

高糖环境下内脏脂肪素在人视网膜色素上皮细胞中的作用

邵义男¹, 路强², 杨晓静³

引用: 邵义男, 路强, 杨晓静. 高糖环境下内脏脂肪素在人视网膜色素上皮细胞中的作用. 国际眼科杂志 2020; 20(12): 2028-2033

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 (No. 2014MS0865, 2017MS0804)

作者单位: ¹(014040) 中国内蒙古自治区包头市, 内蒙古科技大学包头医学院研究生学院; ²(010017) 中国内蒙古自治区呼和浩特市, 内蒙古自治区人民医院眼科; ³(010017) 中国内蒙古自治区呼和浩特市, 内蒙古自治区中医医院眼科

作者简介: 邵义男, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 路强, 毕业于北京大学医学部, 博士, 主任医师, 研究方向: 眼底病. drluqiang@163.com

收稿日期: 2020-03-06 修回日期: 2020-11-09

摘要

目的: 观察体外高糖诱导环境, 对人视网膜色素上皮细胞中内脏脂肪素 (Visfatin) 的表达影响, 以及研究高糖环境下重楼皂苷 I (Polyphyllin I) 对 Visfatin 表达情况的影响。

方法: 人视网膜色素上皮细胞培养后分 3 组, 正常对照组、高糖组和高糖加 Polyphyllin I 药物干预组, 干预培养 12h 后进行检测。正常对照组: 5.5mmol/L 葡萄糖浓度常规培养; 高糖组: 将 25mmol/L 的高糖加入培养基建立模型; 高糖加 Polyphyllin I 药物干预组: 高糖 25mmol/L 和 3 μ g/L Polyphyllin I 药物加入培养基。免疫荧光染色法观察人视网膜色素上皮细胞中 Visfatin 和血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 表达; 实时荧光定量 PCR 检测上皮细胞中 Visfatin 和 VEGF mRNA 的表达; Western-blot 法检测上皮细胞中 Visfatin 和 VEGF 蛋白的表达。

结果: 免疫荧光检测发现 Visfatin 和 VEGF 在正常组视网膜色素上皮细胞中表达呈弱阳性。但在高糖组视网膜色素上皮中可见 Visfatin 和 VEGF 呈强阳性表达。药物干预组中 Visfatin 和 VEGF 荧光较高糖组明显减弱。RT-PCR 显示高糖组 Visfatin mRNA 表达水平较正常组和干预组明显增高 ($t=4.24, 3.89$, 均 $P<0.05$)。高糖组 VEGF mRNA 表达水平较正常组和干预组明显增高 ($t=3.53, 2.57$, 均 $P<0.05$)。Western-blot 结果示 Visfatin 蛋白水平, 高葡萄糖组表达量显著高于正常对照组 ($t=3.62, P=0.01$), 干预组表达低于高糖组 ($t=3.79, P<0.01$)。

结论: 高糖环境可刺激视网膜色素上皮细胞中 Visfatin 的表达增加, Polyphyllin I 可抑制高糖环境下视网膜色素上皮细胞中 Visfatin 的表达, 可能为治疗糖尿病视网膜病变提供新的思路。

关键词: 内脏脂肪素; 高糖; 视网膜色素上皮细胞; 血管内皮生长因子; 重楼皂苷 I

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.12.03

Study on the role of Visfatin in human retinal pigment epithelial cells

Yi-Nan Shao¹, Qiang Lu², Xiao-Jing Yang³

Foundation items: Inner Mongolia Autonomous Region Natural Science Foundation Project (No. 2014MS0865, 2017MS0804)

¹Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou 014040, Inner Mongolia Autonomous Region, China; ²Department of Ophthalmology, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017, Inner Mongolia Autonomous Region, China; ³Department of Ophthalmology, Inner Mongolia Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hohhot 010017, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Correspondence to: Qiang Lu. Department of Ophthalmology, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017, Inner Mongolia Autonomous Region, China. drluqiang@163.com

Received: 2020-03-06 Accepted: 2020-11-09

Abstract

• **AIM:** To observe the effects of high glucose-induced environment on Visfatin expression in human retinal pigment epithelial cells and to study the effects of Polyphyllin I on Visfatin expression in high glucose environment.

• **METHODS:** Human retinal pigment epithelial cells were cultured in three groups, normal control group, high glucose group and intervention group of high glucose aggravated Polyphyllin I, testing after 12h of intervention culture. Normal control group: 5.5mmol/L glucose concentration routine culture; high glucose group: 25mmol/L high glucose was added to the medium to establish the model; high glucose aggravated Polyphyllin I drug intervention group: high glucose 25mmol/L, 3 μ g/L Polyphyllin I drug was added to the medium. Immunofluorescence staining assays to observe expression of the Visfatin and VEGF in human retinal pigment epithelial cells; real-time PCR assays for relative expression of Visfatin and VEGF mRNA in epithelial cells; and western-blot assays for Visfatin and VEGF proteins in epithelial cells.

