

小檗皮水浸膏对 db/db 糖尿病小鼠视网膜病变的影响(II)

周邦华, 叶凡, 岳丽珺, 孟宪丽, 范刚, 赖先荣*
(成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] **目的:**观察小檗皮浸膏对基因突变自然发病型 db/db 糖尿病小鼠视网膜蛋白激酶 C- β (PKC- β), 缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α), 血管内皮细胞生长因子(VEGF)的影响, 探索该药防治糖尿病视网膜病变的作用机制。**方法:**选用 18 周龄 db/db 糖尿病小鼠, db/m 型同性同窝瘦型小鼠为对照。采用随机方法将 db/db 小鼠分为 db/db 组, 小檗皮高、中、低剂量组(1.50, 0.75, 0.38 g·kg⁻¹), 羟苯磺酸钙组(0.23 g·kg⁻¹), 盐酸小檗碱组(0.135 g·kg⁻¹)。相关药物连续 ig 2 个月, 并于 ig 2 个月末处死小鼠。采用免疫组化方法观察 3 种因子在视网膜结构的表达情况, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白质免疫印迹(Western blot)方法检测视网膜内 3 种因子的基因与蛋白表达。**结果:**与 db/m 组比较, db/db 组视网膜组织 PKC- β 、VEGF 免疫组化反应呈阳性, 表达显著增加($P < 0.01$); HIF-1 α 免疫组化反应呈阳性, 表达量有升高趋势, 但差异无统计学意义; db/db 组三种因子的基因与蛋白表达显著增加($P < 0.01$)。与 db/db 组比较, 羟苯磺酸钙组视网膜组织 PKC- β 免疫组化反应呈阳性, 表达显著降低($P < 0.05$), 小檗皮高剂量组视网膜组织 PKC- β 免疫组化反应呈阳性, 表达显著降低($P < 0.01$), 其他各给药组较 db/db 组 PKC- β 表达有降低趋势, 但差异无统计学意义; 各给药组视网膜组织 HIF-1 α 免疫组化反应呈阳性, 表达有降低趋势, 但差异无统计学意义; 小檗碱组、小檗皮低剂量组视网膜组织 VEGF 免疫组化反应呈阳性, 表达明显降低($P < 0.01$), 其他各给药组视网膜组织 VEGF 有降低趋势, 但差异无统计学意义。与 db/db 组比较, 羟苯磺酸钙组 HIF-1 α 基因表达明显降低($P < 0.05$), 其他各给药组 PKC- β 、HIF-1 α 、VEGF 基因表达有降低趋势, 但差异无统计学意义。与 db/db 组比较, 羟苯磺酸钙组、盐酸小檗碱组、小檗皮高、低剂量组 PKC- β 蛋白表达显著降低($P < 0.01$), 小檗皮中剂量组 PKC- β 蛋白表达有降低趋势, 但差异无统计学意义; 羟苯磺酸钙组、盐酸小檗碱组、小檗皮高、中剂量组 HIF-1 α 蛋白表达显著降低($P < 0.01$), 小檗皮低剂量组 HIF-1 α 蛋白表达量有降低趋势, 但差异无统计学意义; 各给药组 VEGF 蛋白表达显著降低($P < 0.01$)。**结论:**小檗皮浸膏防治 db/db 糖尿病小鼠视网膜病变的作用机制可能与抑制 PKC- β 、HIF-1 α 、VEGF 表达有关。

[关键词] 小檗皮; 基因突变自然发病型 db/db 糖尿病小鼠; 糖尿病视网膜病变; 蛋白激酶- β ; 缺氧诱导因子-1 α ; 血管内皮细胞生长因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)24-0116-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240116

Effect of Water Extract from Cortex of *Berberis dictyophylla* on Retinopathy in Spontaneous Type 2 Diabetic db/db Mice (II)

