

红花黄色素调控 p38MAPK 信号通路保护大鼠糖尿病视网膜神经节细胞的实验研究

陈 燕, 郑寒松, 高 举

河南省驻马店市中心医院, 河南 驻马店 463000

摘 要: **目的** 探讨红花黄色素通过调控 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 信号通路对糖尿病 (DM) 大鼠视网膜神经节细胞 (RGC) 的保护作用。**方法** 取 50 只大鼠, 其中 40 只采用单次 ip 链脲佐菌素法制备 DM 大鼠模型, 并将其随机分为模型组和红花黄色素低、中、高剂量组, 其余 10 只为对照组; 红花黄色素低、中、高剂量组分别 ip 20、40、80 mg/kg 红花黄色素, 对照组和模型组 ip 等量生理盐水溶液, 连续给药 6 周。观察大鼠一般状态, 采用苏木精-伊红 (HE) 染色法观察 RGC 形态学变化并计数; 采用原位凋亡 (TUNEL) 法检测并对比 RGC 凋亡率; 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 法和蛋白免疫印迹法检测各组大鼠视网膜组织中 p38MAPK、磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3)、血管内皮生长因子 (VEGF) mRNA 和蛋白表达情况, 并对比 p-p38MAPK 与 p38MAPK 蛋白表达比值。**结果** 实验期间所有大鼠均存活, 对照组大鼠无异常; 模型组大鼠血糖较高、饮水量及尿量较大, 体质量减轻; 红花黄色素低、中、高剂量组大鼠各指标较模型组均有所改善。病理学观察发现, 对照组大鼠视网膜各层细胞均无异常; 模型组大鼠 RGC 排列紊乱、细胞核稀疏, 双极细胞层及感光细胞层细胞数目减少, 排列稀疏; 红花黄色素低、中、高剂量组大鼠 RGC 及外层双极细胞层和感光细胞层异常程度均较模型组减轻, 其中红花黄色素高剂量组减轻最为明显。与对照组比较, 模型组大鼠 RGC 数量显著减少 ($P<0.05$), 凋亡率显著升高 ($P<0.05$), 视网膜中 Caspase-3、VEGF mRNA 及蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), p-p38MAPK/p38MAPK 值显著升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 红花黄色素低、中、高剂量组大鼠 RGC 数量显著增多 ($P<0.05$), RGC 凋亡率显著降低 ($P<0.05$), 视网膜 Caspase-3、VEGF mRNA 及蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), p-p38MAPK/p38MAPK 值显著降低 ($P<0.05$), 且各剂量组间比较差异显著 ($P<0.05$)。**结论** 红花黄色素可通过抑制 p38MAPK 信号通路保护 DM 大鼠 RGC, 减少其凋亡, 其中 80 mg/kg 的红花黄色素保护作用最佳。

关键词: 红花黄色素; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 糖尿病; 视网膜神经节细胞; 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3; 血管内皮生长因子

中图分类号: R587.26 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)11-2639-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.020

Protection of diabetic retinal ganglion cells by safflower yellow pigment regulated p38MAPK signaling pathway

CHEN Yan, ZHENG Han-song, GAO Ju

Zhumadian Central Hospital, Henan Province, Zhumadian 463000, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of safflower yellow pigment (SYP) on diabetic (DM) retinal ganglion cells (RGC) by regulating p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. **Methods** Selected 50 rats and 40 of them were used to establish DM rat model by single intraperitoneal injection of streptozotocin. They were randomly divided into model group and safflower yellow pigment low, medium and high dose groups, and the remaining 10 rats was control group. Safflower yellow pigment low, medium and high dose groups were intraperitoneally injected with 20, 40, and 80 mg/kg of SYP. Model group and control group were intraperitoneally injected with the same amount of physiological saline solution for six weeks. The general state of the rats was observed, and the morphological changes of RGC were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the number of RGC cells was counted. RGC apoptosis rate was detected by *in situ* apoptosis (TUNEL) method. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expressions of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphorylated p38MAPK (p-p38MAPK) and cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme-3 (Caspase-3), vascular

