

## 三七总皂苷溶液滴眼给药对大鼠非增殖性糖尿病视网膜病变的改善作用

孙鑫<sup>1</sup>, 王亚茹<sup>1</sup>, 程雪梅<sup>1</sup>, 陈泓谕<sup>1</sup>, 陈明<sup>2</sup>, 赖树生<sup>2</sup>, 季莉莉<sup>1</sup>,  
尉小慧<sup>1</sup>, 王长虹<sup>1\*</sup>

(1. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 上海市复方中药重点实验室, 上海 201203;  
2. 广西三七综合利用技术重点实验室, 广西 梧州 543000)

**摘要:** 糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是一种累及眼睛的糖尿病并发症, 会导致患者视力低下甚至失明。本文旨在研究三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 溶液滴眼给药对链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的大鼠非增殖性糖尿病视网膜病变 (non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR) 的改善作用及其机制。实验方案经上海中医药大学实验动物福利与伦理委员会审查, 符合实验动物福利与伦理相关规范 (伦理号: PZSHUTCM 211115004)。通过对大鼠腹腔单次注射 STZ 诱导糖尿病模型, 注射两个月后, 分别按照 20、40 和 80 mg·kg<sup>-1</sup> 的剂量双眼滴眼 PNS 溶液, 每日 2 次, 每次间隔 6 h, 连续 1 个月。通过对大鼠眼球进行苏木精-伊红染色和免疫组化分析, 观察视网膜的形态结构变化和小胶质细胞的活化情况; 采用伊文思蓝染料渗漏实验, 观察血-视网膜屏障 (blood-retina barrier, BRB) 的破坏情况; 利用胰酶消化视网膜并进行染色, 观察视网膜中无细胞毛细血管的数量; 通过尾静脉注射异硫氰酸荧光素偶联刀豆蛋白 A 凝集素, 观察视网膜中黏附的中性粒细胞数量; 采用酶联免疫实验检测血清中炎症因子的表达; 采用 Western blot 实验检测视网膜组织中相关蛋白的表达以及核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) 的转录激活。结果发现, PNS 溶液滴眼给药能够显著增加视网膜的厚度、减少无细胞毛细血管的数量以及上调紧密连接蛋白 claudin-1 和 occludin 的表达, 从而缓解 BRB 的损伤。此外, PNS 溶液滴眼给药也能够显著减少中性粒细胞的黏附和小胶质细胞的活化、降低血清中炎症因子的表达以及视网膜 p65 蛋白的核转移, 有效抑制视网膜炎症的发生。以上结果表明, PNS 溶液滴眼给药可以通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活, 降低炎症的发生, 从而发挥改善 NPDR 的作用。

**关键词:** 三七总皂苷; 滴眼给药; 非增殖性糖尿病视网膜病变; 血-视网膜屏障; 炎症因子; 核因子  $\kappa$ B  
中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1271-09

## Ameliorative effect of *Panax notoginseng* saponins eye drops on non-proliferative diabetic retinopathy in rats

SUN Xin<sup>1</sup>, WANG Ya-ru<sup>1</sup>, CHENG Xue-mei<sup>1</sup>, CHEN Hong-yu<sup>1</sup>, CHEN Ming<sup>2</sup>, LAI Shu-sheng<sup>2</sup>,  
JI Li-li<sup>1</sup>, WEI Xiao-hui<sup>1</sup>, WANG Chang-hong<sup>1\*</sup>

(1. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai Key Laboratory for Compound Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Comprehensive Utilization Technology of Pseudo-ginseng, Wuzhou 543000, China)

**Abstract:** Diabetic retinopathy (DR) is a diabetic ocular complication that can lead to poor vision and

收稿日期: 2023-10-10; 修回日期: 2023-12-16.

基金项目: 上海市卫健委中医药传承创新发展三年行动计划建设项目 [ZY(2021-2023)-0215]; 广西科技基地和人才专项 (Guike AD20297068); 上海中医药大学三七研究中心项目 (SQZX202103).

\*通讯作者 Tel: 86-21-51322511, E-mail: wchcxm@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1150

blindness. This experiment aimed to investigate the ameliorative effect and its mechanism of *Panax notoginseng* saponins (PNS) eye drops on streptozotocin (STZ)-induced non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) in rats. All experiments were approved by the Animal Research Committee of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine. Animal welfare and the animal experimental protocols were strictly consistent with related ethics regulations of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (No. PZSHUTCM 21115004). Diabetes mellitus was induced by a single intraperitoneal injection of STZ into rats. Two months later, PNS solution was dropped binocularly twice per day at 6 h intervals at dose of 20, 40, and 80 mg·kg<sup>-1</sup> continuously for 1 month. The morphological structure and activation of microglia of the retina were observed by hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical assay. The disruption of the blood-retina barrier (BRB) was conducted by the Evans blue dye leakage assay. The number of acellular capillaries in the retina was assessed by digesting and hematoxylin-eosin staining assay. The number of retinal leukocyte adhesion was observed by fluorescein isothiocyanate-coupled concanavalin A lectin labeling assay. The serum expression of inflammatory factors was measured using enzyme-linked immunosorbent assay. Western blot experiments were used to detect the expression of relevant proteins in retinal tissue and transcriptional activation of nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B). The results revealed that PNS eye drops significantly increased the thickness of the retina, decreased the number of acellular capillaries, and up-regulated the expression of the tight junction proteins claudin-1 and occludin, thereby alleviating BRB damage. In addition, PNS eye drops were also able to significantly reduce leukocyte adhesion and microglia activation, the expression of inflammatory factors in serum, and the nuclear translocation of retinal p65 proteins, effectively inhibiting the occurrence of retinal inflammation. The above results showed that PNS eye drops played a role in improving NPDR by inhibiting the activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway and reducing inflammation.

