

紫檀芪对高糖介导的人视网膜微血管内皮细胞内皮间充质转化的抑制作用

汪小兰*, 杨瀚毅*, 张益萌, 刘思达, 陈城明, 谢婷珂, 陈奕玄, 宁佳怡, 韩静

引用:汪小兰,杨瀚毅,张益萌,等. 紫檀芪对高糖介导的人视网膜微血管内皮细胞内皮间充质转化的抑制作用. 国际眼科杂志, 2025,25(3):359-364.

基金项目:陕西省中医药管理局科研项目(No.SZY-KJCYC-2023-028);空军军医大学临床研究项目(No.2022LC2227);唐都医院临床研究重点项目(No.2021LCYJ019)

作者单位:(710038)中国陕西省西安市,空军军医大学唐都医院眼科

*:汪小兰和杨瀚毅对本文贡献一致。

作者简介:汪小兰,毕业于西南大学,硕士研究生,实验师,研究方向:糖尿病视网膜病变;杨瀚毅,毕业于西安医学院,硕士研究生,住院医师,研究方向:糖尿病视网膜病变。

通讯作者:韩静,博士,副主任医师,副教授,博士研究生导师,研究方向:视网膜疾病的发病机制及防治、眼内新生血管发生机制和眼外伤的防治等各类复杂疾病. hanjing.cn@163.com

收稿日期:2024-08-07 修回日期:2025-02-06

摘要

目的:探讨紫檀芪对高糖环境下诱导的人视网膜微血管内皮细胞(HRMECs)内皮间充质转化(EndMT)的潜在抑制作用。

方法:采用CCK-8测定法确定紫檀芪处理HRMECs的最适浓度,选择了12.5、25 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度进行后续实验。将HRMECs分为对照组、高糖组、高糖联合12.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪处理组以及高糖联合25 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪处理组。通过Western blot法检测各组细胞中HDAC7表达以及与EndMT相关的标志蛋白水平;Transwell迁移实验和划痕愈合实验评估各组细胞的迁移能力;管腔形成实验用于评价细胞的血管生成能力。

结果:CCK-8实验结果表明紫檀芪在22.07 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时能将HRMECs细胞活性抑制50%。Western blot分析显示,相较于对照组,高糖培养的HRMECs中HDAC7、ZEB1、Vimentin和Snail的表达水平显著升高(均 $P < 0.01$),而VE-cadherin和CD31的表达显著降低(均 $P < 0.01$)。相较于高糖组,12.5、25 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪的处理能够显著降低高糖条件下的HDAC7、ZEB1、Vimentin和Snail的表达(均 $P < 0.01$)。25 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪能够增强VE-cadherin和CD31的表达(均 $P < 0.01$)。划痕实验结果显示,高糖处理组的HRMECs显示出较对照组显著增加的细胞迁移率($P < 0.05$),而25 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪的应用均显著抑制了HRMECs在高糖条件下的细胞迁移($P < 0.01$)。Transwell迁移实验结果显示,高糖组的细胞迁移率显著高于对照组($P < 0.01$),且12.5、25 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪处理后细胞迁移率较高糖组明显降低(均 $P < 0.01$)。管腔形成实验表明,高糖环境下HRMECs的管腔形成能力显著增强($P < 0.01$),并且12.5、25 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪均能有效抑制这一效

应(均 $P < 0.01$)。

结论:紫檀芪能抑制高糖介导的HRMECs的EndMT及HDAC7的表达,并抑制细胞迁移及管腔形成能力。

关键词:紫檀芪;糖尿病视网膜病变;人视网膜微血管内皮细胞;内皮间充质转化;组蛋白去乙酰化酶7

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2025.3.04

Inhibitory effect of pterostilbene on high glucose - mediated endothelial - to - mesenchymal transition in human retinal microvascular endothelial cells

Wang Xiaolan*, Yang Hanyi*, Zhang Yimeng, Liu Sida, Chen Chengming, Xie Tingke, Chen Yixuan, Ning Jiayi, Han Jing

Foundation items: Research Project of Shaanxi Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (No.SZY-KJCYC-2023-028); Clinical Research Project of the Air Force Medical University (No.2022LC2227); Key Project of Clinical Research of Tangdu Hospital (No.2021LCYJ019)

Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

* Co-first authors: Wang Xiaolan and Yang Hanyi

Correspondence to: Han Jing, Department of Ophthalmology, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. hanjing.cn@163.com

Received:2024-08-07 Accepted:2025-02-06

Abstract

• **AIM:** To investigate the potential inhibitory effect of pterostilbene on the endothelial - to - mesenchymal transition (EndMT) induced by high glucose conditions in human retinal microvascular endothelial cells (HRMECs).

• **METHODS:** The optimal concentration of pterostilbene for treating HRMECs was determined using the CCK - 8 assay, with 12.5 and 25 $\mu\text{mol/L}$ concentrations selected for subsequent experiments. Four experimental groups were established: control group, high glucose group, high glucose combined with 12.5 $\mu\text{mol/L}$ pterostilbene treatment group, and high glucose combined with 25 $\mu\text{mol/L}$ pterostilbene treatment group. The expression levels of HDAC7 and EndMT - associated markers were detected via Western blot analysis. Cell migration ability was assessed using Transwell migration assays and scratch wound healing tests, while vasculogenic capability was evaluated through tube formation assays.

