伤

刘媛, 杨倩, 杜鹃, 马胜男, 李娜, 常瑚, 高鸽

保定市第一中心医院 眼四科, 河北 保定 071000

摘要: **目的** 探讨红景天苷对高糖诱导的视网膜神经节细胞(RGC)损伤及环磷酸腺苷/蛋白激酶 A/cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP/PKA/CREB)通路的影响。**方法** 将 RGC-5 细胞分为对照组、模型组、红景天苷(0.25、0.5 mmol/L)组、红景天苷+Forskolin(0.5 mmol/L+0.02 mmol/L)组。5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(Edu)检测各组细胞增殖情况; 2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针检测活性氧(ROS)水平; 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测氧化应激及 cAMP 水平; 流式细胞仪检测细胞凋亡; 单丹磺酰尸胺(MDC)染色检测自噬空泡形成; 蛋白免疫印迹(Western blotting)检测增殖、凋亡、自噬及 cAMP/PKA/CREB 通路相关蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 红景天苷(0.25、0.5 mmol/L)组 Edu 阳性率、PCNA 表达及超氧化物歧化酶(SOD)活性升高, 活性氧(ROS)平均荧光强度、丙二醛(MDA)含量、细胞凋亡率、cleaved 半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、Caspase-3、自噬空泡绿色荧光强度、微管相关蛋白轻链 3II/LC3I、Bcl-2 同源结构域蛋白抗体(Beclin-1)、PKA、p-CREB/CREB 蛋白表达及 cAMP 水平显著降低($P<0.05$); 与红景天苷 0.5 mmol/L 组比较, 红景天苷+Forskolin 组 Edu 阳性率、PCNA 表达及 SOD 活性降低, ROS 平均荧光强度、MDA 含量、细胞凋亡率、cleaved Caspase-3、Caspase-3、自噬空泡绿色荧光强度、LC3II/LC3I、Beclin-1、PKA、p-CREB/CREB 蛋白表达及 cAMP 水平显著升高($P<0.05$)。**结论** 红景天苷可减轻高糖诱导的 RGC-5 细胞损伤, 与抑制 cAMP/PKA/CREB 信号通路相关。

关键词: 红景天苷; 环磷酸腺苷/蛋白激酶 A/cAMP 反应元件结合蛋白通路; 高糖; 视网膜神经节细胞; 损伤

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2025)04-0829-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.04.002

Effect of salidroside on high glucose induced retinal ganglion cell injury by regulating the cAMP/PKA/CREB pathway

LIU Yuan, YANG Qian, DU Juan, MA Shengnan, LI Na, CHANG Hu, GAO Ge

Department of Ophthalmology 4, Baoding NO. 1 Central Hospital, Baoding 071000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of salidroside on retinal ganglion cell (RGC) damage induced by high glucose and cAMP/PKA/CREB pathway. **Methods** RGC-5 cells were assigned into control group, model group, salidroside (0.25, 0.5 mmol/L) groups, and salidroside + Forskolin group. 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (Edu) was used to detect cell proliferation in each group. 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe was used to detect reactive oxygen species (ROS). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect oxidative stress and cAMP levels. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Monodansylcadaverine (MDC) staining was used to detect autophagic vacuolar formation. Western blotting was used to detect the expression of proteins related to proliferation, apoptosis, autophagy, and the cAMP/PKA/CREB pathway. **Results** Compared with model group, the Edu positive rate, PCNA expression, and SOD activity in salidroside (0.25, 0.5 mmol/L) groups were increased, ROS mean fluorescence intensity, MDA content, apoptosis rate, cleaved Caspase-3, Caspase-3, autophagy vacuolar green fluorescence intensity, LC3II/LC3I, Beclin-1, PKA, p-CREB/CREB protein, and cAMP level were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with salidroside 0.5 mmol/L group, the Edu positive rate, PCNA expression, and SOD activity of salidroside +Forskolin group were decreased, ROS mean fluorescence intensity, MDA content, apoptosis rate, cleaved Caspase-3, Caspase-3, autophagy vacuolar green fluorescence intensity, LC3II/LC3I, Beclin-1, PKA, p-CREB/CREB protein expression, and cAMP level were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** Salidroside can alleviate high glucose induced RGC-5 injury, and it is associated with inhibition of cAMP/PKA/CREB signaling pathway.