**Key words:** *Panax notoginseng* saponins; eye-dropping administration; non-proliferative diabetic retinopathy; blood-retinal barrier; inflammatory factor; nuclear factor kappa-B

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是一种糖尿病微血管并发症<sup>[1]</sup>, 是导致成年人视力低下和失明的主要原因, 也是世界卫生组织公布的三大致盲的重点眼科疾病之一。DR 的临床症状主要包括视网膜缺血、异常新生血管、血管通透性增加等<sup>[2]</sup>。DR 根据病理特征分为非增殖性 DR (non-proliferative DR, NPDR) 和增殖性 DR (proliferative DR, PDR)。NPDR 是 DR 的早期阶段, 周细胞丢失致毛细血管稳定性下降, 表现为血管通透性增加和毛细血管闭塞; PDR 是 DR 的晚期阶段, 视网膜出现缺血缺氧, 表现为出现异常的新生血管<sup>[3,4]</sup>。PDR 对视网膜的损害程度远大于 NPDR, NPDR 可以进一步恶化演变为 PDR。

三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 为五加科人参属植物, 是一味活血化瘀类中药, 其中三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 作为三七的主要化学成分, 具有活血化瘀和消肿定痛等药理作用, 临床上常用于抗栓和抗炎等作用<sup>[5]</sup>。在 DR 早期, 高糖导致的视网膜缺血使血管出现堵塞, 继而引发一系列反应对视网膜造成损伤, PNS 因其活血化瘀和抗炎作用能够缓解血管堵塞。有研究表明, PNS 口服能够改善链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的 NPDR<sup>[6]</sup>, 但是口服给药会使 PNS 中的主要成分被胃液降解, 还会受到血眼屏障的影响, 导致到达眼部的药物较少<sup>[7]</sup>。

眼部给药可以直接作用于病变部位并且维持较高的药物浓度。常见的眼部给药方式有玻璃体注射、滴眼液和眼周注射等, 其中滴眼液是治疗眼部疾病的首选给药方式<sup>[8]</sup>。本文旨在研究 PNS 溶液滴眼给药对 STZ 诱导的 NPDR 的改善作用, 探讨其作用机制, 为后续滴眼剂的研制提供依据。

## 材料与方 法

**药物与试剂** PNS (批号: 20220401) 由广西梧州中恒集团有限公司赠送; Accu-Check 血糖试纸购自德国 Roche 公司; 柠檬酸无水 (MB8820)、柠檬酸钠二水 (MB2492)、STZ (MB1227)、伊文思蓝染料 (MB4680)、甲酰胺 (MB2593) 购自大连美仑生物技术有限公司; 异硫氰酸荧光素偶联刀豆蛋白 A 凝集素 (fluorescein isothiocyanate-coupled concanavalin A lectin, FITC-ConA, GTX01505) 购自美国 Vector Laboratories 公司; claudin-1 抗体 (sc-81796) 购自美国 Santa Cruz 公司; occludin (ABT146)、核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 (4764T)、磷酸化的 NF- $\kappa$ B p65 (p-p65, 3033T)、 $\beta$ -actin (4970T)、lamin B1 (13435S) 抗体、离子钙结合衔接分子 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba-1, 17198T) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 蛋白 marker (8~180 kDa, 20350ES72)、胰蛋白酶

(40101ES25)、BCA 蛋白质测定试剂盒 (20201ES76)、过氧化物酶结合的山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG) (H+L, 33707ES60)、抗小鼠 IgG (H+L, 33207ES60) 购自上海翌圣生物科技股份有限公司; 胞浆核提取试剂 (78833) 购自美国 Thermo Scientific 公司; 酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自上海威奥生物科技有限公司; 超敏 ECL 化学发光试剂盒 (P0018S) 购自碧云天生物技术有限公司。

**主要仪器** Accu-Check 血糖仪 (德国 Roche 公司); 解剖镜、IX81 荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); HL-2D 定时数显恒流泵 (上海沪西分析仪器有限公司); 电热鼓风真空干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司); 酶标仪 (美国 BioTek 公司); S0200-230V-EU 型涡旋混合器 (美国 Labnet 公司); 低温高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); 蛋白垂直电泳仪、转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); BP211D 电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); 超纯水过滤仪 (美国 Millipore 公司)。

**实验动物** 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (体重  $200 \pm 20$  g), 购自上海斯莱克实验动物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK (沪) 2022-0004。饲养于无特殊病原体环境中, 温度为  $(25 \pm 2)$  °C, 湿度为  $(55 \pm 15)\%$ , 明暗循环 12 h。实验开始前进行习服饲养 7 天, 自由饮水和鼠粮喂养 1 周。本文中动物福利和实验过程均遵循上海中医药大学实验动物伦理委员会的规定 (伦理号: PZSHUTCM 211115004)。

**滴眼用 PNS 溶液的制备** 称取 5、10 和 20 g PNS 溶于 50 mL 纯水中, 分别加入 404、358、266 mg 氯化钠 (NaCl) 调节渗透压至与泪液等渗 ( $300 \text{ mOsm} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 即得 PNS 低 ( $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、中 ( $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、高 ( $400 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 剂量滴眼溶液。

**模型建立**<sup>[9]</sup> 将  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸溶液与柠檬酸钠溶液以 14:11 的比例混匀, 调 pH 至 4.4, 用以配制 STZ 溶液。称取适量 STZ 粉末, 避光溶解配成一定浓度。80 只已禁食过夜的大鼠按  $65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量腹腔注射 STZ 诱导糖尿病模型。另有 20 只大鼠腹腔注射柠檬酸钠缓冲液作为正常对照组。造模 7 天后尾静脉取血检测空腹血糖浓度 (fasting blood glucose, FBG),  $\text{FBG} \geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $250 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ ) 视为糖尿病造模成功。

