

· 中药药理与质量 ·

糖眼宁调控Nod样受体蛋白3炎症小体通路对糖尿病大鼠视网膜细胞焦亡的影响

崔家霖^{1,2}, 邢俊艳^{1,2}, 王莺洁^{1,2}, 高彦彬^{1,2}

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069)

摘要:【目的】观察糖眼宁对糖尿病大鼠视网膜的保护作用。【方法】采用腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病大鼠模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组, 导升明组及糖眼宁高、中、低剂量组, 每组10只。另设正常组。糖眼宁高、中、低剂量组大鼠分别给予糖眼宁10.8、5.4、2.7 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃, 导升明组大鼠给予导升明0.135 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃, 正常组、模型组给予等体积蒸馏水灌胃。灌胃期间每4周检测大鼠体质量和空腹血糖。灌胃12周后, 分别采用苏木素-伊红染色、末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)染色法观察大鼠视网膜组织病理形态, 采用免疫组织化学法检测视网膜组织凋亡相关斑点样蛋白(ASC)表达, 免疫印迹分析(Western Blot)法检测视网膜组织焦亡相关蛋白BRCC36、Nod样受体蛋白3(NLRP3)、ASC、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1前体(Pro-Caspase-1)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1(Caspase-1)、消皮素D(GSDMD)的表达情况。【结果】(1)给药4周后, 与正常组比较, 模型组体质量趋于降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 给药4周后, 与模型组比较, 导升明组和糖眼宁低、中剂量组体质量变化差异无统计学意义($P > 0.05$), 糖眼宁高剂量组体质量持续增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。 (2)与正常组比较, 模型组大鼠空腹血糖水平明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 导升明组和糖眼宁各剂量组大鼠空腹血糖水平无明显降低, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。 (3)与正常组比较, 模型组大鼠视网膜萎缩, 层间细胞排列紊乱; 与模型组比较, 导升明组和糖眼宁各剂量组大鼠视网膜组织结构改善。 (4)与正常组比较, 模型组大鼠视网膜凋亡细胞染色程度、ASC表达明显增强($P < 0.05$); 与模型组比较, 导升明组和糖眼宁各剂量组大鼠视网膜凋亡细胞染色程度、ASC表达不同程度减弱($P < 0.05$)。 (5)与正常组比较, 模型组大鼠焦亡关键蛋白NLRP3、ASC、Pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、BRCC36表达水平明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 导升明组和糖眼宁各剂量组视网膜组织NLRP3、ASC、Pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、BRCC36表达水平明显降低($P < 0.05$)。【结论】糖眼宁能够减轻糖尿病大鼠视网膜炎症反应, 抑制视网膜细胞焦亡, 进而维护血-视网膜屏障的完整性。

关键词: 糖眼宁; 糖尿病视网膜病变; 炎症小体; 细胞焦亡; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2022)03-0605-07

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2022.03.024

Effects of Tangyanning on Pyroptosis of Retinal Cells in Diabetic Rats by Regulating NLRP3 Inflammasome Pathway

CUI Jia-Lin^{1,2}, XING Jun-Yan^{1,2}, WANG Ying-Jie^{1,2}, GAO Yan-Bin^{1,2}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2. Beijing Key Laboratory of Collateral Diseases of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective To observe the protect effect of *Tangyanning* on retina in diabetic rats. **Methods** The diabetic rat model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin. The successfully modeled rats were randomly divided into model group, Doxium group and *Tangyanning* high-dose, medium-dose and low-dose groups, with 10 rats in each group. Another normal group was set up. Rats in *Tangyanning* high-, medium- and low-dose groups were given intragastric administration of 10.8, 5.4, 2.7 g·kg⁻¹·d⁻¹ of *Tangyanning*, respectively,

