

黄芪含药血清对氯化钴诱导 ARPE-19 细胞缺氧损伤的保护作用

胡 晗^{1,2}, 王晓琴¹, 聂 浩²

引用: 胡晗, 王晓琴, 聂浩. 黄芪含药血清对氯化钴诱导 ARPE-19 细胞缺氧损伤的保护作用. 国际眼科杂志 2022; 22(6): 899-903

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.31502059); 湖北省教育厅科学研究计划指导性项目 (No.B2015447)

作者单位: ¹(434020) 中国湖北省荆州市, 长江大学附属荆州医院眼科; ²(434023) 中国湖北省荆州市, 长江大学医学部

作者简介: 胡晗, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 青光眼、白内障。

通讯作者: 王晓琴, 毕业于武汉大学, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 青光眼、白内障. jzdodo123@sina.com

收稿日期: 2021-08-17 修回日期: 2022-05-12

摘要

目的: 研究黄芪含药血清对氯化钴 (CoCl₂) 诱导人视网膜色素上皮 (ARPE-19) 细胞缺氧损伤的保护作用, 从而探讨黄芪是否通过抗氧化应激来改善糖尿病视网膜病变 (DR)。

方法: 建立 CoCl₂ 诱导 ARPE-19 细胞缺氧模型, 并分为以下 5 组: 正常组 (细胞正常培养, 不加任何处理)、缺氧模型组 (200 μmol/L CoCl₂)、空白血清组 (200 μmol/L CoCl₂ + 空白血清)、低剂量含药血清组 (200 μmol/L CoCl₂ + 10% 含药血清)、高剂量含药血清组 (200 μmol/L CoCl₂ + 20% 含药血清)。CCK-8 检测细胞活性; 试剂盒检测细胞上清液中还原型谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 水平; ELISA 检测细胞培养基中缺氧诱导因子-1α (HIF-1α)、血管内皮生长因子 (VEGF) 的含量; 实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测 VEGF、HIF-1α 和脯氨酰羟化酶-2 (PHD-2) 的 mRNA 水平; Western Blot 法检测 VEGF、HIF-1α 和 PHD-2 的表达情况。

结果: 采用 200 μmol/L 的 CoCl₂ 浓度可成功建立 ARPE-19 细胞缺氧模型。低剂量和高剂量黄芪含药血清可抑制缺氧诱导的 ARPE-19 细胞增殖 ($P < 0.05$), 升高 ARPE-19 细胞缺氧损伤中 GSH 水平, 降低 MDA 含量 ($P < 0.05$)。低剂量和高剂量黄芪含药血清可抑制 ARPE-19 细胞缺氧损伤上清液中 HIF-1α 和 VEGF 的表达 ($P < 0.05$), 以及 ARPE-19 细胞中 VEGF、HIF-1α、PHD-2 的 mRNA 表达和蛋白表达 ($P < 0.05$)。

结论: 低剂量和高剂量黄芪含药血清通过抗氧化作用减轻 CoCl₂ 诱导 ARPE-19 细胞缺氧损伤。

关键词: 黄芪; 糖尿病视网膜病变; 氧化应激; 血管内皮生长因子; 缺氧诱导因子-1α; 人视网膜色素上皮 (ARPE-19) 细胞
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.6.03

Protective effect of astragalus-containing serum on cobalt chloride-induced hypoxia injury in ARPE-19 cells

Han Hu^{1,2}, Xiao-Qin Wang¹, Hao Nie²

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.31502059); Guidance Project of Scientific Research Program of Hubei Provincial Department of Education (No.B2015447)

¹Department of Ophthalmology, Jingzhou Hospital Affiliated to Yangtze University, Jingzhou 434020, Hubei Province, China;

²Medical School, Yangtze University, Jingzhou 434023, Hubei Province, China

Correspondence to: Xiao - Qin Wang. Department of Ophthalmology, Jingzhou Hospital Affiliated to Yangtze University, Jingzhou 434020, Hubei Province, China. jzdodo123@sina.com

Received: 2021-08-17 Accepted: 2022-05-12

Abstract

• **AIM:** To study the protective effect of astragalus-containing serum on cobalt chloride (CoCl₂) - induced hypoxia injury of human retinal pigment epithelial cells (ARPE - 19), so as to explore whether astragalus can improve diabetic retinopathy (DR) by anti - oxidative stress.