ZHOU Bang-hua, YE Fan, YUE Li-jun, MENG Xian-li, FAN Gang, LAI Xian-rong*
(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of water extract from cortex of *Berberis dictyophylla* (BDCE) on expressions of retinal protein kinaseC- β (PKC- β), hypoxia inducing factor-1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF) in spontaneous type 2 diabetic db/db mice, in order to explore its mechanism in preventing and treating diabetic retinopathy (DR). **Method:** Eighteen-week-old db/db mice were selected, with their thin db/m mice for normal control group. The db/db mice were randomly divided into 6 groups: model

[收稿日期] 20151218(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173360, 81303310, 81473427, 81560806); 四川省科技厅科技支撑计划项目(2011SZ0298); 四川省教育厅重点项目(10ZA092); 四川省高校科研创新团队建设计划项目(11TD004)

[第一作者] 周邦华, 硕士, 从事中药创新药物研究, Tel:028-61800074, E-mail:913676353@qq.com

[通讯作者] * 赖先荣, 副研究员, 从事中药及民族药创新药物研究, Tel:028-61800074, E-mail:alexon@126.com

control (db/db) group, high, middle and low-dose BDCE group ($1.50, 0.75, 0.38 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), calcium-dobesilate group ($0.23 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and berberine hydrochloride group ($0.135 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The mice were given relevant drugs for consecutively two months. At the end of the two-month treatment, all the mice were put to death. The immunohistochemical method was used to observe the expressions of the three factors on the retina. Real-time quantitative PCR and western blot methods were used to detect genes and proteins expressions level of PKC- β , HIF-1 α and VEGF in retina. **Result:** Compared to db/m group, the immunohistochemical results showed positive reaction of PKC- β and VEGF in retinal tissues of db/db group, with significant increase in expressions ($P < 0.01$); positive reaction of HIF-1 α , with no significant increase in expressions of db/db group; mRNA and protein expressions of PKC- β , HIF-1 α , VEGF increased significantly in db/db group ($P < 0.01$). Compared to db/db group, the immunohistochemical results showed positive reaction of PKC- β on retinal tissues in calcium-dobesilate group, with significant decrease of expression ($P < 0.05$); positive reaction of PKC- β on retinal tissues in high-dosage BDCE group, with significant decrease of expression ($P < 0.01$); a downward trend in PKC- β expression in other treatment groups compared with the db/db group, with no statistical significance in difference; positive reaction of HIF-1 α on retinal tissue in all treatment groups, with no significant decrease of expression; positive reaction of VEGF on retinal tissues in berberine hydrochloride group and low-dose BDCE group, with significant decrease of expression ($P < 0.01$); and positive reaction of VEGF on retinal tissue in all other treatment groups, with no significant decrease of expression. Compared with db/db group, real-time quantitative PCR results showed significant decreased mRNA expressions of HIF-1 α in calcium-dobesilate group ($P < 0.05$), decreased PKC- β , HIF-1 α , VEGF mRNA expressions in other treatment groups, with no significant decrease. Compared with db/db group, Western blot results showed significant decreased protein expressions of PKC- β in calcium-dobesilate group, berberine hydrochloride group, and high and low-dose BDCE groups ($P < 0.01$), and slightly decreased protein expressions of PKC- β in middle-dose BDCE group, with no significant decrease. Western blot results showed significant decreased protein expressions of HIF-1 α in calcium-dobesilate group, berberine hydrochloride group, high and middle-dose BDCE groups ($P < 0.01$), slightly decreased protein expressions of HIF-1 α in BDCE low-dose group, with no significant decrease; Western blot results showed significant decreased protein expressions of HIF-1 α in all treatment groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** BDCE was an efficient Tibetan medicine to prevent and treat DR, whose mechanism may be correlated with inhibition the expressions of PKC- β , HIF-1 α , VEGF.

