

石斛酚对高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞的保护作用

张梅¹, 李春霞², 韦芳³, 秦瑜²

引用:张梅,李春霞,韦芳,等. 石斛酚对高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞的保护作用.国际眼科杂志 2019;19(2):209-213

基金项目:上海市眼底病重点实验室(No.030105);上海市卫生和计划生育委员会科研课题(No.201640245)

作者单位:¹(233000)中国安徽省蚌埠市,蚌埠医学院;²(200082)中国上海市,上海中医药大学附属上海市中西医结合医院眼科;³(200080)中国上海市,上海交通大学附属第一人民医院眼科

作者简介:张梅,在读硕士研究生,研究方向:眼底疾病。

通讯作者:李春霞,毕业于安徽医科大学,硕士,主任医师,眼科主任,研究方向:眼底疾病.cxli_66@163.com

收稿日期:2018-08-06 修回日期:2019-01-02

摘要

目的:探讨石斛酚对高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞(HRMECs)的醛糖还原酶(AR)通路及氧化应激的保护作用。

方法:将体外培养的HRMECs分为5组:正常组(葡萄糖5.5mmol/L)、甘露醇组(葡萄糖5.5mmol/L+甘露醇24.5mmol/L)、高糖组(葡萄糖30mmol/L)、石斛酚组(葡萄糖30mmol/L+石斛酚5 μ mol/L)、依帕司他组(葡萄糖30mmol/L+依帕司他1 μ mol/L)。通过MTS实验检测细胞活力,DCFH-DA荧光探针法检测细胞内活性氧(ROS)水平;Western blotting法检测核因子 κ B(NF- κ B)的蛋白表达;qRT-PCR法检测AR、HIF-1 α 及VEGF的mRNA表达。

结果:DCFH-DA荧光探针法结果显示石斛酚可明显降低高糖环境下细胞内的ROS水平。与高糖组相比,石斛酚组NF- κ B的蛋白表达,AR、HIF-1 α 及VEGF的mRNA表达也都明显下降。依帕司他组的AR及NF- κ B表达趋势与石斛酚组一致。

结论:石斛酚与依帕司他都可抑制AR/NF- κ B通路的激活,同时石斛酚还可抑制高糖诱导的HRMECs氧化应激反应。石斛酚在糖尿病视网膜病变的发生发展中可能有一定的保护作用,可能帮助减少新生血管的生成。

关键词:糖尿病视网膜病变;醛糖还原酶;氧化应激;石斛酚

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.2.06

Protective effect of gigantolon human retinal microvascular endothelial cells induced by high glucose

Mei Zhang¹, Chun-Xia Li², Fang Wei³, Yu Qin²

Foundation items: Shanghai Key Laboratory of Ocular Fundus Diseases (No. 030105); Scientific Research Project of Shanghai

Municipal Commission of Health and Family Planning (No. 201640245)

¹Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui Province, China;

²Department of Ophthalmology, Shanghai TCM-integrated Hospital of Shanghai University of TCM, Shanghai 200082, China;

³Department of Ophthalmology, Shanghai General Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

Correspondence to: Chun-Xia Li. Department of Ophthalmology, Shanghai TCM-integrated Hospital of Shanghai University of TCM, Shanghai 200082, China. cxli_66@163.com

Received:2018-08-06 Accepted:2019-01-02

Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effects of gigantolon on aldose reductase (AR) pathway and oxidative stress induced by high glucose in human retinal microvascular endothelial cells (HRMECs).

• **METHODS:** HRMECs were cultured and divided into the five groups: normal glucose group, mannitol group, high glucose group, gigantolon group and epalrestat group. Cell vitality was detected by the MTS assay, reactive oxygen species (ROS) levels were detected by DCFH-DA fluorescent probe, protein expressions of nuclear factor kappa B (NF- κ B) were observed by Western blotting, mRNA levels of AR, hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were measured by qRT-PCR.

• **RESULTS:** DCFH-DA fluorescent probe levels showed that gigantolon reduced ROS generation obviously, and protein expressions of NF- κ B, mRNA expressions of AR, HIF-1 α and VEGF were all decreased. The expression trends of AR and NF- κ B in epalrestat group were consistent with gigantolon group.