• **RESULTS:** The CCK-8 assay revealed that pterostilbene at a concentration of 22.07 $\mu\text{mol/L}$ inhibited 50% of cell viability in HRMECs. Western blot analysis demonstrated that compared with the control group, the expression levels of HDAC7, ZEB1, Vimentin, and Snail were significantly upregulated in HRMECs cultured in high glucose (all $P < 0.01$), while the expressions of VE-cadherin and CD31 were significantly reduced (all $P < 0.01$). Compared to the high glucose group, the treatment with 12.5 and 25 $\mu\text{mol/L}$ pterostilbene significantly reduced the expression of HDAC7, ZEB1, Vimentin, and Snail under high glucose conditions (all $P < 0.01$). Notably, 25 $\mu\text{mol/L}$ pterostilbene enhanced the expression of VE-cadherin and CD31 (all $P < 0.01$). Scratch wound healing tests revealed that HRMECs treated with high glucose exhibited a significantly increased cell migration rate compared to the control group ($P < 0.05$), while the application of 25 $\mu\text{mol/L}$ pterostilbene significantly suppressed HRMECs migration under high glucose conditions ($P < 0.01$). Transwell migration assays demonstrated that the cell migration rate in the high glucose group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$), with cell migration rate markedly reduced following treatment with both of 12.5 and 25 $\mu\text{mol/L}$ pterostilbene (all $P < 0.01$). The tube formation assay revealed that the ability of HRMECs to form tubular structures was significantly enhanced under high glucose conditions ($P < 0.01$), and both 12.5 and 25 $\mu\text{mol/L}$ of pterostilbene effectively inhibited this effect (all $P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** Pterostilbene can inhibit HDAC7 expression, suppress EndMT-mediated migration of HRMECs, and impair tube formation under high-glucose conditions.

• **KEYWORDS:** pterostilbene; diabetic retinopathy; human retinal microvascular endothelial cells; endothelial to mesenchymal transition; histone deacetylase 7

Citation: Wang XL, Yang HY, Zhang YM, et al. Inhibitory effect of pterostilbene on high glucose-mediated endothelial-to-mesenchymal transition in human retinal microvascular endothelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2025, 25(3):359-364.

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病常见的微血管并发症, 疾病发展终末期可能致盲。在 DR 的病理进程中, 长期的高血糖状态诱导视网膜血管内皮细胞损伤, 被认为是关键的发病机制之一。这种损伤可能会引起内皮标志物的表达下降, 同时伴随间充质标志物的表达上升, 这一病理过程称为内皮间充质转化 (endothelial to mesenchymal transition, EndMT)^[1]。此外, 组蛋白去乙酰化酶 7 (histone deacetylase 7, HDAC7) 在高糖环境下发挥调节作用, 作为细胞迁移和血管生成的关键分子, 它能够诱导血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达, 影响血管形成^[2]。

紫檀芪 (pterostilbene) 是一种自然存在的多酚类化合物, 属于黄酮类的一种, 因其化学结构与著名的抗氧化物白藜芦醇非常相似而受到广泛研究。以往的研究揭示了

紫檀芪对糖尿病引起的肝肾损伤具有潜在的改善作用^[3-4]。此外, 紫檀芪还能通过激活核因子- κ B 相关因子 2 相关通路减少动脉粥样硬化中人脐静脉内皮细胞的氧化应激、提高细胞的存活率、降低血管炎症^[5]。还有一项研究表明, 紫檀芪可以通过调节乙二醛酶、氧化应激和细胞凋亡来防止生物系统中糖酵解的细胞毒性副产物甲基乙二醛诱导的内皮细胞毒性^[6]。然而, 关于紫檀芪对 DR 中的作用, 尤其是其对视网膜血管内皮细胞的潜在影响的研究, 目前还未有报道。为了深入研究紫檀芪对 DR 中内皮细胞的影响及其作用机制, 我们建立了高糖环境下的人视网膜微血管内皮细胞 (human retinal microvascular endothelial cells, HRMECs) 细胞模型。本研究旨在探讨紫檀芪对高糖状态下 HRMECs 的 EndMT 标志物与 HDAC7 表达的影响, 以及其对细胞迁移和管腔形成能力的作用。这些发现将拓展我们对中药在 DR 辅助治疗中的作用的理, 为制定新的临床治疗策略提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器 ECM 培养基、胎牛血清、青霉素和链霉素均购自美国 ScienCell 公司; CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; HDAC7 (货号: 33418)、ZEB1 (货号: 9782)、Vimentin (货号: 9782)、Snail (货号: 9782)、VE-cadherin (货号: 2500) 抗体购自美国 CST 公司, CD31 (货号: 66065-2-Ig) 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, β -actin (货号: TA-09) 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; BCA 试剂盒和酶标仪购自美国 Thermo 公司; 葡萄糖购自美国 Sigma 公司; 紫檀芪购自美国 Medchemexpress 公司。

