

基于转录组学探讨和血明目片改善斑马鱼糖尿病视网膜病变的作用机制

赵 朵^{1, 2}, 朱紫潞^{1, 2}, 段 鹏^{1, 2}, 黄娇龙^{1, 2}, 朱美娟^{1, 2}, 张 敏^{2, 3}

引用: 赵朵, 朱紫潞, 段鹏, 等. 基于转录组学探讨和血明目片改善斑马鱼糖尿病视网膜病变的作用机制. 国际眼科杂志, 2025, 25(7):1046–1055.

基金项目: 湖北省自然科学基金青年项目 (No. 2023AFB495, 2025AFB527); 襄阳市科技局指导项目 (No. 2022YL48A)
作者单位: ¹(441000) 中国湖北省襄阳市, 湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院 人类疾病斑马鱼模型新药筛选襄阳市重点实验室; ²(442000) 中国湖北省十堰市, 湖北医药学院; ³(441000) 中国湖北省襄阳市中西医结合医院眼科
作者简介: 赵朵, 女, 湖北医药学院在读硕士研究生, 研究方向: 糖尿病视网膜病变。
通讯作者: 朱美娟, 女, 博士, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病. zhumeij666@163.com; 张敏, 男, 教授, 院长, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病. 1025968327@qq.com
收稿日期: 2025-02-18 **修回日期:** 2025-06-03

摘要
目的: 基于转录组学探讨和血明目片改善糖尿病视网膜病变 (DR) 的作用机制。
方法: 将 3 日龄 (3 dpf) 斑马鱼幼鱼持续暴露于 130 mmol/L 葡萄糖溶液 3 d 构建 DR 模型, 随机分为对照组 (给予养殖水)、模型组 (130 mmol/L 葡萄糖)、低剂量治疗组 (130 mmol/L 葡萄糖+7.5 mg/L 和血明目片)、高剂量治疗组 (130 mmol/L 葡萄糖+75 mg/L 和血明目片), 持续干预至 6 dpf。通过体视显微镜观察斑马鱼眼睛面积、眼睛长度和体长, 采用苏木精-伊红 (HE) 染色法观察视网膜形态, 荧光显微镜下观察其视网膜血管直径, 通过 RNA 高通量测序 (RNA-seq) 技术筛选差异表达基因 (DEGs), 进一步阐释和血明目片改善斑马鱼 DR 的分子机制, 并用 qRT-PCR 检测基因的表达以验证测序结果的准确性。
结果: HE 染色显示模型组节细胞层 (GCL) 细胞排列紊乱、间隙增宽、内核层 (INL) 增厚, 和血明目片干预后 GCL 层细胞紊乱有所缓解, INL 厚度降低; 视网膜血管直径定量分析显示, 模型组斑马鱼视网膜血管直径较对照组显著增加, 和血明目片干预后显著逆转, 其中高剂量和血明目片治疗组效果更显著 ($P<0.05$); 转录组分析共鉴定出 1 470 个逆转 DEGs, 主要富集于 AMPK 信号通路、Foxo 信号通路、视网膜发育和紧密连接等过程; 相关性分析表明 qRT-PCR 结果与转录组学结果高度一致 ($R^2=0.8571, P<0.05$)。
结论: 和血明目片可能通过调控 *vsx1*、*pde6c*、*arr3a*、*plk1*、*fbp1b*、*foxo1a*、*pcna* 和 *cdk1* 等核心靶点, 并通过对相机型眼的视网膜发育、视觉感知、细胞骨架组织、紧密连接、AMPK 信号通路、Foxo 信号通路等过程的协同调控改善 DR 视网膜血管微循环障碍。

关键词: 转录组学; 和血明目片; 糖尿病视网膜病变; 斑马鱼
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2025.7.02

Exploring the mechanisms of Hexue Mingmu Tablets in improving diabetic retinopathy of zebrafish based on transcriptomics

Zhao Duo^{1,2}, Zhu Zilu^{1,2}, Duan Peng^{1,2}, Huang Jiaolong^{1,2}, Zhu Meijuan^{1,2}, Zhang Min^{2,3}

Foundation items: Hubei Provincial Natural Science Foundation Youth Project (No. 2023AFB495, 2025AFB527); Xiangyang Science and Technology Bureau Guidance Project (No. 2022YL48A)
¹Xiangyang No.1 People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine; Key Laboratory of Zebrafish Modeling and Drug Screening for Human Diseases of Xiangyang City, Xiangyang 441000, Hubei Province, China; ²Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China; ³Department of Ophthalmology, Xiangyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangyang 441000, Hubei Province, China
Correspondence to: Zhu Meijuan. Xiangyang No. 1 People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine; Key Laboratory of Zebrafish Modeling and Drug Screening for Human Diseases of Xiangyang City, Xiangyang 441000, Hubei Province, China; Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China. zhumeij666@163.com; Zhang Min. Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China; Department of Ophthalmology, Xiangyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangyang 441000, Hubei Province, China. 1025968327@qq.com
Received: 2025-02-18 Accepted: 2025-06-03

Abstract

• **AIM:** To investigate the mechanism of Hexue Mingmu Tablets (HXMMT) in improving diabetic retinopathy (DR) based on transcriptomics.
• **METHODS:** Zebrafish DR models were established by 3-day glucose induction (130 mmol/L) starting at 3 days post-fertilization (dpf). Larvae were randomized into four groups: control group (CG; aquaculture water), model group (MG; 130 mmol/L glucose), low-dose HXMMT treatment group (L-HX; 130 mmol/L glucose + 7.5 mg/L HXMMT), and high-dose HXMMT treatment group (H-HX; 130 mmol/L glucose + 75 mg/L HXMMT), with a 3-

day intervention period until 6 dpf. The area and length of eyes, and body length of zebrafish were observed by stereomicroscopy, retinal morphology was observed by hematoxylin - eosin staining (HE), and retinal vessel diameter was observed under fluorescence microscope. Differentially expressed genes (DEGs) were identified by RNA - sequencing (RNA - seq) technology to further elucidate the molecular mechanism of HXMMT in improving DR in zebrafish, and the sequencing accuracy was validated through quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

• RESULTS: HE staining demonstrated that the intervention with HXMMT significantly improved the disordered cell arrangement, widened gaps, and thickened inner nuclear layer (INL) in ganglion cell layer GCL); retinal vascular diameter quantification revealed that the retinal vessel diameter of the MG significantly increased compared with the CG, and it was significantly changed after the intervention of HXMMT, with significant efficacy in the H - HX ($P<0.05$); transcriptomics profiling identified 1 470 reversed DEGs, predominantly enriched in the AMPK signaling pathway, FoxO signaling pathway, retinal developmental processes, and tight junction regulation. Technical validation confirmed strong correlation between qRT - PCR and RNA - seq data ($R^2 = 0.8571$, $P<0.05$).

• CONCLUSION: HXMMT may improve retinal vascular microcirculation disorders in DR by regulating core targets including *vsx1*, *pde6c*, *arr3a*, *plk1*, *fbp1b*, *foxo1a*, *pcna*, and *cdk1*, as well as synergistically modulating processes such as retinal development in camera - type eyes, visual perception, microtubule cytoskeletal organization, tight junctions, and the AMPK signaling pathway, Foxo signaling pathway.

• KEYWORDS: transcriptomics; Hexue Mingmu Tablets; diabetic retinopathy; zebrafish

Citation: Zhao D, Zhu ZL, Duan P, et al. Exploring the mechanisms of Hexue Mingmu Tablets in improving diabetic retinopathy of zebrafish based on transcriptomics. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2025,25(7):1046-1055.

