

## 荆防颗粒对糖尿病小鼠视网膜的保护作用

刘冬光<sup>1,2,3</sup>, 赵文学<sup>1,2,3#</sup>, 徐燕<sup>1,2,3\*</sup>, 姚茹<sup>1,2,3</sup>, 孟雪<sup>1,2,3</sup>, 姚景春<sup>1,2,3</sup>, 刘忠<sup>1,2,3\*</sup>

1. 鲁南制药集团股份有限公司 新药药理中心, 山东 临沂 276006

2. 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 山东 临沂 276006

3. 临沂市天然药物免疫药理毒理重点实验室, 山东 临沂 276006

**摘要:**目的 探讨荆防颗粒对 db/db 小鼠血糖代谢的调控作用及其对视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 的保护作用。方法 将 60 只雄性 db/db 小鼠随机分为模型组、二甲双胍 (120 mg/kg) 组及荆防颗粒 (1、2 g/kg) 组, 每组 15 只, 另取 15 只雄性 db/m 小鼠作为对照组, 每周检测小鼠体质量、空腹血糖、摄食量及饮水量等基础指标, 并在实验结束后进行口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT); 采用 ELISA 检测小鼠视网膜组织白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平和过氧化氢酶 (catalase, CAT)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性; 采用 PAS 染色检测视网膜组织病理变化; 采用 Western blotting 检测视网膜组织中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、紧密连接跨膜蛋白 (Claudin-1)、胰岛素受体底物 1 (insulin receptor substrate 1, IRS1)、磷酸化 IRS1 (phosphorylated IRS1, p-IRS1)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、磷酸化 PI3K (phosphorylated PI3K, p-PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、磷酸化 Akt (phosphorylated Akt, p-Akt)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组小鼠空腹血糖、摄食量、饮水量明显升高 ( $P < 0.01$ ), OGTT 中曲线下面积 (AUC) 显著升高 ( $P < 0.01$ ); 视网膜组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  和 MDA 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ), CAT、SOD 活性显著下降 ( $P < 0.01$ ); 视网膜组织周细胞降低, 新生血管增多 ( $P < 0.01$ ), 并且视网膜组织中 Claudin-1、p-IRS1/IRS1、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Bcl-2 蛋白表达下调 ( $P < 0.01$ ), VEGF、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达上调 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 荆防颗粒组小鼠体质量明显升高 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 空腹血糖、摄食量、饮水量均有不同程度下降 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 视网膜组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MDA 含量显著下降 ( $P < 0.05, 0.01$ ), CAT、SOD 活性显著上升 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 视网膜组织病理形态有所改善, 视网膜组织中 Claudin-1、p-IRS1/IRS1、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Bcl-2 蛋白表达显著上调 ( $P < 0.05, 0.01$ ), VEGF、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达显著下调 ( $P < 0.05, 0.01$ )。结论 荆防颗粒对 db/db 小鼠视网膜病变具有一定的改善作用, 其作用机制可能为调节小鼠视网膜组织中 VEGF 及 Claudin-1 蛋白表达, 进而激活胰岛素受体 IRS-1/PI3K/Akt 信号通路, 启动 Caspase 级联反应, 抑制视网膜上皮细胞的凋亡, 从而对视网膜病变起到一定的保护作用。

**关键词:** 荆防颗粒; 糖尿病; 视网膜; 氧化应激; 凋亡; IRS-1/PI3K/Akt 通路

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)09-2996-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.09.014

## Protective effect of Jingfang Granules on retina of diabetic mice

LIU Dongguang<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Wenxue<sup>1,2,3</sup>, XU Yan<sup>1,2,3</sup>, YAO Ru<sup>1,2,3</sup>, MENG Xue<sup>1,2,3</sup>, YAO Jingchun<sup>1,2,3</sup>, LIU Zhong<sup>1,2,3</sup>

1. New Drug Pharmacology Center of Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006, China

2. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Linyi 276006, China

3. Linyi Key Laboratory of Immunopharmacology and Toxicology of Natural Drugs, Linyi 276006, China

收稿日期: 2023-11-04

基金项目: 山东省重大科技创新工程 (2020CXGC010505, 2021CXG010508)

作者简介: 刘冬光 (1986—), 男, 硕士, 中药新药研发与安全性评价。E-mail: 15866975281@163.com

#共同第一作者: 赵文学 (1994—), 男, 硕士, 中药新药研发与安全性评价。E-mail: zwx940108@163.com

\*通信作者: 徐燕 (1982—), 女, 硕士, 中药新药研发与安全性评价。E-mail: xuyan119716@163.com

刘忠 (1975—), 男, 研究员, 中药新药研发与安全性评价。E-mail: clevertree@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the regulation of Jingfang Granules (荆防颗粒) on blood glucose metabolism and protective effect of diabetic retinopathy (DR) in db/db mice. **Methods** A total of 60 male db/db mice were randomly divided into model group, metformin (120 mg/kg) group, Jingfang Granules (10, 20 mg/kg) groups, with 15 mice in each group, and 15 male db/m mice were selected as control group. The basic indexes such as body weight, fasting blood glucose, food intake and water intake of mice were detected weekly. After the experiment, oral glucose tolerance test (OGTT) was detected; The levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), malondialdehyde (MDA) and the activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in mouse retinal tissue were detected by ELISA; PAS staining was used to detect the pathological changes of retinal tissue; Western blotting was used to detect the protein expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), tight junction transmembrane protein (Claudin-1), insulin receptor substrate 1 (IRS1), phosphorylated IRS1 (p-IRS1), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated PI3K (p-PI3K), protein kinase B (Akt), phosphorylated Akt (p-Akt), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), and cleaved cystein-aspartate protease-3 (cleaved Caspase-3) in retinal tissue. **Results** Compared with control group, fasting blood glucose, food intake and water intake of mice in model group were significantly increased ( $P < 0.01$ ), AUC in OGTT was significantly increased ( $P < 0.01$ ); The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MDA in retinal tissue were increased ( $P < 0.01$ ). CAT and SOD activities were decreased ( $P < 0.01$ ); The number of peripheral cells in retinal tissue was decreased and the number of new blood vessels was increased ( $P < 0.01$ ), protein expressions of Claudin-1, p-IRS1/IRS1, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt and Bcl-2 were down-regulated ( $P < 0.01$ ), VEGF, Bax and cleaved Caspase-3 protein expressions were up-regulated ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, body weight of mice in Jingfang Granules group was significantly increased ( $P < 0.05, 0.01$ ), fasting blood glucose, food intake and water intake were decreased to varying degrees ( $P < 0.05, 0.01$ ); The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and MDA in retinal tissue were decreased ( $P < 0.05, 0.01$ ). CAT and SOD activities were increased ( $P < 0.05, 0.01$ ); The histopathologic morphology of retina was improved, and the protein expressions of Claudin-1, p-IRS1/IRS1, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, Bcl-2 in retinal tissue were up-regulated ( $P < 0.05, 0.01$ ), VEGF, Bax and cleaved Caspase-3 protein expressions were down-regulated ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** Jingfang Granules can improve retinopathy in db/db mice to a certain extent, and its mechanism may be related to regulating the expressions of VEGF and Claudin-1 protein in retinal tissue of mice, thus activating the insulin receptor IRS-1/PI3K/Akt signaling pathway, initiating the Caspase cascade reaction, and inhibiting the apoptosis of retinal epithelial cells. Thus, it has a certain protective effect on retinopathy.