• **RESULTS:** Immunofluorescence detection revealed that Visfatin and VEGF were weakly positive in normal retinal pigment epithelial cells. Visfatin and VEGF were strongly positive in high glucose group. Visfatin and VEGF

fluorescence in the drug intervention group was significantly weakened in the higher sugar group. RT-PCR showed that the expression level visfatin mRNA high sugar group was significantly higher than that of normal group and intervention group ($t = 4.24, 3.89, P < 0.05$). VEGF mRNA expression was significantly higher in high glucose group than in normal group and intervention group ($t = 3.53, 2.57, P < 0.05$). Western-blot results showed that the protein expression of visfatin and VEGF in high sugar group was significantly higher than that in control group and intervention group ($t = 3.62, P = 0.01; t = 3.79, P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** The high glucose environment can stimulate the increased expression of Visfatin in retinal pigment epithelial cells, Polyphyllin I can inhibit the expression of Visfatin in retinal pigment epithelial cells in high glucose environment, which may provide a new idea for the treatment of diabetic retinopathy.

• **KEYWORDS:** Visfatin; high glucose; retinal pigment epithelial cells; VEGF; Polyphyllin I

Citation: Shao YN, Lu Q, Yang XJ. Study on the role of Visfatin in human retinal pigment epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2020;20(12):2028-2033

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)已成为当今世界范围内糖尿病患者常见的微血管并发症。该疾病由多重病因所致,但其具体发生机制仍未完全清楚^[1]。高糖环境会在体内引发炎症和刺激新生血管生成,继而导致DR。内脏脂肪素(Visfatin)是一种新型脂肪因子,具有类胰岛素、烟酰胺磷酸核糖转移酶活性及引起炎症反应等生物学效应^[2-4]。临床研究表明2型糖尿病视网膜病变患者中Visfatin的表达明显增加^[5-6]。而且研究显示早期糖尿病大鼠视网膜全层高表达Visfatin,认为部分原因可能由Müller细胞分泌产生该因子,进而促进血管内皮生长因子(VEGF)的表达上调^[7],从而促进DR发生。重楼皂苷I(Polyphyllin I)是重楼提取物的一种,百合科植物根茎,是常用的一种治疗玻璃体视网膜疾病的中药成分。国内外的药理学及医学研究表明,Polyphyllin I具有抗肿瘤的功效,且其对非肿瘤细胞无药物毒性作用。Polyphyllin I可以通过调节Bcl-2蛋白的途径诱导肿瘤细胞的凋亡且能显著抑制BGC823、SMMC-7721、SGC-7901等肿瘤细胞的增殖并诱导其凋亡^[8]。同时,视网膜色素上皮细胞作为增殖性糖尿病视网膜病变重要的参与细胞,可能与Visfatin有一定联系。因此,我们通过建立高糖环境的视网膜色素上皮细胞模型,观察Visfatin在视网膜色素上皮细胞中的表达情况,以及Polyphyllin I对Visfatin过表达的影响,了解Visfatin是否通过色素上皮细胞参与DR的发生,为疾病治疗提供有益靶点,并探索治疗新方向。

1 材料和方法

1.1 材料 人视网膜色素上皮细胞ARPE-19(上海中乔新舟生物公司);一抗:兔抗Visfatin多克隆一抗抗体

(Abcam, USA),兔抗VEGF多克隆一抗抗体及GAPDH(武汉博士德生物公司);二抗:羊抗兔二抗IgG(H+L),荧光标记羊抗兔荧光二抗CY3及FITC;DMEM/F12培养基(美国Gibco公司);特级南美ABW胎牛血清(武汉博士德生物公司);Western blot裂解液试剂盒(深圳碧云天生物技术有限公司);逆转录试剂盒、PCR试剂盒(Fermentas, USA);重楼皂苷I(上海麦克林生化科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 人视网膜色素上皮细胞的培养 传代培养人视网膜色素上皮细胞系,培养液配制:1%双抗、10%胎牛血清、DMEM/F12培养基。依照培养情况分组:正常对照组、高糖组、高糖加Polyphyllin I药物干预组。具体方案参照文献[4,7],正常对照组:在含5.5mmol/L葡萄糖的DMEM/F12培养基中培养;高糖组:细胞培养溶液中添加25mmol/L高浓度葡萄糖;药物干预组:将25mmol/L高浓度葡萄糖和3 μ g/L的Polyphyllin I药物加入到细胞培养基中。置入温度为37 $^{\circ}$ C的湿热细胞培养箱中,将条件设置为5%CO₂,95%空气各组细胞均同条件下处理12h。