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见、最严重的微血管并发症之一,会导致成人视力逐渐下降甚至失明^[1]。据国际糖尿病联盟估计,到 2040 年,全球糖尿病患者人数将达到 6.42 亿,其中 34.6% 的患者有罹患 DR 的风险^[2]。临床上将 DR 根据病程分为非增殖性糖尿病视网膜病变(non - proliferative diabetic retinopathy, NPDR)和增殖型糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)。NPDR 的特征性改变是明显的微血管异常和血 - 视网膜屏障的破坏,若此期未得到有效治疗和改善则会进展至 PDR,引起新生血管形成或玻璃体积血,造成患者视力下降、视物变形,甚至视网膜脱离^[3]。目前,DR 的主要治疗方法^[4]包括视网膜激光光凝、玻璃体内注射抗血管内皮生长因子药物、局部

使用糖皮质激素和玻璃体切除术,但存在反复注射、价格昂贵、并发症多等缺点。

近年来,中医药在眼科疾病尤其是视网膜病变的治疗方面展现出独特的优势和特色,但临床治疗 DR 的中成药却不多。血明目片作为其中之一,已被收录于 2020 版《中华人民共和国药典》中。它由蒲黄、丹参、地黄、墨旱莲、菊花等 19 味中药组成,具有凉血止血、滋阴化瘀、养肝明目的功效,目前在 DR 治疗中已取得确切效果^[5-8]。现代药理学研究表明该药在早期止血,中后期促进瘀血吸收,改善微循环,扩张血管、抗血栓形成等方面疗效较好^[9]。然而,和血明目片改善 DR 的分子机制尚未明确。为了进一步研究该中药复方对 DR 的保护作用机制,本研究采用葡萄糖浸泡法构建斑马鱼 DR 模型,采用荧光显微镜观察斑马鱼视网膜血管直径和 HE 染色观察斑马鱼视网膜组织的病理改变,并使用 RNA 高通量测序(RNA - sequencing, RNA - seq)技术筛选关键的差异表达基因(differential expressed genes, DEGs),再应用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)进一步验证这些 DEGs 的 mRNA 表达水平,以期对 DR 的治疗提供一定参考价值。

1 对象和方法

1.1 对象

1.1.1 实验动物 成年野生型斑马鱼(AB 株,3 月龄)来自湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院人类疾病斑马鱼模型新药筛选襄阳市重点实验室,转基因型血管内皮细胞增强型绿色免疫荧光蛋白标记 Tg(flk : EGFP)品系斑马鱼购自国家斑马鱼资源中心(武汉)。所有品系的斑马鱼均在标准的斑马鱼水循环系统中养殖,养殖水 pH 值为 7.5±0.5,水温 28±0.5 ℃,明暗周期为 14 h : 10 h (光 : 暗),每日早晚投喂 2 次丰年虾。本实验所有实验方案和程序均获湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院动物实验伦理委员会批准(No.XYYYYE20240116)。

1.1.2 主要试剂及仪器 和血明目片,葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司),多聚甲醛(上海沪试实验室器材股份有限公司),TRIzol(碧云天生物科技有限公司),Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix,HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNAwiper)(中国南京诺唯赞医疗科技有限公司),异丙醇(中国上海 MACKLIN/麦克林),无水乙醇、氯仿(国药集团化学试剂有限公司),DEPC 水(Biosharp 生物科技有限公司),引物(上海生工生物工程股份有限公司)。体视显微镜系统(日本 Olympus 公司),倒置荧光显微镜(德国徕卡公司),制冰机(中国冰力欧公司),电子天平(中国常州奥豪斯公司),基因扩增仪(美国赛默飞公司);台式高速离心机(武汉赛维尔生物科技有限公司),实时荧光定量 PCR 仪(中国 Rocgene 公司)。

1.2 方法

1.2.1 斑马鱼组织血糖水平的检测 考虑到斑马鱼幼鱼体积小,它的血液样本无法收集,我们选择检测整个鱼体匀浆中的组织葡萄糖水平,该方法目前已得到证实^[10]。将 3 日龄(3 dpf)的斑马鱼暴露于 90-160 mmol/L 的葡萄糖溶液中,维持培养 3 d。在 6 dpf 时,各组随机取 80 尾斑马鱼加入 100 μL 生理盐水采用高速手持式匀浆机匀浆 1 min 至鱼体组织裂解充分,于 4 ℃ 下以 2 500 r/s 离心

20 min,取上清样采用 GLU 检测试剂盒测定葡萄糖浓度,其测定程序和方法按照试剂盒说明书规定进行。

1.2.2 建立 DR 模型 参考既往研究^[11-13],将 3 dpf 斑马鱼幼鱼持续暴露于 130 mmol/L 葡萄糖溶液 3 d 可构建 DR 模型,造模成功标准:血糖显著升高、视网膜血管病理性扩张、炎症相关基因(包括 ICAM1、NF-κB、VEGF、TNF-α、IL-6、IL-8 等)mRNA 表达上调、中性粒细胞数量改变及一氧化氮代谢产物增加。

1.2.3 测定和血明目片最大耐受浓度 根据人与斑马鱼的药物/体质量比例初步设置和血明目片浓度梯度为:7.5、25、50、75、100 mg/L。选取 3 dpf 的野生型斑马鱼幼鱼随机放置在六孔板中(50 尾/孔),随机分对照组、模型组和血明目片治疗组,分别给予养殖水、130 mmol/L 葡萄糖和 130 mmol/L 葡萄糖+不同浓度的和血明目片溶液(7.5、25、50、75、100 mg/L),持续干预至 6 dpf。毒理学评估显示,斑马鱼幼鱼暴露于≤75 mg/L 和血明目片溶液 72 h 后,死亡率均为 0,且未观察到心包水肿、脊柱弯曲等毒性表型。参照国际通行的最大耐受浓度(maximum tolerated concentration, MTC)判定标准,确定和血明目片对斑马鱼 DR 的 MTC 为 75 mg/L。基于安全阈值原则,后续实验采用 7.5 mg/L (1/10 MTC) 和 75 mg/L(MTC)作为低、高剂量梯度。

1.2.4 分组 分别将 3 dpf 野生型和转基因型 Tg(flk:EGFP)斑马鱼幼鱼随机分为 4 组:(1)对照组(CG 组):养殖水;(2)模型组(MG 组):130 mmol/L 葡萄糖;(3)低剂量和血明目片治疗组(L-HX 组):130 mmol/L 葡萄糖+7.5 mg/L 和血明目片;(4)高剂量和血明目片治疗组(H-HX 组):130 mmol/L 葡萄糖+75 mg/L 和血明目片。将 3 dpf 的斑马鱼幼鱼随机放置在六孔板中,每孔 50 尾,将各组工作液容量调整至 5 mL,每组设置 3 个平行组。于 28±0.5 ℃的环境温度中、14 h 光照:10 h 黑暗条件下持续处理至 6 dpf。所有溶液现配现用,每 12 h 更换一次。实验结束后,采用 300 mg/L 三卡因甲磺酸盐溶液对斑马鱼实施安乐死。

1.2.5 观察斑马鱼眼睛大小和体长 6 dpf 时,各组随机取野生型斑马鱼幼鱼 20 尾,麻醉后置于光学显微镜下拍照,随后采用 Image View 软件测量横轴方向眼睛长度、体长(沿体轴测量从头宽最前端到尾巴最后端的距离)和眼睛面积(首先用 Image View 软件将斑马鱼眼睛区域圈定,之后利用工具栏的 Measure 功能进行面积计算得

到面积数值)。

1.2.6 HE 染色 随机取各组 6 dpf 野生型斑马鱼幼鱼 6 尾,放置于 4%多聚甲醛中固定 48 h,流水冲洗过夜,随后脱水透明处理,使用石蜡包埋并切片。切片脱蜡、水化后染色,最后使用中性树胶封片,光学显微镜下观察并采集图像。选择有代表性的显微照片分析各组斑马鱼幼鱼视网膜组织学变化,并用 K-Viewer 软件对视网膜各层进行定量分析。

1.2.7 测量视网膜血管直径 随机取各组 6 dpf 转基因型 Tg(flk:EGFP)斑马鱼幼鱼 30 尾,4%多聚甲醛 4 ℃固定过夜。经超纯水洗涤 3 次(20 min/次)后,置于含 3%胰蛋白酶的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.8)中 37 ℃孵育 90 min,再次洗涤后通过震荡(摇床,10 min)及移液枪强烈抽吸分离含视网膜血管的玻璃体。Olympus 体视显微镜下采集视网膜血管及视盘(optic disc, OD)图像,选取 OD 周围 3 个不同位点,采用 Image J 软件量化血管直径。

1.2.8 RNA-seq 测序及数据分析 从对照组、模型组及高剂量和血明目片治疗组中,每组各随机选取 160 尾 6 dpf 野生型斑马鱼幼鱼,设置 4 个生物学重复(每个重复含 40 尾幼鱼),放置于液氮中快速冷冻,将整鱼样品管插入干冰中并转运至深圳华大基因科技服务有限公司进行转录组学测序。筛选基因并定义|log2FC|>0 且 P<0.05 的基因为对照组与模型组的 DEGs,筛选基因并定义|log2FC|>1 且 P<0.05 的基因为模型组与和高剂量和血明目片治疗组的 DEGs。GO 功能和 KEGG 通路富集分析在微生信(<https://www.bioinformatics.com.cn>)平台中进行。GO 功能和 KEGG 通路富集分析所得到的 DEGs 通过 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>)进行蛋白质相互作用网络(protein interaction network, PPI)分析,用 Cytoscape 软件 3.9.1 进行可视化,并从中筛选出蛋白互作联系较强的 DEGs。