收稿日期: 2021-08-26

作者简介: 崔家霖(1991-), 男, 硕士研究生; E-mail: 122019000199@ccmu.edu.cn

通讯作者: 高彦彬, 男, 教授, 博士研究生导师; E-mail: 24196@ccmu.edu.cn

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(编号: 2018YFC1704102)

rats in *Daoshengming* group were given intragastric administration of $0.135 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of *Daoshengming*, normal group and model group were given equal volume of distilled water intragastric administration. Body mass and fasting blood glucose level were measured every 4 weeks during gavage. After 12 weeks of intragastric administration, the histopathological morphology of retina was observed by hematoxylin-eosin staining and terminal dUTP nick end labeling (TUNEL) staining, and the expression of apoptosis-related spotted protein (ASC) in retinal tissue was detected by immunohistochemistry. Western Blot was used to detect the expression levels of pyroptosis-associated proteins BRCC36, NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3), ASC, Pro-Caspase-1, Caspase-1 and gasdermin D (GSDMD) in retinal tissues. **Results** (1) After 4 weeks of medication, compared with the normal group, body mass in the model group tended to decrease ($P < 0.05$); after 4 weeks of medication, compared with the model group, there was no significant decrease in body mass in the *Daoshengming* group and *Tangyanning* medium-dose and low-dose groups, the difference being statistically significant ($P > 0.05$), while body mass in the *Tangyanning* high-dose group tended to increase ($P < 0.05$). (2) Compared with the normal group, fasting blood glucose level in the model group was significantly increased ($P < 0.05$); compared with the model group, there was no significant decrease in fasting blood glucose level in the *Daoshengming* and *Tangyanning* dose groups, the difference being statistically significant ($P > 0.05$). (3) Compared with the normal group, retinal atrophy and disorder of interlamellar cells were observed in the model group; compared with the model group, the retinal tissue structure of the *Daoshengming* and *Tangyanning* dose groups was improved. (4) Compared with the normal group, the staining degree of apoptotic cells and ASC expression in the model group were significantly increased ($P < 0.05$); compared with model group, the staining degree of retinal apoptotic cells and ASC expression in the *Daoshengming* and *Tangyanning* dose groups were decreased to different degrees ($P < 0.05$). (5) Compared with the normal group, the expression levels of NLRP3, ASC, Pro-Caspase-1, Caspase-1, GSDMD and BRCC36 in the model group were significantly increased ($P < 0.05$); compared with the model group, the expression levels of NLRP3, ASC, Pro-Caspase-1, Caspase-1, GSDMD and BRCC36 in the *Daoshengming* group and *Tangyanning* dose groups were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** *Tangyanning* exerts effect in reducing the inflammatory response of the retina in diabetic rats, inhibiting the pyroptosis of retinal cells, thereby maintaining the integrity of the blood-retina barrier.

Keywords: *Tangyanning*; diabetic retinopathy(DR); inflammasome; pyroptosis; rats

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见的微血管并发症之一,是糖尿病导致的视网膜微血管渗漏和阻塞,从而引起视力受损的眼底病变。临床所见,单纯的控制血糖尚不能有效地阻止糖尿病患者视力的进行性衰减^[1]。糖眼宁(旧称糖网明合剂)是首都医科大学附属中医医院协定处方,前期临床研究发现,糖眼宁可以减少患者视网膜毛细血管微血管渗出,明显缩短患者视网膜平均循环时间,缩小视网膜毛细血管无灌注区^[2-4]。据此,本课题组认为糖眼宁可以改善眼底血液循环,减轻糖尿病视网膜微血管病变,但糖眼宁改善糖尿病的作用及机制仍需进一步明确。既往认为,视网膜细胞在高血糖条件下

处于凋亡状态,导致严重的微血管损伤,破坏了血-视网膜屏障^[5]。但与细胞凋亡对比,细胞焦亡作为一种新的程序性死亡方式发生得更早,而Nod样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体是引起焦亡的关键^[6]。因此,本研究在建立糖尿病大鼠模型基础上,探讨糖眼宁对视网膜NLRP3炎症小体的调控,以及其对NLRP3炎症小体所诱导的视网膜细胞焦亡的影响,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF级SD雄性大鼠60只(8周龄,体质量200~250g),由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号:SCXK(京)2012-

