

红景天苷抑制高糖诱导大鼠视网膜 Müller 细胞的凋亡

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3108>赵宁¹, 于洪丹², 冯珍², 丁佳媛², 刘学政¹

2095-4344.3108

投稿日期: 2020-04-03

送审日期: 2020-04-28

采用日期: 2020-05-27

在线日期: 2020-10-20

中图分类号:

R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2021)11-01664-06

文献标识码: B

文章快速阅读:

文章特点一

△红景天苷能通过激活 PI3K/Akt 通路抑制高糖诱导的氧化应激和细胞凋亡, 减轻大鼠视网膜 Müller 细胞损伤。

大鼠视网膜 Müller 细胞

高糖处理

分组:

- (1) 正常对照组;
- (2) 高糖损伤组;
- (3) 红景天苷组;
- (4) PI3K 抑制剂组。

检测:

- (1) 细胞活力;
- (2) 活性氧水平;
- (3) 超氧化物歧化酶、过氧化氢酶的活力;
- (4) 细胞凋亡情况;
- (5) PI3K、AKT、P-AKT、Cleaved caspase-3 蛋白表达。

文题释义:

视网膜Müller细胞: Müller细胞是视网膜中数量最多的胶质细胞, 横跨整个视网膜层, 是视网膜重要组成部分。Müller细胞不仅营养和支持视网膜神经元, 同时摄取神经递质、参与神经突触传导、感受神经元信号、维持神经内微环境稳态, 在维持视网膜结构完整性及生理功能方面具有重要作用。

糖尿病视网膜病变: 是糖尿病最常见、最严重的并发症之一, 主要由胰岛素激素和细胞代谢异常引发的神经、血管微循环的改变和视功能损伤。糖尿病患者血液组成的变化导致血管内皮细胞功能障碍, 造成血-视网膜屏障损伤, 继而引发小血管渗漏。

摘要

背景: 有研究发现红景天苷对糖尿病视网膜病变有改善作用, 但红景天苷对高糖引起视网膜Müller细胞损伤的保护作用尚不明确。

目的: 探讨红景天苷对高糖诱导的大鼠视网膜Müller细胞系(rMC-1)氧化应激及细胞凋亡的保护作用及其作用机制。

方法: 高糖培养rMC-1细胞模拟高糖环境, 实验分为4组: 正常对照组; 高糖损伤组(培养基葡萄糖浓度为35.5 mmol/L); 红景天苷组(加入红景天苷处理4 h, 再加入高糖共同孵育); PI3K 抑制剂组(红景天苷和PI3K抑制剂共同处理4 h, 再加入高糖共同孵育)。48 h后使用CCK8法检测各组细胞活力, DCFH-DA荧光探针检测活性氧水平, 采用试剂盒测定超氧化物歧化酶、过氧化氢酶的活力。流式细胞术检测各组细胞凋亡情况, 采用Western blot检测PI3K、AKT、磷酸化AKT(P-AKT)、Cleaved caspase-3蛋白表达的变化。

结果与结论: ①与正常对照组相比, 高糖损伤组细胞活力、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活力显著降低, 活性氧水平、细胞凋亡率明显增高, Cleaved caspase-3蛋白表达水平显著增加, 而P-Akt /Akt 蛋白表达比值降低(均为 $P < 0.05$); ②与高糖损伤组比较, 红景天苷组细胞存活率、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活力明显升高, 活性氧水平、细胞凋亡率显著降低, Cleaved caspase-3 蛋白表达水平显著下降, P-Akt /Akt 蛋白表达比值增加($P < 0.05$); ③PI3K抑制剂组各指标与高糖损伤组无显著差异($P > 0.05$); ④结果说明, 红景天苷能通过激活PI3K/Akt通路抑制高糖诱导的氧化应激和细胞凋亡, 减轻rMC-1细胞损伤。

关键词: 视网膜; 红景天苷; Müller细胞系; 氧化应激; 细胞凋亡; 实验; 鼠; 因子

Salidroside inhibits apoptosis of retinal Müller cells induced by high glucose in rats

Zhao Ning¹, Yu Hongdan², Feng Zhen², Ding Jiayuan², Liu Xuezheng¹¹College of Integrative Chinese and Western Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning Province, China;²Department of Anatomy, School of Basic Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Zhao Ning, Master, Lecturer, College of Integrative Chinese and Western Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning Province, China

Corresponding author: Liu Xuezheng, MD, Professor, College of Integrative Chinese and Western Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning Province, China¹ 辽宁中医药大学中西医结合学院, 辽宁省沈阳市 110847; ² 锦州医科大学基础医学院解剖学教研室, 辽宁省锦州市 121001

第一作者: 赵宁, 女, 辽宁省凌海市人, 汉族, 2014年南昌大学毕业, 硕士, 讲师, 主要从事糖尿病视网膜病变研究。

通讯作者: 刘学政, 博士, 教授, 辽宁中医药大学中西医结合学院, 辽宁省沈阳市 110847

<https://orcid.org/0000-0001-8313-9478> (赵宁)

引用本文: 赵宁, 于洪丹, 冯珍, 丁佳媛, 刘学政. 红景天苷抑制高糖诱导大鼠视网膜 Müller 细胞的凋亡 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(11):1664-1669.