**分组与给药** 将造模成功的糖尿病大鼠, 按照体重和 FBG 随机分为模型组、PNS 滴眼液低、中、高剂量组, 每组 20 只。STZ 腹腔注射 2 个月后, 滴眼液低、中、高剂量组分别按照 20、40 和  $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量分别给予大鼠双眼滴入 100、200、400  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 PNS 等渗溶

液; 正常组和模型组分别给予大鼠双眼滴入生理盐水; 每日 2 次, 每次间隔 6 h, 连续给药 1 个月。实验期间, 对大鼠的血糖和体重进行记录。给药结束后, 每组 4 只大鼠进行病理切片、免疫荧光分析和视网膜无细胞毛细血管实验。每组 6 只大鼠进行伊文思蓝染料渗漏实验。每组 4 只大鼠进行视网膜中性粒细胞黏附实验。剩余 6 只大鼠麻醉, 收集血清和视网膜,  $-80$  °C 保存。

**病理切片和免疫组化分析** 解剖大鼠, 从左心室灌入磷酸盐缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 以清除血管中的血液。将大鼠左眼固定在眼科固定液中, 嵌入石蜡中, 并进行切片 ( $5 \mu\text{m}$ )。视网膜切片用苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 用倒置显微镜拍摄获得切片的图像。将石蜡包埋的视网膜切片 ( $5 \mu\text{m}$ ) 在二甲苯中去掉石蜡, 并在乙醇梯度中用蒸馏水进行再水化。在内源性过氧化物酶活性被淬灭后, 将视网膜切片与 5% 的牛血清白蛋白孵育, 以减少非特异性结合。将视网膜切片与相应的抗体在 4 °C 下孵育过夜, 并与物种匹配的荧光二抗在室温下孵育 1 h, 细胞核在室温下用 DAPI 染色 10 min。在荧光倒置显微镜下捕捉图像。

**无细胞毛细血管数量分析**<sup>[6]</sup> 取出大鼠右眼, 用 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 固定 24 h, 之后用 PBS 清洗 4 次。将视网膜剥离, 然后用 3% 的胰蛋白酶在 37 °C 下消化 1 h, 从视网膜组织中分离出视网膜血管。为了量化视网膜中的无细胞毛细血管, 对分离出的视网膜血管进行 HE 染色, 用倒置显微镜对视野内的视网膜无细胞毛细血管进行观察并拍照, 计算 3 个视野下的无细胞毛细血管总数量, 以平均值代表视网膜样本中无细胞毛细血管的数量。

**视网膜伊文思蓝染料渗漏实验** 将伊文思蓝染料溶解于 PBS 中, 配制浓度为  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液, 以  $10 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$  进行大鼠腹腔注射, 循环 2 h 后, 左心室灌洗 PBS 以清除大鼠体循环中的伊文思蓝染料。摘取眼球, 剥离出视网膜组织, 放于真空干燥箱中  $55$  °C 真空干燥 5 h, 称取视网膜组织干燥后质量。加入  $120 \mu\text{L}$  甲酰胺, 于  $70$  °C 水浴 18 h 萃取出伊文思蓝染料。萃取液  $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 1 h, 吸取  $100 \mu\text{L}$  萃取液的上清, 用酶标仪在 620 nm 波长处测量吸光度值, 代入标准曲线, 计算出伊文思蓝染料的量, 计算伊文思蓝染料的量与视网膜组织干燥后质量的比值, 即得视网膜组织中伊文思蓝染料渗漏量 ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )。

**中性粒细胞黏附实验**<sup>[10]</sup> 大鼠尾静脉注射  $600 \mu\text{L}$   $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  FITC-ConA 以标记黏附的白细胞和血管内皮细胞。体循环 2 h 后, 解剖大鼠, 从左心室灌注 PBS

以去除红细胞和非黏附的白细胞。取出左眼在4% PFA中固定2 h,然后将视网膜分离并置于载玻片上。为了量化黏附在视网膜上的白细胞,用荧光倒置显微镜对视野内的白细胞数量进行观察并拍照,计算3个视野下黏附的中性粒细胞的总数量,以平均值代表视网膜样本黏附的中性粒细胞的总数量。

**ELISA** 大鼠血液于 $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,移取上层血清,血清中的肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 检测按照ELISA试剂盒方法操作。

**Western blot 实验** 提取总蛋白样品:将视网膜从 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱取出,在冰上解冻后,加入裂解液,静置5 min,在组织匀浆机中匀浆至均匀且无明显组织块的液体,液氮反复冻融5次, $15\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心10 min,上清即为总蛋白样本。

提取胞浆核样品:视网膜在冰上解冻后,加入胞浆核抽提试剂盒中的CRI液,在组织匀浆机中匀浆至均匀且无明显组织块的液体,冰上静置2 h,加入CRI II液,涡旋5 s, $15\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心10 min,上清即为胞浆样品。在胞浆沉淀中加入NR溶液,反复涡旋6次后, $15\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心10 min,上清即为胞浆样品。

使用BCA蛋白定量试剂盒测定样本的蛋白浓度,将所有样品统一到相等的蛋白浓度。蛋白质样品通过SDS-PAGE分离,然后转移到PVDF膜上。用5% BSA在TBST中封闭2 h后,在 $4\ ^\circ\text{C}$ 下用相应的一抗将膜孵育过夜。用TBST清洗3次,每次10 min,在室温下用相应的二抗孵育1 h。最后,用化学发光试剂观察蛋白的表达,并通过计算目标蛋白印迹与内部对照的灰色密度进行量化。