0001。饲养于首都医科大学SPF级动物房,在控温(22~26℃)、控湿(60%~70%)、控光(光照12 h/d, 8:00~20:00)的安静环境下饮食。

1.2 药物与试剂 糖眼宁颗粒(组成:菊花、枸杞子、生黄芪、太子参、地黄、山药、山茱萸、丹参、三七等),购自北京康仁堂药业有限公司。羟苯磺酸钙胶囊(导升明,奥地利依比威药品有限公司,批号:H20140641)。链脲佐菌素(美国Sigma公司);兔多克隆BRCC36抗体(美国Thermo公司);兔单克隆NLRP3抗体、兔单克隆消皮素D(GSDMD)抗体(美国Abcam公司);小鼠单克隆凋亡相关斑点样蛋白(ASC)抗体、小鼠单克隆半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1前体(Pro-Caspase-1)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1(Caspase-1)抗体(美国Santa公司); β -actin(美国CST公司);山羊抗兔免疫球蛋白(IgG)、山羊抗鼠IgG(美国Immunoway公司);异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司);4%组织细胞固定液(北京索莱宝科技有限公司);电镜固定液(武汉Servicebio公司);二甲苯、盐酸乙醇、树胶、磷酸缓冲液、钨酸溶液、丙酮、环氧树脂、醋酸铀、柠檬酸铅等,由首都医科大学病理实验中心提供。

1.3 仪器 电子天平(美国奥豪斯公司);罗氏卓越型血糖仪(德国罗氏公司);R500小动物通用型麻醉机(深圳瑞沃德生命科技有限公司);RM2235手动轮转式切片机、DMi8显微镜、LEICA DM LB2型显微照相系统(德国Leica公司);JEM-2100透射电子显微镜(日本电子株式会社);Motic B5显微摄像系统(中国麦克奥迪公司);全自动生化分析仪7600(日本Hitachi公司)。

1.4 分组、动物造模与给药 选取SPF级SD雄性大鼠60只,随机分为正常组(10只)和造模组(50只)。正常组注射等量的溶剂柠檬酸缓冲液(pH 4.5),并喂以正常饮食。造模组大鼠经腹腔注射链脲佐菌素55 mg/kg制备糖尿病大鼠模型,并持续高脂饲料诱导,72 h后检测随机空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L为造模成功^[7]。将造模成功后的大鼠随机分为模型组,导升明组及糖眼宁高、中、低剂量组,每组10只。分组后次日开始给药,根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”^[7]计算大鼠灌胃剂量。糖眼宁高、中、低剂量组大鼠分别给予10.8、5.4、2.7 g·kg⁻¹·d⁻¹的糖眼宁冲剂,

导升明组大鼠给予导升明0.135 g·kg⁻¹·d⁻¹混悬液,以上各药物用蒸馏水稀释成等体积10 mL/kg液体。正常组和模型组采用等体积生理盐水灌胃,各组连续灌胃给药12周。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 大鼠血糖和体质量观察 灌胃后每4周称体质量、尾尖取血检测空腹血糖。

1.5.2 视网膜组织检测 大鼠取血后随即摘除眼球制作含有视网膜的眼杯,按要求放置于40 g/L的多聚甲醛、25 g/L的戊二醛中固定或过液氮转-80℃冰箱冻存,分别用于视网膜组织形态学观察、免疫组织化学和蛋白免疫印迹(Western Blot)检测。

1.5.2.1 苏木素-伊红染色法观察视网膜组织病理形态 将上述固定好的视网膜组织制成石蜡切片,常规脱蜡、水化后浸入苏木素染液中染色3~5 min,再次用蒸馏水洗去玻片浮色,梯度乙醇溶液脱水后光镜下观察视网膜各层结构和病理改变,并拍照。

1.5.2.2 末端脱氧核苷酸转移酶介导的d UTP缺口末端标记(TUNEL)染色法观察视网膜组织细胞凋亡情况 随机抽取组织石蜡切片,常规脱蜡脱水后按TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒说明书操作。50 g/L牛血清白蛋白(BAS)封闭30 min,加入TUNEL反应液,37℃结合2 h;加Converter-POD反应液,37℃反应30 min,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色液室温反应约10 min;透明封片,镜检。经TUNEL染色标记细胞核呈现出棕黄色或者棕褐色染色的细胞为阳性细胞,细胞核蓝染的细胞是苏木素复染的阴性细胞。使用ImageJ软件观察视网膜组织细胞DNA断裂在各层的分布,判断视网膜神经-血管单位中神经与血管损伤的状态。

