

利拉鲁肽联合神经干细胞减轻大鼠糖尿病视网膜病变的机制研究

赵吉飞¹, 侯力华², 刘甜¹, 王莉¹, 杨佩瑶¹, 秦扬¹, 陈宁宁³

引用: 赵吉飞, 侯力华, 刘甜, 等. 利拉鲁肽联合神经干细胞减轻大鼠糖尿病视网膜病变的机制研究. 国际眼科杂志, 2026, 26(8): 1332-1342.

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (No. 2024SF-YBXM-341); 咸阳市重点研发计划项目 (No. L2023-ZDYF-SF-062)
作者单位: (712000) 中国陕西省咸阳市第一人民医院¹眼底外一科; ²眼底内科; ³白内障中心
作者简介: 赵吉飞, 男, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向: 眼底病、白内障。
通讯作者: 陈宁宁, 男, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向: 眼底病、白内障. 344015812@qq.com
收稿日期: 2025-10-25 修回日期: 2026-06-16

摘要

目的: 探究利拉鲁肽 (LIR) 联合神经干细胞 (NSCs) 减轻大鼠糖尿病视网膜病变 (DR) 的作用及可能机制。
方法: 采用高脂饮食联合一次性腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 构建 DR 大鼠模型, 对照组大鼠喂养正常饲料并腹腔注射柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。建模后, 将大鼠分为对照组、DR 组、DR+LIR 组、DR+BMSCs 组、DR+NSCs 组、DR+BMSCs+LIR 组和 DR+NSCs+LIR 组, 根据分组说明, 分别对大鼠腹腔注射 200 μg/(kg·d) 利拉鲁肽和玻璃体腔注射骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 或神经干细胞 (NSCs) 或联合治疗, 共治疗 8 wk。检测各组大鼠的空腹血糖 (FBG) 和血清胰岛素水平, 以及视网膜氧化应激指标和血清炎症指标水平。通过苏木精-伊红 (HE) 染色评价视网膜病变, TUNEL 染色检测视网膜细胞凋亡, 免疫组织化学检测视网膜组织中 SIRT1 的表达, 免疫荧光检测视网膜组织中 BDNF 的表达。通过 qRT-PCR 检测视网膜组织中 cZNF532、miR-29a-3p、SIRT1、TGF-β1、NRF2、Keap1 和 BDNF 的转录水平, Western blot 检测视网膜组织中 SIRT1、TGF-β1、SMAD2/3、p-SMAD2/3、NRF2、Keap1、p65 和 p-p65 的蛋白表达水平。
结果: DR+NSCs+LIR 组大鼠视网膜形态相较其他组 DR 大鼠明显改善, FBG、TNF-α、IL-1β、IL-6 和 MDA 水平降低 (均 $P<0.05$), 血清胰岛素水平以及 SOD、CAT 和 GSH-Px 水平均升高 (均 $P<0.05$), 视网膜细胞 TUNEL 阳性率降低 (均 $P<0.05$), 视网膜组织中 cZNF532、SIRT1、NRF2 和 BDNF 表达水平升高 (均 $P<0.05$), miR-29a-3p、TGF-β1、p-SMAD2/3、Keap1 和 p-p65 表达水平均降低 (均 $P<0.05$)。
结论: 利拉鲁肽联合 NSCs 通过调控 cZNF532-miR-29a-3p-SIRT1 网络及其下游 TGF-β/SMAD、NF-κB 和 Keap1/NRF2 信号通路减轻 DR。
关键词: 利拉鲁肽; 神经干细胞; 糖尿病视网膜病变; cZNF532; miR-29a-3p; SIRT1
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2026.8.05

Mechanism study on liraglutide combined with neural stem cells in alleviating diabetic retinopathy in rats

Zhao Jifei¹, Hou Lihua², Liu Tian¹, Wang Li¹, Yang Peiyao¹, Qin Yang¹, Chen Ningning³

Foundation items: Key Research and Development Program of Shaanxi Province (No. 2024SF-YBXM-341); Key Research and Development Program of Xianyang City (No. L2023-ZDYF-SF-062)
¹First Department of Surgical Retina; ²Department of Medical Retina; ³Cataract Center, the First People's Hospital of Xianyang, Xianyang 712000, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Chen Ningning. Cataract Center, the First People's Hospital of Xianyang, Xianyang 712000, Shaanxi Province, China. 344015812@qq.com
Received: 2025-10-25 Accepted: 2026-06-16

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect and potential mechanism of liraglutide (LIR) combined with neural stem cells (NSCs) in alleviating diabetic retinopathy (DR) in rats.
• **METHODS:** A DR rat model was established using a high-fat diet combined with a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). Rats in the control group were fed a normal diet and received an intraperitoneal injection of citric acid-sodium citrate buffer. After modeling, the rats were divided into the control group, DR group, DR+LIR group, DR+BMSCs group, DR+NSCs group, DR+BMSCs+LIR group, and DR+NSCs+LIR group. According to the grouping instructions, rats were given intraperitoneal injection of LIR at 200 μg/(kg·d) and intravitreal injection of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), or NSCs, or the combined therapy accordingly for 8 wk. Fasting blood glucose (FBG) and serum insulin levels, as well as retinal oxidative stress indexes and serum inflammatory indexes, were detected in each group. Retinopathy was evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining, retinal cell apoptosis was detected by TUNEL staining, SIRT1 expression in retinal tissues was detected by immunohistochemistry, and BDNF expression in retinal tissues was detected by immunofluorescence. The transcriptional levels of cZNF532, miR-29a-3p, SIRT1, TGF-β1, NRF2, Keap1, and BDNF in retinal tissues were detected by qRT-PCR, and the protein expression levels

of SIRT1, TGF- β 1, SMAD2/3, p-SMAD2/3, NRF2, Keap1, p65, and p-p65 in retinal tissues were detected by Western blot.

• **RESULTS:** Compared with the other groups of rats, the retinal morphology of rats in the DR+NSCs+LIR group was significantly improved, the levels of FBG, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and MDA were decreased (all $P < 0.05$), the serum insulin level and the levels of SOD, CAT, and GSH-Px were increased (all $P < 0.05$), the TUNEL-positive rate of retinal cells was reduced (all $P < 0.05$). The expression levels of cZNF532, SIRT1, NRF2, and BDNF in retinal tissue were up-regulated (all $P < 0.05$), whereas the expression levels of miR-29a-3p, TGF- β 1, p-SMAD2/3, Keap1, and p-p65 were down-regulated (all $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** LIR combined with NSCs alleviates DR by regulating the cZNF532-miR-29a-3p-SIRT1 network and its downstream TGF- β /SMAD, NF- κ B, and Keap1/NRF2 signaling pathways.

• **KEYWORDS:** liraglutide; neural stem cells; diabetic retinopathy; cZNF532; miR-29a-3p; SIRT1

Citation: Zhao JF, Hou LH, Liu T, et al. Mechanism study on liraglutide combined with neural stem cells in alleviating diabetic retinopathy in rats. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2026,26(8): 1332-1342.

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是一种糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 并发症,也是 DM 患者视力丧失的最常见原因^[1]。抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 疗法在 DR 患者临床治疗中效果显著,但存在玻璃体腔出血、视网膜脱离等并发症^[2-3]。由于当前治疗方法的副作用,临床上也在寻找更好的方法来治疗 DR,其中包括干细胞疗法。神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 具有多向分化潜能,在治疗阿尔兹海默症等神经系统疾病中表现出了良好的神经修复作用^[4-6]。由于从成体神经组织中较难分离 NSCs,因此,需要从其他途径来获得 NSCs。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 具有自我更新能力和高增殖率,并具有多向分化特性,是临床应用中修复受损神经组织的良好细胞来源^[7-8]。2000 年,Woodbury 等^[9]首次报道在特定条件下 BMSCs 可分化为神经元样细胞。此后,其他学者发现, BMSCs 可诱导分化为神经元或胶质细胞,并表达相关的表面标志物^[10]。虽然通过移植 BMSCs 可修复动物模型的神经功能,但是,在脑内 BMSCs 很难发挥替代作用,且存活率低。值得注意的是,移植的 NSCs 具有较高存活率和分化潜能,因此,在治疗神经系统性疾病方面, NSCs 比 BMSCs 具有更广阔的应用前景。本研究从炎症、氧化应激、神经修复和 cZNF532-miR-29a-3p-SIRT1 网络调控等方面探讨了利拉鲁肽联合 NSCs 治疗 DR 大鼠的效果,并分析了其机制,旨在为 DR 的临床治疗提供候选治疗方案。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂 DMEM 和 Opti-MEM 培养基购自美国

Gibco 公司;链脲佐菌素 (STZ) 试剂盒购自美国 Sigma-Aldrich 公司;BCA 试剂盒、ECL 试剂盒、RIPA 裂解液、大鼠白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和丙二醛 (MDA) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;3,3-二氨基联苯胺四盐酸盐 (DAB) 和抗荧光淬灭封片剂购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司;60% 高脂肪肥胖模型饲料和对照饲料购自南通特洛非饲料科技有限公司;葡萄糖购自国药集团化学试剂有限公司;胰岛素 ELISA 试剂盒购自美国艾美捷科技有限公司;PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 购自日本 Takara 公司;抗体均购自英国 Abcam 公司。

