

基于 PI3K/Akt 信号通路探讨白芷颗粒对糖尿病视网膜病变的影响

高彩玲, 朱玲玲, 邱洁, 潘从清, 郭俊*

天津医科大学朱宪彝纪念医院, 天津市内分泌研究所, 国家卫健委激素与发育重点实验室, 天津市代谢性疾病重点实验室, 天津 300134

摘要: 目的 研究白芷颗粒对早期糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 的保护作用。方法 采用 ip 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 法制备糖尿病模型, 设置对照组、模型组、白芷 (1.25 g/kg) 组及羟苯磺酸钙 (135 mg/kg) 组。连续给药 12 周后采用苏木素-伊红 (HE) 和高碘酸-席夫 (PAS) 染色观察大鼠视网膜病理学改变; 采用 TUNEL 染色法检测视网膜细胞凋亡情况; 采用 Western blotting 检测视网膜组织紧密连接蛋白及磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路相关蛋白表达。人视网膜上皮细胞 (adult retinal pigment epithelial cell line-19, ARPE-19) 分为对照组、高渗组、高糖组、白芷 (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组和羟苯磺酸钙 (20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 组, 对照组在含 5.5 mmol/L 葡萄糖的培养基中培养; 高渗组在含 5.5 mmol/L 葡萄糖和 25 mmol/L 甘露醇的培养基中培养; 高糖组和各给药组在含 30 mmol/L 葡萄糖的培养基中培养, 并给予相应药物。采用 TUNEL 染色、免疫荧光、Western blotting 法观察细胞凋亡、紧密连接蛋白及 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达。使用 PI3K 抑制剂 LY294002 后, 观察其下游凋亡相关蛋白的变化。结果 HE 染色结果显示, 模型组大鼠视网膜组织排列紊乱, 视网膜变薄, 白芷干预后较模型组有所缓解。TUNEL 染色显示视网膜组织中细胞凋亡率增加。Western blotting 结果显示, 与模型组比较, 白芷组咬合蛋白 (Occludin)、闭锁小带蛋白 1 (Zonula occluden-1, ZO-1)、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) / B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。体外实验结果显示, 白芷干预后细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$), Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), Occludin、ZO-1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 免疫荧光结果显示白芷干预后 Occludin、ZO-1 表达升高; 此外, 白芷能够促进高糖环境下 PI3K/Akt 的磷酸化, 在使用 PI3K 抑制剂干预后抑制了 Akt 的磷酸化, Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。结论 白芷颗粒能够通过抑制细胞凋亡保护血-视网膜屏障损伤, 从而延缓早期 DR 的发展, 其作用机制可能与调节 PI3K/Akt 信号通路有关。

关键词: 糖尿病视网膜病变; 白芷颗粒; ARPE-19 细胞; 细胞凋亡; 血-视网膜屏障; PI3K/Akt 通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)11-3749-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.11.017

Effect of *Angelica dahurica* granules on diabetic retinopathy based on PI3K/Akt signaling pathway

GAO Cailing, ZHU Lingling, QIU Jie, PAN Congqing, GUO Jun

Chu Hsien-I Memorial Hospital, Tianjin Institute of Endocrinology, NHC Key Laboratory of Hormones and Development, Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Tianjin 300134, China

Abstract: Objective To study the protective effect of *Angelica dahurica* granules on diabetic retinopathy (DR). **Methods** Diabetes mellitus model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin, rats were randomly divided into control group, model group, *A. dahurica* (1.25 g/kg) group and calcium dobesilate (135 mg/kg) group. After 12 weeks of continuous administration, the pathological changes in retina of rats were observed by HE and PAS staining; TUNEL staining was used to detect cell apoptosis in retina; Western blotting was used to detect the expressions of tight junction proteins and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway related protein. Adult retinal pigment epithelial cell line-19 (ARPE-19) was divided into control group,

收稿日期: 2024-01-10

基金项目: 天津市教委科研计划项目 (2020KJ190); 天津市卫计委中西医结合重点项目 (2021034)

作者简介: 高彩玲, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合防治糖尿病及其并发症。E-mail: gcl120240@163.com

*通信作者: 郭俊, 主治医师, 研究方向为中西医结合防治糖尿病及其并发症。E-mail: guojunjun_88521@126.com

hyperosmotic group, high glucose group, *A. dahurica* (150 $\mu\text{g/mL}$) group and calcium dobesilate (20 $\mu\text{mol/L}$) group. The control group was cultured in medium containing 5.5 mmol/L glucose; The hypertonic group was cultured in medium containing 5.5 mmol/L glucose and 25 mmol/L mannitol; The high glucose group and each administration group were cultured in a culture medium containing 30 mmol/L glucose and given corresponding drugs. TUNEL staining, immunofluorescence and Western blotting were used to observe cell apoptosis, expressions of tight junction protein, and PI3K/Akt pathway related protein. After using the PI3K inhibitor LY294002, the changes in downstream apoptosis related proteins were observed. **Results** HE staining results showed that the retinal tissue arrangement of model group rats was disordered, and the retina became thinner. After intervention with *A. dahurica*, there was some relief compared to the model group. TUNEL staining showed an increase in cell apoptosis rate in retinal tissue. Western blotting results showed that compared with model group, the expression levels of occludin, Zonula occludens-1 (ZO-1), p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt proteins in *A. dahurica* group were significantly increased ($P < 0.05$). Bcl-2 associated X protein (Bax)/B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), cleaved cystein-aspartate protease-3 (cleaved Caspase-3) protein expression levels were significantly reduced ($P < 0.05$). *In vitro* experiments results showed after intervention with *A. dahurica*, the apoptosis rate of cells was decreased ($P < 0.05$), and the expression levels of Bax/Bcl-2 and cleaved Caspase-3 proteins were significantly decreased ($P < 0.05$), while the expression levels of Occludin and ZO-1 proteins were significantly increased ($P < 0.05$); The immunofluorescence results showed that the expressions of Occludin and ZO-1 were increased after intervention with *A. dahurica*; In addition, *A. dahurica* could promote the phosphorylation of PI3K/Akt in high glucose environments. After intervention with PI3K inhibitors, Akt phosphorylation was inhibited, and the expression levels of Bax/Bcl-2 and cleaved Caspase-3 proteins were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** *A. dahurica* granules can protect against damage to the blood retinal barrier by inhibiting cell apoptosis, thereby delaying the development of early DR. Its mechanism may be related to the regulation of the PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: diabetic retinopathy; *Angelica dahurica* granules; ARPE-19 cells; cell apoptosis; blood retina barrier; PI3K/Akt pathway