1.5.2.3 免疫组织化学法检测视网膜组织ASC表达 随机抽取组织石蜡切片,常规脱蜡、脱水清洗后,放置于3%过氧化氢溶液中室温下孵育10 min。5%BAS室温下封闭20 min,清洗切片加入50 μ L稀释的一抗(1:100)进行ASC免疫组织化学染色。常规清洗后滴加50 μ L新鲜配制的DAB溶液镜于镜下控制显色。常规清洗、封片,使用IPP软件观察并分析各组大鼠视网膜内ASC阳性细胞染色面积百分比。

1.5.2.4 Western Blot法检测视网膜组织中焦亡

相关蛋白表达 将视网膜组织加入裂解液裂解, 高速离心后收集上清液, 完成蛋白提取。用二喹啉甲酸(BCA)法对提取的视网膜蛋白进行定量。制备10%十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)凝胶, 每孔加入20 μ L蛋白样品进行蛋白电泳。转膜后, 加入BRCC36(1:1 000)、NLRP3(1:1 000)、ASC(1:1 000)、pro-Caspase-1(1:500)、Caspase-1(1:1 000)、GSDMD(1:1 000)、 β -actin(1:1 000)等一抗稀释液4 $^{\circ}$ C孵育过夜。洗膜后加入与一抗同种属的二抗稀释液(1:5 000)孵育2 h, 电化学发光(ECL)法暗室曝光, 扫描胶片后用图像分析软件分析目标条带, 获得目的蛋白表达量。

1.6 统计方法 采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析, 各组数据均为计量资料, 以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量、空腹血糖比较 表1结果显示: 给药4周后, 与正常组比较, 模型组大鼠体

质量趋于降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 给药4周后, 与模型组比较, 导升明组及糖眼宁低、中剂量组大鼠体质量变化差异无统计学意义($P > 0.05$), 糖眼宁高剂量组大鼠体质量持续增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2结果显示: 与正常组比较, 模型组随机空腹血糖水平明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 导升明组及糖眼宁高、中、低剂量组空腹血糖水平无明显降低, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠视网膜组织结构比较 图1结果显示: 正常组大鼠视网膜组织各层结构清晰, 细胞形态正常, 排列有序; 模型组大鼠视网膜组织各层细胞明显减少, 出现萎缩, 可见渗漏血管样结构; 导升明组大鼠视网膜组织水肿, 内、外核层排列紊乱, 散在增生血管; 糖眼宁各剂量组大鼠视网膜组织水肿较导升明组减轻, 其中, 高剂量组各层结构清晰, 较导升明组明显改善。

2.3 各组大鼠视网膜细胞凋亡情况比较 图2结果显示: 与正常组比较, 模型组大鼠视网膜凋亡细胞染色明显增强, 其中, 神经节细胞层、内颗粒层最为明显; 与模型组比较, 各治疗组大鼠视

表1 各组大鼠体质量比较

Table 1 Comparison of body mass of rats in various groups

($\bar{x} \pm s$, g)

组别	鼠数/只	给药0周	给药4周	给药8周	给药12周
正常组	10	228.8 \pm 6.68	321.6 \pm 3.6	381.7 \pm 5.9	417.5 \pm 3.5
模型组	10	228.6 \pm 5.90	288.9 \pm 7.8 ^①	289.3 \pm 6.1 ^①	263.8 \pm 8.4 ^①
导升明组	10	230.7 \pm 5.90	308.5 \pm 6.5	312.6 \pm 9.7	311.4 \pm 5.9
糖眼宁低剂量组	10	230.6 \pm 6.30	327.0 \pm 6.2	356.2 \pm 3.1	398.1 \pm 10.0
糖眼宁中剂量组	10	229.9 \pm 4.00	313.3 \pm 8.5	310.0 \pm 6.1	309.2 \pm 5.7
糖眼宁高剂量组	10	231.4 \pm 6.60	314.5 \pm 6.9 ^②	313.1 \pm 9.4 ^②	305.3 \pm 4.3 ^②