Key words: salidroside; cAMP/PKA/CREB pathway; high glucose; retinal ganglion cells; injury

收稿日期: 2025-01-13

基金项目: 河北省卫生健康委员会医学科学研究课题计划项目(20251433)

作者简介: 刘媛, 女, 副主任医师, 硕士, 研究方向为眼科学。E-mail: yans002880@163.com

糖尿病视网膜病变是糖尿病常见的发生于眼部的一种微血管并发症,早期患者症状不明显,随着病情发展,患者会逐渐出现视野模糊、视力下降、视物变形甚至视力丧失等症状,严重影响患者工作及生活^[1]。随着经济快速发展及人们饮食生活习惯的改变,糖尿病的发生率逐渐升高,促使糖尿病视网膜病变的发病率也随之升高,已成为全球公共卫生问题^[2]。目前主要通过激光、玻璃体切除手术及玻璃体腔内注射抗血管内皮生长因子(VEGF)等方式进行治疗,但效果不理想^[3]。寻求新型高效的治疗药物与方式是目前的研究重点。红景天苷是提取自中药红景天中的天然成分,具有降糖调脂、抗氧化、抗凋亡等多种药理活性^[4],而且在糖尿病相关疾病的治疗方面发挥重要作用。研究显示,红景天苷可降低链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠视网膜神经节细胞损失,从而预防糖尿病视网膜病变^[5]。环磷酸腺苷/蛋白激酶 A/cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP/PKA/CREB)信号通路作为氧化应激相关通路,在参与糖尿病相关疾病的发展进程,其中抑制 cAMP/PKA/CREB 信号通路可降低高糖诱导的 Müller 细胞损伤和胶质增生,改善糖尿病视网膜病变的视网膜损伤^[6]。本研究主要通过探究红景天苷对高糖诱导的视网膜神经节细胞损伤及 cAMP/PKA/CREB 信号通路,以期对糖尿病视网膜病变治疗寻求新的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠视网膜神经节细胞 RGC-5 购自上海酶研生物科技有限公司;红景天苷(质量分数 $\geq 98\%$, S101157)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;cAMP 激活剂(Forskolin)、兔源多克隆 PCNA 抗体(orb1897987、orb1742620)购自武汉博欧特生物科技有限公司;活性氧(ROS)试剂盒(JKSJ-1834)购自上海晶抗生物工程有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)ELISA 试剂盒(XK-E12032、XK-SJH-3056)购自上海恒科生物科技有限公司;cAMP ELISA 试剂盒(YM-0544P)购自上海远慕生物科技有限公司;兔源多克隆 cleaved 半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)抗体(WL01992、WL04004)购自沈阳万类生物科技有限公司;兔源多克隆微管相关蛋白轻链 3 II(LC3II)/LC3I 抗体(E-AB-61027)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;兔源多克隆 Bcl-2 同源结构域蛋白抗体(Beclin-1)、cAMP

反应元件结合蛋白(CREB)抗体(DL95577A、DL90269A)购自无锡市东林科技发展有限公司;兔源多克隆 PKA 抗体(ABP52222-2)购自亚科因(武汉)生物技术有限公司;兔源多克隆 p-CREB 抗体(KM0437025)购自温州科淼生物科技有限公司。

DM IL LED 型荧光显微镜购自德国 Leica 公司;SuPerMax3000FL 多功能酶标仪购自上海闪谱生物科技有限公司;4200SF 型凝胶成像分析系统购自上海天能公司;FACSCalibur 型流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 RGC-5 细胞置于 DMEM 培养基(10%胎牛血清+100 U/mL 青-链霉素)并在含 5% CO₂ 的 37 °C 恒温环境下常规培养,1~2 d 更换新的培养基,而且在细胞生长密度 $>85\%$ 时消化传代,取对数期细胞进行后续实验研究。

1.2.2 分组与处理 将 RGC-5 细胞分为对照组、模型组、红景天苷(0.25、0.5 mmol/L)组、红景天苷(0.5 mmol/L)+Forskolin(0.02 mmol/L)组。模型组使用 30 mmol/L 葡萄糖培养细胞 48 h;红景天苷(0.25、0.5 mmol/L)组分别用 0.25、0.5 mmol/L 红景天苷处理 4 h 后再加入 30 mmol/L 葡萄糖培养细胞 48 h^[7];红景天苷+Forskolin 组用 0.5 mmol/L 红景天苷处理 4 h 后再加入 30 mmol/L 葡萄糖及 0.02 mmol/L Forskolin 培养细胞 48 h^[8]。

1.2.3 Edu 检测细胞增殖 各组细胞参照 1.2.3 项下培养 48 h 收集细胞,加入 Edu 染色标记,4%多聚甲醛室温固定 30 min,再加入渗透剂 TritonX-100 摇床孵育 10 min,再依次加入 1×Apollo®染色液、TritonX-100 渗透剂、甲醇进行反应,最后进行 DAPI 室温避光孵育,然后清洗干燥荧光显微镜下观察拍照,分析细胞增殖情况。