Abstract

BACKGROUND: It has been found that salidroside can improve diabetic retinopathy. However, it is not clear whether salidroside can protect retinal Müller cells (rMC-1) against damage induced by high glucose.

OBJECTIVE: To investigate the effect and mechanism of salidroside on oxidative stress and apoptosis induced by high glucose in rat rMC-1 cells.

METHODS: The rMC-1 cells were divided into four groups: normal control group, high glucose group (culture medium with a final glucose concentration of 35.5 mmol/L), salidroside group (treatment with salidroside for 4 hours followed by co-culture with high glucose) and PI3K inhibitor group (treatment with salidroside and PI3K inhibitor for 4 hours followed by co-culture with high glucose). The viability of the rMC-1 cells was measured by cell counting kit-8 assay. Reactive oxygen species production was detected by DCFH-DA. The superoxide dismutase and catalase activities were tested by specific kits. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. Western blot was used to detect the expression levels of Cleaved caspase-3, PI3K, AKT and phosphorylated AKT.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the normal control group, the cell viability and the activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase) in the high glucose group were significantly decreased, the production of reactive oxygen species, apoptotic rate and the level of Cleaved caspase-3 were significantly increased, and the phosphorylated AKT/AKT ratio was down-regulated ($P < 0.05$). Compared with the high glucose group, salidroside significantly enhanced the cell viability and increased the activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase), decreased the production of reactive oxygen species, reduced the apoptotic rate of the cells and downregulated the expression level of Cleaved caspase-3 ($P < 0.05$). Salidroside also activated the phosphorylation of Akt ($P < 0.05$). Whereas, the addition of LY294002, a pharmacological inhibitor of PI3K, showed similar results in the high glucose group ($P > 0.05$). To conclude, salidroside can protect rMC-1 cells through inhibiting apoptosis and oxidative stress induced by high glucose. The main mechanism responsible for the inhibition of oxidative stress is the activation of the PI3K/Akt pathway.

Key words: retina; salidroside; Müller cell line; oxidative stress; apoptosis; experiment; rat; factor

How to cite this article: ZHAO N, YU HD, FENG Z, DING JY, LIU XZ. Salidroside inhibits apoptosis of retinal Müller cells induced by high glucose in rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(11):1664-1669.

0 引言 Introduction

糖尿病视网膜病变是糖尿病最常见、最严重的并发症之一，是成年人视力损害的主要原因^[1]。随着病情加重，约5%糖尿病患者因并发糖尿病视网膜病变致盲，严重影响患者的生命健康及生活质量^[2]。目前针对糖尿病视网膜病变的玻璃体切割等手术或糖皮质激素等药物治疗只能缓解症状并不能阻止病程发展^[3]。因此，探寻治疗糖尿病视网膜病变的新方法具有重要意义。

Müller细胞是视网膜中数量最多的胶质细胞，横跨整个视网膜层，在维持视网膜结构完整性及生理功能方面具有重要作用。研究发现，高糖诱导的Müller细胞氧化应激和细胞凋亡在糖尿病视网膜病变的发病机制中起重要作用。高糖不仅会增加Müller细胞内活性氧的产生，还会削弱抗氧化酶系统的能力，加重视网膜的氧化应激损伤^[4-6]。活性氧的增多导致Müller细胞线粒体功能障碍，通透性增加，继而激活caspase家族最终导致视网膜细胞凋亡^[7]。因此，阻断高糖诱导的Müller细胞氧化应激及细胞凋亡是治疗糖尿病视网膜病变的重要步骤之一。

红景天苷是中药红景天最有效的活性成分之一，具有抗氧化应激、抗衰老、抗炎、降糖等药理作用^[8-10]。有研究表明，红景天苷通过激活AKT信号通路介导的抗氧化应激、减少凋亡损伤发挥其有益作用^[11]；SHI等^[12]证明了红景天苷可以通过调节氧化状态和凋亡来保护视网膜内皮细胞免受过氧化氢诱导的损伤；QIAN等^[13]发现红景天苷通过下调miR-138减轻高糖诱导的视网膜色素上皮细胞系ARPE-19的损伤。但是红景天苷对高糖引起Müller细胞损伤的作用及相关机制报道并不多见。此次实验通过高糖培养大鼠视网膜Müller细胞系(retinal Müller cell line, rMC-1)模拟高糖环境，探讨高糖对rMC-1细胞氧化应激及凋亡损伤的影响，以及红景天苷的保护作用及机制，以期对糖尿病视网膜病变的预防和治疗寻找新的思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验观察。