**统计学分析** 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用Graph-Pad Prism 8统计软件进行分析,组间差异的显著性通过单因素方差分析进行评估,然后进行Bonferroni事后检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结果

### 1 体重和FBG

正常对照组大鼠的体重在整个实验过程中稳步上升,糖尿病大鼠的体重则无明显变化( $P < 0.001$ );此外,糖尿病大鼠的FBG在第7天后趋于稳定,且明显高于正常对照组大鼠( $P < 0.001$ )。然而,研究结果显示PNS溶液滴眼给药(20、40和 $80\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )治疗并不影响糖尿病大鼠的体重和FBG(图1)。

### 2 病理切片分析

与正常对照组大鼠的视网膜相比,模型组糖尿病大鼠的视网膜细胞数量减少,细胞间的排列变得松散。与模型组相比,PNS溶液滴眼给药组大鼠的视网膜细胞数量减少的情况得到了改善(图2A)。此外,细胞数量的减少会导致糖尿病大鼠的视网膜内核层(inner nuclear layer, INL)厚度明显减少( $P < 0.001$ ),PNS溶液滴眼给药(40和 $80\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )治疗的糖尿病大鼠,视网膜INL厚度的减少明显增加( $P < 0.001$ ,图2B)。

### 3 无细胞毛细血管数量分析

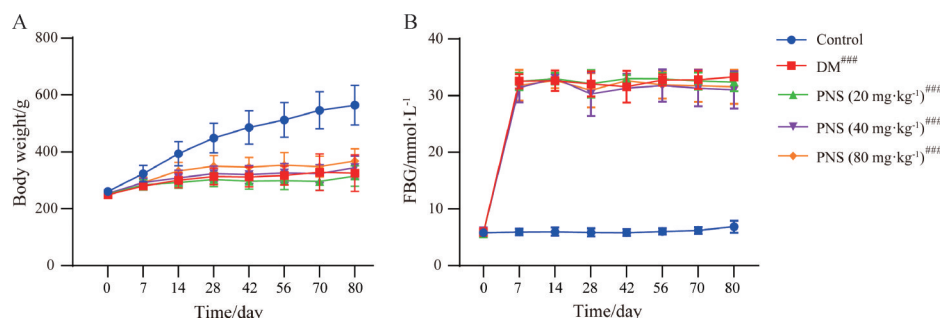
与正常对照组大鼠相比,模型组糖尿病大鼠的视网膜无细胞毛细血管数量明显增加( $P < 0.001$ );与模型组相比,PNS溶液滴眼给药(20、40和 $80\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )治疗的糖尿病大鼠的视网膜无细胞毛细血管数量明显减少( $P < 0.05$ ,图3)。

### 4 伊文思蓝染料检测血管渗漏

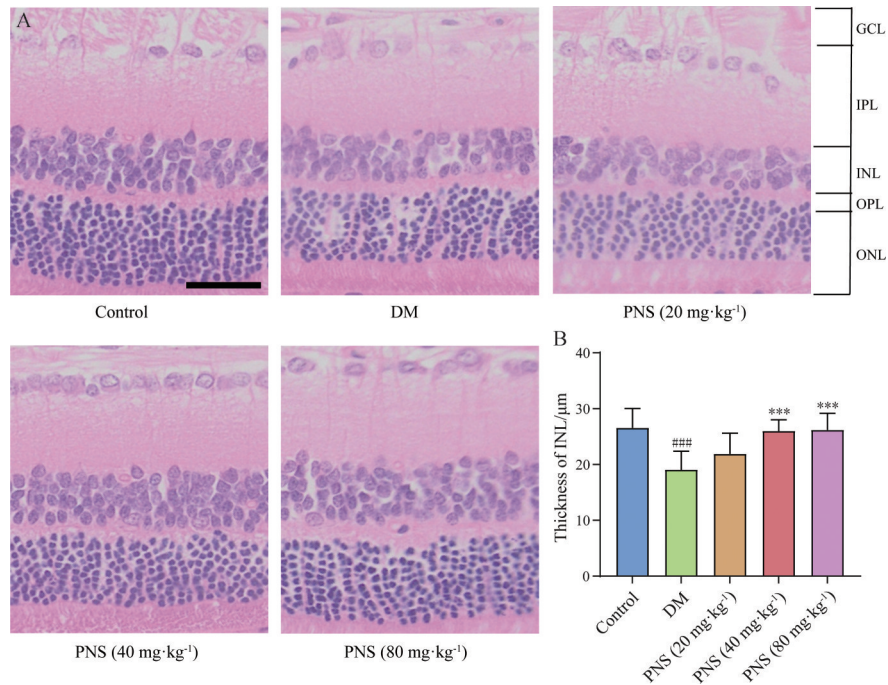
与正常对照组大鼠相比,模型组糖尿病大鼠的视网膜伊文思蓝染料的渗漏量显著增加,说明STZ造模后,糖尿病大鼠的视网膜血管的通透性增加。与模型组相比,PNS溶液滴眼给药组(40和 $80\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )的伊文思蓝染料渗漏量显著降低( $P < 0.05$ ),说明PNS溶液滴眼给药可以有效地降低血管的通透性,改善NPDR模型的血管功能(图4)。