1.2.9 qRT-PCR 检测 mRNA 表达水平使用 TRIzol 试剂从每组中随机选择的 60 尾野生型斑马鱼幼鱼中提取总 RNA,总 RNA 浓度调整为 500 ng/μL 后逆转录。qRT-PCR 检测 mRNA 表达水平。PCR 反应程序为 95 ℃ 30 s, 95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,40 个循环;然后 95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,95 ℃ 15 s。如表 1 所示,基因引物由上海生工生物工程股份有限公司设计和合成,以 β-actin 基因的表达作为内参对照,用 2^{-ΔΔCt}方法计算目的基因相对于内参基因的表达量。

表 1 qRT-PCR 相关基因的引物序列

基因	引物序列(Forward,5'→3')	引物序列(Reverse,5'→3')
β-actin	AAGCAGGAGTACGATGAGTC	TGGAGTCCTCAGATGCATTG
plk1	TGAAGCCGCACCAAGGAG	CACCACATACACGAAGTCATCATCC
vsx1	GCACCGTGATGGCAGAGTATG	TCTTGGCAGAGTTGATGATGGATTG
pde6c	ATTGCCACTGACCTGGCTTTG	GCGACCATCTCCTCCTCCTTAG
arr3a	ATGATGTCGTGATAAGCCTGTTCTTCTG	CTTTGTTGGTCTCGTTCTTGATCTTG
fbp1b	GCCATCGGTGAGTTTCATACTTGTG	GAGCGTAGCCTTCATTAAGACTGTAG
foxo1a	TGCTGGAGGGAGTGATGTATG	ATGTTGTGTGGGTGAGAAAGAGTG
pna	GACAAGGAGGATGAAGCGGTAAC	CCGTCTTGGACAGAGGAGTG
cdk1	CCTCTGGAGAGTGAGGAGGAAG	GCACATCTAGCAGGCGTACAAC

统计学分析:采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。计量资料采用均值±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析;计数资料以 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验。采用 Pearson 相关性分析评估 RNA-seq 与 PCR 数据的一致性,相关系数 R^2 越接近 1,表明两者正相关性越强。所有图形均使用 Graphpad Prism 软件 9.0 绘制生成。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 暴露于不同浓度葡萄糖对斑马鱼幼鱼体内葡萄糖水平的影响 为了验证 130 mmol/L 葡萄糖溶液构建斑马鱼 DR 模型的可行性,本研究选取 3 dpf 的斑马鱼幼鱼,分别暴露于不同浓度梯度的葡萄糖溶液 (0、90、110、130、150 和 160 mmol/L) 中,并采用酶联法测定其血糖水平。实验数据显示,斑马鱼血糖浓度随葡萄糖暴露浓度增加呈剂量依赖性升高,且 130 mmol/L 暴露组血糖水平较 0 mmol/L 组显著升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$,图 1)。基于既往相关文献报道^[11-13] 及本研究中的血糖浓度结果,最终确定 MG 组葡萄糖浓度为 130 mmol/L。

2.2 和血明目片对斑马鱼 DR 幼鱼发育的影响 各组 6 dpf 斑马鱼幼鱼眼睛面积、眼睛长度/体长之间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$,图 2A、B)。表明 7.5 mg/L 和 75 mg/L 的和血明目片对斑马鱼 DR 幼鱼发育无明显影响。

2.3 和血明目片对斑马鱼 DR 视网膜组织形态的影响 HE 染色结果显示,对照组斑马鱼视网膜各层组织结构层

次清晰、细胞排布规则紧密。与对照组相比,模型组的节细胞层 (ganglion cell layer, GCL) 细胞排列紊乱、间隙增宽,而经和血明目片干预后,低剂量和血明目片治疗组和高剂量和血明目片治疗组的 GCL 层细胞紊乱有所缓解;此外,模型组的内核层 (inner nuclear layer, INL) 厚度较对照组显著增加,而低剂量和血明目片治疗组与高剂量和血明目片治疗组干预可有效逆转该病理改变 (图 2C、D)。各组斑马鱼幼鱼眼睛的晶状体层 (lens) 及视网膜的内网状层 (inner plexiform layer, IPL) 和外核层 (outer nuclear layer, ONL) 的形态学参数比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$,图 2C)。结果表明,和血明目片可以在一定程度上改善斑马鱼 DR 视网膜病理性改变。

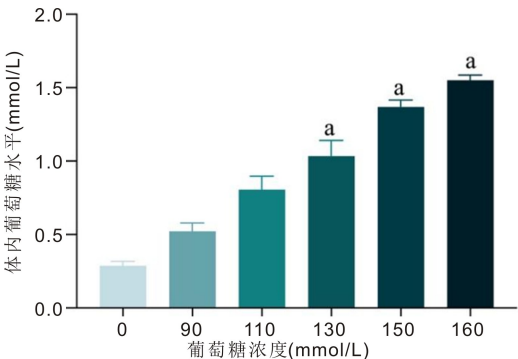


图 1 暴露于不同浓度葡萄糖对斑马鱼幼鱼体内葡萄糖水平的影响 ^a $P<0.05$ vs 0 mmol/L。

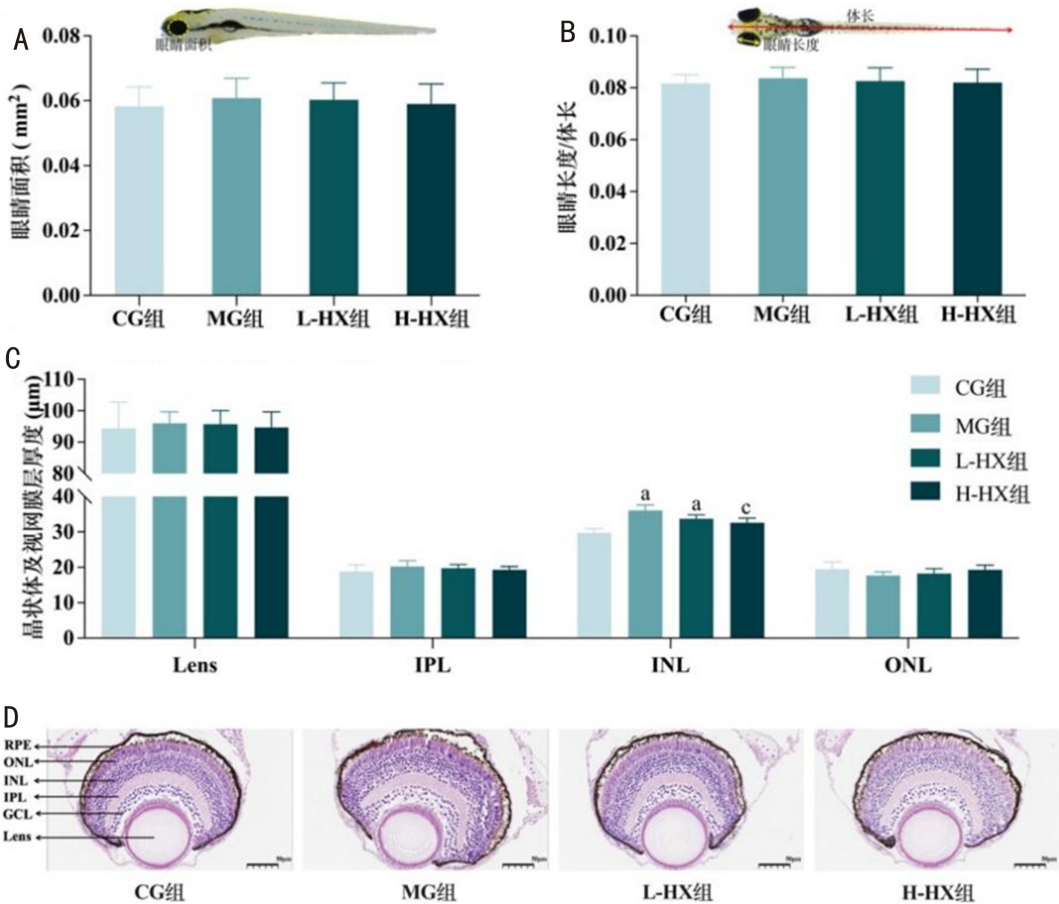


图 2 和血明目片对斑马鱼幼鱼发育的影响 A: 斑马鱼眼睛面积; B: 斑马鱼眼睛长度/体长; C: 斑马鱼视网膜各层定量图 ($n=6$), ^a $P<0.05$ vs CG 组; ^c $P<0.05$ vs MG 组; D: 斑马鱼视网膜 HE 染色切片图; Lens: 晶状体层; GCL: 节细胞层; IPL: 内网状层; INL: 内核层; ONL: 外核层; RPE: 视网膜色素上皮层。

