

## · 实验研究 ·

# 特女贞苷对高糖诱导人视网膜微血管内皮细胞损伤的抑制作用及其机制

刘茜 冯效梅 刘长庚 李海军 杨潇远 任静 张颖

河南省人民医院眼科 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所 郑州大学人民医院眼科, 郑州 450003

通信作者:刘茜, Email: qianliuyk@163. com

**【摘要】 目的** 探讨特女贞苷对高糖诱导人视网膜微血管内皮细胞(hRMECs)损伤的抑制作用及其机制。**方法** 将hRMECs分为正常对照组、高渗组、高糖组、高糖+低浓度特女贞苷组、高糖+中浓度特女贞苷组和高糖+高浓度特女贞苷组,分别用含5.5 mmol/L葡萄糖、5.5 mmol/L葡萄糖+24.5 mmol/L甘露醇、30 mmol/L葡萄糖、30 mmol/L葡萄糖+25、50、100  $\mu$ mol/L特女贞苷的培养液培养24 h。另将hRMECs分为高糖+小干扰RNA阴性序列(si-NC)组、高糖+si-叉头框转录因子O4(FOXO4)组、高糖+特女贞苷+pcDNA组、高糖+特女贞苷+pcDNA-FOXO4组,转染相应试剂后分别用含30 mmol/L葡萄糖或100  $\mu$ mol/L特女贞苷+30 mmol/L葡萄糖的培养液培养24 h。采用流式细胞术检测hRMECs细胞凋亡情况;采用硫代巴比妥酸法检测细胞中丙二醛(MDA)质量浓度;采用黄嘌呤氧化酶法检测细胞中超氧化物歧化酶(SOD)活性;采用ELISA法检测细胞培养上清液中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 质量浓度;采用Western blot法检测细胞中FOXO4蛋白表达水平。

**结果** 正常对照组、高渗组、高糖组、高糖+低浓度特女贞苷组、高糖+中浓度特女贞苷组和高糖+高浓度特女贞苷组细胞凋亡率分别为(7.32 $\pm$ 0.72)%、(7.44 $\pm$ 0.70)%、(23.96 $\pm$ 1.32)%、(19.84 $\pm$ 1.09)%、(14.13 $\pm$ 0.85)%和(9.84 $\pm$ 0.70)%。各组细胞凋亡率、MDA质量浓度、SOD活性值、IL-1 $\beta$ 质量浓度、TNF- $\alpha$ 质量浓度和FOXO4蛋白相对表达量总体比较,差异均有统计学意义( $F=498.545, 1186.693, 516.629, 654.247, 638.238, 472.655$ ,均 $P<0.001$ ),其中与高糖组相比,高糖+低、中、高浓度特女贞苷组细胞凋亡率、MDA浓度、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 质量浓度、FOXO4蛋白相对表达量均明显降低,SOD活性值明显升高,且呈剂量依赖性;与高糖+si-NC组相比,高糖+si-FOXO4组FOXO4蛋白相对表达量、细胞凋亡率、MDA浓度、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 质量浓度降低,SOD活性值升高;与高糖+特女贞苷+pcDNA组相比,高糖+特女贞苷+pcDNA-FOXO4组细胞凋亡率、MDA浓度、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 质量浓度、FOXO4蛋白相对表达量均明显升高,SOD活性值明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。**结论** 特女贞苷可保护hRMECs免受高糖损伤,作用机制与其下调FOX4表达抑制hRMECs凋亡、氧化应激和炎症反应有关。

**【关键词】** 糖尿病视网膜病变; FOXO4蛋白; 凋亡; 氧化应激; 炎症; 特女贞苷

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(U1404812); 河南省医学科技攻关计划省部共建项目(SBGJ2018083); 河南省立眼科医院基础研究专项项目(21JQCQN005)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20211130-00662

## Inhibitory effect of specnuezhenide on high glucose-induced human retinal microvascular endothelial cell injury and its mechanism

Liu Qian, Feng Xiaomei, Liu Changgeng, Li Haijun, Yang Xiaoyuan, Ren Jing, Zhang Ying

Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Hospital, Henan Eye Institute, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Liu Qian, Email: qianliuyk@163. com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of specnuezhenide on high glucose-induced human retinal microvascular endothelial cells (hRMECs) injury and its mechanism. **Methods** The hRMECs were divided into a normal control group cultured in a culture medium containing 5.5 mmol/L glucose, a hypertonic group cultured in a culture medium containing 5.5 mmol/L glucose + 24.5 mmol/L mannitol, a high glucose group cultured in a culture medium containing 30 mmol/L glucose, as well as high glucose+low-, medium-, and high-dose specnuezhenide groups cultured in culture media containing 30 mmol/L glucose + 25, 50, 100  $\mu$ mol/L specnuezhenide for 24 hours, respectively. In addition, hRMECs were divided into a high glucose+small interfering RNA-negative control (si-NC)

group cultured in a culture medium containing 30 mmol/L glucose, a high glucose+si-forkhead box O4 (FOXO4) group cultured in a culture medium containing 30 mmol/L glucose, a high glucose+specnuezhenide+pcDNA group cultured in a culture medium containing 100  $\mu$ mol/L specnuezhenide +30 mmol/L glucose, and a high glucose+specnuezhenide+pcDNA-FOXO4 group cultured in a culture medium containing 100  $\mu$ mol/L specnuezhenide+30 mmol/L glucose for 24 hours after transfection by corresponding reagents. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The malondialdehyde (MDA) concentration and superoxide dismutase (SOD) activity in cells were detected by the thiobarbituric acid method and xanthine oxidase method, respectively. The concentrations of interleukin (IL)-1 $\beta$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in the cell culture supernatant were detected by enzyme linked immunosorbent assay. The relative expression level of FOXO4 protein in cells was determined by Western blot.

**Results** The apoptosis rates of normal control group, hypertonic group, high glucose group, high glucose+low-, medium- and high-dose specnuezhenide groups were (7.32 $\pm$ 0.72)%, (7.44 $\pm$ 0.70)%, (23.96 $\pm$ 1.32)%, (19.84 $\pm$ 1.09)%, (14.13 $\pm$ 0.85)% and (9.84 $\pm$ 0.70)%, respectively. There were significant differences in cell apoptosis rate, MDA concentration, SOD activity, the concentration of IL-1 $\beta$ , the concentration of TNF- $\alpha$ , and the relative expression level of FOXO4 protein among the six groups ( $F=498.545, 1186.693, 516.629, 654.247, 638.238, 472.655$ ; all at  $P<0.001$ ). Compared with high glucose group, the apoptosis rate, MDA concentration, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  concentration, FOXO4 protein expression level were significantly decreased in high glucose+low-, medium- and high-dose specnuezhenide groups, and SOD activity was significantly increased in a dose-dependent manner. Compared with high glucose+si-NC group, the expression level of FOXO4 protein, cell apoptosis rate, MDA concentration, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mass concentrations were decreased in high glucose+si-FOXO4 group, while the SOD activity was increased. Compared with high glucose+specnuezhenide+pcDNA group, the apoptosis rate, MDA concentration, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  concentrations, FOXO4 protein expression level of hRMECs in high glucose+specnuezhenide+pcDNA-FOXO4 group were significantly increased, and SOD activity was significantly decreased (all at  $P<0.05$ ).

**Conclusions** Specnuezhenide can protect hRMECs from high glucose-induced apoptosis, oxidative stress and inflammatory response by down-regulating FOXO4.