1.2.4 DCFH-DA 荧光探针检测 ROS 水平 各组细胞参照 1.2.3 项下培养 48 h 收集细胞,参照 ROS 试剂盒说明书,加入 2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)37 °C 避光孵育 1 h,洗涤 3 次,荧光显微镜观察平均荧光强度(MFI)并拍照,Image 软件分析 ROS 水平。

1.2.5 ELISA 检测 MDA、SOD、cAMP 含量 各组细胞参照 1.2.3 项下培养 48 h 收集细胞,离心取上清液,然后加入固定有抗体的酶标板室温下孵育,清洗后加入酶标记抗体室温孵育,然后显色处理后

加入终止液, ELISA 检测吸光度, 然后计算 MDA、SOD、cAMP 水平。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 各组细胞参照 1.2.3 项下培养 48 h 收集细胞, 用提前预冷的 PBS 洗涤 3 次后加入结合缓冲液悬浮, 然后依次加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 PI 染液混匀后室温避光染色 15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.7 MDC 染色观察自噬空泡形成 各组细胞参照 1.2.3 项下培养 48 h 收集细胞, 加入 MDC 室温避光孵育 15~45 min 后, 清洗细胞并重悬, 然后滴加在载玻片上, 固定干燥后置于荧光显微镜下观察拍照。

1.2.8 Western blotting 检测增殖、凋亡、自噬及 cAMP/PKA/CREB 通路相关蛋白表达 各组细胞参照 1.2.3 项下培养 48 h 收集细胞, 然后加入 RIPA 裂

解液裂解提取细胞总蛋白, 电泳分离蛋白并将其转移至 PVDF 膜上, 然后血清封闭, 将膜与一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, 再与 HRP 偶联的二抗室温下孵育, 最后加入 ECL 试剂, 观察并分析计算各蛋白表达水平。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 进行统计分析, 计量资料符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 描述, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。

2 结果

2.1 各组细胞增殖情况

与模型组比较, 红景天苷 (0.25、0.5 mmol/L) 组 Edu 阳性率、PCNA 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 且呈浓度相关性; 与红景天苷 0.5 mmol/L 组比较, 红景天苷+Forskolin 组 Edu 阳性率、PCNA 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 见图 1、2 及表 1。

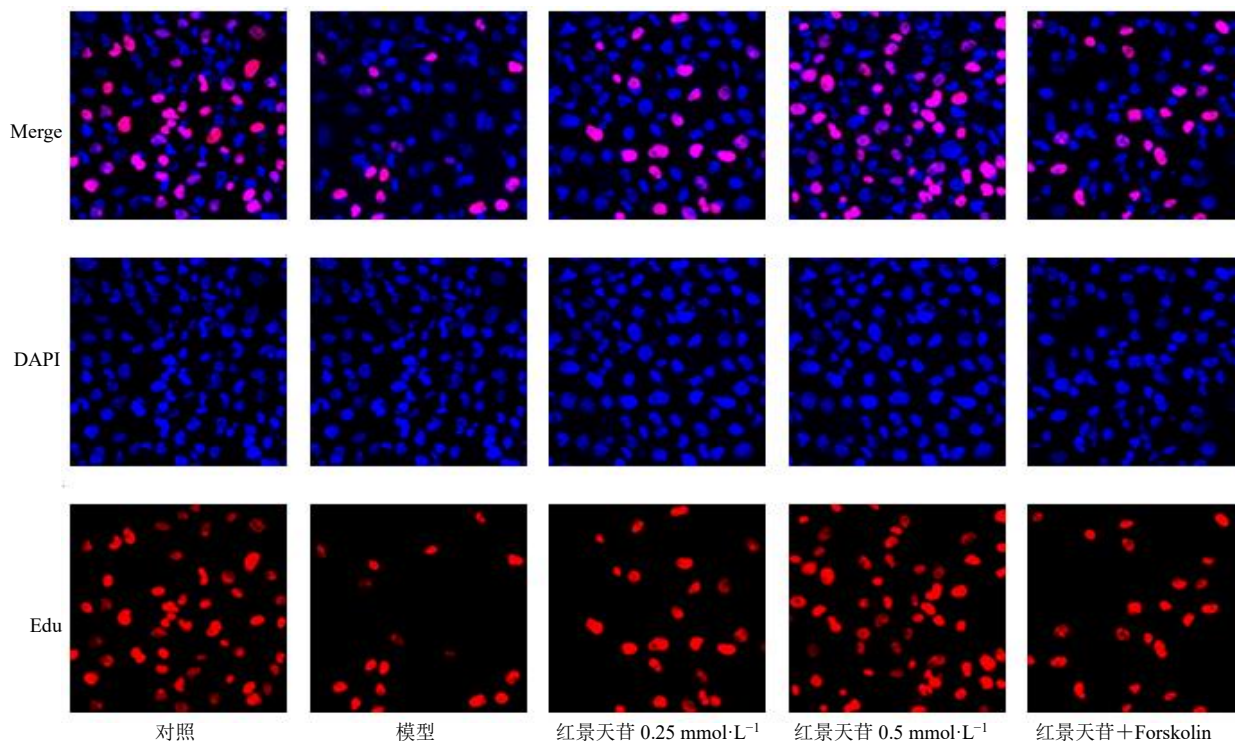


图 1 细胞增殖情况 (×400)

