

田勇,董其娟,于江红,等. 胰激肽原酶对糖尿病大鼠视网膜病变的保护作用及对 Notch1/Hes-1 信号通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 102-107,127.

Tian Y, Dong QJ, Yu JH, et al. The protective effect of pancreatic kininogenase on the retinopathy of diabetic rats and its influence on the Notch1/Hes-1 signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(5): 102-107,127.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.05.017

胰激肽原酶对糖尿病大鼠视网膜病变的保护作用及对 Notch1/Hes-1 信号通路的影响

田 勇^{1*}, 董其娟¹, 于江红¹, 韩 超²

(1.河南中医药大学人民医院(郑州人民医院)内分泌代谢科,郑州 450003;

2.郑州大学第一附属医院临床药学科,郑州 450052)

【摘要】 目的 观察胰激肽原酶对糖尿病(diabetes mellitus, DM)大鼠视网膜病变的保护作用,并探究其作用机制。**方法** 将60只SPF级大鼠随机分为空白组、模型组和治疗组,每组20只。模型组和治疗组通过单次腹腔注射60 mg/kg 链脲佐菌素(streptozocin, STZ)建立DM模型,空白组腹腔注射等量0.1 mol/L 枸橼酸钠。治疗组腹腔注射胰激肽原酶0.8 U治疗,空白组和模型组腹腔注射0.2 mL生理盐水,每天1次,连续2周。HE染色观察大鼠视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)病理学变化并计数;TUNEL法检测RGCs凋亡情况;ELISA试剂盒检测视网膜组织SOD活力和MDA含量;qRT-PCR法和Western blot法检测视网膜组织Notch-1、Hes-1 mRNA和蛋白表达。**结果** 空白组大鼠视网膜组织各层结构清晰,RGCs细胞核清晰有序,偶见凋亡细胞;与空白组比较,模型组RGCs排列紊乱,细胞核稀疏,RGCs数量显著减少,凋亡率升高,视网膜组织SOD水平降低,MDA含量升高($P < 0.05$);与模型组比较,治疗组视网膜组织各层结构清晰,RGCs细胞核清晰规整,RGCs层细胞数量增加,凋亡率降低,视网膜组织SOD活力提高,MDA含量降低($P < 0.05$)。qRT-PCR和Western blot检测结果显示,与空白组比较,模型组视网膜组织Notch1、Hes1 mRNA和蛋白表达水平降低($P < 0.05$);与模型组比较,治疗组视网膜组织Notch1、Hes1 mRNA和蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。**结论** 胰激肽原酶对DM大鼠视网膜病变具有保护和改善作用,其作用机制可能与激活Notch1/Hes-1信号通路的表达有关。

【关键词】 糖尿病;视网膜神经节细胞;胰激肽原酶;Notch1/Hes-1信号通路;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)05-0102-06

The protective effect of pancreatic kininogenase on the retinopathy of diabetic rats and its influence on the Notch1/Hes-1 signaling pathway

TIAN Yong^{1*}, DONG Qijuan¹, YU Jianghong¹, HAN Chao²

(1. Department of Endocrinology and Metabolism, People's Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine (Zhengzhou people's Hospital), Zhengzhou 450003, China. 2. Department of Clinical Medicine, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

【Abstract】 Objective To examine the protective effect of pancreatic kininogenase on retinopathy in diabetes mellitus rats, and explore its mechanism of action. **Methods** Sixty specific-pathogen-free rats were randomly divided into a