1.2.2 免疫荧光染色法 正常对照组、高糖组和药物干预组均用96孔板接种4 \times 10⁴cell/L,每孔100 μ L,2个复孔/组,培养箱环境为湿度100%,温度37 $^{\circ}$ C,5%CO₂,待细胞生长至70%时,用PBS洗涤3min/次,共3次;室温下4%多聚甲醛固定15min,每次用PBS洗3min;每孔中加入0.5%Triton X-100通透20min,PBS清洗3次,每次3min;在37 $^{\circ}$ C下15%胎牛血清液50 μ L封闭1h;弃去封闭血清,按照分组每孔分别滴加对应一抗(1:100),避光孵育4 $^{\circ}$ C过夜,PBS液3min/次清洗(3次),等体积PBS液做阴性对照;各组每孔滴加荧光标记二抗CY3或FITC(1:100),避光置于37 $^{\circ}$ C恒温箱反应1h;再次使用PBS清洗3次,每次3min;荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜暗室观察Visfatin和VEGF在细胞中的表达和分布。

1.2.3 实时荧光定量PCR法 检测各组细胞中Visfatin和VEGF mRNA的表达:提取各组色素上皮细胞总RNA(Trizol法);冰浴解冻模板RNA及配置溶液,将5 \times gDNA Buffer(2 μ L)、总RNA、RNase-Free ddH₂O(补足至10 μ L)配制混合液,离心后置于42 $^{\circ}$ C孵育,用10 \times King RT Buffer(2 μ L)、FastKing RT Enzyme Mix(1 μ L)、FQ-RT Primer Mix(2 μ L)及RNase-Free ddH₂O(补足至10 μ L)配制反转录混合液,gDNA反应液中加入反转录反应中的Mix,混匀后42 $^{\circ}$ C孵育15min;92 $^{\circ}$ C孵育3min后得到cDNA后进行PCR反应,使用Primer Express5.0软件编辑引物序列如下,产品为PAGE纯化。Visfatin引物(109bp):上游5'-CCAGCGGCAGAGCACAC-TACC-3',下游5'-CGCTGACCACAGACACAG-GCA-3',VEGF引物(195bp):上游5'-TCCCAGCCTGGCCAAC-CCTT-3',下游5'-ATGGGTCACCCCAGGGCTCC-3',反应参数为Visfatin:94 $^{\circ}$ C 5min 预变性,93 $^{\circ}$ C 30s 扩增,55 $^{\circ}$ C 45s,72 $^{\circ}$ C 45s,30个循环,最终延伸72 $^{\circ}$ C 7min;VEGF:94 $^{\circ}$ C 5min 预变性,94 $^{\circ}$ C 30s 扩增,55 $^{\circ}$ C 45s,72 $^{\circ}$ C 60s,30个循环,最终延伸72 $^{\circ}$ C 7min。每组15个复孔并以GAPDH引物为内参。扩增完成后,用PCR自动分析软件和比较RT法检测各组mRNA的表达情况。