Fig. 1 Cell proliferation (×400)

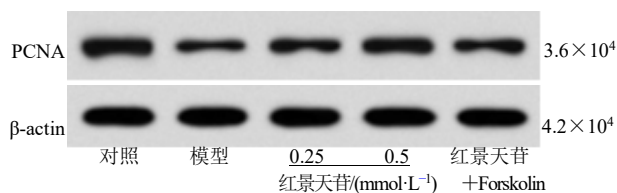


图 2 各组细胞 PCNA 蛋白表达

Fig. 2 PCNA protein expression in each group

2.2 各组细胞氧化应激水平

与模型组比较, 红景天苷 (0.25、0.5 mmol/L) 组细胞 ROS 平均荧光强度、MDA 含量降低, SOD 活性升高 ($P < 0.05$), 且呈浓度相关性; 与红景天苷 0.5 mmol/L 组比较, 红景天苷+Forskolin 组细胞 ROS 平均荧光强度、MDA 含量升高, SOD 活性降低 ($P < 0.05$); 见图 3、表 2。

表 1 各组细胞增殖及增殖相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Comparison of cell proliferation and proliferation-related protein expression in each groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/(mmol·L ⁻¹)	Edu 阳性率/%	PCNA 蛋白相对表达量
对照	—	48.32 ± 4.91	0.95 ± 0.10
模型	—	14.16 ± 1.48*	0.36 ± 0.04*
红景天苷	0.25	29.35 ± 3.02 [#]	0.59 ± 0.06 [#]
	0.5	46.54 ± 4.71 ^{#&}	0.84 ± 0.09 ^{#&}
红景天苷+Forskolin	0.5+0.02	30.18 ± 3.09 [@]	0.66 ± 0.07 [@]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与红景天苷 0.25 mmol·L⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与红景天苷 0.5 mmol·L⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs salidroside 0.25 mmol·L⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs salidroside 0.5 mmol·L⁻¹ group.

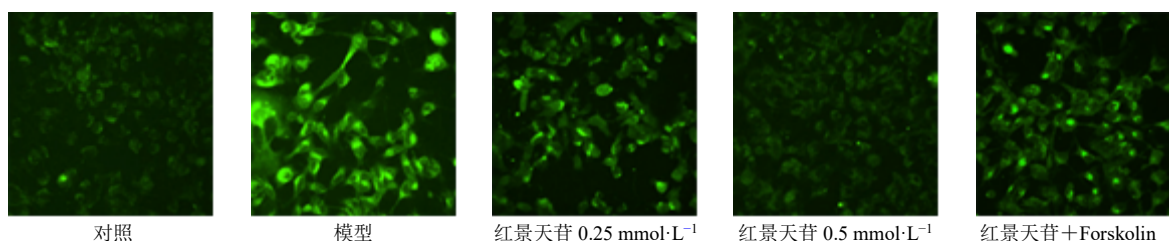


图 3 DCFH-DA 检测 ROS 水平 (×400)

Fig. 3 ROS levels detected by DCFH-DA (×400)

表 2 各组细胞氧化应激水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Comparison of cellular oxidative stress in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/(mmol·L ⁻¹)	ROS/MFI	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)
对照	—	50.26 ± 5.11	4.45 ± 0.46	18.92 ± 1.95
模型	—	124.89 ± 12.69*	27.39 ± 2.82*	4.06 ± 0.43*
红景天苷	0.25	95.28 ± 9.72 [#]	18.14 ± 1.87 [#]	8.25 ± 0.89 [#]
	0.5	61.39 ± 6.31 ^{#&}	7.51 ± 0.79 ^{#&}	16.74 ± 1.75 ^{#&}
红景天苷+Forskolin	0.5+0.02	93.76 ± 9.58 [@]	17.68 ± 1.81 [@]	9.32 ± 1.01 [@]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与红景天苷 0.25 mmol·L⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与红景天苷 0.5 mmol·L⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs salidroside 0.25 mmol·L⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs salidroside 0.5 mmol·L⁻¹ group.