【基金项目】 河南省科技攻关计划(172102310024)。

【作者简介】 田勇(1983—),男,硕士,副主任医师,研究方向:胰岛素抵抗,院内血糖管理。E-mail: xin5482g@163.com

blank group, model group, and treatment group, with 20 rats in each group. The model group and treatment group were given a single intraperitoneal injection of 60 mg/kg streptozotocin to establish a rat diabetes model. Rats in the blank group were intraperitoneally injected with an equivalent amount of 0.1 mol/L sodium citrate. Rats in the treatment group were treated by intraperitoneal injection of 0.8 U of pancreatic kininogenase, while the blank group and model group were intraperitoneally injected with 0.2 mL of normal saline once a day for 2 weeks. Hematoxylin and eosin staining was used to observe pathological changes of retinal ganglion cells (RGCs). Apoptosis of RGCs was detected by TUNEL staining. Activity of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) content in the retina were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. mRNA and protein expression of Notch1 and HES-1 were detected by quantitative RT-PCR and western blotting. **Results** In the blank group, the structure of each layer of retinal tissue was clear, RGC nuclei were clear and orderly, and apoptotic cells were only occasionally seen. Compared with the blank group, RGCs in the model group were arranged disorderly, the nuclei were sparse, the number of RGCs was significantly reduced, apoptosis rate was increased, SOD activity of retinal tissue was decreased, and MDA content was increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the structure of each layer of retinal tissue in the treatment group was clear, the nuclei of RGCs were clear and regular, the number of RGC layer cells was increased, apoptosis rate was decreased, SOD activity of retinal tissue was increased, and content of MDA was decreased ($P < 0.05$). The quantitative RT-PCR and western blotting result showed that mRNA and protein expression levels of Notch1 and Hes1 were decreased in the model group compared with the blank group ($P < 0.05$). Compared with the model group, mRNA and protein expression levels of Notch1 and Hes1 in the treatment group were increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Pancreatic kininogenase can protect and improve diabetic retinopathy. The mechanism may be related to the activation of the Notch1/HES-1 signaling pathway.

【Keywords】 diabetes; retinal ganglion cells; pancreatic kininogenase; Notch1/Hes-1 signaling pathway; rats

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是全球发病率较高的代谢性疾病,以高血糖为主要特征,常伴有眼、肾、心血管和神经系统的多种并发症^[1]。糖尿病性视网膜病变 (diabetic retinitis, DR) 是 DM 并发症中较为常见的一种疾病,据统计,DM 患者视网膜病变的发生率为 35%,是发达国家劳动人口失明的主要原因^[2]。DR 主要由慢性高血糖环境诱发,故目前治疗大多以控制 DM 患者血糖为主,但仍有部分患者治疗效果不佳^[3]。研究证明,DR 的发生发展过程中伴随视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 显著减少和凋亡,抑制 RGCs 功能受损和丢失可显著减轻 DR^[4]。胰激肽原酶又称为血管舒缓素,是存在于人和哺乳动物胰腺中的一种蛋白水解酶,具有扩血管、改善微循环的作用,临床主要用于治疗糖尿病肾病,防止糖尿病微血管病变^[5]。近年来,胰激肽原酶在 DR 的临床治疗中取得了较好的疗效,可与其他药物联合使用改善 DR 患者视网膜血流动力学指标,增加视网膜厚度,提高患者视力^[6-7]。Notch 信号通路是一种在人和动物中高度保守的信号通路,与肿瘤、心血管和神经退行性疾病等多种疾病密切相关,Hes 已被证实是该信号通路的关键靶基因^[8]。研究证明,Notch 信号通路在 DR 的发生发展中具有重要作用,可通过调节血管功能调控新生血管的重构或退化,是治疗 DR 的

潜在靶点^[9]。目前,虽已有研究证明胰激肽原酶能够治疗 DR,但其具体作用机制尚不清晰。本研究建立大鼠 DM 模型,观察胰激肽原酶对 DM 大鼠 RGCs 的保护作用,并初步探究其作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 60 只,6 周龄,体重 180~220 g,雌雄各半,购自河南省实验动物中心 [SCXK (豫) 2017-0001],饲养在河南省实验动物中心实验室独立动物房 [SYXK (豫) 2016-0002]。饲养条件:室温 (22±2) °C,湿度 (50±10) %,每天定时换气,保持 12 h:12 h 光照照明,食水不限。研究方案获郑州人民医院伦理委员会批准 (IACUC:ZZRMY2019005),实验严格遵循实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