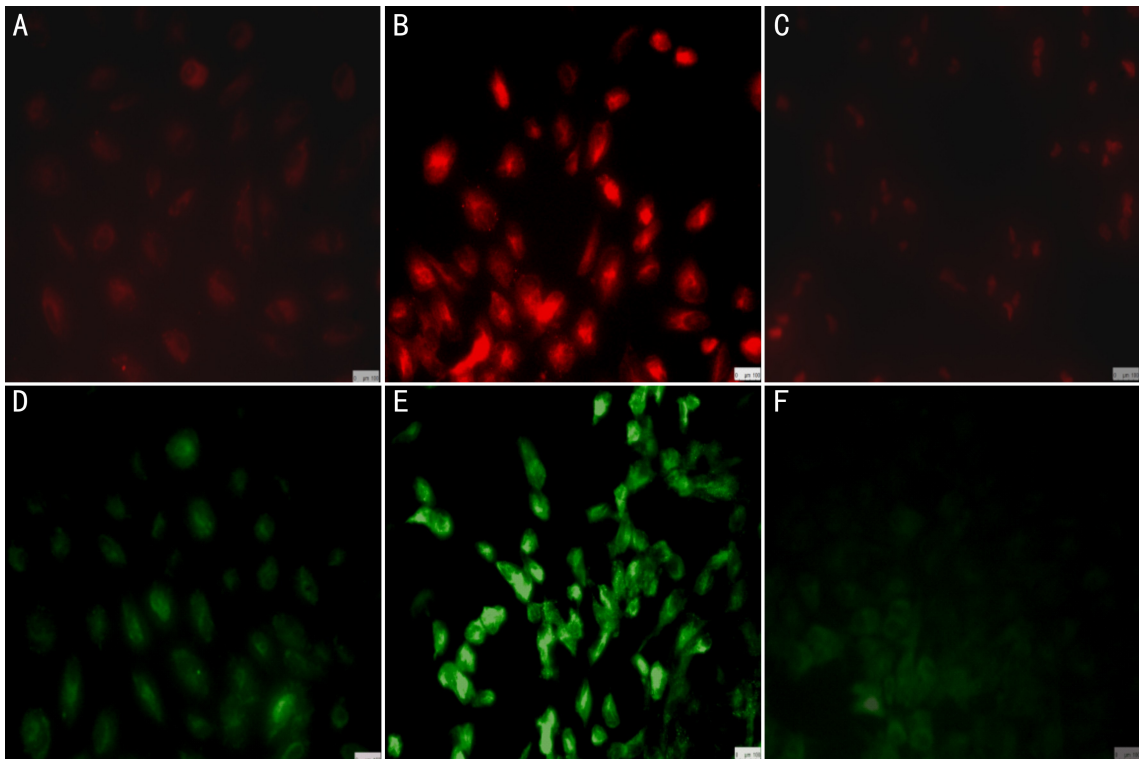


图1 人视网膜色素上皮细胞中 Visfatin 和 VEGF 的荧光表达($\times 400$) A:正常对照组细胞中 Visfatin 蛋白表达呈弱阳性(Cy3);B:高糖组细胞中 Visfatin 蛋白表达呈强阳性(Cy3);C:高糖加 Polyphyllin I 组细胞中 Visfatin 蛋白表达较高糖组减弱(Cy3);D:正常对照组中可见 VEGF 的弱表达(FITC);E:高糖组细胞中 VEGF 表达呈强绿色荧光(FITC);F:高糖加 Polyphyllin I 组细胞中 VEGF 表达较高糖组减弱(FITC)。标尺:100 μm 。

1.2.4 Western-blot 法 5×10^4 /L 于 6 孔板培养正常对照组、高糖组和药物干预组,贴壁生长至 70%时,在冰上进行操作,用预冷的 PBS 液漂洗 2~3 次后,增强型细胞裂解液 200 μL /孔(1mL 裂解液与 10 μL 蛋白酶抑制剂混合),在冰浴中裂解 30min 使细胞完全裂解,离心 10min (10 000r/min,4 $^{\circ}\text{C}$),收集上清加入 5 \times SDS-PAGE 上样液,将混合液 EP 管置于 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,蛋白变性 10min;取 20 μL 混合液上样于聚丙烯酰胺凝胶孔中,70V 电压电泳至溴酚蓝染料达浓缩胶处,调节电压至 110V,溴酚蓝到凝胶底端时停止电泳;恒流 150mA 电转转膜 50min 至 0.2 μm PVDF 膜上。用 TBST 制备 5% 脱脂奶粉室温封闭孵育 2h,根据目的蛋白分子量切膜,切好的条带放置于对应一抗内,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST 洗膜 5min (3 次);二抗中 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇动孵育 2h;ECL 发光显色试剂显影,将 GAPDH 用作内部对照,以比较各组中蛋白的相对表达。

统计学分析:采用 SPSS23.0 软件进行分析,计量资料用均数 \pm 标准差表示,多组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组免疫荧光检测结果 实验结果显示:Visfatin 蛋白在正常人视网膜色素上皮细胞的胞质中弱阳性表达,呈弱红色荧光(图 1A)。VEGF 蛋白在正常人视网膜色素上皮细胞中呈弱绿色荧光(图 1D)。高糖组模型中,Visfatin 和 VEGF 在视网膜色素上皮细胞中均可见到强阳性表达,Visfatin 呈红色强荧光,VEGF 呈绿色强荧光,二者在胞质与细胞核中均呈强荧光染色(图 1B、E)。给予

Polyphyllin I 干预高糖状态后,Visfatin 和 VEGF 均表达较高糖组减弱,且细胞形态不规则或发生皱缩(图 1C、F)。

2.2 各组细胞中 Visfatin 和 VEGF mRNA 的相对表达量

RT-PCR 检测,3 组视网膜色素上皮细胞中 Visfatin mRNA 和 VEGF mRNA 相对表达量比较,差异具有统计学意义($F = 7.78, 8.44$, 均 $P < 0.01$)。高糖组 Visfatin mRNA 水平较正常对照组明显增高($t = 4.24, P < 0.01$);高糖加 Polyphyllin I 药物干预组 Visfatin mRNA 水平较高糖组表达降低($t = 3.89, P = 0.02$);而药物干预组与正常对照组间无显著差异($t = 0.37, P = 0.23$)。高糖组中 VEGF mRNA 表达水平较正常对照组明显升高($t = 3.53, P < 0.01$),且其 mRNA 水平高于干预组($t = 2.57, P = 0.01$),而干预组与正常对照组比较,差异无统计学意义($t = 0.58, P = 0.12$),见表 1,图 2。