2.3 各组细胞凋亡情况

与模型组比较, 红景天苷 (0.25、0.5 mmol/L) 组细胞凋亡率、cleaved Caspase-3、Caspase-3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 且呈浓度相关性; 与红景天苷 0.5 mmol/L 组比较, 红景天苷+Forskolin 组

细胞凋亡率、cleaved Caspase-3、Caspase-3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 见图 4、5 及表 3。

2.4 各组细胞自噬情况

与模型组比较, 红景天苷 (0.25、0.5 mmol/L) 组细胞荧光减弱, LC3II/LC3I、Beclin-1 蛋白表达显

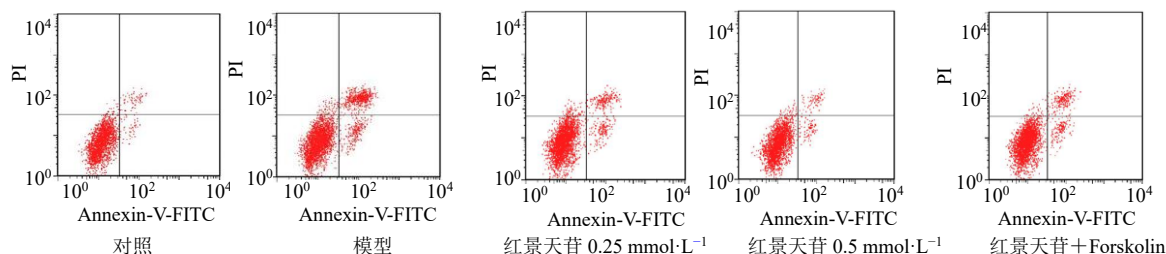


图 4 流式细胞术检测细胞凋亡

Fig. 4 Apoptosis was detected by flow cytometry

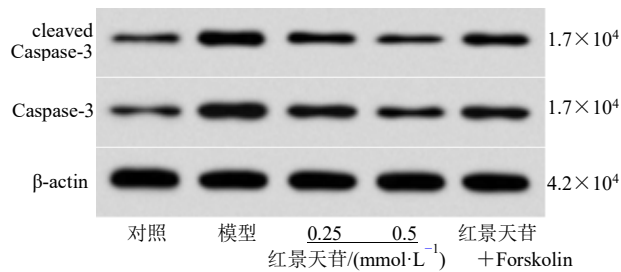


图 5 Western blotting 检测各组细胞 cleaved Caspase-3、Caspase-3 蛋白表达

Fig. 5 Western blotting detected cleaved Caspase-3 and Caspase-3 protein expression in each group

表 3 各组细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Comparison of apoptosis and apoptosis-related protein expression in each groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度/(mmol·L ⁻¹)	细胞凋亡率/%	cleaved Caspase-3 相对表达量	Caspase-3 相对表达量
对照	—	4.33 ± 0.46	0.23 ± 0.03	0.26 ± 0.03
模型	—	25.47 ± 2.63*	0.79 ± 0.08*	0.87 ± 0.09*
红景天苷	0.25	13.72 ± 1.42 [#]	0.58 ± 0.06 [#]	0.64 ± 0.07 [#]
	0.5	6.28 ± 0.65 ^{#&}	0.34 ± 0.04 ^{#&}	0.38 ± 0.04 ^{#&}
红景天苷 + Forskolin	0.5 + 0.02	12.53 ± 1.31 [@]	0.55 ± 0.06 [@]	0.62 ± 0.07 [@]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与红景天苷 0.25 mmol·L⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与红景天苷 0.5 mmol·L⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs salidroside 0.25 mmol·L⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs salidroside 0.5 mmol·L⁻¹ group.

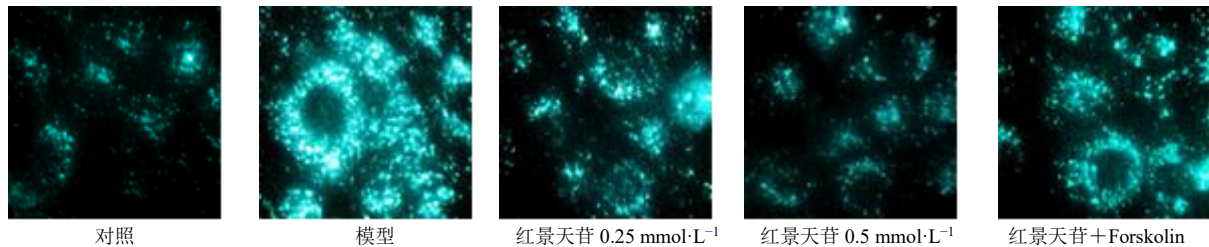


图 6 MDC 观察细胞自噬空泡形成 ($\times 1600$)