注射用胰激肽原酶 (常州千红药业,批号:481912052A);链脲佐菌素 (streptozocin, STZ, Sigma-Aldrich,批号:V900890-1G);HE 染色试剂盒、中性树胶、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司);蛋白定量试剂盒 (博士德生物);RevertAid™ first Strand cDNA Synthesis Kit (美国 Thermo Scientific);引物 (日本 TaKaRa);Notch1、

Hes1、GAPDH 兔源单克隆抗体,羊抗兔二抗(美国 CST 公司);One Touch II 型血糖仪(美国强生公司);DYCZ-24KS 型双板垂直电泳仪(北京六一仪器厂);IX53 显微镜(日本奥林巴斯);G:BOX 多功能凝胶成像系统(Syngene);M ultiskan MK3 酶标仪(Thermo Fisher Scientific);TGL16 MB 高速冷冻离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司);7500 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystems)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组、造模与给药

将 60 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组和治疗组,每组 20 只。模型组和治疗组大鼠提前禁食 12 h,腹腔注射 60 mg/kg STZ 溶液,空白组大鼠腹腔注射等量 0.1 mol/L 枸橼酸钠溶液。造模 72 h 后,各组大鼠尾静脉取血,检测血糖值 ≥ 16.7 mmol/L 者即可认为 DM 模型建立成功^[10]。经检测,模型组和治疗组造模成功的大鼠均为 18 只。造模成功后第 2 天开始给药,治疗组大鼠腹腔注射胰激肽原酶 0.8 U 治疗,空白组和模型组腹腔注射 0.2 mL 生理盐水,每天 1 次,连续 2 周。

1.3.2 HE 染色观察 RGCs 病理学变化

实验结束后,摘除大鼠左侧眼球,置于 4%多聚甲醛中固定 48 h,用于 HE 染色和 TUNEL 检测。切片固定后蒸馏水清洗,然后置于不同浓度的乙醇中进行梯度脱水,制作组织蜡块,冰上预冷切片,切片厚度为 4 μ m,二甲苯脱蜡 30 min,在不同浓度梯度的乙醇溶液中复水,使用苏木精和伊红染液分别染细胞核和细胞质,脱水、透明后用中性树胶封片,置于显微镜下观察各组大鼠视网膜各层病理变化,随机选取 5 个高倍镜视野进行 RGCs 计数,取平均值。

1.3.3 TUNEL 法检测 RGCs 凋亡情况

切片制备方法同 1.3.2。切片标本常规脱蜡、复水,滴加蛋白酶 K 溶液,室温水解 15 min 去除组织蛋白,蒸馏水清洗后放置在含 2%过氧化氢的 PBS 中反应 5 min,滴加 TDT 酶反应液 2 滴,置湿盒中 37℃ 孵育 1 h,滴加 50 μ L 过氧化物标记的抗地高辛抗体,湿盒中室温孵育 0.5 h,PBS 清洗后滴加 DAB 溶液,室温孵育 3~6 min 显色,蒸馏水终止,苏木精染细胞核 2 min,脱水、透明后用中性树胶封片,显微镜高倍镜下观察凋亡细胞阳性细胞率。