2.3 各组细胞中 Visfatin 和 VEGF 蛋白表达量

Western-blot 结果显示,各组人视网膜色素上皮细胞中 Visfatin 蛋白和 VEGF 蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义($F = 13.14, 8.59$, 均 $P < 0.01$)。Visfatin 蛋白水平,高葡萄糖组表达量显著高于正常对照组($t = 3.62, P = 0.01$),干预组表达低于高糖组($t = 3.79, P < 0.01$),差异有统计学意义,VEGF 蛋白水平,高葡萄糖组表达量显著高于正常对照组($t = 3.09, P < 0.01$),干预组表达低于高糖组($t = 2.87, P < 0.01$),差异有统计学意义,见图 3,表 2。

3 讨论

近年来,Visfatin 与糖尿病相关的研究引起了广泛关注。研究发现 2 型糖尿病及其血管病变的机体中,Visfatin 表达量显著升高,可引发一系列病理生理改变^[9-10]。DR

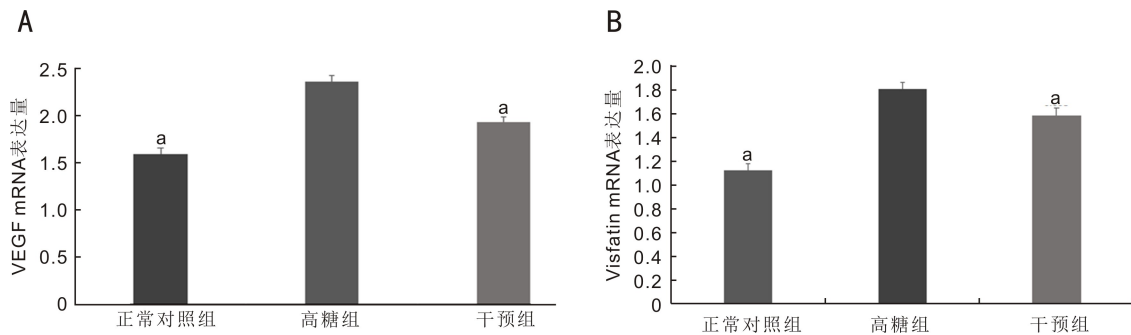


图2 三组视网膜色素上皮细胞中 VEGF mRNA 和 Visfatin mRNA 相对表达量比较 A: VEGF mRNA; B: Visfatin mRNA。^a*P*<0.05 vs 高糖组。



图3 Western-blot 法检测各组细胞中 Visfatin 与 VEGF 蛋白表达情况 1:正常对照组 2:高糖组 3:干预组。正常对照组中 Visfatin 和 VEGF 蛋白表达量较低,高糖组 Visfatin 和 VEGF 蛋白表达量明显增强,高糖加重楼皂苷 I 组 Visfatin 和 VEGF 蛋白表达量高于正常对照组,但较高糖组减弱。

表1 各组细胞中 Visfatin mRNA 和 VEGF mRNA 相对表达量的比较

组别	Visfatin mRNA	VEGF mRNA
正常对照组	1.128±0.043 ^a	1.601±0.058 ^a
高糖组	1.812±0.024	2.372±0.032
干预组	1.593±0.008 ^a	1.932±0.007 ^a
<i>P</i>	<0.01	<0.01

注:^a*P*<0.05 vs 高糖组。

表2 各组细胞中 Visfatin 和 VEGF 蛋白相对表达量的比较

组别	Visfatin 蛋白	VEGF 蛋白
正常对照组	132.81±3.43 ^a	229.37±5.07 ^a
高糖组	601.59±2.69	502.71±2.94
干预组	523.92±1.11 ^a	334.61±9.13 ^a
<i>P</i>	<0.01	<0.01

