

加味桃红四物汤对视网膜 Müller 细胞缺氧损伤的保护作用

孔令春, 邹红, 李景景, 凌芸, 唐慧新

引用: 孔令春, 邹红, 李景景, 等. 加味桃红四物汤对视网膜 Müller 细胞缺氧损伤的保护作用. 国际眼科杂志 2023; 23(1): 17-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81874384); 浦东新区卫健委 (联合攻关项目) (No.PW2021D-03)

作者单位: (201203) 中国上海市, 上海中医药大学附属曙光医院眼科

作者简介: 孔令春, 毕业于上海交通大学, 硕士, 主治医师, 研究方向: 中医药治疗眼底病。

通讯作者: 邹红, 毕业于复旦大学, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病、白内障的诊断和治疗. zouhong2007@126.com

收稿日期: 2022-07-14 修回日期: 2022-12-09

摘要

目的: 探讨加味桃红四物汤 (MTSD) 对视网膜 Müller 细胞 rMC-1 缺氧损伤的保护作用。

方法: 用加味桃红四物汤含药血清干预缺氧条件下 rMC-1 细胞, 随机分为正常对照组 (21% O₂)、缺氧模型组 (1% O₂)、含药血清低 (1% O₂ + 5% 含药血清)、中 (1% O₂ + 10% 含药血清)、高剂量组 (1% O₂ + 15% 含药血清), CCK-8 法检测细胞的活力, ELISA 法检测血管内皮生长因子 (VEGF) 和色素上皮衍生因子 (PEDF) 分泌, Western blot 检测磷酸化转录激活因子 3 (p-STAT3)、转录激活因子 3 (STAT3) 和缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 的蛋白表达, Real time PCR 检测 VEGF、PEDF、STAT3 和 HIF-1 α 的基因表达。

结果: 在 1% O₂ 条件下培养 48h, rMC-1 细胞活力较正常对照组明显受到抑制 ($P < 0.05$), 加味桃红四物汤含药血清低、中剂量组均可以改善 rMC-1 细胞缺氧 48h 的细胞存活率 ($P < 0.05$), 而高剂量组无改善作用 ($P > 0.05$)。加味桃红四物汤含药血清低、中剂量组均可减少缺氧条件下 rMC-1 细胞上清液 VEGF 的蛋白表达量 ($P < 0.05$), 但不能增加 PEDF 的蛋白含量 ($P > 0.05$), 对 p-STAT3 和 HIF-1 α 在蛋白水平均有下调作用 ($P < 0.05$), 且低剂量组抑制作用优于中剂量 ($P < 0.05$)。加味桃红四物汤含药血清中剂量组对缺氧后 rMC-1 细胞 STAT3 的蛋白表达有上调作用 ($P < 0.05$)。加味桃红四物汤含药血清低、中剂量组对缺氧后 rMC-1 细胞 VEGF 基因表达均有下调作用 ($P < 0.05$), 对 PEDF 基因表达均有上调作用 ($P < 0.05$), 且低剂量组优于中剂量 ($P < 0.05$); 并且加味桃红四物汤含药血清低剂量可下调缺氧后 STAT3 和 HIF-1 α 的基因表达 ($P < 0.05$)。

结论: 加味桃红四物汤含药血清可能通过抑制 STAT3/HIF-1 α 通路, 下调缺氧诱导的视网膜 Müller 细胞 rMC-1

的 VEGF 蛋白和基因表达, 上调 PEDF 基因表达, 减轻该细胞的缺氧损伤。

关键词: 加味桃红四物汤; 视网膜缺氧; Müller 细胞; 血管内皮生长因子; 色素上皮衍生因子; 缺氧诱导因子-1 α

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.1.04

Protective effect of Modified Taohong Siwu Decoction on hypoxia injury to retinal Müller cells

Ling-Chun Kong, Hong Zou, Jing-Jing Li, Yun Ling, Hui-Xin Tang

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.81874384); Pudong New Area Health Construction Committee (Joint Project) (No.PW2021D-03)

Department of Ophthalmology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Correspondence to: Hong Zou. Department of Ophthalmology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China. zouhong2007@126.com

Received: 2022-07-14 Accepted: 2022-12-09

Abstract

• AIM: To investigate the protective effect of Modified Taohong Siwu Decoction (MTSD) on hypoxia injury to retinal Müller cells rMC-1.