**Key words:** Jingfang Granules; diabetes; retina; oxidative stress; apoptosis; IRS-1/PI3K/Akt pathway

伴随着人们生活质量的提高, 糖尿病发病率呈现逐年上升的趋势, 糖尿病主要表现为血糖过高及一系列相关症状, 是血糖自平衡失调而引起的慢性代谢性综合征<sup>[1]</sup>, 其中糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病微血管病变中最常见的表现, 是一种具有特异性改变的眼底病变。DR 是糖尿病的严重并发症之一。据统计, 我国糖尿病人群中 DR 的患病率为 20.86%, 因 DR 临床症状较少而不被人们重视, 但随着 DR 能够严重影响患者视力, 甚至存在致盲的风险, 现已逐渐进入研究范畴<sup>[2-3]</sup>。

DR 的发病机制尚不十分明确, 推测其机制主要涉及氧化应激、炎症反应、新血管生成及视网膜神经元凋亡等过程<sup>[4]</sup>。一方面, 当机体的高糖不能通过正常途径降解时, 会激活细胞多元醇途径, 从而使细胞内形成高渗透状态, 损伤视网膜的微循环。同时, 视网膜内的高糖环境会促进糖基化终末产物 (advanced glycation end products, AGEs) 的形成, 从而进一步激活活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 信号通路, 促进周细胞和内皮细胞的凋亡。

另一方面, 高血糖环境还能够激活胰岛素受体底物 1 (insulin receptor substrate 1, IRS1) /磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 途径, 上调血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达, 促进视网膜新生血管生成<sup>[5-6]</sup>。

目前临床治疗 DR 的方法主要包括使用各类控制代谢的药物和激素、激光治疗及玻璃体切割术等<sup>[7]</sup>。但由于 DR 发病机制的复杂性, 药物及手术治疗都存在一定的局限性。传统药物治疗 DR 并不能起到根治作用<sup>[8]</sup>, 且药物治疗可能引发胃肠道反应、高热等不良反应; 而激光光凝术虽然能有效降低 DR 分期并提升临床有效率<sup>[9]</sup>, 但其不适用于严重玻璃体积血或视网膜前出血的患者, 且可能造成患者永久性视网膜损伤及不同程度的视力下降<sup>[10]</sup>。因此, 探寻不良反应低、疗效好的药物已成为糖尿病治疗的首要问题, 传统中医认为 DR 属于“视瞻昏渺”“云雾移睛”等范畴, 称其为“消渴内障”, 中医的基本治则是“益气养阴, 活血化瘀通络”。越

来越多的研究表明, 中药单体、组方以及中成药可通过多种机制共同作用于 DR, 有效改善其临床症状。陈晶等<sup>[11]</sup>研究发现青蒿琥酯能够通过抑制基质金属蛋白酶-9 表达, 从而抑制糖尿病大鼠视网膜病变; 桃红四物汤联合激光治疗能够增加患者血清中一氧化氮合酶水平, 降低血清中 VEGF 和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平<sup>[12]</sup>; 荆防颗粒由荆芥、防风、羌活、独活、柴胡、前胡、川芎、枳壳、茯苓、桔梗、甘草等组成, 可通过影响谷氨酸代谢、能量代谢、葡萄糖代谢等通路调节荨麻疹诱导的免疫系统紊乱, 且药理学实验证实其能通过调节机体免疫功能, 干预免疫性炎症反应等作用发挥抗炎作用<sup>[13-16]</sup>。因此本研究基于 DR 的发病机制, 对荆防颗粒治疗 DR 的疗效及作用机制进行研究, 旨在为中药治疗 DR 提供研究证据和思路。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 db/db 小鼠 (8~12 周、体质量 40~42 g), SPF 级雄性 db/m 小鼠 (8~12 周, 体质量 25~27 g), 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号 SCXK (京) 2016-0011。小鼠饲养于鲁南制药集团股份有限公司新药安评中心 (GLP) 屏障区大、小鼠实验室, 动物使用许可证号 SYXK (鲁) 2018-0008。饲养条件为室温 20~26 °C, 日温差 ≤4 °C; 相对湿度 40%~70%; 人工照明, 12 h/12 h 明暗交替; 换气次数 ≥15 次/h; 饲喂 SPF 大小鼠生长繁殖饲料, 自由饮水和饮食。动物实验经鲁南制药集团股份有限公司实验动物管理与使用委员会批准 (批准号 AN-IACUC-2020-034)。

### 1.2 药品与试剂

荆防颗粒 (批号 802230115) 由鲁南制药集团股份有限公司提供; 盐酸二甲双胍肠溶片 (批号 H52020955) 购自贵州圣济堂制药有限公司; BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (批号 P0010S) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 2118S)、p-IRS1 抗体 (批号 2385S)、IRS-1 抗体 (批号 3089S)、PI3K 抗体 (批号 4255S)、p-PI3K 抗体 (批号 17366S)、Akt 抗体 (批号 9272S)、p-Akt 抗体 (批号 4060S)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (批号 3498S)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (批号 2772S)、剪切型半胱氨酸

天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cystein-asparate protease-3, cleaved Caspase-3) 抗体 (批号 9661S) 均购自美国 CST 公司; VEGF 抗体 (批号 MA5-13182)、Claudin-1 抗体 (批号 PA1-37465) 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 A0208)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (批号 A0216) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; 小鼠白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 试剂盒 (批号 ml003057)、小鼠 IL-6 试剂盒 (批号 ml102828)、小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 试剂盒 (批号 ml002859)、小鼠过氧化氢酶 (catalase, CAT) 试剂盒 (批号 ml037079)、小鼠超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 ml059387)、小鼠丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 ml077384) 均购自上海酶联生物科技有限公司。

### 1.3 仪器

EVOS FL 型显微镜、Multiskan FC 酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ONETOUCH 强生-稳豪倍优型血糖仪 [强生 (中国) 医疗器材有限公司]; WP-UP-1840 型超纯水机 (沃特浦); 1645050 型电泳仪 [伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司]; FL1000 型蛋白成像系统 (上海哈灵生物技术有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 分组及给药