注:^a*P*<0.05 vs 高糖组。

作为糖尿病微血管并发症的一种,Visfatin 可能同样参与其中^[11]。研究表明 DR 中纤维血管增殖膜形成与 Visfatin 的表达增多有一定关系^[12]。另有报道指出:DR 中视网膜新生血管,可能通过 Visfatin 的促炎症反应特性诱导氧化应激,或类胰岛素效应增强蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 活性形成^[13]。然而 DR 的发生发展还由其他多种因素共同参与,本研究观察了 Visfatin 在模拟高糖环境下,人视网膜色素上皮细胞中的表达情况及其与 VEGF 的关系,并应用 Polyphyllin I 作为干预抑制剂进行 DR 治疗的初步探讨,以期发现与病因相关的关键作用靶点,为 DR 防治提供新策略。在 DR 的视网膜细胞研究中,视网膜血管内皮细胞的相关研究较多,色素上皮细胞的研究甚少。视网膜色素上皮细胞有调节眼内电解质平衡、构成血-视网膜屏障及分泌多种生长因子等保护及再生作用^[14]。本研究中发现,在人视网膜色素上皮细胞中的 Visfatin 表达升高,推测高糖环境下色素上皮细胞可以分泌 Visfatin,并可能

与 DR 的发生机制相关。研究表明,高糖、低氧、机械损伤、糖基化等影响下,Visfatin 可激活胶质细胞,诱导 Müller 细胞分泌 VEGF 使得表达上调^[7],推测色素上皮细胞中可能存在相似的作用方式。而 Visfatin 和 VEGF 的表达升高可能促进色素上皮层新生血管形成^[15]。色素上皮细胞的细胞骨架中相关的转化生长因子-β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1) 可直接调控 VEGF 的表达^[16]。且细胞中不仅可以分泌促进新生血管形成的 VEGF,还可以分泌出抑制血管生成的因子[如重组人色素上皮衍生因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) 等],二者间的动态平衡及其形成的物理屏障,可以有效地抑制脉络膜新生血管的形成^[17]。我们认为糖尿病患者眼底视网膜细胞长期处于缺氧状态,致色素上皮层基部 VEGF 异常分泌,一系列靶基因表达上调,Bruch 膜受损使视网膜对疾病的抵御能力下降,影响各分子通路的激活,如 PI3K/Akt 和 ERK(1/2) 通路作用,使得细胞增殖新生血管形成,影响脉络膜的供养能力,造成眼底光感受器细胞因缺营养而死亡^[18-19],破坏了色素上皮层的屏障功能。因此,Visfatin 在色素上皮细胞中的表达升高提示其可能主要作用于 DR 视网膜的缺血阶段,可能是局部缺血引起色素上皮细胞中 Visfatin 的表达增加,进而激活 VEGF 的表达,最终引起视网膜新生血管形成。我们将视网膜色素上皮细胞视为重点研究对象,希望能够以此为突破口,进一步研究 DR 的发生机制、早期诊断与治疗。

Visfatin 可能通过多种途径作用于 DR 的发生发展中,使内皮细胞增殖和迁移、色素上皮细胞活化等反应,促进血管平滑肌成熟和参与新生血管形成^[20]。Adya 等、Kim 等、Bea 等提出 Visfatin 通过 PI3K 及 NF-κB 信号通路、介导 mTOR 通路或激活 ERK(1/2) 通路形成新生血管^[21-22]。因此我们认为,Visfatin 可能通过上述某些通路诱导形成病理性新生血管^[23]。本研究中高糖缺氧的状态下视网膜色素上皮细胞中的 Visfatin 过表达,说明 Visfatin 对于 DR

的发生发展起着不可忽略的作用。此外,本次实验还观察到高糖环境中 Visfatin 与 VEGF 同时呈现高表达状态,药物干预后二者表达均有所减弱,推测视网膜新生血管的生成方面,Visfatin 和 VEGF 存在类似作用效果,或 Visfatin 可以调控 VEGF 的表达。研究发现 Visfatin 能够发挥抗凋亡效果,抑制血管内皮细胞增殖,经 PI3K/Akt 和 ERK (1/2)通路促 VEGF 表达及新生血管形成^[24-25]。Visfatin 可以诱导 Akt 磷酸化,或激活某些炎性因子,使 VEGF 表达增多^[26-27]。我们由此推测 Visfatin 可能对 VEGF 起正性调控作用。因此视网膜色素上皮细胞中 Visfatin,在 DR 的视网膜增殖阶段发挥重要效果,促使血管生成因子活跃,新生血管形成。