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病患者中最常见的眼部并发症, 糖尿病相关眼病是导致全球中度至重度视力丧失和失明的第 5 大常见原因^[1]。随着糖尿病发病率的增加, 糖尿病视网膜病变发病率逐年升高^[2]。目前, DR 的防治方法主要有手术治疗如激光光凝术、药物治疗如抗血管内皮生长因子制剂等, 但治疗成本高, 疗效欠佳, 并且存在一定的不良反应, 尚缺乏有效的防治措施^[3-4]。因此, 积极寻找更安全有效的治疗药物尤为重要。

白芷为伞形科植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 或杭白芷 *A. dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. var. *formosana* (Boiss.) Shan et Yuan 的干燥根^[5]。现代药理学研究表明, 白芷主要含有香豆素类、挥发油类、生物碱类等多种化学成分, 具有抗炎、抗氧化应激、抗肿瘤等作用^[6-7]。糖尿病的各种慢性并发症以微血管病变为主, 这种损害包括内皮细胞损伤、基底膜增厚、血管通透性增加等, 影响了血管的正常结构和功能, 炎症、氧化应激是其重要的发病机制^[8-9]。本课题组前期研究发现, 在糖尿病慢性溃疡中, 白芷可以通过调节巨噬细胞极化, 减少炎症从而促进伤口愈合, 证明了白芷在糖尿病并发症中的抗炎作用^[10]。白芷能够减轻糖尿病溃疡中微血管细胞的功

能障碍, 抑制细胞的凋亡及丢失, 从而减轻血管的损伤^[11]。此外, 白芷中有效成分紫花前胡苷对蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 的磷酸化作用非常明显^[12]。DR 作为另一严重的糖尿病微血管并发症, 主要表现也是血管功能的异常, 因此提出白芷是否能够在一定程度上保护视网膜细胞从而延缓 DR 的发生和发展。本研究构建了 DR 动物模型和高糖诱导的视网膜细胞损害模型, 拟从体内和体外实验 2 方面探讨白芷颗粒在 DR 中的保护作用 and 机制, 以期对 DR 的防治提供新思路。

1 材料

1.1 动物

48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 8 周龄, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 动物许可证号 SYXK (津) 2020-0001, 动物质量合格证号 110324221106017247。大鼠饲养于天津医科大学朱宪彝纪念医院 SPF 级实验动物中心, 动物房内保持 22~25 $^{\circ}\text{C}$ 环境温度, 50%~60% 相对湿度, 12 h 明暗交替。本实验及相关实验操作已获得天津医科大学朱宪彝纪念医院动物实验伦理委员会批准 (批准号 DXBY-2022071)。

1.2 细胞

人视网膜上皮细胞 (adult retinal pigment epithelial cell line-19, ARPE-19) 购自北京北纳生物

科技有限公司。

1.3 药品与试剂

白芷颗粒(批号 A2110071, 其中欧前胡素质量分数为 0.12%)购自广东一方制药有限公司; 羟苯磺酸钙(国药准字 H20030088)购自上海朝晖药业有限公司; 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 批号 572201)购自美国 Sigma 公司; 柠檬酸钠缓冲液(批号 C1013)、RIPA 组织/细胞裂解液(批号 R0010)、苏木素染色液(批号 G1121)、伊红染色液(批号 G1121)、高碘酸-席夫(PAS)染色试剂盒(批号 G1281)购自北京索莱宝科技有限公司; NC 膜(批号 HATF00010)购自美国 Millipore 公司; ECL 化学发光试剂盒(批号 34095)购自美国 Invitrogen 公司; TUNEL 检测试剂盒(批号 C1090)购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 三色预染蛋白 Marker(批号 WJ102)、PAGE 凝胶快速制备试剂盒(批号 PG213)购自上海雅酶生物科技有限公司; 剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3)兔多克隆抗体(批号 9661S)、磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)兔多克隆抗体(批号 4292S)、p-PI3K 兔多克隆抗体(17366S)、Akt 兔多克隆抗体(批号 9272S)、p-Akt 兔多克隆抗体(批号 4060S)购自美国 CST 公司; B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)兔多克隆抗体(批号 26593-1-AP)、咬合蛋白(Occludin)兔多克隆抗体(批号 27260-1-AP)、闭锁小带蛋白 1(Zonula occluden-1, ZO-1)兔多克隆抗体(批号 21773-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司; Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)兔多克隆抗体(批号 A0207)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; PI3K 抑制剂 LY294002(批号 HY-10108)购自美国 MCE 公司。

1.4 仪器

Tissuelyser 组织研磨机(上海净信实业发展有限公司); 5425R 型台式离心机(德国 Eppendorf 公司); 3K30 型低温离心机(德国 Heraeus 公司); PowerPac 通用电泳仪、Mini-PROTEAN Tetra 电泳槽(美国 Bio-Rad 公司); eBlot L1 型转膜仪(南京金斯瑞生物科技股份有限公司); G BOX 型凝胶成像系统(英国 SYNGENE 公司); BX53 型光学倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); DM2500 型荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 动物模型制备、分组及给药 48 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 称定体质量, 随机取 12 只作为对照组, 36 只作为造模组。禁食 12 h 后以 ip STZ 溶液(60 mg/kg)构建糖尿病模型, 注射 STZ 72 h 后随机测得 3 次血糖值 ≥ 16.7 mmol/L 时认为造模成功^[13], 成模率为 86.1%。将造模成功的 31 只大鼠称定体质量后随机分为模型组($n=11$)、白芷组($n=10$)、羟苯磺酸钙组($n=10$)。白芷组给药剂量参考课题组前期研究结果^[11], 以 1.25 g/(kg·d)剂量 ig 给药, 羟苯磺酸钙以 135 mg/(kg·d)剂量 ig 给药, 连续给药 12 周, 药物使用羟甲基纤维素钠溶液溶解。