收稿日期: 2019-01-07

作者简介: 陈 燕 (1973—), 女, 河南遂平人, 主治医师, 研究方向为眼底病及眼科整形。E-mail: 676969726@qq.com

endothelial growth factor polyclonal antibody (VEGF), and protein expression ratio of p-p38/p38MAPK was compared. **Results** All the rats survived during the experiment. There were no abnormalities in the rats in the control group. The blood glucose in the model group was higher, the diet and urine volume were larger, and the body weight was reduced. The safflower yellow pigment low, medium and high dose groups were better than the model group. Pathological observation showed that there were no abnormalities in the cells of the retina of the control group, while the RGC cells in the model group were disordered arranged and the nucleus were sparse, and the number of cells in the bipolar cell layer and the photoreceptor layer was reduced, and the arrangement was sparse. The abnormalities of RGC cells and outer bipolar cells in the safflower yellow pigment low, medium and high dose groups were significantly lower than those in the model group, and the high dose groups was the most obvious. There was significant difference in the number of RGC between groups ($P < 0.05$). Compared with the control group, the number of RGC in the model group was significantly decreased ($P < 0.05$), the apoptotic rate was significantly increased ($P < 0.05$), the levels of Caspase-3 and VEGF in the retina were significantly increased ($P < 0.05$), and the values of p-p38MAPK/p38MAPK were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the number of RGC was increased significantly ($P < 0.05$), the apoptotic rate of RGC was decreased significantly ($P < 0.05$), the expression levels of Caspase-3, VEGF and protein in retina were decreased significantly ($P < 0.05$), and the value of p-p38MAPK/ p38MAPK was decreased significantly ($P < 0.05$), and the differences among the dose groups were significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Safflower yellow pigment can protect RGC of DM rats by inhibiting p38MAPK signaling pathway, and reduce RGC apoptosis. The 80 mg/kg of SYP has the best protective effect.

Key words: safflower yellow pigment; p38 mitogen-activated protein kinase; diabetes; retina ganglion cells; Caspase-3; VEGF

糖尿病 (DM) 常导致视网膜损伤, 据统计, 在各型 DM 患者中糖尿病视网膜病 (DR) 发生率为 38%~70%, 随着病程的延长及病情加重, 约 5% 的 DM 患者因并发 DR 而失明, 且随着 DM 发病率不断升高, DR 发病率随之升高, 对人们的生命健康及生活质量造成严重影响^[1]。研究发现, 视网膜神经元细胞对高糖状态十分敏感, 故治疗多以控制血糖为主, 但仍有部分患者治疗效果不佳^[2]。另有研究发现, 视网膜神经节细胞 (RGC) 减少及凋亡增加是 DR 进展过程中主要病理变化^[3], 因此, 寻找有效药物和治疗靶点, 对患者预后有重要意义。菊科植物红花 *Chelonopsis pseudobracteata* var. *rubra* C. Y. Wu et H. W. Li 是一种活血化瘀的常用中药, 红花黄色素是红花花瓣的提取物, 主要成分为黄酮类化合物。研究表明^[4], 红花黄色素具有活血化瘀、通经止痛等多种作用, 其对视网膜相关疾病作用的研究已成为热点, 但对 DM 早期视网膜病变 RGC 影响的研究较少。鉴于此, 本研究应用不同剂量红花黄色素对 DM 大鼠进行干预, 观察其对 RGC 保护作用及 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 信号通路的影响。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 50 只, 6 周龄, 体质量 (200±20) g, 购自斯贝福北京实验动物科技有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2017-0001, 裂隙灯和检眼镜检查眼部均无病变, 血糖仪检查血糖均正常,

饲养于 (24±1) °C、12 h/12 h 明暗循环、60%湿度条件下。

1.2 药物、试剂和仪器

链脲佐菌素 (STZ, 批号 V900890-1G, 美国 Sigma 公司); 注射用红花黄色素 (批号 160703, 浙江永宁药业股份有限公司); TUNEL 检测细胞凋亡试剂盒 (美国罗氏公司); 枸橼酸钠 (美国 Sigma 公司); 兔抗大鼠 p38MAPK、磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK) 单抗、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3) 单抗、血管内皮生长因子 (VEGF) 多抗、二抗 (Santa Cruz 公司); One Touch II 型血糖仪 (美国强生公司); SM2010R 切片机 (徕卡显微系统贸易公司); 3000AL 酶标仪 (上海闪谱生物科技有限公司); iQ5 实时荧光定量 PCR 仪 (qRT-PCR, Bio-Rad 公司); 电泳仪 (北京六一仪器厂); 天能 5200 全自动化学发光成像分析系统 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 DM 大鼠模型制备及给药