动物适应性饲养 1 周后, 以 db/m 小鼠作为对照组, db/db 小鼠按血糖值随机分为模型组、二甲双胍 (120 mg/kg) 组和荆防颗粒 (1、2 g/kg, 分别相当于临床等效剂量的 1、2 倍) 组, 每组 15 只。各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积生理盐水 (10 mL/kg), 1 次/d, 连续 6 周。

### 2.2 基础指标检测

每周定时禁食 6 h 后, 对各组小鼠的体质量、血糖值、摄食量及饮水量进行检测。

### 2.3 口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT)

末次给药前禁食 6 h, 并在给药 1 h 后 ig 4 g/kg 的葡萄糖溶液, 检测各组小鼠在 0、30、60、90、120 min 后的血糖值变化<sup>[17]</sup>。

### 2.4 视网膜组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MDA 水平及 CAT、SOD 活力的检测

于实验结束后, 各组小鼠腹主动脉取血后, 取

各组小鼠视网膜组织制备匀浆液，3 200×g 离心 10 min，收集上清液，按照试剂盒说明书测定视网膜组织中 IL-1β、IL-6、TNF-α、MDA 水平及 CAT、SOD 活力<sup>[18-21]</sup>。

### 2.5 PAS 染色观察视网膜组织形态学变化

实验结束后，取各组小鼠眼组织，于 4%多聚甲醛溶液中固定 48 h，流水轻轻冲洗 5 min，从睫状体后部经锯齿缘环形剪开巩膜，去除眼前节部分，随后将后眼杯以视乳头为中心切 3 瓣，轻轻分离出视网膜，将分离出的视网膜用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 轻轻漂洗 10 min，加入 3%胰蛋白酶于 37 °C 恒温箱消化 2 h，用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 漂洗，当仅剩下一层透明的视网膜血管网时，将其取出并平铺于载玻片上，置于 37 °C 展片器上 5 min，以利于血管网展开<sup>[22]</sup>。用流水轻轻冲洗视网膜消化铺片 5 min，随后加入 PAS 氧化剂处理 5 min，流水轻轻冲洗 5 min，以除去残留的氧化剂，擦干载玻片上多余的水分后滴加 Schiff 染液，染色 10 min，流水冲洗 5 min，随后梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片，于显微镜下观察视网膜形态<sup>[23]</sup>。

### 2.6 Western blotting 检测视网膜组织中 VEGF、Claudin-1、p-IRS1/IRS1、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达

实验结束后，取各组小鼠眼组织并迅速分离出视网膜，按 1 : 6 的比例加入 RIPA 裂解液，于组织研磨仪以 4 °C、1 200 r/min 研磨 10 min，随后以 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min，取上清，采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。蛋白样品经十

二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，封闭后加入相应一抗，4 °C 孵育过夜，次日 PBST 洗膜后，加入二抗，室温孵育 2 h，PBST 洗膜后，加适量的 ECL 发光液显影，并分析蛋白条带灰度值。

### 2.7 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析，两组以上比较采用单因素方差分析 (LSD)，两组之间比较采用 *T* 检验分析。

## 3 结果

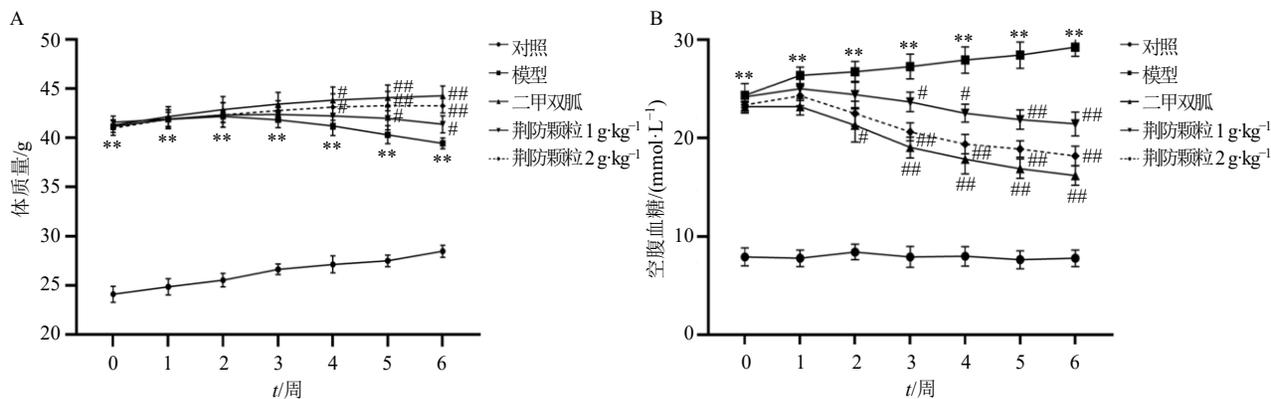
### 3.1 荆防颗粒对 db/db 小鼠体质量和血糖的影响

如图 1-A 所示，对照组小鼠体质量呈平缓上升趋势，db/db 小鼠在实验初期 (0~3 周) 体质量均有所增加，但各组之间无显著性差异。与模型组比较，第 4 周荆防颗粒 (2 g/kg) 组及二甲双胍组小鼠体质量显著升高 ( $P < 0.05$ )，第 5~6 周各给药组小鼠体质量均显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

如图 1-B 所示，与对照组比较，模型组小鼠各时间点空腹血糖均显著升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，给予二甲双胍干预 2 周后，小鼠空腹血糖显著下降 ( $P < 0.05$ 、0.01)；给予荆防颗粒干预 3 周后，小鼠空腹血糖显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

### 3.2 荆防颗粒对 db/db 小鼠摄食量和饮水量的影响

如图 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠摄食量及饮水量明显增多 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，各给药组小鼠在给药 3 周后摄食量及饮水量均有不同程度的减少 ( $P < 0.05$ 、0.01)。



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ , 下同。  
\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group, same as below figures.