1.3.4 视网膜氧化应激水平检测

摘除大鼠右侧眼球,解剖镜下小心剥离视网膜组织,按照 1:4 体积比在组织中加入 PBS 冰上制备

成匀浆,10000 r/min 离心 10 min 取上清,离心半径为 12.5 cm,分装在 EP 管中,-80℃ 保存。①SOD 活性检测:取待测样品 20 μ L,依次加入 SOD 检测缓冲液、WST-8 工作液和反应启动工作液,37℃ 孵育 30 min,450 nm 波长测定吸光度(A)值,计算抑制百分率,抑制百分率 = $(\Delta A_{\text{空白}} - \Delta A_{\text{测定}}) / \Delta A_{\text{空白}} \times 100\%$,按照标准曲线计算待测样品的 SOD 酶活力(U/mg)。②MDA 含量检测:取待测样品 100 μ L,依次加入工作液、蒸馏水和待测样品,置于 100℃ 水浴中孵育 60 min,冰浴冷却,9500 r/min 常温离心 10 min,吸取 200 μ L 上清液加入玻璃比色皿中,测定各样品在 450 nm、532 nm 和 600 nm 处的吸光度 A 值,计算 $\Delta A_{450} = A_{450\text{测定}} - A_{450\text{空白}}$, $\Delta A_{532} = A_{532\text{测定}} - A_{532\text{空白}}$, $\Delta A_{600} = A_{600\text{测定}} - A_{600\text{空白}}$,MDA 含量(nmol/mg) = $5 \times [12.9 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 2.58 \times \Delta A_{450}]$ 。

1.3.5 qRT-PCR 法检测大鼠视网膜组织 Notch1、Hes-1 mRNA 表达

收集大鼠视网膜组织,方法同 1.3.4。将视网膜组织剪碎,加适量 TRIzol 裂解液提取组织总 RNA,使用 RevertAid™ first Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒合成 cDNA,作为荧光定量模版。引物由日本 Takara 公司设计合成,所有样品均以 GAPDH 为内参。反应体系: dNTPs 0.5 μ L + 5 $\times$ Buffer 5 μ L + Taq 酶 0.3 μ L + MgCl₂ 1.5 μ L + cDNA 模板 2 μ L + 上下游引物分别 1 μ L,加去离子水至总体积 25 μ L。反应条件为:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,62℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,重复 40 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 5 min 终止反应,实验重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法计算目的基因 mRNA 相对表达水平的变化。引物序列见表 1。

1.3.6 Western blot 法检测大鼠视网膜组织 Notch1、Hes-1 蛋白表达

收集大鼠视网膜组织,方法同 1.3.4。各组视网膜组织用眼科镊剪碎,加入裂解液提取组织蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,加入

表 1 基因引物序列
Table 1 Primer sequences of genes

基因 Gene name	正向引物(5'→3') Former primer	反向引物(5'→3') Reverse primer
Notch1	TCAGCGGATCCA CTGTGAG	ACACAGGCAGGTGA ACGAGTTG
Hes-1	TGATTTTGATGCTC TGAAGAAAGATA	GCTGCAGGTT CCGGAGGT
GAPDH	GCACCGTCAAGGC TGAGAAC	TGGTGAAGACGCCA GTGGA

loading buffer,在 EP 管中混匀后置于沸水中煮沸 5 min 使蛋白变性。配置 15% 的分离胶和 5% 的浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳,上样后 80 V 电泳 2 h,60 V 转膜 2 h,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,随后将条带放入 10 mL Notch1(1:1000)、Hes-1(1:1 000)、GAPDH(1:1000)兔源一抗稀释液中,稀释比例分别为,4℃ 环境下孵育 12 h,第 2 天用 TBST 缓冲液清洗 3 次,每次 10 min,然后加入羊抗兔二抗(1:2000)中,在 37℃ 环境下孵育 2 h,TBST 缓冲液清洗 3 次后滴加 ECL 发光液,反应 1 min 后置于凝胶成像系统显影。免疫印迹实验的内参蛋白为 GAPDH,用 Image J 软件分析各个蛋白对应的灰度值,计算蛋白的相对表达量,蛋白相对表达量=目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 25.0 统计软件分析数据,GraphPad Prism 8.0 作图,实验重复 3 次,计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 RGCs 病理学变化