• **CONCLUSION:** Gigantolon and epalrestat could inhibit the activation of AR/NF- κ B pathway, and gigantolon also could inhibit high glucose induced oxidative stress and in HRMECs, which may have a protective effect on diabetic retinopathy (DR), and improve angiogenesis.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; aldose reductase; oxidative stress; gigantolon

Citation: Zhang M, Li CX, Wei F, *et al.* Protective effect of gigantolon human retinal microvascular endothelial cells induced by high glucose. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2019;19(2):209-213

0 引言

据世界卫生组织保守估计,至2035年糖尿病患病率将增加55%,由目前的3.82亿增加至5.92亿^[1]。在过去

1980/2010的30a中,经过7次全国糖尿病调查,发现中国大陆糖尿病发病人群增长了17倍,且糖尿病和糖调节异常在中国已成为了流行病^[2]。糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病并发症之一,在DR的发病过程中主要表现为视网膜血管病变和视网膜神经退行性病变,视网膜上所有细胞都会受到影响,并导致视功能逐渐丧失^[3]。石斛是《中国药典》历版所收录的名贵中药材,具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳等功效,来源于兰科石斛属多种植物的新鲜或干燥茎。现代研究发现石斛属植物,具有抗肿瘤、免疫调节、抗血小板聚集、扩张血管、抗氧化、抗诱变等多种活性^[4],其主要化学成分为联苕类、多糖、生物碱、萜类、蒽酮、香豆素和倍半萜等化合物^[5]。石斛酚是一种从石斛中提取出的联苕类化合物,联苕类化合物具有重要的抗肿瘤、抗诱变等生物活性,常被作为衡量石斛药材质量的质控指标。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及药物 人视网膜微血管内皮细胞(human retinal microvascular endothelial cells, HRMECs, ACBRI181)购自 Cell Systems(Kirkland, WA, USA);石斛酚、依帕司他购自上海源叶生物科技有限公司。石斛酚结构式见图1。

1.1.2 试剂 M199培养基、胎牛血清、2.5g/L胰蛋白酶、青-链霉素混合液购自 Gibco公司;ROS活性氧检测试剂盒购自凯基生物;一抗NF- κ B(ab32536)购自 Abcam公司, β -actin(60008-1-Ig)购自 Proteintech公司;二抗羊抗兔(111-035-003)购自 Jackson公司;Trizol Reagent 购自 Invitrogen公司。

1.1.3 仪器 CO₂细胞培养箱(美国 Thermo公司),流式细胞仪(美国 Beckman公司),酶标仪(美国 Thermo公司),荧光定量PCR检测仪(美国 Thermo公司),紫外分光光度计(上海司乐仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 使用含10%胎牛血清的M199低糖培养基(葡萄糖5.5mmol/L),在37℃,5%CO₂条件下培养细胞,每2~3d换液一次。实验分为5组:正常组(葡萄糖5.5mmol/L,NG)、甘露醇组(葡萄糖5.5mmol/L+甘露醇24.5mmol/L,M)、高糖组(葡萄糖30mmol/L,HG)、石斛酚组(葡萄糖30mmol/L+石斛酚5 μ mol/L,GIG)、依帕司他组(葡萄糖30mmol/L+依帕司他1 μ mol/L,EPS)。实验组细胞均培养48h。

1.2.2 MTS实验检测细胞活力 MTS细胞毒性与细胞增殖实验试剂盒是用于测定细胞增殖与毒性实验中活细胞数目的一种高灵敏度、无放射性的比色检测法。HRMECs种植在96孔培养板中,每孔100 μ L,约1 \times 10⁴个细胞。将石斛酚及依帕司他在糖浓度为5.5mmol/L的培养基中设置出一系列浓度梯度组,每组设6个复孔,置37℃,5%CO₂培养箱中孵育24h或48h。然后每孔加入20 μ L的MTS试剂,37℃孵育2h,用酶标仪在490nm波长处检测每孔的光密度(OD)值。细胞活性=处理组OD值/对照组OD值 \times 100%。

1.2.3 ROS检测 活性氧检测试剂盒(Reactive Oxygen Species Assay Kit)是一种利用荧光探针DCFH-DA进行活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测的试剂盒。HRMECs种植在6孔培养板中,置37℃,5%CO₂培养箱中