[**Key words**] cortex of *Berberis dictyophylla*; spontaneous type 2 diabetic db/db mice; diabetic retinopathy; retinal protein kinaseC- β ; hypoxia inducing factor-1 α ; vascular endothelial growth factor

“糖尿病是当前威胁全球人类健康的最重要的非传染性疾病之一。”(中华医学会糖尿病学分会《中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版)》)。“2014 年,全球 18 岁以上的成年人中糖尿病的患病率估计为 9%。”“随着时间的推移,糖尿病可能损害心脏、血管、眼睛、肾脏和神经。”(2015 年 1 月,世界卫生组织《糖尿病·实况报道·第 312 号》),主要引起糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)等糖尿病并发症^[1]。DR 的高血糖、低氧环境,促使蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 途径激活,诱导血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α) 的过量表达加速了 DR 进展^[2-3]。前期研究表明,小

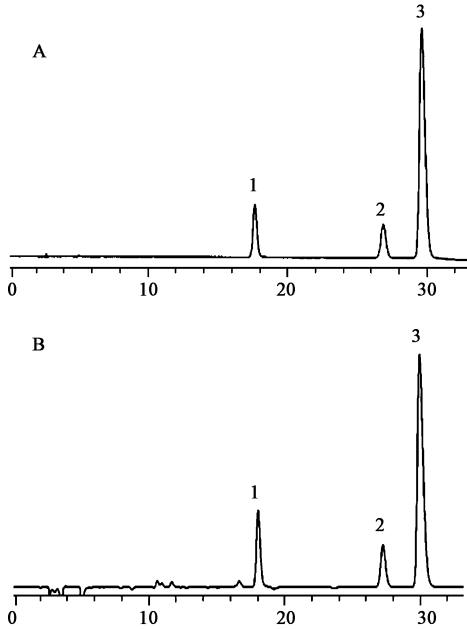
檗皮浸膏(water extract from cortex of *Berberis dictyophylla*, BDCE)明显降低了实验性糖尿病 DR 模型的血糖水平,同时,对 DR 具有明显的血管功能保护作用^[4-6]。本研究进一步观察 BDCE 对基因突变自然发病型 db/db 糖尿病小鼠视网膜 PKC- β , VEGF, HIF-1 α 在基因水平、蛋白水平上的影响,有助于探索该药防治 DR 的作用机制^[7]。

1 材料

1.1 动物 db/db 糖尿病小鼠动物来源、周龄、级别、体重、动物合格证号、饲养条件及饲料来源等内容详见研究论文 I^[8]。

1.2 药物及试剂 小檗皮饮片来源, BDCE 制备方法, 受试药物剂量设置, 羟苯磺酸钙胶囊剂量设置, 盐酸小檗碱剂量设置等内容详见研究论文 I^[8]。

BDCE 采用 HPLC 法测定, HPLC 色谱图见图 1, 按干燥品计算, BDCE(TMBCC-1) 每 1 g 浸膏含盐酸小檗碱($C_{20}H_{17}NO_4 \cdot HCl$) 为 60.26 mg, 盐酸药根碱($C_{20}H_{20}NO_4 \cdot HCl$) 为 11.51 mg, 盐酸巴马汀($C_{21}H_{21}NO_4 \cdot HCl$) 为 8.59 mg^[9]。SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒, RNAiso Plus 试剂盒, PrimeScript RT reagent 试剂盒, RNA Loading Buffer 及 RNA Marker RL 6000(宝生物工程公司, 批号分别为 BK402, BK3303, BK501, A501A, AK101); 兔抗 VEGF, HIF-1 α , PKC- β 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司, 批号分别为 bs-1313R, bs-0737R, bs-10228R)。其他试剂均为免疫组化, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR), 蛋白质免疫印迹(Western blot) 检测的常规试剂。



Wondasil C₁₈-WR 色谱柱; 流动相 0.3% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B) 梯度洗脱; 检测波长 345 nm; 1. 盐酸药根碱; 2. 盐酸巴马汀; 3. 盐酸小檗碱

图 1 混合对照品(A) 及小檗皮浸膏(B) HPLC 色谱
Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances(A) and BDCE(B)