• METHODS: Retinal Müller cells rMC-1 were interfered with the MTSD drug-containing serum under hypoxia condition, and were randomly divided into control group (21% O₂), hypoxia model group (1% O₂), MTSD drug-containing serum low-dose (1% O₂ + 5% medicated serum), medium-dose (1% O₂ + 10% medicated serum) and high-dose (1% O₂ + 15% medicated serum) groups. Cell viability was detected by CCK-8 method, and secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) and pigment epithelium derived factor (PEDF) was detected by ELISA. The protein expressions of p-STAT3, STAT3 and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) were detected by Western blot, and the gene expressions of VEGF, PEDF, STAT3 and HIF-1 α were detected by real-time polymerase chain reaction (PCR).

• RESULTS: The viability of rMC-1 cells was significantly inhibited when cultured at 1% O₂ for 48h compared with that of control group ($P < 0.05$), while it was improved in both low and medium dose of MTSD groups ($P < 0.05$).

The viability of rMC-1 cells in high dose group was not improved in hypoxia condition ($P > 0.05$). The low and medium doses of MTSD could reduce the protein expressions of VEGF in supernatant of rMC-1 cells under hypoxia condition ($P < 0.05$), while the protein expressions of PEDF could not be increased ($P > 0.05$). The above two dose groups down-regulated the protein levels of both p-STAT3 and HIF-1 α ($P < 0.05$), and the inhibition effect of low dose group was better than that of medium dose group ($P < 0.05$). The medium dose of MTSD could up-regulate STAT3 protein level after hypoxia culture in rMC-1 cells ($P < 0.05$). The low and medium doses of MTSD significantly down-regulated VEGF gene level ($P < 0.05$) and up-regulated PEDF gene level after hypoxia culture in rMC-1 cells ($P < 0.05$), and the function in the low dose group was superior to that in the medium dose group ($P < 0.05$). The low dose of MTSD could down-regulate STAT3 and HIF-1 α gene levels after hypoxia culture in rMC-1 cells ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Probably by inhibiting the STAT3/HIF-1 α pathway, the drug-containing serum of MDST down-regulated the expression of VEGF protein and gene in hypoxia-induced retinal Müller cells, rMC-1, up-regulated the gene expression of PEDF, and alleviated the hypoxia injury to the cells.

• **KEYWORDS:** Modified Taohong Siwu Decoction; retinal hypoxia; Müller cells; vascular endothelial growth factor; pigment epithelium derived factor; hypoxia-inducible factor-1 α

Citation: Kong LC, Zou H, Li JJ, *et al.* Protective effect of Modified Taohong Siwu Decoction on hypoxia injury to retinal Müller cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2023;23(1):17-22

0 引言

视网膜静脉阻塞(retinal vein occlusion, RVO)作为一种缺血缺氧性视网膜血管疾病,黄斑水肿(macular edema, ME)和视网膜新生血管(retinal neovascularization, RNV)是其最常见的并发症,也是导致RVO患者视力下降的主要原因^[1]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和色素上皮衍生因子(pigment epithelium derived factor, PEDF)之间动态的平衡在新生血管形成过程中起着重要的作用^[2],已得到广泛共识。而缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)是在缺氧状态下发挥活性的转录因子,是调节细胞内氧代谢的关键物质,能诱导下游基因VEGF的表达^[3],同时也参与PEDF翻译后蛋白水平的下调机制^[4]。

桃红四物汤是一种经典的活血化瘀中药方剂,由桃仁、红花、熟地黄、当归、芍药、川芎等6种药材组成。多项研究报告该方治疗心脏、脑等大血管的阻塞效果较好^[5-7]。前期研究发现以桃红四物汤为基础方,加上黄芪、枳壳、香附、茯苓、白术、薏苡仁益气利水的中药组成的加味桃红四物汤,灌胃后视网膜静脉阻塞模型大鼠可以减轻视网膜出血、渗出、水肿等眼底病变^[8]。为了进一步研究该中药复方对视网膜的保护作用机制,本研究拟建立视网膜Müller细胞缺氧模型,探究加味桃红四物汤含药血清对缺氧条件下视网膜Müller细胞VEGF、PEDF、STAT3、HIF-1 α 表达的影响,为临床上中药治疗缺血缺氧性视网

膜血管疾病提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 **动物与细胞株** SPF级健康SD雄性大鼠20只,体质量 250 ± 30 g,由上海中医药大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK(沪)2012-0008。于上海中医药大学SPF级实验室常规饲养,饲养温度 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$,环境湿度 $50\% \sim 60\%$,自由饮水进食。该实验动物经上海中医药大学实验动物福利与伦理委员批准。rMC-1细胞是一种鼠源视网膜Müller细胞系,为实验室液氮保存。

1.1.2 **药物** 加味桃红四物汤组成:黄芪20g,当归12g,生地12g,桃仁9g,红花9g,赤芍12g,枳壳9g,川芎9g,香附9g,茯苓12g,白术10g,薏苡仁20g。总共12味中药,重143g。上海中医药大学附属曙光医院中药房配备。由本院中药制剂室煎制,将上述药材浸泡、煎煮(加水煮沸1h后过滤,滤渣加水煮沸1h,合并二煎的滤液)、去渣,浓缩(90°C)至药液浓度为 $32\text{g}/10\text{mL}$ (含生药)。