2.1.2 视网膜组织病理学观察

(1) 苏木素-伊红(HE)染色: 末次给药后处死大鼠, 摘眼球置于 4%多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋后切片进行 HE 染色, 在显微镜下观察其病理学变化。

(2) PAS 染色: 显微镜下剥离视网膜后 PBS 冲洗 3 次, 加入 3%胰蛋白酶溶液, 置于 37 °C 恒温箱中消化视网膜; 用吸管将消化好的血管脉络转移到干净的载切片上并晾干至完全干燥; 干燥后的切片在自来水中冲洗 3 min, 过碘酸溶液氧化 5 min, ddH₂O 浸洗 2 次; Schiff Reagent 溶液染色 5 min; 自来水浸洗 10 min, 然后用苏木素溶液染细胞核 2 min, ddH₂O 浸洗使其返蓝; 依次放入 70%乙醇 1 min、80%乙醇 1 min、90%乙醇 1 min、无水乙醇 3 min 后, 中性树胶封片并拍照保存。

2.1.3 TUNEL 染色检测视网膜细胞凋亡情况 切片脱蜡脱水后滴加蛋白酶 K, 37 °C 孵育 20 min; PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min; 滴加 50 μ L TUNEL 检测液, 37 °C 避光孵育 60 min; PBS 洗涤 3 次, 每次 10 min; 使用含 DAPI 抗荧光淬灭封片液封片后, 在显微镜下观察拍照。

2.1.4 Western blotting 检测视网膜组织 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、Occludin、ZO-1、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白表达 取各组视网膜组织, 加入裂解液提取蛋白, 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, 于 5%牛奶中封闭, 室温摇床振荡 1 h; TBST 洗膜 3 次后加入一抗稀释液, 4 °C 摇床孵育过夜; 回收一抗, TBST 清洗后加入二抗孵育 1 h; 弃二抗, TBST 洗膜后使用 ECL 显影液曝光。

2.2 体外实验

2.2.1 细胞培养 ARPE-19 细胞用含 10%胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素的 DMEM/F12 培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中进行培养。

2.2.2 TUNEL 染色检测 ARPE-19 细胞凋亡 取对数生长期的 ARPE-19 细胞, 以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板中, 培养 24 h。设置对照组、高渗组、高糖组、白芷组和羟苯磺酸钙组。对照组在含 5.5 mmol/L 葡萄糖的培养基中培养; 高渗组在含 5.5 mmol/L 葡萄糖和 25 mmol/L 甘露醇的培养基中培养; 高糖组在含 30 mmol/L 葡萄糖的培养基中培养; 白芷组在含 30 mmol/L 葡萄糖的培养基中加入白芷继续培养; 羟苯磺酸钙组在含 30 mmol/L 葡萄糖的培养基中加入羟苯磺酸钙继续培养。通过 CCK-8 实验结果确定白芷给药浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 羟苯磺酸钙给药浓度为 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。各组细胞干预 24 h 后, PBS 洗涤 1 次, 加入 4%多聚甲醛固定细胞 30 min; 用 PBS 洗涤后加入含 0.3% Triton X-100 的 PBS, 室温孵育 5 min。滴加 50 μL TUNEL 检测液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 60 min 后 PBS 清洗 3 次; 使用含 DAPI 的抗荧光淬灭剂封片, 荧光显微镜下观察并拍照。

2.2.3 Western blotting 检测 ARPE-19 细胞 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、Occludin、ZO-1 蛋白表达 按“2.2.2”项下方法处理细胞, 收集细胞, 提取蛋白, 按“2.1.4”项下方法检测 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达。

2.2.4 免疫荧光检测 ARPE-19 细胞 Occludin、ZO-1 表达 按“2.2.2”项下方法处理细胞, PBS 洗涤, 每孔加入 1 mL 4%组织细胞固定液, 常温固定 30 min。PBS 洗涤后加入 1%牛血清白蛋白封闭, 于

37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 30 min; 弃封闭液, PBS 摇洗后每孔加入 200 μL 一抗 (1:500), 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。回收一抗, 清洗细胞后每孔加入 200 μL 荧光二抗 (1:200), 避光孵育 1 h 后弃二抗, 每孔加入 200 μL DAPI 溶液避光染核 15 min, 显微镜下观察并拍照保存。

2.2.5 Western blotting 检测 PI3K 抑制剂 LY294002 对 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、PI3K/Akt 通路蛋白表达的影响 设置对照组、高糖组、白芷 (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组和白芷 (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + LY294002 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 组, 给予药物干预 24 h 后, 收集细胞, 提取蛋白, 按“2.1.4”项下方法检测相关蛋白表达。

2.3 统计学分析

所有数据均采用 Graphpad Prism 9.0 软件进行统计学处理并作图, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间的比较采用独立样本 t 检验, 多组间的比较采用单因素方差分析。

3 结果

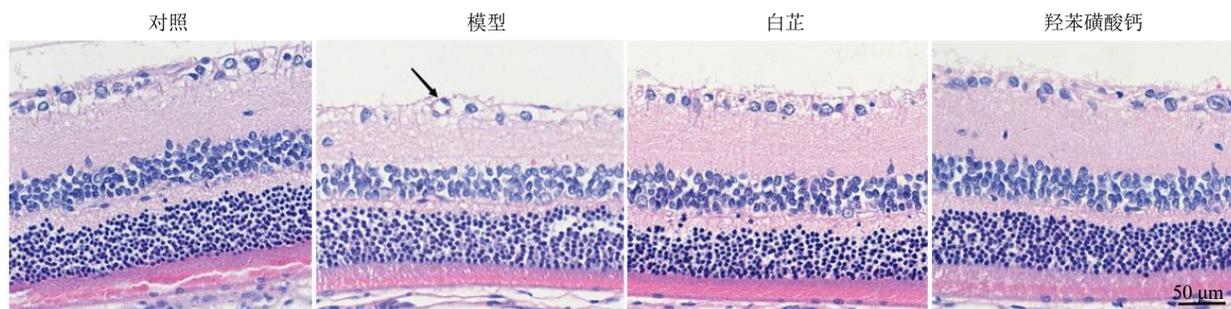
3.1 白芷颗粒对糖尿病大鼠视网膜病理学变化的影响

HE 染色结果如图 1 所示, 对照组大鼠视网膜组织结构清晰, 神经节细胞排列紧密, 内核层和外核层细胞结构完整、紧密; 模型组大鼠视网膜组织毛细血管轻微扩张, 内、外核层组织疏松、厚度变薄, 细胞排列紊乱; 与模型组比较, 白芷组和羟苯磺酸钙组以上病理变化均有所缓解。

