

汉黄芩素对 2 型糖尿病小鼠糖尿病视网膜病变的影响

颜彦^{1*}, 吴琳², 郑海龙³

(1. 海南医学院第一附属医院药学部, 海南海口 570100; 2. 海南医学院热检学院, 海南海口 570102;
3. 海南医学院第一附属医院内分泌科, 海南海口 570100)

摘要: 为探讨汉黄芩素对 2 型糖尿病小鼠视网膜病变的影响, 采用酶联免疫法检测小鼠血脂(TC、TG、LDL-C、HDL-C)和空腹胰岛素(FINS)水平; Western blot 法和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法分别检测血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、转化生长因子- β (TGF- β) 蛋白及基因水平, 分析汉黄芩素对 2 型糖尿病小鼠视网膜病变的影响。结果显示, 汉黄芩素组视网膜 VEGF 荧光强度较模型组明显减弱, TC、TG、LDL-C、FINS 含量、VEGF、bFGF、TGF- β 的 mRNA 水平及蛋白表达显著低于模型组, 而 HDL-C 含量明显高于模型组 ($P < 0.05$)。汉黄芩素可能通过抑制小鼠糖尿病进程及小鼠视网膜 VEGF、bFGF、TGF- β 的表达, 对小鼠糖尿病视网膜病变起到保护作用。

关键词: 汉黄芩素; 糖尿病视网膜病变; 血管内皮生长因子; 碱性成纤维细胞生长因子; 转化生长因子- β

中图分类号: R587.2

文献标识码: A

Effect of baicalin on diabetic retinopathy in type 2 diabetic mice

YAN Yan^{1*}, WU Lin², ZHENG Hailong³

(1. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570100, Hainan, China; 2. College of Thermal Examination, Hainan Medical College, Haikou 570102, Hainan, China; 3. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570100, Hainan, China)

Abstract: The effect of baicalin on retinopathy of type 2 diabetic mice was explored. In this project, the levels of blood lipids and fasting insulin (FINS) was detected by enzyme-linked immunoassay; the protein and gene levels of VEGF, bFGF and TGF- β were detected by Western blot and Real-Time quantitative PCR (qRT-PCR) respectively, to analyse the effects of baicalin on retinopathy in type 2 diabetic mice. The results showed that the fluorescence intensity of the baicalin group was significantly decreased, the content of TC, TG, FINS, LDL-c and the mRNA level and protein expression of VEGF, bFGF and TGF-beta were significantly lower than that of the model group, while HDL-C content was significantly higher than those in the model group ($P < 0.05$). Baicalin may play a protective role in diabetic retinopathy in mice by inhibiting the progression of diabetes in mice and the expressions of VEGF, bFGF and TGF- β in mice.

Key words: baicalin; diabetic retinopathy; VEGF; bFGF; TGF- β

随着我国经济的飞速发展,人们的高节奏生活及饮食结构的改变,现在我国已经赶超美国成为第一大糖尿病大国^[1]。2 型糖尿病发展至后期会出现严重的并发症,如糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变、糖尿病足等^[2-3]。有文献报道^[4-5],汉黄芩素在人结肠癌细胞中可通过 p53 诱导癌细胞凋亡,且能够显

著抑制肿瘤的生长并促进树突状细胞、T 细胞等在肿瘤组织中的聚集,证实了汉黄芩素的抗肿瘤作用及免疫增强活性。然而,目前汉黄芩素对于 2 型糖尿病视网膜病变的相关研究较少。目前,已有多数研究^[6-8]证实血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)与糖尿病视网膜病变关系密切。本研究从汉黄芩素改善糖

尿病人视网膜病变的角度出发,研究其对 KK/Upj-Ay 小鼠 2 型糖尿病及糖尿病视网膜病变的改善作用及作用机制,为汉黄芩素治疗糖尿病视网膜病变提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