**[Key words]** Diabetic retinopathy; FOXO4 protein; Apoptosis; Oxidative stress; Inflammation; Specnuezhenide

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (U1404812); The Provincial and Ministerial Co-construction Project of Henan Medical Science and Technology Research Program (SBJ2018083); Basic Research Special Project of Henan Provincial Eye Hospital (21JCQN005)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20211130-00662

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病常见的微血管并发症,也是成年人致盲的主要原因<sup>[1]</sup>。研究表明,DR的发病机制与持续性高血糖引起的人视网膜微血管内皮细胞(human retinal microvascular endothelial cells, hRMECs)损伤,如过度氧化应激、炎症反应及细胞凋亡等密切相关<sup>[2-4]</sup>。抑制高血糖引起的hRMECs损伤可延缓DR进展。特女贞苷是从木犀科植物女贞子干燥成熟果实中分离得到的环烯醚萜苷类物质,具有抗炎、免疫调节等多种药理活性。研究显示,特女贞苷可通过调控Bcl-2/Bax和抑制caspase 3激活减少高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡<sup>[5]</sup>,也可减少过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡,并减轻血管内皮细胞氧化损伤<sup>[6]</sup>。基于特女贞苷的药理作用和相关研究结果推测,特女贞苷可对DR中hRMECs发挥保护作用。叉头框转录因子O4(forkhead box O4, FOXO4)是叉头框蛋白家族的成员之一,参与调控细胞凋亡、氧化应激及炎症等生理或病理过程<sup>[7]</sup>。有研究显示,FOXO4在高糖诱导的大鼠视

网膜血管内皮细胞中表达升高,抑制FOXO4表达可促进高糖诱导的大鼠视网膜血管内皮细胞增生,并阻止细胞凋亡<sup>[8]</sup>。本研究拟探讨特女贞苷对高糖诱导下hRMECs损伤的抑制作用及其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞来源** hRMECs购自北京伊塔生物科技有限公司。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 特女贞苷(成都仪睿生物科技有限公司);Opti-MEM培养液、DMEM培养液、膜联蛋白V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)试剂盒、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(浙江天杭生物科技有限公司);Lipofectamine™ 2000试剂盒(美国Invitrogen公司);FOXO4小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)(si-FOX4)、过表达载体(pcDNA-

FOXO4)、siRNA 阴性序列 (siRNA negative control, si-NC)、空载体 (pcDNA) (上海生工生物工程有限公司);超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 试剂盒 (南京建成科技有限公司);FOXO4 抗体 (Ab154520)、 $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) (Ab179467) (英国 Abcam 公司);山羊抗兔二抗 (ZB2301, 北京中杉金桥生物技术有限公司)。流式细胞仪 (FACSCalibur, 美国 BD 公司);凝胶扫描系统 (WD-9413C, 北京六一生物科技有限公司);酶标仪 (Fax-2100, 美国 Awareness 公司);荧光定量 PCR 仪 (T100, 美国 Bio-Rad 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 hRMECs 体外培养和分组处理

采用含体积分数 10% FBS 的低糖 DMEM 培养液培养 hRMECs, 细胞置于 37  $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中。当细胞融合至 90% 时, 质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化并传代。将 2.5 ml 对数期 hRMECs (1.0 $\times$ 10<sup>5</sup> 个/ml) 接种至 6 孔板中, 培养 4 h 后弃培养液。将 hRMECs 分为正常对照组、高渗组、高糖组、高糖+低浓度特女贞苷组、高糖+中浓度特女贞苷组和高糖+高浓度特女贞苷组, 其中正常对照组、高渗组和高糖组分别采用含 5.5 mmol/L 葡萄糖、5.5 mmol/L 葡萄糖 + 24.5 mmol/L 甘露醇和 30 mmol/L 葡萄糖培养液培养 24 h; 高糖+低、中、高浓度特女贞苷组参考文献[5] 药物剂量, 分别用含 25、50、100  $\mu$ mol/L 特女贞苷和 30 mmol/L 葡萄糖培养液共同培养 24 h。24 h 后收集各组细胞和细胞培养液, 进行相关指标检测。

### 1.2.2 流式细胞术检测 hRMECs 细胞凋亡情况

将收集的各组 hRMECs 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗 2 次, 并调整密度为 1.0 $\times$ 10<sup>6</sup> 个/ml。取 1.0 ml 细胞悬液, 离心半径 8 cm, 1 000 r/min 离心 5 min 后, 弃上清, 加 500  $\mu$ l 结合缓冲液重悬细胞。加 10  $\mu$ l Annexin V-FITC, 避光孵育 10 min。加 5  $\mu$ l PI, 避光孵育 5 min, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。细胞凋亡率 (%) = (早期凋亡细胞数 + 晚期凋亡细胞数) / 细胞总数  $\times$  100%。

### 1.2.3 硫代巴比妥酸法检测 hRMECs 中 MDA 质量浓度

将收集的各组细胞用 PBS 清洗 2 次, 加细胞裂解液充分裂解细胞, 3 500 r/min 离心 10 min, 收集上清液。设置标准管、标准空白管、测定管和测定空白管, 分别加入 10 nmol/ml 标准品、无水乙醇、上清液和上清液各 0.1 ml, 另各管均加入试剂一 0.1 ml。混合均

匀, 向标准管、标准空白管、测定管中均加 3.0 ml 试剂二和 1.0 ml 试剂三, 向测定空白管中加 3.0 ml 试剂二和 1.0 ml 50% 冰醋酸。涡旋混合均匀, 95  $^{\circ}$ C 水浴 40 min。流水冷却, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 使用酶标仪测定波长 532 nm 处各管吸光度 (absorbance, A) 值。MDA 质量浓度 (nmol/ml) = (A<sub>测定管</sub> - A<sub>测定空白管</sub>) / (A<sub>标准管</sub> - A<sub>标准空白管</sub>)  $\times$  标准品浓度 (10 nmol/ml)  $\times$  样品测试前稀释倍数。

### 1.2.4 黄嘌呤氧化酶法检测 hRMECs 中 SOD 活性

将收集的各组细胞用 PBS 清洗 2 次, 加细胞裂解液充分裂解细胞, 3 500 r/min 离心 10 min, 收集上清液。设置测定管和对照管, 测定管依次加入 1.0 ml 试剂一应用液、0.05 ml 上清液、0.1 ml 试剂二、0.1 ml 试剂三和 0.1 ml 试剂四应用液; 对照管依次加入 1.0 ml 试剂一应用液、0.05 ml 蒸馏水、0.1 ml 试剂二、0.1 ml 试剂三和 0.1 ml 试剂四应用液。将管中的液体涡旋混合均匀, 37  $^{\circ}$ C 水浴 40 min。向管中加入 2 ml 显色液, 混合均匀, 室温放置 10 min, 使用酶标仪测定波长 550 nm 处 A 值。SOD 活性 [ $\mu$ mol / (min  $\cdot$  L)] = (A<sub>对照管</sub> - A<sub>测定管</sub>) / A<sub>对照管</sub> / 50%  $\times$  反应液总量 / 所取样品量。

### 1.2.5 ELISA 法检测细胞培养上清液中 IL-1 $\beta$ 和 TNF- $\alpha$ 质量浓度

收集各组细胞培养上清, 3 500 r/min 离心 10 min, 收集上清液。先将试剂盒在室温下平衡 30 min。设置空白孔、标准品孔、零孔和样品孔, 空白孔不加样, 标准品孔每孔加 50  $\mu$ l 稀释好的标准品和 50  $\mu$ l 生物素抗原工作液, 零孔加 50  $\mu$ l 标准品/样品稀释液和 50  $\mu$ l 生物素抗原工作液, 样品孔加 50  $\mu$ l 样品和 50  $\mu$ l 生物素抗原工作液。轻轻摇晃, 盖上封板膜, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 重复 5 次, 拍干。向标准品孔、零孔和样品孔中加 50  $\mu$ l 亲和素-HRP, 轻轻摇晃, 盖上封板膜, 37  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 30 min。小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 重复 5 次, 拍干。每孔先加入 50  $\mu$ l 显色剂 A, 再加入 50  $\mu$ l 显色剂 B, 轻轻震荡混匀, 37  $^{\circ}$ C 避光显色 10 min。向每孔加 50  $\mu$ l 终止液, 终止反应 (此时蓝色立转黄色)。以空白孔调零, 使用酶标仪测定各孔处 450 nm A 值, 根据浓度和标准品 A 值算出标准曲线的回归方程, 并计算 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  质量浓度。