Polyphyllin I 是重楼提取物中的一种,是治疗玻璃体视网膜病变的一种药物^[8]。我们在实验中发现视网膜色素上皮细胞在高糖环境中增殖,且 Visfatin 及 VEGF 表达量增加,在给予 Polyphyllin I 药物干预后,色素上皮细胞的增生受到了一定程度的抑制,Visfatin 和 VEGF mRNA 和蛋白水平明显下降,证明 Polyphyllin I 可能作为视网膜新生血管生成的抑制剂存在,对相关眼病起治疗作用。这与苏菲菲等研究有相似之处,即 Polyphyllin I 抑制色素上皮细胞增殖、快速诱导细胞凋亡,也可下调 VEGF 的表达,抑制新生血管形成,与 Bcl-2、Cyclin D1、Bax、ERK(1/2)、p-ERK(1/2)和 cleaved caspase-3 等因子相关^[4,28-29]。也有研究报道,重楼可抑制肿瘤细胞增殖、促进其凋亡的作用,作用机制可能与 Bcl-2 表达下调相关^[30]。Polyphyllin I 同样具有抗肿瘤作用,是广泛应用于各类肿瘤疾病的中药,其肿瘤抑制作用可能多数通过 PI3K/Akt/mTOR 介导^[29-31],与介导 DR 的通路相同。我们认为该药物可能对 DR 起到治疗的效果,同时 Polyphyllin I 兼具对非肿瘤细胞无细胞毒性的特性,较同类临床药物风险更低,治疗收益更高。由此推测, Polyphyllin I 有望成为治疗 DR 乃至 DM 的潜力药物。

采用体外细胞高糖模型模拟 DR 环境,可能与人类 DR 的生理环境不完全相同。但在本研究中,高糖刺激后机体视网膜色素上皮细胞内出现 Visfatin 和 VEGF 表达增加,而 Polyphyllin I 的干预可抑制因子表达。因此,Visfatin 做为新靶点可为 DR 的防治提供新的方向,但相关通路信息还有待更加深入的探索。Polyphyllin I 可能成为治疗 DR 的潜力药物,但仍需进一步研究拓展。

参考文献

- 1 Yaribeygi H, Butler AE, Sahebkar A. Aerobic exercise can modulate the underlying mechanisms involved in the development of diabetic complications. *J Cell Physiol* 2019;234(8):12508-12515
- 2 Erfani S, Khaksari M, Oryan S, et al. Namp1/PBEF/visfatin exerts neuroprotective effects against ischemia/reperfusion injury via modulation of Bax/Bcl-2 ratio and prevention of caspase-3 activation. *J Mol Neurosci* 2015;56(1):237-243
- 3 杨媚, 杨刚毅, 李伶, 等. 不同糖耐量个体血浆内脂素水平的变化. *中华内分泌代谢杂志* 2006;22(3):245-247
- 4 苏菲菲, 卢木娣, 曾惠红, 等. 重楼皂苷 I 对人视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19 增殖的影响. *眼科新进展* 2016;36(6):528-531
- 5 刘真真, 刘金波, 刘传谦, 等. 2 型糖尿病微血管病变患者血浆内脂素水平变化及意义. *山东医药* 2018;58(14):47-49