1.3 仪器 2015 型切片机(德国克林蓝公司), CKX41 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司), Motic BA400 型显微摄像系统(麦克奥迪公司), PIKORed96 型 Real-time PCR 仪, TCA0096 型热循环仪及 MK3 型多功能酶标仪(美国 ThermoFisher 公司); JY200C 型电泳仪, JY-SPFT 型电泳槽及 JY-Clear ECL 化学发光凝胶成像仪(北京君意东方电泳设备有限公司); Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件包(美国 Media Cybernetics 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药、一般体征状态观察、空腹血糖水平测定 详见研究论文 I^[8]。

2.2 组织取材 动物处死后, 摘取眼球, 迅速剖取视网膜组织, 用冰生理盐水洗净血迹后, 放置液氮中快速冷冻, 然后转移至 -86 °C 超低温冰箱保存备用。

2.3 免疫组化检测 VEGF, HIF-1, PKC- β 的表达 取视网膜组织, 石蜡包埋, 切片, 常规脱蜡, 置枸橼酸溶液(pH6.0) 中, 加热至沸腾后, 间隔 5 min 后, 反复 1 次, 冷却后, PBS 溶液冲洗, 加入山羊血清封闭液, 室温孵育 20 min, 加入一抗工作液, 4 °C 过夜, PBS 冲洗; 阴性对照以 PBS 溶液代替一抗进行实验。免疫组化常规操作, 室温显色, 镜下控制反应时间, 蒸馏水冲洗。苏木精复染。常规脱水、透明, 封片。通过显微摄像系统, 采用图像分析软件对切片进行图像采集。每张切片分别选取 1~3 个区域 400 倍采集图像, 采集各组大鼠视网膜组织积分吸光度 IA。阳性表达: 颜色为棕黄色, 阴性表达为蓝色, 底色为白色。

2.4 Real-time PCR 检测 PKC- β , HIF-1 α , VEGF 基因表达 取视网膜组织, 迅速转移至预冷的 RNAiso Plus 试剂中匀浆, 常规提取组织总 RNA, 待 RNA 沉淀完全, 加适量无 RNA 酶的无菌水溶解后于 -80 °C 保存。酶标仪紫外分光光度法鉴定 RNA 纯度。PrimeScript RT reagent Kit 进行基因组 DNA 的除去反应、逆转录反应。目的基因及相应的内参基因 GAPDH 的 mRNA 特征性引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成并纯化, 见表 1。按 Real-time PCR(SYBR GREEN) 反应体系进行 RT-PCR 扩增和检测。

$$\Delta C_t = C_{t \text{目的 mRNA}} - C_{t \text{内参 mRNA}}; \Delta \Delta C_t = \Delta C_{t \text{实验组}} - \Delta C_{t \text{对照组}}$$

2.5 Western blot 检测 PKC- β , HIF-1 α , VEGF 蛋白表达 取视网膜组织, 放入到 RAPI 裂解液中, 加入抑制剂后常规充分研磨、冰浴, 于 12 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液。常规测定蛋白浓度; 取组织裂解蛋白 100 μ g 加样 SDS-PAGE, 常规电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育。显影、定影。用凝胶图像分析成像系统进行扫描分析, 结果以目的蛋白相对表达量表示。

2.6 统计学分析 数据统计采用 SPSS 17.0 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 试验结果

3.1 对一般体征、空腹血糖水平的影响 结果表明

表 1 相关引物核苷酸序列

Table 1 Nucleotide sequences of related primers

名称	上游序列	下游序列	扩增产物/bp
PKC-β	5'-GGAAGCGAGGGCAATGAA-3'	5'-TCATCTGTACCCCTTCCGC-3'	228
HIF-1α	5'-CCTAACTTTTCCCAGCCTAACA-3'	5'-AGCCAGCATCTCCAAATCTAAA-3'	228
VEGF	5'-AGTCTGTGCTCTGGGATTTGAT-3'	5'-GCTCTTGATACCTCTTTCTGCTG-3'	480
GAPDH	5'-CCAAGGTCATCCATGACAAC-3'	5'-TGTCATACCAGGAAATGAGC-3'	308