1.2 时间及地点 实验于2019年8月至2020年1月在锦州医科大学解剖学实验室完成。

1.3 材料 大鼠视网膜Müller细胞rMC-1为锦州医科大学解剖学实验室液氮保存；红景天苷购自大连美伦生物技术有限公司，货号为MB5843；胎牛血清(FBS)购自杭州四季青有限公司，货号为061024；CCK8购自上海尚宝生物科技有限公司，货号为ST1008.01；活性氧试剂盒，LY294002购自碧云天生物技术研究所，货号分别为S0033, S1737；超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) WET-1法测定试剂盒、过氧化氢酶(catalase, CAT)测定试剂盒购自南京建成生物科技有限公司，货号分别为A001-3, A007-1；Annexin-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司，货号为CA1020-100T；PI3K, Akt, 磷酸化Akt(P-Akt)多克隆抗体购自affinity公司，货号分别为AF6241, AF6261, AF0016；Cleaved caspase-3多克隆抗体，GAPDH单克隆抗体，羊抗兔二抗，羊抗鼠二抗均购自proteintech公司，货号分别为19677-1-AP, 60004-1-Ig, SA00001-2, SA00001-1。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 大鼠视网膜Müller细胞rMC-1细胞培养于含体积分数10%FBS完全高糖DMEM培养基中，置于37℃、体积分数5%CO₂培养箱中培养。当细胞融合率至70%–80%时，传代培养。

1.4.2 红景天苷及PI3K抑制剂的配置 ①红景天苷的配置：称取红景天苷0.1g，加入3.33mL ddH₂O，可完全溶解，配置浓度为10mmol/L母液，使用前稀释为相应浓度；②PI3K抑制剂的配置：称取PI3K抑制剂LY294002 1mg，加入3.254mL二甲亚砜，可完全溶解，配置浓度为1mmol/L母液，使用前稀释为相应浓度。

1.4.3 CCK8法检测红景天苷对rMC-1细胞活力的影响 取对

数生长期 rMC-1 细胞, 胰酶消化后按照 1×10^4 / 孔接种于 96 孔板中, 在正常培养基中培养至细胞贴壁, 镜下观察生长状态良好后, 分别在正常培养基及高糖培养基中加入 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mmol/L 红景天苷培养 48 h, 加入 CCK8 试剂在培养箱中孵育 1.5 h, 酶标仪 490 nm 处测定各孔吸光度, 计算细胞活力。

1.4.4 细胞分组 取对数生长期 rMC-1 细胞, 胰酶消化后采用正常培养基培养至细胞贴壁 70%–80% 时, 更换为 1% 血清培养。随即分为 4 组: 正常对照组, 正常培养基 1% 血清含 5.5 mmol/L 葡萄糖; 高糖损伤组, 在正常培养基中加入 30 mmol/L 葡萄糖, 使培养基葡萄糖终浓度为 35.5 mmol/L; 红景天苷组, 在高糖损伤组的条件下加入 0.5 mmol/L 红景天苷 (红景天苷处理 4 h 后再加入 30 mmol/L 高糖共同孵育 48 h); PI3K 抑制剂组, 在红景天苷组基础上加入 25 μ mol/L LY294002 (红景天苷和 PI3K 抑制剂共同处理 4 h 后再加入 30 mmol/L 高糖共同孵育 48 h)。

1.4.5 DCFH-DA 荧光探针检测活性氧水平 各组细胞按照实验方案处理 48 h 以后, 依据活性氧检测试剂盒说明书进行操作。在避光条件下, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。置于倒置荧光显微镜下观察拍照检测活性氧水平。最后采用 Image-Pro Plus 6.0 软件对结果进行定量分析。

1.4.6 超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活力的检测 各组细胞按照实验方案处理 48 h 以后, 胰酶消化收集细胞, 加入预冷 PBS 超声破碎, 采用专门的试剂盒按照说明书操作, 酶标仪 405 nm 处测定各孔吸光度。

1.4.7 流式细胞术检测细胞凋亡 各组细胞按照实验方案处理 48 h 以后, 加入不含 EDTA 的胰酶消化, 收集细胞, PBS 洗涤后用 1 mL 1 \times Binding Buffer 重悬细胞, 细胞计数使细胞浓度达到 1×10^8 L $^{-1}$ 。按照 Annexin-V/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作, 每管加入 100 μ L 细胞, 再向管中加入 5 μ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀, 室温避光 10 min。加入 5 μ L PI, 室温避光, 孵育 5 min。加入 PBS 至 500 μ L, 轻轻混匀。在 1 h 内用流式细胞仪检测凋亡率。

1.4.8 Western blot 检测蛋白的表达 各组细胞按照实验方案培养 48 h 以后提取细胞总蛋白, 电泳转膜、封闭漂洗后, 分别孵育抗 Cleaved caspase-3、PI3K、Akt、P-Akt、抗内参照 GAPDH 的抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 漂洗 3 次后室温孵育二抗 90 min (0.1% BSA 作为抗体稀释液, 一抗效价比为 1 : 1 000, 二抗效价比为 1 : 5 000)。TBST 漂洗 3 次后使用化学发光信号凝胶成像仪显影。

1.5 主要观察指标 ① rMC-1 细胞活力; ② rMC-1 细胞活性氧水平; ③ rMC-1 细胞超氧化物歧化酶、过氧化氢酶的活力; ④ rMC-1 细胞凋亡的情况; ⑤ rMC-1 细胞 Cleaved caspase-3、PI3K、Akt、P-Akt 的蛋白表达。

1.6 统计学分析 用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 在方差齐性条件下采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显