• **METHODS:** The ARPE - 19 hypoxia model induced by CoCl₂ was established and divided into the following 5 groups: normal group (cells were cultured normally without any treatment), hypoxia model group (200 μmol/L CoCl₂), blank serum group (200 μmol/L CoCl₂ + blank serum), low - dose drug - containing serum group (200 μmol/L CoCl₂ + 10% medicated serum) and high-dose drug - containing serum group (200 μmol/L CoCl₂ + 20% medicated serum); CCK - 8 detects cell viability; Detect the levels of reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in the cell supernatant with a kit; ELISA was used to detect the content of hypoxia-inducible factor - 1α (HIF - 1α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in cell culture medium; Real-time quantitative PCR (qPCR) to detect the mRNA levels of VEGF, HIF - 1α and Prolyl hydroxylase - 2 (PHD - 2); The expressions of VEGF, HIF - 1α and PHD - 2 were detected by Western Blot.

• **RESULTS:** Hypoxia model of ARPE - 19 can successfully establish by CoCl₂ at 200 μmol/L. Low - dose and high - dose astragalus-containing serum could inhibit hypoxia-induced ARPE - 19 proliferation ($P < 0.05$), increase the GSH level and reduce the MDA content in ARPE - 19 with

hypoxic injury ($P < 0.05$). Low-dose and high-dose astragalus-containing serum could inhibit the expression of HIF-1 α and VEGF in ARPE-19 hypoxic injury supernatant ($P < 0.05$), as well as the mRNA and protein expressions of VEGF, HIF-1 α and PHD-2 in ARPE-19 ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Low-dose and high-dose astragalus-containing serum alleviates the hypoxia injury of ARPE-19 induced by CoCl₂ through anti-oxidant effect.

• **KEYWORDS:** astragalus; diabetic retinopathy; oxidative stress; vascular endothelial growth factor; hypoxia-inducible factor-1 α ; human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19)

Citation: Hu H, Wang XQ, Nie H. Protective effect of astragalus-containing serum on cobalt chloride-induced hypoxia injury in ARPE-19 cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022; 22(6): 899-903

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是一种进行性无症状的糖尿病微血管并发症,可引发不可逆的视网膜损伤^[1]。DR发生的基础是长期高糖环境、持续的氧化应激或炎症刺激,进而引起内皮细胞损伤,导致局部缺氧,继而诱发新生血管生成^[2]。视网膜新生血管可引起玻璃体出血和牵拉性视网膜脱离,导致视力下降,故DR是导致成年人失明的主要原因^[3]。尽管严格控制血糖、高血压和高脂血症仍是DR初始治疗的主要策略,但与DR相关的症状仅在病变处于晚期状态时才会出现,因此限制了许多患者治疗的有效性^[4]。氧化应激是DR病变的一个关键因素,既可导致高血糖引起的代谢异常,也可由高血糖引起的代谢异常引起^[5]。因此,通过抑制氧化应激和保护内皮细胞对于防治DR具有重要意义。

黄芪性味甘温,主归脾肺二经,具有补中益气、健脾益肺、托毒生肌之功效。现代药理研究表明,黄芪具有多种功效,包括免疫调节^[6]、降血糖和改善胰岛素敏感性^[7]、抗炎作用^[8]、抗氧化作用^[9]、抗病毒作用^[10]、抗肿瘤作用^[11]、保护心血管功能^[12]等。先前已有研究表明黄芪及其活性成分可通过抗氧化应激对糖尿病肾病等疾病有明显改善作用^[13],而氧化应激在DR的发病机制中起着重要作用。它通过调控细胞凋亡和神经变性导致线粒体功能障碍、炎症和细胞死亡,从而导致血管、神经和视网膜组织损伤^[14]。因此,抑制氧化应激和新生血管形成对于防治DR具有重要意义。但黄芪是否能在DR的病理生理过程中抑制缺氧诱导的氧化应激尚不清楚。故本实验采用CoCl₂诱导的ARPE-19细胞缺氧损伤模型,从抗氧化角度研究黄芪含药血清对视网膜色素上皮细胞的保护作用,进一步探讨其防治DR的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性SD大鼠(SPF级)20只,体质量250±20g,购于三峡大学实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(鄂)2017-0012,该动物实验经过长江大学动物伦理委员会(中国荆州)批准。人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19)购于中国典型培养物保藏中心。黄芪(货号200601)购于湖北省荆州市中医院;CoCl₂·6H₂O(货号20200407)购于上海沃凯生物公司;CCK-8检测试剂盒(货号BS350B)购于兰杰柯科技有限公司;还原型谷胱甘肽(GSH)含量检测试剂盒(货号:BC1175)、丙二醛