### 5 Claudin-1和occludin的Western blot分析

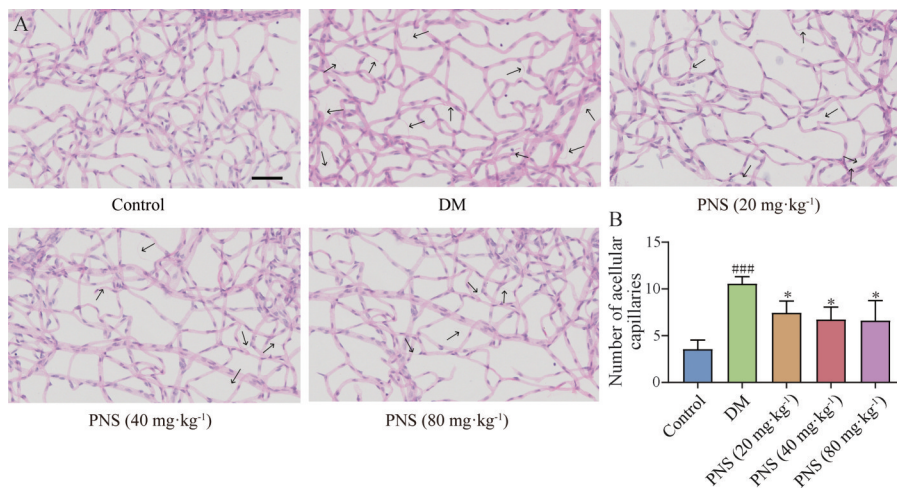
Claudin-1和occludin作为视网膜组织中的紧密连接蛋白,通过增加紧密连接蛋白的表达可以改善BRB



**Figure 1** Effect of *Panax notoginseng* saponins (PNS) on body weight (A) and fasting blood glucose (FBG, B) in diabetic rats.  $n = 20$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group. Control: Control group; DM: Diabetes mellitus group



**Figure 2** Effects of PNS on retinal morphology and structure and inner nuclear layer (INL) thickness in diabetic rats. A: Hematoxylin-eosin (HE) staining of retinas. Scale bar: 50 μm; B: Quantitative analysis of retinal INL thickness.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs DM group



**Figure 3** Effect of PNS on retinal acellular capillaries in diabetic rats. A: Typical diagram of acellular capillaries in retinal tissue. Scale bar: 100 μm, black arrows indicate acellular capillaries; B: Quantitative analysis of the number of acellular capillaries.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs DM group

的通透性。与正常对照组大鼠相比,模型组糖尿病大鼠的视网膜组织中紧密连接蛋白 claudin-1 和 occludin 的表达明显下降 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组相比, PNS 溶液滴眼给药 (40 和 80 mg·kg<sup>-1</sup>) 治疗的糖尿病大鼠的视网膜 claudin-1 和 occludin 的蛋白表达明显上调 (图 5)。

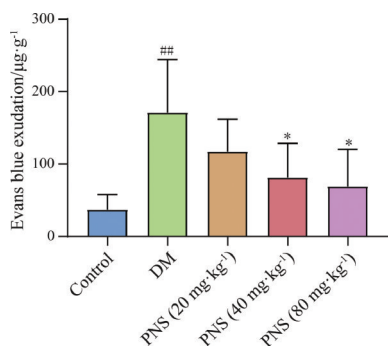
### 6 视网膜小胶质细胞的活化情况

在糖尿病视网膜病变的发展过程中,小胶质细胞发挥着重要作用; Iba-1 作为小胶质细胞理想的生物标

记物,常被用来判断小胶质细胞的活化状态。与正常对照组大鼠相比,模型组糖尿病大鼠的视网膜神经节细胞层、外丛状层和内丛状层中 Iba-1 的数量增加,表明糖尿病大鼠的小胶质细胞被激活, PNS 溶液滴眼给药治疗能够抑制糖尿病大鼠视网膜中小胶质细胞的活化 (图 6)。

### 7 中性粒细胞黏附分析

与正常对照组大鼠相比,模型组糖尿病大鼠的视网膜血管内皮细胞上黏附的中性粒细胞数量显著增加



**Figure 4** Comparison of the amount of Evans blue dye leakage in the retina of rats in each group.  $n = 6, \bar{x} \pm s$ . ### $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs DM group

( $P < 0.001$ ), 用PNS溶液滴眼给药 (20、40和80 mg·kg<sup>-1</sup>) 治疗后, 糖尿病大鼠视网膜血管内皮细胞上白细胞黏附数量的增加被明显逆转 ( $P < 0.01, P < 0.001, P < 0.001$ , 图7)。

### 8 ELISA 检测血清中炎症因子的表达

与正常对照组大鼠相比, 模型组糖尿病大鼠的血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 的表达量显著升高; 与模型组相比, PNS溶液滴眼给药 (20、40和80 mg·kg<sup>-1</sup>) 治疗可以有效降低糖尿病大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 的表达 (图8)。

### 9 NF- $\kappa$ B的转录激活机制研究

与正常对照组大鼠相比, 模型组糖尿病大鼠视网膜组织中胞核p65蛋白表达量增加 ( $P < 0.001$ ); 与模型组相比, PNS溶液滴眼给药 (20、40和80 mg·kg<sup>-1</sup>) 治疗后, 糖尿病大鼠胞核中p65的蛋白表达量明显减少 ( $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ , 图9)。

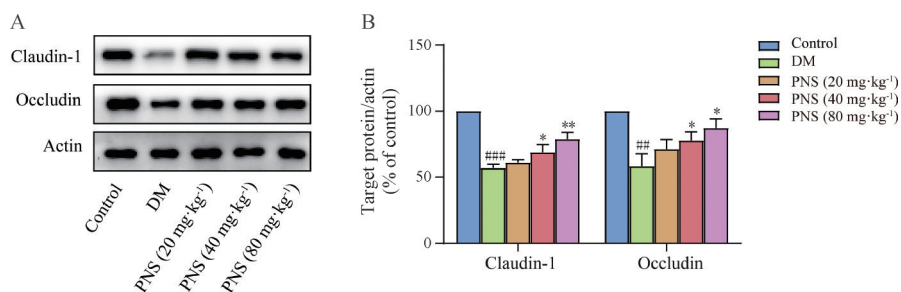
## 讨论

DR是慢性进行性糖尿病导致的视网膜微血管渗漏和阻塞, 是糖尿病常见的微血管并发症之一, 也是导致视力低下和失明的主要原因。临床上, DR主要表现为神经变性、血管渗漏、血管新生<sup>[11]</sup>, 视网膜脱离, 甚至