取 50 只大鼠, 其中 40 只一次性 ip 60 mg/kg STZ (用 pH 4.5、0.1 mol/L 枸橼酸钠溶解), 72 h 后快速血糖仪检测, 空腹血糖值 (FBG) >16.7 mmol/L 则模型制备成功。将模型大鼠按体质量分为模型组和红花黄色素低、中、高剂量组, 每组 10 只。其余 10 只大鼠为对照组, ip 等剂量枸橼酸钠 (pH 4.5、0.1 mol/L)。红花黄色素低、中、高剂量组大鼠分别 ip 20、40、80 mg/kg 注射用红花黄色素 (溶于生理盐

水中)^[5], 对照组和模型组 ip 等量生理盐水溶液, 连续给药 6 周。

2.2 标本采集

末次给药 2 h 后, 大鼠 ip 10%水合氯醛麻醉, 迅速剖开胸腔, 暴露心脏, 剪开右心耳, 从左心室快速灌注 4%多聚甲醛, 速度先快后慢, 持续 30 min, 灌注量约 250 mL, 大鼠四肢僵直、口唇苍白则固定良好。消毒双侧眼球周围皮肤, 无菌镊夹起颞侧球结膜, 剪开暴露上直肌, 钝性分离并暴露视神经, 于眼球后 2 mm 处将其离断, 摘除眼球, 双侧眼球分别迅速放入预冷的 4%多聚甲醛和生理盐水中, 沿角膜缘将眼球剪开, 取出晶状体和玻璃体, 仔细分辨眼后节并分离视网膜, 分别保存备用。

2.3 病理组织学观察

取固定后的眼后节标本, 乙醇梯度脱水 (70%→80%→90%→95%→100%), 二甲苯透明后, 石蜡包埋, 连续切片, 层厚 5 μm。切片经乙醇梯度脱蜡至水 (100%→95%→85%→75%)、蒸馏水中各 15 min, 将标本放于苏木精中染色 10 min, 自来水冲洗 3 遍, 放入乙醇梯度脱水 (50%→70%→80%→90%→95%) 各 1 min, 0.9%伊红染色 1 min, 100%乙醇 1 min、2 次, 二甲苯透明 15 min、2 次, 中性树脂胶封片后显微镜下观察组织病理学变化, 每张切片随机选取 5 个视野, 进行 RGC 计数, 取平均值。

2.4 RGC 凋亡率检测

视网膜标本石蜡切片常规脱蜡, 乙醇水化 (100%→95%→85%→70%→50%), 滴加蛋白酶 K 孵育, 2%过氧化氢 (H₂O₂) 孵育 5 min, 每张切片滴加 50 μL 末端核酸转移酶 (TDT) 反应液, 37 °C 避光 60 min, 滴加 50 μL 过氧化物标记的抗地高辛抗体, 湿盒中室温孵育 30 min, 链霉亲和素-生物素复合物 (SABC) 法染色, DAB 稀释液进行显色, 光镜下观察和控制反应时间。显色成功后用双蒸水终止反应, 苏木精核染 2 min, 脱水、透明后中性树脂封片, 设置阴性对照 (用 PBS 替换 TDT 酶), 其余步骤同上。光学显微镜下观察, 以细胞核或细胞浆黄色及棕黄色染色细胞记为凋亡细胞, 计算细胞凋亡率。

细胞凋亡率 = 视野内凋亡细胞数 / 视野内细胞总数

2.5 qRT-PCR 法检测 p38MAPK、Caspase-3、VEGF mRNA 表达

取视网膜放入预冷 PBS, 洗涤后于 4 °C 离心, 弃去上清液, 下层沉淀加入预冷 Trizol 后采用超声裂解, 获得总 RNA, 逆转录得到 cDNA, 产物鉴定

后, 进行 qRT-PCR 反应。设定反应体系: SYBR Premix Ex Taq 10.5 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 1 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 11.5 μL; 反应条件: 95 °C 预变性 1 min; 95 °C 变性 20 s, 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 60 s, 重复 40 个循环。以 β-actin 为内参, 2^{-ΔΔCt} 法计算 p38MAPK、Caspase-3、VEGF 基因相对表达量, 重复 3 次计算平均值。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