KK/Upj-Ay 小鼠(自发性 2 型糖尿病小鼠),63 只,5 周龄;昆明小鼠 21 只,体质量 30 ~ 40 g,SPF 级,雄性,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(湘)2011-0003。自购买之日起,适应性饲养 1 周,期间自由摄食与饮水,适应期内所有小鼠的饲料与饮用水一致。汉黄芩素(生产批号:MUST-11040321 纯度>98%),购于成都曼斯特有限公司;链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号:S0130-1g);盐酸二甲双胍片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号:AAH5579,规格:0.5 g/片)。柠檬酸(天津市北辰方正试剂厂,批号:20170225);总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)、三酰甘油(TG)试剂盒、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS) ELISA 试剂盒(南京建成生物工程研究所);VEGF、bFGF、TGF- β 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);BGMS-1 血糖仪(长沙三诺生物传感技术股份有限公司);专用饲料(北京博爱港商贸中心);M200PRO 型多功能酶标仪为瑞士 TECAN 公司产品;引物序列由上海生工生物工程公司合成(见表 1)。

表 1 各引物序列

引物	序列(5'-3')
GAPDH	上游:5'-TGCTGAGTATGTCGTGGAGTC-3'
	下游:5'-TGCTGAGTATGTCG TGGAGTC-3'
VEGF	上游:5'-TGTCTATCAAGGGAGTGTGT-3'
	下游:5'-TGGAGTATTTCGGTGACCG-3'
bFGF	上游:5'-CGTCAAACTACAACCTCAAGCA-3'
	下游:5'-CGTCCATCTTCCTTCATAGCA-3'
TGF- β	上游:5'-CCGCAACAACGCCATCTATG-3'
	下游:5'-TGCTYCCCGAATGTCTGAC-3'

1.2 动物分组及给药^[9]

KK/Upj-Ay 小鼠,5 周龄,按照空腹血糖(FBG)水平随机分组,分别为模型组、汉黄芩素组(6.32 g 生药/kg)、二甲双胍组(0.1 g/kg);以正常昆明小鼠为对照组,每组 21 只。采用灌胃给药,对照组和模型组给予等体积的蒸馏水,1 次/天,连续给药 3

个月。

1.3 糖尿病视网膜病变(DR)模型的建立^[10-12]

KK/Upj-Ay 小鼠连续饲喂专用饲料 3 个月,每 1 个月进行一次眼底检查,糖尿病小鼠出现视网膜出血或新生血管即糖尿病视网膜病变小鼠模型成功。对照组小鼠给予正常饲料饲喂。

1.4 ELISA 法

连续给药 3 个月后,采用酶联免疫法(ELISA)四组小鼠在处死前,尾静脉采血,按照试剂盒说明,测定血清中 TC、TG、HDL-C、LDL-C 含量,及血清 FINS 水平。

1.5 小鼠视网膜 VEGF 免疫荧光

给药 3 个月结束采完血后,随机取 7 只小鼠麻醉处死,摘取眼球,固定于 10% 多聚甲醛液中固定,切片,加入抗 VEGF 的一抗抗体,室温孵育 1 h, PBS 洗三遍,每次 5 min。加入二抗,室温孵育 30 min。PBS 洗三遍,每次 5 min。加入 DAPI 原液染色 5 min,用 PBS 洗三遍,洗去多余的 DAPI,加入 20 μ L 抗荧光淬灭封片剂封片。

1.6 Western blot 法

随机取 7 只小鼠,剥离小鼠视网膜,加入 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min,充分裂解后,低温离心机 4 $^{\circ}$ C 12 000 rpm 离心 10 min,采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。将不同浓度的蛋白样品用 PBS 稀释成相同浓度,并加入 5 $\times$ 上样缓冲液,使用 10% ~ 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1h,4 $^{\circ}$ C 条件下孵育一抗过夜。二抗室温孵育含蛋白的 PVDF 膜 2h,TPBS 洗涤膜 3 次。采用 ECL 显色法,在暗室采用胶片曝光,用 Image J 软件分析。