1.1.3 **主要试剂与仪器** 戊巴比妥钠($10\text{g}/\text{L}$)(批号:Lot. No.WS20160401)购自国药集团化学试剂公司;DMEM培养基(货号:11885-084,批号:2366072)、胎牛血清(FBS)(货号:10099-141,批号:2021472)均购自美国Gibco公司;CCK-8试剂盒(货号:CK04-100T)购自日本DOJINDO公司;PEDF酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(货号:SDR0068)、VEGF ELISA试剂盒(货号:SDR0041)、BCA蛋白定量试剂盒(货号:SD0012)均购自上海司鼎生物科技有限公司;Trizol RNA提取试剂(批号:15596018)购自美国Invitrogen公司;实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)试剂盒(货号:RR420A)购自日本TAKARA;引物由上海司鼎生物科技有限公司合成;STAT3抗体(货号:ab68153)、p-STAT3抗体(货号:ab32143)、HIF-1 α 抗体(货号:ab179483)均购自美国Abcam公司; β -actin抗体(货号:SD0034)购自上海司鼎生物科技有限公司。三气培养箱(中国华仪宁创公司,Smartor 118型)。

1.2 方法

1.2.1 **含药血清的制备** 正常SD雄性大鼠随机分为含药血清组和空白血清组,每组10只。按照每天 $1\text{mL}/100\text{g}$ 分别予加味桃红四物汤方中药灌胃,空白血清组给予同等量生理盐水。给药3d,第3d灌胃结束后给予禁食,次日晨再灌胃一次。1h后3%戊巴比妥钠腹腔麻醉,无菌条件下自后腔静脉采血,静置 $3 \sim 4\text{h}$, $3000\text{r}/\text{min}$ 、 20min , 4°C 离心,超净台上分离血清,将分离得到的血清置于 56°C 水浴中 30min 灭活,微孔滤膜过滤,密封好, -20°C 保存备用。临用前用空白血清进行稀释作为含药血清的低、中、高剂量组。

1.2.2 **Müller细胞培养及缺氧处理** rMC-1细胞复苏后,使用添加10%FBS、1%青霉素/链霉素的DMEM培养基,置 37°C 度培养箱培养($5\%\text{CO}_2$, $21\%\text{O}_2$),并维持一定的湿度。约 $1 \sim 2\text{d}$ 换液1次,细胞生长融合至85%时,使用0.25%胰蛋白酶消化细胞,用完全培养基终止消化后,以1:3比例传代,取对数生长期的 $3 \sim 6$ 代细胞用于实验。缺氧处理为将细胞放入缺氧箱($5\%\text{CO}_2$, $1\%\text{O}_2$)培养6、24、48h。

1.2.3 **实验分组及干预** 实验分为五组,即正常对照组,缺氧模型组,加味桃红四物汤低、中、高剂量组,具体干预和培养条件见表1。

表1 各组干预及培养条件

组别	干预条件	培养条件
正常对照组	含 15%空白血清的 DMEM 培养液	5%CO ₂ , 21%O ₂
缺氧模型组	含 15%空白血清的 DMEM 培养液	5%CO ₂ , 1%O ₂
加味桃红四物汤低剂量组	含 5%含药血清、10%空白血清的 DMEM 培养液	5%CO ₂ , 1%O ₂
加味桃红四物汤中剂量组	含 10%含药血清、5%空白血清的 DMEM 培养液	5%CO ₂ , 1%O ₂
加味桃红四物汤高剂量组	含 15%含药血清的 DMEM 培养液	5%CO ₂ , 1%O ₂

1.2.4 CCK-8 法检测细胞活力 通过 CCK-8 实验明确加味桃红四物汤含药血清的干预剂量。向 96 孔板中每孔接种细胞悬液 100 μ L,使每孔细胞数目至 1×10^5 个,然后将 96 孔板放在培养箱中(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂的条件下)常规培养 24h,各组细胞按照分组干预后,每组设 6 个复孔,向每孔中加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液,将培养板在培养箱内孵育 3h,用酶标仪检测 450nm 处的 OD 值。