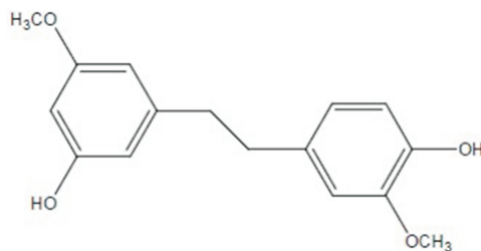


图1 石斛酚化学结构式。

培养,待细胞达70%融合状态后,将实验分为正常组、甘露醇组、高糖组和石斛酚组4组,孵育48h,然后去除培养基,在避光条件下用无血清培养基按照1:1000稀释DCFH-DA,每孔不少于1mL,置于37℃孵育30min。收集细胞,用PBS清洗3次,将细胞重悬于300 μ L预冷的PBS中,送流式细胞仪,使用488nm激发波长,525nm发射波长检测细胞ROS的活性。

1.2.4 qRT-PCR检测mRNA的表达 各组细胞处理结束后,采用Trizol试剂盒提取细胞总RNA,紫外分光光度计测D260/280的值,估算RNA的纯度,并测RNA浓度,计算RNA含量,将其逆转录为cDNA,在荧光定量PCR仪上进行实时定量PCR检测醛糖还原酶(aldehyde reductase, AR)、缺氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的基因表达情况。引物序列:AR前链:GTC CAA AGG CAT CGT GGT GA;后链:AGC AAT GCG TTC TGG TGT CA;HIF-1 α 前链:TGC TTG GTG CTG ATT TGT GA;后链:GGT CAG ATG ATC AGA GTC CA;VEGF前链:AAG GAG GAG GGC AGA ATC AT;后链:ATC TGC ATG GTG ATG TTG GA; β -actin前链:GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG;后链:AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG。反应条件:预变性(95℃ 30s),PCR反应(95℃ 5s,60℃ 34s,40个循环),溶解曲线(95℃ 15s,60℃ 60s,95℃ 15s)。结果处理: Δ Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因}, $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct_{处理组} - Δ Ct_{对照组},以2^{- $\Delta\Delta$ Ct}值作为目的基因mRNA的相对表达量。

1.2.5 Western blotting检测相关蛋白的表达 检测核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)的蛋白表达,正常组、甘露醇组、高糖组、石斛酚组、依帕司他组细胞处理结束后,用PBS洗3次,RIPA裂解细胞,提取细胞总蛋白,BCA法测蛋白浓度。定量20 μ g上样,10%SDS-PAGE凝胶电泳100mV恒压,70mV恒压转膜,封闭,加一抗NF- κ B(1:5000),4℃摇床孵育过夜,TBST洗膜3次,再加辣根过氧化物酶标记的二抗IgG室温孵育。TBST洗膜后ECL显影曝光。用Image J软件分析,并计算各组光密度与 β -actin光密度的比值,分析蛋白的相对表达水平。

1.2.6 细胞划痕实验 细胞划痕实验是一种检测细胞迁移与修复能力的实验。HRMECs种植在12孔培养板中,待细胞达90%融合状态后,在每孔中均匀地划出十字空隙,分为正常组、甘露醇组、高糖组和石斛酚组4组,置37℃,5%CO₂培养箱中孵育48h。在倒置显微镜下分别在药物开始处理后的0、24、48h拍照,用Image J软件统计细胞迁移面积,并计算细胞的愈合率,愈合率=(处理后面积-0h面积)/0h面积 \times 100%。