(MDA)含量检测试剂盒(货号BC0025)购于北京索莱宝公司;Human HIF-1 α ELISA Kit(货号PH368)、Human VEGF ELISA Kit(货号PV963)、VEGF anti-body(货号AF0312)购于北京碧云天生物公司;PrimeScript™ RT reagent Kit(货号3733)、TB Green® Premix Ex Taq™ I Kit(货号RR820A)购于日本TaKaRa公司;HIF-1 α Rabbit mAb(货号36169S)、脯氨酸羟化酶-2(PHD-2) Rabbit mAb(货号4835S)购买于Cell Signaling Technology生物公司。

1.2 方法

1.2.1 含药血清获取及CoCl₂溶液制备 大鼠黄芪的给药剂量为10mL/kg连续灌胃7d,于末次给药1h后,用戊巴比妥腹腔注射麻醉后采用腹主动脉收集血液,待血液凝固后,4℃、3600r/min离心15min,分离血清。然后经56℃水浴30min灭活,再通过0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌,存放在-20℃冰箱中备用。称取0.2379g CoCl₂·6H₂O溶于1L的DMEM培养基中,充分混匀,再通过0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌,即为200 μ mol/L的CoCl₂溶液,4℃避光保存。

1.2.2 缺氧模型的建立 ARPE-19细胞用含10%胎牛血清的DMEM/F12(含双抗)培养基在37℃、5%CO₂培养箱中培养。取对数生长期细胞制备细胞悬液,以5×10³/孔接种于96孔板,待细胞贴壁后,每孔分别加入终浓度为含0、100、200、400、800、1600 μ mol/L CoCl₂的DMEM/F12培养液培养24h。CCK-8法检测细胞增殖活性,筛选最佳造模浓度(200 μ mol/L)。

1.2.3 实验分组 细胞以5×10³/孔接种于96孔板,待细胞贴壁后,实验分为正常组(细胞正常培养,不加任何处理)、缺氧模型组(200 μ mol/L CoCl₂)、空白血清组(200 μ mol/L CoCl₂+空白血清)、低剂量含药血清组(200 μ mol/L CoCl₂+10%含药血清)、高剂量含药血清组(200 μ mol/L CoCl₂+20%含药血清)。细胞培养24h后,一部分细胞用于CCK-8法检测细胞活力;其余细胞收集上清培养液检测GSH活性、MDA含量、血管内皮生长因子(VEGF)及缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的水平,收集底部细胞用于Western blot、实时荧光定量PCR(qPCR)检测。

1.2.4 CCK-8检测细胞活性 取对数生长期状态良好的ARPE-19细胞制备成5×10³/mL细胞悬液,接种于96孔板中(每孔100 μ L),待细胞贴壁后按照实验需要给予不同浓度药物的DMEM/F12培养基继续培养24h,再每孔加入10 μ L CCK-8溶液,细胞培养箱中继续孵育4h后,用酶标仪测定450nm处的OD值。

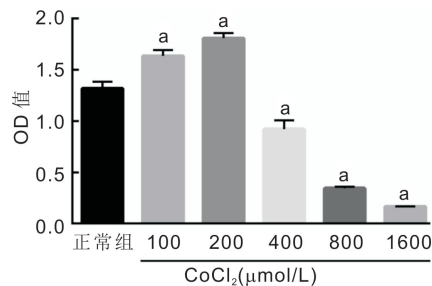
1.2.5 氧化应激指标的检测 GSH和MDA的含量使用商业检测试剂盒测量,所有步骤均按照说明书操作,通过酶标仪设定特定波长(GSH检测波长:412nm;MDA检测波长:532nm),检测各个孔的OD值,计算结果。

1.2.6 ELISA检测细胞培养基中VEGF和HIF-1 α 的含量 按ELISA试剂盒说明书操作,测量细胞上清培养液中VEGF、HIF-1 α 水平,酶标仪设定波长为450nm,检测各孔的OD值,以建立标准曲线得到浓度与OD值之间的换算公式,以此计算结果。

1.2.7 qPCR检测 VEGF和HIF-1 α 及PHD-2的mRNA水平使用TRIzol法进行总RNA的提取,然后使用PrimeScript RT试剂盒按说明书操作将RNA逆转录成cDNA。qPCR使用SYBR Premix Ex Taq™试剂盒按说明书进行操作。采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法测量靶基因对GAPDH的相对表达。引物序列见表1。