空白组大鼠的视网膜组织各层结构清晰,RGCs 排列整齐有序,细胞核清晰;与空白组比较,模型组 RGCs 排列紊乱、不规则,细胞核稀疏;与模型组比较,治疗组视网膜组织各层结构清晰,RGCs 细胞核较为清晰且排列整齐。见图 1。空白组、模型组和治疗组 RGCs 层细胞数量分别为(29.54 ± 1.35)、(10.28 ± 1.29)、(20.68 ± 1.52),三组 RGCs 数量差异有统计学意义($F = 52.36, P = 0.0008$);与空白组比较,模型组和治疗组 RGCs 层细胞数量均降低($P = 0.005, 0.039$);与模型组比较,治疗组 RGCs 层细胞数量增加($P = 0.028$)。见图 2。

2.2 各组大鼠 RGCs 凋亡情况比较

空白组大鼠视网膜 RGCs 层偶见 TUNEL 阳性细胞,与空白组比较,模型组可见较多的呈深棕色的 TUNEL 阳性细胞染色;与模型组比较,治疗组虽有 TUNEL 阳性细胞,但数量较少,阳性细胞染色较浅。见图 3。空白组、模型组和治疗组 RGCs 凋亡率分别为(0.55 ± 0.20)、(33.33 ± 0.25)、(16.51 ± 0.23)%,三组间 RGCs 凋亡率比较,差异有统计学意义($F = 85.21, P = 0.0003$),进一步两两比较,模

型组和治疗组 RGCs 凋亡率显著高于空白组($P = 0.005, 0.008$);与模型组比较,治疗组 RGCs 凋亡率显著降低($P = 0.017$)。

2.3 各组大鼠视网膜组织 SOD 活力和 MDA 含量比较

空白组、模型组和治疗组 SOD 水平分别为(80.33 ± 4.22)、(38.85 ± 3.14)、(75.68 ± 3.95) U/mg,三组间 SOD 水平比较,差异有统计学意义($F = 98.24, P = 0.0001$);MDA 含量分别为(0.81 ± 0.09)、(3.70 ± 0.12)、(1.52 ± 0.10) nmol/mg,三组间 SOD 水平比较,差异有统计学意义($F = 69.73, P = 0.0005$)。与空白组比较,模型组大鼠 SOD 水平显著降低,而 MDA 含量显著升高($P = 0.021, 0.003$);与模型组比较,治疗组 SOD 活力显著提高,MDA 含量显著降低($P = 0.035, 0.024$)。见图 4。

2.4 各组大鼠视网膜组织 Notch1、Hes1 mRNA 表达水平比较

空白组、模型组和治疗组 Notch1 mRNA 相对表达量分别为(0.98 ± 0.09)、(0.25 ± 0.03)、(0.59 ± 0.07),三组间 Notch1 mRNA 比较,差异有统计学意义($F = 39.21, P = 0.002$);Hes1 mRNA 相对表达量分别为(1.01 ± 0.08)、(0.20 ± 0.04)、(0.84 ± 0.09),三组间 Hes1 mRNA 比较,差异有统计学意义($F = 56.32, P = 0.0006$)。与空白组比较,模型组大鼠视网膜组织 Notch1、Hes1 mRNA 表达水平显著降低($P = 0.005, 0.006$);与模型组比较,治疗组大鼠视网膜组织 Notch1、Hes1 mRNA 表达水平显著升高($P = 0.003, 0.016$)。见图 5。

2.5 各组大鼠视网膜组织 Notch1、Hes1 蛋白表达水平比较

空白组、模型组和治疗组 Notch1 蛋白相对表达量分别为(0.99 ± 0.09)、(0.26 ± 0.05)、(0.48 ± 0.06),三组间 Notch1 蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义($F = 34.84, P = 0.001$);Hes1 蛋白相对表达量分别为(1.05 ± 0.12)、(0.29 ± 0.03)、(0.80 ± 0.07),三组间 Hes1 蛋白相对表达量比较,差异有