图 1 荆防颗粒对 db/db 小鼠体质量 (A) 和空腹血糖 (B) 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 15$ )

Fig. 1 Effect of Jingfang Granules on body weight (A) and fasting blood glucose (B) of db/db mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 15$ )

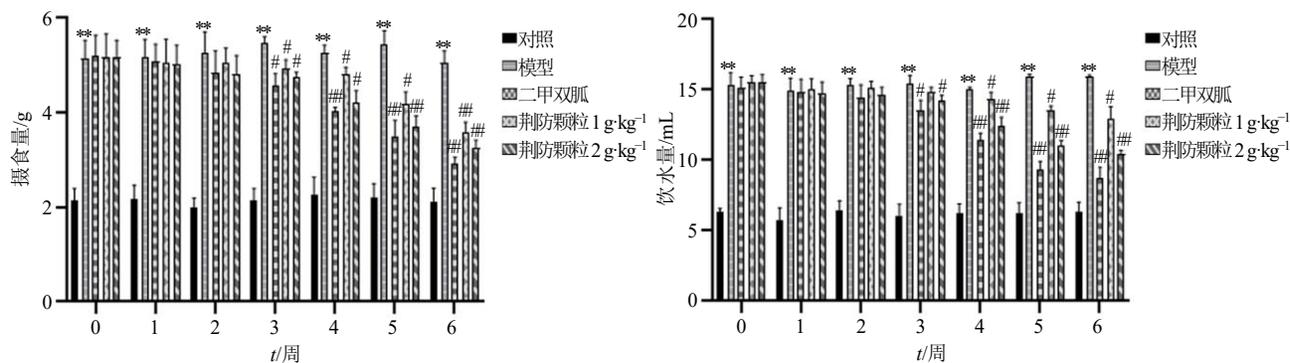


图2 荆防颗粒对 db/db 小鼠摄食量和饮水量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Fig. 2 Effect of Jingfang Granules on food intake and water intake of db/db mice ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

### 3.3 荆防颗粒对 db/db 小鼠 OGTT 的影响

如图3所示,与对照组比较,模型组小鼠各时间点血糖值均显著升高 ( $P < 0.01$ ),曲线下面积显著增加 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,荆防颗粒(1 g/kg)组小鼠在 0、60、90、120 min 时血糖值均显著下降 ( $P < 0.05$ ),荆防颗粒(2 g/kg)组和二甲双胍组小鼠各时间点血糖值均显著下降 ( $P < 0.05$ 、0.01),各给药组曲线下面积均显著下降 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

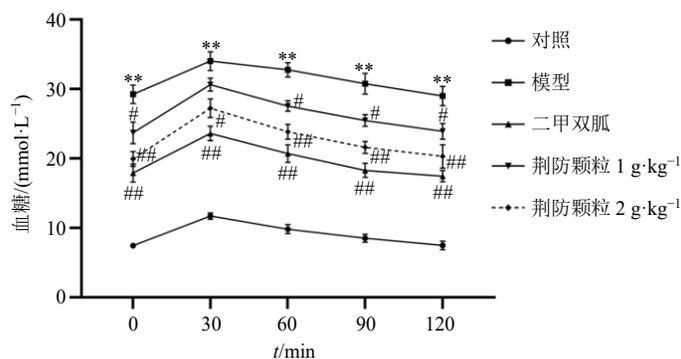


图3 荆防颗粒对 db/db 小鼠 OGTT 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Fig. 3 Effect of Jingfang Granules on OGTT of db/db mice ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

### 3.4 荆防颗粒对视网膜组织 IL-1β、IL-6、TNF-α、MDA 水平及 CAT、SOD 活力的影响

如图4所示,与对照组比较,模型组小鼠视网膜组织中 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组小鼠视网膜组织中 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01),表明荆防颗粒对糖尿病引起的视网膜炎性反应具有明显的改善作用。

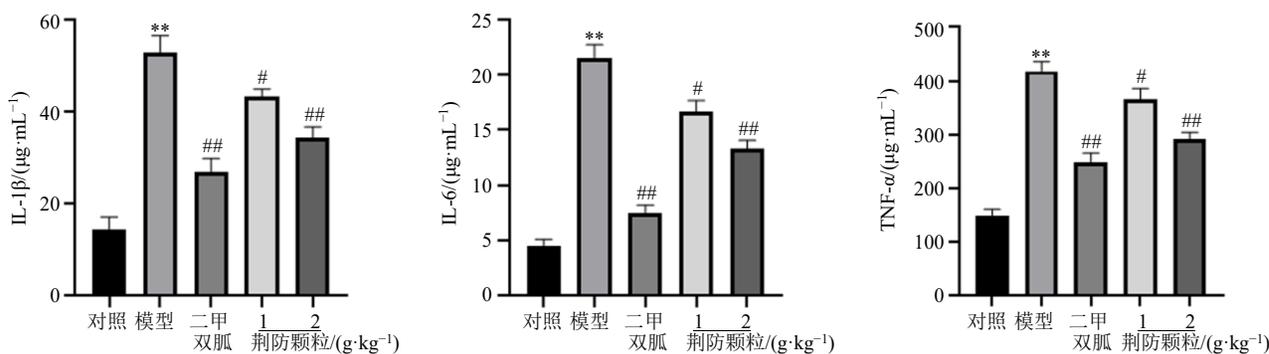
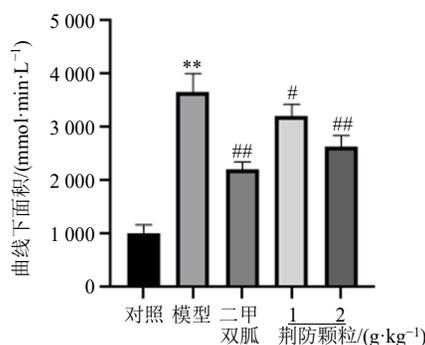


图4 荆防颗粒对 db/db 小鼠视网膜组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Fig. 4 Effect of Jingfang Granules on levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α in retinal tissue of db/db mice ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

如图5所示,与对照组比较,模型组小鼠视网膜组织中MDA含量明显升高( $P<0.01$ ),CAT、SOD活性均显著下降( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组MDA含量明显下降( $P<0.05$ 、 $0.01$ ),CAT、SOD活性均明显升高( $P<0.05$ 、 $0.01$ ),表明荆防颗粒能够增强db/db小鼠视网膜组织的抗氧化能力,减轻机体氧化应激损伤。

### 3.5 荆防颗粒对db/db小鼠视网膜组织病理形态的影响

如图6所示,对照组小鼠视网膜形态无异常改变;与对照组比较,模型组小鼠视网膜出现微动脉瘤、非细胞毛细血管增多、内皮细胞增生以及周细胞选择性丢失( $P<0.05$ );与模型组比较,各给药组小鼠视网膜未见微动脉瘤组织,并且非细胞毛细血管减少,内皮细胞增生减少及周细胞丢失率明显

下降( $P<0.05$ 、 $0.01$ ),表明荆防颗粒对db/db小鼠视网膜并发症具有良好的改善作用。

### 3.6 荆防颗粒对db/db小鼠视网膜组织VEGF、Claudin-1蛋白表达的影响

如图7所示,与对照组比较,模型组小鼠视网膜组织VEGF蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ ),Claudin-1蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组小鼠视网膜组织中VEGF蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ 、 $0.01$ ),Claudin-1蛋白表达水平显著升高( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。

### 3.7 荆防颗粒对db/db小鼠视网膜组织p-IRS1/IRS1、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白表达的影响

如图8所示,与对照组比较,模型组小鼠视网膜组织中p-IRS1/IRS1、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋

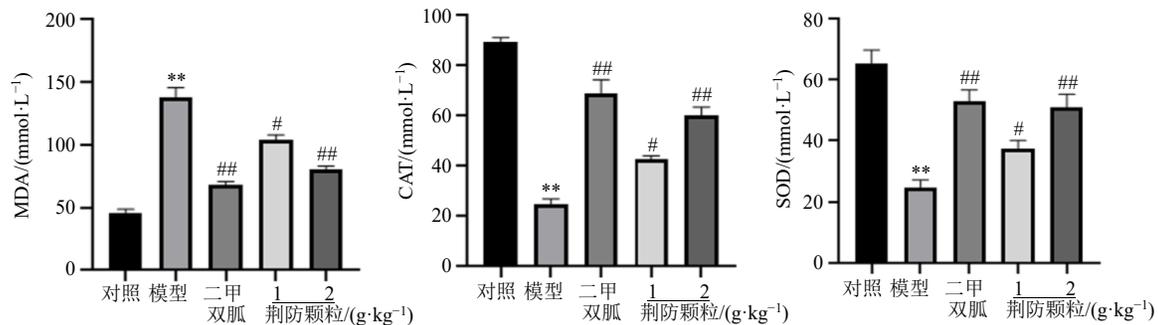
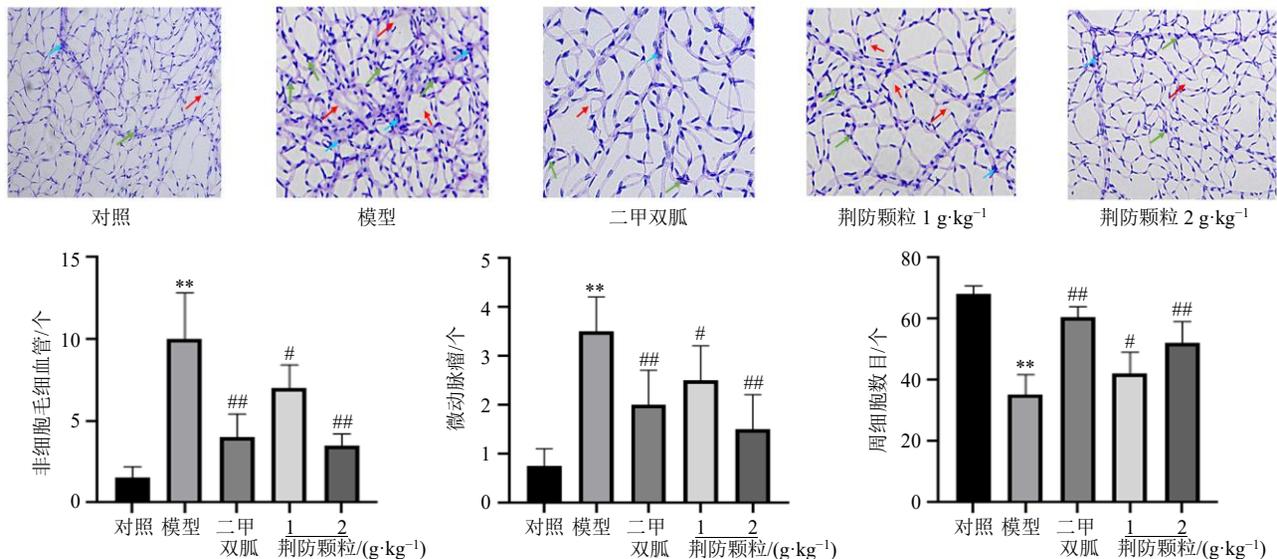


图5 荆防颗粒对db/db小鼠视网膜组织MDA含量及CAT、SOD活力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Fig. 5 Effect of Jingfang Granules on MDA content and activities of CAT, SOD in retinal tissue of db/db mice ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )



绿色箭头表示内皮细胞增生,红色箭头表示非细胞毛细血管,蓝色箭头表示微动脉瘤。

Green arrow indicates endothelial cell proliferation, red arrow indicates acellular capillaries, and blue arrow indicates microaneurysms.

图6 荆防颗粒对db/db小鼠视网膜组织病理形态的影响(PAS,  $\times 20; \bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 6 Effect of Jingfang Granules on pathological changes of retina in db/db mice (PAS,  $\times 20; \bar{x} \pm s, n = 8$ )

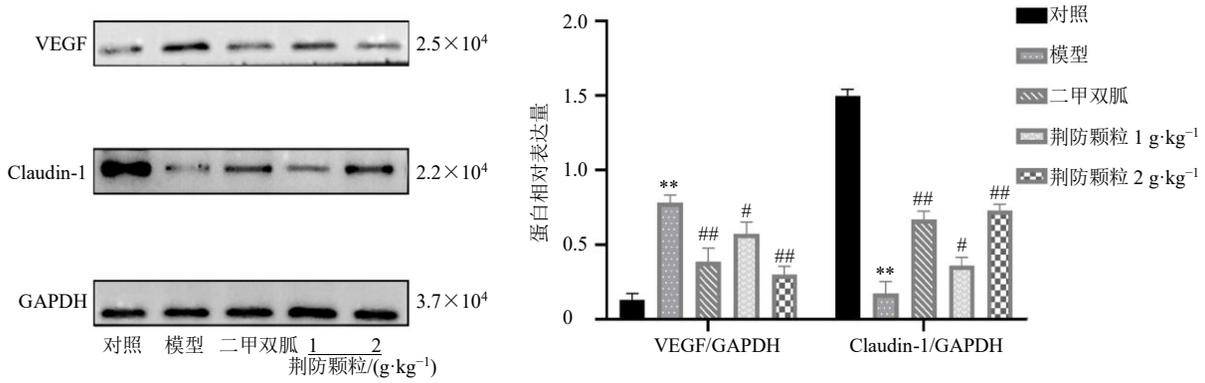


图7 荆防颗粒对 db/db 小鼠视网膜组织 VEGF、Claudin-1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Fig. 7 Effect of Jingfang Granules on VEGF and Claudin-1 protein expressions in retina of db/db mice ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