表1 引物序列

mRNA	引物序列
GAPDH	Forward: 5'-GTT GTC TCC TGC GAC TTC A-3'
	Reverse: 5'-GGT GGT CCA GGG TTT CTT A-3'
VEGF	Forward: 5'-TTG CCT TGC TGC TCT ACC TCC A-3'
	Reverse: 5'-GAT GGC AGT AGC TGC GCT GAT A-3'
HIF-1 α	Forward: 5'-GTG GTT ACT CAG CAC TTT TAG-3'
	Reverse: 5'-AAT CTC CGT CCC TCA ACC TCT-3'
PHD-2	Forward: 5'-AAA CCA TTG GGC TGC TCA T-3'
	Reverse: 5'-CGT ACA TAA CCC GTT CCA TTG-3'

图1 不同浓度 CoCl_2 对 ARPE-19 细胞增殖活性的影响 ($n=6$) ^a $P<0.05$ vs 正常组。

1.2.8 Western Blot 法检测 VEGF 和 HIF-1 α 及 PHD-2 的表达情况 首先用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液进行裂解细胞提取总蛋白,使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测量蛋白质浓度,在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中变性 10min;然后等量的蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳并转至 PVDF 膜上,接着在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1h 后,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下与相应的一抗孵育过夜,用 TBST 缓冲液洗涤 10min \times 3 次;再加入对应二抗室温孵育 1h 后,将 PVDF 膜放入压片盒中,用 ECL 显色液显色,压片曝光,定影洗片,扫描结果;最终使用 Image J 软件进行定量分析。

统计学分析:使用 SPSS 22.0 以及 GraphPad Prism6.0 软件对数据进行统计分析,所有的实验结果均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较采用 Dunnett- t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立缺氧细胞模型的最佳 CoCl_2 浓度结果 CCK-8 结果显示,不同浓度 (0、100、200、400、800、1600 $\mu\text{mol/L}$) CoCl_2 处理 ARPE-19 细胞 24h 后,细胞增殖活性对应的 OD 值分别为 1.31 \pm 0.07、1.63 \pm 0.05、1.81 \pm 0.05、0.92 \pm 0.08、0.34 \pm 0.01、0.16 \pm 0.02,差异有统计学意义 ($F=98.51$, $P<0.001$)。与正常组相比,细胞活性呈现先增长后抑制情况,当 CoCl_2 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活性最高,差异有统计学意义 ($P<0.05$);随着 CoCl_2 浓度增加 (400、800 和 1600 $\mu\text{mol/L}$),其对应的 OD 值随之下降,且差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见图 1。故本实验选择 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 CoCl_2 浓度作为 ARPE-19 细胞缺氧模型的最佳浓度。

2.2 黄芪含药血清可抑制缺氧诱导的 ARPE-19 细胞增殖

通过 CCK-8 检测黄芪含药血清对缺氧诱导的 ARPE-19 细胞增殖能力的影响,结果显示正常组、缺氧模型组、空白血清组、低剂量含药血清组、高剂量含药血清组对应的 OD 值分别为 0.65 \pm 0.05、1.21 \pm 0.09、1.23 \pm 0.05、0.96 \pm 0.09、0.82 \pm 0.04,差异有统计学意义 ($F=75.51$, $P<0.001$)。如图 2A 所示,与正常组相比,缺氧模型组中细胞增殖明显增高,差异有统计学意义 ($P<0.05$),而与缺氧模型组相比低剂量、高剂量含药血清组均可明显降低缺氧诱导的 ARPE-19 细胞增殖,差异有统计学意义 ($P<0.05$),其中高剂量含药血清组细胞增殖明显低于低剂量含药血清组,但差异无统计学意义 ($P>0.05$);而空白血清组细胞增殖与缺氧模型组,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。此外,通过倒置显微镜对各个组的细胞增殖情况进行拍照,缺氧模型组和空白血清组细胞数相对于正常组明显增加,而低剂量、高剂量含药血清组细胞数相对于缺氧模型组明显减少 (图 2B)。因此,低剂量和高剂量黄芪含药血清处理均会抑制缺氧诱导的 ARPE-19 细胞增殖。

2.3 黄芪含药血清对缺氧诱导损伤细胞上清液中的 GSH 和 MDA 含量的影响 各组细胞上清液中的 GSH 和 MDA 的含量比较,差异均有统计学意义 ($P<0.001$)。与正常组相比,缺氧模型组细胞上清液中 GSH 含量显著下降,而 MDA 含量升高,差异具有统计学意义 ($P<0.05$);与缺氧模型组比较,低剂量、高剂量含药血清组 GSH 水平升高,MDA 含量降低,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见表 2。以上结果表明,低剂量和高剂量黄芪含药血清可改善 ARPE-19 细胞缺氧损伤的氧化应激。