基因	引物序列 (5'→3')
p38MAPK	正向 AACGATGCACGATCGATGCACA
	反向 ATCGTACGATCGTACGTACGGT
Caspase-3	正向 ACGTACGTGTAGCTGGCTACGC
	反向 GTCGTAGCTGATCTATGCATCGC
VEGF	正向 CGTACGTAGCTATCGCTAGCCACA
	反向 CTGATGCTAGCTAGCTGATCGATC
β-actin	正向 CTAGCTAGCTAGCTAGCTGATCA
	反向 CTAGCTAGACACTGTGCATGCTG

2.6 Western blotting 法检测 p38MAPK、p-p38MAPK、Caspase-3、VEGF 蛋白表达

取视网膜放入预冷 PBS, 洗涤后于 4 °C 离心, 弃去上清液, 下层沉淀体积估算后, 计入 5 倍体积悬浮缓冲液 [0.1 mol/L NaCl、0.01 mol/L Tris (pH 7.6)、0.001 mol/L EDTA (pH 8.0)、1 μg/mL Aprotinin、100 μg/mL PMSF), 迅速加入等体积上样缓冲液, 经超声裂解、沸水浴、再次超声裂解, 离心取上清, 蛋白定量后, 各泳道加入 50 μg 样品, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转 50 min 至硝酸纤维膜, 加入封闭液室温封闭 1 h, 加入一抗 (1:1 000) 室温孵育 4 h, 然后加入二抗 (1:10 000), 室温孵育 0.5 h, 曝光、显影, 扫描拍照, 采用图像分析软件进行处理, 以 p-p38MAPK、p38MAPK、Caspase-3、VEGF 蛋白与内参 β-actin 蛋白灰度比值表示其相对表达量。

2.7 统计学分析

采用统计学软件 SPSS 22.0 处理数据, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本计量资料比较采用单因素方差分析, 两两样本比较采用 SNK-*q* 检验。

3 结果

3.1 大鼠一般状态观察

实验期间所有大鼠均存活, 对照组大鼠体质量、血糖、尿量及饮食均无异常, 模型组大鼠血糖较高、饮食量及尿量较大, 体质量减轻, 红花黄色素低、

中、高剂量组大鼠各指标较模型组均有所改善。

3.2 红花黄色素对 DM 大鼠 RGC 形态及存活数量的影响

对照组大鼠 RGC 细胞呈单层、排列有序、细胞核清晰，外层双极细胞及感光上皮细胞排列紧密整齐；模型组大鼠 RGC 细胞排列紊乱、细胞核稀疏，双极细胞层及感光细胞层细胞数目减少，排列稀疏；红花黄色素低、中、高剂量组大鼠 RGC 细胞、外层双极细胞层和感光细胞层异常程度均较模型组减轻，其中高剂量组减轻最为明显。与对照组比较，模型组大鼠 RGC 数量显著减少 ($P<0.05$)，与模型组比较，红花黄色素低、中、高剂量组大鼠 RGC 数量显著增多 ($P<0.05$)，且各剂量组间差异显著 ($P<0.05$) 见图 1、表 2。

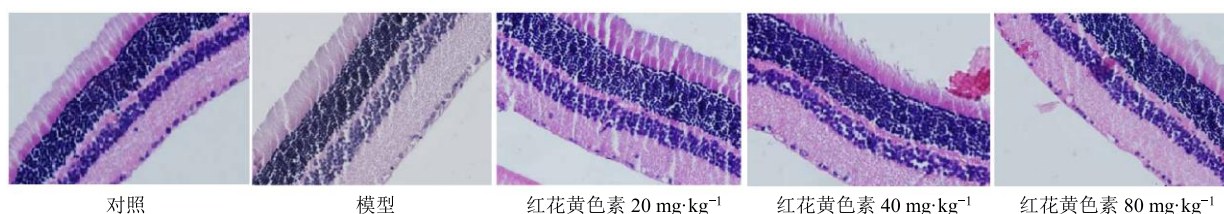


图 1 各组大鼠视网膜组织 HE 染色 (×400)

Fig. 1 HE staining of retinal tissue of each group of rats (×400)

表 2 红花黄色素对 DM 大鼠 RGC 数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)
Table 2 Effect of safflower yellow pigment on number of RGC in DM rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	RGC 数量/个
对照	—	24.10±2.15
模型	—	4.71±0.50*
红花黄色素	20	9.32±1.04*#
	40	14.20±1.52*#△
	80	20.66±1.98*#△▲

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与红花黄色素 20 mg·kg⁻¹ 组比较: △ $P<0.05$; 与红花黄色素 40 mg·kg⁻¹ 组比较: ▲ $P<0.05$, 下同