2.4 和血明目片对斑马鱼 DR 幼鱼视网膜血管的影响 荧光显微镜捕获视网膜血管照片,图 3A 中黄色星号标示 OD 所在位置。结果显示,与对照组相比,模型组斑马鱼视网膜血管直径显著增加($P<0.05$),提示 DR 造模成功。而经和血明目片干预后,低剂量和血明目片治疗组和高剂量和血明目片治疗组的斑马鱼视网膜血管直径较模型组显著减小($P<0.05$),且高剂量和血明目片治疗组的视网膜血管直径的变化更为显著($P<0.05$),见图 3。结果表明,和血明目片可以在一定程度上缓解斑马鱼视网膜血管损伤。

2.5 和血明目片对斑马鱼 DR 幼鱼的转录组学效应

2.5.1 三组 6 dpf 斑马鱼幼鱼在 RNA-Seq 中 DEGs 的表达情况 与对照组相比,模型组共有 1 470 个 DEGs,其中上调和下调基因分别有 798、672 个;与模型组相比,高剂量和血明目片治疗组共有 954 个 DEGs,其中上调和下调基因分别有 665、289 个(图 4A、B)。同组 4 个样本之间聚类良好,说明该组表达模式在 4 个测序样本之间较一致(图 4C、D)。韦恩图所示在对照组、模型组及高剂量和血明目片治疗组三组所有 DEGs 中共有 938 个表达逆转的基因,其中包含 408 个上调基因和 530 个下调基因(图 4E)。提示和血明目片改善斑马鱼 DR 的过程可能与这 938 个逆转 DEGs 的激活有关。

2.5.2 逆转 DEGs 的 GO 和 KEGG 功能富集分析 为了进一步确定和血明目片对斑马鱼 DR 作用所涉及的具体生物学功能及通路,我们又对 938 个逆转 DEGs 进行了 GO 功能富集分析及 KEGG 信号通路富集分析。GO 功能富集分析显示逆转 DEGs 主要参与细胞周期(cell cycle)、微管细胞骨架组织(microtubule cytoskeleton organization)、相机型眼的视网膜发育(retina development in camera-type eye)和视觉感知(visual perception)过程(图 5A)。KEGG 信号通路富集分析显示逆转 DEGs 主要与 AMPK 信号通路(AMPK signaling pathway)、Foxo 信号通路(Foxo signaling pathway)、细胞周期、紧密连接(tight junction)通路有关(图 5B)。这些结果表明,和血明目片可至少通过部分调节视觉发育、细胞周期、细胞骨架组织、AMPK 信号通路、Foxo 信号通路、紧密连接等通路来缓解斑马鱼 DR

的视网膜损伤。

2.5.3 逆转 DEGs 的通路-基因蛋白互作网络图 为了解对照组、模型组和高剂量和血明目片治疗组的 DEGs 相互作用关系,我们利用 STRING 数据库及 Cytoscape 软件 3.9.1 对图 4E 中的逆转 DEGs 绘制了 PPI。如图 5C 所示,cdc20、pcna、kif11、cdca8、cdk1、cdk2、aurka 7 个基因处于核心位置。如图 5D 通路-基因 PPI 图所示,细胞周期、细胞骨架组织、AMPK 信号通路、Foxo 信号通路、紧密连接与相机型眼的视网膜发育的关系最为密切。

2.5.4 逆转 DEGs 层次聚类分析 为了更直观观察基因的表达水平,我们选取了逆转 DEGs 中部分通路内基因进行层次聚类分析并绘制出了相对应的热图。如图 6 所示,与细胞周期、细胞骨架组织、紧密连接和相机型眼的视网膜发育相关的基因在模型组上调,在高剂量和血明目片治疗组下调;与 AMPK 信号通路、Foxo 信号通路和视觉感知相关的基因在模型组下调,在高剂量和血明目片治疗组上调。这些结果表明,和血明目片可能通过调节上述通路中相关基因的表达来减轻斑马鱼 DR 视网膜损伤。

2.6 qRT-PCR 对转录组学结果的验证 为了进一步验证转录组学结果的准确性,我们进行了 qRT-PCR 实验。根据聚类热图分析的结果选择与相机型眼的视网膜发育相关的基因 plk1,与视觉感知相关的基因 vsx1、pde6c、arr3a,与 AMPK 信号通路相关的基因 fbp1b、foxo1a,与细胞周期相关的基因 pcna、cdk1 进行验证。如图 7B 所示,我们发现:与对照组相比,pcna、cdk1、plk1 的 mRNA 表达水平在模型组呈现上调趋势;而与模型组相比,这些基因在高剂量和血明目片治疗组下调。与对照组相比,vsx1、pde6c、arr3a、fbp1b、foxo1a 的 mRNA 表达水平在模型组下调;而与模型组相比,上述基因在高剂量和血明目片治疗组上调,这与层次聚类分析热图(图 7A)趋势一致。此外,这 8 个 DEGs 的 qRT-PCR 表达倍数变化与 RNA-seq 结果之间存在显著正相关($P<0.05$),相关系数 R^2 为 0.8571(图 7C)。上述结果均表明 RNA-seq 和 qRT-PCR 结果的表达变化趋势基本一致,说明转录组学结果较为可靠。

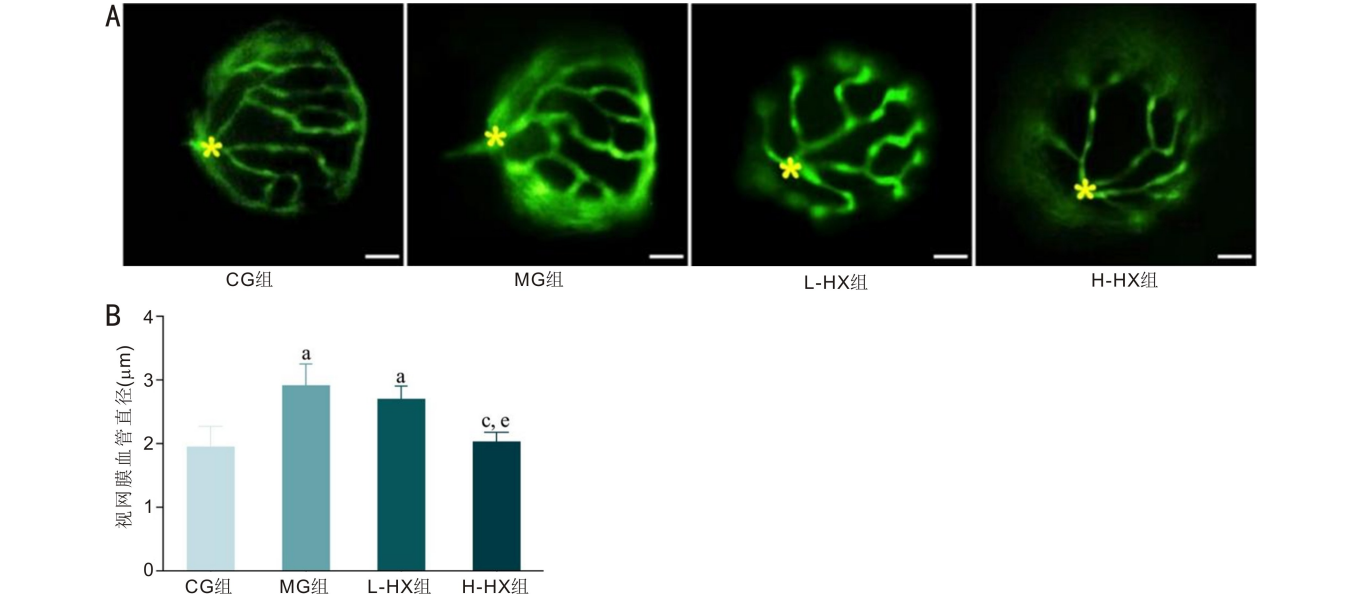


图 3 和血明目片对斑马鱼 DR 幼鱼视网膜血管的影响 A: 荧光显微镜捕获视网膜血管照片,每张图片以视盘(黄色星号)为中心随机选取三个点测定血管直径;B: 和血明目片干预对斑马鱼 DR 幼鱼视网膜血管直径定量图($n=30$);^a $P<0.05$ vs CG 组;^c $P<0.05$ vs MG 组;^c $P<0.05$ vs L-HX 组。