1.1.2 细胞培养 将 HRMECs (购自美国 ATCC 公司) 放在含有 5% 胎牛血清 (FBS)、1% 内皮细胞生长补充剂和 1% 青霉素/链霉素溶液的内皮细胞专用培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养。本研究使用了第 3 代和第 8 代之间的细胞。用正常葡萄糖 (5.5 mmol/L) 或高葡萄糖 (30 mmol/L) 处理细胞, 在细胞培养箱中培养 48 h。每天更换培养基以维持细胞活力和持续的高浓度糖刺激。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 法检测细胞活性 取对数生长期的细胞, 用完全培养基调整细胞密度为 5×10^4 cell/mL, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔培养板中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 用不同浓度的紫檀芪 (0、6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$) 处理 48 h 后, 换上完全培养基, 每孔加入 10 μL CCK-8, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 用酶标仪在 450 nm 波长测定吸光度值。每组设置 5 个复孔, 重复 3 次, 根据 IC_{50} 确定模型浓度。

1.2.2 实验分组及干预 将细胞分为四组: 对照组: 未经任何处理的 HRMECs; 高糖组: HRMECs 用 30 mmol/L 高糖处理 48 h; 高糖 + 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪组: HRMECs 用 30 mmol/L 高糖和 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪同时处理 48 h; 高糖 + 25 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪组: HRMECs 用 30 mmol/L 高糖和 25 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪同时处理 48 h。

1.2.3 Western blot 分析 使用 RIPA 蛋白裂解液从细胞中提取总蛋白, 放入 1.5 mL EP 管 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放, 使用 BCA 定量试剂盒配制 BCA 溶液 (A 液: B 液 = 50:1), 将配制好的 BCA 液均匀加入 96 孔板中 (200 微升/孔), 再依次加入用去离子水稀释 (1:9) 的蛋白样品 (10 微升/孔), 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温

金属浴 30 min 后用酶标仪读取吸光度值,计算后,向装有蛋白样品的 1.5 mL EP 管中加入相应体积的 SDS 上样缓冲液,使各样品浓度一致,安装防爆夹,沸水煮蛋白样品 8 min,离心后上样,用 10% SDS-PAGE 分离蛋白质,然后电转印到 PVDF 膜上。用含有 5% 牛奶蛋白的 TBST 封闭膜 2 h。4 °C 下孵育相对应的一抗过夜。TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,再使用相应的辣根过氧化物酶标记的二抗室温下孵育 2 h,TBST 漂洗 3 次,每次 10 min。配置化学发光显色液,ChemiDoc XRS 系统(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)检测靶蛋白的表达。以 β -actin 为内参,使用 Image J 软件对蛋白质印迹结果进行定量分析。

1.2.4 划痕实验 按照前述分组处理细胞,准备细胞悬液,调整悬液浓度为 3×10^5 个/毫升,将易比迪划痕插件逐个黏贴在 24 孔板正中位置,向划痕插件两侧各加入 70 μ L 的细胞悬液,37 °C 培养箱中培养 24 h 后用无菌镊子轻轻取出插件,之后加入 1 mL 培养基培养,分别在 0、24 h 于倒置显微镜下观察并拍照划痕变化情况。

1.2.5 Transwell 实验 按照前述分组处理细胞,用无血清培养基重悬细胞,将 100 μ L 细胞悬液接种于 Transwell 小室的上室(2×10^4 个/孔),下室加入 600 μ L 完全培养基,培养箱中培养 24 h 后,将小室置于 4% 多聚甲醛中固定 15 min,然后用结晶紫染色 30 min,PBS 清洗 3 次后在倒置显微镜下随机取 5 个视野拍照并计数。

1.2.6 管腔形成实验 按照前述分组处理细胞,将 ABW 基质胶(Matrigel,082704)铺于 48 孔板的底部,并在其上接种 HRMECs。6 h 后,在倒置显微镜下观察毛细管状结构并拍照。使用 Image J 软件分析毛细管状结构的网格、分支和分支长度。

统计学分析:使用 SPSS27.0 统计处理软件进行数据分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,进一步的两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 实验筛选紫檀芪处理 HRMECs 的适宜浓度

我们用不同浓度梯度(0、6.25、12.5、25、50、100、200 μ mol/L)的紫檀芪处理 HRMECs,用 CCK-8 实验检测细胞活性,结果为紫檀芪在 HRMECs 细胞内的 $IC_{50} = 22.07 \mu$ mol/L(图 1),

我们希望选取既能发挥生物学效应,又能避免过高浓度可能引起的细胞毒性作用的合理浓度,选择较低于和接近 IC_{50} 的浓度,可以观察到紫檀芪在不同浓度下对细胞的影响,从而获得更全面的剂量-反应关系,故选择 12.5 μ mol/L 和 25 μ mol/L 两种浓度进行进一步研究。