著性意义。

2 结果 Results

2.1 红景天苷对高糖作用后 rMC-1 细胞活力的影响 通过 CCK8 检测不同条件下红景天苷对 rMC-1 细胞活力的影响。在正常培养基中加入不同浓度红景天苷孵育 48 h, 对 rMC-1 细胞活力没有显著影响 ($P > 0.05$), 见图 1A; 在高糖培养基中孵育 48 h, 与正常对照组比较, 高糖损伤组 rMC-1 细胞活力明显降低 ($P < 0.05$), 见图 1B; 与高糖损伤组比较, 红景天苷组 (0.5, 1 mmol/L) 细胞活力显著上升 ($P < 0.05$)。实验筛选红景天苷 (0.5 mmol/L) 为最佳使用浓度用于后续细胞实验。

2.2 红景天苷对高糖作用后 rMC-1 细胞活性氧水平的影响 荧光显微镜检测活性氧水平, 见图 2。与正常对照组相比, 高糖损伤组荧光强度增加 ($P < 0.05$); 与高糖损伤组相比, 红景天苷组荧光强度减弱 ($P < 0.05$); 而 PI3K 抑制剂组荧光强度与红景天苷组结果相反 ($P < 0.05$)。以上结果提示红景天苷能减少高糖作用后 rMC-1 细胞活性氧水平, 而 LY294002 能阻止这种效果。

2.3 红景天苷对高糖作用后 rMC-1 细胞超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活力的影响 酶标仪检测 rMC-1 细胞超氧化物歧化酶、过氧化氢酶的活力, 见图 3。与正常对照组相比, 高糖损伤组 rMC-1 细胞超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活力显著降低 ($P < 0.05$); 与高糖损伤组相比, 红景天苷组 rMC-1 细胞超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活力显著升高 ($P < 0.05$); 而 PI3K 抑制剂组结果与红景天苷组结果相反 ($P < 0.05$)。以上结果提示红景天苷能增加高糖作用后 rMC-1 细胞超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活力, 而 LY294002 能阻止这种效果。

2.4 红景天苷对高糖作用后 rMC-1 细胞凋亡的影响 流式细胞仪检测各组细胞凋亡, 见图 4。与正常对照组相比, 高糖损伤组 rMC-1 细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.01$); 与高糖损伤组相比, 红景天苷组 rMC-1 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$); 而 PI3K 抑制剂组结果与红景天苷组结果相反 ($P < 0.01$)。以上结果提示红景天苷能减少高糖作用后 rMC-1 细胞凋亡率, 而 LY294002 能阻止这种效果。

2.5 红景天苷对高糖作用后 rMC-1 细胞 Cleaved caspase-3、PI3K、Akt、P-Akt 蛋白表达的影响 Western blot 检测各组细胞 Cleaved caspase-3、PI3K、Akt、P-Akt 蛋白的表达情况, 见图 5。与正常对照组相比, 高糖损伤组 Cleaved caspase-3 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$), PI3K 蛋白表达明显减少 ($P < 0.01$)。以总 Akt 为参照, P-Akt 表达明显减少 ($P < 0.01$); 与高糖损伤组相比, 红景天苷组 Cleaved caspase-3 蛋白表达明显减少, PI3K 蛋白表达显著升高, 以总 Akt 为参照, P-Akt 表达明显增多 ($P < 0.05$); 而 PI3K 抑制剂组结果与红景天苷组结果相反 ($P < 0.05$)。以上结果提示红景天苷可能通过激活 AKT 信号通路减少高糖作用后 rMC-1 细胞 Cleaved caspase-3 的表达, 而 LY294002 能阻止这种效果。

3 讨论 Discussion

目前依据糖尿病视网膜病变的发病机制研发多种药物,已在动物实验和临床试验中取得了很好效果,例如:非类固醇抗炎药物阿司匹林,可以降低糖尿病视网膜病变的发病率,然而单纯应用并不能有效治疗糖尿病视网膜病变,西医对糖尿病视网膜病变的治疗综合疗效仍不理想^[14-15]。越来越多的证据表明,中药对改善眼部微循环,降低血糖,改善血脂等方面比西药效果更佳^[16-17]。因此研究中药对糖尿病视网膜病变的保护作用引起了作者的浓厚兴趣。

红景天苷是从中药红景天中提取的天然成分,对各种慢性疾病具有多种治疗功效。越来越多证据表明红景天苷在糖尿病肾病、糖尿病性脑病等多种糖尿病并发症等方面具有巨大的治疗潜力^[18-20]。Müller细胞是视网膜重要组成部分,贯穿视网膜全层,不仅营养和支持视网膜神经元,同时摄取神经递质、参与神经突触传导、感受神经元信号、维持神经元内外微环境稳态^[21]。研究显示,Müller细胞的功能和代谢在糖尿病视网膜病变早期出现微血管病变之前就已产生变化,其胞体肿胀肥大,逐渐迁移至闭塞的毛细血管内参与形成胶质瘢痕,晚期Müller细胞增殖迁移参与新生血管的形成^[22-24]。因此,Müller细胞在糖尿病视网膜病变进程中发挥着重要调控作用。截至目前为止,红景天苷对高糖引起视网膜Müller细胞损伤的保护作用尚未见报道。此次研究通过建立高糖诱导的细胞损伤模型,首先用CCK-8法检测红景天苷对高糖诱导的rMC-1细胞活力的影响,结果显示红景天苷对正常培养的细胞存活率没有影响,但能提高高糖损伤组的细胞存活率,说明红景天苷对高糖损伤的rMC-1细胞具有一定的保护作用。