PAS 结果如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组无功能毛细血管明显增加; 与模型组比较, 白芷组和羟苯磺酸钙组抑制了无功能毛细血管的形成。

3.2 白芷颗粒对糖尿病大鼠视网膜细胞凋亡的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组红色荧光

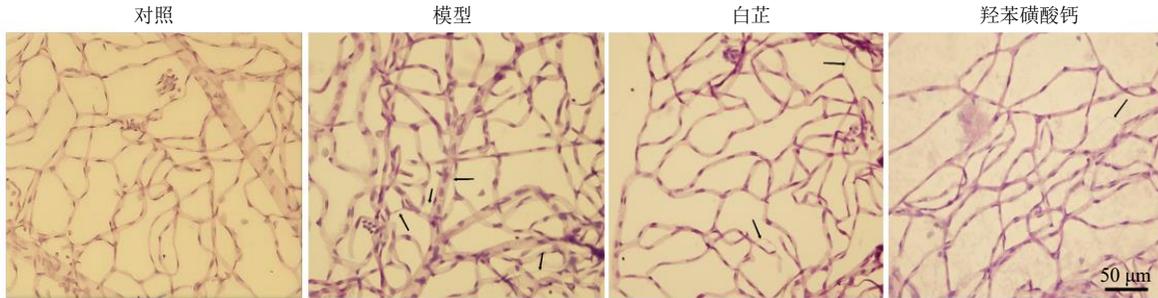


箭头表示毛细血管轻微扩张。

Arrows indicate slight dilation of capillaries.

图 1 各组大鼠视网膜组织病理形态改变 (HE, $\times 400$)

Fig. 1 Histopathologic morphological changes in retina of rats in each group (HE, $\times 400$)

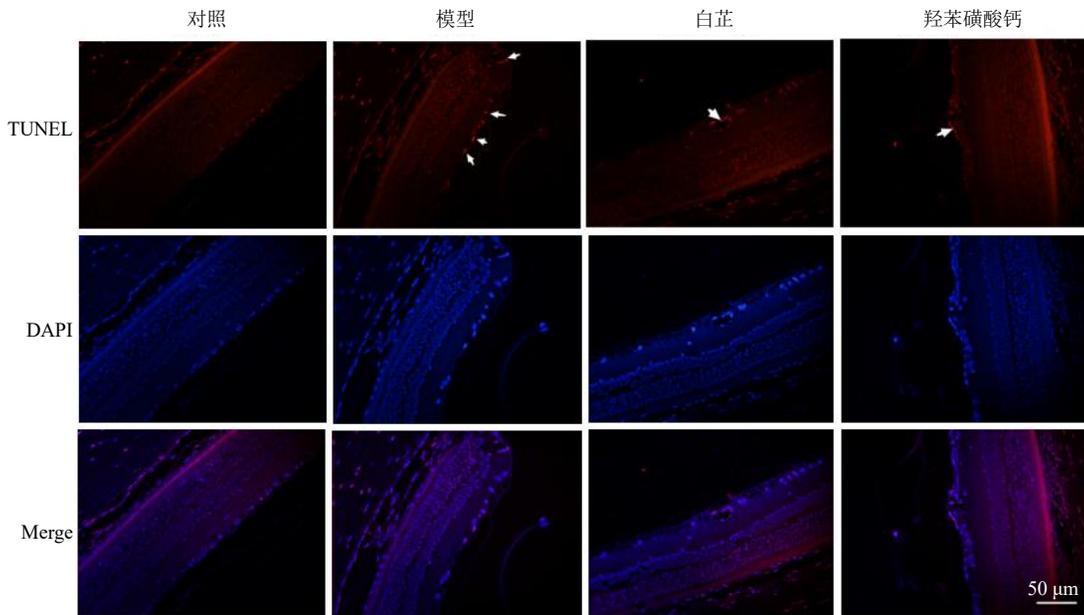


箭头表示无功能毛细血管。

Arrows indicate non functional capillaries.

图 2 各组大鼠视网膜血管病变 (PAS, ×400)

Fig. 2 Retinal vasculopathy in rats in each group (PAS, × 400)



箭头表示凋亡细胞。

Arrows indicate apoptotic cells.

图 3 各组大鼠视网膜细胞凋亡情况 (×400)

Fig. 3 Apoptosis of retinal cells in each group of rats (× 400)

明显增加,提示糖尿病大鼠视网膜细胞凋亡水平增加;与模型组比较,白芷组和羟苯磺酸钙组荧光强度明显减弱,提示药物治疗后可以减轻糖尿病大鼠视网膜细胞凋亡水平。

3.3 白芷颗粒对糖尿病大鼠视网膜组织凋亡相关蛋白表达的影响

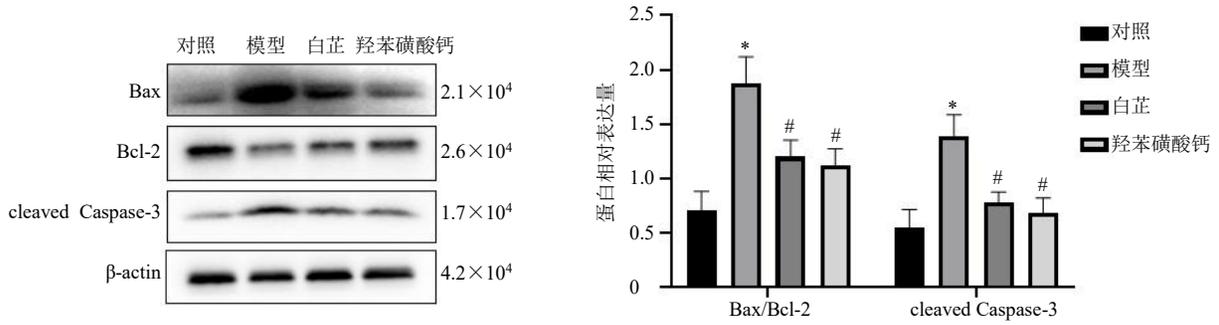
如图 4 所示,与对照组比较,模型组大鼠视网膜组织中 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,白芷组和羟苯磺酸钙组 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$),提示白芷颗粒能够抑制糖尿病大鼠视网膜细胞的凋亡。