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group; △ $P<0.05$ vs SYP 20 mg·kg⁻¹ group; ▲ $P<0.05$ vs SYP 40 mg·kg⁻¹ group, same as below

3.3 红花黄色素对 DM 大鼠 RGC 凋亡的影响

与对照组比较，模型组大鼠 RGC 凋亡率显著升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，红花黄色素低、中、高剂量组大鼠 RGC 凋亡率显著降低 ($P<0.05$)，且各剂量组间比较差异显著 ($P<0.05$)，见图 2、表 3。

3.4 红花黄色素对 DM 大鼠 RGC 中 p38MAPK、Caspase-3、VEGF mRNA 表达的影响

qRT-PCR 结果表明，与对照组比较，模型组大鼠 RGC 中 Caspase-3、VEGF mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$)，与模型组比较，红花黄色素低、中、高剂量组大鼠 RGC 中 Caspase-3、VEGF mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$)，且各剂量组间比较差异显著 ($P<0.05$)。各组大鼠 p38MAPK mRNA 表达水平无显著差异，见表 4。

3.5 红花黄色素对 DM 大鼠视网膜 Caspase-3、VEGF 蛋白表达及 p-p38MAPK/p38MAPK 值的影响

Western blotting 结果表明，与对照组比较，模型组大鼠视网膜 Caspase-3、VEGF 蛋白表达水平及 p-p38MAPK/p38MAPK 值显著升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，红花黄色素低、中、高剂量组大鼠视网膜 Caspase-3、VEGF 蛋白表达水平及 p-p38MAPK/p38MAPK 值显著降低 ($P<0.05$)，且各剂量组间比较差异显著 ($P<0.05$)，见表 5、图 3。

4 讨论

DR 是导致人类失明的主要原因，其发病机制十分复杂，目前仍未完全阐明，经典理论认为其发

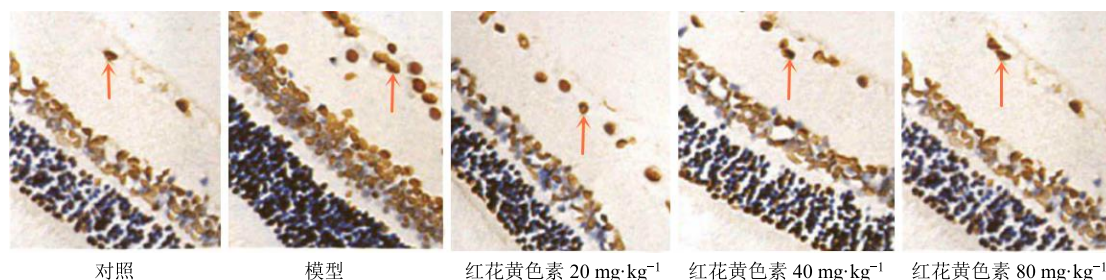


图 2 各组大鼠视网膜组织 TUNEL 染色 (×400, 箭头所示为凋亡 RGC)

Fig. 2 TUNEL staining of retinal tissue of each group of rats (×400, arrow showing apoptotic RGC)

表3 红花黄色素对DM大鼠RGC凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of safflower yellow pigment on RGC apoptosis in DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	凋亡率/%
对照	—	0.78±0.08
模型	—	27.10±3.54*
红花黄色素	20	19.45±2.16*#
	40	12.38±1.85*#△
	80	5.30±0.74*#△▲

表4 红花黄色素对DM大鼠视网膜中p38MAPK、Caspase-3、VEGF mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of safflower yellow pigment on mRNA expressions of p38 MAPK, Caspase 3, and VEGF in retina of DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量		
		p38MAPK	Caspase-3	VEGF
对照	—	0.62±0.07	0.34±0.04	0.10±0.01
模型	—	0.61±0.06	0.59±0.06*	0.42±0.04*
红花黄色素	20	0.64±0.07	0.53±0.05*#	0.37±0.04*#
	40	0.65±0.08	0.48±0.05*#△	0.31±0.03*#△
	80	0.62±0.06	0.41±0.04*#△▲	0.20±0.02*#△▲