### 1.2.6 Western blot 法检测 hRMECs 中 FOXO4 蛋白相对表达量

收集各组细胞, PBS 清洗 2 次, 用 RIPA 试剂裂解细胞, 4  $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 10 min。取上清液, BCA 法检测蛋白浓度后, 行质量分数 10%

SDS-PAGE 电泳。将分离蛋白转至 PVDF 膜,质量分数 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。分别用 FOXO4 (1:500)、 $\beta$ -actin (1:1 000) 一抗 4 °C 孵育过夜,洗膜后加入山羊抗兔二抗 (1:2 000), 37 °C 孵育 1 h。加显影液,避光显影,曝光拍照,ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值,以  $\beta$ -actin 为内参,计算 FOXO4 相对表达量。

**1.2.7 si-NC、si-FOXO4、pcDNA 和 pcDNA-FOXO4 转染和干预** 取 2.5 ml 处于对数生长期、浓度为  $2.5 \times 10^4$  个/ml 的 hRMECs 细胞悬液接种至 6 孔板,培养 24 h,弃培养液,加入不含 FBS 的 DMEM 培养液。将 250  $\mu$ l Opti-MEM 培养液与 6.0  $\mu$ l Lipofectamine™ 2000 试剂混匀,室温孵育 5 min。将 250  $\mu$ l Opti-MEM 培养液与终浓度为 100 nmol/L 的 si-FOXO4、si-NC、pcDNA-FOXO4 或 pcDNA 混匀,室温孵育 5 min。将上述混合液室温孵育 15 min,缓慢加至 6 孔板中 (100  $\mu$ l/孔),于培养箱中孵育 12 h。转染 si-FOXO4 或 si-NC 后的细胞均用含 30 mmol/L 葡萄糖的培养液培养 24 h,分别记为高糖+si-FOXO4 组、高糖+si-NC 组;转染 pcDNA-FOXO4 或 pcDNA 后的细胞均用含 100  $\mu$ mol/L 特女贞苷和 30 mmol/L 葡萄糖的培养液培养 24 h,分别记为高糖+特女贞苷+pcDNA-FOXO4 组、高糖+特女贞苷+pcDNA 组。分别按照上述 1.2.2~1.2.6 方法检测细胞凋亡率、细胞中 MDA 质量浓度和 SOD 活性、培养上清液中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  质量浓度及细胞中 FOXO4 蛋白相对表达量。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件 (美国 IBM SPSS 公司) 进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示。各组指标总体差异比较采用单因素方差分析,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

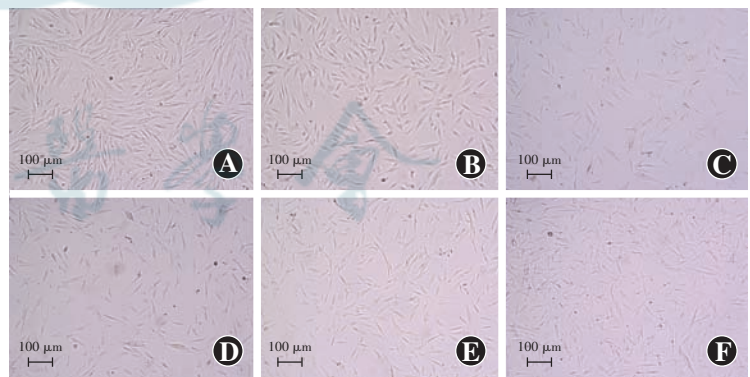
### 2.1 不同剂量特女贞苷处理组细胞凋亡率比较

正常对照组和高渗组细胞基本无变化,细胞形状均一,数量级较多,细胞间融合较好。高糖组 hRMECs 整体密度降低,细胞周围出现空隙,细胞变形,高糖+低、中和高浓度特女贞苷组相较于高糖组,hRMECs 生长状态逐渐恢复,数量增多 (图 1)。正常对照组、高渗组、高糖组、高糖+低浓度特女贞苷组、高糖+中浓度特女贞苷组和高糖+高浓度特女贞苷组

hRMECs 细胞凋亡率分别为  $(7.32 \pm 0.72)\%$ 、 $(7.44 \pm 0.70)\%$ 、 $(23.96 \pm 1.32)\%$ 、 $(19.84 \pm 1.09)\%$ 、 $(14.13 \pm 0.85)\%$  和  $(9.84 \pm 0.70)\%$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 498.545, P < 0.05$ )。其中高糖组细胞凋亡率较正常对照组明显升高,不同剂量特女贞苷处理组细胞凋亡率明显低于高糖组,且随着特女贞苷剂量逐渐增加,细胞凋亡率逐渐下降,差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 2)。

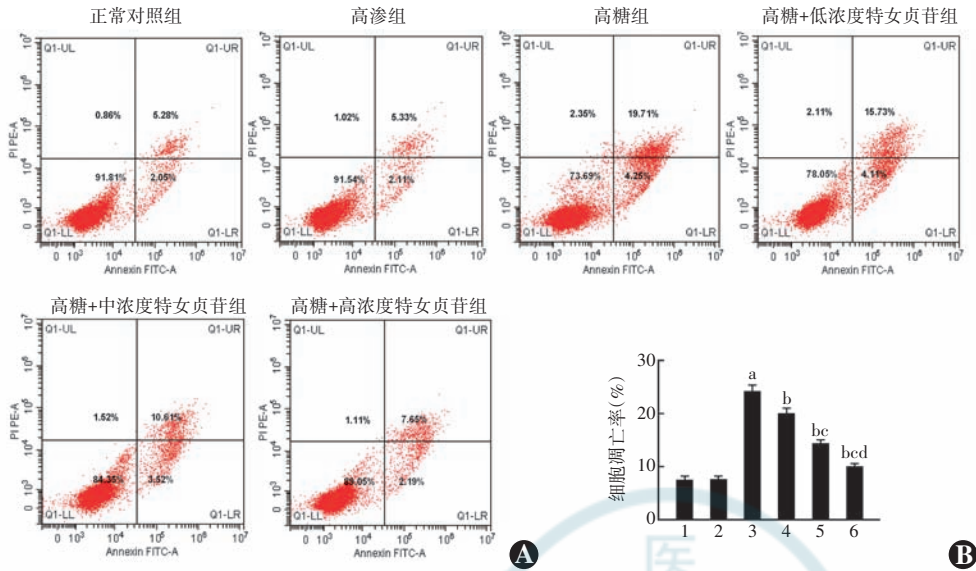
### 2.2 不同剂量特女贞苷处理组细胞中 MDA 浓度和 SOD 活性比较

正常对照组、高渗组、高糖组、高糖+低浓度特女贞苷组、高糖+中浓度特女贞苷组和高糖+高浓度特女贞苷组 MDA 浓度分别为  $(83.96 \pm 6.81)$ 、 $(82.41 \pm 7.98)$ 、 $(546.04 \pm 21.65)$ 、 $(471.09 \pm 21.65)$ 、 $(344.85 \pm 24.27)$  和  $(172.34 \pm 20.17)$  nmol/ml, SOD 活性值分别为  $(273.11 \pm 17.82)$ 、 $(268.56 \pm 19.98)$ 、 $(35.41 \pm 2.47)$ 、 $(61.78 \pm 5.91)$ 、 $(130.54 \pm 16.70)$  和  $(224.69 \pm 15.74)$   $\mu$ mol/(min · L), 总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 1 186.693, 516.629$ , 均  $P < 0.05$ ), 其中与正常对照组比较,高糖组 hRMECs 中 MDA 浓度明显升高, SOD 活性明显降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 与高糖组比较,高糖+低、中、高浓度特女贞苷组 hRMECs 中 MDA 含量均降低, SOD 活性值均升高, 且呈剂量依赖性, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 3)。