1.1.2 实验动物 SPF 级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 6 周龄,体质量 180-220 g,购自西安交通大学实验动物中心 [SCXK(陕)2023-002],所有大鼠均在标准 SPF 级屏障环境条件下饲养,温度为 24 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C,湿度为 55% $\pm$ 5%,光照条件为 12 h 光暗循环照明。本研究经过咸阳市第一人民医院伦理委员会审查 (批件编号:IITLC-11062025035)。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 体外诱导转化为 NSCs (1) 预诱导:从出生 3 d 的 SD 大鼠胫骨及股骨中分离 BMSCs, BMSCs 传至第 4 代,密度达 80% 汇合时,开始 NSCs 诱导。弃培养基后,以 0.01 mol/L 的 PBS 清洗 1-2 次;采用 1 mL 0.25% 胰蛋白酶-0.01% EDTA 消化处理 2-3 min,待细胞变圆,加 2 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基终止胰蛋白酶消化。经 PBS 清洗、1 000 r/min 离心 5 min,采用 10 mL DMEM/F12 培养基重悬细胞,按 2 $\times$ 10⁵ 个/瓶接种。预诱导培养基为含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM/F12 完全培养基,每瓶 5 mL,并添加 50 ng/mL bFGF、500 ng/mL SHH、100 ng/mL FGF8、10 ng/mL LIF。细胞于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度环境培养 6-8 d,每 3 d 换液;(2) 诱导分化:预诱导细胞再次生长至 80% 汇合,洗涤细胞,加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶-0.01% EDTA 消化处理,加入 2 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基终止胰蛋白酶消化。经离心处理后,以 10 mL 的 Neurobasal Medium 重悬,转接培养。诱导培养基为含 2% N2/B27、双抗的无血清 Neurobasal Medium,每瓶 5 mL,添加 50 ng/mL bFGF、500 ng/mL SHH、100 ng/mL FGF8。细胞培养 20 d,期间每 3 d 添加生长因子,每 7 d 更换培养基;(3) 传代:诱导后细胞经 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清;加入含 20 ng/mL bFGF 和 20 ng/mL EGF 的无血清 Neurobasal Medium,吹打制成单细胞悬液,按 1:3 比例传代,后续培养沿用相同培养基。

通过流式细胞仪鉴定 NSCs。选取第 4-6 代对数生长期的 BMSCs 和 NSCs,以 0.25% 胰蛋白酶消化 2-3 min 制成单细胞悬液,离心收集细胞,采用 0.01 mol/mL PBS 重悬细胞并调整密度至 3 $\times$ 10⁴ cells/ μ L 备用。

1.2.2 动物模型建立及分组 参考文献[11]所述方法,采用高脂饮食联合腹腔注射 STZ 建立 DR 大鼠模型,为 DR 模型组。使用 60% 高脂肪肥胖模型饲料连续喂养大鼠 3 mo,然后使用 0.1 mol/L、pH 4.5 的柠檬酸-柠檬酸钠缓

冲液将 STZ 配制成 2% 溶液,按 45 mg/kg 剂量对大鼠进行一次腹腔注射。DR 建模成功标准:注射 STZ 72 h 后,连续 3 d 检测尾静脉随机血糖,血糖值持续高于 16.7 mmol/L 视为糖尿病大鼠模型造模成功。将糖尿病大鼠继续用高脂饲料喂养 12 wk,然后行眼底照相检查,观察是否出现血管扩张、新生血管形成等 DR 典型改变,同时,随机处死 3 只大鼠,进行视网膜组织 HE 染色,镜下观察视网膜血管及神经节细胞层病变,作为 DR 的特异性病变验证指标。对照组大鼠喂养正常对照饲料,在连续喂养 3 mo 后腹腔注射等量柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

将造模成功的 DR 模型组大鼠随机分为 6 个亚组,DR 组:未治疗的 DR 大鼠;DR+LIR 组:腹腔注射利拉鲁肽(200 μg/(kg·d),0.9% 生理盐水配制成 40 μg/mL 溶液,按 1-4 mL/kg 体积给药)的 DR 大鼠;DR+BMSCs 组:玻璃体腔注射 BMSCs(5 μL,3×10⁴ cells/μL)的 DR 大鼠;DR+NSCs 组:玻璃体腔注射 NSCs(5 μL,3×10⁴ cells/μL)的 DR 模型大鼠;DR+BMSCs+LIR 组:腹腔注射 200 μg/(kg·d)利拉鲁肽联合玻璃体腔注射 BMSCs 的 DR 大鼠;DR+NSCs+LIR 组:腹腔注射 200 μg/(kg·d)利拉鲁肽联合玻璃体腔注射 NSCs 的 DR 大鼠。利拉鲁肽每日腹腔注射 1 次,连续 8 wk;玻璃体腔注射 BMSCs 或 NSCs 为一次性注射,于实验开始时完成。各组大鼠均治疗 8 wk。未造模的正常大鼠作为对照组,未进行造模手术、腹腔注射及玻璃体腔注射操作,仅正常喂养。本研究共纳入 7 组大鼠,每组 10 只。

玻璃体腔注射 BMSCs 或 NSCs 细胞悬液操作步骤为:3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,使用滴眼液散瞳和处理注射眼后,在显微镜下于右眼角膜缘后 1 mm 处作结膜切口,显露巩膜并穿刺。最后用微量注射器将 5 μL 的 BMSCs 或 NSCs 细胞悬液(3×10⁴ cells/μL)注入玻璃体腔,操作时避免损伤晶状体与视网膜,术后以氧氟沙星眼膏封眼处理。玻璃体腔注射 BMSCs 或 NSCs 为一次性注射,于实验开始时完成,后续不再重复注射。

1.2.3 空腹血糖和血清胰岛素水平的检测 使用 Accu-Check 血糖仪检测大鼠空腹血糖(FBG),使用 ELISA 试剂盒检测血清胰岛素水平。

1.2.4 炎症指标检测及氧化应激指标的测定 治疗结束后,3% 戊巴比妥钠过量麻醉处死大鼠,开胸取腹主动脉血,离心后收集血清,按照 ELISA 试剂盒步骤检测大鼠血清炎症因子(TNF-α、IL-1β 和 IL-6)水平。取血结束后,迅速摘取眼球并剥离视网膜组织,将部分组织置于冰 PBS(pH 7.4)中匀浆,经 3 000 r/min、4 ℃ 离心 20 min 获取上

清液。严格按照试剂盒说明书步骤,分别采用 TBA 法、WST-1 法、钼酸铵法和比色法检测视网膜组织中 MDA、SOD、CAT 和 GSH-Px 水平。酶标仪分别检测 532、450、405、412 nm 处吸光度值,根据标准曲线计算各样品指标表达水平。

1.2.5 苏木精-伊红染色 大鼠视网膜组织经 4% 多聚甲醛固定 48 h,按照常规方法制作厚度为 4 μm 的石蜡切片,进行苏木精-伊红(HE)染色。取制备好的石蜡切片先经脱蜡和水化处理,再依次进行苏木精染色 7 min、1% 盐酸酒精分化 3 s、1% 氨水中和 3 s、伊红染色 3 min,随后经梯度酒精脱水、二甲苯透明,最后以中性树胶封片,光学显微镜下观察拍照。

1.2.6 TUNEL 染色 大鼠视网膜组织石蜡切片经脱蜡和水化后,采用不含 DNase 的蛋白酶 K 37 ℃ 处理 15 min、PBS 洗涤,滴加 50 μL TUNEL 检测液于 37 ℃ 避光孵育 1 h,再次洗涤后 DAPI 染核 5 min,PBS 洗涤后以抗荧光淬灭封片液封片,于荧光显微镜下观察和拍照。

1.2.7 免疫组织化学染色 大鼠视网膜组织石蜡切片依次经过烤片、脱蜡、水化和 10 mol/L 的柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)沸水浴加热 5 min,再经过 3% 过氧化氢封闭 10 min 和 5% 山羊血清孵育 30 min,加入 1:200 稀释的 SIRT1 一抗 4 ℃ 孵育过夜,第二天经 PBS 冲洗后与 1:200 稀释的 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h,DAB 显色、苏木精复染,再经脱水、透明处理后封片。于显微镜下观察并应用 MIAS-2000 型图像分析系统测量阳性染色的平均光密度。

1.2.8 免疫荧光染色 大鼠视网膜组织石蜡切片依次经烤片、脱蜡、水化、抗原修复和封闭处理,加入 1:200 稀释的 BDNF 一抗 4 ℃ 孵育过夜,第二天经 PBS 冲洗后与 1:200 稀释的 Alexa Fluor 488 标记的 IgG 二抗室温孵育 1 h,DAPI 染核后以抗荧光淬灭剂封片,在荧光显微镜下观察和拍照。

1.2.9 qRT-PCR 取各组大鼠视网膜组织并剪碎,与 Trizol 混合后匀浆并提取总 RNA,使用紫外分光光度计测定 RNA 纯度。使用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 将 RNA 逆转录为 cDNA,使用 TB Green Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus)配制反应体系,在 Applied Biosystems 7500 PCR 系统上进行 PCR。反应条件:预变性:95 ℃ 30 s;PCR 反应:95 ℃ 5 s;60 ℃ 34 s;40 个循环。引物用 Primer 6.0 设计,由上海生工合成。引物序列如表 1 所示。U6 和 β-actin 作为内参;通过 2^{-ΔΔCT} 方法计算 mRNA 的相对表达量。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	
<i>cZNF532</i>	正向:GTTATCTCAGCTCCGGCAAG	反向:TATCCCCATGGTCATGAAT
<i>miR-29a-3p</i>	正向:CCCAGGGTCTGGTGCGGAGA	反向:CAGGGGCTGACGGTGAGGG
<i>SIRT1</i>	正向:ATAAATAGGGAACCTCTGCC	反向:GCTTTACAGGGTTACAACAA
<i>TGF-β1</i>	正向:CCCGCATCCAGGACCTCTCT	反向:CGGGGGACTGCGGAGCCTTAG
<i>NRF2</i>	正向:CATTGTAGATGACCATGAGTCGC	反向:ATCAGGGGTGCTGAAGACTG
<i>Keap1</i>	正向:GTGGA GACAGAGACCTGGACTTTTC	反向:TGTCAAGCGGGTCACTTCACTC
<i>BDNF</i>	正向:TGTGACAGTATTAGCGAGTGGGT	反向:CGATTGCTAGTTCGGCATT
<i>U6</i>	正向:CGCTTCGGCAGCACATATACTA	反向:CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA
<i>β-actin</i>	正向:CATGGGTCAGAAGGATTCTCCT	反向:TGATCTGGGTCATCTTCTCG