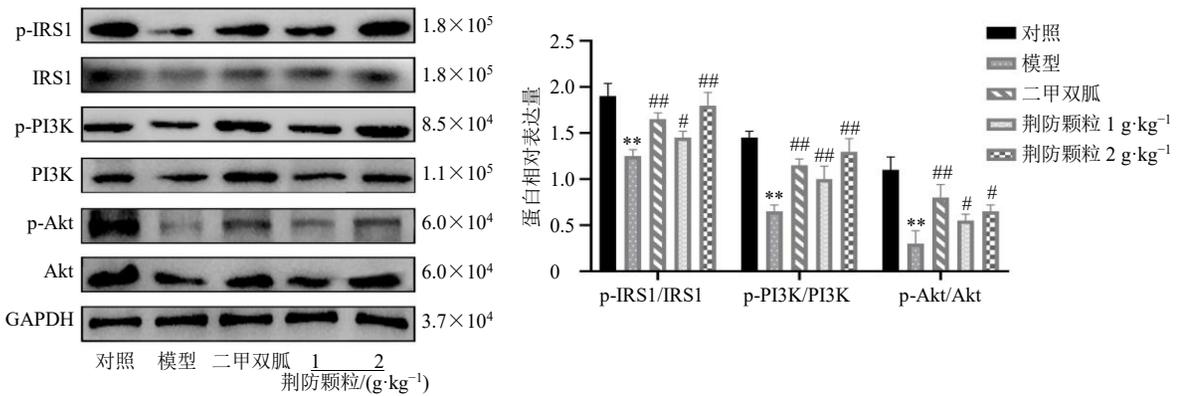


图8 荆防颗粒对 db/db 小鼠视网膜组织 p-IRS1/IRS1、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Fig. 8 Effect of Jingfang Granules on p-IRS1/IRS1, p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt protein expressions in retina of db/db mice ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

白表达水平均显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组小鼠视网膜组织中 p-IRS1/IRS1、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05、0.01$ )。

### 3.8 荆防颗粒对 db/db 小鼠视网膜组织 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

如图9所示, 与对照组比较, 模型组小鼠视网膜组织中 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), Bcl-2/Bax 值显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组小鼠视网膜组织中 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05、0.01$ ), Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05、0.01$ ), Bcl-2/Bax 值显著升高 ( $P < 0.05、0.01$ )。

## 4 讨论

随着现代社会的快速发展, DR 是一种常见和特殊的糖尿病微血管并发症, 是导致患者视网膜出

现慢性损伤, 最终导致患者视力模糊, 甚至失明的主要原因<sup>[24]</sup>, 因此糖尿病视网膜并发症已逐渐成为日益突出的社会健康问题, 其病因复杂, 患者由于体内长期的高糖反应, 导致机体视网膜等多种器官出现炎症反应<sup>[25]</sup>, 因此开展糖尿病视网膜并发症的研究有着重大的意义<sup>[26-29]</sup>。

随着近几年的研究发展, DR 已被认为是一种长期低炎症导致的微血管疾病, 可导致糖尿病视网膜缺血、血管通透性增加、视网膜新生血管增生及糖尿病黄斑水肿等表现<sup>[30]</sup>, 其中细胞内发生炎症反应、氧化应激及细胞凋亡是导致 DR 发生及发展的主要元凶, 炎症因子水平上调能够激活 VEGF/Claudin-1、IRS-1/PI3K/Akt、Caspase-3 等通路, 从而引起视网膜内新生血管增加, 毛细血管通透性增加, 进而发生 BRB 渗漏, 最终导致患者失明<sup>[31]</sup>, 本研究通过 db/db 小鼠模型探讨荆防颗粒对小鼠 DR 的早期保护作用。

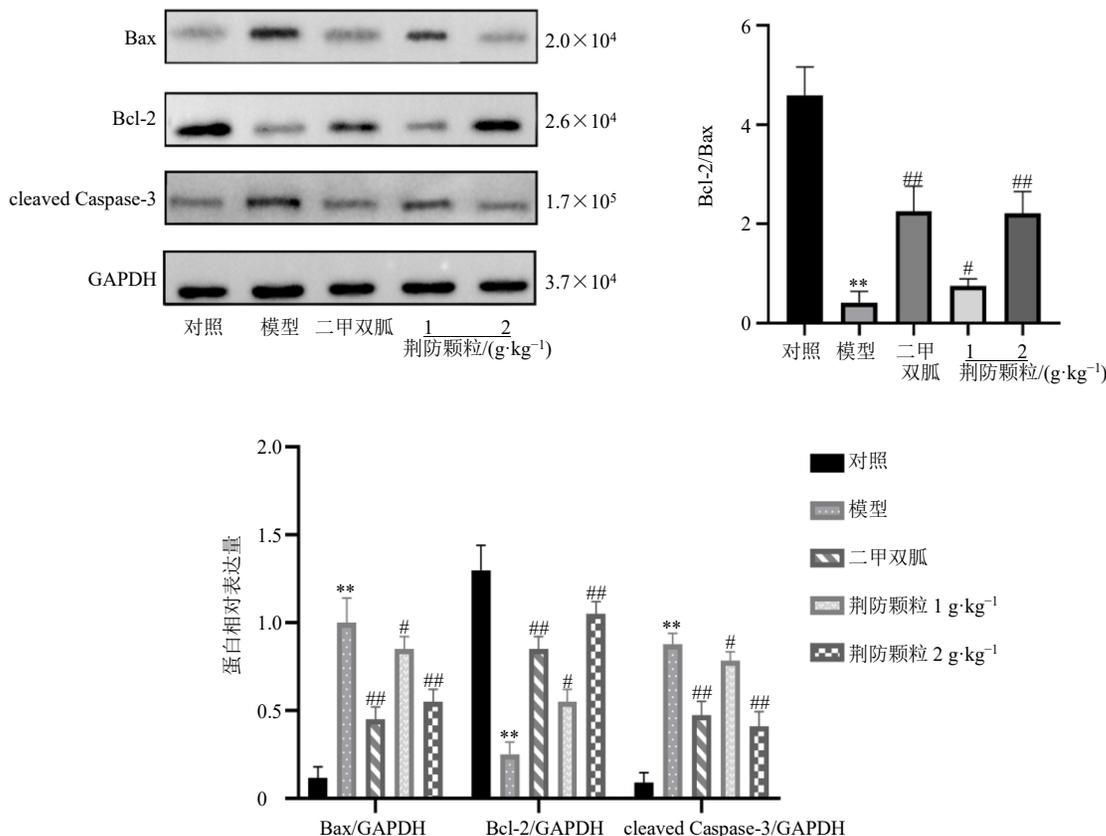


图9 荆防颗粒对 db/db 小鼠视网膜组织 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )  
 Fig. 9 Effect of Jingfang Granules on Bax, Bcl-2 and cleaved Caspase-3 protein expressions in retina of db/db mice ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

据报道, VEGF 是最有效的促血管生长因子, 在高血糖状态下可改变视网膜微环境, 导致缺氧引起内皮细胞功能异常, 从而上调 VEGF 的表达, VEGF 上调可诱导视网膜内皮细胞通透性增加, 下调内皮细胞间紧密连接蛋白 Claudin-1 的表达, 进而导致视网膜新生血管生成<sup>[32]</sup>。Zhang 等<sup>[33]</sup>研究发现通过抑制 VEGF 的表达, 可阻止血管的生成, 改善 DR。也有文献报道 IL-6 可促进内皮细胞通透性增加, 与 VEGF 等产生协同作用, 最终导致新生血管形成及微导管闭塞, 加快 DR 的进展<sup>[34]</sup>。TNF- $\alpha$  也可引起 VEGF 水平的提高, 使视网膜通透性有所增加, 同时诱发新生血管<sup>[34]</sup>。SOD 是维护内皮细胞和血管功能的关键酶, 也是主要的自由基清除剂, 在胰岛  $\beta$  细胞内高度集中, 维持  $\beta$  细胞在体内的平衡<sup>[35]</sup>。MDA 是膜脂过氧化的一种重要产物, 可以使视网膜细胞通透性和流通性改变, 最终导致其结构的改变。有研究发现经中药治疗后糖尿病大鼠静脉血清 SOD、MDA 值均有显著性改变<sup>[36]</sup>, 本研究结果显示, 模型组小鼠视网膜组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、