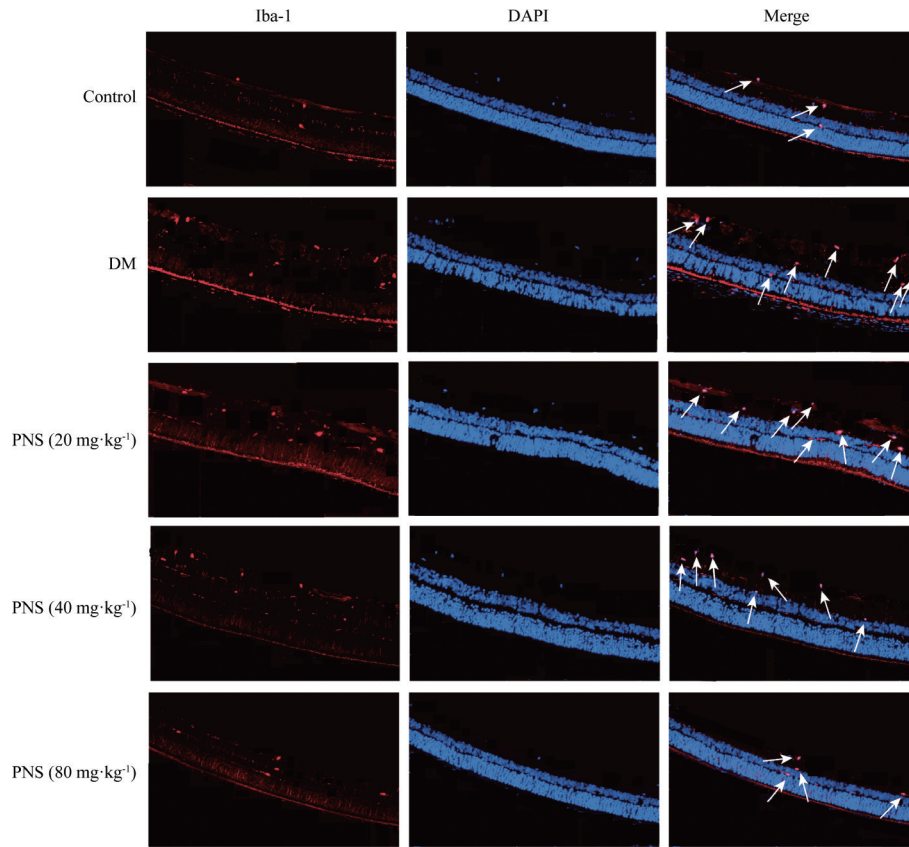
是失明<sup>[12]</sup>。DR根据是否出现新生血管分为NPDR和PDR<sup>[13]</sup>, 在大鼠模型中, 通常采用STZ造模后观察两个月, 给药1个月的实验方案研究药物对NPDR大鼠的药效<sup>[6,14]</sup>。

在NPDR大鼠模型中, 视网膜神经变性通常发生在血管损伤之前, 表现为视网膜细胞凋亡导致的视网膜层变薄和神经元活动丧失<sup>[15-17]</sup>。结果显示, PNS溶液滴眼给药1个月后显著抑制了视网膜神经细胞的损伤, 有效改善了视网膜病变。BRB破坏引起的视网膜通透性增强是视网膜血管功能性损伤的重要特征, 无细胞毛细血管增加是视网膜血管形态学损伤的重要特征。本研究通过伊文思蓝染料渗漏实验观察视网膜的血管功能, 无细胞毛细血管实验监测视网膜血管的形态, 结果显示PNS溶液滴眼给药可以显著改善视网膜血管的损伤。紧密连接蛋白的表达量与BRB的破坏密切相关。BRB由内部和外部屏障组成, 其中视网膜的内部BRB由视网膜毛细血管内皮细胞之间的紧密连接组成, 外部BRB由视网膜色素上皮细胞之间的紧密连接组成<sup>[18]</sup>。Claudin-1和occludin是主要的紧密连接蛋白, 对维持BRB的完整性至关重要<sup>[13]</sup>, 其蛋白表达减少会增加BRB的破坏。PNS溶液滴眼给药能够通过增加claudin-1和occludin蛋白的表达, 减少BRB的破坏。如果结合视网膜电图 (electroretinogram, ERG)、光学相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT) 等眼底造影技术, 将能够更加直观地观察视网膜形态和血管的变化。