Müller细胞氧化应激损伤是糖尿病视网膜病变主要发病机制之一,被认为是糖尿病视网膜病变的一个重要的病理改变^[25]。活性氧是机体内氧化应激的标志物,直接反映细胞内氧化应激水平。有研究表明,在氧化应激导致的视网膜细胞凋亡过程中,活性氧扮演着关键角色^[26]。高糖诱导的Müller细胞会引起线粒体内产生大量的活性氧,当细胞内氧化与抗氧化作用失衡,超出氧化物的清除能力时,会导致氧化应激反应从而促进凋亡损伤^[27]。超氧化物歧化酶、过氧化氢酶是机体抗氧化平衡的重要指标,在细胞氧化应激损伤模型中,超氧化物歧化酶及过氧化氢酶活力降低^[28]。此次研究结果表明,高糖诱导rMC-1细胞48h后,活性氧水平显著增加,超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活力显著降低。而红景天苷可以显著降低高糖环境中rMC-1细胞活性氧的过量产生,同时升高超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活力。证明红景天苷可以减少rMC-1细胞氧化应激损伤。

Müller细胞凋亡率升高和存活率下降是糖尿病视网膜病变发生发展的主要特征之一,减少Müller细胞凋亡对视网膜有保护作用^[29-30]。高血糖导致Müller细胞氧化应激损伤,线粒体发生功能障碍,是细胞凋亡的标志性事件^[31]。Müller细胞高糖损伤时导致线粒体产生活性氧的大量积累,破坏线粒体通透性,继而激活细胞凋亡过程中核心蛋

白Caspase-3^[32-33]。Caspase-3作为Caspase家族重要的促凋亡蛋白,在激活细胞凋亡过程中发挥关键核心作用,通过降解细胞DNA损伤修复酶,激活核酸内切酶,导致细胞凋亡和坏死^[34-35]。此次实验通过Annexin VFITC/PI双染流式细胞仪检测红景天苷对rMC-1细胞凋亡的影响,检测结果显示,高糖处理的rMC-1细胞凋亡率明显升高,而红景天苷可以显著降低高糖环境中rMC-1细胞的凋亡,为了进一步明确红景天苷对rMC-1细胞凋亡的抑制作用,采用Western blot检测各组细胞Cleaved caspase-3蛋白的表达情况,结果显示高糖诱导rMC-1细胞48h后,Cleaved caspase-3蛋白表达明显增加,而红景天苷可以显著降低高糖环境中rMC-1细胞Cleaved caspase-3蛋白表达,进一步从蛋白水平证明红景天苷可以缓解高糖诱导的rMC-1凋亡损伤。

越来越多的研究表明,病理状态下活性氧的增多改变了PI3K/AKT信号通路的活性,进而导致氧化应激损伤和凋亡的发生^[36]。Akt是PI3K的重要下游靶标之一,PI3K活化后磷酸化Akt为P-Akt,P-Akt是Akt的活性形式,参与抵抗视网膜细胞的氧化应激损伤^[37-38]。YANG等^[39]发现,藏红花素可通过激活PI3K/AKT信号通路抑制与糖尿病视网膜病变相关的小胶质细胞的氧化应激。有研究报道,红景天苷通过激活视网膜上皮细胞中AKT的磷酸化,抑制过氧化氢诱导的细胞凋亡和氧化应激^[40]。此外,有研究证实在肌萎缩侧索硬化症细胞模型中红景天苷可激活鼠神经元细胞的PI3K/AKT通路从而抑制细胞凋亡和氧化应激^[41]。然而红景天苷通过激活Müller细胞中PI3K/Akt通路发挥有益作用的研究尚未见报道。此次研究通过Western blot检测PI3K/AKT信号通路中重要相关蛋白,结果显示,高糖诱导rMC-1细胞48h后,PI3K蛋白表达减少,且Akt磷酸化减少;而红景天苷可以显著升高高糖环境中rMC-1细胞PI3K蛋白表达及P-Akt/Akt比值,并发现PI3K抑制剂可显著阻断红景天苷的保护作用。结果表明,红景天苷可能通过激活PI3K/Akt信号通路,抑制高糖诱导的rMC-1细胞氧化应激及其介导的凋亡损伤。