① $P < 0.05$, 与正常组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较

表2 各组大鼠空腹血糖水平比较

Table 2 Comparison of fasting blood glucose levels of rats in various groups

($\bar{x} \pm s$, mmol \cdot L⁻¹)

组别	鼠数/只	给药0周	给药4周	给药8周	给药12周
正常组	10	5.31 \pm 0.61	4.97 \pm 0.78	5.76 \pm 0.50	4.98 \pm 0.44
模型组	10	30.56 \pm 1.80 ^①	30.22 \pm 1.10 ^①	30.54 \pm 1.50 ^①	32.16 \pm 1.20 ^①
导升明组	10	28.78 \pm 0.50	30.96 \pm 1.10	30.21 \pm 0.76	32.23 \pm 0.95
糖眼宁低剂量组	10	28.83 \pm 0.36	31.43 \pm 1.10	31.29 \pm 1.30	32.24 \pm 1.10
糖眼宁中剂量组	10	28.79 \pm 0.57	31.68 \pm 1.00	31.35 \pm 1.17	31.79 \pm 0.80
糖眼宁高剂量组	10	25.4 \pm 0.42	28.29 \pm 0.38	29.09 \pm 0.49	29.76 \pm 0.89

① $P < 0.05$, 与正常组比较

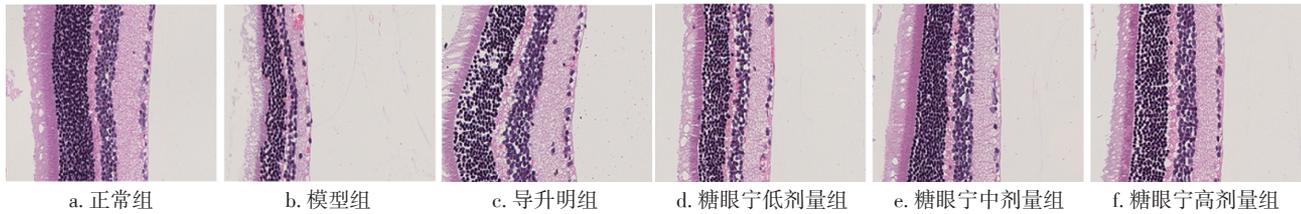


图1 各组大鼠视网膜组织结构比较(HE染色, ×400)

Figure 1 Comparison of retinal tissue structure in various groups (by HE staining, × 400)

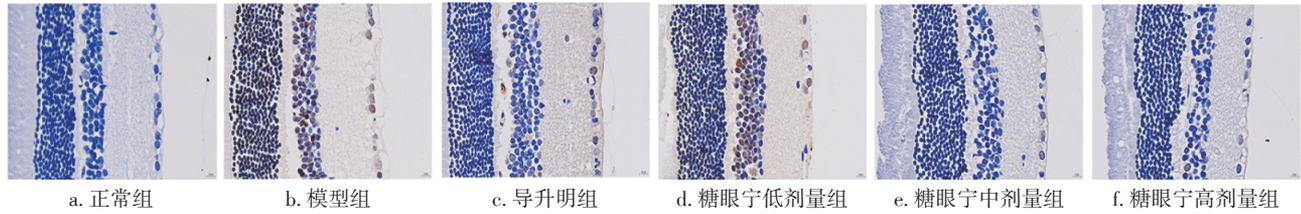


图2 各组大鼠视网膜细胞凋亡情况比较(TUNEL染色, ×400)

Figure 2 Comparison of retinal cell apoptosis in various groups (by TUNEL staining, × 400)

网膜凋亡细胞染色均不同程度减弱, 其中, 糖眼宁高剂量组内核层、外核层改善最为明显。结果表明, 糖眼宁能够改善糖尿病大鼠视网膜细胞损伤, 尤其对神经节细胞层的保护最为明显。