3.4 白芷颗粒对糖尿病大鼠视网膜组织中 Occludin、ZO-1 蛋白表达的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组大鼠视网膜组织中 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,白芷组和羟苯磺酸钙组 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$),提示白芷颗粒能够在一定程度上保护糖尿病大鼠视网膜屏障。

3.5 白芷颗粒对糖尿病大鼠视网膜组织中 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响

如图 6 所示,与对照组比较,模型组大鼠视网膜组织中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 显著降低 ($P <$



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型(高糖)组比较: # $P < 0.05$, 下图同。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model (high-glucose) group, same as below figures.

图4 各组大鼠视网膜组织凋亡相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Expressions of apoptosis-related proteins in retinal tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

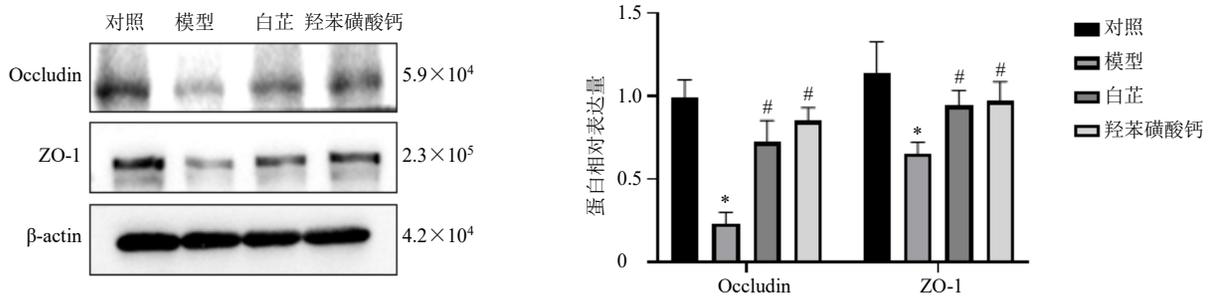


图5 各组大鼠视网膜组织中 Occludin、ZO-1 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Occludin, ZO-1 protein expressions in retinal tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

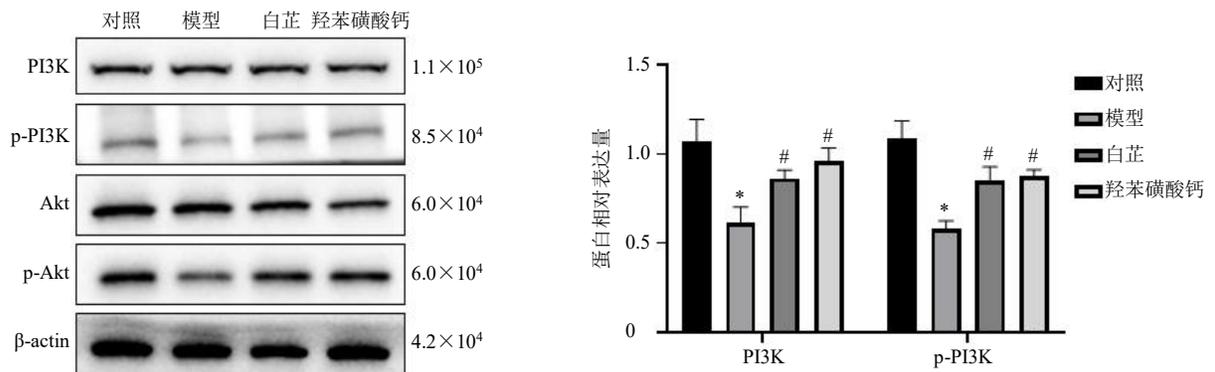


图6 各组大鼠视网膜组织中 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Expressions of PI3K/Akt pathway-related proteins in retinal tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

0.05); 与模型组比较, 白芷组和羟苯磺酸钙组鼠视网膜组织中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 显著升高 ($P < 0.05$), 提示白芷颗粒可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路减轻 DR 损伤。

3.6 白芷颗粒对高糖诱导的 ARPE-19 细胞凋亡的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 高糖刺激显著增加了细胞凋亡 ($P < 0.05$), 红色荧光明显增多; 与

模型组比较, 白芷组和羟苯磺酸钙组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$), 红色荧光明显减少。表明白芷颗粒可以抑制高糖环境下 ARPE-19 细胞的凋亡。

3.7 白芷颗粒对高糖诱导的 ARPE-19 细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 白芷组和羟苯磺酸

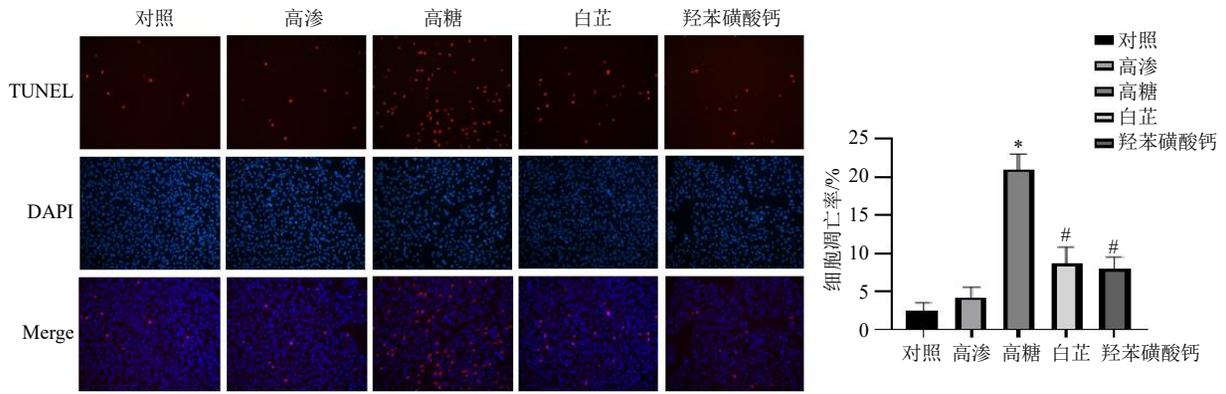


图7 白芷颗粒对高糖诱导的 ARPE-19 细胞凋亡的影响 (×200)