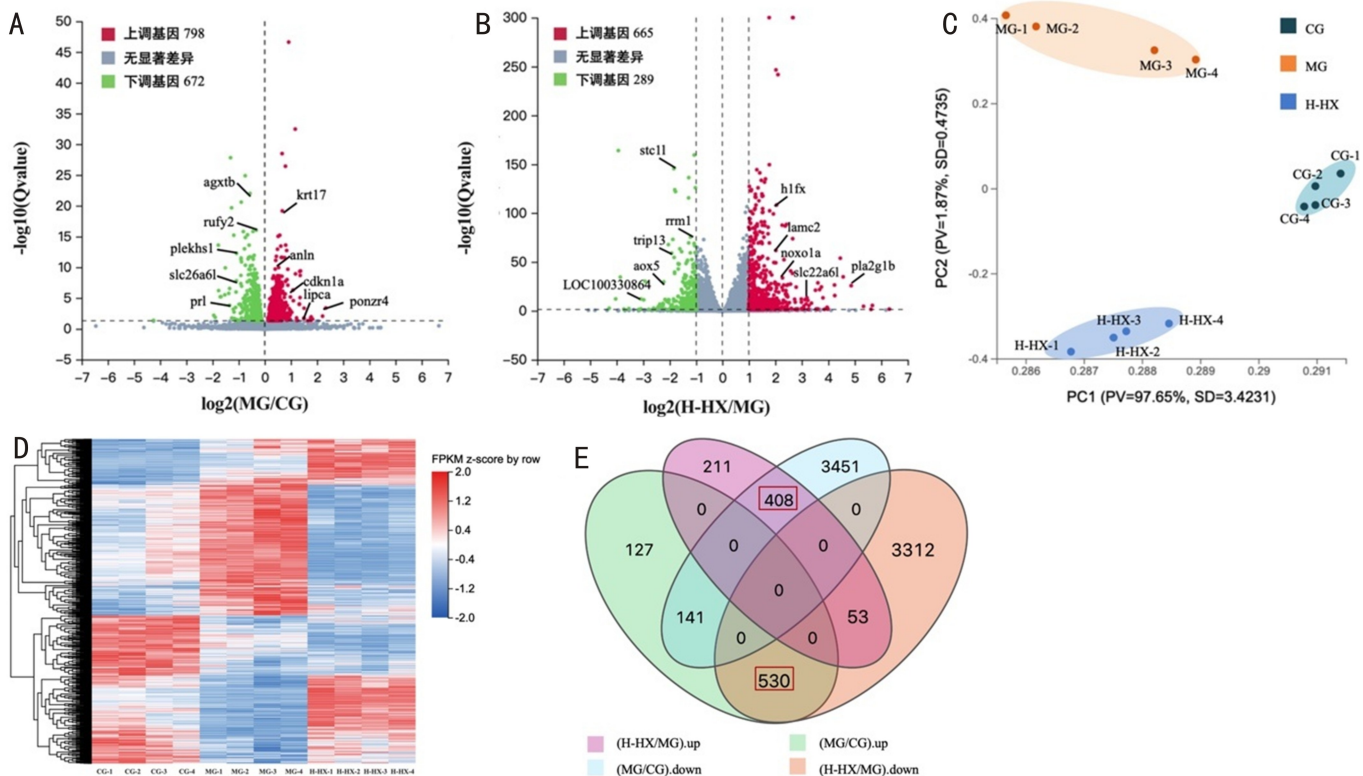


图 4 三组 6 dpf 斑马鱼幼鱼在 RNA-Seq 中 DEGs 的表达情况 A:对照组 vs 模型组 DEGs 的火山图;B:模型组 vs 高剂量和血明目片治疗组 DEGs 的火山图;红点代表显著上调的基因,绿点代表显著下调的基因;C:三组 6 dpf 斑马鱼幼鱼主成分分析;D:三组 6 dpf 斑马鱼幼鱼 DEGs 的层次聚类分析热图;热图中红色代表上调,颜色越深表达量越高;蓝色代表下调,颜色越深表达量越低;E:逆转基因的韦恩图。

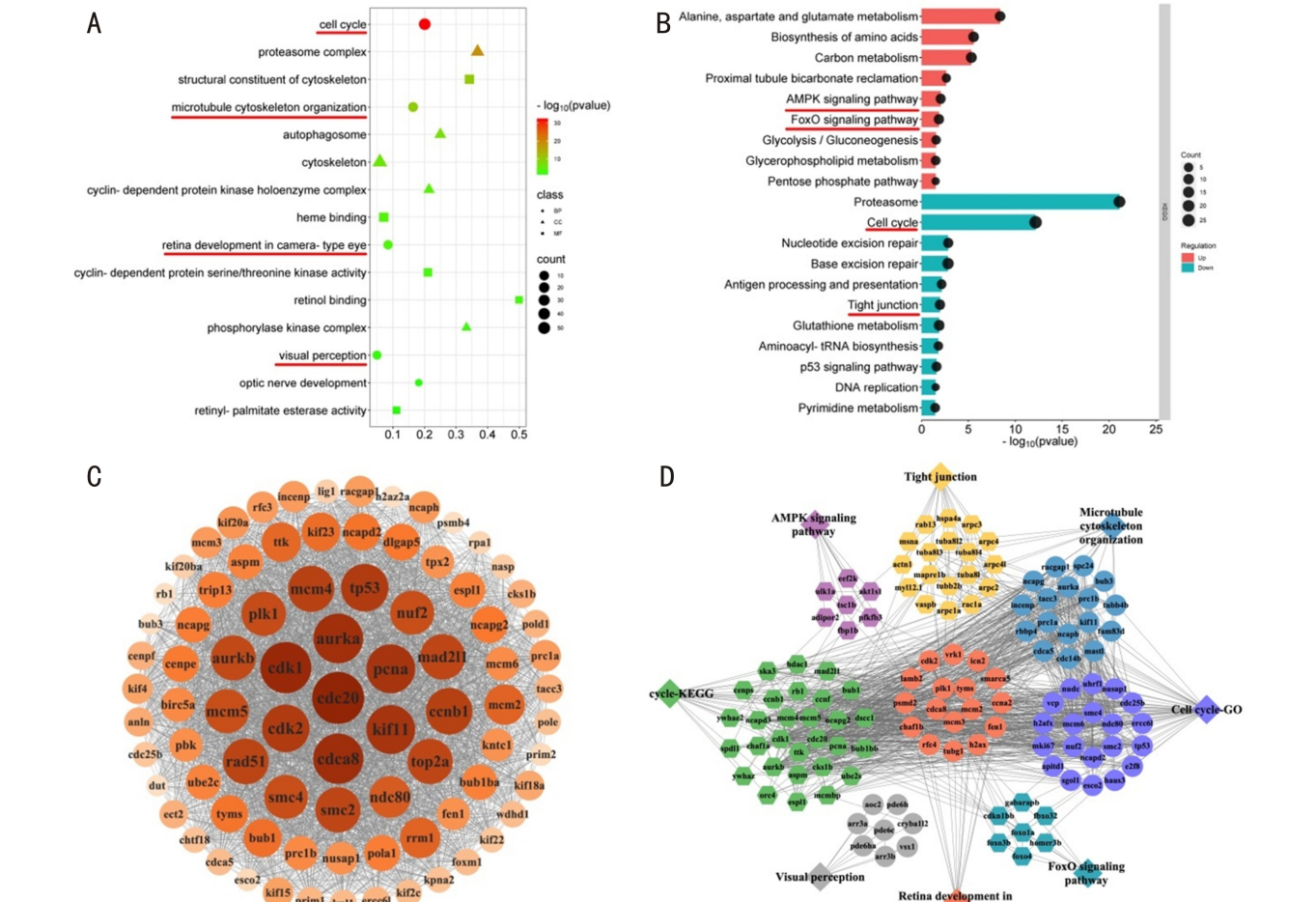


图 5 逆转 DEGs 的 GO 和 KEGG 功能富集分析 A:938 个逆转 DEGs 的 GO 功能富集分析;B:938 个逆转 DEGs 的 KEGG 信号通路富集分析;C:938 个逆转 DEGs 的 PPI 图(颜色深浅代表节点度数即 degree 值大小,节点度数是指一个节点与之相连的边数量。颜色越深代表节点度数越高,说明该节点具有更多的互作关系);D:938 个逆转 DEGs 部分通路-基因的 PPI 图。