1.2.10 Western blot 取各组大鼠视网膜组织并剪碎,加入含有 PMSF 的 RIPA 匀浆并裂解视网膜组织并提取总蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取 30 μg 蛋白样品上样,经 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,使用湿转法将蛋白从凝胶转移至 PVDF 膜,转膜完成后采用 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h。封闭完成后,将膜与稀释好的一抗 (SIRT1、TGF-β1、SMAD2/3、p-SMAD2/3、NRF2、Keap1、p65 和 p-p65,稀释比例均为 1:1 000) 4 ℃ 孵育过夜。次日洗膜后再与 HRP 标记的二抗 (稀释比例 1:2 000) 室温孵育 1.5 h。使用 ECL 化学发光试剂盒进行显色,通过 Bio-Rad ChemiDocXRS+化学发光成像系统曝光显影。使用 ImageJ 软件对条带灰度值进行分析,以 β-actin 为内参,计算各目的蛋白的相对表达量。

统计学分析:使用 SPSS 26.0 版本和 GraphPad Prism 8.0 版本软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料以平均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,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 各组大鼠 FBG 和血清胰岛素水平比较 与对照组比较,DR 组大鼠的 FBG 水平升高 (*P*<0.05),血清胰岛素水平降低 (*P*<0.05)。与 DR 组比较,DR+LIR 组、DR+BMSCs 组和 DR+NSCs 组的 FBG 水平降低,血清胰岛素水平升高 (均 *P*<0.05)。与 DR+BMSCs 组比较,DR+BMSCs+LIR 组大鼠的 FBG 水平降低,血清胰岛素水平升高 (均 *P*<0.05),与 DR+NSCs 组比较,DR+NSCs+LIR 组大鼠的 FBG

水平降低,血清胰岛素水平升高 (均 *P*<0.05)。与 DR+BMSCs+LIR 组比较,DR+NSCs+LIR 组的 FBG 水平降低,血清胰岛素水平升高,差异有统计学意义 (均 *P*<0.05),见表 2。

2.2 各组大鼠视网膜氧化应激指标比较 与对照组比较,DR 组的视网膜中 MDA 水平升高 (*P*<0.05),SOD、CAT 和 GSH-Px 水平均降低 (*P*<0.05)。与 DR 组比较,DR+LIR 组、DR+BMSCs 组和 DR+NSCs 组的视网膜中 MDA 水平均降低 (*P*<0.05),SOD、CAT 和 GSH-Px 水平均升高 (*P*<0.05)。DR+BMSCs+LIR 组的视网膜中 MDA 水平相较 DR+BMSCs 组降低,SOD、CAT 和 GSH-Px 水平升高 (均 *P*<0.05),与 DR+NSCs 组比较,DR+NSCs+LIR 组的视网膜中 MDA 水平降低,SOD、CAT 和 GSH-Px 水平升高 (均 *P*<0.05)。与 DR+BMSCs+LIR 组比较,DR+NSCs+LIR 组的视网膜中 MDA 水平降低,SOD、CAT 和 GSH-Px 水平升高,差异有统计学意义 (均 *P*<0.05),见表 3。

2.3 各组大鼠血清炎症指标水平比较 与对照组比较,DR 组的血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平均升高 (*P*<0.05)。与 DR 组比较,DR+LIR 组、DR+BMSCs 组和 DR+NSCs 组的血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平均降低 (均 *P*<0.05)。DR+BMSCs+LIR 组血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平低于 DR+BMSCs 组 (均 *P*<0.05),DR+NSCs+LIR 组血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平低于 DR+NSCs 组 (均 *P*<0.05)。与 DR+BMSCs+LIR 组比较,DR+NSCs+LIR 组的血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平均降低,差异有统计学意义 (*P*<0.05),见表 4。

2.4 各组大鼠视网膜组织 HE 染色 HE 染色显示,对照组

表 2 各组大鼠 FBG 和血清胰岛素水平比较 $\bar{x}\pm s$

组别	FBG (mmol/L)	血清胰岛素 (μIU/mL)
对照组	5.77±0.71	16.36±1.11
DR 组	26.43±3.60 ^a	5.16±0.50 ^a
DR+LIR 组	17.75±1.44 ^c	10.84±0.91 ^c
DR+BMSCs 组	23.43±2.09 ^c	7.12±0.59 ^c
DR+NSCs 组	24.00±2.52 ^c	8.63±1.25 ^c
DR+BMSCs+LIR 组	14.32±1.13 ^c	13.85±1.50 ^c
DR+NSCs+LIR 组	11.45±1.12 ^{c,g,i}	14.15±1.36 ^{c,g,i}
<i>F</i>	138.605	142.269
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:^a*P*<0.05 vs 对照组;^c*P*<0.05 vs DR 组;^e*P*<0.05 vs DR+BMSCs 组;^g*P*<0.05 vs DR+NSCs 组;ⁱ*P*<0.05 vs DR+BMSCs+LIR 组。

表 3 各组大鼠的视网膜氧化应激指标比较 $\bar{x}\pm s$

组别	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)	CAT (U/mg)	GSH-Px (U/mg)
对照组	5.74±0.46	15.66±1.20	12.55±0.62	22.61±0.78
DR 组	26.71±2.66 ^a	5.00±0.69 ^a	3.81±0.58 ^a	7.13±0.60 ^a
DR+LIR 组	14.98±0.68 ^c	10.54±1.23 ^c	7.03±0.58 ^c	12.92±0.67 ^c
DR+BMSCs 组	12.20±0.87 ^c	11.44±1.22 ^c	7.91±0.90 ^c	14.81±0.59 ^c
DR+NSCs 组	8.52±0.75 ^c	13.92±1.32 ^c	8.75±0.82 ^c	17.21±0.65 ^c
DR+BMSCs+LIR 组	7.00±0.51 ^c	14.81±0.64 ^c	9.97±0.88 ^c	18.76±1.17 ^c
DR+NSCs+LIR 组	4.64±0.45 ^{c,g,i}	16.40±1.33 ^{c,g,i}	12.12±0.90 ^{c,g,i}	20.61±0.93 ^{c,g,i}
<i>F</i>	433.618	123.619	156.274	428.566
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:^a*P*<0.05 vs 对照组;^c*P*<0.05 vs DR 组;^e*P*<0.05 vs DR+BMSCs 组;^g*P*<0.05 vs DR+NSCs 组;ⁱ*P*<0.05 vs DR+BMSCs+LIR 组。

大鼠的视网膜形态正常;其他组大鼠视网膜均出现不同程度的病变,主要表现为视网膜细胞层次不清晰,排列不规则,细胞形态不规则,血管扩张,神经节细胞层增厚,内丛状层可见游离细胞。与DR组比较,DR+LIR组、DR+BMSCs组、DR+NSCs组、DR+BMSCs+LIR组和DR+NSCs+LIR组大鼠的视网膜形态均有所改善,DR+LIR组、DR+BMSCs组、DR+NSCs组视网膜神经节细胞层厚度均降低,差异有统计学意义($P<0.05$);其中DR+NSCs+LIR组大鼠的视网膜形态较其他组改善最为明显,见图1,表5。

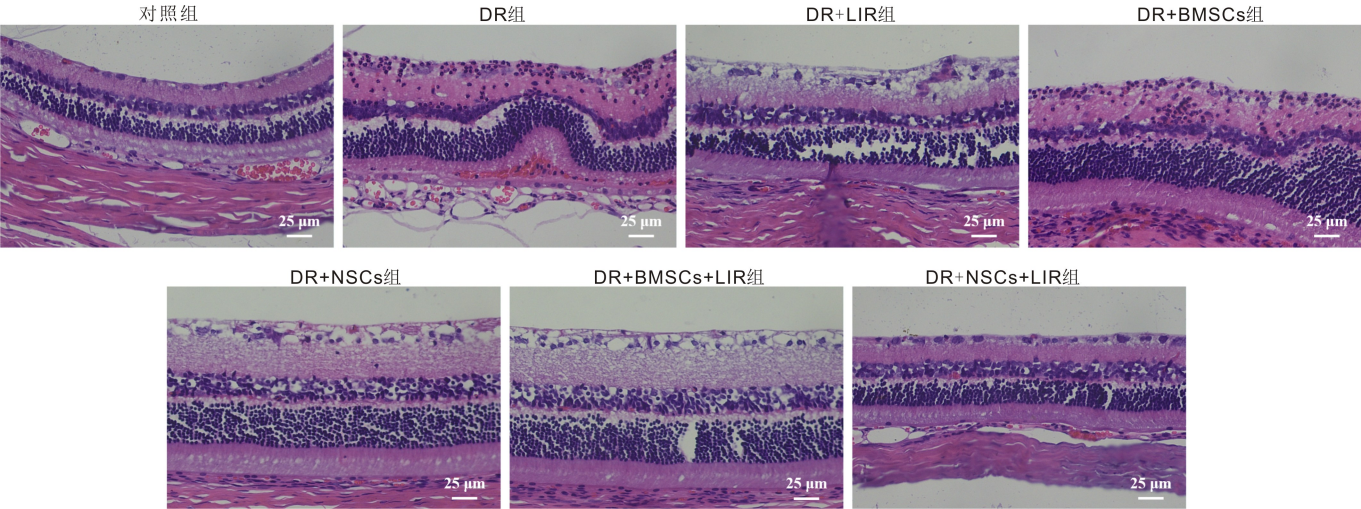


图1 各组大鼠视网膜组织 HE 染色结果。

表4 各组大鼠的血清炎症指标水平比较 (x̄±s, pg/mL)