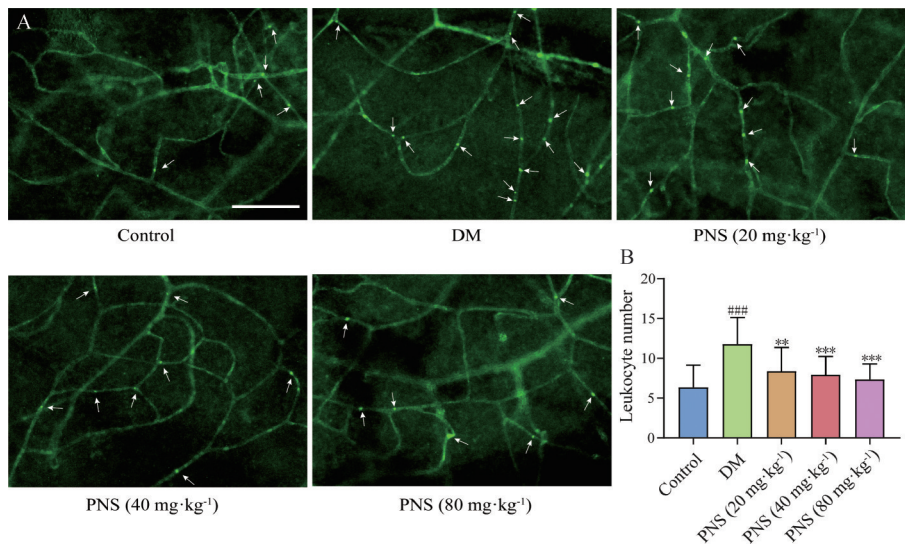
炎症早已被认为是DR发展和恶化的一个因素。小胶质细胞是视网膜上的免疫细胞, 其活化会诱导视网膜炎症损伤的发生<sup>[19]</sup>。Iba-1是一个常用的小胶质细胞的生物标志物。本实验结果显示, PNS溶液滴眼给药后能够减少Iba-1的数量, 抑制小胶质细胞的激活。此外, 在炎症条件下, 白细胞迁移的能力增强, 白细胞黏附在视网膜血管内皮上是DR中炎症可识别的特征之一<sup>[20]</sup>, 可导致内皮细胞损伤和坏死、BRB破坏



**Figure 5** Effect of PNS on retinal claudin-1 and occludin expression in diabetic rats. A: Typical bands of claudin-1 and occludin protein expression in retinal tissues; B: Statistical plots of quantitative analyses of claudin-1 and occludin proteins in retinal tissues. Results expressed as a percentage of controls.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . ### $P < 0.01$ , #### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs DM group



**Figure 6** Representative image of immunohistochemical staining of retinal tissue for ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1). Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ , white arrows indicate retinal microglia

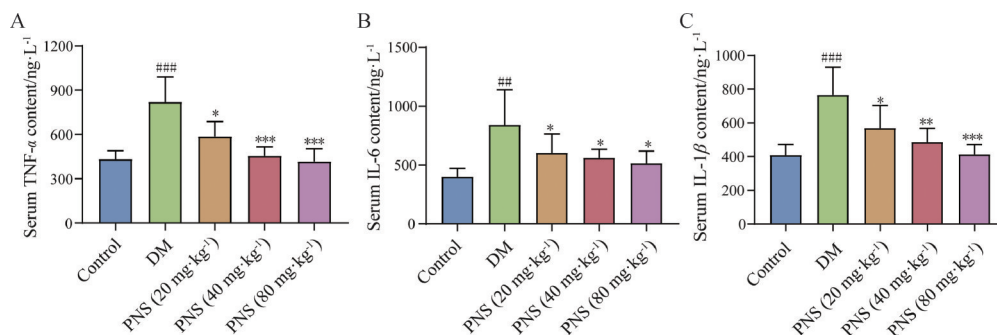


**Figure 7** Effect of PNS on retinal neutrophil adhesion in diabetic rats. A: Typical images of retinal fluorescein isothiocyanate-coupled concanavalin A lectin (FITC-ConA) staining. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ , white arrows indicate the location of neutrophils; B: Quantitative analysis of leukocyte numbers.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $###P < 0.001$  vs control group;  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  vs DM group

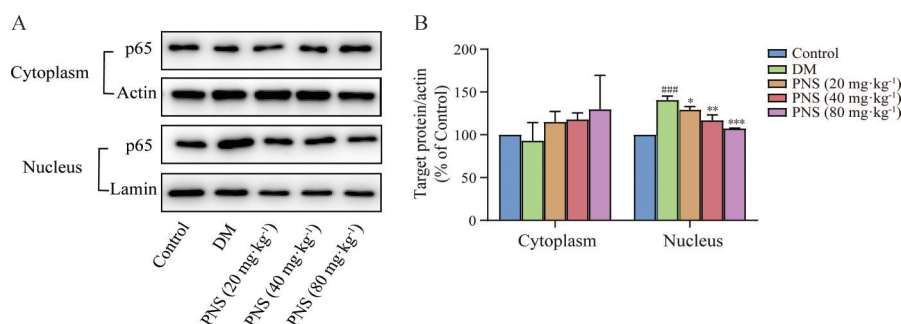
和血管通透性增加<sup>[21,22]</sup>。PNS 溶液滴眼给药可以减少白细胞对视网膜的黏附。

NF- $\kappa$ B 是促炎症基因转录的显著调节因子,在 DR 进展过程中对调节视网膜炎症至关重要<sup>[23]</sup>。NF- $\kappa$ B 信号通路的激活可以调节炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6

以及趋化因子的表达,进一步诱发神经变性、BRB 破坏、白细胞黏附和血管损伤。在本研究中,PNS 溶液滴眼给药降低炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的表达量,减少 p65 从细胞质到细胞核的核转位,说明 PNS 溶液滴眼给药能够通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活而改善



**Figure 8** Effect of PNS on serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , A), interleukin-6 (IL-6, B) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , C).  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$ , <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs DM group



**Figure 9** Effect of PNS on nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway in the retina of diabetic rats. A: Typical bands of p65 protein expression in the cytoplasm and cytosol of retinal tissues; B: Statistical plots of quantitative analyses of p65 protein in the cytoplasm and cytosol. Results expressed as a percentage of controls.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs DM group