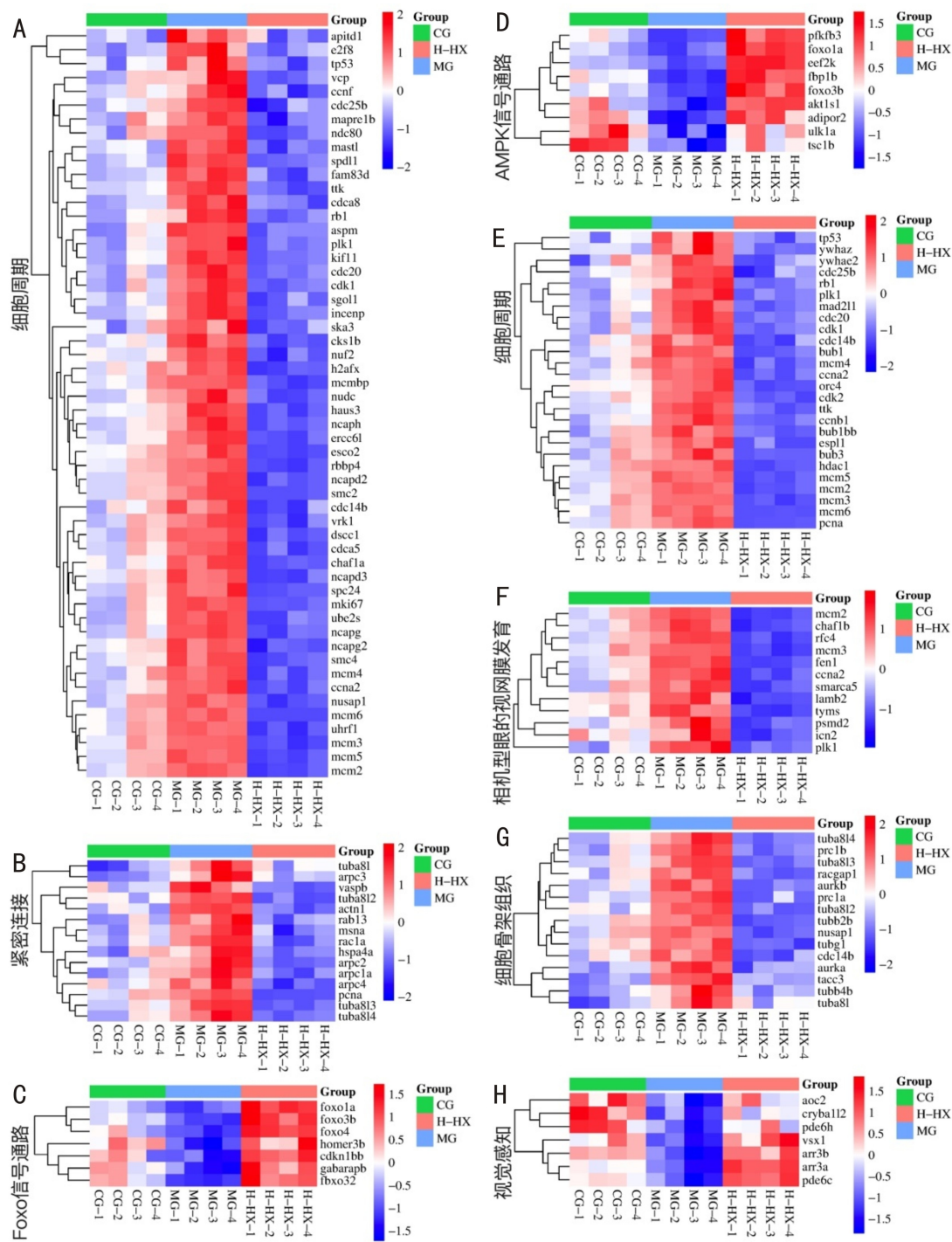


图6 转录组中的关键通路分析 A:KEGG中细胞周期通路中DEGs的层次聚类分析热图;B:紧密连接通路中DEGs的层次聚类分析热图;C:Foxo信号通路中DEGs的层次聚类分析热图;D:AMPK信号通路中DEGs的层次聚类分析热图;E:GO中细胞周期通路中DEGs的层次聚类分析热图;F:相机型眼的视网膜发育通路中DEGs的层次聚类分析热图;G:细胞骨架组织通路中DEGs的层次聚类分析热图;H:视觉感知通路中DEGs的层次聚类分析热图。

3 讨论

DR是糖尿病最常见的微血管并发症之一,也是全球致盲的重要原因。由于其发病机制复杂且早期症状不明显,DR的研究一直面临许多挑战。传统的动物模型(如小鼠、大鼠、家兔等)在DR研究中已经取得了一些进展^[14-16],但这些模型往往存在实验周期长、操作复杂、成本高等问题。斑马鱼作为一种新的模式生物,与人类基因同源性高达85%,具有养殖方便、发育周期短、单次产卵数较多、胚体透明、72 hpf就具备视觉功能等优点,已广泛应用于新药筛选、药物毒性与安全性评价以及人类疾病模型

研究^[17-18]。有文献报道斑马鱼在胰腺结构和糖代谢调控机制等方面与成年哺乳动物高度一致^[19]。此外,斑马鱼与人类和其他哺乳动物在眼部发育和视网膜细胞排列以及视网膜层的结构特征方面非常相似^[20]。在本研究中,我们通过将斑马鱼幼鱼暴露于130 mmol/L的葡萄糖溶液中成功建立了DR模型。结果表明,和血明目片通过调控AMPK信号通路、Foxo信号通路、视网膜发育及细胞周期等相关基因表达,显著逆转高糖诱导的视网膜病理改变。近年来,和血明目片因其良好的临床疗效和安全性,在DR治疗领域备受关注。本研究首次采用斑马鱼模型

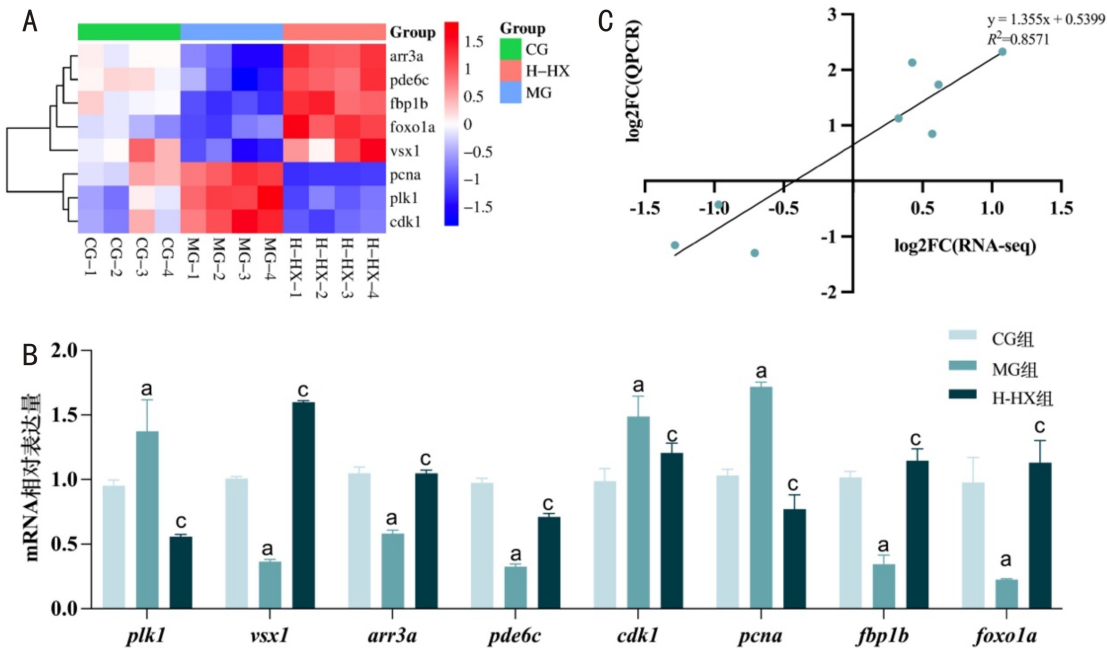


图 7 三组相关基因 mRNA 表达情况 A: 相机型眼的视网膜发育、视觉感知、AMPK 信号通路和细胞周期相关 DEGs 的聚类热图; B: 8 个相关基因在模型组和高剂量和血明目片治疗组的 mRNA 相对表达量 (n = 6); ^a P < 0.05 vs CG 组; ^c P < 0.05 vs MG 组; C: RNA-seq 与 qRT-PCR 在 DEGs 表达中的相关性。