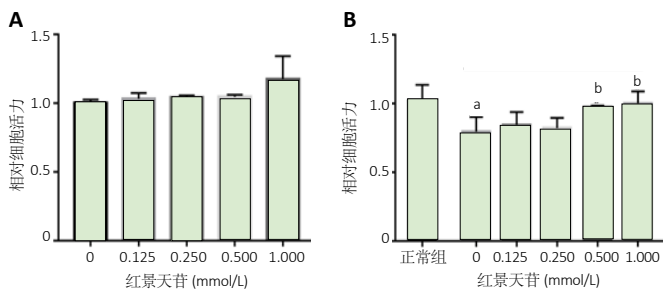
结论:综上所述,红景天苷可增加高糖诱导的rMC-1细胞活性,对高糖诱导的氧化应激和细胞凋亡具有保护作用。红景天苷的保护作用与增加超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活力,抑制活性氧及凋亡相关蛋白Cleaved caspase-3的生成有关。此外,红景天苷可以显著上调高糖环境中rMC-1细胞PI3K蛋白表达水平及P-Akt/Akt蛋白表达比值,说明红景天苷可能通过激活PI3K/AKT信号通路发挥其保护作用,为糖尿病视网膜病变的治疗提供实验依据。

作者贡献:第一作者进行实验设计、撰写成文,实验实施为第一、三作者完成,通讯作者负责审核。第二、四作者负责评估,采用盲法评估。

经费支持:该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

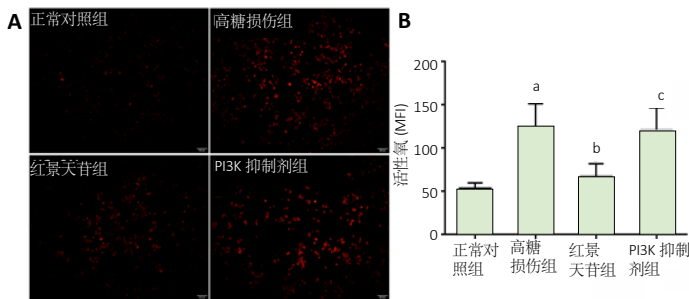
文章查重:文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。



图注：图 A 为正常培养的 rMC-1 细胞；B 为高糖诱导的 rMC-1 细胞，与正常对照组相比，^a $P < 0.05$ ；与高糖损伤组相比，^b $P < 0.05$

图 1 | 不同浓度红景天苷对 rMC-1 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

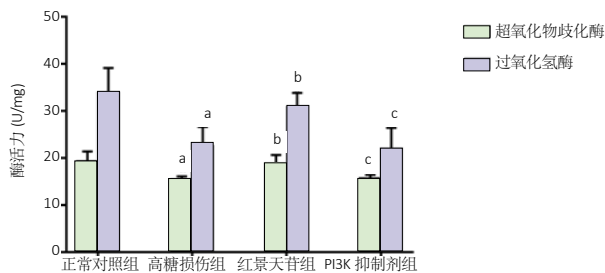
Figure 1 | Effect of salidroside on the viability of retinal Müller cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)



图注：图 A 为荧光显微镜检测活性氧水平 ($\times 200$)；B 为定量分析，与正常对照组相比，^a $P < 0.05$ ；与高糖损伤组相比，^b $P < 0.05$ ；与红景天苷组相比，^c $P < 0.05$

图 2 | 红景天苷对高糖诱导 rMC-1 细胞活性氧水平的影响

Figure 2 | Effect of salidroside on reactive oxygen species production in retinal Müller cell lines induced by high glucose



图注：与正常对照组相比，^a $P < 0.05$ ；与高糖损伤组相比，^b $P < 0.05$ ；与红景天苷组相比，^c $P < 0.05$

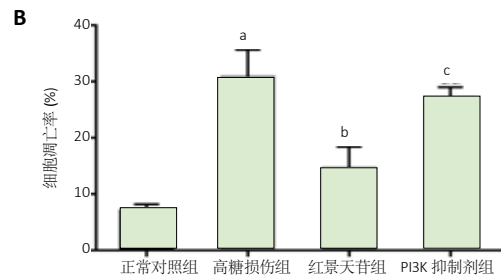
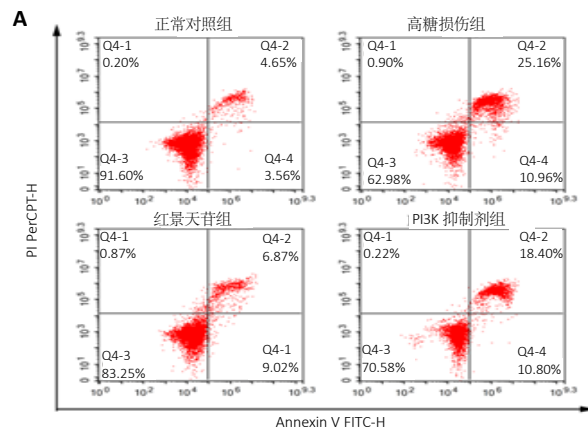
图 3 | 红景天苷对高糖诱导 rMC-1 细胞超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 3 | Effect of salidroside on the activities of superoxide dismutase and catalase in retinal Müller cell lines induced by high glucose ($\bar{x} \pm s, n=3$)

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

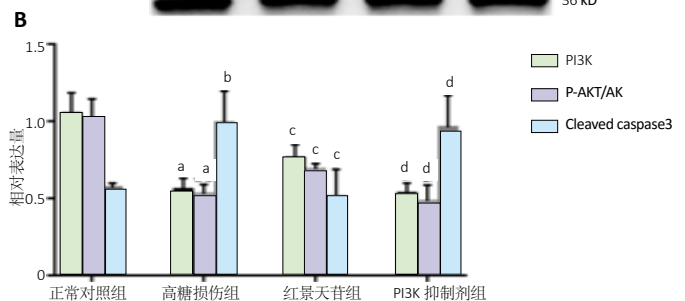
开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。