TNF- $\alpha$ 、MDA 含量升高, CAT、SOD 活性下降, 同时 VEGF 表达上调, Claudin-1 表达下调, 给予荆防颗粒处理可显著改善上述异常指标。

IRS-1/PI3K/Akt 作为胰岛素抵抗的经典信号通路, 是其调节血糖平衡的重要信号通路之一<sup>[37-38]</sup>, IRS-1 是胰岛素受体激活后发生级联反应的重要因子, 也是参与胰岛素等重要细胞因子信号转导的磷酸化蛋白, 参与调节胰岛素信号转导, 同时也参与着细胞的生长代谢过程, 当胰岛素受体底物被激活, 会促进 IRS-1 蛋白磷酸化, 促使下游 PI3K/Akt 信号通路被激活<sup>[39]</sup>, 活化的 PI3K 参与调节细胞增殖、分化、葡萄糖转运等多种功能, Akt 作为 PI3K 信号通路的主要下游信号传导物, 活化后在胰岛素传导通路中也扮演着重要的降血糖功能, 并且激活的 IRS-1/PI3K/Akt 信号通路可以增加体内葡萄糖转运蛋白 4 向质膜的转移, 促进糖原代谢, 从而达到降血糖的目的<sup>[40]</sup>, 本研究结果显示, 模型组小鼠视网膜组织中 p-IRS1/IRS-1、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 表达下调, 给予荆防颗粒处理可显著上调其表达水平。

有文献表明, 视网膜与视神经中含有大量的线粒体, 为视觉信号传导和细胞内物质转运提供三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) [41], 细胞凋亡损伤视网膜细胞及血管功能, 不可避免地引起 DR 的进展[42]。Caspase 正常情况下以酶原形式位于细胞质中, 并无活性, 当收到凋亡信号的刺激后, 可被激活, 裂解为有酶解活性的异二聚体, 并通过裂解特异底物和激活内源性核酸酶, 进而引起细胞凋亡[43]。细胞色素 C (cytochrome-C, Cyt-C) 是线粒体呼吸链中传递电子的载体, 是线粒体凋亡通路激活的标志[44]。在正常情况下, Cyt-C 主要存在于线粒体内外膜之间的腔隙内, 当线粒体损伤时, Cyt-C 从线粒体膜间隙释放到细胞质中, 与凋亡蛋白酶激活因子-1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) 结合形成寡聚体复合物, 进一步结合 Caspase-9 酶原形成凋亡体, Caspase-9 活化后能激活下游 Caspase-3, 从而启动细胞凋亡[45]。本研究结果显示, 模型组小鼠视网膜组织中 Bax、cleaved Caspase-3 表达上调、Bcl-2 表达下调, 给予荆防颗粒处理可显著下调 Bax、cleaved Caspase-3 的表达水平, 上调 Bcl-2 的表达水平, 由此推测, 荆防颗粒可通过激活 VEGF/Claudin-1、IRS1/PI3K/Akt、Caspase-3 等信号通路, 发挥视网膜的保护作用。

综上, 荆防颗粒缓解 DR 的机制已初步明确, 前期亦有文献表明, 防风通圣散联合二甲双胍片可治疗腹型肥胖 2 型糖尿病[46], 桂枝茯苓丸对于治疗 DR 也具有很好的疗效, 可有效改善糖尿病大鼠眼底病变[47], 同时, 丹参川芎嗪注射液可用于治疗 2 型糖尿病血管病变的临床观察, 并且能有效降低血糖、血脂、糖化血红蛋白及血液流变学等指标[48], 由此推测荆防颗粒发挥抗 DR 药效的成分主要为防风、羌活、川芎、茯苓等, 但其具体的作用靶点还需进一步深入研究, 为 DR 的临床治疗提供更多的科学依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] Lv W Q, Graves D T, He L H, *et al.* Depletion of the diabetic gut microbiota resistance enhances stem cells therapy in type 1 diabetes mellitus [J]. *Theranostics*, 2020, 10(14): 6500-6516.

[2] 邓玲, 潘颖喆, 王慧. 糖尿病性视网膜病变的治疗进展 [J]. *国际眼科杂志*, 2020, 20(3): 489-491.

[3] 陈雪珍, 吴慧华, 刘媛媛, 等. 糖尿病视网膜病变患病率的 Meta 分析 [J]. *中国公共卫生管理*, 2020, 36(4):

460-465.

[4] Chai G R, Liu S, Yang H W, *et al.* Quercetin protects against diabetic retinopathy in rats by inducing heme oxygenase-1 expression [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(7): 1344-1350.

[5] 周跃, 周燕红. 白藜芦醇治疗糖尿病视网膜病变的研究进展 [J]. *重庆医学*, 2020, 49(8): 1363-1366.

[6] 何媛, 周涛, 苏婷, 等. 糖尿病视网膜病变的分类、发生机制及治疗进展 [J]. *山东医药*, 2020, 60(19): 111-115.

[7] 桑智慧, 李慧红, 周丽娟. 中药治疗糖尿病视网膜病变的疗效及机制研究进展 [J]. *中国药房*, 2023, 34(12): 1532-1536.

[8] 薛君, 武学慧. 炎症在糖尿病视网膜病变中的研究进展 [J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2022, 21(12): 953-956.

[9] 鞠晓妮. 探讨激光光凝术治疗糖尿病视网膜病变的疗效 [J]. *当代医学*, 2021, 27(12): 159-160.

[10] 吴静, 范松涛. 激光治疗糖尿病视网膜病变的研究进展 [J]. *大连医科大学学报*, 2022, 44(6): 556-560.

[11] 陈晶, 关晓海, 杨杉杉, 等. 青蒿琥酯对糖尿病大鼠视网膜 MMP-9 表达的影响 [J]. *中草药*, 2018, 49(5): 1106-1109.

[12] 刘淑萍. 桃红四物汤联合激光对糖尿病性黄斑水肿患者血脂及血清一氧化碳合酶、血管内皮生长因子、白细胞介素-6 的影响 [J]. *中国药物与临床*, 2021, 21(24): 4046-4048.

[13] 高铭, 丁美灵, 雷紫琴, 等. 荆防败毒散及其中成药制剂研究进展 [J]. *中药药理与临床*, 2023, 39(5): 112-118.