2.4 黄芪含药血清对缺氧诱导损伤细胞上清液中 HIF-1 α 和 VEGF 表达的影响 各组细胞上清液中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白浓度比较,差异均有统计学意义 ($P<0.001$)。与正常组相比,缺氧模型组中 ARPE-19 细胞分泌 HIF-1 α 和 VEGF 增加,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);而与缺氧模型组相比,低剂量、高剂量含药血清组均可明显降低 HIF-1 α 和 VEGF 的分泌,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见表 3。表明低剂量和高剂量黄芪含药血清可抑制 ARPE-19 细胞缺氧损伤中 HIF-1 α 和 VEGF 的表达。

2.5 黄芪含药血清对缺氧诱导损伤细胞的 VEGF 和 HIF-1 α 及 PHD-2 mRNA 表达的影响 各组细胞的 VEGF 和 HIF-1 α 及 PHD-2 mRNA 表达比较差异均有统计学意义 ($P<0.001$)。缺氧模型组中 VEGF、HIF-1 α 和 PHD-2 mRNA 的表达较正常组显著增加,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);与缺氧模型组相比,黄芪含药血清组以剂量依赖性方式显著降低,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见表 4。结果表明低剂量和高剂量黄芪含药血清可以抑制缺氧诱导的 VEGF、HIF-1 α 和 PHD-2 mRNA 的高表达。

2.6 黄芪含药血清对缺氧诱导的 ARPE-19 细胞相关蛋白表达的影响 各组间 VEGF 和 HIF-1 α 及 PHD-2 蛋白相对表达量比较差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。缺氧模型组中 VEGF、HIF-1 α 和 PHD-2 蛋白水平明显高于正常组,差异均有统计学意义 ($P<0.05$);与缺氧模型组相比,低剂量、高剂量含药血清组 VEGF、HIF-1 α 和 PHD-2 蛋白水平明显下降,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见表 5,图 3。低剂量和高剂量黄芪含药血清处理可抑制缺氧诱导的 ARPE-19 细胞中 VEGF、HIF-1 α 和 PHD-2 蛋白表达水平。

3 讨论

作为糖尿病的严重并发症,DR 是导致视力障碍的最常见原因之一,其患病率在全球范围内呈上升趋势^[15]。目前基于抗氧化、抗炎和抗血管生成药物和激光光凝的 DR 治疗方法是有效的,但也会对视网膜组织产生不良反应。因此,需要一种安全有效的治疗方式来控制或延迟

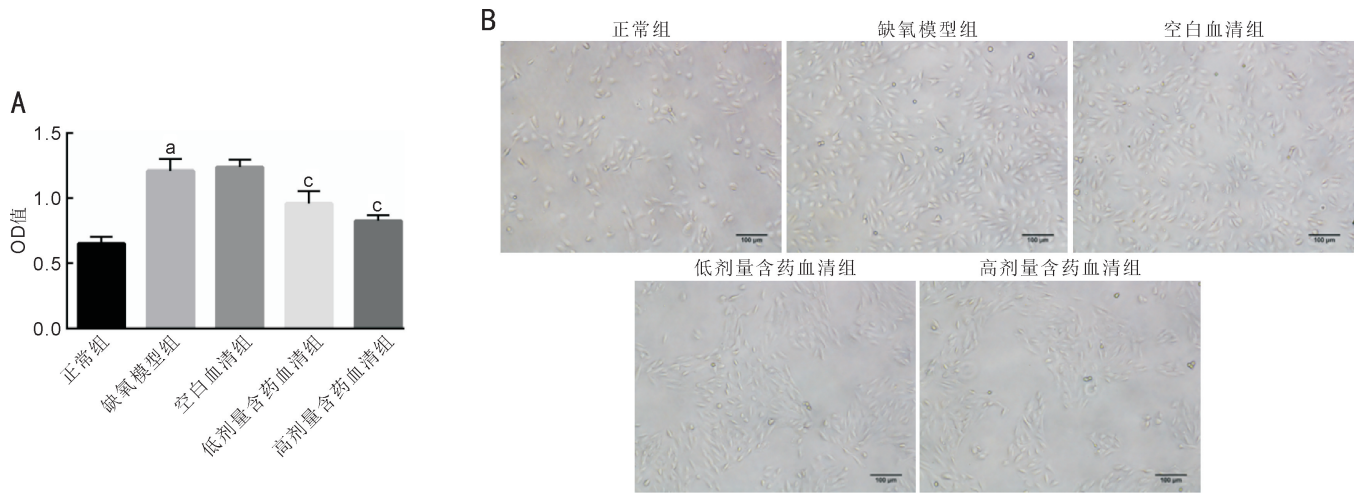


图2 黄芪含药血清对ARPE-19细胞增殖活性的影响($n=6$) A:CCK-8检测细胞活性;B:细胞增殖情况;^a $P<0.05$ vs 正常组;^c $P<0.05$ vs 缺氧模型组。