- 6 赵高宇, 马金兰, 张瑞霞. VEGF-B 与低氧诱导大鼠视网膜新生血管的相关性. *中国高原医学与生物学杂志* 2018;39(1):34-38
- 7 路强, 杨晓静, 崔巍, 等. 实验性糖尿病大鼠视网膜中 Visfatin mRNA 及蛋白表达研究. *内蒙古医学院学报* 2012;34(1):11-15
- 8 宣群, 潘红梅. 滇重楼内生真菌转化万古霉素的研究. *昆明医科大学学报* 2014;35(11):10-12
- 9 Jun JY, Lee HO, Jang I, et al. Visfatin promotes angiogenesis by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357(1):150-156
- 10 Lovren F, Pan Y, Praphulla C, et al. Visfatin activates eNOS via Akt and MAP kinases and improves endothelial cell function and angiogenesis in vitro and in vivo; translational implications for atherosclerosis. *Am J Physiol* 2009;296(6):E1440-1449
- 11 路强, 杨晓静, 崔巍, 等. 内脏脂肪素和血管内皮生长因子在早期糖尿病大鼠视网膜中的表达及意义. *中华实验眼科杂志* 2013;31(1):45-48
- 12 杨晓静, 崔巍, 高伟, 等. 人增殖性糖尿病视网膜病变纤维血管膜中 Visfatin 的表达研究. *内蒙古医学院学报* 2012;34(4):285-288
- 13 Hameed W, Yousaf I, Latif R, et al. Effect of visfatin on testicular steroidogenesis in purified Leydig cells. *J Ayub Medical Coll Abbottabad* 2012;24(3-4):62-64
- 14 Wittehen ES, Nishimura E, Mccloskey M, et al. Rap1 GTPase activation and barrier enhancement in rpe inhibits choroidal neovascularization in vivo. *PLoS One* 2013;8(9):73070
- 15 徐建锋, 杨丽君, 莫荔, 等. 真实世界下玻璃体腔内注射抗 VEGF 药物治疗眼底疾病的实效性研究. *国际眼科杂志* 2017;17(9):1734-1737
- 16 Farnoodian M, Kinter JB, Yadranji AS, et al. Expression of pigment epithelium-derived factor and thrombospondin-1 regulate proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells. *Physiol Rep* 2015;3(1):e12266
- 17 Zhu D, Deng X, Spee C, et al. Polarized secretion of PEDF from human embryonic stem cell-derived RPE promotes retinal progenitor cell survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(3):1573-1585
- 18 Annie L, Gurusubramanian G, Roy VK. Estrogen and progesterone dependent expression of visfatin/NAMPT regulates proliferation and apoptosis in mice uterus during estrous cycle. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019;185:225-236
- 19 Xiao J, Xiao ZJ, Liu ZG, et al. Involvement of dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 in visfatin-enhanced angiogenic function of endothelial cells. *Diabetes Metab Res Rev* 2009;25(3):242-249
- 20 Park JW, Kim WH, Shin SH, et al. Visfatin exerts angiogenic effects on human umbilical vein endothelial cells through the mTOR signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813(5):763-771
- 21 Adya R, Tan BK, Chen J, et al. Pre-B cell colony enhancing factor (PBEF)/visfatin induces secretion of MCP-1 in human endothelial cells; Role in visfatin-induced angiogenesis. *Atherosclerosis* 2009;205(1):113-119
- 22 Bae YH, Bae MK, Kim SR, et al. Upregulation of fibroblast growth factor-2 by visfatin that promotes endothelial angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;379(2):206-211
- 23 Bae SK, Kim SR, Kim JG, et al. Hypoxic induction of human visfatin gene is directly mediated by hypoxia-inducible factor-1. *FEBS Lett* 2006;580(17):4105-4113
- 24 Wang BW, Lin CM, Wu GJ, et al. Tumor necrosis factor- α enhances hyperbaric oxygen-induced visfatin expression via JNK pathway in human

coronary arterial endothelial cells. *J Biom Sci* 2011;18:27

25 Wickremasinghe SS, Xie J, Guymer RH, et al. Retinal vascular changes following intravitreal ranibizumab injections for neovascular AMD over a 1-year period. *Eye* 2012;26(7):958

26 Hui ZQ, Liu Z, He A, et al. Visfatin promotes the malignancy of human acute myeloid leukemia cells via regulation of IL-17. *Europ J Pharmacol* 2019;853:103-110

27 梁宁林. 原发性肝癌患者血清内脂素、血管内皮生长因子表达及意义. *临床消化病杂志* 2017;29(1):33-36

28 龙剑文, 皮先明, 涂亚庭. 重楼皂苷 I 对 IL-17 刺激 HaCaT 细胞

分泌 VEGF 和 IL-23 的影响. *中国皮肤性病学杂志* 2016;30(5):453-455,498

29 Ma DD, Lu HX, Xu LS. Polyphyllin D exerts potent anti-tumour effects on Lewis cancer cells under hypoxic conditions. *J Int Med Res* 2009;37(3):631-640

30 Tian Y, Jia SX, Shi J, et al. Polyphyllin I induces apoptosis and autophagy via modulating JNK and mTOR pathways in human acute myeloid leukemia cells. *Chem Biol Interact* 2019;311:108793

31 王妮妮, 吴雪松, 张红苗, 等. 重楼皂苷 I 对体外抑制冠状动脉内皮细胞增殖的影响. *昆明医科大学学报* 2016;37(11):37-40

中国科技核心期刊眼科学类期刊主要指标及排名

刊名	核心总被引频次		核心影响因子		综合评价总分	
	数值	排名	数值	排名	数值	排名
中华眼科杂志	1891(3036)	2(2)	0.954(1.191)	1(4)	71.5	1
眼科新进展	1428(2775)	3(3)	0.902(1.656)	2(1)	65.3	2
中华实验眼科杂志	1021(1721)	4(4)	0.775(1.292)	3(3)	49.9	3
国际眼科杂志	2257(5484)	1(1)	0.628(1.628)	5(2)	49.3	4
中华眼科医学杂志电子版	108	10	0.340	10	48.0	5
中华眼底病杂志	843	5	0.668	4	45.4	6
临床眼科杂志	467	7	0.470	6	33.9	7
中华眼视光学与视觉科学杂志	579	6	0.448	7	24.8	8
眼科	404	8	0.412	9	23.5	9
中国斜视与小儿眼科杂志	253	9	0.448	7	18.0	10

摘编自 2019 版《中国科技期刊引证报告》核心版和扩展版(括号里面为扩展版的统计指标)