统计学分析:用SPSS 22.0统计软件进行统计分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方

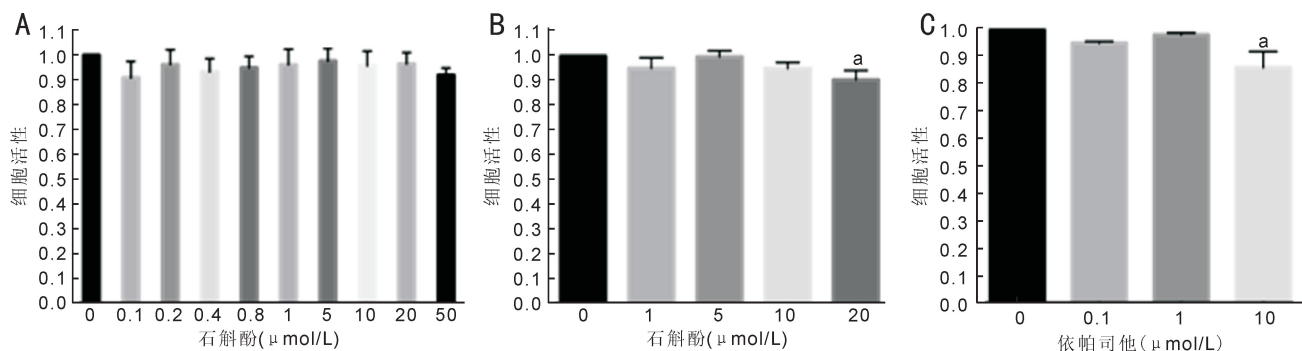


图2 石斛酚对细胞活性的影响 A:不同浓度石斛酚作用于细胞24h;B:0~20 $\mu\text{mol/L}$ 的石斛酚作用于细胞48h;C:0~10 $\mu\text{mol/L}$ 的依帕司他作用于细胞48h。^a $P < 0.05$ vs 对照组。

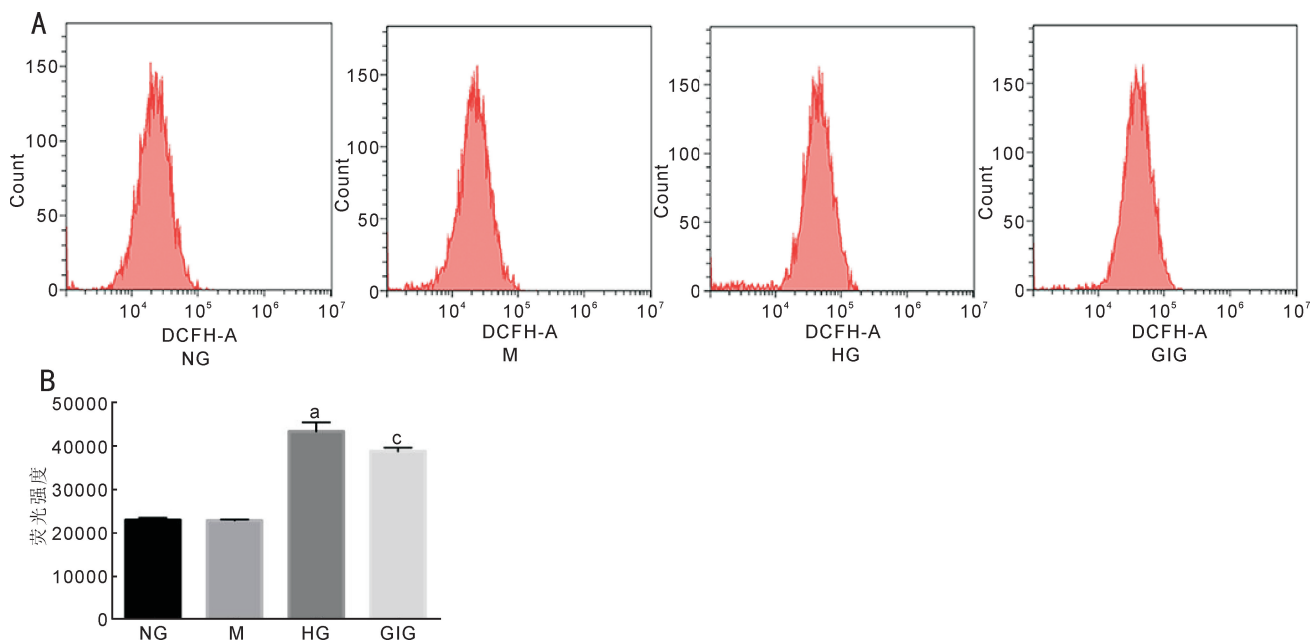


图3 高糖诱导内皮细胞发生氧化应激反应 A:流式仪检测各实验组ROS的表达活性;B:各实验组ROS的平均荧光强度,^a $P < 0.05$ vs 正常组;^c $P < 0.05$ vs 高糖组。