2.2 紫檀芪抑制高糖介导的 HRMECs 细胞迁移能力增强

Transwell 实验显示,对照组迁移的细胞数目显著低于高糖组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与高糖组相比,高糖+12.5 μ mol/L 紫檀芪组和高糖+25 μ mol/L 紫檀芪组迁移的细胞数目均显著降低,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。值得注意的是,与高糖+12.5 μ mol/L 紫檀芪组相比,高糖+25 μ mol/L 紫檀芪组迁移的细胞数目明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。划痕实验显示,对照组的细胞迁移率显著低于高糖组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与高糖组相比,12.5 μ mol/L 紫檀芪对细胞迁移率并无降低作用,差异无统计学意义($P > 0.05$),而 25 μ mol/L 紫檀芪处理的细胞迁移则受到明显抑制,差异有统计学意义($P < 0.01$)。同时,25 μ mol/L 紫檀芪组也比 12.5 μ mol/L 紫檀芪处理组展现了更强的细胞迁移抑制能力,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。综上所述,紫檀芪能有效抑制高糖条件下 HRMECs 的迁移,并且在 25 μ mol/L 浓度时,其抑制作用优于 12.5 μ mol/L,表明紫檀芪抑制高糖诱导的 HRMECs 细胞迁移作用具有浓度依赖性。

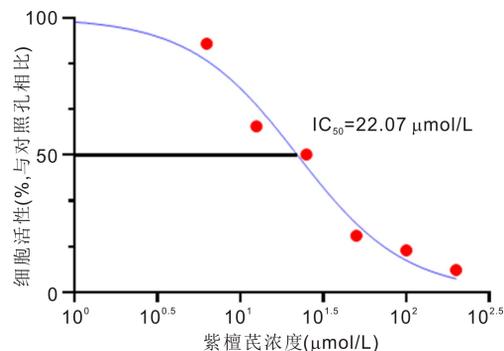


图 1 CCK-8 检测紫檀芪毒性筛选适宜浓度 利用 CCK-8 实验测定了不同浓度(0、6.25、12.5、25、50、100、200 μ mol/L)的紫檀芪处理后 HRMECs 的细胞活力,计算得出 $IC_{50} = 22.07 \mu$ mol/L。

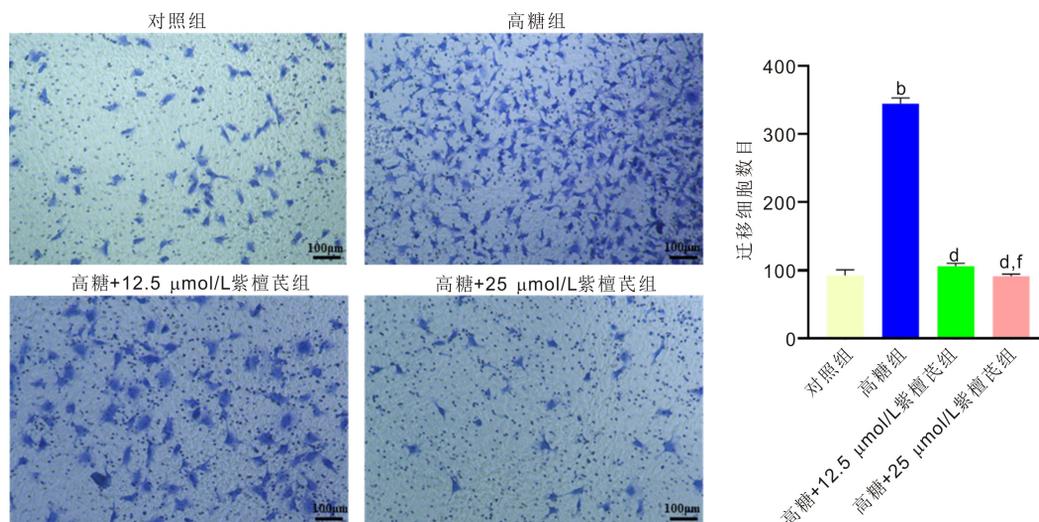


图 2 Traswell 实验检测紫檀芪对 HRMECs 迁移能力的影响 用高糖和不同浓度的紫檀芪处理 HRMECs,Transwell 实验观察穿过小室的细胞数目来检测细胞迁移能力。^b $P < 0.01$ vs 对照组;^d $P < 0.01$ vs 高糖组;^f $P < 0.01$ vs 高糖+12.5 μ mol/L 紫檀芪组。

2.3 紫檀芪抑制高糖介导的 HRMECs 细胞管腔形成能力增强 管腔形成实验显示,与对照组相比,高糖组的 HRMECs 在基质胶上展现了更强的管腔形成能力,差异有统计学意义($P<0.01$)。与高糖组相比,加入 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪和 25 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪后细胞成管数目均显著降低,差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。另外,加入 25 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪比加入 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪的细胞成管数目更低,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 4。以上实验结果说明紫檀芪对高糖条件下的 HRMECs 管腔形成具有剂量依赖性的抑制作用。