[14] 曹天佑, 屈会化, 董利洋, 等. 荆防颗粒对马兜铃酸 I 致小鼠急性肾损伤的预防和保护作用研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(18): 5742-5749.

[15] 张永康, 孙成宏, 王西双, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨荆防颗粒对自身免疫性肝炎小鼠的治疗作用及作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(5): 1461-1470.

[16] 尉雅洁, 刘明飞, 孙成宏, 等. 基于网络药理学和动物实验探究荆防颗粒对高尿酸血症的治疗作用及机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(3): 808-816.

[17] Dantis Pereira de Campos T, da Cruz Rodrigues K C, Martins Pereira R, *et al.* Short-term combined exercise improves inflammatory profile in the retina of obese mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 6099.

[18] Bamforth S D, Lightman S, Greenwood J. The effect of TNF- $\alpha$  and IL-6 on the permeability of the rat blood-retinal barrier *in vivo* [J]. *Acta Neuropathol*, 1996, 91(6): 624-632.

[19] Weigelt C M, Fuchs H, Schönberger T, *et al.* AAV-mediated expression of human VEGF, TNF- $\alpha$ , and IL-6 induces retinal pathology in mice [J]. *Transl Vis Sci Technol*, 2021, 10(11): 15.

- [20] 何东林, 贾明珍, 谭越月, 等. 房水 IL-17、IL-23、TNF- $\alpha$  水平在糖尿病性视网膜病变诊断中的价值 [J]. 解放军医药杂志, 2021, 33(8): 62-65.
- [21] 邹华, 游志鹏, 吴晓坚. 葛根素对糖尿病视网膜病变损伤的保护作用及机制研究进展 [J]. 国际眼科杂志, 2023, 23(8): 1295-1298.
- [22] 王丽敏, 于静, 张林, 等. 小柴胡汤对 CFA 大鼠血清细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、M-CSF 作用的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(1): 15-19.
- [23] 张博, 李凤君, 刘学政, 等. 芍药苷基于 JAK2/STAT3 信号通路抑制糖尿病大鼠视网膜细胞炎症的研究 [J]. 中国中医眼科杂志, 2023, 33(4): 305-310.
- [24] 代浩然, 王跃, 王旭, 等. 2型糖尿病及其微血管并发症动物模型生化指标特征分析 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 2(6): 1-9.
- [25] Lepage P, Leclerc M C, Joossens M, et al. A metagenomic insight into our gut's microbiome [J]. *Gut*, 2013, 62(1): 146-158.
- [26] Horie M, Miura T, Hirakata S, et al. Comparative analysis of the intestinal flora in type 2 diabetes and nondiabetic mice [J]. *Exp Anim*, 2017, 66(4): 405-416.
- [27] Brunkwall L, Orho-Melander M. The gut microbiome as a target for prevention and treatment of hyperglycaemia in type 2 diabetes: From current human evidence to future possibilities [J]. *Diabetologia*, 2017, 60(6): 943-951.
- [28] Sonnenburg J L, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 56-64.
- [29] Valdes A M, Walter J, Segal E, et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health [J]. *BMJ*, 2018, 361: k2179.
- [30] 吴沂旎, 吴雪梅, 韩治华, 等. 复方血栓通胶囊联合前列地尔治疗糖尿病视网膜病变及其对血清活性多肽和 SPARC 表达的影响 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(3): 587-593.
- [31] 刘梦伟, 鲍新颖, 王烁, 等. 中医药治疗糖尿病视网膜病变的研究进展 [J]. 中医临床研究, 2022, 14(36): 45-47.
- [32] Yang Y, Liu Y, Li Y P, et al. microRNA-15b targets VEGF and inhibits angiogenesis in proliferative diabetic retinopathy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(11): 3404-3415.
- [33] Zhang D, Lv F L, Wang G H. Effects of HIF-1 $\alpha$  on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(16): 5071-5076.
- [34] 鹿秋玉, 李才锐, 孙曙光. IL-6 与糖尿病性视网膜病变的相关研究进展 [J]. 国际眼科杂志, 2015, 15(1): 52-54.
- [35] 王伟, 李孝才. 糖尿病视网膜病变与超氧化物歧化酶活性值的关系 [J]. 武警医学, 2018, 29(8): 784-785.
- [36] 董文, 颌瑞萍, 刘勤, 等. 益气养阴方对糖尿病视网膜病变患者中 SOD 和 MDA 表达的影响 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(20): 145-147.
- [37] Huang X J, Liu G H, Guo J, et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1483-1496.
- [38] Guo X, Sun W, Luo G B, et al. *Panax notoginseng* saponins alleviate skeletal muscle insulin resistance by regulating the IRS1-PI3K-AKT signaling pathway and GLUT4 expression [J]. *FEBS Open Bio*, 2019, 9(5): 1008-1019.
- [39] Nandipati K C, Subramanian S, Agrawal D K. Protein kinases: Mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 426(1): 27-45.
- [40] Wei F, Wang A X, Wang Q, et al. Plasma endothelial cells-derived extracellular vesicles promote wound healing in diabetes through YAP and the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Aging*, 2020, 12(12): 12002-12018.
- [41] Kooragayala K, Gotoh N, Cogliati T, et al. Quantification of oxygen consumption in retina *ex vivo* demonstrates limited reserve capacity of photoreceptor mitochondria [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(13): 8428-8436.
- [42] Elshaer S, Lemtalsi T, El-Remessy A. High glucose-mediated tyrosine nitration of PI3-kinase: A molecular switch of survival and apoptosis in endothelial cells [J]. *Antioxidants*, 2018, 7(4): 47.
- [43] 白蔷薇, 李翠凡, 李梦媛, 等. 大黄素对肺炎链球菌诱导的肺泡 II 型上皮细胞凋亡和炎症的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(24): 2959-2963.
- [44] Hu W L, Dong H Y, Li Y, et al. Bid-induced release of AIF/EndoG from mitochondria causes apoptosis of macrophages during infection with *Leptospira interrogans* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 471.
- [45] Yang N A, Li C, Li H L, et al. Emodin induced SREBP1-dependent and SREBP1-independent apoptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 709.
- [46] 吴艳, 郑承红. 防风通圣散联合二甲双胍片治疗腹型肥胖 2 型糖尿病临床观察 [J]. 湖北中医杂志, 2011, 33(2): 23-24.
- [47] 王映璇, 朱中贵. 桂枝茯苓丸治疗糖尿病视网膜病变效果观察 [J]. 中国医学创新, 2019, 16(6): 73-76.
- [48] 吕雄, 杜育冰, 曹明满, 等. 丹参川芎嗪注射液治疗 2 型糖尿病血管病变的临床观察 [J]. 中国实用内科杂志, 2009, 29(S2): 221-224.