图注：图 A 为各组流式细胞图；B 为各组凋亡率比较，与正常对照组相比，^a $P < 0.01$ ；与高糖损伤组相比，^b $P < 0.05$ ；与红景天苷组相比，^c $P < 0.01$

图 4 | 红景天苷对高糖诱导 rMC-1 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 4 | Effect of salidroside on apoptosis of retinal Müller cell lines induced by high glucose ($\bar{x} \pm s, n=3$)



图注：图 A 为 Western blot 检测电泳图；B 为蛋白条带灰度比值。与正常对照组相比，^a $P < 0.01$ ，^b $P < 0.05$ ；与高糖损伤组相比，^c $P < 0.05$ ，与红景天苷组相比，^d $P < 0.05$

图 5 | 红景天苷对高糖诱导 rMC-1 细胞 PI3K、p-AKT/AKT、Cleaved caspase3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 5 | Effect of salidroside on PI3K, p-AKT/AKT and Cleaved caspase3 expression in retinal Müller cell lines induced by high glucose ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 参考文献 References

[1] SALEH I, MARITSKA Z, PARISA N, et al. Inhibition of Receptor for Advanced Glycation End Products as New Promising Strategy Treatment in Diabetic Retinopathy. Open Access Maced J Med Sci. 2019;7(23): 3921-3924.