**图 1 各组 hRMECs 细胞形态** ( $\times 100$ , 标尺 = 100  $\mu$ m) 正常对照组和高渗组细胞形状均一,数量级较多,细胞间融合较好。高糖组 hRMECs 整体密度降低,细胞周围出现空隙,细胞变形,高糖+低、中和高浓度特女贞苷组 hRMECs 生长状态逐渐恢复,数量增多 A:正常对照组 B:高渗组 C:高糖组 D:高糖+低浓度特女贞苷组 E:高糖+中浓度特女贞苷组 F:高糖+高浓度特女贞苷组

**Figure 1 Morphology of hRMECs in different groups** ( $\times 100$ , bar = 100  $\mu$ m) Cells in normal control group and hypertonic group were uniform in shape, with more orders of magnitude and better intercellular fusion. In high glucose group, the overall density of cells was decreased, and void appeared around the cells, and cell deformation occurred. In high glucose+low-, medium- or high-dose specnuezhenide group, the growth state of cells gradually recovered and the number increased A: normal control group B: hypertonic group C: high glucose group D: high glucose+low-dose specnuezhenide group E: high glucose+ medium-dose specnuezhenide group F: high glucose+ high-dose specnuezhenide group



**图 2 各组 hRMECs 细胞凋亡情况** A: 各组细胞凋亡流式细胞图 B: 各组细胞凋亡率比较  $F = 498.545, P < 0.05$ . 与正常对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与高糖组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与高糖+低浓度特女贞苷组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与高糖+中浓度特女贞苷组相比, <sup>d</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验;  $n = 3$ ) 1: 正常对照组; 2: 高渗组; 3: 高糖组; 4: 高糖+低浓度特女贞苷组; 5: 高糖+中浓度特女贞苷组; 6: 高糖+高浓度特女贞苷组

**Figure 2 Apoptosis of hRMECs in different groups** A: Flow cytometry of apoptosis B: Comparison of apoptosis rate among different groups  $F = 498.545, P < 0.05$ . Compared with normal control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with high glucose group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; compared with high glucose+low-dose specnuezhenide group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; compared with high glucose+medium-dose specnuezhenide group, <sup>d</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test;  $n = 3$ ) 1: normal control group; 2: hypertonic group; 3: high glucose group; 4: high glucose+low-dose specnuezhenide group; 5: high glucose+medium-dose specnuezhenide group; 6: high glucose+high-dose specnuezhenide group

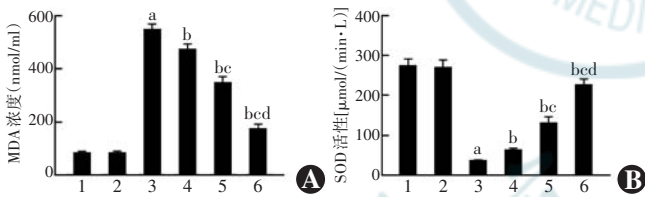
### 2.3 不同剂量特女贞苷处理组细胞培养上清液中炎性因子表达比较

正常对照组、高渗组、高糖组、高糖+低浓度特女贞苷组、高糖+中浓度特女贞苷组和高糖+高浓度特女贞苷组 IL-1 $\beta$  质量浓度分别为 (144.15  $\pm$  14.34)、(145.76  $\pm$  21.76)、(639.26  $\pm$  33.14)、(552.95  $\pm$  37.28)、(403.09  $\pm$  20.89) 和 (247.42  $\pm$  22.84) pg/ml, TNF- $\alpha$  质量浓度分别为 (214.84  $\pm$  16.22)、(211.77  $\pm$  24.17)、(717.12  $\pm$  29.80)、(609.67  $\pm$  33.63)、(497.67  $\pm$  28.09) 和 (332.03  $\pm$  24.19) pg/ml, 总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 654.247, 638.238$ , 均  $P < 0.05$ ), 其中与正常对照组比较, 高糖组细胞中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  质量浓度

显著升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 与高糖组比较, 高糖+低、中、高浓度特女贞苷组 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  质量浓度均显著降低, 且呈剂量依赖性, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。正常对照组与高渗组细胞中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  质量浓度比较, 差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ) (图 4)。

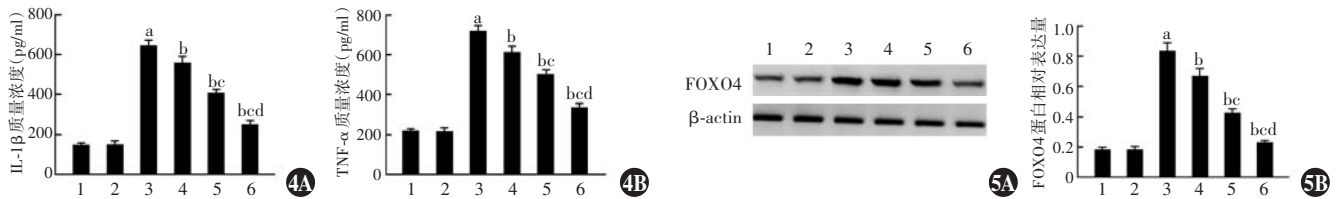
### 2.4 不同剂量特女贞苷处理组细胞中 FOXO4 蛋白相对表达量比较

高糖组 FOXO4 蛋白条带最强, 随着特女贞苷浓度的降低, FOXO4 蛋白条带强度逐渐减弱。正常对照组、高渗组、高糖组、高糖+低浓度特女贞苷组、高糖+中浓度特女贞苷组和高糖+高浓度特女贞苷组细胞中 FOXO4 蛋白相对表达量分别为 0.18  $\pm$  0.02、0.18  $\pm$  0.03、0.83  $\pm$  0.06、0.66  $\pm$  0.05、0.42  $\pm$  0.03 和 0.22  $\pm$  0.02, 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 472.655, P < 0.05$ ), 其中与正常对照组比较, 高糖组细胞中 FOXO4 蛋白相对表达量明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 高糖+低、中、高浓度特女贞苷组 FOXO4 蛋白相对表达量明显低于高糖组, 且呈剂量依赖性, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 正常对照组与高渗组细胞中 FOXO4 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 5)。



**图 3 各组 hRMECs 中 MDA 浓度和 SOD 活性值比较** A: 各组 hRMECs 中 MDA 浓度比较  $F = 1186.693, P < 0.05$  B: 各组 hRMECs 中 SOD 活性值比较  $F = 516.629, P < 0.05$  与正常对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与高糖组相比, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与高糖+低浓度特女贞苷组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与高糖+中浓度特女贞苷组相比, <sup>d</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验;  $n = 3$ ) 1: 正常对照组; 2: 高渗组; 3: 高糖组; 4: 高糖+低浓度特女贞苷组; 5: 高糖+中浓度特女贞苷组; 6: 高糖+高浓度特女贞苷组 MDA: 丙二醛; SOD: 超氧化物歧化酶