表5 红花黄色素对DM大鼠视网膜Caspase-3、VEGF蛋白表达及p-p38MAPK/p38MAPK值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of safflower yellow pigment on protein expressions of Caspase-3, VEGF and p-p38MAPK/p38MAPK in retina of DM rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量		
		p-p38MAPK/p38MAPK	Caspase-3	VEGF
对照	—	0.25±0.03	0.28±0.03	0.21±0.02
模型	—	1.03±0.12*	1.22±0.15*	1.25±0.16*
红花黄色素	20	0.85±0.10*#	1.01±0.11*#	0.97±0.10*#
	40	0.52±0.06*#△	0.54±0.05*#△	0.52±0.06*#△
	80	0.33±0.04*#△▲	0.32±0.04*#△▲	0.31±0.04*#△▲

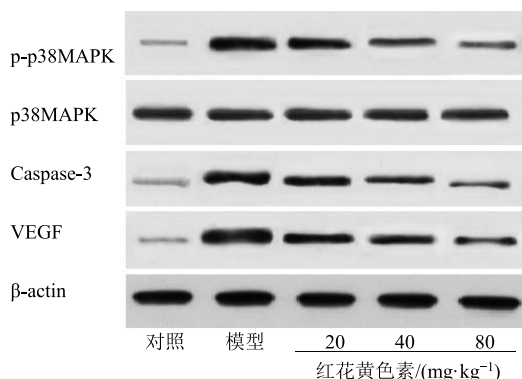


图3 红花黄色素对DM大鼠视网膜Caspase-3、VEGF蛋白表达及p-p38MAPK/p38MAPK值的影响

Fig. 3 Effects of safflower yellow pigment on protein expressions of Caspase-3, VEGF and p-p38MAPK/p38MAPK in retina of DM rats

程。已有研究证实,高糖状态可有效激活p38MAPK信号通路^[9],但关于高糖对视网膜组织p38MAPK信号通路的影响研究较少,因此探究红花黄色素对

病机制为微血管病变^[6]。近年来研究发现^[7],在DR特征性微血管病理改变前,即DM早期已出现神经元病理改变,但尚无定论。DR早期主要改变为毛细血管周细胞丢失及其基底膜增厚,并伴随微血管瘤。随着DM病程延长,血-视网膜屏障(BRB)功能破坏及毛细血管闭塞,伴随新生血管及纤维组织生成^[8]。p38MAPK是传递细胞内、外信号刺激的重要通路之一,参与调控细胞增殖、生长及凋亡等多种生物过

视网膜RGC的保护作用及其对该信号通路的影响对DR的治疗有重要意义。

本研究中,红花黄色素干预后DM大鼠一般状态及病理组织学异常较模型组均有所改善,且高剂量组改善最为明显。与模型组比较,红花黄色素各剂量组大鼠RGC数量显著增多,凋亡率降低($P < 0.05$),提示红花黄色素可保护DM视网膜病变大鼠RGC,减少其凋亡,其中高剂量效果最佳。DM患者由于体内高糖持续刺激,可产生大量的活性氧(ROS),ROS的累积对机体RGC凋亡起促进作用,进而加重DR病情^[10-11]。红花黄色素具有扩张血管、改善微循环、清除机体过多氧自由基、抗炎等多种作用。辛蕾等^[12]研究发现,羟基红花黄色素A(HSYA)可通过降低紫外线损伤的人皮肤Hacat细胞、ESF细胞中ROS水平,进而发挥对人表皮细胞的保护作用。本研究中红花黄色素对DM大鼠RGC的保护作用是否与降低ROS水平有关还需进一步探讨。

此外, 本研究中, 与模型组比较, 红花黄色素各剂量组大鼠视网膜 Caspase-3、VEGF mRNA 及蛋白水平显著降低, p-p38MAPK/p38MAPK 值显著降低, 表明红花黄色素可通过抑制 p38MAPK 信号通路提高 RGC 存活率, 且减少其凋亡。p38MAPK 广泛分布于细胞浆中, 可被氧化应激信号启动并介导凋亡信号通路, 是细胞内多种信号传递的共同通路, Caspase-3 是其下游重要蛋白, 同时是凋亡信号的执行者^[13]。DM 高糖条件下, 氧化应激等信号刺激激活 p38MAPK, p-p38MAPK 激活其下游 Caspase-3, 启动周围神经细胞凋亡过程, 造成 RGC 细胞损伤。VEGF 广泛分布于视网膜微血管周细胞、神经节细胞等眼部细胞中。既往研究表明^[14-15], 在 DR 发病过程中, 视网膜局部 VEGF 异常高表达参与调控视网膜微血管通透性, 造成白细胞黏滞及 BRB 破坏, 导致视网膜渗出、水肿等改变。另外, VEGF 是一种特异性促血管内皮细胞有丝分裂因子, 可直接促进血管内皮增殖, 促进脉络膜新生血管生成, 进一步加速破坏 BRB。现代药理学研究发现, 红花黄色素具有降低白细胞黏滞及抗血小板集聚功能, 可改善微循环^[16], 抑制 VEGF 表达。本研究中红花黄色素可能通过改善 DM 大鼠视网膜微血管循环状态, 进而抑制 p38MAPK 磷酸化及其下游 Caspase-3 的表达, 抑制 RGC 凋亡信号通路, 降低 VEGF 表达水平, 最终达到延缓 DR 进展的目的。

