

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.22.004

前列腺素 E2 及其受体在链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠视网膜病变中的作用及机制研究*

车选义¹ 杨燕² 石蕊¹ 李春花³ 杨文³ 张倩^{3Δ}

(1 陕西省人民医院 西安医学院附属医院眼科 陕西 西安 710068; 2 陕西省人民医院手术室 陕西 西安 710068;

3 西安市第四医院眼科 陕西 西安 710004)

摘要 目的:探究前列腺素 E2(prostaglandin E2, PGE2)及其受体前列腺素 E2 受体(E-prostanoid2 receptor, EP2R)在链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠视网膜病变中的作用及机制。**方法:**将 SD 大鼠随机分为 6 组:对照组使用标准饲料喂养;其他组大鼠使用高脂高糖饲料喂养+腹腔内注射链脲佐菌素(30 mg/kg)建立糖尿病大鼠模型;PGE2 组、Butaprost 组、AH6809 组大鼠分别给予玻璃体腔内注射 5 mmol/L 的 PGE2、EP2R 激动剂 Butaprost 或 EP2R 抑制剂 AH6809,注射剂量为 6 μL。DMSO 组注射等剂量 DMSO 盐溶液。每周注射 1 次,共注射 4 周。通过苏木精伊红(HE)染色评价视网膜病变;免疫组化或蛋白质印迹分析视网膜组织中 EP2R、胰岛素受体底物 1 (IRS-1)、磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)、p-PI3K、蛋白激酶 B (Akt)、p-Akt、细胞间粘附分子 -1 (ICAM-1)、内皮一氧化氮合酶(eNOS)、核因子 κB p65 (NF-κB p65)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达。此外,分别应用 PGE2、Butaprost 或 AH6809 处理高糖培养基(4.5 g/L 葡萄糖)培养的视网膜微血管内皮细胞系(HRMEC),并检测各组细胞活力、细胞凋亡率和血管生成情况。**结果:**与正常视网膜组织相比,糖尿病大鼠视网膜组织中 EP2R 呈显著高表达($P<0.05$)。与对照组和模型组相比,PGE2 和 Butaprost 组的 EP2R、IRS-1、p-PI3K、p-Akt、ICAM-1、eNOS、NF-κBp65 和 VEGF 的表达水平显著升高,而 AH6809 组的上述蛋白的表达水平显著降低($P<0.05$)。体外研究中,与对照组和模型组 HRMEC 相比,PGE2 和 Butaprost 处理的 HRMEC 的活力和血管生成数量显著升高,而细胞凋亡率显著降低,AH6809 处理则抑制了上述细胞改变($P<0.05$)。**结论:**PGE2/EP2R 可能通过促进 IRS-1/PI3K/Akt 信号通路介导的炎症反应、细胞凋亡和血管生成促进糖尿病视网膜病变的发生和发展。

关键词:糖尿病性视网膜病变;前列腺素 E2;前列腺素 E2 受体;视网膜微血管内皮细胞;IRS-1/PI3K/Akt 信号通路

中图分类号:R-33;R774.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)22-4218-07

Role and Mechanism of Prostaglandin E2 and Its Receptor in the Retinopathy in Diabetic Rats Induced by Streptozotocin*

CHE Xuan-yi¹, YANG Yan², SHI Rui¹, LI Chun-hua³, YANG Wen³, ZHANG Qian^{3Δ}

(1 Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710068, China; 2 Operating Room, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;

3 Department of Ophthalmology, Xi'an Fourth Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710004, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role and mechanism of prostaglandin E2 (PGE2) and its receptor E-prostanoid2 receptor (EP2R) in retinopathy induced by streptozotocin in diabetic rats. **Methods:** SD rats were randomly divided into 6 groups: the control group was fed with standard feed; the other groups were fed with high-fat and high-sugar feed + intraperitoneal injection of streptozotocin (30 mg/kg) to establish a diabetic rat model. The rats in PGE2 group, Butaprost group, and AH6809 group were injected intravitreally with 5 mmol/L of PGE2, EP2R agonist Butaprost or EP2R inhibitor AH6809, with a volume of 6 μL. The DMSO group was injected with an equal volume of DMSO salt solution. Inject once a week for 4 weeks. Retinopathy was evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining. The expression of EP2R, Insulin receptor substrate-1 (IRS-1), Phosphoinositide 3-kinase (PI3K), p-PI3K, Protein kinase B (Akt), p-Akt, Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), Endothelial nitric oxide synthase (eNOS), Nuclear factor kappa-B p65 (NF-κB p65), Vascular endothelial growth factor (VEGF) in retinal tissues was assessed by immunohistochemical or western blot analysis. In addition, PGE2, Butaprost or AH6809 were used to treat the retinal microvascular endothelial cell line (HRMEC) cultured in high glucose medium (4.5g/L glucose), and the cell viability, apoptosis rate and angiogenesis were detected. **Results:** Compared with normal retinal tissue, EP2R was abnormally highly expressed in retinal tissue of diabetic rats ($P<0.05$). Compared with the control group and the model group, the expression levels of EP2R, IRS-1, p-PI3K, p-Akt, ICAM-1, eNOS and NF-κBp65 in PGE2 and butaprost groups were significantly higher, while those in ah6809 group were significantly lower ($P<0.05$). In vitro studies, compared with the control group and

* 基金项目:陕西省重点研发计划项目(2017SF-249)

作者简介:车选义(1972-),男,硕士,副主任医师,主要研究方向:白内障和眼底病等眼科疾病,E-mail:Xiuhua_M@126.com,电话:18629304989

Δ 通讯作者:张倩(1977-),女,硕士研究生,副主任医师,主要研究方向:白内障和青光眼方面眼科疾病,E-mail:donggulongdong@163.com

(收稿日期:2020-04-28 接受日期:2020-05-23)

model group HRMEC, the activity and number of angiogenesis of PGE2 and Butaprost-treated HRMEC were significantly increased, while the apoptosis rate was significantly reduced. AH6809 treatment inhibited the above cell behavior ($P < 0.05$). **Conclusions:** Inhibition of PGE2/EP2R can reduce retinopathy by inhibiting the inflammatory response and angiogenesis mediated by the IRS-1/PI3K/Akt signaling pathway. Inhibition of PGE2/EP2R signaling pathway can inhibit the abnormal proliferation and angiogenesis of HRMEC and promote apoptosis.