Fig. 6 MDC observed the formation of autophagy vacuoles ($\times 1600$)

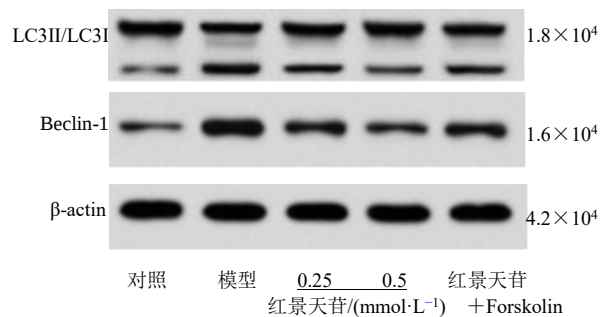


图 7 Western blotting 检测各组细胞 LC3II/LC3I、Beclin-1 蛋白表达

Fig. 7 Western blotting detected the expression of LC3II/LC3I and Beclin-1 proteins in cells of each group

著降低 ($P < 0.05$), 且呈浓度相关性; 与红景天苷 0.5 mmol/L 组比较, 红景天苷 + Forskolin 组细胞荧光增强, LC3II/LC3I、Beclin-1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 见图 6、7 及表 4。

2.5 各组细胞 cAMP/PKA/CREB 通路蛋白表达情况

与模型组比较, 红景天苷 (0.25、0.5 mmol/L) 组细胞 cAMP 水平及 PKA、p-CREB/CREB 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 且呈浓度相关性; 与红景天苷 0.5 mmol/L 组比较, 红景天苷 + Forskolin 组细胞 cAMP 水平及 PKA、p-CREB/CREB 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 见图 8、表 5。

表 4 各组细胞自噬相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 4 Comparison of autophagy related protein expression in each groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度/(mmol·L ⁻¹)	蛋白相对表达量	
		LC3II/LC3I	Beclin-1
对照	—	0.34 ± 0.04	0.25 ± 0.03
模型	—	0.88 ± 0.09*	0.81 ± 0.09*
红景天苷	0.25	0.67 ± 0.08 [#]	0.59 ± 0.06 [#]
	0.5	0.41 ± 0.05 ^{#&}	0.33 ± 0.04 ^{#&}
红景天苷 + Forskolin	0.5 + 0.02	0.65 ± 0.07 [@]	0.56 ± 0.06 [@]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与红景天苷 0.25 mmol·L⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与红景天苷 0.5 mmol·L⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs salidroside 0.25 mmol·L⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs salidroside 0.5 mmol·L⁻¹ group.

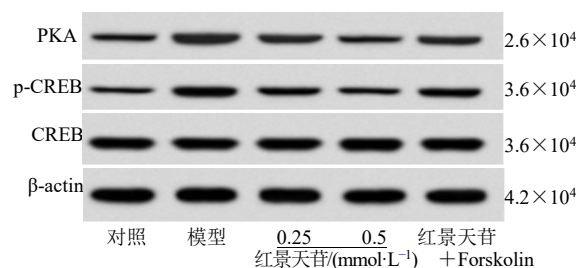


图 8 Western blotting 检测各组细胞 PKA、p-CREB、CREB 蛋白表达
Fig. 8 Western blotting detected the expression of PKA, p-CREB, and CREB protein in each group

表 5 各组细胞 cAMP/PKA/CREB 信号通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度/(mmol·L ⁻¹)	cAMP/(nmol·L ⁻¹)	蛋白相对表达量	
			PKA	p-CREB/CREB
对照	—	6.03±0.62	0.32±0.04	0.38±0.04
模型	—	13.96±1.41*	0.82±0.09*	0.90±0.10*
红景天苷	0.25	10.31±1.06 [#]	0.61±0.07 [#]	0.68±0.07 [#]
	0.5	6.72±0.69 ^{#&}	0.36±0.04 ^{#&}	0.43±0.05 ^{#&}
红景天苷+ Forskolin	0.5+0.02	9.81±1.02 [@]	0.59±0.06 [@]	0.66±0.07 [@]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与红景天苷 0.25 mmol·L⁻¹ 组比较: [&] $P < 0.05$; 与红景天苷 0.5 mmol·L⁻¹ 组比较: [@] $P < 0.05$ 。
* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs salidroside 0.25 mmol·L⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs salidroside 0.5 mmol·L⁻¹ group.