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
对照组	123.01±12.10	32.39±2.94	72.70±6.59
DR 组	478.25±51.95 ^a	367.27±27.56 ^a	253.67±23.80 ^a
DR+LIR 组	229.98±19.13 ^c	129.90±13.02 ^c	156.92±10.55 ^c
DR+BMSCs 组	219.70±20.65 ^c	154.13±9.59 ^c	160.17±8.77 ^c
DR+NSCs 组	220.64±18.43 ^c	130.64±9.04 ^c	148.58±10.37 ^c
DR+BMSCs+LIR 组	186.00±18.83 ^c	112.51±7.94 ^c	115.77±10.34 ^c
DR+NSCs+LIR 组	163.13±15.91 ^{c,g,i}	94.40±10.48 ^{c,g,i}	107.92±7.90 ^{c,g,i}
<i>F</i>	202.726	601.422	213.310
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注: ^a $P<0.05$ vs 对照组; ^c $P<0.05$ vs DR 组; ^e $P<0.05$ vs DR+BMSCs 组; ^g $P<0.05$ vs DR+NSCs 组; ⁱ $P<0.05$ vs DR+BMSCs+LIR 组。

表5 各组大鼠视网膜组织神经节细胞层厚度比较

组别	视网膜神经节细胞层厚度 (x̄±s, μm)
对照组	7.00±0.82
DR 组	11.60±1.26 ^a
DR+LIR 组	9.50±1.35 ^c
DR+BMSCs 组	9.70±0.82 ^c
DR+NSCs 组	9.30±0.95 ^c
DR+BMSCs+LIR 组	8.50±0.71 ^c
DR+NSCs+LIR 组	7.50±0.85 ^{c,g,i}
<i>F</i>	23.821
<i>P</i>	<0.001

注: ^a $P<0.05$ vs 对照组; ^c $P<0.05$ vs DR 组; ^e $P<0.05$ vs DR+BMSCs 组; ^g $P<0.05$ vs DR+NSCs 组; ⁱ $P<0.05$ vs DR+BMSCs+LIR 组。

2.5 各组大鼠视网膜组织 TUNEL 染色 与对照组比较, DR 组大鼠视网膜组织 TUNEL 阳性率升高 ($P<0.05$)。与 DR 组比较, DR+LIR 组、DR+BMSCs 组和 DR+NSCs 组大鼠视网膜组织 TUNEL 阳性率降低 (均 $P<0.05$)。DR+BMSCs+LIR 组视网膜组织 TUNEL 阳性率低于 DR+BMSCs 组, DR+NSCs+LIR 组大鼠视网膜组织 TUNEL 阳性率低于 DR+NSCs 组 (均 $P<0.05$)。与 DR+BMSCs+LIR 组比较, DR+NSCs+LIR 组的视网膜组织 TUNEL 阳性率降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图2, 表6。

表6 各组大鼠视网膜组织 TUNEL 阳性率比较

组别	TUNEL 阳性率 (x̄±s, %)
对照组	3.02±0.19
DR 组	22.62±2.63 ^a
DR+LIR 组	10.56±0.97 ^c
DR+BMSCs 组	11.75±0.93 ^c
DR+NSCs 组	10.69±1.16 ^c
DR+BMSCs+LIR 组	7.91±0.46 ^c
DR+NSCs+LIR 组	5.82±0.66 ^{c,g,i}
<i>F</i>	251.491
<i>P</i>	<0.001

注: ^a $P<0.05$ vs 对照组; ^c $P<0.05$ vs DR 组; ^e $P<0.05$ vs DR+BMSCs 组; ^g $P<0.05$ vs DR+NSCs 组; ⁱ $P<0.05$ vs DR+BMSCs+LIR 组。

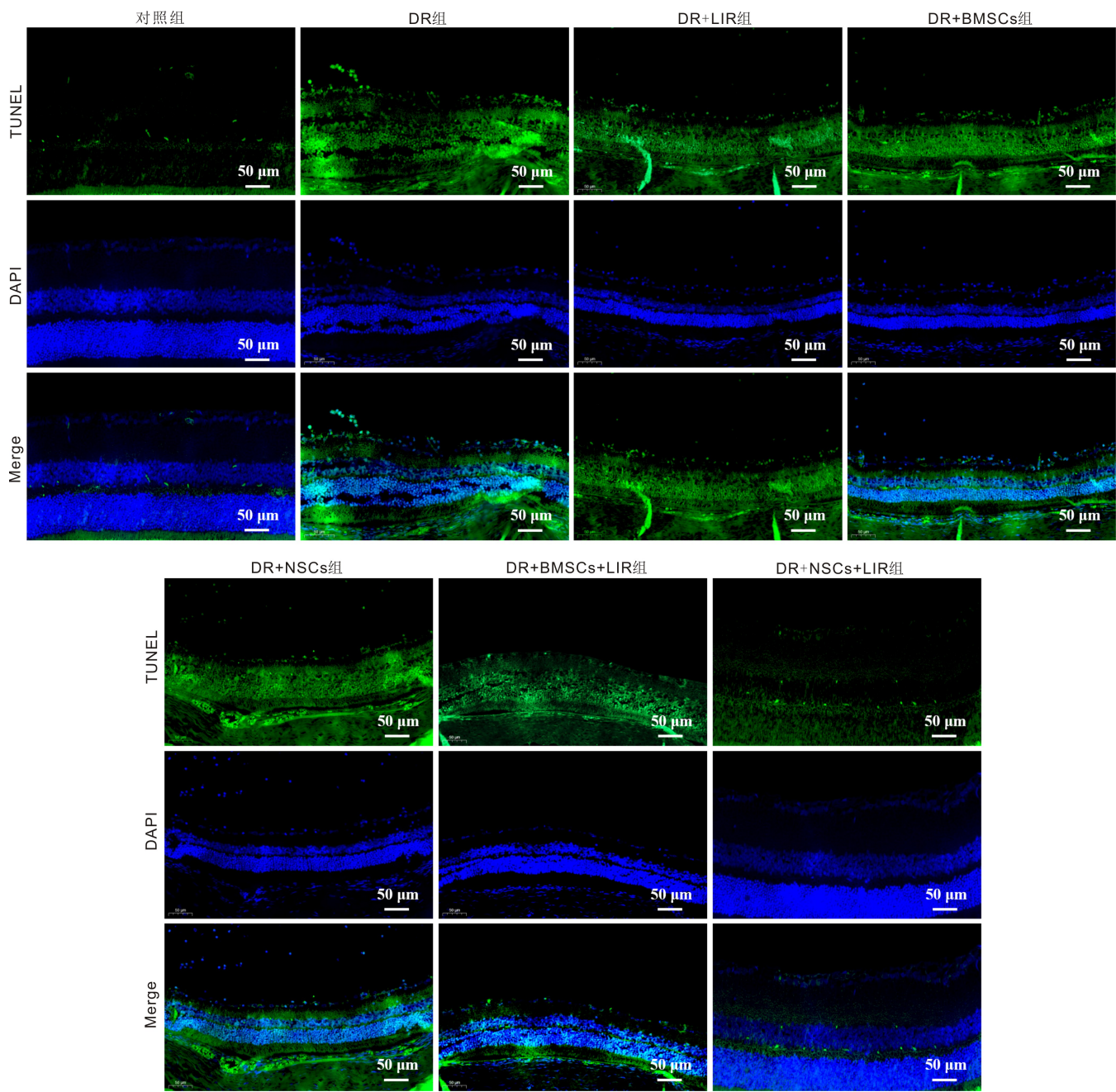


图2 各组大鼠的视网膜组织 TUNEL 染色结果。

2.6 各组大鼠视网膜组织 cZNF532 及 miR-29a-3p 和 SIRT1 的表达比较 与对照组比较,DR 组大鼠视网膜组织中 cZNF532 和 miR-29a-3p 相对表达水平均升高 ($P<0.05$),SIRT1 的 mRNA、蛋白相对表达水平以及平均光密度均降低 ($P<0.05$)。与 DR 组比较,DR+LIR 组大鼠视网膜组织的 cZNF532 和 miR-29a-3p 表达水平差异无统计学意义 (均 $P>0.05$),而 SIRT1 的 mRNA、蛋白相对表达水平以及平均光密度均升高 (均 $P<0.05$);与 DR 组比较,DR+BMSCs 组和 DR+NSCs 组大鼠视网膜组织 cZNF532 以及 SIRT1 的 mRNA、蛋白相对表达水平以及平均光密度升高,miR-29a-3p 相对表达水平降低,差异有统计学意义 (均 $P<0.05$)。DR+BMSCs+LIR 组大鼠视网膜组织中 cZNF532 以及 SIRT1 的 mRNA、蛋白相对表达水平以及平均光密度高于 DR+BMSCs 组,miR-29a-3p 相对表达水平低于 DR+BMSCs 组,差异有统计学意义 (均 $P<0.05$),DR+NSCs+LIR 组大鼠视网膜组织中 cZNF532 以及 SIRT1 的

mRNA、蛋白相对表达水平以及平均光密度高于 DR+NSCs 组,miR-29a-3p 相对表达水平低于 DR+NSCs 组,差异有统计学意义 (均 $P<0.05$)。与 DR+BMSCs+LIR 组比较,DR+NSCs+LIR 组大鼠视网膜组织中 cZNF532 以及 SIRT1 的 mRNA、蛋白相对表达水平以及平均光密度均升高,miR-29a-3p 相对表达水平均降低 ($P<0.05$)。免疫组化染色显示,SIRT1 在视网膜各层均有表达,但在视网膜神经节细胞层高表达,见表 7,图 3、4。