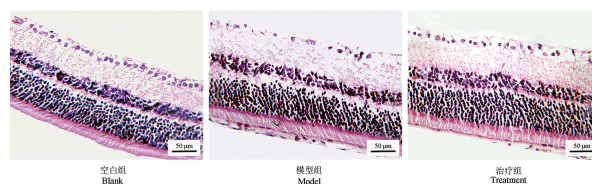


图 1 各组大鼠 RGCs 病理学变化(HE 染色)

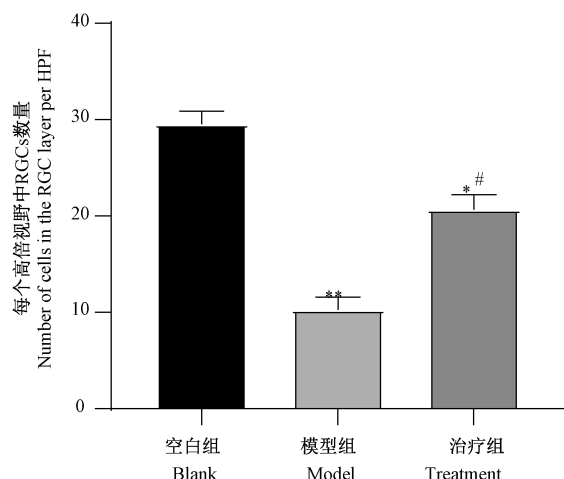
Figure 1 Pathological changes of RGCs in each group of rats(HE staining)

统计学意义 ($F = 29.58, P = 0.003$)。与空白组比较,模型组大鼠视网膜组织 Notch1、Hes1 蛋白表达水平显著降低 ($P = 0.023, 0.031$);与模型组比较,治疗组大鼠视网膜组织 Notch1、Hes1 蛋白表达水平显著升高 ($P = 0.019, 0.026$)。见图 6。

3 讨论

DR 是 DM 的常见并发症之一,可导致 RGCs 大量凋亡,而 RGCs 被损伤可直接影响患者视力,严重者可导致失明^[11]。DR 的发病机制复杂,可能的原因包括代谢紊乱、氧化应激损伤、神经营养因子缺乏等,而 RGCs 损伤是多因素、多途径和多阶段共同作用的结果^[12]。目前,DR 的治疗方法包括药物、激光、手术及基因治疗,各种新的疗法和途径均在不断深入探索中^[13]。胰激肽原酶是一种具有扩张血管、改善微循环作用的蛋白水解酶,近年来,被广泛

用于糖尿病肾病、周围神经性病变及 DM 相关男性勃起功能障碍的治疗^[5,14-15]。Cheng 等^[16]研究表明,胰激肽原酶能够预防 DM 动物模型的视网膜病变,增加视网膜层厚度并减弱血管渗漏,是治疗 DR 的一种新的治疗剂,但其作用机制尚不清楚。在本研究中,我们采用单次腹腔注射 STZ 的方法建立大鼠 DM 模型,观察胰激肽原酶对大鼠 DR 的保护作用,病理切片结果显示,空白组大鼠的视网膜组织各层结构清晰,RGCs 排列整齐有序,几乎没有凋亡细胞,而模型组大鼠的 RGCs 排列紊乱、不规则,细胞核稀疏,细胞数量显著减少,且凋亡细胞数量较多,阳性着色较深,与模型组比较,治疗组视网膜 RGCs 细胞核清晰,排列整齐,RGCs 数量显著增加,凋亡细胞数量减少,阳性着色相对较浅,初步表明胰激肽原酶对 DM 大鼠 RGCs 具有保护作用,能够提高 RGCs 数量,防止细胞凋亡。

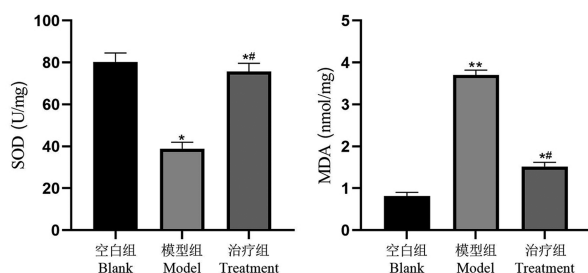


注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠 RGCs 数量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Note. Compared with the blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, # $P < 0.05$.