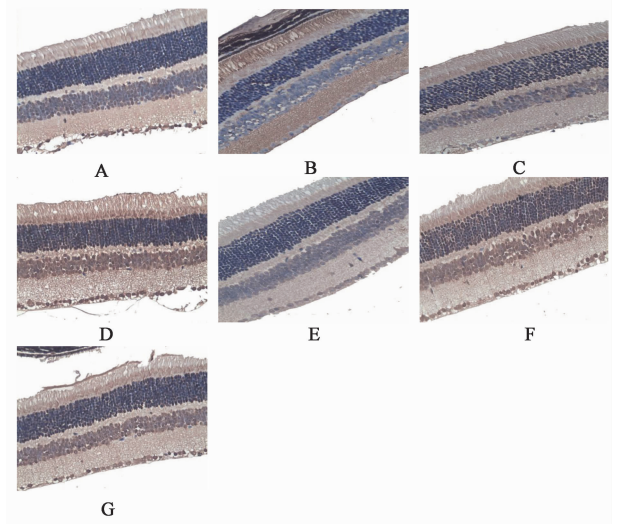
小檗皮对 db/db 糖尿病小鼠的一般体征无显著性影响,具有降低高血糖水平作用^[8]。

3.2 免疫组化检测结果

3.2.1 对视网膜组织 PKC-β 表达的影响 与 db/m 组比较,db/db 组 PKC-β 表达显著增加 ($P < 0.01$)。与 db/db 组比较,羟苯磺酸钙组 PKC-β 表达显著降低 ($P < 0.05$),小檗皮高剂量组 PKC-β 表达显著降低 ($P < 0.01$),其他各给药组 PKC-β 表达有降低趋势,但差异无统计学意义。见表 2,图 2。

3.2.2 对视网膜组织 HIF-1α 表达的影响 与 db/m 组比较,各组 HIF-1α 表达无统计学意义;与 db/db 组比较,各给药组 HIF-1α 表达较都有降低趋势,但差异无统计学意义。见表 2,图 3。

3.2.3 对视网膜组织 VEGF 表达的影响 与 db/m 组比较,db/db 组 VEGF 的表达显著增加 ($P < 0.01$);与 db/db 组比较,小檗碱组、小檗皮低剂量组 VEGF 表达显著降低 ($P < 0.01$),其他各给药组 VEGF 表达有降低趋势,但差异无统计学意义。见表 2,图 4。



A. db/m 组; B. db/db 组; C. 羟苯磺酸钙 0.23 g·kg⁻¹ 组; D. 小檗碱 0.135 g·kg⁻¹ 组; E. 小檗皮 1.50 g·kg⁻¹ 组; F. 小檗皮 0.75 g·kg⁻¹ 组; G. 小檗皮 0.38 g·kg⁻¹ 组 (图 3~5 同)

图 2 各组糖尿病 db/db 小鼠视网膜组织 PKC-β 表达 (免疫组化, ×400)

Fig.2 PKC-β expression in db/db mice of each groups (IHC, ×400)

表 2 小檗皮对 db/db 糖尿病小鼠视网膜组织 PKC-β, HIF-1α, VEGF 蛋白 (IA) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of BDCE on PKC-β, HIF-1α, VEGF protein (IA) expressions of in db/db mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PKC-β	HIF-1α	VEGF
db/m	-	0.146 4 ± 0.039 9 ²⁾	0.118 3 ± 0.026 6	0.217 2 ± 0.011 0 ²⁾
db/db	-	0.230 0 ± 0.023 3	0.127 4 ± 0.034 6	0.250 5 ± 0.015 4
羟苯磺酸钙	0.23	0.183 9 ± 0.014 6 ¹⁾	0.118 7 ± 0.041 3	0.240 0 ± 0.007 1
小檗碱	0.135	0.198 1 ± 0.008 3	0.120 4 ± 0.022 0	0.202 8 ± 0.014 4 ²⁾
小檗皮	1.50	0.177 2 ± 0.010 4 ²⁾	0.126 4 ± 0.022 4	0.239 7 ± 0.007 6
	0.75	0.214 8 ± 0.007 0	0.118 6 ± 0.022 1	0.251 8 ± 0.018 1
	0.38	0.213 3 ± 0.008 9	0.119 8 ± 0.033 7	0.214 9 ± 0.011 7 ²⁾