1.7 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

剩余 7 只小鼠取视网膜组织,常规方法提取 RNA, TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 进行反转录;涡旋震荡混匀,短暂离心,使管壁上的残留集中到管底。设定 PCR 程序,42 $^{\circ}$ C 孵育 40 min,85 $^{\circ}$ C,5 min。反应结束后,冷却,cDNA 产物置于-20 $^{\circ}$ C 暂存。采用 TaqMan Small RNA Assays 进行扩增,用 DEPC 水补齐至 10 μ L,加入八联排管中。混匀,离心,放入 PCR 仪中,选择两步法程序,反应结束后采用相对定量方法进行 mRNA 水平分析,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。 $\Delta\Delta Ct$ 计算公式: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}})_{\text{对照组}}$ 。

1.8 统计学分析

应用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,计量资

料数据以均值 $\pm$ 标准差表示,多组间均数的比较采用单因素(one-way ANOVA)方差分析,组间两两比较采用S-N-K检验。当 $P<0.05$ 时,表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清中 TC、TG、HDL-C、LDL-C 和 FINS 含量

如表1所示,四组小鼠 HDL-C、TC、LDL-C、TG 和 FINS 的含量差异具有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,模型组 TC、TG、LDL-C、FINS 含量显著

升高,汉黄芩素或二甲双胍能显著降低 TC、TG、LDL-C、FINS 含量,升高 HDL-C 含量。

2.2 VEGF 在小鼠视网膜的分布及表达

通过采用免疫荧光法检测 VEGF 在小鼠视网膜的分布及表达情况,结果发现,与对照组比较,模型组视网膜神经节细胞层 VEGF 呈现高表达(箭头部分,红色荧光),荧光较强。汉黄芩素组和二甲双胍组相对于模型组荧光明显的减弱,说明汉黄芩素对小鼠视网膜 VEGF 的表达有明显的抑制作用(图1)。

表1 各组小鼠血清中 TC、TG、HDL-C、LDL-C、FINS 含量比较

组别	n	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	FINS (ng/L)
对照组	21	2.4 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.1	1.5 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1
模型组	21	3.9 $\pm$ 0.4 ^a	1.9 $\pm$ 0.3 ^a	0.8 $\pm$ 0.3 ^a	0.4 $\pm$ 0.2 ^a	2.8 $\pm$ 0.2 ^a
汉黄芩素组	21	2.8 $\pm$ 0.5 ^{ab}	1.3 $\pm$ 0.2 ^{ab}	1.2 $\pm$ 0.2 ^{ab}	0.2 $\pm$ 0.1 ^b	1.9 $\pm$ 0.2 ^{ab}
二甲双胍组	21	2.6 $\pm$ 0.1 ^b	1.4 $\pm$ 0.2 ^{ab}	1.1 $\pm$ 0.2 ^{ab}	0.2 $\pm$ 0.1 ^b	1.8 $\pm$ 0.1 ^{ab}

与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$

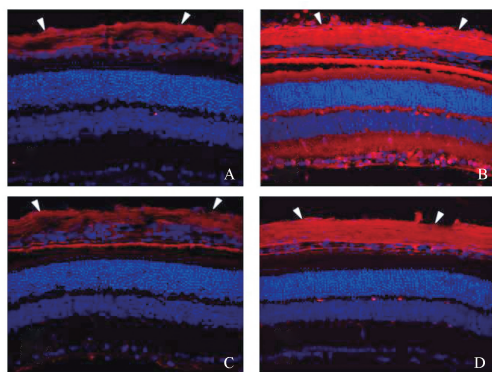


图1 各组小鼠荧光染色结果(IF,400 $\times$)

A:对照组,B:模型组,C:汉黄芩素组,D:二甲双胍组

2.3 VEGF、bFGF、TGF- β 蛋白表达

采用 Western blot 法检测了各组小鼠视网膜 VEGF、bFGF、TGF- β 蛋白表达情况,结果表明,四组小鼠视网膜 VEGF、bFGF、TGF- β 蛋白表达比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,模型组 VEGF、bFGF、TGF- β 蛋白表达显著增加($P<0.05$)。与模型组相比,汉黄芩素组和二甲双胍组 VEGF、bFGF、TGF- β 蛋白表达显著降低($P<0.05$)。Western blot 结果见图2,各蛋白的相对密度见表2。