Fig. 7 Effect of *A. dahurica* granules on apoptosis of high glucose-induced ARPE-19 cells (×200)

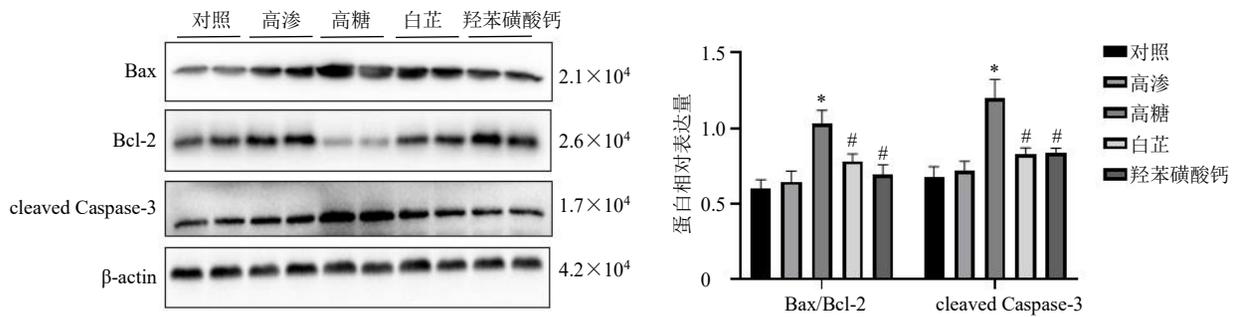


图8 白芷颗粒对高糖诱导的 ARPE-19 细胞中凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

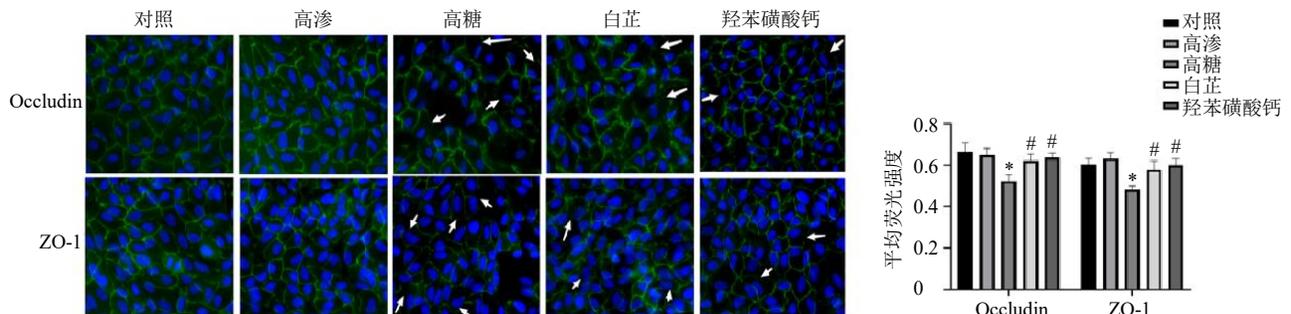
Fig. 8 Effect of *A. dahurica* granules on apoptosis-related protein expressions in high glucose-induced ARPE-19 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

钙组 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 表明白芷颗粒能够在一定程度上抑制 ARPE-19 细胞凋亡从而减轻高糖环境下的视网膜损伤。

3.8 白芷颗粒对高糖诱导的 ARPE-19 细胞中 Occludin、ZO-1 表达的影响

为了进一步验证白芷对视网膜屏障的保护作用,

采用免疫荧光技术考察白芷对高糖诱导下 ARPE-19 细胞 Occludin 以及 ZO-1 表达的影响。如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组细胞间连接被破坏, Occludin、ZO-1 荧光强度明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 白芷组和羟苯磺酸钙组细胞中紧密连接有所恢复, Occludin、ZO-1 荧光强度显著增加 ($P < 0.05$)。



白色箭头表示紧密连接被破坏。

White arrow indicates that tight connection has been broken.

图9 白芷对高糖诱导的 ARPE-19 细胞中 Occludin、ZO-1 表达的影响 (×200)

Fig. 9 Effect of *A. dahurica* granules on expressions of Occludin and ZO-1 in high glucose-induced ARPE-19 cells (×200)

3.9 白芷颗粒对高糖诱导的 ARPE-19 细胞中紧密连接相关蛋白表达的影响

如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 Occludin、ZO-1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 白芷组和羟苯磺酸钙组 Occludin、ZO-1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 与免疫荧光结果一致, 说明白芷颗粒能够通过增强细胞间紧密连接从而保护高糖诱导的 ARPE-19 细胞损伤。