注:与 db/db 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

3.3 对视网膜组织 PKC-β, HIF-1α, VEGF mRNA 表达的影响 与 db/m 组比较,db/db 组 PKC-β, HIF-1α, VEGF 基因表达显著增加 ($P < 0.01$);与 db/db 组比较,羟苯磺酸钙组 HIF-1α 基因表达明显降低 ($P < 0.05$);其他各给药组 PKC-β, HIF-1α, VEGF 基

因表达均有降低趋势,但差异无统计学意义。见表 3。

3.4 Western blot 检测结果

3.4.1 对 PKC-β 蛋白表达的影响 与 db/m 组比较,db/db 组 PKC-β 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$);

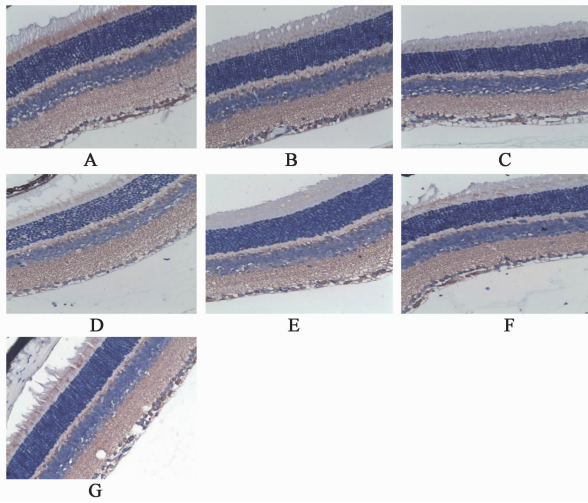


图 3 各组糖尿病 db/db 小鼠视网膜组织 HIF-1 α 表达 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 3 HIF-1 α expression in db/db mice of each groups (IHC, $\times 400$)

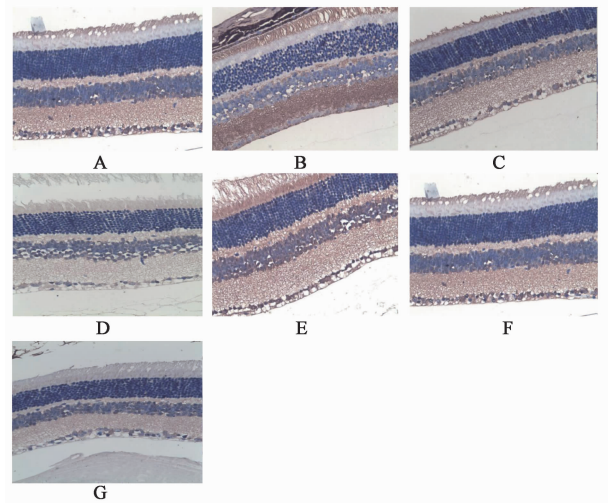


图 4 各组糖尿病 db/db 小鼠视网膜组织 VEGF 表达 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 4 VEGF expression in db/db mice of each groups (IHC, $\times 400$)