2.4 紫檀芪通过抑制 HDAC7 的表达减弱了高糖介导的 HRMECs 中 EndMT 标志物的表达异常 Western blot 实验观察 HDAC7 及其下游 EndMT 标志物的表达变化,结果显示:相较于对照组,高糖组中的 HDAC7、ZEB1、Vimentin 和 Snail 的蛋白表达量显著增加,而 VE-cadherin 和 CD31 的蛋白表达量显著降低,差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。在高糖基础上加入 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪后,HDAC7、ZEB1、Vimentin 和 Snail 的蛋白表达量较高糖组有所降低,差异有统计学意义(均 $P<0.01$),而 VE-cadherin 和 CD31 的蛋白表达量较高糖组有所增加,差异有统计学意义(均 $P<0.05$),但仍低于对照组。与高糖组相比,在高糖基础上加入 25 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪后 HDAC7、ZEB1、Vimentin 和 Snail 的

蛋白表达量显著降低,差异有统计学意义(均 $P<0.01$),且 HDAC7 和 ZEB1 表达较高糖+12.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪组明显降低,差异有统计学意义(均 $P<0.01$),而 VE-cadherin 和 CD31 的蛋白表达量较高糖组和高糖+12.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪组均显著增加,差异有统计学意义(均 $P<0.01$),见图 5,表 1。以上结果显示,紫檀芪可以抑制高糖诱导的 HRMECs 细胞内 HDAC7 的表达,并影响下游 EndMT 标志物的表达,增加内皮细胞标志物的表达,具有一定的内皮保护作用。

3 讨论

在人体中,眼睛的耗氧量是其他组织的 8 倍,DR 长期的高血糖环境中,视网膜比其他组织更容易发生氧化应激。而过量的活性氧能够激活各种信号通路,促使 EndMT 的发生,从而造成内皮功能失调^[7],这种失调是 DR 和失明进展的主要因素之一^[8]。紫檀芪是一种天然存在的有机化合物,其与白藜芦醇结构相似。区别在于,紫檀芪有一个额外的甲基,使其获得了更好的生物利用度和稳定性^[9]。因此,紫檀芪也展现了更为出色的抗炎和抗氧化应激的效应^[10]。目前,抗 VEGF 药物被认为是 DR 的治疗首选,但有一部分患者由于内皮细胞突变和血管重塑等原因对其产生耐药^[11]。有学者发现在抗 VEGF 药物的基础上联合中医中药治疗能够减少抗 VEGF 药物的注射

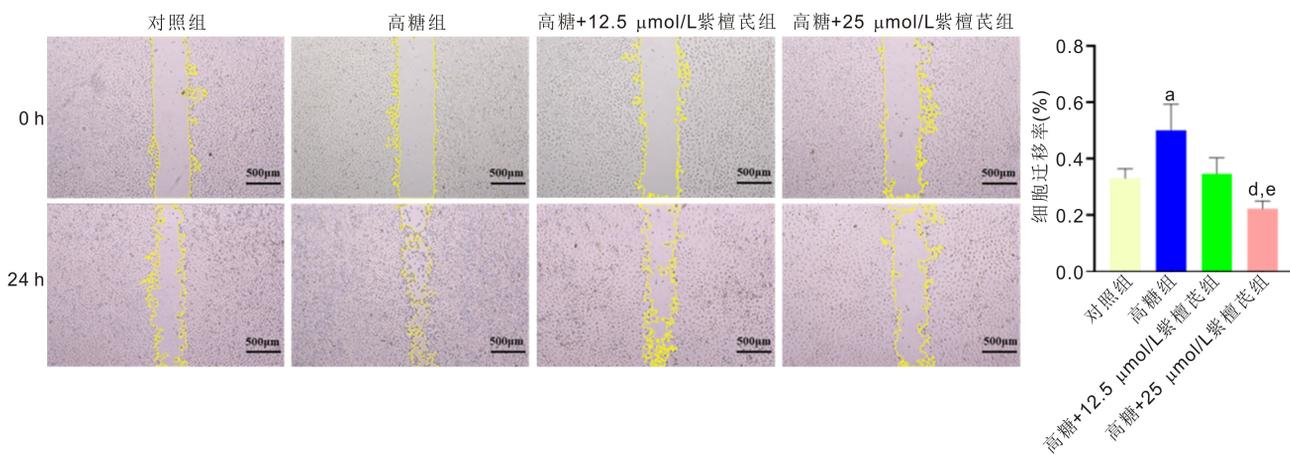


图 3 划痕实验检测紫檀芪对 HRMECs 迁移能力的影响 用高糖和不同浓度的紫檀芪处理 HRMECs,划痕实验观察细胞划痕愈合情况。细胞迁移率=0 h 时划痕面积/24 h 时划痕面积。^a $P<0.05$ vs 对照组;^d $P<0.01$ vs 高糖组;^e $P<0.05$ vs 高糖+12.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪组。