2.7 各组大鼠视网膜组织 TGF-β/SMAD 信号通路的活化情况比较 与对照组比较,DR 组大鼠视网膜组织 TGF-β1 的 mRNA 和蛋白相对表达水平、p-SMAD2/3 蛋白相对表达量均升高 ($P<0.05$),SMAD2/3 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 DR 组比较,DR+LIR 组、DR+BMSCs 组和 DR+NSCs 组大鼠视网膜组织 TGF-β1 的 mRNA 和蛋白相对表达量、p-SMAD2/3 蛋白相对表达均降低,差异有统计学意义 (均 $P<0.05$)。与 DR+BMSCs 组或 DR+NSCs

组比较,DR+BMSCs+LIR 组和 DR+NSCs+LIR 组大鼠视网膜组织 TGF-β1 的 mRNA 和蛋白相对表达量、p-SMAD2/3蛋白相对表达均降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 DR+BMSCs+LIR 组比较,DR+NSCs+LIR 组大鼠视网膜组织 TGF-β1 的 mRNA 和蛋白相对表达量、p-SMAD2/3蛋白相对表达均降低($P<0.05$),见表 8,图 3。

2.8 各组大鼠视网膜组织 Keap1/NRF2 信号通路的活化情况比较 与对照组比较,DR 组大鼠视网膜组织 NRF2 的 mRNA 和蛋白相对表达量均降低 ($P<0.05$),Keap1 的 mRNA 和蛋白相对表达量均升高($P<0.05$)。与 DR 组比较,DR+LIR 组、DR+BMSCs 组和 DR+NSCs 组大鼠视网膜组织 NRF2 的 mRNA 和蛋白相对表达量均升高,Keap1 的

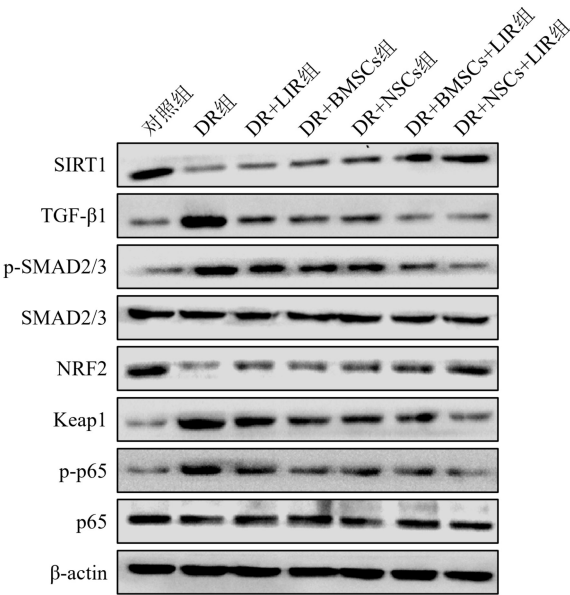


图 3 各组大鼠视网膜组织相关蛋白 Western blot 检测结果。

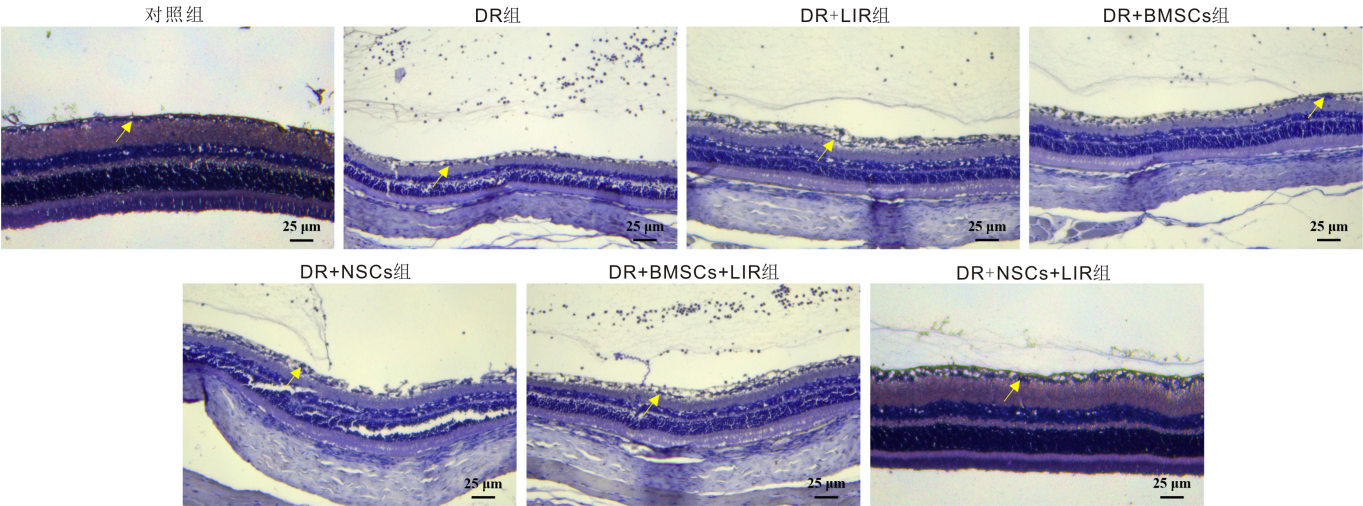


图 4 各组大鼠视网膜组织中 SIRT1 免疫组织化学染色结果 图中黄色箭头表示阳性染色细胞。

表 7 各组大鼠视网膜组织中 cZNF532 及 miR-29a-3 和 SIRT1 相对表达水平比较					$\bar{x}\pm s$
组别	cZNF532	miR-29a-3p	SIRT1 mRNA	SIRT1 蛋白	SIRT1 平均光密度
对照组	1.00±0.05	1.00±0.05	1.00±0.04	1.00±0.04	0.66±0.04
DR 组	2.07±0.23 ^a	2.33±0.15 ^a	0.29±0.02 ^a	0.30±0.01 ^a	0.22±0.01 ^a
DR+LIR 组	2.04±0.21	2.28±0.22	0.58±0.05 ^c	0.57±0.06 ^c	0.31±0.03 ^c
DR+BMSCs 组	2.49±0.14 ^e	1.53±0.11 ^e	0.60±0.08 ^e	0.57±0.05 ^e	0.31±0.03 ^e
DR+NSCs 组	2.90±0.20 ^e	1.38±0.08 ^e	0.68±0.03 ^e	0.68±0.07 ^e	0.34±0.03 ^e
DR+BMSCs+LIR 组	3.39±0.22 ^e	1.22±0.14 ^e	0.78±0.05 ^e	0.85±0.05 ^e	0.38±0.04 ^e
DR+NSCs+LIR 组	3.69±0.29 ^{e,g,i}	1.02±0.08 ^{e,g,i}	1.08±0.10 ^{e,g,i}	0.92±0.07 ^{e,g,i}	0.52±0.05 ^{e,g,i}
<i>F</i>	200.179	192.958	206.398	206.172	180.870
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: ^a $P<0.05$ vs 对照组; ^c $P<0.05$ vs DR 组; ^e $P<0.05$ vs DR+BMSCs 组; ^g $P<0.05$ vs DR+NSCs 组; ⁱ $P<0.05$ vs DR+BMSCs+LIR 组。

表 8 各组大鼠视网膜组织 TGF-β/SMAD 信号通路 mRNA 及蛋白相对表达水平					$\bar{x} \pm s$
组别	TGF-β1 mRNA	TGF-β1 蛋白	SMAD2/3 蛋白	p-SMAD2/3 蛋白	
对照组	1.00±0.05	1.00±0.05	1.00±0.05	1.00±0.06	
DR 组	3.73±0.49 ^a	3.39±0.36 ^a	0.99±0.03	3.86±0.32 ^a	
DR+LIR 组	1.65±0.13 ^c	1.64±0.16 ^c	0.99±0.05	1.99±0.13 ^c	
DR+BMSCs 组	1.71±0.09 ^c	1.61±0.10 ^c	1.02±0.05	2.03±0.14 ^c	
DR+NSCs 组	1.67±0.12 ^c	1.64±0.08 ^c	1.00±0.04	1.93±0.14 ^c	
DR+BMSCs+LIR 组	1.22±0.14 ^e	1.20±0.07 ^e	0.98±0.07	1.43±0.12 ^e	
DR+NSCs+LIR 组	1.10±0.09 ^{c,g,i}	1.11±0.11 ^{c,g,i}	0.99±0.05	1.24±0.12 ^{c,g,i}	
<i>F</i>	194.437	241.044	0.565	324.299	
<i>P</i>	<0.001	<0.001	0.757	<0.001	

注:^a*P*<0.05 *vs* 对照组;^c*P*<0.05 *vs* DR 组;^e*P*<0.05 *vs* DR+BMSCs 组;^g*P*<0.05 *vs* DR+NSCs 组;ⁱ*P*<0.05 *vs* DR+BMSCs+LIR 组。