1.2.5 ELISA 检测 VEGF 和 PEDF 分泌 收集各组细胞上清液按试剂盒说明操作,每组设 3 个复孔,在阳性对照正常显色的前提下,根据说明书对 VEGF、PEDF 的含量进行测量。

1.2.6 Western blot 检测 p-STAT3 和 STAT3 及 HIF-1 α 蛋白的表达 收集各组 rMC-1 细胞,按照蛋白抽提试剂盒说明抽提细胞总蛋白,并采用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度,每组分别取 20 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,转膜后分别加入 p-STAT3、STAT3 和 HIF-1 α 一抗体稀释度分别为 1:2000、1:2000、1:1000,以抗体稀释液配制,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,随后加入 HRP 标记的与一抗相对应二抗(1:20000),37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。显色定影之后,用 ImageJ 图象处理系统分析目标蛋白条带的灰度值,蛋白表达量结果以灰密度比值(目的蛋白/ β -actin)表示。

1.2.7 Real time PCR 检测 VEGF、PEDF、STAT3 和 HIF-1 α mRNA 水平 收集各组 rMC-1 细胞,使用 Trizol 提取细胞总 RNA,测定 RNA 的质量和浓度。应用逆转录试剂盒将 mRNA 合成为 cDNA,随后依照 RT-qPCR 试剂盒进行 VEGF、PEDF、STAT3、HIF-1 α mRNA 扩增,以 GAPDH 为内参,引物序列见表 2。每个样品设置 3 个复孔,反应体系为: cDNA 1 μ L,上下游引物各 1 μ L, 2 \times Green Mix 10 μ L,去离子水 7 μ L。反应条件设置为:95 $^{\circ}$ C 30s;95 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 30s,40 个循环,使用相对表达量 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法进行分析。

统计学分析:采用 SPSS 21.0 统计处理软件进行数据分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 SNK-q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时间各组对缺氧损伤 rMC-1 细胞活力的影响

CCK-8 结果显示(图 1):在 1%O₂条件下培养 48h,与正常对照组相比,缺氧模型组 rMC-1 细胞活力明显受到抑制,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与缺氧模型组相比,加味桃红四物汤含药血清低、中剂量组均可以改善 rMC-1 细胞缺氧 48h 的细胞存活率,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而高剂量组对 rMC-1 细胞缺氧 48h 的细胞存活率无改善作用,差异无统计学意义($P > 0.05$),故选用加味桃红四物汤含药血清低、中剂量组和缺氧 48h 用于后续实验。

2.2 各组对缺氧损伤 rMC-1 细胞 VEGF 和 PEDF 分泌的影响 ELISA 结果发现:与正常对照组比较,缺氧模型组细胞上清液 VEGF 蛋白表达量增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 PEDF 蛋白表达量下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),加味桃红四物汤低、中剂量均可减少缺氧条件下 rMC-1 细胞 VEGF 的蛋白表达量,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),但不能增加 PEDF 的蛋白含量,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果表明,加味桃红四物汤含药血清对 rMC-1 细胞缺氧 48h VEGF 的分泌有抑制作用,低剂量作用优于中剂量,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.3 各组对缺氧损伤 rMC-1 细胞 p-STAT3、STAT3、HIF-1 α 蛋白的影响 Western blot 结果发现:与正常对照组比较,rMC-1 细胞缺氧培养 48h 后,p-STAT3 和 HIF-1 α 的蛋白表达显著上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而加味桃红四物汤低、中剂量对两者在蛋白水平较缺氧模型组均有下调作用,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且低剂量组抑制作用均优于中剂量,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与正常对照组比较,rMC-1 细胞缺氧培养 48h 后,STAT3 的蛋白表达无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$),而加味桃红四物汤含药血清中剂量对其在蛋白水平较缺氧模型组有上调作用,差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明加味桃红四物汤含药血清可减少缺氧 48h 后 rMC-1 细胞 STAT3 的磷酸化,减少 HIF-1 α 的蛋白表达,见图 3,表 3。

2.4 各组对缺氧损伤 rMC-1 细胞 VEGF、PEDF、STAT3、HIF-1 α 基因表达的影响 Real time PCR 结果表明:与正常对照组比较,rMC-1 细胞缺氧培养 48h 后,VEGF、STAT3 和 HIF-1 α 的基因表达上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$),PEDF 的基因表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),而加味桃红四物汤低、中剂量对 VEGF 在基因水平较缺氧模型组均有下调作用,差异均有统计学意义($P < 0.05$),对 PEDF 在基因水平较缺氧模型组均有上调作用,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且低剂量组优于中剂量,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与缺氧模型组相比,加味桃红四物汤低剂量对 STAT3 和 HIF-1 α 在基因水平均有下调作用,差异均有统计学意义($P < 0.05$),但其中剂量对两者在基因水平无下调作用,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 4。结果表明,低剂量加味桃红四物汤含药血清可以抑制缺氧损伤 rMC-1 细胞 VEGF、STAT3、HIF-1 α mRNA 的高表达,增加 PEDF mRNA 的表达。