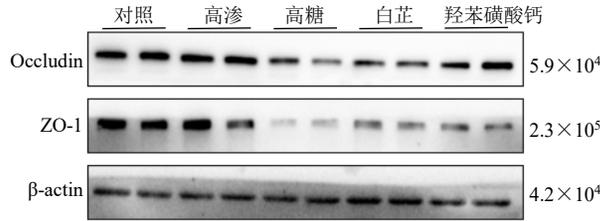
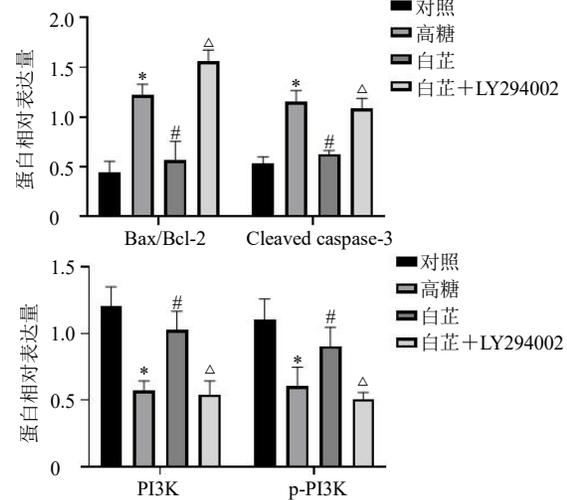
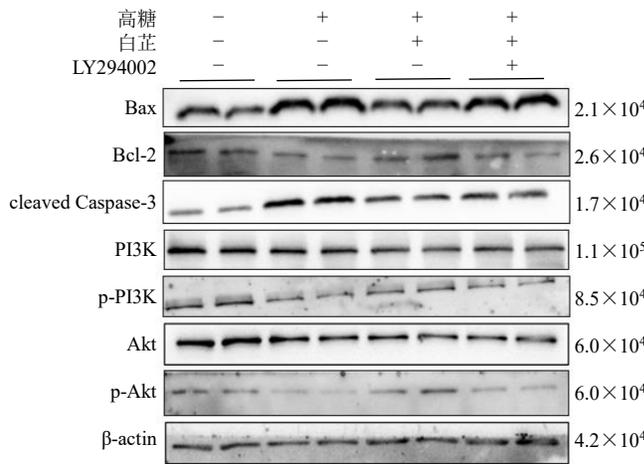
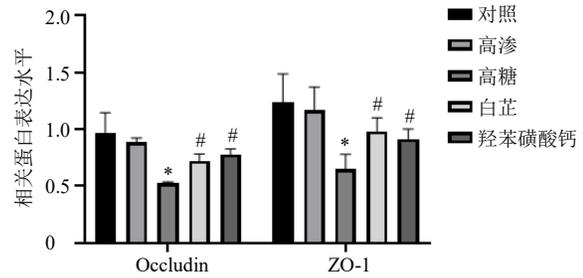


图 10 白芷颗粒对高糖诱导的 ARPE-19 细胞中 Occludin、ZO-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 10 Effect of *A. dahurica* granules on Occludin and ZO-1 protein expressions in high glucose-induced ARPE-19 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.10 白芷颗粒通过激活 PI3K/Akt 通路减轻细胞凋亡保护视网膜屏障损伤

如图 11 所示, 与对照组比较, 模型组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 明显降低 ($P < 0.05$), PI3K/Akt 信号通路受到抑制; 与模型组比较, 白芷组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 明显升高 ($P < 0.05$); 给予 PI3K 抑制剂 LY294002 干预后, Akt 磷酸化受到抑制 ($P < 0.05$), Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表



与白芷组比较: $\Delta P < 0.05$ 。

$\Delta P < 0.05$ vs *A. dahurica* granules group.

图 11 PI3K 抑制剂对高糖诱导的 ARPE-19 细胞中 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 11 Effect of PI3K inhibitors on expression of PI3K/Akt pathway related proteins in high glucose-induced ARPE-19 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

达明显升高 ($P < 0.05$), 提示白芷颗粒可能通过 PI3K/Akt 通路抑制细胞凋亡从而减轻视网膜屏障损伤。

4 讨论

DR 是糖尿病患者中最常见的一种微血管并发症, 其病理过程与血-视网膜屏障 (blood retinal

barrier, BRB) 密切相关^[14]。慢性高血糖会破坏视网膜屏障, 引起毛细血管中周细胞的丢失以及基底膜增厚, 从而使得视网膜中的血管通透性增加, 最终导致 BRB 分解^[15-16]。BRB 主要包括内屏障和外屏障, 其中外屏障主要由视网膜色素上皮 (retina pigment epithelium, RPE) 及其连接构成^[17-18]。细胞

间的连接是屏障功能正常发挥作用的基础,紧密连接主要由 Occludin、ZO-1 等组成^[19]。在糖尿病患者中, Occludin 与 BRB 损伤密切相关,高糖会使得 Occludin 表达选择性降低, BRB 通透性增加。相关实验表明, STZ 诱导的糖尿病大鼠模型在 8 周后采用伊文思蓝染色观察发现其渗漏量与对照组相比增加了 10%, 免疫荧光结果显示糖尿病大鼠中 Occludin 表达量明显降低^[20]。ZO 家族中, ZO-1 位于上皮细胞和内皮细胞的封锁小带中^[21]。在 DR 早期阶段, 氧化应激及炎症等会诱导炎症因子和趋化因子上调, 导致 ZO-1 表达降低, 视网膜屏障被破坏, 从而出现出血等症状^[22]。本研究结果显示, 与对照组比较, 模型组大鼠 Occludin、ZO-1 表达明显降低, 提示糖尿病大鼠视网膜组织中紧密连接被破坏, BRB 受损; 与模型组比较, 白芷给药后 Occludin、ZO-1 表达量明显升高, 表明白芷在一定程度上具有保护 BRB 功能的作用。在体外研究中, 采用免疫荧光和 Western blotting 法观察 ARPE-19 细胞中紧密连接及其蛋白表达情况, 结果发现白芷干预后可以增加细胞间 Occludin、ZO-1 表达, 发挥保护 ARPE-19 细胞的作用。

高糖诱导的视网膜细胞凋亡是早期 DR 的重要发病机制之一^[23-24]。线粒体中高血糖诱导的 ROS 积累可以使线粒体膜通透性增加, 进而触发视网膜线粒体释放细胞色素 C 激活 Caspase-9, 然后通过一系列生物过程激活 Caspase-3 导致细胞凋亡^[25]。PI3K/Akt 信号通路在视网膜细胞凋亡过程中起着至关重要的作用^[26]。活化的 Akt 会引起下游磷酸化级联反应, 从而促进细胞存活^[27]。在高糖环境下 PI3K/Akt 信号通路传导受阻, 使促凋亡因子 Bax 表达上调, 抗凋亡因子 Bcl-2 表达受到抑制, 之后进一步激活 Caspase3 后导致细胞凋亡增加^[28]。本研究发现, 白芷颗粒可以降低糖尿病大鼠视网膜组织与 ARPE-19 细胞中 Bax/Bcl-2、cleaved Caspase-3 的蛋白表达, TUNEL 染色也证实了这一表现。本研究进一步测定了 ARPE-19 细胞中 PI3K/Akt 信号通路及其下游凋亡相关蛋白表达情况, 结果显示与高糖组比较, 白芷干预后 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达水平明显增加。使用 PI3K 抑制剂 LY294002 后抑制了 Akt 的磷酸化过程, 同时下游 Bax/Bcl-2 蛋白表达增加、cleaved Caspase-3 蛋白表达升高, 由此推测白芷颗粒可能通过 PI3K/Akt 通路抑制细胞凋亡。