**Figure 3 Comparison of MDA content and SOD activity in hRMECs among different groups** A: Comparison of MDA content  $F = 1186.693, P < 0.05$  B: Comparison of SOD activity  $F = 516.629, P < 0.05$  Compared with normal glucose group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with high glucose group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; compared with high glucose+low-dose specnuezhenide group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; compared with high glucose+medium-dose specnuezhenide group, <sup>d</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test;  $n = 3$ ) 1: normal control group; 2: hypertonic group; 3: high glucose group; 4: high glucose+low-dose specnuezhenide group; 5: high glucose+medium-dose specnuezhenide group; 6: high glucose+high-dose specnuezhenide group MDA: malondialdehyde; SOD: superoxide dismutase



**图4 各组 hRMECs 培养上清液中炎症因子质量浓度比较** A: 各组 hRMECs 中 IL-1 $\beta$  质量浓度比较  $F=654.247, P<0.05$  B: 各组 hRMECs 中 TNF- $\alpha$  质量浓度比较  $F=638.238, P<0.05$  与正常对照组相比, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与高糖组相比, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; 与高糖+低浓度特女贞苷组相比, <sup>c</sup> $P<0.05$ ; 与高糖+中浓度特女贞苷组相比, <sup>d</sup> $P<0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验;  $n=3$ ) 1: 正常对照组; 2: 高渗组; 3: 高糖组; 4: 高糖+低浓度特女贞苷组; 5: 高糖+中浓度特女贞苷组; 6: 高糖+高浓度特女贞苷组 IL: 白细胞介素; TNF: 肿瘤坏死因子 **图5 各组 hRMECs 中 FOXO4 蛋白表达情况** A: 各组 FOXO4 蛋白表达电泳图 B: 各组 FOXO4 蛋白相对表达量比较  $F=472.655, P<0.05$ . 与正常对照组相比, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与高糖组相比, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; 与高糖+低浓度特女贞苷组相比, <sup>c</sup> $P<0.05$ ; 与高糖+中浓度特女贞苷组相比, <sup>d</sup> $P<0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验;  $n=3$ ) 1: 正常对照组; 2: 高渗组; 3: 高糖组; 4: 高糖+低浓度特女贞苷组; 5: 高糖+中浓度特女贞苷组; 6: 高糖+高浓度特女贞苷组 FOXO4: 叉头框转录因子 O4;  $\beta$ -actin:  $\beta$ -肌动蛋白

**Figure 4 Comparison of concentrations of inflammatory factors in culture supernatant among different groups** A: Comparison of IL-1 $\beta$  concentration  $F=654.247, P<0.05$  B: Comparison of TNF- $\alpha$  concentration  $F=638.238, P<0.05$  Compared with normal glucose group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; compared with high glucose group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; compared with high glucose+low-dose specnuezhenide group, <sup>c</sup> $P<0.05$ ; compared with high glucose+medium-dose specnuezhenide group, <sup>d</sup> $P<0.05$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test;  $n=3$ ) 1: normal control group; 2: hypertonic group; 3: high glucose group; 4: high glucose+low-dose specnuezhenide group; 5: high glucose+medium-dose specnuezhenide group; 6: high glucose+high-dose specnuezhenide group IL: interleukin; TNF: tumor necrosis factor **Figure 5 Expression of FOXO4 protein in hRMECs in different groups** A: Electrophoretogram of FOXO4 protein expression B: Comparison of the relative expression of FOXO4 protein among various groups  $F=472.655, P<0.05$ . Compared with normal control group, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; compared with high glucose group, <sup>b</sup> $P<0.05$ ; compared with high glucose+low-dose specnuezhenide group, <sup>c</sup> $P<0.05$ ; compared with high glucose+medium-dose specnuezhenide group, <sup>d</sup> $P<0.05$  (One-way ANOVA, LSD- $t$  test;  $n=3$ ) 1: normal control group; 2: hypertonic group; 3: high glucose group; 4: high glucose+low-dose specnuezhenide group; 5: high glucose+medium-dose specnuezhenide group; 6: high glucose+high-dose specnuezhenide group FOXO4: forkhead box O4

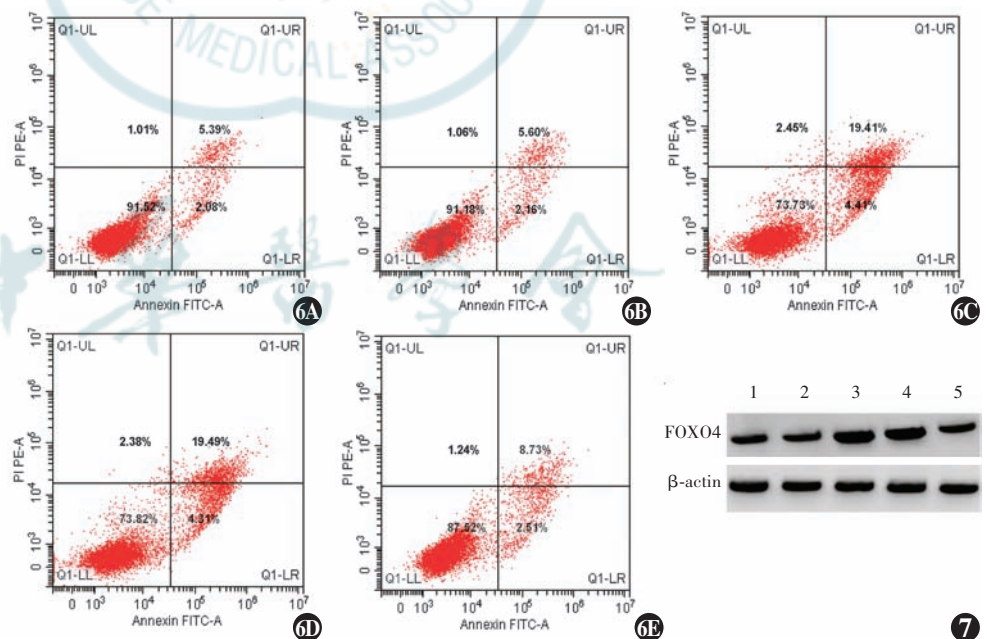
**2.5 不同 siRNA 干扰组 FOXO4 表达及凋亡、氧化应激相关指标和炎症因子表达比较**

正常对照组、高渗组、高糖组、高糖+si-NC 组和高糖+si-FOXO4 组 FOXO4 蛋白相对表达量、细胞凋亡率、SOD 活性值、MDA 浓度、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  质量浓度总体比较, 差异均有统计学意义 ( $F=602.078, 711.928, 389.593, 1245.194, 592.073, 605.989$ , 均  $P<0.001$ ), 其中高糖+si-FOXO4 组 FOXO4 蛋白相对表达量、细胞凋亡率、MDA 浓度、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  质量浓度均明显低于高糖+si-NC 组, SOD 活性值明显高于高糖+si-NC 组, 差异均有统计学意义 (均  $P<0.05$ ) (图 6, 7, 表 1)。

**2.6 不同重组质粒转染组 FOXO4 表达及凋亡、氧化应激相关指标和炎症因子表达比较**

正常对照组、高渗组、高糖组、高糖+特女贞

苷+pcDNA 组和高糖+特女贞苷+pcDNA-FOXO4 组 FOXO4 蛋白相对表达量、细胞凋亡率、SOD 活性值、MDA 浓度、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  质量浓度总体比较差异均



**图6 流式细胞术测定各组 hRMECs 细胞凋亡情况** A: 正常对照组 B: 高渗组 C: 高糖组 D: 高糖+si-NC 组 E: 高糖+si-FOXO4 组 **图7 Western blot 测定各组细胞中 FOXO4 蛋白表达** 1: 正常对照组; 2: 高渗组; 3: 高糖组; 4: 高糖+si-NC 组; 5: 高糖+si-FOXO4 组 FOXO4: 叉头框转录因子 O4;  $\beta$ -actin:  $\beta$ -肌动蛋白