2.4 VEGF、bFGF、TGF- β 的 mRNA 水平

采用 qRT-PCR 对小鼠视网膜 VEGF、bFGF、TGF- β 的 mRNA 水平变化情况进行了检测,结果发

现,四组视网膜 VEGF、bFGF、TGF- β mRNA 水平比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,模型组 VEGF、bFGF、TGF- β mRNA 表达显著增加($P<0.05$)。与模型组相比,汉黄芩素组和二甲双胍组 VEGF、bFGF、TGF- β mRNA 表达显著降低(见表3)。

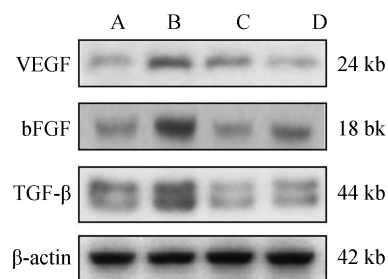


图2 各组小鼠相关蛋白表达

A:对照组,B:模型组,C:汉黄芩素组,D:二甲双胍组

表2 各组小鼠视网膜中 VEGF、bFGF、TGF- β 蛋白含量比较

组别	VEGF	bFGF	TGF- β
对照组	0.4 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
模型组	1.2 $\pm$ 0.1 ^a	1.3 $\pm$ 0.3 ^a	1.1 $\pm$ 0.2 ^a
汉黄芩素组	0.7 $\pm$ 0.2 ^{ab}	0.7 $\pm$ 0.2 ^{ab}	0.6 $\pm$ 0.1 ^b
二甲双胍组	0.8 $\pm$ 0.1 ^{ab}	0.8 $\pm$ 0.2 ^{ab}	0.7 $\pm$ 0.2 ^b

与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ ($n=7$)

表 3 各组小鼠视网膜中 VEGF、bFGF、TGF- β mRNA 含量比较

组别	VEGF mRNA	bFGF mRNA	TGF- β mRNA
对照组	0.6 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
模型组	1.6 $\pm$ 0.1 ^a	1.2 $\pm$ 0.1 ^a	1.3 $\pm$ 0.2 ^a
汉黄芩素组	0.8 $\pm$ 0.1 ^b	0.9 $\pm$ 0.2 ^{ab}	0.7 $\pm$ 0.2 ^b
二甲双胍组	0.8 $\pm$ 0.1 ^b	0.8 $\pm$ 0.2 ^b	0.8 $\pm$ 0.2 ^b

与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$ ($n = 7$)

3 讨 论

糖尿病确切的病因和发病机制尚未完全阐明,对糖尿病的治疗已成为需要全人类共同攻克的难题^[13]。2 型糖尿病到后期会产生严重的并发症。常见的并发症包括糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病、糖尿病足等^[14],建立 2 型糖尿病视网膜病变小鼠模型是研究糖尿病的理想工具,一个长期、稳定的 2 型糖尿病视网膜病变小鼠模型,对于进一步研究糖尿病视网膜病变很有必要^[15]。本研究采用 KK/Upj-Ay 小鼠诱发 2 型糖尿病视网膜病变模型比较稳定、成模率更高。

汉黄芩素是黄芩中的成分,属于黄酮类化合物,具有抗病毒、抗菌、抗炎、解热等作用。研究还证实汉黄芩素有降血糖、抗氧化作用^[16]。从实验结果可以看出,汉黄芩素可显著增加 HDL-C 的含量,同时降低 TC、TG、LDL-C 的含量,说明汉黄芩素对小鼠 2 型糖尿病诱发的高脂血症具有明显的治疗作用。VEGF、TGF- β 、bFGF 是眼睛新生血管的形成、血管增生和炎症形成的主要作用因子。相关实验表明,VEGF 可以促进血管内皮细胞的增殖,形成新生毛细血管。TGF- β 可以诱导巨噬和中性粒细胞进行抗炎反应。bFGF 则主要和胶原纤维的合成有关。2 型糖尿病视网膜病变到后期有大量的炎性细胞浸润,还会生成大量的新生血管,推测汉黄芩素发挥改善视网膜病变的效应,与 VEGF、bFGF、TGF- β 等相关。免疫荧光显示,汉黄芩素能明显抑制小鼠视网膜 VEGF 的表达。实验结果显示,汉黄芩素对小鼠视网膜病变的 VEGF、bFGF、TGF- β 蛋白和 mRNA 表达有下调作用。综上所述,汉黄芩素对小鼠 2 型糖尿病视网膜病变的保护作用可能是通过抑制 VEGF、bFGF、TGF- β 表达起作用。