2.4 各组大鼠视网膜内NLRP3炎症小体活化程度比较 图3结果显示: 与正常组[(5.45 ± 1.94)%]比较, 模型组[(67.412 ± 2.37)%]大鼠视网膜内凋亡相关的斑点样蛋白(ASC)免疫染色程度明显增强, 且集中表达于视网膜各内层和外层的视细胞层, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较, 导升明组[(55.82 ± 3.43)%], 糖眼宁低剂量组[(55.637 ± 3.72)%], 糖眼宁中剂量组[(50.242 ± 3.93)%], 糖眼宁高剂量组[(48.11 ± 3.14)%]大鼠视网膜内ASC免疫染色程度均减弱或下调, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结果表明, 糖眼宁能够抑制糖尿病大鼠视网膜内NLRP3炎症小体的活化。

2.5 各组大鼠视网膜中焦亡相关蛋白表达比较 图4结果显示: 与正常组比较, 模型组焦亡关键蛋白

NLRP3、ASC、Pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、BRCC36表达明显上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 各治疗组大鼠视网膜内焦亡关键蛋白NLRP3、ASC、Pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、BRCC36表达均减弱或下调, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结果表明, 糖眼宁能够明显抑制糖尿病大鼠视网膜细胞焦亡。

3 讨论

糖尿病视网膜病变不仅是微血管病变, 还是一种低、中度炎症反应^[8], 主要表现为白细胞的聚集和边流、炎症因子分泌增加等^[9]。在高血糖状态下, 视网膜各种炎症因子分泌的增加导致炎症风暴损伤视网膜的血管和神经单位^[10], 出现微血管神经细胞、周细胞、内皮细胞凋亡等^[11-12]。因此, 炎症反应被认为是糖尿病视网膜病变的发病机制之一^[13]。NLRP3炎症小体(inflammasome)作为炎症反应中重要的组成部分, 由胞内固有免疫受体Nod样

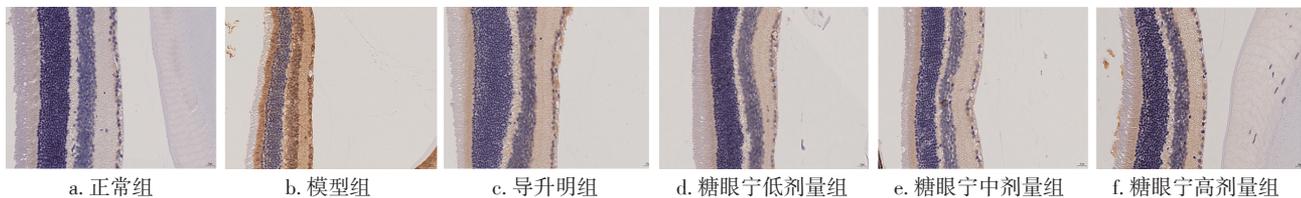
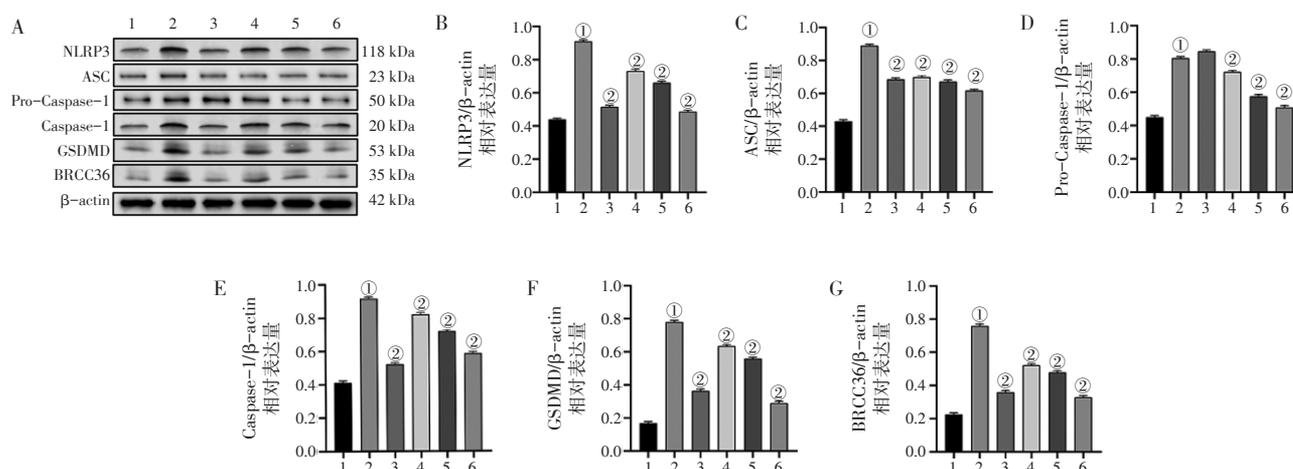