- [2] OSTRI C, LA COUR M, LUND-ANDERSEN H. Diabetic vitrectomy in a large type 1 diabetes patient population: long-term incidence and risk factors. *Acta Ophthalmol.* 2014;92(5):439-443.
- [3] CHEN H, JI Y, YAN X, et al. Berberine attenuates apoptosis in rat retinal Muller cells stimulated with high glucose via enhancing autophagy and the AMPK/mTOR signaling. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:1201-1207.
- [4] WANG JJ, ZHU M, LE YZ. Functions of Muller cell-derived vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *World J Diabetes.* 2015;6(5):726-733.
- [5] ZHOU J, SHEN X, LU Q, et al. Thioredoxin-Interacting Protein (TXNIP) Suppresses Expression of Glutamine Synthetase by Inducing Oxidative Stress in Retinal Muller Glia Under Diabetic Conditions. *Med Sci Monit.* 2016;22:1460-1466.
- [6] TIEN T, ZHANG J, MUTO T, et al. High Glucose Induces Mitochondrial Dysfunction in Retinal Muller Cells: Implications for Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(7):2915-2921.
- [7] OLA MS, AL-DOSARI D, ALHOMIDA AS. Role of Oxidative Stress in Diabetic Retinopathy and the Beneficial Effects of Flavonoids. *Curr Pharm Des.* 2018;24(19):2180-2187.
- [8] CHEN S, CAI F, WANG J, et al. Salidroside protects SHSY5Y from pathogenic alphasynuclein by promoting cell autophagy via mediation of mTOR/p70S6K signaling. *Mol Med Rep.* 2019;20(1):529-538.
- [9] ZHU L, CHEN T, CHANG X, et al. Salidroside ameliorates arthritis-induced brain cognition deficits by regulating Rho/ROCK/NF-kappaB pathway. *Neuropharmacology.* 2016;103:134-142.
- [10] TANG H, GAO L, MAO J, et al. Salidroside protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis: activation of Nrf2-antioxidant signaling, and inhibition of NF-kappaB and TGF-beta1/Smad-2/-3 pathways. *Cell Stress Chaperones.* 2016;21(2):239-249.
- [11] XING SS, YANG XY, ZHENG T, et al. Salidroside improves endothelial function and alleviates atherosclerosis by activating a mitochondria-related AMPK/PI3K/Akt/eNOS pathway. *Vascul Pharmacol.* 2015;72:141-152.
- [12] SHI K, WANG X, ZHU J, et al. Salidroside protects retinal endothelial cells against hydrogen peroxide-induced injury via modulating oxidative status and apoptosis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2015;79(9):1406-1413.
- [13] QIAN C, LIANG S, WAN G, et al. Salidroside alleviates high-glucose-induced injury in retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 by down-regulation of miR-138. *RNA Biol.* 2019;16(10):1461-1470.
- [14] BERGERHOFF K, CLAR C, RICHTER B. Aspirin in diabetic retinopathy. A systematic review. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002;31(3):779-793.
- [15] EGAN A, BYRNE M. Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes. *Ir Med J.* 2011;104(2):37.
- [16] WANG L, WANG N, TAN HY, et al. Protective effect of a Chinese Medicine formula He-Ying-Qing-Re Formula on diabetic retinopathy. *J Ethnopharmacol.* 2015;169:295-304.
- [17] ZHAO YQ, LI QS, XIANG MH, et al. Distribution of traditional Chinese medicine syndromes of diabetic retinopathy and correlation between symptoms. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2017;42(14):2796-2801.
- [18] LU H, LI Y, ZHANG T, et al. Salidroside Reduces High-Glucose-Induced Podocyte Apoptosis and Oxidative Stress via Upregulating Heme Oxygenase-1 (HO-1) Expression. *Med Sci Monit.* 2017;23:4067-4076.
- [19] MA YG, WANG JW, ZHANG YB, et al. Salidroside improved cerebrovascular vasodilation in streptozotocin-induced diabetic rats through restoring the function of BKCa channel in smooth muscle cells. *Cell Tissue Res.* 2017;370(3):365-377.
- [20] 韩雪娇, 郭娜, 朱美宜, 等. 红景天苷药理作用及其作用机理研究进展 [J]. *中国生化药物杂志*, 2015,35(1): 171-175.
- [21] NEWMAN E, REICHENBACH A. The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.* 1996;19(8):307-312.
- [22] OLA MS. Effect of hyperglycemia on insulin receptor signaling in the cultured retinal Muller glial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;444(2):264-269.
- [23] BRINGMANN A, PANNICKE T, GROSCHE J, et al. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* 2006;25(4):397-424.
- [24] FU QL, WU W, WANG H, et al. Up-regulated endogenous erythropoietin/erythropoietin receptor system and exogenous erythropoietin rescue retinal ganglion cells after chronic ocular hypertension. *Cell Mol Neurobiol.* 2008;28(2):317-329.
- [25] 颜赛梅, 常青. 糖尿病视网膜病变中 Müller 细胞氧化还原状态研究 [J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2009,9(4):261-263.
- [26] TRUDEAU K, MOLINA AJ, GUO W, et al. High glucose disrupts mitochondrial morphology in retinal endothelial cells: implications for diabetic retinopathy. *Am J Pathol.* 2010;177(1):447-455.
- [27] KOWLURU RA, KOWLURU A, MISHRA M, et al. Oxidative stress and epigenetic modifications in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 2015;48:40-61.
- [28] LIU L, ZUO Z, LU S, et al. Naringin attenuates diabetic retinopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress and NF-kappaB activation in vivo and in vitro. *Iran J Basic Med Sci.* 2017;20(7):813-821.
- [29] BRINGMANN A, PANNICKE T, GROSCHE J, et al. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* 2006;25(4):397-424.
- [30] HAN N, YU L, SONG Z, et al. Agmatine protects Muller cells from high-concentration glucose-induced cell damage via N-methyl-D-aspartic acid receptor inhibition. *Mol Med Rep.* 2015;12(1):1098-1106.
- [31] REN X, SUN L, WEI L, et al. Liraglutide Up-regulation Thioredoxin Attenuated Muller Cells Apoptosis in High Glucose by Regulating Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr Eye Res.* 2020;17:1-9.
- [32] ZHOU X, AI S, CHEN Z, et al. Probulcol promotes high glucose-induced proliferation and inhibits apoptosis by reducing reactive oxygen species generation in Muller cells. *Int Ophthalmol.* 2019;39(12):2833-2842.
- [33] DEVI TS, LEE I, HUTTEMANN M, et al. TXNIP links innate host defense mechanisms to oxidative stress and inflammation in retinal Muller glia under chronic hyperglycemia: implications for diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:438238.
- [34] 庞若宇, 关美萍, 郑宗基, 等. 二甲双胍对糖基化终末产物诱导的成纤维细胞凋亡及相关蛋白 Caspase3、Bax 及 Bcl-2 表达的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2015,35(6):898-902.
- [35] ZUO T, ZHU M, XU W, et al. Iridoids with Genipin Stem Nucleus Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Oxidative Stress by Blocking the NF-kappaB Pathway in Polycystic Ovary Syndrome. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43(5):1855-1865.
- [36] CUI W, LENG B, WANG G. Klotho protein inhibits H2O2-induced oxidative injury in endothelial cells via regulation of PI3K/AKT/Nrf2/HO-1 pathways. *Can J Physiol Pharmacol.* 2019;97(5):370-376.
- [37] 师岩, 徐晶, 程昊, 等. 京尼平抑制高糖诱导的大鼠心肌 H9c2 细胞氧化应激及凋亡损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019,35(2):224-230.
- [38] 崔伟, 王高频, 王洪新, 等. 黄芩甲苷通过激活 PI3K/Akt 通路抑制内皮细胞内质网应激介导的细胞凋亡的研究 [J]. *中药药理与临床*, 2018,34(5):39-44.
- [39] YANG X, HUO F, LIU B, et al. Crocin Inhibits Oxidative Stress and Pro-inflammatory Response of Microglial Cells Associated with Diabetic Retinopathy Through the Activation of PI3K/Akt Signaling Pathway. *J Mol Neurosci.* 2017;61(4):581-589.
- [40] YIN Y, LIU D, TIAN D. Salidroside prevents hydroperoxide-induced oxidative stress and apoptosis in retinal pigment epithelium cells. *Exp Ther Med.* 2018;16(3):2363-2368.
- [41] 陶蕊, 张怀国, 付庆喜, 等. 红景天苷对肌萎缩侧索硬化症的保护机制 [J]. *中药药理与临床*, 2019,10(3):2471-2473.