差分析,若差异有统计学意义,进一步两两比较采用LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 石斛酚对细胞活性的影响 MTS实验结果见图2A显示,一系列浓度梯度的石斛酚作用于HRMECs 24h,各组细胞活性差异无统计学意义($F = 0.860, P = 0.574$)。选取0~20 $\mu\text{mol/L}$ 石斛酚孵育细胞48h,结果见图2B,各组细胞活性差异有统计学意义($F = 5.321, P = 0.015$)。20 $\mu\text{mol/L}$ 石斛酚组与对照组比较,20 $\mu\text{mol/L}$ 石斛酚组细胞活性明显下降,差异有统计学意义($t = 3.959, P = 0.003$);1~10 $\mu\text{mol/L}$ 石斛酚组与对照组比较,5 $\mu\text{mol/L}$ 石斛酚组细胞活性最高,其活性与对照组差异无统计学意义($t = 0.135, P = 0.895$)。依帕司他孵育HRMECs 48h,MTS实验结果见图2C,各组细胞活性差异有统计学意义($F = 13.225, P = 0.002$),10 $\mu\text{mol/L}$ 依帕司他组与对照组比较,10 $\mu\text{mol/L}$ 依帕司他组细胞活性明显下降,差异有统计学意义($t = 0.587, P < 0.001$),0.1~1 $\mu\text{mol/L}$ 依帕司他组与对照组比较,1 $\mu\text{mol/L}$ 依帕司他组细胞活性最高,其活性与对照组差异无统计学意义($t = 0.096, P = 0.366$)。

2.2 石斛酚对氧化应激的影响 各组ROS的荧光强度分布,差异有统计学意义($F = 233.844, P < 0.001$)。高糖组与正常组比较,高糖组ROS明显升高,差异有统计学意义

($t = 23.888, P < 0.001$);石斛酚组与高糖组比较,石斛酚组ROS明显降低,差异有统计学意义($t = 5.342, P < 0.001$)。甘露醇组与正常组比较,差异无统计学意义($t = 0.131, P = 0.898$),见图3。

2.3 石斛酚对AR/NF- κ B的调控 图4A是AR在5组实验组中的mRNA表达结果,各组AR mRNA表达差异有统计学意义($F = 4.459, P = 0.025$),高糖组与正常组比较,高糖组AR表达升高,差异有统计学意义($t = 3.596, P = 0.005$);石斛酚组、依帕司他组与高糖组比较,石斛酚组与依帕司他组表达下降,差异有统计学意义(石斛酚组: $t = 3.178, P = 0.01$;依帕司他组: $t = 3.369, P = 0.007$)。图4B、C是5组Western blotting结果,各组NF- κ B蛋白表达差异有统计学意义($F = 25.220, P < 0.001$),高糖组与正常组比较,高糖组NF- κ B表达升高,差异有统计学意义($t = 6.916, P < 0.001$);石斛酚组、依帕司他组与高糖组比较,石斛酚与依帕司他组表达下降,差异有统计学意义(石斛酚组: $t = 8.503, P < 0.001$;依帕司他组: $t = 7.483, P < 0.001$)。甘露醇组与正常组比较,差异无统计学意义(AR表达 $t = 0.495, P = 0.631$;NF- κ B表达 $t = 1.417, P = 0.187$)。

2.4 石斛酚对HIF-1 α 和VEGF的调控 图5显示的是石斛酚对细胞中HIF-1 α 和VEGF的mRNA表达的调节

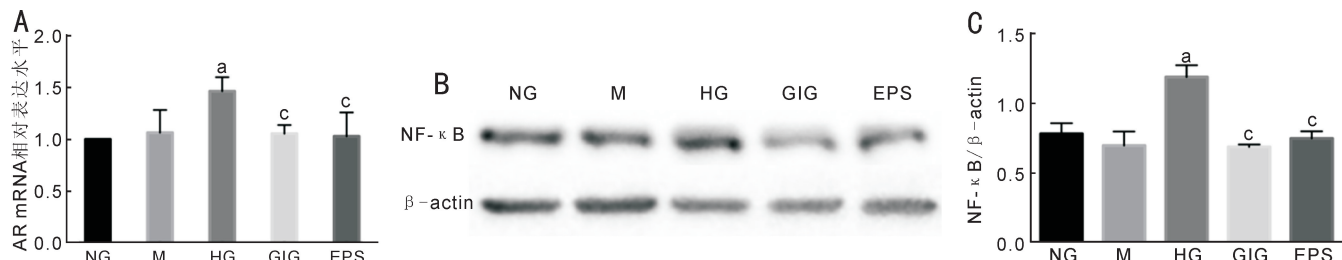


图4 石斛酚对高糖诱导的AR/NF-κB的调控 A:AR mRNA的表达水平;B:Western blotting法检测高糖下内皮细胞中NF-κB蛋白表达水平;C:NF-κB蛋白的相对表达水平,^a*P*<0.05 vs 正常组;^c*P*<0.05 vs 高糖组。