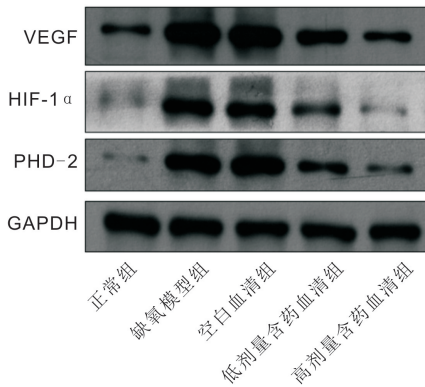


图3 Western blot检测缺氧诱导损伤细胞中相关蛋白表达情况。

表2 各组细胞上清液中GSH和MDA含量比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	GSH ($\mu\text{mol/g}$)	MDA (nmol/mL)
正常组	1.75 \pm 0.12	2.31 \pm 0.66
缺氧模型组	0.73 \pm 0.13 ^a	11.79 \pm 0.99 ^a
空白血清组	0.71 \pm 0.09	12.14 \pm 1.43
低剂量含药血清组	1.34 \pm 0.07 ^c	8.31 \pm 0.94 ^c
高剂量含药血清组	1.56 \pm 0.06 ^c	6.55 \pm 0.45 ^c
<i>F</i>	90.31	68.42
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:^a $P<0.05$ vs 正常组;^c $P<0.05$ vs 缺氧模型组。

表3 各组细胞上清液中HIF-1 α 和VEGF蛋白浓度比较

组别	HIF-1 α	VEGF
正常组	36.34 \pm 2.21	72.11 \pm 5.32
缺氧模型组	70.23 \pm 7.35 ^a	167.53 \pm 11.15 ^a
空白血清组	66.81 \pm 6.69	172.09 \pm 11.86
低剂量含药血清组	56.97 \pm 5.98 ^c	137.90 \pm 13.22 ^c
高剂量含药血清组	43.49 \pm 7.19 ^c	110.76 \pm 7.90 ^c
<i>F</i>	43.51	81.74
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:^a $P<0.05$ vs 正常组;^c $P<0.05$ vs 缺氧模型组。

表4 各组间VEGF和HIF-1 α 及PHD-2 mRNA相对表达量 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	VEGF	HIF-1 α	PHD-2
正常组	1.03 \pm 0.12	1.09 \pm 0.12	1.03 \pm 0.21
缺氧模型组	5.77 \pm 0.47 ^a	3.55 \pm 0.38 ^a	6.05 \pm 0.61 ^a
空白血清组	5.93 \pm 0.42	3.68 \pm 0.38	6.07 \pm 0.92
低剂量含药血清组	4.23 \pm 0.35 ^c	2.36 \pm 0.36 ^c	4.76 \pm 0.56 ^c
高剂量含药血清组	2.91 \pm 0.29 ^c	1.76 \pm 0.31 ^c	3.07 \pm 0.73 ^c
<i>F</i>	73.56	58.03	54.22
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a $P<0.05$ vs 正常组;^c $P<0.05$ vs 缺氧模型组。

表5 各组间VEGF和HIF-1 α 及PHD-2蛋白相对表达量

组别	VEGF	HIF-1 α	PHD-2
正常组	0.24 \pm 0.11	0.13 \pm 0.01	0.17 \pm 0.09
缺氧模型组	1.07 \pm 0.21 ^a	0.88 \pm 0.05 ^a	0.98 \pm 0.13 ^a
空白血清组	1.08 \pm 0.15	0.90 \pm 0.05	0.12 \pm 0.18
低剂量含药血清组	0.66 \pm 0.20 ^c	0.41 \pm 0.09 ^c	0.63 \pm 0.19 ^c
高剂量含药血清组	0.43 \pm 0.11 ^c	0.24 \pm 0.04 ^c	0.35 \pm 0.05 ^c
<i>F</i>	16.04	58.03	23.73
<i>P</i>	<0.01	<0.001	<0.01