善糖尿病诱导的视网膜黄斑变性^[11]。红景天苷可减轻糖尿病小鼠眼底的微血管病变, 保护视网膜正常屏障功能^[12]。红景天苷可抑制 cleaved-Caspase3 蛋白的表达抑制视网膜神经节细胞凋亡^[13]。本研究结果显示, 红景天苷可促进 RGC-5 细胞增殖, 减轻高糖诱导的 RGC-5 细胞损伤, 说明红景天苷对糖尿病视网膜病变具有保护作用。

高糖刺激后 RGC-5 细胞出现氧化损伤, 主要是高糖可促使 RGC-5 细胞内 ROS 水平升高, 并且降低 SOD 活性, 以至于细胞内多余的 ROS 无法及时清除, 在细胞内大量聚集, 氧化蛋白质、DNA、脂质等分子, 促使脂质过氧化产物 MDA 大量生成, 氧化损伤发生^[14]。RGC 细胞凋亡会引起视网膜毛细血管病变, 致使患者视力下降, 是糖尿病视网膜病变早期的重要标志, 而 ROS 引发的氧化应激损伤可通过 Caspase 途径诱导细胞凋亡发生, 其中 caspase-3 作为 Caspase 家族成员之一, 其被活化成 cleaved Caspase-3 后可促进细胞凋亡。另外高糖刺激可促使 RGC-5 细胞过度自噬, 进而损伤细胞, 加剧细胞凋亡。其中 LC3II/LC3I 与 Beclin-1 均是参与自噬体形成的关键标志物。本研究结果显示, 高糖环境下, RGC-5 细胞内的 ROS 水平、MDA 含量及

3 讨论

糖尿病视网膜病变作为一种影响视力甚至失明的慢性进行性疾病, 是全世界视力损伤和失明的主要原因之一^[9]。视网膜可以将光转化成为神经冲动并通过视神经传递到大脑, 而视网膜神经节细胞是一种位于视网膜内表面附近的神经元细胞, 是视神经的重要组成部分, 高糖诱导其损伤是引发糖尿病视网膜病变发生的重要原因^[10]。红景天苷作为提取自中药红景天中主要的活性成分, 其在治疗慢性病特别是糖尿病相关疾病具有重要作用。研究显示, 红景天苷可改善糖尿病视网膜的病理结构, 改

cleaved Caspase-3、Caspase-3、LC3II/LC3I、Beclin-1 表达升高, SOD 活性降低, 而红景天苷处理不仅降低 ROS 水平、MDA 含量及 cleaved Caspase-3、Caspase-3、LC3II/LC3I、Beclin-1 蛋白表达, 还提高了 SOD 活性。另有研究显示, 降低 ROS 水平及 MDA 含量, 提高 SOD 活性, 可抑制氧化应激反应, 减轻高糖刺激的人视网膜内皮细胞的损伤^[15]。抑制 cleaved Caspase-3 表达可减轻细胞凋亡, 改善糖尿病视网膜病变, 对糖尿病小鼠的视网膜发挥保护作用^[16]。抑制 LC3II/LC3I、Beclin-1 表达可改善糖尿病视网膜病变^[17]。抑制 LC3II/LC3I、Beclin-1 表达可抑制自噬, 进而降低高糖刺激的大鼠视网膜内皮细胞中的 ROS 水平和凋亡^[18]。进一步说明了红景天苷可通过抑制氧化应激反应、凋亡及自噬, 改善高糖诱导的 RGC-5 细胞损伤。

cAMP/PKA/CREB 信号通路是细胞内调控氧化应激反应的经典信号途径, 其中高糖环境下, 细胞内产生大量的 ROS, 激活 cAMP, 促进下游 PKA 及其底物 CREB 蛋白磷酸化, 然后影响基因转录与蛋白合成, 进而促进自噬与凋亡, 加剧高糖诱导的 RGC-5 细胞损伤^[19]。本研究结果显示, 高糖环境下, cAMP 水平及 PKA、p-CREB/CREB 蛋白表达升高,

而红景天苷处理可降低 cAMP 水平及 PKA、p-CREB/CREB 蛋白表达,另外 cAMP/PKA/CREB 通路激活剂 Forskolin 处理,发现 cAMP 水平、PKA、p-CREB/CREB 表达升高,减弱了红景天苷对高糖诱导的 RGC-5 细胞损伤的改善作用。另有研究显示,PKA 通路激活参与增生性玻璃体视网膜病变的发病机制,抑制 PKA 可有效抑制增生性玻璃体视网膜病变^[20]。抑制 PKA/CREB 信号通路可减轻视网膜变性和视网膜色素上皮细胞损伤^[21]。进一步说明红景天苷可通过抑制 cAMP/PKA/CREB 信号通路减轻高糖诱导的 RGC-5 细胞损伤。