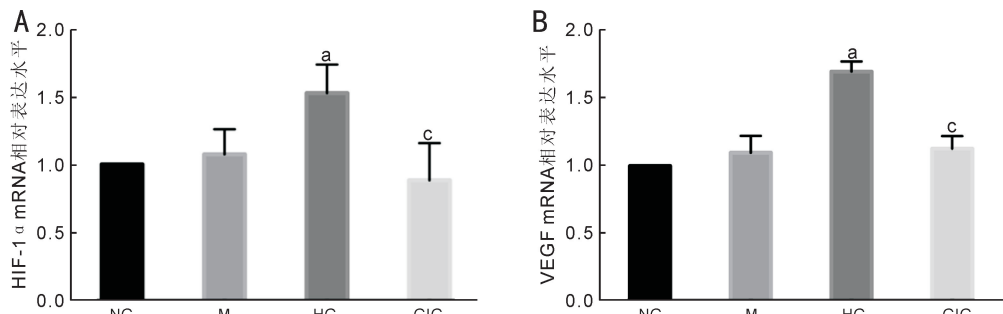


图5 采用实时定量PCR检测HIF-1α和VEGF mRNA的表达 A:HIF-1α mRNA的表达;B:VEGF mRNA的表达。^a*P*<0.05 vs 正常组;^c*P*<0.05 vs 高糖组。

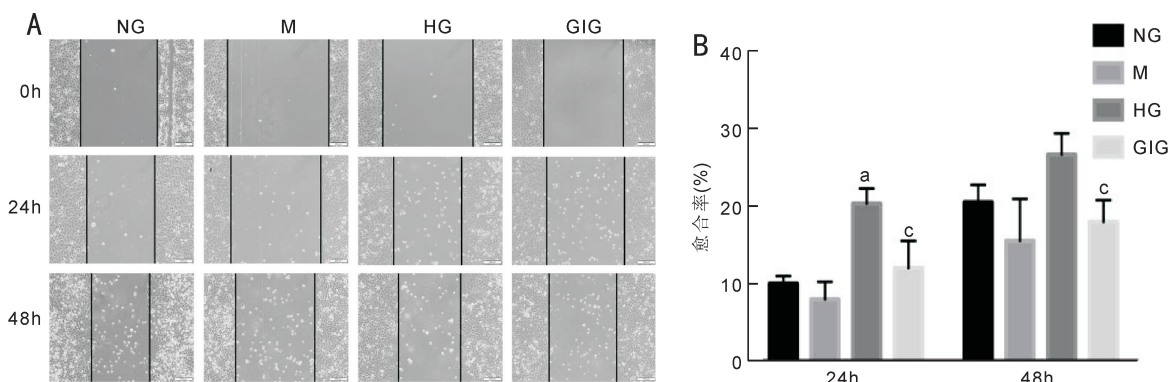


图6 石斛酚对细胞迁移能力的影响 A:倒置显微镜下观察细胞迁移能力(×100);B:24、48h各组细胞愈合率比较,^a*P*<0.05 vs 正常组;^c*P*<0.05 vs 高糖组。

作用,各实验组 HIF-1α 和 VEGF 的 mRNA 表达差异都有统计学意义(HIF-1α 表达: $F=4.263, P=0.029$; VEGF 表达: $F=39.936, P<0.05$)。高糖组与正常组比较,高糖组 HIF-1α 和 VEGF 的表达都明显升高,差异有统计学意义(HIF-1α 表达: $t=3.112, P=0.011$; VEGF 表达: $t=9.877, P<0.05$);石斛酚组与高糖组比较,石斛酚组 HIF-1α 和 VEGF 的表达都明显降低,差异有统计学意义(HIF-1α 表达: $t=3.801, P=0.003$, VEGF 表达: $t=8.051, P<0.05$),甘露醇组与正常组比较,差异无统计学意义(HIF-1α 表达: $t=0.443, P=0.667$; VEGF 表达: $t=1.405, P=0.198$)。