注:^a $P<0.05$ vs 正常组;^c $P<0.05$ vs 缺氧模型组。

DR的发生。黄芪具有多种药理特性,如清除机体氧自由基代谢产物、调节免疫、降低血糖和保护大脑的作用^[7]。然而黄芪在DR的作用机制尚未清楚。故本研究采用200 $\mu\text{mol/L}$ 的 CoCl_2 来诱导ARPE-19细胞缺氧模型,旨在探讨黄芪对缺氧诱导DR的保护作用及其可能机制。

VEGF是一种关键的血管生成因子,参与多种生物过程,包括胚胎发育和肿瘤进展^[16]。此外,VEGF是眼内新生血管形成的主要介质,在糖尿病视网膜病变的病因学中起关键作用^[17]。HIF-1 α 是VEGF的主要上游调节剂^[18]。在缺氧条件下,脯氨酰羟化酶失活,HIF-1 α 降解受到抑制,导致其积累,并与HIF-1 β 结合产生功能性异二聚体转录因子^[19]。然而,HIF-1 α 可以在正常条件下可被

PHD-2羟甲基化;羟甲基化的 HIF-1 α 在蛋白酶体中被泛素化和降解;相反,PHD-2 的 mRNA 表达通过 HIF-1 α 依赖性信号通路被缺氧上调^[20]。因此,HIF-1 α 增加诱导了缺氧条件下 VEGF 的表达,导致血管通透性和视网膜新生血管增加。另一方面,抑制 HIF-1 α 可以防止缺氧条件下的视网膜新生血管形成^[21]。在本研究中,我们发现了 VEGF、HIF-1 α 和 PHD-2 的 mRNA 及蛋白可在缺氧条件下表达显著增加;而黄芪则以剂量依赖的方式抑制其表达。因此,黄芪通过 HIF-1 α /VEGF 信号通路抑制 VEGF 的分泌。

氧化应激已被证实是 DR 发病机制的一个重要因素^[5]。HIF-1 α 的稳定会促进活性氧(reactive oxygen species, ROS)的合成,而 ROS 的过度产生有助于 DR 病变的许多迹象的发展,从血管渗漏和血管功能障碍到病理性血管生成^[22]。在一些情况下,ROS 的这些不同作用是通过它们的脂质过氧化副产物而发挥作用。MDA 是脂质过氧化的最终产物,可作为氧化应激和组织损伤的良好标志物^[23]。在缺氧条件下,GSH 等抗氧化酶大量消耗,使得视网膜色素上皮细胞处于氧化应激状态,诱导细胞凋亡和新血管生成,导致早期 DR 血流动力学改变和微血管病变^[24]。此外,有研究表明,由 CoCl₂ 引起的细胞缺氧和随后积累的脂质过氧化产物诱导的氧化应激促进了 VEGF 基因的表达^[25]。而 VEGF 表达增加可能取决于 ROS 激活转录因子 HIF-1 α 以及脂质过氧化产物水平的增加,这可能是视网膜病变中新血管生成的可能机制之一^[26]。本研究发现,在缺氧条件下,细胞上清液中 GSH 水平显著下降,而黄芪则是以剂量依赖的方式提高细胞上清液中 GSH 水平;同时,缺氧条件下细胞上清液中 MDA 水平显著升高,而黄芪则是以剂量依赖的方式降低细胞的 MDA 水平。提示黄芪可能通过增强细胞的抗氧化能力,从而对抗缺氧损伤。

在本研究中,我们发现低剂量和高剂量黄芪含药血清确实可以抑制缺氧条件下 ARPE-19 细胞的 VEGF 分泌,下调 VEGF、HIF-1 α 和 PHD-2 的 mRNA 及蛋白表达。此外,结果还表明黄芪则是以剂量依赖的方式抑制缺氧诱导的氧化应激的发生。因此,我们的研究结果表明黄芪对缺氧诱导的 ARPE-19 细胞损伤具有一定的保护作用,其可能机制是通过抑制氧化应激来改善 DR 病变发生。这一研究发现可为临床上黄芪治疗 DR 提供新的见解。