综上所述,红景天苷可减轻高糖诱导的 RGC-5 细胞损伤,与抑制 cAMP/PKA/CREB 信号通路相关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Filippov V M, Petrachkov D V, Budzinskaya M V, *et al.* Modern concepts of pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. *Vestn Oftalmol*, 2021, 137(5. Vyp. 2): 306-313.
- [2] Tan T E, Wong T Y. Diabetic retinopathy: Looking forward to 2030 [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 13: 1077669.
- [3] Lin K Y, Hsieh W H, Lin Y B, *et al.* Update in the epidemiology, risk factors, screening, and treatment of diabetic retinopathy [J]. *J Diabetes Investig*, 2021, 12(8): 1322-1325.
- [4] 蔡静, 黄文静, 刘时喜, 等. 基于 TGF- β 1/Smad3 信号探讨红景天苷对缺血性脑卒中大鼠的神经保护作用机制 [J]. *中草药*, 2020, 51(24): 6294-6301.
- [5] Feng Z, Yang Y, Shi C X, *et al.* Salidroside ameliorates diabetic retinopathy and Müller cell inflammation via the PI3K/Akt/GSK-3 β /NF- κ B pathway [J]. *Mol Vis*, 2024, 30: 1-16.
- [6] Fang X L, Zhang Q, Xue W W, *et al.* Suppression of cAMP/PKA/CREB signaling ameliorates retinal injury in diabetic retinopathy [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2023, 39(9): 916-926.
- [7] 赵宁, 于洪丹, 冯珍, 等. 红景天苷抑制高糖诱导大鼠视网膜 Müller 细胞的凋亡 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(11): 1664-1669.
- [8] Liu L, Jiang Y D, Steinle J J. Forskolin regulates retinal endothelial cell permeability through TLR4 actions *in vitro* [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(12):4487-4492.
- [9] Kour V, Swain J, Singh J, *et al.* A review on diabetic retinopathy [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2024, 20(6): e201023222418.
- [10] Soni D, Sagar P, Takkar B. Diabetic retinal neurodegeneration as a form of diabetic retinopathy [J]. *Int Ophthalmol*, 2021, 41(9): 3223-3248.
- [11] Zhang L C, Li N, Xu M, *et al.* Salidroside protects RGC from pyroptosis in diabetes-induced retinopathy associated with NLRP3, NFE2L2 and NGK1, revealed by network pharmacology analysis and experimental validation [J]. *Eur J Med Res*, 2024, 29(1): 60.
- [12] Yao F, Jiang X Y, Qiu L, *et al.* Long-term oral administration of salidroside alleviates diabetic retinopathy in db/db mice [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 861452.
- [13] Li J, Liu W Q, Wang Y F, *et al.* Salidroside inhibits ganglion cell apoptosis by suppressing the Müller cell inflammatory response in diabetic retinopathy [J]. *Curr Eye Res*, 2023, 48(8):758-769.
- [14] Zhao L, Sun J B, Shi S Q, *et al.* Kaempferol protects retinal ganglion cells from high-glucose-induced injury by regulating vasohibin-1 [J]. *Neurosci Lett*, 2020, 716: 134633.
- [15] Li S Y, Lu S H, Wang L, *et al.* Effects of amygdalin on ferroptosis and oxidative stress in diabetic retinopathy progression via the NRF2/ARE signaling pathway [J]. *Exp Eye Res*, 2023, 234: 109569.
- [16] Liao W L, Huang C P, Wang H P, *et al.* Diosgenin, a natural steroidal sapogenin, alleviates the progression of diabetic retinopathy in diabetic mice [J]. *In Vivo*, 2023, 37(2): 661-666.
- [17] Li R, Chen L, Yao G M, *et al.* Effects of quercetin on diabetic retinopathy and its association with NLRP3 inflammasome and autophagy [J]. *Int J Ophthalmol*, 2021, 14(1): 42-49.
- [18] Wu H X, Li G D, Chen W W, *et al.* Drp1 knockdown represses apoptosis of rat retinal endothelial cells by inhibiting mitophagy [J]. *Acta Histochem*, 2022, 124(1): 151837.
- [19] Benchoula K, Parhar I S, Madhavan P, *et al.* CREB nuclear transcription activity as a targeting factor in the treatment of diabetes and diabetes complications [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 188: 114531.
- [20] Lyu Y L, Xu W, Zhang J P, *et al.* Protein kinase A inhibitor H89 attenuates experimental proliferative vitreoretinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, 61(2): 1.
- [21] Hu Y F, Chen J Q, Wang Y W, *et al.* Fat mass and obesity-associated protein alleviates A β ₁₋₄₀ induced retinal pigment epithelial cells degeneration via PKA/CREB signaling pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2023, 47(3): 584-597.

[责任编辑 高源]