**Figure 6 Apoptosis of hRMECs in different groups by flow cytometry** A: normal control group B: hypertonic group C: high glucose group D: high glucose+si-NC group E: high glucose+si-FOXO4 group **Figure 7 FOXO4 protein expression in different groups by Western blot** 1: normal control group; 2: hypertonic group; 3: high glucose group; 4: high glucose+si-NC group; 5: high glucose+si-FOXO4 group FOXO4: forkhead box O4

有统计学意义 ( $F = 518.481、465.002、766.288、1230.092、822.927、369.889$ , 均  $P < 0.05$ ), 其中高糖+特女贞苷+pcDNA 组 FOXO4 蛋白相对表达量、细胞凋亡率、MDA 浓度、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  质量浓度均明显高于高糖+特女贞苷+pcDNA 组, SOD 活性值明显低于高糖+特女贞苷+pcDNA 组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 8, 9, 表 2)。

高糖+特女贞苷+pcDNA 组 FOXO4 蛋白相对表达量、细胞凋亡率、MDA 浓度、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  质量浓度均明显高于高糖+特女贞苷+pcDNA 组, SOD 活性值明显低于高糖+特女贞苷+pcDNA 组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 8, 9, 表 2)。

表 1 不同 siRNA 干扰组细胞中 FOXO4 蛋白相对表达量、细胞凋亡率、氧化应激指标和炎症因子表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Comparison of the relative expression level of FOXO4 protein, cell apoptosis rate, oxidative stress indexes and inflammatory factor expressions among various groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	FOXO4 相对表达量	细胞凋亡率 (%)	SOD 活性 [ $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ ]	MDA 浓度 (nmol/ml)	IL-1 $\beta$ 质量浓度 (pg/ml)	TNF- $\alpha$ 质量浓度 (pg/ml)
正常对照组	3	0.18 $\pm$ 0.02	7.47 $\pm$ 0.60	267.80 $\pm$ 26.97	81.16 $\pm$ 6.73	147.02 $\pm$ 14.25	210.92 $\pm$ 21.16
高渗组	3	0.17 $\pm$ 0.03	7.76 $\pm$ 0.50	262.98 $\pm$ 19.44	84.69 $\pm$ 5.98	148.96 $\pm$ 14.13	213.11 $\pm$ 16.09
高糖组	3	0.82 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	23.82 $\pm$ 1.46 <sup>a</sup>	35.76 $\pm$ 5.49 <sup>a</sup>	552.63 $\pm$ 24.77 <sup>a</sup>	642.52 $\pm$ 29.09 <sup>a</sup>	714.79 $\pm$ 35.34 <sup>a</sup>
高糖+si-NC 组	3	0.82 $\pm$ 0.05	23.80 $\pm$ 1.06	35.58 $\pm$ 3.18	554.98 $\pm$ 30.67	629.31 $\pm$ 50.35	720.08 $\pm$ 43.61
高糖+si-FOXO4 组	3	0.31 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	11.24 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>	184.19 $\pm$ 10.38 <sup>b</sup>	232.41 $\pm$ 20.53 <sup>b</sup>	289.94 $\pm$ 29.99 <sup>b</sup>	399.72 $\pm$ 30.79 <sup>b</sup>
F 值		602.078	711.928	389.593	1245.194	592.073	605.989
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与高糖+si-NC 组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- $t$  检验) siRNA:小干扰 RNA;FOXO4:叉头框转录因子 O4;SOD:超氧化物歧化酶;MDA:丙二醛;IL:白细胞介素;TNF:肿瘤坏死因子;si-NC:小干扰 RNA 阴性序列

Note:Compared with respective normal control group,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;compared with high glucose+si-NC group,<sup>b</sup> $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- $t$  test) siRNA:small interfering RNA;FOXO4:forkhead box O4;SOD:superoxide dismutase;MDA:malondialdehyde;IL:interleukin;TNF:tumor necrosis factor;si-NC:small interfering RNA-negative control

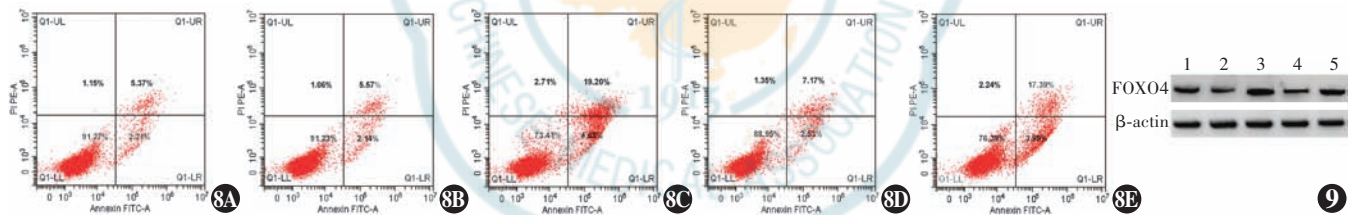


图 8 流式细胞术测定各组 hRMECs 细胞凋亡情况 A:正常对照组 B:高渗组 C:高糖组 D:高糖+特女贞苷+pcDNA 组 E:高糖+特女贞苷+pcDNA-FOXO4 组 图 9 Western blot 测定各组 FOXO4 蛋白表达 1:正常对照组;2:高渗组;3:高糖组;4:高糖+特女贞苷+pcDNA 组;5:高糖+特女贞苷+pcDNA-FOXO4 组 FOXO4:叉头框转录因子 O4; $\beta$ -actin: $\beta$ -肌动蛋白

Figure 8 Apoptosis of hRMECs in different groups by flow cytometry A:normal control group B:hypertonic group C:high glucose group D:high glucose+specnuezhenide+pcDNA group E:high glucose+specnuezhenide+pcDNA-FOXO4 group Figure 9 FOXO4 protein expression in different groups by Western blot 1:normal control group;2:hypertonic group;3:high glucose group;4:high glucose+specnuezhenide+pcDNA group;5:high glucose+specnuezhenide+pcDNA-FOXO4 group FOXO4:forkhead box O4

表 2 不同重组质粒转染组细胞中 FOXO4 蛋白相对表达量、细胞凋亡率、氧化应激指标和炎症因子表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 2 Comparison of the relative expression level of FOXO4 protein, cell apoptosis rate, oxidative stress indexes and inflammatory factor expressions among various groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	FOXO4 相对表达量	细胞凋亡率 (%)	SOD 活性 [ $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ ]	MDA 浓度 (nmol/ml)	IL-1 $\beta$ 质量浓度 (pg/ml)	TNF- $\alpha$ 质量浓度 (pg/ml)
正常对照组	3	0.18 $\pm$ 0.03	7.58 $\pm$ 0.70	271.89 $\pm$ 15.87	83.82 $\pm$ 6.32	149.70 $\pm$ 17.66	221.76 $\pm$ 17.39
高渗组	3	0.18 $\pm$ 0.02	7.71 $\pm$ 0.77	267.01 $\pm$ 17.30	83.07 $\pm$ 6.89	151.06 $\pm$ 18.62	215.00 $\pm$ 23.40
高糖组	3	0.81 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	23.88 $\pm$ 1.65 <sup>a</sup>	36.24 $\pm$ 2.07 <sup>a</sup>	550.88 $\pm$ 26.70 <sup>a</sup>	645.02 $\pm$ 31.54 <sup>a</sup>	709.40 $\pm$ 51.16 <sup>a</sup>
高糖+特女贞苷+pcDNA 组	3	0.22 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	9.70 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>	230.64 $\pm$ 16.16 <sup>b</sup>	174.99 $\pm$ 20.70 <sup>b</sup>	247.15 $\pm$ 25.25 <sup>b</sup>	326.26 $\pm$ 34.27 <sup>b</sup>
高糖+特女贞苷+pcDNA-FOXO4 组	3	0.65 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	21.38 $\pm$ 1.32 <sup>c</sup>	44.24 $\pm$ 4.78 <sup>c</sup>	512.26 $\pm$ 27.26 <sup>c</sup>	592.27 $\pm$ 30.53 <sup>c</sup>	635.58 $\pm$ 45.38 <sup>c</sup>
F 值		518.481	465.002	766.288	1230.092	822.927	369.889
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与正常对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与高糖组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与高糖+特女贞苷+pcDNA 组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- $t$  检验) FOXO4:叉头框转录因子 O4;SOD:超氧化物歧化酶;MDA:丙二醛;IL:白细胞介素;TNF:肿瘤坏死因子