2.5 石斛酚对细胞迁移的影响 为探究石斛酚对细胞运动能力的影响,用细胞的愈合率反映其迁移能力。图 6A 是各实验组细胞在药物作用后 0、24、48h 的位置,可看到随着时间的延长,各组细胞也在生长,但生长的速度不同。图 5B 是对各组细胞的愈合率进行统计分析,发现各实验组的愈合率差异有统计学意义(24h: $F=15.926, P=0.001$; 48h: $F=5.493, P=0.024$)。高糖组细胞在 24h 和 48h 时间内生长都是快于正常组的,但只有 24h 时,差异有统计学意义(24h: $t=5.374, P=0.001$; 48h: $t=2.136, P=0.065$)。且石斛酚组细胞在 24h 和 48h 时间内生长都明

显慢于高糖组,差异有统计学意义(24h: $t=4.337, P=0.002$; 48h: $t=3.006, P=0.017$)。甘露醇组与正常组在 24h 和 48h 比较,差异无统计学意义(24h: $t=1.054, P=0.323$; 48h: $t=1.724, P=0.123$)。

3 讨论

代谢异常致血糖升高,而 ROS 累积会产生氧化应激反应,进而损害视网膜血管,最终发展为 DR。据研究,高糖血症损害血管主要通过四条经典途径:(1)多元醇代谢途径;(2)晚期糖基化终末产物途径;(3)蛋白激酶 C 的激活途径;(4)氨基己糖的激活途径。这些途径都与 ROS 的过度产生有关,而 DR 会诱导 ROS 生成。氧化应激能激活相关细胞信号分子,从而增加基因表达和改变酶的功能,导致视网膜功能受损,如内皮细胞功能异常、周细胞凋亡、视网膜屏障功能受损、渗透性过高、黄斑水肿、异常新生血管等表现^[6-7]。

多元醇通路在 DR 的发展中起重要作用,而 AR 是多元醇通路的关键限速酶。AR 广泛存在于肾脏、血管、晶状体、视网膜、心脏、骨骼肌等组织器官中,催化葡萄糖转化为不易通透细胞膜的山梨醇,使细胞肿胀、变性、坏死,与糖尿病慢性并发症的发生发展有密切关系^[8]。研究发

现,石斛酚可作用于 AR。石斛酚能延迟晶状体混浊,保持晶状体的透明度,具有抗渗透压和抗氧化的能力,在糖尿病性白内障的治疗中起重要作用^[9]。此外,石斛酚可抑制 NF- κ B 通路,减少 RAW264.7 巨噬细胞中由脂多糖诱导的诱导型一氧化氮合酶和环氧化酶-2 的产生^[10]。

本研究用 30mmol/L 葡萄糖建立高糖模型,模拟 DR 在体内的发病过程。为防止高渗环境对内皮细胞产生影响,特设置甘露醇组,保持与高糖组相同的渗透压环境。石斛酚作为一种从传统中草药石斛中提取的单体,已被证实可作用于 AR,但是未在 DR 中做过有关视网膜微血管内皮细胞的研究。本实验使用 HRMECs,可能在病理特征方面更加贴近 DR 的实际病理变化,便于得出更为接近临床的实际研究结果。有研究发现,依帕司他作为一种醛糖还原酶抑制剂,能通过多元醇通路减少 2 型糖尿病患者红细胞中某些氧化应激标志物,达到治疗糖尿病及其并发症的目的^[11]。本实验中使用石斛酚作用于高糖环境下的细胞,依帕司他作为阳性对照,拟探究石斛酚在 DR 中是否可以像在糖尿病性白内障中一样,通过抑制 AR 发挥作用。本研究发现,与高糖组相比,石斛酚与依帕司他都可减少 HRMECs 中 AR mRNA 的表达,NF- κ B 的蛋白表达量也呈下降趋势。实验结果说明石斛酚可能会通过抑制 AR/NF- κ B 通路起到治疗 DR 的作用。此外,所有实验结果都显示,甘露醇组与正常组比较,差异无统计学意义,说明 30mmol/L 的高渗状态并未对内皮细胞产生不良影响。