表 9 各组大鼠视网膜组织 NRF2 和 Keap1 的 mRNA 及蛋白相对表达水平					$\bar{x} \pm s$
组别	NRF2 mRNA	NRF2 蛋白	Keap1 mRNA	Keap1 蛋白	
对照组	1.00±0.05	1.00±0.04	1.00±0.06	1.00±0.06	
DR 组	0.26±0.02 ^a	0.26±0.02 ^a	2.84±0.20 ^a	3.18±0.35 ^a	
DR+LIR 组	0.40±0.02 ^c	0.67±0.05 ^c	1.89±0.08 ^c	1.70±0.18 ^c	
DR+BMSCs 组	0.46±0.02 ^c	0.71±0.04 ^c	1.81±0.18 ^c	1.44±0.08 ^c	
DR+NSCs 组	0.53±0.03 ^c	0.73±0.04 ^c	1.74±0.17 ^c	1.46±0.19 ^c	
DR+BMSCs+LIR 组	0.72±0.08 ^e	0.83±0.06 ^e	1.39±0.09 ^e	1.31±0.08 ^e	
DR+NSCs+LIR 组	0.89±0.06 ^{c,g,i}	0.93±0.12 ^{c,g,i}	1.26±0.10 ^{c,g,i}	0.99±0.04 ^{c,g,i}	
<i>F</i>	302.719	164.998	192.237	187.402	
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

注:^a*P*<0.05 *vs* 对照组;^c*P*<0.05 *vs* DR 组;^e*P*<0.05 *vs* DR+BMSCs 组;^g*P*<0.05 *vs* DR+NSCs 组;ⁱ*P*<0.05 *vs* DR+BMSCs+LIR 组。

mRNA 和蛋白相对表达量降低(均 *P*<0.05)。DR + BMSCs+LIR 组相较 DR+BMSCs 组、DR+NSCs+LIR 组相较 DR+NSCs 组 NRF2 的 mRNA 和蛋白相对表达量升高, Keap1 的 mRNA 和蛋白相对表达量降低,差异有统计学意义(均 *P*<0.05)。与 DR+BMSCs+LIR 组比较,DR+NSCs+LIR 组大鼠视网膜组织 NRF2 的 mRNA 和蛋白相对表达量升高,Keap1 的 mRNA 和蛋白相对表达量降低(均 *P*<0.05),见表 9,图 3。

2.9 各组大鼠视网膜组织 NF-κB 的活化情况对比 本研究通过检测 NF-κB 亚基 p65 的磷酸化水平来反映其活化情况。各组大鼠视网膜组织中 p65 蛋白相对表达水平差异无统计学意义(*P*>0.05)。与对照组比较,DR 组大鼠视网膜组织中 p-p65 蛋白相对表达水平升高(*P*<0.05)。与 DR 组比较,DR+LIR 组、DR+BMSCs 组和 DR+NSCs 组大鼠视网膜组织中 p-p65 蛋白相对表达水平均降低(*P*<0.05)。DR+BMSCs+LIR 组 p-p65 表达低于 DR+BMSCs 组,DR+NSCs+LIR 组 p-p65 表达低于 DR+NSCs 组,差异有统计学意义(均 *P*<0.05)。与 DR+BMSCs+LIR 组比较,DR+NSCs+LIR 组大鼠视网膜组织中 p-p65 蛋白相对表达水平降低,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 10,图 3。

2.10 各组大鼠视网膜组织 BDNF mRNA 和蛋白表达情况比较 与对照组比较,DR 组大鼠视网膜组织中 BDNF mRNA 相对表达量和相对荧光强度均降低(均 *P*<0.05)。与 DR 组比较,DR+LIR 组、DR+BMSCs 组和 DR+NSCs 组大鼠视网膜组织中 BDNF mRNA 相对表达量和相对荧光强度升高(均 *P*<0.05)。DR+BMSCs+LIR 组大鼠视网膜组织中 BDNF mRNA 相对表达量和相对荧光强度高于 DR+BMSCs 组,DR + NSCs + LIR 组大鼠视网膜组织中 BDNF

表 10 各组大鼠的视网膜组织 p65 和 p-p65 的蛋白相对表达水平对比

组别	p65 蛋白	p-p65 蛋白
对照组	1.00±0.05	1.00±0.03
DR 组	1.02±0.03	3.94±0.53 ^a
DR+LIR 组	1.01±0.05	2.03±0.24 ^c
DR+BMSCs 组	0.99±0.04	2.24±0.19 ^c
DR+NSCs 组	0.98±0.04	2.11±0.21 ^c
DR+BMSCs+LIR 组	1.01±0.03	1.59±0.11 ^e
DR+NSCs+LIR 组	1.02±0.03	1.38±0.14 ^{c,g,i}
<i>F</i>	1.377	141.846
<i>P</i>	0.238	<0.001

注:^a*P*<0.05 *vs* 对照组;^c*P*<0.05 *vs* DR 组;^e*P*<0.05 *vs* DR+BMSCs 组;^g*P*<0.05 *vs* DR+NSCs 组;ⁱ*P*<0.05 *vs* DR+BMSCs+LIR 组。

mRNA 相对表达量和相对荧光强度高于 DR+NSCs 组(均 *P*<0.05)。与 DR+BMSCs+LIR 组比较,DR+NSCs+LIR 组大鼠视网膜组织中 BDNF mRNA 相对表达量和相对荧光强度升高,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 11,图 5。

3 讨论

利拉鲁肽是一种长效的 GLP-1 类似物,现已用于 DM 的临床治疗,然而,其在治疗 DR 患者方面并不理想^[12]。NSCs 通过增加存活的视网膜神经节细胞(RGCs)的数量和减缓 DR 的进展而显示出神经保护作用^[13]。BMSCs 具有广泛分化特性、取材方便、取自于自体等优势,使用 BMSCs 诱导转化的 NSCs 可能在治疗 DR 方面具有较好的应用前景。目前,已有学者研究表明通过使用特殊诱导物

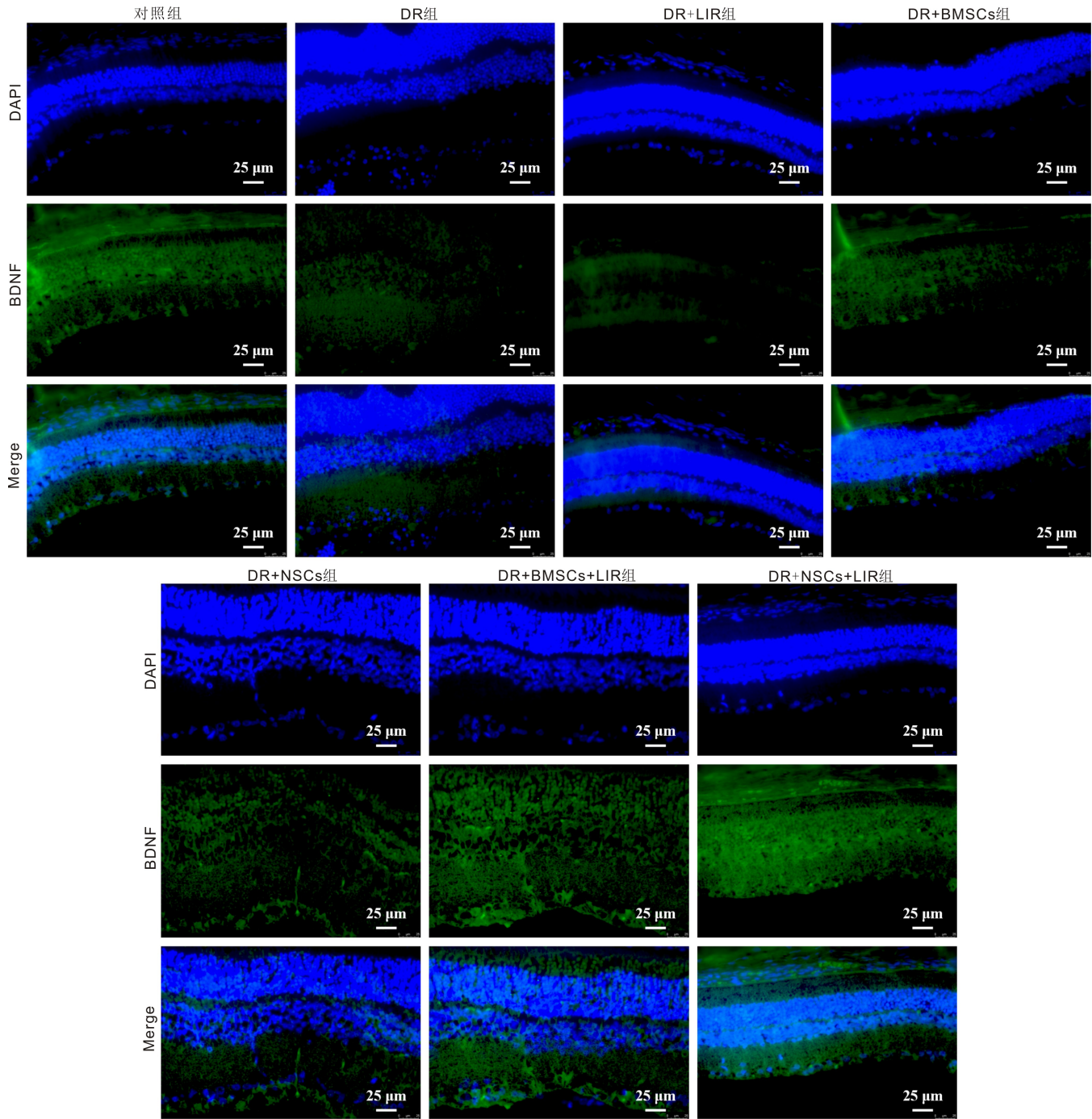


图5 各组大鼠视网膜组织 BDNF 免疫荧光染色结果。

表 11 各组大鼠视网膜组织 BDNF 表达比较 $\bar{x} \pm s$		
组别	BDNF mRNA	BDNF 相对荧光强度
对照组	1.00±0.05	1.00±0.06
DR 组	0.32±0.04 ^a	0.47±0.03 ^a
DR+LIR 组	0.47±0.03 ^c	0.58±0.05 ^c
DR+BMSCs 组	0.71±0.04 ^c	0.84±0.07 ^c
DR+NSCs 组	0.97±0.07 ^c	1.05±0.07 ^c
DR+BMSCs+LIR 组	0.96±0.05 ^c	1.01±0.06 ^c
DR+NSCs+LIR 组	1.11±0.12 ^{c,g,i}	1.17±0.07 ^{c,g,i}
<i>F</i>	238.451	186.473
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:^a*P*<0.05 vs 对照组;^c*P*<0.05 vs DR 组;^e*P*<0.05 vs DR+BMSCs 组;^g*P*<0.05 vs DR+NSCs 组;ⁱ*P*<0.05 vs DR+BMSCs+LIR 组。