表 3 小檗皮对 db/db 糖尿病小鼠视网膜病变 PKC- β , HIF-1 α , VEGF mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of BDCE on PKC- β , HIF-1 α , VEGF mRNA expressions in db/db mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	PKC- β	HIF-1 α	VEGF
db/m	-	1.008 4 \pm 0.144 9 ²⁾	1.016 7 \pm 0.214 3 ²⁾	1.007 9 \pm 0.139 4 ²⁾
db/db	-	1.774 9 \pm 0.142 0	1.616 6 \pm 0.042 6	1.504 6 \pm 0.176 8
羧苯磺酸钙	0.23	1.376 8 \pm 0.269 4 ²⁾	1.263 3 \pm 0.214 0 ¹⁾	1.215 7 \pm 0.232 2 ²⁾
小檗碱	0.135	1.629 9 \pm 0.242 7	1.397 0 \pm 0.219 0	1.352 6 \pm 0.242 7
小檗皮	1.50	1.621 3 \pm 0.663 0	1.577 2 \pm 0.614 4	1.455 2 \pm 0.592 8
	0.75	1.560 6 \pm 0.190 1	1.581 3 \pm 0.184 2	1.294 2 \pm 0.186 5
	0.38	1.881 6 \pm 0.312 4	1.500 7 \pm 0.080 8	1.421 9 \pm 0.227 7

与 db/db 组比较,羧苯磺酸钙组、小檗碱组、小檗皮高剂量组、小檗皮低剂量组 PKC- β 蛋白表达显著降

低 ($P < 0.01$),小檗皮中剂量组 PKC- β 蛋白表达有降低趋势,但差异无统计学意义。见表 4,图 5。

表 4 小檗皮对 db/db 糖尿病小鼠视网膜 PKC- β , HIF-1 α , VEGF 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of BDCE on PKC- β , HIF-1 α , VEGF protein expressions in db/db mice ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	PKC- β /GAPDH	HIF-1 α /GAPDH	VEGF/GAPDH
db/m	-	0.125 0 \pm 0.010 2 ²⁾	0.235 3 \pm 0.015 8 ²⁾	0.287 1 \pm 0.012 6 ²⁾
db/db	-	0.453 1 \pm 0.014 2	0.690 1 \pm 0.018 9	0.678 8 \pm 0.020 7
羧苯磺酸钙	0.23	0.329 1 \pm 0.010 8 ²⁾	0.568 9 \pm 0.113 4	0.435 4 \pm 0.015 1 ²⁾
小檗碱	0.135	0.336 9 \pm 0.019 2 ²⁾	0.452 4 \pm 0.017 7 ²⁾	0.414 9 \pm 0.019 0 ²⁾
小檗皮	1.50	0.239 8 \pm 0.013 2 ²⁾	0.392 3 \pm 0.010 8 ²⁾	0.392 2 \pm 0.010 8 ²⁾
	0.75	0.478 1 \pm 0.015 6	0.494 4 \pm 0.024 7 ²⁾	0.478 1 \pm 0.015 6 ²⁾
	0.38	0.310 5 \pm 0.017 5 ²⁾	0.575 1 \pm 0.185 1	0.519 5 \pm 0.011 6 ²⁾

3.4.2 对 HIF-1 α 蛋白表达的影响 与 db/m 组比较,db/db 组 HIF-1 α 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$); 与 db/db 组比较,羧苯磺酸钙组、小檗碱组、小檗皮

高、中剂量组 HIF-1 α 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$),小檗皮低剂量组 HIF-1 α 蛋白表达量有降低趋势,但差异无统计学意义。见表 4,图 5。

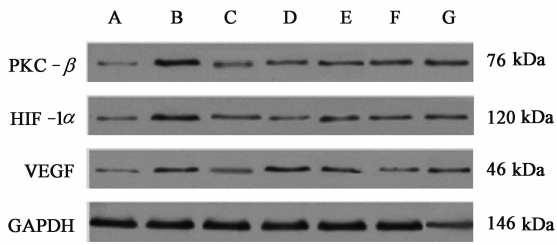


图 5 Western blot 检测小檗皮对 db/db 糖尿病小鼠视网膜 PKC- β , HIF-1 α , VEGF 蛋白表达

Fig. 5 Western blot results of BDCE on PKC- β , HIF-1 α , VEGF protein expressions in db/db mice