视网膜炎症。

综上所述, PNS 溶液滴眼给药可以通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活, 抑制 DR 发生和发展过程中的视网膜炎症, 从而明显减轻糖尿病大鼠的视网膜损伤和 BRB 的渗漏。此外, 课题组前期的研究结果显示口服 PNS 溶液也是通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活, 达到改善 DR 的作用<sup>[6]</sup>。然而, 伊文思蓝染料渗漏量的指标检测结果显示, PNS 口服剂量需要达到 160 mg·kg<sup>-1</sup> 时才能够显著减少伊文思蓝染料的渗漏量 ( $P < 0.05$ ), 而 PNS 溶液滴眼给药剂量为 40 mg·kg<sup>-1</sup> 时就能够显著降低伊文思蓝染料的渗漏量 ( $P < 0.05$ ), 说明滴眼给药剂量达到口服剂量 1/4 时, 两者的疗效相当。眼部给药的安全性也至关重要, 在 PNS 溶液滴眼给药过程中未发现大鼠眼部出现分泌物和红肿等情况。另一项采用家兔对 PNS 温敏凝胶滴眼剂的刺激性进行评价, 结果也未发现不良刺激性 (数据另文发表)。说明 PNS 滴眼给药是一种安全的给药方式, 在 DR 的治疗中具有巨大的应用潜力。

**作者贡献:** 孙鑫负责完成动物实验、采集数据、分析数据和撰写文章; 王亚茹负责动物实验、分析数据和修改文稿; 陈泓淦负责动物实验; 程雪梅、陈明、赖树生、季莉莉、尉小慧负

责指导实验方案; 王长虹负责指导实验方案、文章的审阅和修改。

**利益冲突:** 本研究与任何组织和个人均不存在利益冲突。

## References

- [1] Li HL, Sun HH, Liu HY, et al. The mechanism by which *Peganum harmala* L. inhibits high glucose-induced tube formation in endothelial cells [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 2544-2552.
- [2] Fehér J, Taurone S, Spoletini M, et al. Ultrastructure of neurovascular changes in human diabetic retinopathy [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2018, 31: 1042259236.
- [3] Wang W, Lo A. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19: 1816.
- [4] Song YL, Wang ZL, Xing W, et al. Pharmacological mechanism of Compound Xueshuantong in treatment of diabetic retinopathy based on network pharmacology [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1442-1448.
- [5] Liang XL, Liu QQ, Li WL, et al. Research progress in pharmacological effects and clinical applications of *Panax notoginseng* saponins [J]. Hubei Agric Sci (湖北农业科学), 2021, 60: 15-19.

- [6] Wang YR, Sun X, Xie YM, et al. *Panax notoginseng* saponins alleviate diabetic retinopathy by inhibiting retinal inflammation: association with the NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319: 117135.
- [7] Vaneev A, Tikhomirova V, Chesnokova N, et al. Nanotechnology for topical drug delivery to the anterior segment of the eye [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 12368.
- [8] Wang YR, Wang CH. Novel eye drop delivery systems: advance on formulation design strategies targeting anterior and posterior segments of the eye [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14: 1150.
- [9] Li KM, Xu ZP, Tian N, et al. Zishen jianpi huayu tablets improve retinopathy in diabetic rats by inhibiting AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理)*, 2020, 31: 1147-1152.
- [10] Deliyanti D, Zhang Y, Khong F, et al. FT011, a novel cardiorenal protective drug, reduces inflammation, gliosis and vascular injury in rats with diabetic retinopathy [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e134392.
- [11] Su M, Bai HL, Kong BH, et al. Research progress on the mechanism of metformin in improving diabetic retinopathy [J]. *Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志)*, 2019, 35: 1530-1532.
- [12] Kusuvara S, Fukushima Y, Ogura S, et al. Pathophysiology of diabetic retinopathy: the old and the new [J]. *Diabetes Metab J*, 2018, 42: 364.
- [13] Yu Z, Gong C, Lu B, et al. *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. alleviates diabetic retinopathy by preventing retinal inflammation and tight junction protein decrease [J]. *J Diabetes Res*, 2015, 2015: 518317.
- [14] Gong CY, Lu B, Hu QW, et al. Streptozotocin induced diabetic retinopathy in rat and the expression of vascular endothelial growth factor and its receptor [J]. *Int J Ophthalmol*, 2013, 6: 573-577.
- [15] Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, 27: 283-290.
- [16] Chakravarthy H, Devanathan V. Molecular mechanisms mediating diabetic retinal neurodegeneration: potential research avenues and therapeutic targets [J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 66: 445-461.
- [17] Livne-Bar I, Lam S, Chan D, et al. Pharmacologic inhibition of reactive gliosis blocks TNF-alpha-mediated neuronal apoptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2386.
- [18] Zhang HW, Shi Y. Recent progress on diabetic retinopathy and mechanism of blood-retinal barrier injury [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊)*, 2021, 39: 105-109.
- [19] Yi QX, Zhang JF, Liu L. Function of microglia in diabetic retinopathy [J]. *Int Eye Sci (国际眼科杂志)*, 2019, 19: 2048-2052.
- [20] Jousseaume AM, Poulaki V, Mitsiades N, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression [J]. *FASEB J*, 2002, 16: 438-440.
- [21] Kong WW, Ren J. Current status and prospects for treatment of diabetic retinopathy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 287-295.
- [22] Xu HP, Forrester JV, Liversidge J, et al. Leukocyte trafficking in experimental autoimmune uveitis: breakdown of blood-retinal barrier and upregulation of cellular adhesion molecules [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 226-234.
- [23] Mesquida M, Drawnel F, Fauser S. The role of inflammation in diabetic eye disease [J]. *Semin Immunopathol*, 2019, 41: 427-445.