Figure 2 Comparison of the number of RGCs in each group



注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图 4 各组大鼠视网膜组织 SOD 活力和 MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Note. Compared with the blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, # $P < 0.05$.

Figure 4 Comparison of SOD activity and MDA content in retina tissue of rats in each group

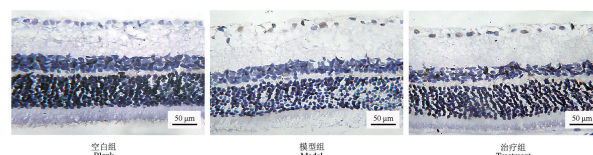
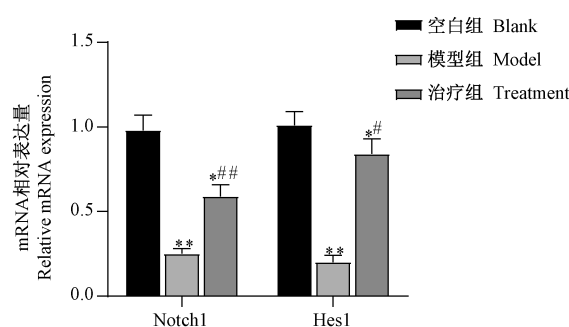


图 3 各组大鼠 RGCs 凋亡情况比较 (TUNEL 染色)

Figure 3 Comparison of RGCs apoptosis in rats in each group (TUNEL staining)

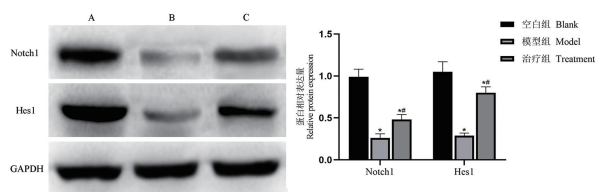


注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 5 各组大鼠视网膜组织 Notch1、Hes1 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Note. Compared with the blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 5 Comparison of Notch1 and Hes1 mRNA expression levels in the retina of rats in each group



注:A.空白组;B.模型组;C.治疗组;与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

图6 各组大鼠视网膜组织 Notch1、Hes1 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=18$)

Note. A, Blank group. B, Model group. C, Treatment group. Compared with the blank group, * $P<0.05$. Compared with the model group, $^{\#}P<0.05$.

Figure 6 Comparison of Notch1 and Hes1 protein expression levels in rat retina

氧化应激是Ⅱ型糖尿病发生和发展的重要原因和过程,可导致胰岛 β 细胞功能损伤及胰岛素抵抗,另有研究表明,氧化应激反应与DR、青光眼和视神经炎等多种疾病中RGCs凋亡现象有关,抗氧化应激药物的使用则可有效保护RGCs,降低RGCs凋亡率,从而控制疾病发展^[17-18]。SOD是人体重要的自由基清除剂,可阻断氧自由基造成的细胞损害,保护受损细胞,MDA是机体脂质过氧化反应产物,可使视网膜细胞的流通性和通透性改变,最终可导致视网膜结构损伤,当视网膜缺血缺氧情况下,氧化应激反应显著增加,表现为SOD活力降低而MDA水平升高^[19]。在本研究中,我们检测了DM大鼠视网膜组织中SOD和MDA含量,结果显示,与空白组比较,模型组大鼠SOD水平显著降低,而MDA含量显著升高,与模型组比较,治疗组SOD活力显著提高,MDA含量显著降低,表明胰激肽原酶能够抑制DR氧化应激反应。Notch信号通路是一种进化保守的信号转导途径,已有研究证明,Notch信号通路可调节细胞增殖、凋亡及血管新生,是机体新陈代谢的关键参与者,该信号通路的活化能够减轻氧化应激对机体的损伤^[20-21]。研究表明,Notch信号转导途径在视网膜血管形成过程中定期表达,也通过调节血管直径保持视网膜血管成熟稳定,而Notch信号通路的表达缺失则使血管动态平衡被破坏,对维持静态内皮细胞的稳定至关重要^[22]。Li等^[23]研究发现,Notch信号通路能够抑制急性高眼压大鼠RGCs细胞凋亡,促进受损视神经的再生。刘文强等^[24]认为,激活Notch1/Hes-1信号通路能够对DM状态下的RGCs损伤产生神经保护作用。与上述研究结果一致,本研究发现,模型组大鼠视网膜组织