系统评估其疗效,结果显示,和血明目片能够显著逆转高糖诱导的斑马鱼视网膜 GCL 层细胞排列紊乱、间隙增宽及 INL 层异常增厚现象。与我们的数据相似, Sankar 等^[21]研究表明高糖诱导的斑马鱼胚胎的 GCL 层和 INL 层厚度增加, IPL 层和 OPL 层变薄。这可能是由于高糖暴露会促使氧化应激增强,进而导致血-房水屏障功能受损和房水中蛋白质浓度升高,视网膜血管通透性增加^[10]。先前的一项研究表明, DR 的发展主要是由于视网膜细胞的炎症,导致 INL 层厚度增加,视力下降^[22]。既往多项医学研究^[23-25]证实了和血明目片不仅能改善患者黄斑厚度及血液流变学指标,还能显著提升矫正视力效果和临床有效率,同时缩短症状改善时间。本研究发现和血明目片显著逆转了高糖诱导的视网膜血管直径扩张,这与临床观察到的黄斑水肿减轻及微循环改善具有机制一致性,进一步证实了和血明目片在 DR 治疗中的潜在价值。

DR 的发病机制复杂,涉及炎症反应、氧化应激、代谢紊乱及视网膜神经退行性病变等多种病理过程^[3-5]。本研究首次结合斑马鱼模型与转录组学技术,系统阐释了和血明目片改善 DR 视网膜损伤的作用机制。结果发现,高剂量和血明目片治疗组显著逆转了高糖诱导的 938 个 DEGs,涉及细胞周期、AMPK 信号通路、Foxo 信号通路、紧密连接、相机型眼的视网膜发育、视觉感知和细胞骨架组织等关键通路。这些发现不仅验证了和血明目片的多靶点作用特性,还为其“滋阴化瘀、凉血止血”的中医理论提供了分子生物学证据。AMPK 是一种进化上相对保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在维持细胞能量平衡、调节炎症反应及应对氧化应激方面具有至关重要的作用^[26]。病理性的高血糖环境可诱发线粒体功能障碍,促使过量活性氧的生成,进而引发视网膜组织氧化损伤^[27]。本研究发现,高剂量和血明目片治疗组显著上调 AMPK 通路相关基因 (*fbplb* *foxo1a*),并逆转高糖诱导的氧化应激标志物水平升高。实验数据表明,AMPK 的磷酸化激活可介导多重保

护机制:(1)通过诱导抗氧化因子(如 Nrf2、SOD)表达,促进活性氧的清除并降低氧化应激水平;(2)通过调控血管内皮细胞间连接蛋白的稳定性,显著降低血管通透性,最终抑制糖尿病相关黄斑水肿及异常血管增生等病理进程^[28-29]。AMPK 通过增强线粒体自噬选择性清除功能受损的线粒体,进一步阻断视网膜神经元凋亡信号通路,这为延缓糖尿病视网膜神经退行性改变提供了分子层面的解释^[30]。这一机制与实验中高剂量和血明目片治疗组视网膜血管直径显著减小的表型直接相关,提示 AMPK 通路在和血明目片改善微血管渗漏中起核心作用。Parmar 等^[31]研究发现 Foxo 家族参与调节细胞增殖、代谢、分化、自噬和凋亡等多种生物过程,其中 *foxo1*、*foxo3*、*foxo4* 和 *foxo6* 与糖尿病及其并发症密切相关。此外, Foxo 信号通路的激活可以预防和保护血管内皮细胞,在增殖型糖尿病视网膜病变的血管新生中起关键作用^[32]。本研究显示,高糖暴露导致 *foxo1a* 表达下调,而高剂量和血明目片治疗组干预后其表达显著恢复。Wang 等^[33]通过单细胞转录组测序数据分析及实验验证证明高葡萄糖处理的斑马鱼胚胎中 *foxo1a* 的表达水平显著降低,这可能是通过调控其靶基因 *marcksl1a* 来发挥其调控作用,这与本研究的结果一致。此外,本研究中 *foxo1a* 的上调与 AMPK 通路激活协同作用,共同抑制活性氧积累,延缓视网膜神经元损伤。

本研究中,KEGG 富集分析显示逆转 DEGs 显著富集于紧密连接通路,且高剂量和血明目片治疗组视网膜血管渗漏减少,提示和血明目片可能通过修复内皮细胞间连接结构改善血-视网膜屏障功能。紧密连接蛋白(如 claudin-5、ZO-1)及细胞骨架蛋白的异常表达是血-视网膜屏障破坏的重要标志。细胞骨架在视网膜的发育和功能维持中也发挥着不可或缺的作用^[34]。视网膜细胞骨架基因的突变可能导致眼睛的结构或功能异常,进而引发视力障碍或其他相关疾病。视网膜色素上皮细胞层由单层色素细胞组成,其通过紧密连接蛋白形成血-视网膜屏

障,在视网膜的生理功能中起到关键作用^[35-36]。和血明目片对相机型眼视网膜发育通路(*plk1*)及视觉感知通路(*arr3a*、*vsx1*、*pde6c*)的调控,可能通过促进感光细胞分化及突触传递效率,改善 DR 患者的视觉功能。*vsx1* 基因突变可导致斑马鱼视网膜色素层异常及光敏感性下降^[37],而高剂量和血明目片治疗组 *vsx1* 表达上调可能部分逆转高糖诱导的感光细胞退化。此外,*pde6c* 作为视锥细胞特异性基因,其表达恢复有助于维持光转导级联反应的正常进行^[38]。有研究发现 *arr3a* 基因参与视杆细胞和视锥细胞的光适应过程,确保视觉系统对不同光照条件的适应性。Hao 等^[39] 研究表明 *klf14* 通过直接结合 *plk1* 的染色质来激活 *plk1* 的转录,而 *klf14* 过表达会促进内皮细胞增殖,从而加剧内皮细胞的功能障碍。

进一步对 GO 和 KEGG 通路中的逆转 DEGs 进行 PPI 网络分析发现,*pcna*、*cdk1* 等基因处于调控核心。本研究中 RNA-seq 分析显示,模型组中 *pcna*、*cdk1* 等基因显著上调,提示高糖环境促进血管内皮细胞增殖,而高剂量和血明目片治疗组干预后这些基因表达被抑制,与视网膜血管直径减小表型一致。作为 DNA 聚合酶 δ 的核心辅助因子,增殖细胞核抗原(*pcna*)表达水平与细胞增殖活性呈显著正相关。多项研究证实,高糖状态下 *pcna* 表达量显著上调导致 Müller 细胞增殖,导致血-视网膜屏障受损,最终出现视网膜新生血管^[40]。高鑫^[41] 研究显示 *cdk1* 在小鼠视网膜新生血管中表达增加,而抑制 *cdk1* 的表达可以激活细胞周期调控通路,使细胞周期阻滞于 G1/S 期,同时激活线粒体凋亡通路。这种双重调控作用最终导致血管内皮细胞的增殖活性、迁移能力及体外管腔形成能力均受到显著抑制,从而有效延缓视网膜新生血管的病理进程。

之前的研究多采用传统的分子生物学方法,如 Western blot、ELISA、荧光染色等,虽然也有涉及信号通路分析,但结合高通量测序技术进行全基因组层面的分析较少^[14-16]。本文创新性的采用了转录组学分析探讨和血明目片的作用机制,能够更全面地揭示药物作用的分子网络和潜在靶点,为 DR 患者的临床治疗奠定实验基础。然而,本研究尚存在一定的局限性。本研究转录组测序基于全鱼样本,可能混杂其他器官信号,后续需对斑马鱼幼鱼眼睛这一单一器官进行了转录组测序,精确地确定眼睛中的基因表达模式,更深入地了解眼睛器官的分子机制。此外,和血明目片由多种中药成分组成,后续研究还需采用网络药理学解析其活性成分的精准靶点,明确复方中具体成分与核心基因的对应关系。再者,关于和血明目片的最佳剂量的研究不够充分。

综上所述,和血明目片可能通过调控 *vsx1*、*pde6c*、*arr3a*、*plk1*、*fbp1b*、*foxo1a*、*pcna* 和 *cdk1* 等核心靶点,并通过相机型眼的视网膜发育、视觉感知、细胞骨架组织、紧密连接、AMPK、Foxo 等信号通路的协同调控改善 DR 视网膜血管微循环障碍。但是和血明目片逆转 DR 作用的确切机制尚不清楚,因此仍需更为深入的研究来阐明这些机制。

利益冲突申明:本文不存在利益冲突。

作者贡献申明:赵朵论文选题与修改,初稿撰写;朱紫璐文献检索,数据分析;张敏、朱美娟、段鹏、黄娇龙选题指导,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] Weerasinghe LS, Dunn HP, Fung AT, et al. Diabetic retinopathy screening at the point of care (DR SPOC): detecting undiagnosed and vision-threatening retinopathy by integrating portable technologies within existing services. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2023,11(4):e003376.