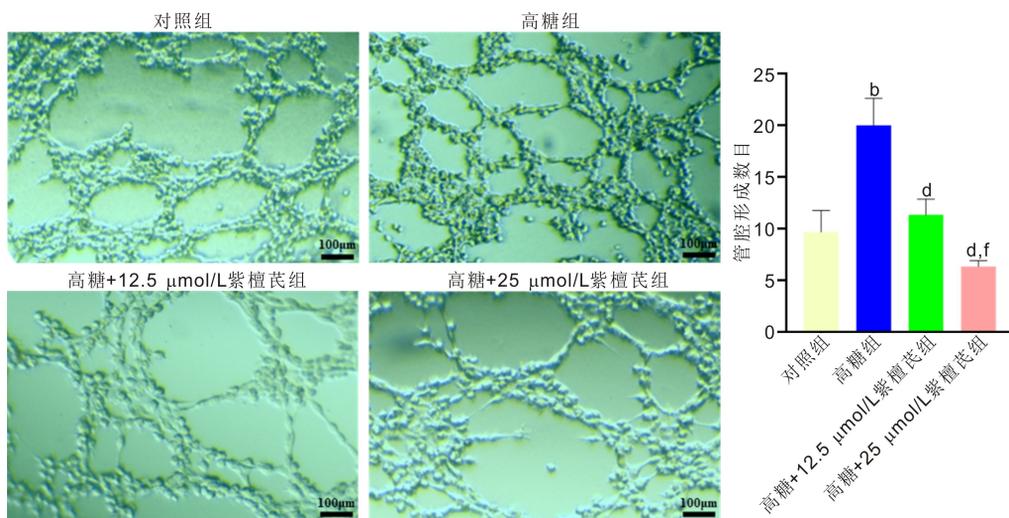


图 4 管腔形成实验检测紫檀芪对 HRMECs 成管能力的影响 用高糖和不同浓度的紫檀芪处理 HRMECs,管腔形成实验观察细胞成管数目。^b $P<0.01$ vs 对照组;^d $P<0.01$ vs 高糖组;^f $P<0.01$ vs 高糖+12.5 $\mu\text{mol/L}$ 紫檀芪组。

表 1 各组处理对 HRMECs 中 HDAC7、ZEB1、Vimentin、Snail、VE-cadherin、CD31 蛋白表达的影响 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

| 组别 | HDAC7 | ZEB1 | Vimentin | Snail | VE-cadherin | CD31 |
|---------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 对照组 | 0.146±0.010 | 0.373±0.017 | 0.728±0.046 | 0.383±0.017 | 0.893±0.036 | 0.921±0.030 |
| 高糖组 | 0.440±0.005 ^b | 0.832±0.023 ^b | 1.503±0.117 ^b | 0.979±0.041 ^b | 0.575±0.027 ^b | 0.617±0.034 ^b |
| 高糖+12.5 μmol/L 紫檀芪组 | 0.311±0.007 ^d | 0.515±0.025 ^d | 0.666±0.101 ^d | 0.309±0.026 ^d | 0.656±0.088 ^c | 0.678±0.021 ^c |
| 高糖+25 μmol/L 紫檀芪组 | 0.141±0.008 ^{d,f} | 0.404±0.011 ^{d,f} | 0.475±0.086 ^d | 0.061±0.095 ^{d,e} | 1.043±0.090 ^{d,f} | 0.958±0.025 ^{d,f} |
| F | 1067.205 | 332.355 | 73.464 | 156.733 | 31.016 | 111.699 |
| P | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

注:^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 高糖组; ^eP<0.05, ^fP<0.01 vs 高糖+12.5 μmol/L 紫檀芪组。

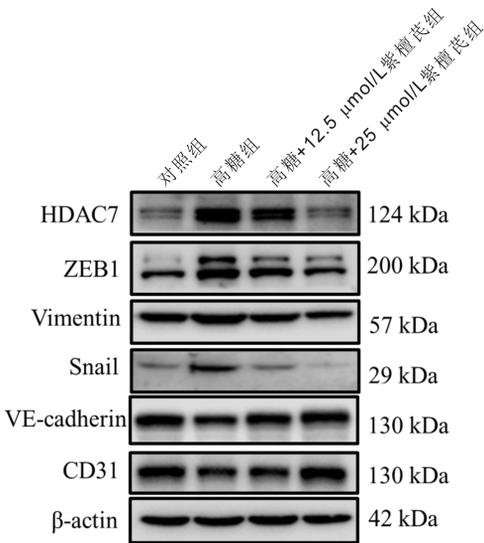


图 5 紫檀芪对 HRMECs 细胞内 HDAC7 以及下游 EndMT 标志物表达的影响 用高糖和不同浓度的紫檀芪同时处理 HRMECs 观察 HDAC7、ZEB1、Vimentin、Snail、VE-cadherin、CD31、β-actin 的表达情况。

次数,取得更好的疗效^[12]。因此,本文探索紫檀芪对 HRMECs 中高糖介导的 EndMT 的抑制作用,这对于进一步拓宽 DR 的治疗手段具有重要的科研价值。