(如 EGF 或 bGF)体外诱导 BMSCs 可使其转化为 NSCs 并表达 Nestin 和 NeuroD1 等神经干细胞标志物^[14-15]。在前期研究中本课题组已成功将 BMSCs 诱导转化为 NSCs。本研究考察了利拉鲁肽、BMSCs 和 NSCs 单独或联合用药对 DR 大鼠的治疗效果。本研究中,利拉鲁肽、BMSCs 或 NSCs 单独处理均可降低 DR 大鼠 FBG 水平并升高血清胰岛素水平,利拉鲁肽联合 NSCs 治疗可以最大程度的降低 DR 大鼠 FBG 水平,升高血清胰岛素水平,并减少视网膜组织损伤和细胞凋亡,这些结果提示利拉鲁肽联合 NSCs 在治疗 DR 方面比单独用药效果更好。陈频等^[16]研究证实,利拉鲁肽在体外具有促进人 BMSCs 诱导分化为胰岛素分泌细胞的功能,该团队进一步研究表明,利拉鲁肽联合 BMSCs 比两者单独治疗能够更好地改善 DM 大鼠的糖代谢^[17],与本研究利拉鲁肽与干细胞的协同作用结果

一致。本研究推测利拉鲁肽与 BMSCs 或 NSCs 的联合使用在治疗 DR 方面也具有协同促进的作用。利拉鲁肽可直接作用于胰岛 β 细胞促进胰岛素分泌、抑制胰高血糖素释放^[18];而 NSCs 可改善胰岛微循环并保护胰岛 β 细胞功能^[19]。Sharma 等^[20]认为,NSCs 具有分化为胰岛 β 细胞的潜能,用自体移植产生胰岛素的 NSCs 替代丢失的胰岛 β 细胞可能是治疗糖尿病的潜在策略。因此,利拉鲁肽与 NSCs 可能从不同靶点调控糖代谢,实现了血糖的控制和病情的缓解。

目前,circRNAs-miRNAs-mRNAs 网络是 DR 发病机制研究的热点领域,多项研究证实靶向 circRNAs-miRNAs-mRNAs 网络的治疗措施在 DR 治疗中效果显著^[21-23]。本研究表明,单独利拉鲁肽对 cZNF532 和 miR-29a-3p 的表达无显著影响,但可上调 SIRT1 的表达;而 BMSCs 或 NSCs 单独治疗可同时上调 cZNF532 和 SIRT1 的表达,下调 miR-29a-3p 的表达,利拉鲁肽联合 NSCs 最大程度增强上述效应。Jiang 等^[24]研究显示,circ_0047814(cZNF532)在高糖刺激的人视网膜周细胞、糖尿病小鼠模型的视网膜血管和糖尿病患者的玻璃体中表达上调,支持本研究结果。Jiang 等^[24]报道,cZNF532 的过表达通过内源性竞争结合 miR-29-3p 从而解除 miR-29-3p 对下游靶基因的抑制作用,无论是 cZNF532 的过表达还是 miR-29-3p 的下调均可减缓 DM 引起的视网膜周细胞变性和血管功能障碍^[24],与本研究的核心机制一致。本研究中 DR 模型组与药物干预组均出现 cZNF532 表达上调,但二者的诱发机制与生物学意义存在差异。本研究推测,DR 状态下的升高是高糖损伤诱导的内源性应激代偿作用,持续高糖造成视网膜周细胞变性、神经细胞氧化损伤与炎症浸润,受损细胞启动自我保护应答,通过上调 cZNF532 转录拮抗 miR-29a-3p 的促损伤效应,但该代偿作用有限,无法抵消高糖持续损伤,难以阻滞 DR 进展。给药后的升高是外源性干预介导的主动保护性上调;干细胞可能通过分泌外泌体或其他机制促进 cZNF532 的转录,同时利拉鲁肽与干细胞的协同作用可激活细胞内保护性信号通路,进一步促进 cZNF532 转录合成,该上调幅度更显著,可有效抑制 miR-29a-3p 活性并上调下游 SIRT1 表达,最终实现视网膜损伤修复。另外,本研究在预实验中通过 TargetScan 在线预测分析发现 SIRT1 是 miR-29a-3p 潜在的靶基因。Karbasforooshan 等^[25]报道 SIRT1 是 DR 治疗的关键靶点,其表达下调与 DR 的进展密切相关,支持本研究结果。本研究首次发现利拉鲁肽与 NSCs 在调控 cZNF532-miR-29a-3p-SIRT1 网络中具有协同作用。其机制可能为: NSCs 通过分泌外泌体将 cZNF532 传递至视网膜细胞,从而抑制 miR-29a-3p 的活性,解除其对下游靶基因 SIRT1 的转录抑制;而利拉鲁肽通过激活 GLP-1 受体/AMPK 通路上调 SIRT1 的蛋白表达^[26],二者共同作用使 SIRT1 的表达水平显著升高。

氧化应激和炎症是 DR 的主要病理现象,高糖环境会增加视网膜中的活性氧(ROS)生成,引发氧化应激,而 ROS 会增加炎症介质的生成,炎症介质也会进一步促进 ROS 的产生^[27]。本研究结果表明,利拉鲁肽联合 NSCs 治疗可以最大程度的抑制 DR 大鼠外周炎症和视网膜氧化应激。进一步研究证实,利拉鲁肽联合 NSCs 进一步抑制了 TGF- β /SMAD 和 NF- κ B 信号通路的活化,并激活了 Keap1/NRF2 信号通路。NF- κ B 通路是经典炎症通路,而

Keap1/NRF2 通路是主要抗氧化通路,因此利拉鲁肽联合 NSCs 的抗炎和抗氧化作用与该两条通路密切相关。值得注意的是,本研究发现,各组大鼠视网膜组织中 p65 蛋白的基础表达水平无显著统计学差异,而 p-p65 的表达水平存在显著组间差异,这一结果提示 NF- κ B 信号通路的活化并非依赖于 p65 蛋白的合成增加,而是通过 p65 的磷酸化修饰实现其功能激活。另外,SIRT1 是调控 TGF- β /SMAD、NF- κ B 和 Keap1/NRF2 信号通路的上游调控基因,其在 DR 及其他疾病中通过调控这三条通路参与疾病进展,Xia 等^[28]报道 SIRT1 激活通过抑制 TGF- β /SMAD 信号通路改善恒河猴肝纤维化;Chen 等^[29]发现 SIRT1 可通过抑制 NF- κ B 通路减轻 DR 炎症,Pu 等^[30]报道 SIRT1 可激活 Nrf2 通路改善氧化应激,均支持本研究结果。结合上文结果推测,利拉鲁肽联合 NSCs 可能通过调控 cZNF532-miR-29a-3p-SIRT1 网络及其下游 TGF- β /SMAD、NF- κ B 和 Keap1/NRF2 信号通路抑制视网膜炎症和氧化应激,缓解视网膜损伤。

BDNF 是一种重要的神经营养因子,可促进神经元的存活、分化和突触形成,在视网膜神经保护中发挥着关键作用。本研究表明,利拉鲁肽联合 NSCs 最大程度上调了 DR 大鼠视网膜组织 BDNF 的表达水平。Zhang 等^[13]发现 NSCs 移植可分泌 BDNF 促进神经损伤修复,与本研究中 DR+NSCs 组 BDNF 表达升高的结果一致;Magdy 等^[31]报道利拉鲁肽可通过上调 BDNF 的表达改善高脂饮食肥胖大鼠模型中的抑郁和认知缺陷,支持本研究中联合治疗进一步升高 BDNF 的结果。NSCs 可能通过多种机制促进多视网膜损伤修复:(1) NSCs 移植后迁移至损伤区域,分化为神经元、星形胶质细胞及少突胶质细胞,直接补充丢失的视网膜神经细胞(如神经节细胞),重建神经网络结构^[32];(2) NSCs 能分泌多种生长因子和神经营养因子,如 bFGF、神经生长因子和 BDNF 等,这些因子可能将局部不利微环境改变为促进再生的环境^[33-35]。本研究推测 NSCs 促进视网膜损伤修复的机制与其多向分化潜能和分泌的生长因子和神经营养因子有关,这些因素导致其对 DR 的治疗效果较 BMSCs 更佳。总之,本研究表明利拉鲁肽与 NSCs 治疗 DR 时可能具有协同作用,可最大程度的发挥两种药物的药效。