Note:Compared with normal control group,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;compared with high glucose group,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;compared with high glucose+specnuezhenide+pcDNA group,<sup>c</sup> $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- $t$  test) FOXO4:forkhead box O4;SOD:superoxide dismutase;MDA:malondialdehyde;IL:interleukin;TNF:tumor necrosis factor

### 3 讨论

研究认为,高血糖是诱发 DR 的重要因素,其可引起 hRMECs 过度发生氧化应激、炎症反应及细胞凋亡,促进 DR 的发生和发展<sup>[9-11]</sup>。因此,探索 DR 中抑制 hRMECs 氧化应激、炎症反应及细胞凋亡的药物可为 DR 治疗提供新途径。MDA 是脂质过氧化产物之一,其表达量可间接反映细胞氧化应激水平<sup>[12]</sup>。SOD 是机体内重要的抗氧化酶,可清除氧自由基,减轻自由基对机体组织的氧化损伤<sup>[13]</sup>。IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  是诱导微血管病变的主要炎症因子。IL-1 $\beta$  可引起血清蛋白和红细胞向玻璃体内渗和弥散,导致局部水肿和炎症,血管内皮细胞损伤,血管间隙增加,视网膜屏障破坏<sup>[14-15]</sup>。TNF- $\alpha$  作用于内皮细胞受体,激活核因子  $\kappa$ B 途径,诱导 hRMECs 凋亡,促使血管通透性增加和血管细胞增生,进而促进眼内新生血管生成<sup>[16]</sup>。本研究结果显示, hRMECs 经高糖干预后,细胞凋亡率、细胞中 MDA 浓度及培养上清液中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  质量浓度均明显升高,而细胞中 SOD 活性降低,提示高糖诱导 hRMECs 发生了过度的氧化应激、炎症反应及细胞凋亡。

现代药理学研究发现,女贞子具有降血糖、降血脂及抗衰老等作用<sup>[17-18]</sup>。特女贞苷是女贞子的主要活性成分,具有抗炎、免疫调节等多种药理活性<sup>[19]</sup>。近年来,特女贞苷的抗炎保护作用逐渐受到国内外研究者的广泛关注,其发挥作用的途径主要包括抗炎、抗氧化等机制。研究显示,特女贞苷可通过发挥抗氧化和抗炎作用减轻趋化因子配体 4 引起的肝损伤<sup>[20]</sup>; Wu 等<sup>[21]</sup> 研究发现,特女贞苷通过促进视网膜色素上皮细胞分泌血管内皮生长因子 A,抑制缺氧诱导的视网膜新生血管形成,具有被开发为预防和治疗 DR 药物的潜力。本研究结果发现,特女贞苷降低了高糖诱导的 hRMECs 凋亡率、细胞中 MDA 浓度及培养上清液中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  质量浓度,同时增强了细胞 SOD 活性,且呈剂量依赖性,提示特女贞苷可抑制高糖诱导下的 hRMECs 凋亡、氧化应激及炎症反应。

FOXO4 是叉头框转录因子家族成员,在机体组织生理或病理过程中发挥重要的调控作用,与多种疾病的发生和发展密切相关。敲减 FOXO4 可减少缺血-再灌注引起的肝细胞凋亡,减轻肝脏缺血-再灌注损伤<sup>[22]</sup>;敲低 FOXO4 可减少缺血-再灌注大鼠心肌梗死面积,改善心脏功能,并抑制大鼠心肌组织氧化应激及心肌细胞凋亡,保护心肌组织免受缺血-再灌注损伤<sup>[23]</sup>。FOXO4 的 DNA 结合区域含有 5 个氨基酸构成

的片段,受到胰岛素调控,且其在胰岛素外周靶器官中广泛表达,参与糖尿病并发症的发生,FOXO4 表达的上调可加重 DR<sup>[24]</sup>。本研究结果显示,高糖促进了 hRMECs 中 FOXO4 的表达,而敲减 FOXO4 抑制了高糖诱导的 hRMECs 凋亡、氧化应激及炎症反应,与陆骏等<sup>[25]</sup> 报道结果一致,提示 FOXO4 有可能成为减轻 DR 的分子靶点。此外,本研究结果进一步提示,特女贞苷可呈剂量依赖性地抑制高糖诱导的 hRMECs 中 FOXO4 蛋白的表达,而过表达 FOXO4 逆转了特女贞苷对高糖诱导的 hRMECs 凋亡、氧化应激及炎症反应的抑制作用,提示特女贞苷可能通过下调 FOXO4 表达来抑制高糖诱导的 hRMECs 凋亡、氧化应激及炎症反应。但特女贞苷是否可通过调控其他信号通路达到减轻高糖诱导的 hRMECs 损伤的目的尚需进一步探讨。

综上所述,本研究结果表明特女贞苷可有效保护 hRMECs 免受高糖损伤,作用机制与其下调 FOXO4 抑制 hRMECs 凋亡、氧化应激及炎症反应有关,推测特女贞苷具有改善 DR 微血管损伤的作用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 刘茜:直接参与选题、酝酿和设计实验、分析/解释数据、起草文章、文章知识性内容的审阅和智力性内容的修改及定稿;冯效梅:实验研究、收集数据、统计分析、论文修改;刘长庚:直接参与选题、酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、起草文章;李海军、杨潇远:分析/解释数据;任静、张颖:实施研究、采集数据

### 参考文献

- [1] 何媛,周涛,苏婷,等. 糖尿病视网膜病变的分类、发生机制及治疗进展[J]. 山东医药, 2020, 60(19): 111-115. DOI: 10. 3969/j. issn. 1002-266X. 2020. 19. 030.
- [2] Sun M, He N, Lv Z. Polysaccharides extracted from Cassia seeds protect against high glucose-induced retinal endothelial cell injury [J]. Int Ophthalmol, 2021, 41(7): 2465-2472. DOI: 10. 1007/s10792-021-01801-5.
- [3] Zhang TH, Huang CM, Gao X, et al. Gastrodin inhibits high glucose-induced human retinal endothelial cell apoptosis by regulating the SIRT1/TLR4/NF- $\kappa$ B/p65 signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(6): 7774-7780. DOI: 10. 3892/mmr. 2018. 8841.
- [4] Ji Q, Han J, Wang L, et al. MicroRNA-34a promotes apoptosis of retinal vascular endothelial cells by targeting SIRT1 in rats with diabetic retinopathy [J]. Cell Cycle, 2020, 19(21): 2886-2896. DOI: 10. 1080/15384101. 2020. 1827509.
- [5] 张安娜,李澎,洪晓华,等. 特女贞苷对高糖刺激的肾小球系膜细胞凋亡的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(8): 116-119. DOI: 10. 13422/j. cnki. syfx. 2015080116. Zhang AN, Li P, Hong XH, et al. Preventive effect of specnuezhenide on high glucose-induced apoptosis in glomerular mesangial cells [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2015, 21(8): 116-119. DOI: 10. 13422/j. cnki. syfx. 2015080116.
- [6] 顾闻,刘特,陈久林,等. 特女贞苷对血管内皮细胞氧化损伤的作用研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(9): 1093-1098. DOI: 10. 7661/j. cjim. 20180619. 058. Gu W, Liu T, Chen JL, et al. Effect of specnuezhenide reducing the