3.4.3 对 VEGF 蛋白表达的影响 与 db/m 组比较, db/db 组 VEGF 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$); 与 db/db 组比较, 各给药组 VEGF 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。见表 4, 图 5。

4 讨论

本研究结果表明与 db/m 组比较, db/db 组 PKC- β , HIF-1 α , VEGF 表达显著增加; 与 db/db 组比较, 小檗皮各给药组 PKC- β , HIF-1 α , VEGF 表达均有降低趋势。提示机体处于高血糖、低氧状态下, 这些因素共同构成了血管内皮损伤关键信号传导通路, 在 DR 的发生发展过程中发挥着重要作用^[2-3]。李强等实验研究发现, 采用糖尿病性 GK 大鼠模型, 检测到 PKC 活性增加, VEGF 表达增加, 破坏血-视网膜屏障, 造成视网膜微血管内皮细胞的损伤^[10]。同时, HIF-1 α /VEGF 低氧诱导的信号通路偶联表达呈正相关性增强^[11], 临床研究发现, 进入增殖期后, DR 患者 HIF-1 α , VEGF 水平显著增加, 且随着病情的严重程度呈相关性增加^[12]。但是 HIF-1 α , VEGF 同时又是机体的保护性适应, 因此, 调控 HIF-1 α , VEGF 的适度稳定表达有助于糖尿病视网膜病变的防治^[11]。结合前期研究结果^[4-6], 说明小檗皮还可以调节血糖水平, 改善机体的长期慢性高血糖、低氧环境, 延缓糖尿病视网膜病变进一步发生发展, 从而起到一定的预防和治疗作用。

[参考文献]

- [1] 赵艳茹, 尹福在, 齐曦明. 趋化因子与糖尿病微血管并发症[J]. 河北医药, 2013, 35(2): 264-268.
- [2] 刘路宏, 廖品正, 段俊国, 等. 高血糖对大鼠视网膜蛋白激酶 C 的影响[J]. 长治医学院学报, 2003, 17(1): 1-3.
- [3] 王静, 朱鸿, 施彩虹. 糖尿病大鼠视网膜中内质网应激蛋白、HIF-1 α 和血管内皮生长因子的表达[J]. 国际眼科杂志, 2015, 15(5): 772-776.
- [4] 岳丽珺, 孟宪丽, 张燕, 等. 藏药小檗皮对糖尿病大鼠视网膜 PKC、VEGF、HIF-1 α 表达的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(1): 181-186.
- [5] 岳丽珺, 张燕, 向丽, 等. 藏药吉尔巴对糖尿病性视网膜病变的影响及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20): 149-153.
- [6] 张燕, 孟宪丽, 岳丽珺, 等. 藏药小檗皮对糖尿病模型小鼠血糖水平影响的初步研究[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(19): 3619-3622, 3607.
- [7] 岳丽珺. 藏药吉尔巴对自发性糖尿病小鼠视网膜病变的药效及机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
- [8] 叶凡, 岳丽珺, 范刚, 等. 藏药小檗皮水浸膏对 db/db 糖尿病小鼠视网膜病变的影响(I)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2): 82-86.
- [9] 叶凡, 周邦华, 王胜, 等. HPLC 法测定藏药小檗膏提取物中 3 种生物碱的含量[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(2): 286-289.
- [10] 李强. 芪灯明目胶囊对自发性糖尿病大鼠视网膜蛋白激酶 C 及玻璃体血管内皮生长因子影响的实验研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2007.
- [11] 徐国兴, 许建斌, 胡建章. 糖尿病大鼠视网膜中缺氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子表达的研究[J]. 国际眼科杂志, 2008, 8(3): 487-489.
- [12] Wang X Q, Wang G B, Wang Y. Intravitreal vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 α in patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. Am J Ophthalmol, 2009, 148(6): 883-889.

[责任编辑 周冰冰]