参考文献

- 1 Simó-Servat O, Hernández C, Simó R. Diabetic retinopathy in the context of patients with diabetes. *Ophthalmic Res* 2019;62(4):211-217
- 2 Wang W, Lo ACY. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments. *Int J Mol Sci* 2018;19(6):1816
- 3 Tomita Y, Lee D, Tsubota K, et al. Updates on the current treatments for diabetic retinopathy and possibility of future oral therapy. *J Clin Med* 2021;10(20):4666
- 4 Kang AY, Park SK, Park SY, et al. Therapeutic target achievement in type 2 diabetic patients after hyperglycemia, hypertension, dyslipidemia management. *Diabetes Metab J* 2011;35(3):264-272
- 5 Kang QZ, Yang CX. Oxidative stress and diabetic retinopathy: molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Redox Biol* 2020;37:101799
- 6 Qi Y, Gao F, Hou LF, et al. Anti-inflammatory and immunostimulatory activities of astragalosides. *Am J Chin Med* 2017;45(6):1157-1167
- 7 Zheng YJ, Ren WY, Zhang LN, et al. A review of the pharmacological

- action of *Astragalus polysaccharide*. *Front Pharmacol* 2020;11:349
- 8 Cheng WJ, Chiang CC, Lin CY, et al. *Astragalus mongholicus bunge* water extract exhibits anti-inflammatory effects in human neutrophils and alleviates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice. *Front Pharmacol* 2021;12:762829
- 9 Adesso S, Russo R, Quaroni A, et al. *Astragalus membranaceus* extract attenuates inflammation and oxidative stress in intestinal epithelial cells via NF- κ B activation and Nrf2 response. *Int J Mol Sci* 2018;19(3):E800
- 10 Liu TL, Zhang MJ, Niu HY, et al. *Astragalus polysaccharide* from *Astragalus Melittin* ameliorates inflammation via suppressing the activation of TLR-4/NF- κ B p65 signal pathway and protects mice from CVB₃-induced virus myocarditis. *Int J Biol Macromol* 2019;126:179-186
- 11 Tay KC, Tan LT, Chan CK, et al. Formononetin: a review of its anticancer potentials and mechanisms. *Front Pharmacol* 2019;10:820
- 12 Tan YQ, Chen HW, Li J. Astragaloside IV: an effective drug for the treatment of cardiovascular diseases. *Drug Des Devel Ther* 2020;14:3731-3746
- 13 Wang EY, Wang L, Ding R, et al. Astragaloside IV acts through multi-scale mechanisms to effectively reduce diabetic nephropathy. *Pharmacol Res* 2020;157:104831
- 14 Cecilia OM, José Alberto CG, José NP, et al. Oxidative stress as the main target in diabetic retinopathy pathophysiology. *J Diabetes Res* 2019;2019:8562408
- 15 Le NT, Kroeger ZA, Lin WV, et al. Novel treatments for diabetic macular edema and proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep* 2021;21(10):43
- 16 Zhang AF, Fang HW, Chen J, et al. Role of VEGF-A and LRG1 in abnormal angiogenesis associated with diabetic nephropathy. *Front Physiol* 2020;11:1064
- 17 Tan YR, Fukutomi A, Sun MT, et al. Anti-VEGF crunch syndrome in proliferative diabetic retinopathy: a review. *Surv Ophthalmol* 2021;66(6):926-932
- 18 Vaupel P, Multhoff G. Fatal Alliance of Hypoxia-/HIF-1 α -Driven Microenvironmental Traits Promoting Cancer Progression. *Adv Exp Biol* 2020;1232:169-176
- 19 Pages G, Pouyssegur J. Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene? a concert of activating factors. *Cardiovasc Res* 2005;65(3):564-573
- 20 Berra E, Benizri E, Ginouvès A, et al. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J* 2003;22(16):4082-4090
- 21 Zhang D, Lv FL, Wang GH. Effects of HIF-1 α on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22(16):5071-5076
- 22 Du YP, Veenstra A, Palczewski K, et al. Photoreceptor cells are major contributors to diabetes-induced oxidative stress and local inflammation in the retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(41):16586-16591
- 23 Fonseca I, Reguengo H, Oliveira JC, et al. A triple-biomarker approach for the detection of delayed graft function after kidney transplantation using serum creatinine, cystatin C, and malondialdehyde. *Clin Biochem* 2015;48(16-17):1033-1038
- 24 Fan Y, Qiao Y, Huang JM, et al. Protective effects of *Panax notoginseng* saponins against high glucose-induced oxidative injury in rat retinal capillary endothelial cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016;2016:5326382
- 25 Cervellati F, Cervellati C, Romani A, et al. Hypoxia induces cell damage via oxidative stress in retinal epithelial cells. *Free Radic Res* 2014;48(3):303-312
- 26 Wilkinson-Berka JL, Rana I, Armani R, et al. Reactive oxygen species, Nox and angiotensin II in angiogenesis: implications for retinopathy. *Clin Sci (Lond)* 2013;124(10):597-615