参考文献:

[1] AIELLO LP, ODIA I, GLASSMAN AR, et al. Comparison of early treatment diabetic retinopathy study standard 7-field imaging

with ultrawide-field imaging for determining severity of diabetic retinopathy[J]. JAMA Ophthalmol, 2018,34(5):45-7.

[2] ONDREJKOVA M, JACKULIAK P, MARTINKA E, et al. Prevalence and epidemiological characteristics of patients with diabetic retinopathy in Slovakia: 12-month results from the DIARET SK study[J]. PLoS One, 2019,14(12):e0223788.

[3] JIANG S, YU T, ZHANG Z, et al. Diagnostic performance of retinopathy in the detection of diabetic nephropathy in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of 45 studies[J]. Ophthalmic Res, 2019,62(2):68-79.

[4] SHIMIZU T, SHIBUYA N, NARUKAWA Y, et al. Synergistic effect of baicalein, wogonin and oroxylin a mixture: multistep inhibition of the NF- κ B signalling pathway contributes to an anti-inflammatory effect of scutellaria root flavonoids[J]. J Nat Med, 2018, 72(1): 181-91.

[5] RUIBIN J, BO J, DANYING W, et al. Therapy effects of wogonin on ovarian cancer cells[J]. Biomed Res Int, 2017, 20(12): 938.

[6] XU B, ZHANG H, ZHU M, et al. Critical role of trophic factors in protecting müller glia: implications to neuroprotection in age-related macular degeneration, diabetic retinopathy, and anti-VEGF therapies[J]. Adv Exp Med Biol, 2019,1185:469-73.

[7] LI JK, WEI F, JIN XH, et al. Changes in vitreous VEGF, bFGF and fibrosis in proliferative diabetic retinopathy after intravitreal bevacizumab[J]. Int J Ophthalmol, 2015, 8(6):1202-6.

[8] 戎慧丰.增生型糖尿病视网膜病变纤维化相关因子的研究进展[J].中华实验眼科杂志,2011,29(5):473-6.

[9] CHEN X, GU T, WANG JH, et al. Effects of wogonin on the mechanism of melanin synthesis in A375 cells[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5): 4547-53.

[10] VERMA A, XU K, DU T, et al. Erratum: expression of human ACE2 in lactobacillus and beneficial effects in diabetic retinopathy in mice[J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2020,17:400.

[11] BEK T, STEFANSSON E, HARDARSON SH. Retinal oxygen saturation is an independent risk factor for the severity of diabetic retinopathy[J]. Br J Ophthalmol, 2018,76(57):97.

[12] 李高彪,周云云,李雨薇,等.通络驻景丸对糖尿病大鼠视网膜病变的影响[J].中华中医药学刊,2018, 54(6):45.

[13] JOY SS, SIDDIQUI K. Molecular and pathophysiological mechanisms of diabetic retinopathy in relation to adhesion molecules[J]. Curr Diabetes Rev, 2018,6(6):567.

[14] YOU J, QI S, DU Y, et al. Multiple bioinformatics analyses of integrated gene expression profiling data and verification of hub genes associated with diabetic retinopathy[J]. Med Sci Monit, 2020,26:e923146.

[15] PANG JP, SON G, YOON YH, et al. Combined vitrectomy with intravitreal dexamethasone implant for refractory macular edema secondary to diabetic retinopathy, retinal vein occlusion, and noninfectious posterior uveitis[J]. Retina, 2018, 56(6):667.

[16] DURR C, HANAN BS, SCHULZ A, et al. Tumor necrosis factor receptor signaling is a driver of chronic lymphocytic leukemia that can be therapeutically targeted by the flavonoid wogonin[J]. Haematologica, 2018, 103(4): 688-97.

(本文编辑:秦旭平)