3 讨论

Müller 细胞作为视网膜上特有的也是极为重要的一种神经胶质细胞,占视网膜胶质细胞的 90%,它通过分泌 VEGF 等多种细胞生长因子,参与视网膜新生血管的形成^[9]。正常情况下它也会分泌 PEDF,而 PEDF 是一种对

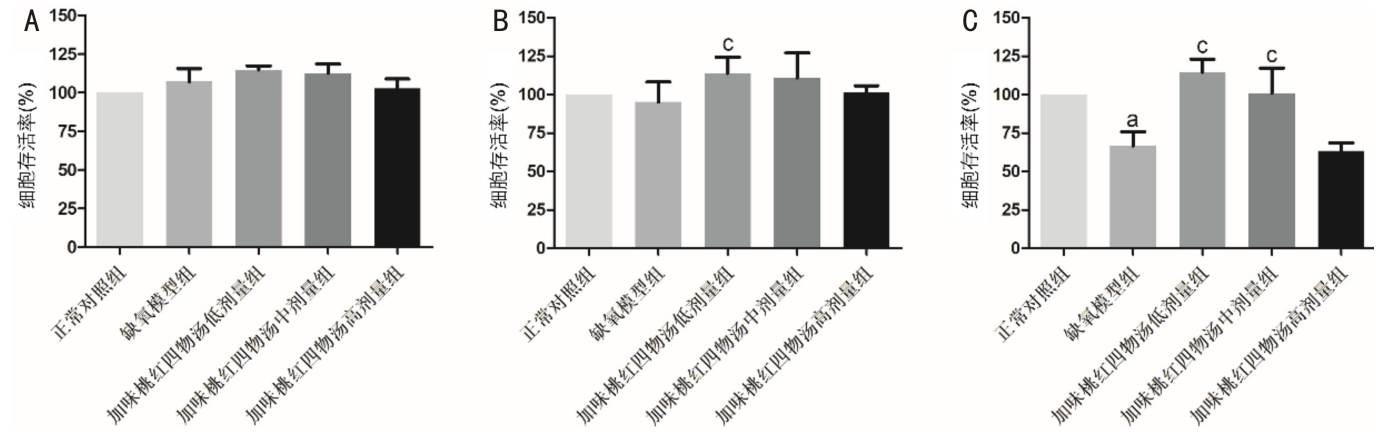


图1 不同时间各组对缺氧损伤 rMC-1 细胞活力的影响 A:6h;B:24h;C:48h; * $P < 0.05$ vs 正常对照组; ° $P < 0.05$ vs 缺氧模型组。

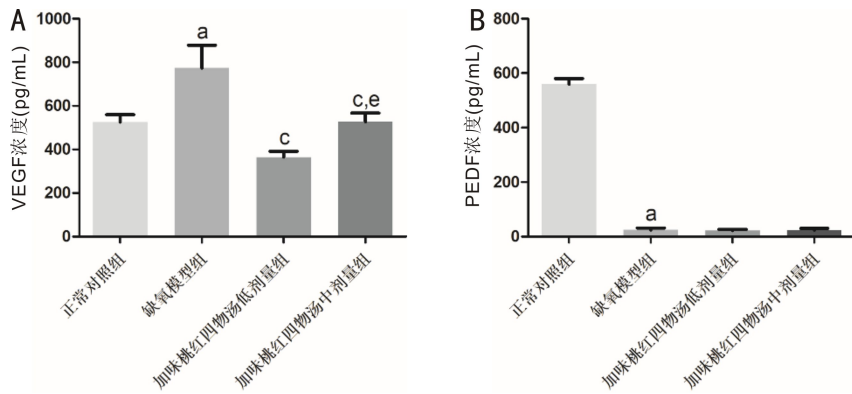


图2 各组对缺氧损伤 rMC-1 细胞 VEGF 和 PEDF 分泌的影响 A:ELISA 检测 VEGF 浓度;B:ELISA 检测 PEDF 浓度; * $P < 0.05$ vs 正常对照组; ° $P < 0.05$ vs 缺氧模型组; ° $P < 0.05$ vs 加味桃红四物汤低剂量组。

表2 引物序列

基因	上游(5'-3')	下游(5'-3')	产物大小(bp)
VEGF	TGTACCTCCACCATGCCAAGT	ACCACTTCATGGGCTTTCTGCT	73
PEDF	ACTCTTTGCAGGACATGAAGCTA	GATAGTCGAGCGGGAAGGTG	186
STAT3	AAGCTGACCCAGGTAGTGCT	TTTCAGCTCCTCACATCGGG	237
HIF-1 α	TGCTGAAGACACAGAAGCGA	ATTCATCAGTGGTGGCAGTTG	245
GAPDH	TTCACGGCACAGTCAAGG	CTCAGCACCAAGCATCACC	114