图3 各组大鼠视网膜内NLRP3炎症小体活化程度比较(免疫组织化学法, ×400)

Figure 3 Comparison of activation degree of NLRP3 inflammasome in retina of rats in various groups (by immunohistochemical method, ×400)



A. Western Blot 电泳条带; B ~ G. NLRP3、ASC、Pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD、BRCC36 相对表达量

1. 正常组; 2. 模型组; 3. 导升明组; 4. 糖眼宁低剂量组; 5. 糖眼宁中剂量组; 6. 糖眼宁高剂量组

① $P < 0.05$, 与正常组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较

图4 各组大鼠视网膜中焦亡相关蛋白表达比较(Western Blot法)

Figure 4 Comparison of pyroptosis related protein expression in retina of rats in various groups (by Western Blot)

受体(NLRs)、ASC和Pro-Caspase-1组成,能够诱导促炎因子白细胞介素 1β (IL- 1β)和白细胞介素18(IL-18)的成熟和分泌。其在细胞中的活化分为启动和激活2个过程,当NLRP3翻译后被泛素标记则不能进行寡聚化,直到去泛素酶BRCC36使其去泛素化才具有活性^[14]。虽然NLRP3激活的过程多样,但始终与ASC寡聚化介导相关^[15]。本质上,炎症(inflammation)是机体对组织损伤的一种快速而协调的反应,过犹不及。本研究通过免疫组织化学法和Western Blot法检测发现,除正常组外,其他各组大鼠视网膜细胞ASC和BRCC36均已激活,NLRP3炎症小体表达均不同程度增强。其中,糖眼宁高剂量组BRCC36、ASC、NLRP3炎症小体表达均较模型组下调,表明大鼠成模后随着糖尿病病程的进展,视网膜细胞在高血糖条件下受到损伤,出现了炎症反应。当炎症反应过度造成细胞DNA双链断裂或一条链出现缺口时,则会被TUNEL染色标记。NLRP3炎症小体过表达的组别视网膜细胞凋亡染色增强,表明视网膜细胞在炎症因子的刺激下已经出现程序性死亡。

NLRP3过度活化的结果可导致细胞焦亡^[16]。焦亡属于炎症性死亡途径,按激活机制可分为依赖Caspase-1的经典途径和依赖Caspase-4、-5、-11的非经典途径^[17-18]。经典途径主要特征为NLRP3炎症小体及其下游效应因子Caspase-1活化,活化的

Caspase-1在剪切GSDMD诱导细胞膜穿孔的同时,剪切Pro-IL- 1β 、Pro-IL-18形成IL- 1β 和IL-18释放到胞外扩大炎症反应^[19]。而GSDMD基因敲除,则Caspase-1不会介导细胞焦亡的发生^[20]。本研究结果显示:与模型组比较,糖眼宁高剂量组Pro-Caspase-1、Caspase-1、GSDMD蛋白表达水平明显降低。

糖眼宁由枸杞子、菊花、地黄、山萸肉、生黄芪、三七等组成,具有益气养阴、通络明目的功效,主要用于治疗气阴两虚、络脉瘀阻型糖尿病。本研究通过视网膜组织病理切片直观反映糖尿病大鼠视网膜损伤程度,进而评价各治疗组对血-视网膜屏障的保护作用。结果显示:当造模达到12周时,大鼠已经出现轻、中度的视网膜组织损伤,主要表现为层间结构排列紊乱。在进行药物干预后,各治疗组大鼠视网膜组织损伤与模型组比较均得到不同程度的改善,其中糖眼宁高剂量组改善作用最明显。结果表明,糖眼宁能够改善糖尿病大鼠的一般生理状态,有效抑制大鼠视网膜中NLRP3炎症小体活化减轻炎症反应,降低焦亡关键蛋白的表达。