- oxidative damage of vascular endothelial cells [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med*, 2018, 38 (9) : 1093-1098. DOI: 10. 7661/j. cjim. 20180619. 058.
- [7] Liu W, Li Y, Luo B. Current perspective on the regulation of FOXO4 and its role in disease progression [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(4) : 651-663. DOI: 10. 1007/s00018-019-03297-w.
- [8] 李欢, 路璐. miR-96-5p 靶向 FOXO4 对高糖诱导的大鼠视网膜血管内皮细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *国际眼科杂志*, 2020, 20 (8) : 1331-1338. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2020. 8. 07.
- Li H, Lu L. Effect of miR-96-5p targeting FOXO4 on proliferation and apoptosis of rat retinal vascular endothelial cells induced by high glucose [J]. *Int Eye Sci*, 2020, 20 (8) : 1331-1338. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2020. 8. 07.
- [9] 李婷, 何学敏, 彭荣东, 等. 舒洛地特通过抑制 NOX4/NLRP3 通路减轻高糖诱导的视网膜血管损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(4) : 577-587. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-4718. 2020. 04. 001.
- Li T, He XM, Peng RD, et al. Sulodexide protects against hyperglycemia-induced retinal vascular injury via suppressing NOX4/NLRP3 pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2020, 36 (4) : 577-587. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-4718. 2020. 04. 001.
- [10] Ren Z, Wang X. Long non-coding ribonucleic acid ATP2B1-AS1 modulates endothelial permeability through regulating the miR-4729-IQGAP2 axis in diabetic retinopathy [J]. *J Diabetes Investig*, 2022, 13(3) : 443-452. DOI: 10. 1111/jdi. 13740.
- [11] Shi Q, Tang J, Wang M, et al. Knockdown of long non-coding RNA TUG1 suppresses migration and tube formation in high glucose-stimulated human retinal microvascular endothelial cells by sponging miRNA-145 [J]. *Mol Biotechnol*, 2022, 64 (2) : 171-177. DOI: 10. 1007/s12033-021-00398-5.
- [12] Xu Z, Zhao B, Mao J, et al. Knockdown of long noncoding RNA metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 protects against intracerebral hemorrhage through microRNA-146a-mediated inhibition of inflammation and oxidative stress [J]. *Bioengineered*, 2022, 13 (2) : 3969-3980. DOI: 10. 1080/21655979. 2022. 2031401.
- [13] Cao X, Ma J, Li S. Mechanism of lncRNA SNHG16 in oxidative stress and inflammation in oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced SK-N-SH cells [J]. *Bioengineered*, 2022, 13 (3) : 5021-5034. DOI: 10. 1080/21655979. 2022. 2026861.
- [14] 刘安琪, 左中夫, 吴传玲, 等. Netrin-1 对糖尿病视网膜病变大鼠的保护作用 [J]. *眼科新进展*, 2020, 40(1) : 11-15.
- Liu AQ, Zuo ZF, Wu CL, et al. Protective effect of Netrin-1 on rats with diabetic retinopathy [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2020, 40(1) : 11-15.
- [15] Rasoulinejad SA, Akbari A, Nasiri K. Interaction of miR-146a-5p with oxidative stress and inflammation in complications of type 2 diabetes mellitus in male rats: anti-oxidant and anti-inflammatory protection strategies in type 2 diabetic retinopathy [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2021, 24 (8) : 1078-1086. DOI: 10. 22038/IJBMS. 2021. 56958. 12706.
- [16] 杨明, 赵通, 邓婷婷, 等. 虾青素对 1 型糖尿病大鼠视网膜病变的保护作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38 (7) : 589-596. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20200519-00360.
- Yang M, Zhao T, Deng TT, et al. Protective effect of astaxanthin on the retinopathy of type 1 diabetic rats [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2020, 38(7) : 589-596. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20200519-00360.
- [17] 孙雅文, 张明发, 沈雅琴. 女贞子及其活性成分降血糖、调血脂、抗肥胖作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(6) : 1086-1091. DOI: 10. 7501/j. issn. 1674-6376. 2016. 06. 036.
- Sun YW, Zhang MF, Shen YQ. Research progress on hypoglycemia, lipidemic regulation, and antiobesity effects of Ligustru Lucidi Fructus and its active constituents [J]. *Drug Eval Res*, 2016, 39 (6) : 1086-1091. DOI: 10. 7501/j. issn. 1674-6376. 2016. 06. 036.
- [18] 赵志恒, 毕经会, 叶诗洁, 等. 基于网络药理学和分子对接探究黄芪-女贞子治疗免疫缺陷病的作用机制 [J]. *食品工业科技*, 2022, 43(3) : 374-383. DOI: 10. 13386/j. issn1002-0306. 2021060024.
- Zhao ZH, Bi JH, Ye SJ, et al. Mechanism of Astragalus-Ligustrum lucidum in the treatment of immunodeficiency diseases based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Sci Technol Food Indust*, 2022, 43 (3) : 374-383. DOI: 10. 13386/j. issn1002-0306. 2021060024.
- [19] Hu D, Huang S, Ding Y, et al. Specnuezhenide reduces carbon tetrachloride-induced liver injury in mice through inhibition of oxidative stress and hepatocyte apoptosis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2022, 74(2) : 191-199. DOI: 10. 1093/jpp/rgab164.
- [20] 胡冬梅, 陆杨, 房敏峰, 等. 特女贞苷对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(9) : 1260-1263. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-1978. 2016. 09. 014.
- Hu DM, Lu Y, Fang MF, et al. Protective effects of specnuezhenide against carbon tetrachloride-induced acute hepatic damage in mice [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2016, 32 (9) : 1260-1263. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-1978. 2016. 09. 014.
- [21] Wu J, Ke X, Fu W, et al. Inhibition of hypoxia-induced retinal angiogenesis by specnuezhenide, an effective constituent of Ligustrum lucidum Ait., through suppression of the HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway [J/OL]. *Molecules*, 2016, 21 (12) : 1756 [2022-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28009852/>. DOI: 10. 3390/molecules21121756.
- [22] He B, Yang F, Ning Y, et al. Sevoflurane alleviates hepatic ischaemia/reperfusion injury by up-regulating miR-96 and down-regulating FOXO4 [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25 (13) : 5899-5911. DOI: 10. 1111/jcmm. 16063.
- [23] Yu L, Zhang W, Huang C, et al. FoxO4 promotes myocardial ischemia-reperfusion injury: the role of oxidative stress-induced apoptosis [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(9) : 2890-2900.
- [24] Zhang J, Wu L, Chen J, et al. Downregulation of microRNA 29a/b exacerbated diabetic retinopathy by impairing the function of Müller cells via forkhead box protein O4 [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2018, 15(3) : 214-222. DOI: 10. 1177/1479164118756239.
- [25] 陆骏, 秦瑜, 肖文玮, 等. FOXO4 对高糖环境下视网膜血管内皮细胞氧化应激和凋亡的影响 [J]. *国际眼科杂志*, 2018, 18 (12) : 2146-2150. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2018. 12. 06.
- Lu J, Qin Y, Xiao WW, et al. Effects of FOXO4 on oxidative stress and apoptosis of retinal vascular endothelial cells under high glucose environmental conditions [J]. *Int Eye Sci*, 2018, 18(12) : 2146-2150. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2018. 12. 06.

(收稿日期: 2022-09-10 修回日期: 2023-02-15)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)