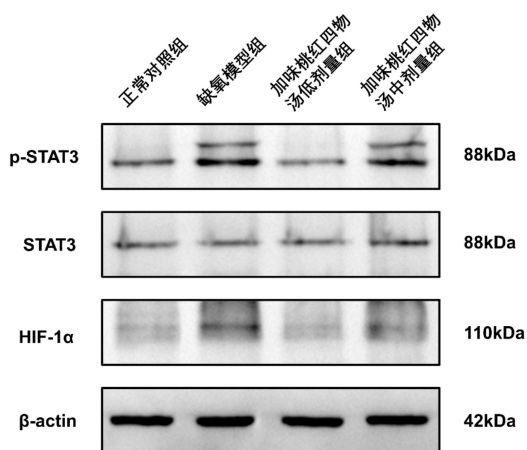


图3 Western blot 检测各组 rMC-1 细胞中 p-STAT3、STAT3、HIF-1 α 蛋白表达条带图。

从而形成各种病理性新生血管^[12-13]。Wolfram 等^[14]证实,在缺氧条件下, Müller 细胞内 VEGF 基因及蛋白表达升高, PEDF 基因及蛋白表达降低,引起视网膜新生血管的形成。本研究选用 Müller 细胞作为模型细胞。

VEGF 是一种促血管生成因子,在 ME 和 RNV 的发生发展中起关键作用^[15-16]。目前针对以上两种并发症的一线治疗是玻璃体内注射抗 VEGF 药物,这为广大患者带来了福音,但其给药方式为眼球内注射,属侵入性治疗,增加了眼内感染的机率,且有研究显示,尽管采取定期多次抗 VEGF 治疗,仍有约 25% 患者的视力或黄斑水肿程度得不到明显的改善^[17]。在抗 VEGF 基础上联合中医中药治疗 RVO 有提高疗效,减少用药次数的优点^[18-19],亦有学者发现单味中药含药血清可以抑制缺氧下视网膜色素上皮细胞的 VEGF 分泌^[20],因此,传统医学治疗视网膜血管病越来越受到学者们广泛关注。RVO 是由视网膜静脉的血栓引起的,属中医“络损暴盲”范畴,活血化瘀贯穿其整个治疗过程,若并发黄斑水肿,可配伍益气、利水的中药。本课题组前期研究发现,加味桃红四物汤(原名行气活血健脾利水方)治疗气虚血瘀的 RVO 患者可提高视网膜静脉阻

表3 各组对 rMC-1 细胞缺氧 48h p-STAT3、STAT3、HIF-1 α 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	p-STAT3	STAT3	HIF-1 α
正常对照组	0.336 \pm 0.013	0.325 \pm 0.008	0.500 \pm 0.040
缺氧模型组	0.599 \pm 0.007 ^a	0.306 \pm 0.034	0.875 \pm 0.059 ^a
加味桃红四物汤低剂量组	0.263 \pm 0.021 ^c	0.310 \pm 0.004	0.487 \pm 0.033 ^c
加味桃红四物汤中剂量组	0.483 \pm 0.005 ^{c,e}	0.358 \pm 0.013 ^c	0.703 \pm 0.084 ^{c,e}
F	371.3	4.439	30.30
P	<0.0001	0.040	0.0001

注:^aP<0.05 vs 正常对照组; ^cP<0.05 vs 缺氧模型组; ^eP<0.05 vs 加味桃红四物汤低剂量组。

表4 各组对 rMC-1 细胞缺氧 48h VEGF、PEDF、STAT3、HIF-1 α mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	VEGF	PEDF	STAT3	HIF-1 α
正常对照组	1.004 \pm 0.121	1.000 \pm 0.042	1.007 \pm 0.145	1.015 \pm 0.215
缺氧模型组	4.532 \pm 0.529 ^a	0.030 \pm 0.011 ^a	2.478 \pm 0.418 ^a	1.980 \pm 0.137 ^a
加味桃红四物汤低剂量组	0.502 \pm 0.021 ^c	0.878 \pm 0.074 ^c	1.026 \pm 0.158 ^c	1.164 \pm 0.204 ^c
加味桃红四物汤中剂量组	2.679 \pm 0.359 ^{c,e}	0.391 \pm 0.080 ^{c,e}	2.152 \pm 0.166 ^c	1.824 \pm 0.265 ^c
F	94.95	173.0	27.92	15.38
P	<0.0001	<0.0001	0.0001	0.0011