本研究的创新点主要体现在以下两个方面:(1)将临床常用降糖药利拉鲁肽与 BMSCs 诱导的 NSCs 联合应用于 DR 治疗,证实了二者在糖代谢调控、视网膜神经保护、炎症抑制和抗氧化应激方面的协同作用,为 DR 提供了一种全新的多靶点联合治疗方案;(2)揭示了 cZNF532-miR-29a-3p-SIRT1 调控网络在利拉鲁肽联合 NSCs 治疗 DR 中的核心作用,并系统验证了其下游 TGF- β /SMAD、NF- κ B 和 Keap1/NRF2 三条信号通路的介导机制。

本研究具有重要的临床应用价值:(1)该联合疗法可从糖代谢调控、神经组织修复、氧化应激抑制、炎症反应阻断、血管异常调控等多个病理环节干预 DR 进展,更符合 DR 多因素、多环节的发病特点;(2) NSCs 可实现视网膜神经组织的修复与保护,弥补了抗 VEGF 疗法仅关注血管、忽视神经损伤的缺陷;(3)利拉鲁肽采用腹腔注射,NSCs 为单次玻璃体腔注射,无需反复眼内给药,可显著降低眼内并发症的发生风险。

本研究也存在一定的局限性:(1)仅在大鼠 DR 模型中验证了联合疗法的效果与机制,尚未开展体外细胞实验

的深入验证;(2)对 cZNF532-miR-29a-3p-SIRT1 网络的调控细节尚未明确,后续可通过基因敲除、过表达等技术进一步验证该网络的核心作用;(3)本研究中 NSCs 由 BMSCs 体外诱导而来,其在视网膜内的长期存活率、分化效率及潜在的免疫反应仍需进一步研究。

综上所述,本研究表明利拉鲁肽联合 NSCs 可降低 DR 大鼠 FBG 水平,升高血清胰岛素水平,减轻视网膜损伤,抑制视网膜炎症和氧化应激。利拉鲁肽联合 NSCs 可能通过调控 cZNF532-miR-29a-3p-SIRT1 网络及其下游 TGF-β/SMAD、NF-κB 和 Keap1/NRF2 信号通路发挥对治疗效果。总之,利拉鲁肽联合 NSCs 治疗 DR 较单一疗法更有效,该联合疗法在临床治疗 DR 方面具有较高的开发价值。

利益冲突声明:本文不存在利益冲突。

作者贡献声明:赵吉飞论文选题与修改,初稿撰写;侯力华、刘甜、王莉、杨佩瑶协助文献检索,动物实验和数据收集;秦扬数据统计学分析和核验;陈宁宁选题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

[1] 魏凡, 彭立, 谢青. 糖尿病早期视网膜神经变性研究新进展. 国际眼科杂志, 2025,25(1):76-81.

[2] Arrigo A, Aragona E, Bandello F. VEGF-targeting drugs for the treatment of retinal neovascularization in diabetic retinopathy. *Ann Med*, 2022,54(1):1089-1111.

[3] Aras C, Senturk F, Erdur SK, et al. Preoperative co-application of bevacizumab and tissue plasminogen activator in vitrectomy for proliferative diabetic retinopathy. *Arq Bras Oftalmol*, 2024, 87(2):e20230001.

[4] Barak M, Fedorova V, Pospisilova V, et al. Human iPSC-derived neural models for studying Alzheimer's disease: from neural stem cells to cerebral organoids. *Stem Cell Rev Rep*, 2022,18(2):792-820.

[5] Chen XK, Jiang SZ, Wang RZ, et al. Neural stem cells in the treatment of Alzheimer's disease: current status, challenges, and future prospects. *J Alzheimers Dis*, 2023,94(s1):S173-S186.

[6] Han D, Xu W, Jeong HW, et al. Multipotent neural stem cells originating from neuroepithelium exist outside the mouse central nervous system. *Nat Cell Biol*, 2025,27(4):605-618.

[7] Huang K, Fang J, Sun WM, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells modulate miR-202-3p to suppress neuronal apoptosis following spinal cord injury through autophagy activation *via* the AMPK, MAPK, and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Sci Rep*, 2024,14(1):30099.

[8] Zou XF, Zhang BZ, Qian WW, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells in treatment of peripheral nerve injury. *World J Stem Cells*, 2024,16(8):799-810.

[9] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 2000,61(4):364-370.

[10] Hermann A, Gastl R, Liebau S, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci*, 2004,117(Pt 19):4411-4422.

[11] 石静丽, 阚红卫, 王海青, 等. 2 型糖尿病大鼠视网膜病变模型的建立及羟苯磺酸钙的干预作用. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23):180-183.

[12] Mahzari MM, Alanazy AM, Feroz Z, et al. Retinopathy risk factors in patients with type 2 diabetes on liraglutide. *Medicine*, 2024,103(29):e39026.

[13] Zhang W, Wang YX, Kong JH, et al. Therapeutic efficacy of neural stem cells originating from umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in diabetic retinopathy. *Sci Rep*, 2017,7(1):408.

[14] Kabos P, Ehtesham M, Kabosova A, et al. Generation of neural

progenitor cells from whole adult bone marrow. *Exp Neurol*, 2002, 178(2):288-293.

[15] Zhang L, Zhang HT, Hong SQ, et al. Cografted Wharton's jelly cells-derived neurospheres and BDNF promote functional recovery after rat spinal cord transection. *Neurochem Res*, 2009,34(11):2030-2039.

[16] 陈频, 张芳芳, 王惠玲, 等. 利拉鲁肽在人骨髓间充质干细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞中的作用. 中华内分泌代谢杂志, 2012, 28(5):414-418.

[17] 陈频, 邵珠林, 徐向进, 等. 利拉鲁肽联合骨髓间充质干细胞介导胃肠激素对链脲佐菌素诱导的 1 型糖尿病大鼠模型糖代谢的影响. 中华内分泌代谢杂志, 2015,31(3):277-281.

[18] 刘素荣, 张金艳, 杨旭, 等. 津力达颗粒联合德谷胰岛素利拉鲁肽注射液治疗血糖控制不佳 2 型糖尿病的临床疗效. 中国现代医学杂志, 2024,34(15):65-70.

[19] Olerud J, Kanaykina N, Vasylovska S, et al. Neural crest stem cells increase beta cell proliferation and improve islet function in co-transplanted murine pancreatic islets. *Diabetologia*, 2009, 52(12):2594-2601.

[20] Sharma K, Puranik N, Yadav D. Neural stem cell-based regenerative therapy: a new approach to diabetes treatment. *EndocrMetab Immune Disord Drug Targets*, 2024,24(5):531-540.

[21] Lu L, Ning Y, Gu F, et al. The circular RNA circSLC16A10 alleviates diabetic retinopathy by improving mitochondrial function *via* the miR-761-5p/MFN2 axis. *Cell Signal*, 2024,121:111283.

[22] Xiao J, Xu ZP. Roles of noncoding RNAs in diabetic retinopathy: Mechanisms and therapeutic implications. *Life Sci*, 2024,357:123092.

[23] Zuo Z, Li N, Zhang Q, et al. The role of non-coding RNAs in diabetic retinopathy: mechanistic insights and therapeutic potential. *Mol Neurobiol*, 2025,62(8):9829-9860.

[24] Jiang Q, Liu C, Li CP, et al. Circular RNA-ZNF532 regulates diabetes-induced retinal pericyte degeneration and vascular dysfunction. *J Clin Invest*, 2020,130(7):3833-3847.

[25] Karbasforooshan H, Karimi G. The role of SIRT1 in diabetic retinopathy. *Biomed Pharmacother*, 2018,97:190-194.

[26] Ammar RA, Mohamed AF, Kamal MM, et al. Neuroprotective effect of liraglutide in an experimental mouse model of multiple sclerosis: role of AMPK/SIRT1 signaling and NLRP3 inflammasome. *Inflammopharmacology*, 2022,30(3):919-934.

[27] Kowluru RA. Cross talks between oxidative stress, inflammation and epigenetics in diabetic retinopathy. *Cells*, 2023,12(2):300.

[28] Xia Y, Luo QH, Gao Q, et al. SIRT1 activation ameliorates Rhesus monkey liver fibrosis by inhibiting the TGF-β/smad signaling pathway. *Chem Biol Interact*, 2024,394:110979.

[29] Chen N, Jiang K, Yan GG. Effect of fenofibrate on diabetic retinopathy in rats *via* SIRT1/NF-κB signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019,23(19):8630-8636.

[30] Pu Q, Guo XX, Hu JJ, et al. Nicotinamide mononucleotide increases cell viability and restores tight junctions in high-glucose-treated human corneal epithelial cells *via* the SIRT1/Nrf2/HO-1 pathway. *Biomed Pharmacother*, 2022,147:112659.

[31] Magdy YM, Kamar SA, Habib MZ, et al. Liraglutide improves depressive and cognitive deficits in a high-fat diet rat model of obesity: the role of hippocampal autophagy and the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Psychopharmacology*, 2025,242(12):2801-2816.

[32] Mead B, Berry M, Logan A, et al. Stem cell treatment of degenerative eye disease. *Stem Cell Res*, 2015,14(3):243-257.

[33] De Gioia R, Biella F, Citterio G, et al. Neural stem cell transplantation for neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9):3103.

[34] Marsh SE, Blurton-Jones M. Neural stem cell therapy for neurodegenerative disorders: The role of neurotrophic support. *Neurochem Int*, 2017,106:94-100.

[35] Ye QS, Wu YQ, Wu JM, et al. Neural stem cells expressing bFGF reduce brain damage and restore sensorimotor function after neonatal hypoxia-ischemia. *Cell Physiol Biochem*, 2018,45(1):108-118.