综上, 本研究发现白芷颗粒可能通过调控

PI3K/Akt 信号通路减轻视网膜细胞凋亡保护 BRB 损伤, 从而延缓早期 DR, 为白芷治疗 DR 提供了潜在机制研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Leasher J L, Bourne R R, Flaxman S R, *et al.* Erratum. global estimates on the number of people blind or visually impaired by diabetic retinopathy: A Meta-analysis from 1990—2010. [J]. *Diabetes Care*, 2016, 39(11): 1643-1649.
- [2] Zheng Y, Ley S H, Hu F B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(2): 88-98.
- [3] Tan T N, Wong T Y. Diabetic retinopathy: Looking forward to 2030 [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 13: 1077669.
- [4] Prince J, Kumar D, Ghosh A, *et al.* Surgical management of diabetic macular edema [J]. *Curr Diab Rep*, 2023, 23(6): 119-125.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 109.
- [6] 邹菊英, 苏维, 潘意, 等. 白芷化学成分和药理作用研究进展及其质量标志物 (Q-marker) 的预测分析 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2023, 25(7): 2535-2548.
- [7] 雷思思, 胡志波, 郭俊, 等. 白芷提取物促糖尿病溃疡新生血管成熟作用及机制研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(12): 3223-3233.
- [8] Li Y W, Liu Y F, Liu S W, *et al.* Diabetic vascular diseases: Molecular mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 152.
- [9] Shi X D, Liu C, Chen J W, *et al.* Endothelial MICU1 alleviates diabetic cardiomyopathy by attenuating nitrate stress-mediated cardiac microvascular injury [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2023, 22(1): 216.
- [10] Hu Y H, Lei S S, Yan Z Y, *et al.* *Angelica dahurica* regulated the polarization of macrophages and accelerated wound healing in diabetes: A network pharmacology study and *in vivo* experimental validation [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 678713.
- [11] Guo J, Hu Z B, Yan F J, *et al.* *Angelica dahurica* promoted angiogenesis and accelerated wound healing in db/db mice via the HIF-1 α /PDGF- β signaling pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 160: 447-457.
- [12] 李依洋, 杨珍, 张晓娜, 等. 基于分子对接及网络药理学的托里消毒散精简方促糖尿病创面愈合作用机制研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(14): 3298-3308.
- [13] Liu K, Gao X, Hu C Y, *et al.* Capsaicin ameliorates diabetic retinopathy by inhibiting poldip2-induced oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2022, 56: 102460.
- [14] Tajima K, Akanuma S I, Ohishi Y, *et al.* Freshly isolated

- retinal capillaries to determine efflux transporter function at the inner BRB [J]. *J Control Release*, 2022, 343: 434-442.
- [15] Stravalaci M, Ferrara M, Pathak V, *et al.* The long pentraxin PTX3 as a new biomarker and pharmacological target in age-related macular degeneration and diabetic retinopathy [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 12: 811344.
- [16] Yang X, Yu X W, Zhang D D, *et al.* Blood-retinal barrier as a converging pivot in understanding the initiation and development of retinal diseases [J]. *Chin Med J*, 2020, 133(21): 2586-2594.
- [17] Yau J W, Rogers S L, Kawasaki R, *et al.* Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(3): 556-564.
- [18] Yumnamcha T, Devi T S, Singh L P. Auranofin mediates mitochondrial dysregulation and inflammatory cell death in human retinal pigment epithelial cells: Implications of retinal neurodegenerative diseases [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 1065.
- [19] Platania C B M, Lazzara F, Fidilio A, *et al.* Blood-retinal barrier protection against high glucose damage: The role of P2X7 receptor [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 168: 249-258.
- [20] Fang M Y, Wan W C, Li Q M, *et al.* Asiatic acid attenuates diabetic retinopathy through TLR4/MyD88/NF- κ B p65 mediated modulation of microglia polarization [J]. *Life Sci*, 2021, 277: 119567.
- [21] Napoli D, Biagioni M, Billeri F, *et al.* Retinal pigment epithelium remodeling in mouse models of retinitis pigmentosa [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10): 5381.
- [22] Zhang C Y, Xie H, Yang Q, *et al.* Erythropoietin protects outer blood-retinal barrier in experimental diabetic retinopathy by up-regulating ZO-1 and occludin [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2019, 47(9): 1182-1197.
- [23] Zhang T Y, Ouyang H, Mei X Y, *et al.* Erianin alleviates diabetic retinopathy by reducing retinal inflammation initiated by microglial cells via inhibiting hyperglycemia-mediated ERK1/2-NF- κ B signaling pathway [J]. *FASEB J*, 2019, 33(11): 11776-11790.
- [24] Eshaq R S, Wright W S, Harris N R. Oxygen delivery, consumption, and conversion to reactive oxygen species in experimental models of diabetic retinopathy [J]. *Redox Biol*, 2014, 2: 661-666.
- [25] Nano M, Montell D J. Apoptotic signaling: Beyond cell death [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2024, 156: 22-34.
- [26] Chen K Q, Li Y Q, Zhang X H, *et al.* The role of the PI3K/AKT signalling pathway in the corneal epithelium: Recent updates [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(5): 513.
- [27] Wang N, Zhang C, Xu Y, *et al.* Berberine improves insulin-induced diabetic retinopathy through exclusively suppressing Akt/mTOR-mediated HIF-1 α /VEGF activation in retina endothelial cells [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(15): 4316-4326.
- [28] Huang H, He J, Johnson D K, *et al.* Deletion of placental growth factor prevents diabetic retinopathy and is associated with Akt activation and HIF1 α -VEGF pathway inhibition [J]. *Diabetes*, 2015, 64(1): 200-212.

[责任编辑 李亚楠]