DR 是最常见的视网膜血管病,微血管细胞受损导致视网膜缺血缺氧,从而产生新生血管,HIF-1 α 是新生血管形成过程中的关键因子^[12]。HIF-1 α 作为缺氧反应中的一个调节因子,在临床上尚未发现眼内有明显缺血改变前,视网膜上 HIF-1 α 的表达已增加,HIF-1 α 表达越多表明视网膜缺血缺氧的情况越严重^[13]。HIF-1 α 可诱导 VEGF 激活,而 VEGF 与新生血管的形成有重要关系。实验证明,削弱氧化应激中 ROS 的产生,可抑制 HIF-1 α /VEGF 通路激活,从而减少新生血管生成^[14]。本研究中荧光探针 DCFH-DA 结果显示,石斛酚可明显减少 HRMECs 中 ROS 的表达,同时其下游的 HIF-1 α /VEGF 通路表达也受到抑制,HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 表达明显降低,说明石斛酚可改善高糖环境下视网膜缺血缺氧的状态,在对抗氧化应激反应方面有显著效果,并且可能有助于减少 DR 中新血管的形成。

综上所述,本研究通过探讨石斛酚对高糖诱导的 HRMECs 中 AR 通路和氧化应激的作用机制,发现石斛酚

能抑制 HRMECs 中的 AR 通路和氧化应激反应,并能对抗 VEGF 的表达,减少新生血管形成,为临床治疗 DR 提供了重要的理论依据,但是要将实验结果转为临床成果还需进一步的研究。

参考文献

- 1 Popkin BM. Nutrition Transition and the Global Diabetes Epidemic. *Curr Diab Rep* 2015;15(9):64
- 2 Shen XH, Anand V, Wu SL, et al. The Diabetes Epidemic in China: An Integrated Review of National Surveys. *Endocr Pract* 2016; 22(9): 1119-1129
- 3 Barber AJ. Diabetic retinopathy: recent advances towards understanding neurodegeneration and vision loss. *Sci China Life Sci* 2015; 58(6): 541-549
- 4 林萍,毕志明,徐红,等.石斛属植物药理活性研究进展. *中草药* 2003;34(11):19-22
- 5 张光浓,毕志明,王峥涛,等.石斛属植物化学成分研究进展. *中草药* 2003;34(6):5-8
- 6 Li C, Miao X, Li FS, et al. Oxidative Stress-Related Mechanisms and Antioxidant Therapy in Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:9702820
- 7 Cai X, McGinnis JF. Diabetic Retinopathy: Animal Models, Therapies, and Perspectives. *J Diabetes Res* 2016;2016:3789217
- 8 李宏哲,李才锐,孙曙光.醛糖还原酶在糖尿病视网膜病变中作用的研究进展. *国际眼科杂志* 2015;15(7):1176-1178
- 9 Fang H, Hu XH, Wang ML, et al. Anti-osmotic and antioxidant activities of gigantol from *Dendrobium aurantiacum* var. *denneanum* against cataractogenesis in galactosemic rats. *J Ethnopharmacol* 2015; 172:238-246
- 10 Won JH, Kim JY, Yun KJ, et al. Gigantol isolated from the whole plants of *Cymbidium goeringii* inhibits the LPS-induced iNOS and COX-2 expression via NF- κ B inactivation in RAW 264.7 macrophages cells. *Planta Med* 2006;72(13):1181-1187
- 11 Ohmura C, Watada H, Azuma K, et al. Aldose reductase inhibitor, epalrestat, reduces lipid hydroperoxides in type 2 diabetes. *Endocrine J* 2009;56(1):149-156
- 12 D'Amico AG, Maugeri G, Reitano R, et al. PACAP Modulates Expression of Hypoxia-Inducible Factors in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Retina. *J Mol Neurosci* 2015;57(4):501-509
- 13 李才锐,胥延,姜德咏,等.早期糖尿病 NOD 小鼠视网膜 HIF-1 的表达. *眼科学报* 2006;22(2):107-111
- 14 Wang D, Wang L, Gu J, et al. Scutellarin inhibits high glucose-induced and hypoxia-mimetic agent-induced angiogenic effects in human retinal endothelial cells through reactive oxygen species/hypoxia-inducible factor-1 α /vascular endothelial growth factor pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 2014;64(3):218-227