综上所述, 红花黄色素可通过抑制 p38MAPK 信号通路保护 DR 大鼠 RGC, 减少其凋亡, 其中 80 mg/kg 红花黄色素保护作用最佳, 提示 p38MAPK 信号通路为红花黄色素抑制 RGC 凋亡的重要通路, 可为红花黄色素相关药物应用于 DM 疾病中 RGC 的保护提供参考, 但是否存在其他调控通路仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 沈旻倩, 杨 华, 袁源智, 等. 上海市嘉定区社区 2 型糖尿病患者糖尿病视网膜病变的流行病学调查 [J]. 中国临床医学, 2017, 24(5): 723-727.
- [2] Paddock E, Looker H C, Piaggi P, *et al.* One-hour plasma glucose compared with two-hour plasma glucose in relation to diabetic retinopathy in American Indians [J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(6): 1212-1217.
- [3] Dimitrova G, Chihara E, Takahashi H, *et al.* Quantitative retinal optical coherence tomography angiography in patients with diabetes without diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(1): 190-196.
- [4] 陈可冀, 付长庚, 丛伟红, 等. 红花黄色素临床应用中国专家共识 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(10): 1167-1173.
- [5] 张 帅. 红花黄色素对大鼠糖尿病视网膜病变的保护作用 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
- [6] Jingi A M, Tankeu A T, Ateba N A, *et al.* Mechanism of worsening diabetic retinopathy with rapid lowering of blood glucose: The synergistic hypothesis [J]. *BMC Endocr Disord*, 2017, 17(1): 63-68.
- [7] Cui Z, Zeng Q, Guo Y, *et al.* Integrated bioinformatic changes and analysis of retina with time in diabetic rats [J]. *Peer J*, 2018, 6(1): 47-52.
- [8] Wan T T, Li X F, Sun Y M, *et al.* Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic retinopathy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 74(1): 145-147.
- [9] Gong W, Zhu G, Li J, *et al.* LncRNA MALAT1 promotes the apoptosis and oxidative stress of human lens epithelial cells via p38MAPK pathway in diabetic cataract [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 144(1): 314-321.
- [10] Guo Y, Song Z, Zhou M, *et al.* Infiltrating macrophages in diabetic nephropathy promote podocytes apoptosis via TNF- α -ROS-p38MAPK pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.18394.
- [11] Calderon G D, Juarez O H, Hernandez G E, *et al.* Oxidative stress and diabetic retinopathy: Development and treatment [J]. *Eye*, 2017, 31(8): 1122-1130.
- [12] 辛 蕾, 苏 欣, 李 莎, 等. 羟基红花黄色素 A 对紫外线致人皮肤细胞系损伤的保护作用 [J]. 西北药学杂志, 2017, 32(5): 281-282.
- [13] Cui F, Gao Y, Zhao W, *et al.* Effect of Tongxinluo on podocyte apoptosis via inhibition of oxidative stress and p38 pathway in diabetic rats [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2016, 13(3): 273-279.
- [14] Bolinger M T, Antonetti D A. Moving past anti-VEGF: Novel therapies for treating diabetic retinopathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(9): 125-130.
- [15] Liu W L. MicroRNA-9 inhibits retinal neovascularization in rats with diabetic retinopathy by targeting vascular endothelial growth factor A [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 61(1): 79-86.
- [16] 郑 萌, 潘瑞艳, 臧宝霞, 等. 羟基红花黄色素 A 抑制血小板活化因子诱导的与支气管哮喘相关信号转导的研究 [J]. 心肺血管病杂志, 2017, 36(7): 590-595.