注:^aP<0.05 vs 正常对照组; ^cP<0.05 vs 缺氧模型组; ^eP<0.05 vs 加味桃红四物汤低剂量组。

塞患者的视敏度,减轻视网膜黄斑水肿,增加眼部血流,改善视网膜的微循环^[21];还可以减轻 RVO 模型大鼠视网膜出血、水肿等眼底病变,具有良好的改善视网膜水肿的作用^[8]。方中黄芪、当归为君药,益气活血;生地黄、赤芍凉血活血,川芎、香附、枳壳行气活血,白术、茯苓、薏苡仁健脾利水,同为臣药;佐以桃仁、红花活血化瘀,全方共奏活血化瘀和健脾利水之功。

本研究用加味桃红四物汤含药血清干预缺氧培养的 Müller 细胞,发现缺氧培养后该细胞活力受到明显抑制,而含药血清低、中剂量均可以改善缺氧后 Müller 细胞的活力。研究还发现,与正常对照组比较,缺氧模型组 VEGF 分泌和基因表达增加,而 PEDF 分泌水平和基因表达下降,加味桃红四物汤含药血清低、中剂量均可以减少 VEGF 分泌和基因表达,表明加味桃红四物汤对 Müller 细胞缺氧条件下 VEGF 的分泌和基因表达均有抑制作用,且低剂量组的抑制作用优于中剂量组,其原因可能是因为 Müller 细胞在缺氧刺激下其活力下降导致对药物的吸收率下降。值得注意的是,加味桃红四物汤含药血清可上调 PEDF 的基因表达,但却不能促进 PEDF 的分泌,考虑原因可能有两方面:(1)PEDF 的表达水平可能具有滞后性,张梅虹等^[22]也发现高氧诱导早产儿视网膜病变模型小鼠血清 PEDF 水平的变化滞后于视网膜 PEDF 的改变;(2)蛋白翻译是多步骤调控的结果,本实验的加味桃红四物汤是多种药物的复方制剂,可能存在某些单体成分在 PEDF 的蛋白翻译水平起到抑制作用,需要对该方的有效成分进一步研究。

HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 组成的异二聚体,HIF-1 α mRNA 既是 HIF-1 的调节亚基,又是活性亚基,其蛋白稳定性及转录活性均受到氧分压的严格调控,属于氧调节蛋白,故 HIF-1 的生理活性主要取决于 HIF-1 α ^[23]。有研究表明,在缺氧时,STAT3 被激活^[24-25],激活的 STAT3 通过增加 HIF-1 α 的稳定性和转录活动上调 HIF-1 α 的表

达^[26]。利用 shRNA 干扰缺氧条件下人角膜上皮细胞 HIF-1 α 表达,能有效地抑制 VEGF mRNA 和蛋白表达,使 PEDF mRNA 和蛋白表达上调^[27],提示 PEDF 和 VEGF 的调控均受 HIF-1 α 的调控。本研究发现,与正常对照组比较,Müller 细胞缺氧培养后,p-STAT3 和 HIF-1 α 的蛋白和基因表达显著上调,而低剂量含药血清对两者在蛋白和基因水平均有下调作用;与正常对照组比较,Müller 细胞缺氧培养后,STAT3 的蛋白表达无明显变化,而中剂量含药血清对其在蛋白水平有上调作用。表明加味桃红四物汤含药血清可减少缺氧后 Müller 细胞 STAT3 的磷酸化,减少 HIF-1 α 的蛋白表达。

综上所述,加味桃红四物汤可改善缺氧损伤的视网膜 Müller 细胞 rMC-1 活力下降,抑制其 VEGF 分泌,下调 VEGF 的基因表达,上调 PEDF 基因表达,维护了两者之间的平衡,进而可能抑制视网膜新生血管,减轻视网膜水肿,发挥治疗 RVO 的作用,其作用机制可能与抑制 STAT3/HIF-1 α 通路有关。

参考文献

- 1 Moon BG, Cho AR, Kim YN, *et al.* Predictors of refractory macular edema after branch retinal vein occlusion following intravitreal bevacizumab. *Retina* 2018;38(6):1166-1174
- 2 Cao W, Tombran-Tink J, Elias R, *et al.* *In vivo* protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(7):1646
- 3 Tan SQ, Geng X, Liu JH, *et al.* Xue-fu-Zhu-Yu Decoction protects rats against retinal ischemia by downregulation of HIF-1 α and VEGF via inhibition of RBP2 and PKM2. *BMC Complement Altern Med* 2017;17(1):365
- 4 Xiao Q, Zeng S, Lv M, *et al.* Small hairpin loop RNA targeting HIF-1 α down-regulates VEGF and up-regulates PEDF in human retinal pigment epithelial cells under hypoxic condition. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2008;28(4):460-464
- 5 Wang N, Fei C, Chu F, *et al.* Taohong Siwu Decoction Regulates Cell