[2] Wang XF, Wang Y, Luo L, et al. Prevalence and associated factors of urinary tract infection in patients with diabetic neuropathy: a hospital-based cross-sectional study. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2023, 16: 1261-1270.

[3] Zhan L. Frontiers in understanding the pathological mechanism of diabetic retinopathy. *Med Sci Monit*, 2023,29:e939658.

[4] Himasa FI, Singhal M, Ojha A, et al. Prospective for diagnosis and treatment of diabetic retinopathy. *Curr Pharm Des*, 2022, 28(7): 560-569.

[5] 张乐,谭晓丹,沈志华,等.和血明目片治疗糖尿病视网膜病变和视网膜静脉阻塞的系统评价及 Meta 分析. *中国实验方剂学杂志*, 2023,29(18):109-116.

[6] 邢凯,朱明娟,张娇,等.和血明目片眼科临床应用的研究进展. *中国中医眼科杂志*, 2022,32(11):900-903.

[7] 刘彩金,张俊霞,白雪.和血明目片和康柏西普联合激光光凝治疗重度增殖性糖尿病性视网膜病变的疗效. *中国激光医学杂志*, 2022,31(5):276-280,300.

[8] 梁田,纵丹丹,周军.和血明目片联合羧苯磺酸钙片治疗早期糖尿病视网膜病变的效果及对其血管瘤体积、黄斑厚度、视野灰度值、出血斑面积的影响. *糖尿病新世界*, 2023,26(15):182-185,189.

[9] 席玉婕,高锦成,郭非非,等.基于网络稳健性的和血明目片潜在适应证预测. *世界中医药*, 2022,17(7):912-920.

[10] 刘均,李强,谭蓉.基于斑马鱼生物模型评价青钱柳叶水提物的降糖作用. *中国茶叶加工*, 2022, 1: 62-70.

[11] 牛文丹.款冬花对高糖诱导斑马鱼视网膜血管损伤的干预作用研究.河北大学,2023.

[12] 苏梅,娄雅静,王姗,等.脑脉利颗粒对斑马鱼糖尿病性视网膜病变的治疗作用研究. *中医药导报*, 2022,28(6):24-29.

[13] Lee YJ, Yang J. Development of a zebrafish screening model for diabetic retinopathy induced by hyperglycemia: Reproducibility verification in animal model. *Biomedecine Pharmacother*, 2021, 135:111201.

[14] 朱昭亮,白淑玮,段鹏,等.芍药苷调控 PI3K/Akt 信号通路对糖尿病视网膜病变大鼠炎症反应的影响. *国际眼科杂志*, 2025, 25(3):365-371.

[15] 汪小兰,杨瀚毅,张益萌,等.紫檀芪对高糖介导的人视网膜微血管内皮细胞内皮间充质转化的抑制作用. *国际眼科杂志*, 2025, 25(3):359-364.

[16] 赖思艺,邱心悦,何建忠,等.益景汤调控 MMOL/LPs/TIMPs 相关分子拮抗高糖诱导的 iBRB 模型基底膜损害. *国际眼科杂志*, 2024,24(9):1387-1391.

[17] Rosa JGS, Lopes-Ferreira M, Lima C. An overview towards zebrafish larvae as a model for ocular diseases. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6):5387.

[18] Mi JR, Ren LP, Andersson O. Leveraging zebrafish to investigate pancreatic development, regeneration, and diabetes. *Trends Mol Med*, 2024,30(10):932-949.

[19] Sanni O, Fasemore T, Nkomozepi P. Non-genetic-induced zebrafish model for type 2 diabetes with emphasis on tools in model validation. *Int J Mol Sci*, 2023,25(1):240.

[20] Baier H, Scott EK. The visual systems of zebrafish. *Annu Rev Neurosci*, 2024,47(1):255-276.

[21] Sankar S, Suresh D, Ibrahim M. Impact of high glucose exposure on induction of apoptosis and its implication on developing retina of

zebrafish embryos. Dev Neurosci, 2022,44(6):576–589.

[22] Rangaraju L, Jiang X, McAnany JJ, et al. Association between visual acuity and retinal layer metrics in diabetics with and without macular edema. J Ophthalmol, 2018,2018:1089043.

[23] 郑朝元, 李慧芳. 常规药物联合和血明目片治疗糖尿病眼底出血的临床疗效分析. 医药论坛杂志, 2020,41(9):162–164.

[24] 雷新建. 和血明目片辅助治疗对糖尿病眼底出血患者血液流变学、眼底出血吸收及纤溶状态的影响. 贵州医药, 2022,46(8):1282–1283.

[25] 王莎莎, Jorge A.Trujillo Perdomo, 薛敏, 等. 和血明目片联合全视网膜激光光凝术对糖尿病视网膜病变患者视力状况、血液流变学及脉络膜厚度的影响. 现代生物医学进展, 2022,22(17):3343–3346.

[26] Zhou LL, Mo Y, Zhang HY, et al. Role of AMPK-regulated autophagy in retinal pigment epithelial cell homeostasis: a review. Medicine (Baltimore), 2024,103(28):e38908.

[27] de Marañón AM, Díaz-Pozo P, Canet F, et al. Metformin modulates mitochondrial function and mitophagy in peripheral blood mononuclear cells from type 2 diabetic patients. Redox Biol, 2022,53:102342.

[28] Cao P, Chen Q, Shi CX, et al. Sirtuin1 attenuates acute liver failure by reducing reactive oxygen species via hypoxia inducible factor 1α. World J Gastroenterol, 2022,28(17):1798–1813.

[29] Wang DX, Li JY, Luo G, et al. Nox4 as a novel therapeutic target for diabetic vascular complications. Redox Biol, 2023,64:102781.

[30] Park Y, Jeong Y, Son S, et al. AMPK-induced mitochondrial biogenesis decelerates retinal pigment epithelial cell degeneration under nutrient starvation. BMB Rep, 2023,56(2):84–89.

[31] Parmar UM, Jalgaonkar MP, Kansara AJ, et al. Emerging links between FOXOs and diabetic complications. Eur J Pharmacol, 2023,960:176089.

[32] Li JY, Chen KQ, Li X, et al. Mechanistic insights into the alterations and regulation of the AKT signaling pathway in diabetic retinopathy. Cell Death Discov, 2023,9(1):418.

[33] Wang XN, Zhao JX, Xu JH, et al. Noncaloric monosaccharides induce excessive sprouting angiogenesis in zebrafish via foxo1a-marcksl1a signal. eLife, 2024,13:RP95427.

[34] SAHU S, MISHRA M. Alteration of Cytoskeletal Proteins Leads to Retinal Degeneration in Drosophila. Cytoskeleton (Hoboken), 2024.

[35] Cheng YW, Huang YC, Chang KF, et al. Protective effect of curcumin on the tight junction integrity and cellular senescence in human retinal pigment epithelium of early diabetic retinopathy. J Physiol Invest, 2024,67(3):107–117.

[36] Robles-Osorio ML, Sabath E. Tight junction disruption and the pathogenesis of the chronic complications of diabetes mellitus: a narrative review. World J Diabetes, 2023,14(7):1013–1026.

[37] Priyadarshana DGCE, Cheon J, Lee Y, et al. Particulate matter induced adverse effects on eye development in zebrafish (Danio rerio) embryos. Toxics, 2024,12(1):59.

[38] Blumer M, Brown T, Freitas MB, et al. Gene losses in the commol/Lon vampire bat illuminate molecular adaptations to blood feeding. Sci Adv, 2022,8(12):eabm6494.

[39] Hao JS, Zhu CJ, Yan BY, et al. Stimulation of KLF14/PLK1 pathway by thrombin signaling potentiates endothelial dysfunction in Type 2 diabetes mellitus. Biomed Pharmacother, 2018,99:859–866.

[40] 于洋, 刘学政. CDK抑制剂对糖尿病大鼠视网膜 Müller 细胞胶质增殖及新生血管形成的抑制作用. 眼科新进展, 2019,39(9):809–813.

[41] 高鑫. CDK1 在视网膜新生血管形成中作用与机制的研究. 中国人民解放军海军军医大学, 2020.