Notch1、Hes1 mRNA和蛋白表达水平显著低于空白组,与模型组比较,治疗组大鼠视网膜组织Notch1、Hes1 mRNA和蛋白表达水平显著升高,表明胰激肽原酶能够上调DM大鼠视网膜组织Notch1/Hes-1信号通路的表达水平,进而产生抑制RGCs细胞凋亡和氧化应激损伤的作用。

综上所述,胰激肽原酶能够改善DM大鼠视网膜病变,抑制RGCs细胞数量减少和细胞凋亡,减少氧化应激损伤,其作用机制可能与激活Notch1/Hes-1信号通路的表达有关。

参考文献:

- [1] Strain WD, Paldanius PM. Diabetes, cardiovascular disease and the microcirculation [J]. Cardiovasc Diabetol, 2018, 17(1): 57.
- [2] Lee R, Wong TY, Sabanayagam C. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss [J]. Eye Vis (Lond), 2015, 2: 17.
- [3] Paddock E, Looker HC, Piaggi P, et al. One-hour plasma glucose compared with two-hour plasma glucose in relation to diabetic retinopathy in American Indians [J]. Diabetes Care, 2018, 41(6): 1212-1217.
- [4] Potilinski MC, Lorenc V, Perisset S, et al. Mechanisms behind retinal ganglion cell loss in diabetes and therapeutic approach [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2351.
- [5] 石智勇, 靳立英, 辛国辉, 等. 胰激肽原酶联合替米沙坦治疗早期糖尿病肾病 [J]. 中国实用医药, 2018, 13(9): 132-133.
- [6] 刘克锋, 周霖, 赵杰. 胰激肽原酶联合递法明治疗糖尿病视网膜病变的疗效观察 [J]. 中国药房, 2016, 27(2): 250-252.
- [7] 杨岚, 代海燕, 帅天姣, 等. 康柏西普眼内注射联合胰激肽原酶对糖尿病视网膜病患者眼底血流动力学的影响 [J]. 实用药物与临床, 2018, 21(12): 1390-1393.
- [8] Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism [J]. Cell, 2009, 137(2): 216-233.
- [9] 张彬, 孟祥宝, 陈亚萍, 等. Notch信号通路在糖尿病并发症中的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4): 463-467.
- [10] 陈玲, 刘彦芳, 林萍. 玻璃体腔注射抗氧化剂NAC对早期糖尿病大鼠视网膜的保护作用 [J]. 国际眼科杂志, 2020, 20(3): 438-441.
- [11] Zhang J, Liu R, Kuang HY, et al. Protective treatments and their target retinal ganglion cells in diabetic retinopathy [J]. Brain Res Bull, 2017, 132: 53-60.
- [12] 李东洁, 吴迪, 张旭乡. 糖尿病视网膜神经节细胞损伤的研究进展 [J]. 国际眼科杂志, 2016, 16(4): 670-672.

(下转第127页)