Necrosis and Neuroinflammation in the Rat Middle Cerebral Artery Occlusion Model. *Front Pharmacol* 2021;59(4):569-575

6 Luo ZR, Li H, Xiao ZX, *et al.* Taohong Siwu Decoction Exerts a Beneficial Effect on Cardiac Function by Possibly Improving the Microenvironment and Decreasing Mitochondrial Fission after Myocardial Infarction. *Cardiol Res Pract* 2019;2019:5198278

7 Yen TL, Ong ET, Lin KH, *et al.* Potential advantages of Chinese medicine Taohong Siwu Decoction combined with tissue-plasminogen activator for alleviating middle cerebral artery occlusion-induced embolic stroke in rats. *Chin J Integr Med* 2014 [Epub ahead of print]

8 吕小利, 邹红, 黎蕾, 等. 加味桃红四物汤灌胃治疗视网膜静脉阻塞大鼠的实验研究. *上海中医药杂志* 2019;53(8):81-88

9 Vecino E, David Rodriguez F, Ruzafa N, *et al.* Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* 2016;51:1-40

10 Yan BX, Zheng YX, Li W, *et al.* Comparative expression of PEDF and VEGF in human epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts: from normal skin to psoriasis. *Discov Med* 2018;25(136):47-56

11 Rychli K, Kaun C, Hohensinner PJ, *et al.* The anti-angiogenic factor PEDF is present in the human heart and is regulated by anoxia in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Cell Mol Med* 2010;14(1-2):198-205

12 蒋晨, 万新娟, 丁琳, 等. 布林佐胺与噻吗洛尔滴眼液对新生血管性青光眼患者眼压及血清和房水 IL-6、PEDF 和 VEGF 水平的影响. *现代生物医学进展* 2018;18(19):3685-3689

13 孙磊, 陶勇. 玻璃体腔注射 Bevacizumab 对 PDR 患者增殖膜中 CTGF 及 PEDF 的影响. *国际眼科杂志* 2017;17(6):1051-1054

14 Eichler W, Yafai Y, Wiedemann P, *et al.* PEDF derived from glial Müller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis. *Exp Cell Res* 2004;299(1):68-78

15 Campochiaro PA, Bhisitkul RB, Shapiro H, *et al.* Vascular endothelial growth factor promotes progressive retinal nonperfusion in patients with retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 2013;120(4):795-802

16 Wang L, Astone M, Alam SK, *et al.* Suppressing STAT3 activity protects the endothelial barrier from VEGF-mediated vascular permeability. *Dis Model Mech* 2021;14(11):1-14

17 Vinković M, Bosnar D, Tedeschi Reiner E, *et al.* Combined treatment with bevacizumab and triamcinolone acetonide for macular edema due to retinal vein occlusion. *Acta Clin Croat* 2020;59(4):569-575

18 李晓宇, 谢立科, 郝晓凤, 等. 中医药治疗视网膜静脉阻塞研究进展. *中国中医基础医学杂志* 2020;26(1):140-142

19 相自越, 罗向霞, 王虹强, 等. 血栓通离子导入联合康柏西普玻璃体腔注射治疗视网膜静脉阻塞合并黄斑水肿. *国际眼科杂志* 2021;21(12):2150-2155

20 胡晗, 王晓琴, 聂浩. 黄芪含药血清对氯化钴诱导 ARPE-19 细胞缺氧损伤的保护作用. *国际眼科杂志* 2022;22(6):899-903

21 邹红, 黎蕾, 任建萍, 等. 行气活血健脾利水方治疗视网膜静脉阻塞黄斑水肿临床研究. *新中医* 2014;46(11):158-161

22 张梅虹, 章学英, 杜鹃. 早产儿视网膜病变小鼠模型视网膜 PEDF 的表达和血清 PEDF 水平的变化及意义. *中国临床医学* 2013;20(8):484-487

23 Gross J, Rheinländer C, Fuchs J, *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor-1 in the cochlea of newborn rats. *Hear Res* 2003;183(1-2):73-83

24 Jung JE, Lee HG, Cho IH, *et al.* STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *FASEB J* 2005;19(10):1296-1298

25 Koh MY, Spivak-Kroizman TR, Powis G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci* 2008;33(11):526-534

26 Jung JE, Kim HS, Lee CS, *et al.* STAT3 inhibits the degradation of HIF-1 α by pVHL-mediated ubiquitination. *Exp Mol Med* 2008;40(5):479-485

27 张晓玲, 陈剑, 姚敏, 等. HIF-1 α 的 RNA 干涉可引起缺氧条件下人角膜上皮细胞 VEGF 表达下调和 PEDF 表达上调. *细胞与分子免疫学杂志* 2018;34(10):880-884