HDAC7 已被发现在内皮通透性和 EndMT 中起着调控作用^[13],研究指出 HDAC7 能促进 HRMECs 的细胞迁移与管腔形成^[2],进一步研究发现,HDAC7 在高糖和 TGF-β 处理的 HRMECs 中通过 HDAC7/FOXO1/ZEB1 轴诱导细胞的 EndMT,进而影响细胞的增殖、迁移和管腔形成功能^[14]。此外,在动脉粥样硬化的小鼠模型中,HDAC7-AS1 探针染色与内皮细胞标志物 CD31 共定位,提示了 HDAC7 和 CD31 在动脉粥样硬化中的潜在关联^[15]。本研究结果显示,在高糖环境中,HRMECs 中 HDAC7 的表达升高,与此同时内皮细胞标志物 VE-cadherin 和 CD31 的表达降低,这伴随着细胞迁移能力的增强和管腔结构形成的促进。给予紫檀芪处理能够抑制 HDAC7 的表达,增加内皮标志物的表达,并且减弱细胞迁移和管状结构的形成。紫檀芪对 HDAC7 的表达和 EndMT 相关表型以及蛋白质标志物表达都分别有抑制效应,其具体是否存在上下游关系还需要进一步设计联合干预实验以及回复实验来探究。另外,紫檀芪对 HDAC7 的表达的具体调控机制也是一个值得探究的问题,紫檀芪已经被证明能够激活核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 通路起到抗氧化作用^[16],核因子 E2 相关因子 2 同时也是一个重要的转录因子,可能从转录层面参与调控 HDAC7 的表达。已经有研究表明紫

紫檀芪可以调节人内皮细胞中核因子-E2 相关因子 2 相关通路的表观遗传修饰,其中包括 HDAC1/2/3/4 的 mRNA 水平^[17],紫檀芪也可能通过调控细胞内的信号传导途径或者调控某些酶的活性来影响 HDAC7 的表达。总之,紫檀芪调控 HDAC7 的机制可能是多方面的,涉及氧化应激、抗炎反应、表观遗传学修饰、转录因子激活等多个途径。进一步的实验研究将有助于揭示其具体的分子机制。

近年来对 DR 中的内皮功能障碍的研究很多,氧化应激、糖基化终末产物、microRNA 等病理因素均可引起内皮受损引起的视网膜功能失常^[18]。本文所研究的 EndMT 与该过程密切相关,EndMT 是由内皮细胞表现出间质细胞特征的过程,这一过程包括内皮细胞标志物的下调,它们是形成细胞间连接并维持内皮层完整性的关键组分^[19-21]。这一过程涉及多个关键的分子标记,包括细胞黏附分子 VE-cadherin 和 CD31 以及转录因子如 ZEB1 和 Snail。在此研究中,我们观察到 ZEB1、Vimentin 和 Snail 的蛋白水平在高糖条件下显著上调,这有助于内皮细胞表型向间质细胞转变。这些转录因子的激活预示着细胞表型的改变,包括细胞迁移能力的增强。此外,我们发现内皮细胞特有的标志物 VE-cadherin 和 CD31 的表达下降,这进一步证实了 EndMT 过程的存在。细胞骨架蛋白 Vimentin,常与间质相关的细胞表型有关^[20],在 EndMT 过程中表达上升,标志着细胞结构和功能发生根本性变化。本研究结果显示,高糖环境增强了这些 EndMT 相关蛋白的表达,进而推动如迁移、管腔形成等细胞表型的改变。这些结果表明,高血糖状况可能通过激活 EndMT 通路,促进糖尿病相关的微血管改变。紫檀芪的应用,能够部分逆转高糖环境引起的这些效应,尤其是在 ZEB1、Vimentin 和 Snail 的表达上调、VE-cadherin 和 CD31 表达下调以及细胞迁移和成管受到抑制。这显示紫檀芪具有潜在的抑制高糖介导的 EndMT 作用,为包括 DR 在内的糖尿病血管并发症的潜在治疗提供了新的理论依据。过去对紫檀芪作用于内皮细胞的作用机制的研究集中在凋亡、抗氧化和抗炎等方面^[5-6],而紫檀芪对 HRMECs 的 EndMT 的调控作用尚未被充分研究。而本文将紫檀芪与 EndMT 的关系纳入研究,提供了一种新策略,有望用于调节糖尿病环境下内皮细胞中 EndMT 的影响,减缓疾病进程。

以往已经有双药联合在玻璃体腔注药治疗中取得了不错的疗效,例如血栓通离子导入联合康柏西普玻璃体腔注射能有效改善视网膜静脉阻塞患者的黄斑水肿,提高视力^[12]。考虑到紫檀芪对抗 EndMT 的治疗潜力,和其在减轻和逆转高糖环境导致的 HRMECs 细胞表型改变方面的作用,其有望联合已经十分成熟的抗 VEGF 药物为 DR 患

者提供一种更加全面而有效的治疗方案。虽然紫檀芪在DR中抑制HRMECs的EndMT过程非常具有前瞻性,但本研究大多集中在体外实验,缺乏体内验证,导致其生理意义和实际应用的可靠性尚不明确。其次,EndMT过程复杂,紫檀芪的具体作用机制,如通过哪些信号通路调控,仍需深入探讨。再者,关于紫檀芪的最佳剂量、时效性及与其他药物的相互作用等方面的研究不够充分。虽然紫檀芪被认为是安全的天然物质,但其长期使用的副作用和毒性问题仍缺乏足够的证据支持,且机制的普适性是否适用于DR发病机制中眼内的其他相关细胞还需进一步验证。

综上所述,紫檀芪可以改善高糖介导的HRMECs中EndMT的改变,下调HDAC7的表达,进而抑制了细胞迁移和管腔形成,为DR提供了新的治疗策略。

利益冲突声明: 本文不存在利益冲突。

作者贡献声明: 汪小兰、杨瀚毅、韩静论文选题与修改,实验操作,初稿撰写;张益萌、刘思达、谢婷珂、陈奕玄、宁佳怡文献检索,数据分析;陈城明、韩静选题指导,数据分析,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

[1] Cao YN, Feng B, Chen SL, et al. Mechanisms of endothelial to mesenchymal transition in the retina in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014,55(11):7321-7331.