综上所述,糖眼宁可减轻糖尿病大鼠视网膜炎症反应,抑制视网膜组织细胞的焦亡,延缓了糖尿病视网膜微血管损伤进程,维护了血-视网膜屏障的完整性。

参考文献:

- [1] 汤庆丽, 沈焯宇, 徐婉文, 等. 血糖控制达标2型糖尿病患者发生糖尿病视网膜病变的影响因素[J]. 国际眼科杂志, 2021, 21(11): 1952-1956.
- [2] 李大奇, 高彦彬. 糖网明合剂治疗单纯型糖尿病视网膜病变的临床研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2004: 33-36.
- [3] 周芸丽, 高彦彬, 张涛静, 等. 益气养阴通络法治疗糖尿病性视网膜病变的临床研究[A]. 中华中医药学会. 第四届国际中医糖尿病大会论文汇编[C]. 北京: 中华中医药学会, 2009: 414-415.
- [4] 李勤, 高彦彬. 高彦彬教授治疗糖尿病视网膜病变经验拾荟[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(11): 2857-2859.
- [5] LI W, YANOFF M, JIAN B, et al. Altered mRNA levels of antioxidant enzymes in pre-apoptotic pericytes from human diabetic retinas[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1999, 45(1): 59-66.
- [6] MARIATHASAN S, WEISS D S, NEWTON K, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP [J]. Nature, 2006, 440(7081): 228-232.
- [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 1013.
- [8] 韩旭, 王璇, 余芝, 等. STZ制备糖尿病大鼠模型影响因素的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 716-725.
- [9] ADAMIS A P. Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? [J]. Br J Ophthalmol, 2002, 86(4): 363-365.
- [10] JOUSSEN A M, POULAKI V, LE M L, et al. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. The FASEB Journal, 2004, 18(12): 1450-1452.
- [11] JAIN S K, CHAUBEY A, GOEL R K, et al. Pathological perturbations in diabetic retinopathy: hyperglycemia, AGEs, oxidative stress and inflammatory pathways [J]. Curr Protein Pept Sci, 2019, 20(1): 92-110.
- [12] TAKAHASHI J, KITAYA N, YOSHIDA A, et al. Inhibitory effect of losartan, an AT1 angiotensin II receptor antagonist, on increased leucocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats [J]. Br J Ophthalmol, 2002, 86(10): 1172-1174.
- [13] MIYAMOTO K, KHOSROF S, BURSELL S E, et al. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(19): 10836-10841.
- [14] SAVLI H, SEVINC A, TURKOZ Y, et al. Comparison of serum NO, TNF-alpha, IL-1beta, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus [J]. Eye (Lond), 2002, 16(2): 163-170.
- [15] PY B F, KIM M S, YUAN J, et al. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity [J]. Mol Cell, 2013, 49(2): 331-338.
- [16] OKADA M, MATSUZAWA A, YOSHIMURA A, et al. The lysosome rupture-activated TAK1-JNK pathway regulates NLRP3 inflammasome activation [J]. J Biol Chem, 2014, 289(47): 32926-32936.
- [17] MARIATHASAN S, WEISS D S, NEWTON K, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP [J]. Nature, 2006, 440(7081): 228-232.
- [18] BAKEN T B, SUSAN L, FINK I, et al. Pyroptosis: host cell death and inflammation [J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(2): 99-109.
- [19] SCHNEIDER V, GROB C J, DREIER R, et al. The inflammasome drives GSDMD independent secondary pyroptosis and IL-1 release in the absence of Caspase-1 protease activity [J]. Cell Rep, 2017, 21(13): 3846-3859.
- [20] MAN S M, KANNEGANTI T D. Gasdermin D: the long-awaited executioner of pyroptosis [J]. Cell Res, 2015, 25(11): 1183-1184.

【责任编辑: 侯丽颖】