[2] Ning JY, Yang HY, Xie TK, et al. Down-regulation of histone deacetylase 7 reduces biological activities of retinal microvascular endothelial cells under high glucose condition and related mechanism. *Int J Ophthalmol*, 2023,16(8):1210-1217.

[3] 陈柳, 杨坤, 郭昆全. 紫檀芪减轻人肾小管上皮细胞高糖缺氧复氧损伤及其作用机制的研究. *中国糖尿病杂志*, 2020,28(3):216-221.

[4] 张玉晶, 孙华磊, 刘欣欣, 等. 紫檀芪对2型糖尿病大鼠肝损伤的作用. *郑州大学学报(医学版)*, 2020,55(3):360-364.

[5] Zhang Q, Liu J, Duan H, et al. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: an important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress. *J Adv Res*, 2021,34:43-63.

[6] Tang D, Xiao W, Gu WT, et al. Pterostilbene prevents methylglyoxal-induced cytotoxicity in endothelial cells by regulating glyoxalase, oxidative stress and apoptosis. *Food Chem Toxicol*, 2021,153:112244.

[7] Giordo R, Nasrallah GK, Posadino AM, et al. Resveratrol-elicited PKC inhibition counteracts NOX-mediated endothelial to mesenchymal

transition in human retinal endothelial cells exposed to high glucose. *Antioxidants (Basel)*, 2021,10(2):224.

[8] Nentwich MM, Ulbig MW. Diabetic retinopathy - ocular complications of diabetes mellitus. *World J Diabetes*, 2015,6(3):489-499.

[9] Estrela JM, Ortega A, Mena S, et al. Pterostilbene: biomedical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2013,50(3):65-78.

[10] Liu HX, Wu X, Luo JN, et al. Pterostilbene attenuates astrocytic inflammation and neuronal oxidative injury after ischemia-reperfusion by inhibiting NF- κ B phosphorylation. *Front Immunol*, 2019,10:2408.

[11] Abdullah SE, Perez-Soler R. Mechanisms of resistance to vascular endothelial growth factor blockade. *Cancer*, 2012,118(14):3455-3467.

[12] 董雯佳, 游志鹏, 余晓, 等. 红花黄色素注射液联合抗 VEGF 药物治疗非缺血性视网膜中央静脉阻塞. *国际眼科杂志*, 2023,23(12):1954-1960.

[13] Shen ZX, Bei Y, Lin HR, et al. The role of class IIa histone deacetylases in regulating endothelial function. *Front Physiol*, 2023,14:1091794.

[14] Ning JY, Pan MH, Yang HY, et al. Melatonin attenuates diabetic retinopathy by regulating EndMT of retinal vascular endothelial cells via inhibiting the HDAC7/FOXO1/ZEB1 axis. *J Pineal Res*, 2024,76(6):e13008.

[15] Yang BW, Ye ZS, Wang YW, et al. Evaluation of early biomarkers of atherosclerosis associated with polychlorinated biphenyl exposure: an *in vitro* and *in vivo* study. *Environ Health Perspect*, 2022,130(3):37011.

[16] Shen B, Wang Y, Cheng J, et al. Pterostilbene alleviated NAFLD via AMPK/mTOR signaling pathways and autophagy by promoting Nrf2. *Phytomedicine*, 2023,109:154561.

[17] Harithpriya K, Ganesan K, Ramkumar KM. Pterostilbene reverses epigenetic silencing of Nrf2 and enhances antioxidant response in endothelial cells in hyperglycemic microenvironment. *Nutrients*, 2024,16(13):2045.

[18] 蔡晖, 宋颖, 石华宗, 等. miR-519d-3p 靶向 HIF-1 α 抑制高糖诱导的人视网膜微血管内皮细胞功能障碍及血管生成. *国际眼科杂志*, 2023,23(7):1087-1092.

[19] Xu L, Fu MX, Chen DR, et al. Endothelial-specific deletion of Ets-1 attenuates AngiotensinII-induced cardiac fibrosis via suppression of endothelial-to-mesenchymal transition. *BMB Rep*, 2019,52(10):595-600.

[20] Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Endothelial to mesenchymal transition: role in physiology and in the pathogenesis of human diseases. *Physiol Rev*, 2019,99(2):1281-1324.

[21] Shu DY, Butcher E, Saint-Geniez M. EMT and EndMT: emerging roles in age-related macular degeneration. *Int J Mol Sci*, 2020,21(12):E4271.