Key words: Diabetic retinopathy; Prostaglandin E2; E-prostanoid2 receptor; Retinal microvascular endothelial cells; IRS-1/PI3K/Akt signaling pathway

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R774.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)22-4218-07

前言

糖尿病性视网膜病变(Diabetic retinopathy, DR)约占糖尿病人群的三分之一,是24至70岁成年人失明的主要原因,然而其分子机制尚未完全揭示^[1,2]。视网膜微血管内皮细胞(Retinal microvascular endothelial cells, RMEC)功能障碍和血管功能障碍是糖尿病性视网膜病变的早期临床症状^[3]。前列腺素E2(Prostaglandin E2, PGE2)是介导炎症及损伤、肿瘤生长及转移的炎症介质,是PGE2是环加氧酶2(Cyclooxygenase-2, COX2)的主要代谢产物,通过刺激细胞膜表面的PGE2受体1-4(PGE2 receptors 1-4, EP1-4Rs)激活多种信号转导途径^[4]。近年来,多项研究显示PGE2在糖尿病动物视网膜组织中呈高表达,并且与病变程度显著正相关^[5]。此外,前列腺素抑制剂可以预防或延迟视网膜病变的进展^[6]。PGE2主要通过靶向调控EP2R来参与糖尿病性视网膜病变的发生发展,外源性使用PGE2可通过激活EP2R进一步加重视网膜损伤^[7]。然而,PGE2在糖尿病视网膜病变中的确切分子机制仍需进一步探讨。

RMEC中的慢性炎症可导致血管通透性增加、内皮细胞凋亡和血管生成障碍^[8]。既往研究显示胰岛素信号转导相关蛋白的异常与糖尿病性视网膜病变发生发展密切相关,包括胰岛素受体底物1(Insulin receptor substrate-1, IRS-1)和磷酸肌醇3激酶(Phosphoinositide 3-kinase, PI3K)^[9]。IRS-1/PI3K/蛋白激酶B(Akt)及其下游信号传导分子可诱导血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)的转录和表达,从而刺激视网膜新血管形成^[10]。此外,细胞间粘附分子-1(Intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、内皮一氧化氮合酶(Endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和核因子 κ B(Nuclear factor kappa-B, NF- κ B)也是IRS-1/PI3K/Akt信号通路的下游分子。PI3K/Akt信号通路的异常可能导致视网膜色素上皮细胞的病理改变^[11]。然而,目前尚不清楚IRS-1/PI3K/Akt信号通路在糖尿病性视网膜病变中的病理学作用以及该信号通路是否介导PGE2对糖尿病性视网膜病变的影响。因此,本研究主要探讨了PGE2在链脲佐菌素诱导的糖尿病性视网膜病变大鼠中的作用及机制。

1 材料与方 法

1.1 材料

高糖(4.5 g/L)的DMEM培养基、低糖(1.0 g/L)的DMEM培养基和胰蛋白酶购自江苏凯基生物技术股份有限公司。胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司;MTT试剂盒、二甲基亚砜(DMSO)和链脲佐菌素(STZ)购自美国Sigma公司。H&E染色试剂

盒、RIPA细胞裂解液、BCA蛋白定量试剂盒购自碧云天生物科技有限公司;PVDF膜购自美国Millipore公司;牛血清蛋白(BSA)购自美国Biosharp公司;脱脂奶粉购自美国BD公司;TUNEL检测试剂盒购自德国Roche公司;PGE2、Butaprost、AH6809购自美国R&D Systems公司;IRS-1、PI3K、p-PI3K、p-Akt、Akt、ICAM-1、eNOS、NF- κ Bp65、VEGF和GAPDH一抗购自美国Cell Signaling Technology公司;HRP标记的IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司;增强化学发光(ECL)溶液购自美国Pierce公司;膜联蛋白-V(Annexin-V)-异硫氰酸荧光素(FITC)凋亡测定试剂盒购自艾美捷科技有限公司;Matrigel基质胶购自北京索莱宝科技有限公司。人视网膜微血管内皮细胞系(HRMEC)购自爱必信(上海)生物科技有限公司。雄性Sprague Dawley大鼠(180-200 g)由陕西省人民医院动物实验中心[SYXK(陕)2016-006]提供,所有动物实验均符合科研实验动物的使用和护理指南。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及处理 所有大鼠均在25℃的温度和55%的相对湿度环境下饲养,给予蒸馏水及对应的大鼠饲料喂养。将大鼠随机分为对照组、模型组、DMSO组、PGE2组、EP2R选择性激动剂Butaprost组和EP2R选择性抑制剂AH6809组,每组10只。对照组的大鼠给予标准大鼠饲料喂养。其他组大鼠给予高脂高糖饲料(由5%的猪油、10%的蔗糖、1%的胆固醇、0.2%的胆酸盐、10%的蛋黄粉和68.8%的标准大鼠饲料组成)喂养,持续喂养1个月。然后对除对照组以外的大鼠一次腹腔内注射链脲佐菌素(STZ, 30 mg/kg,溶于0.1 mol/L柠檬酸盐缓冲液[pH=4.5])。注射7天后,大鼠空腹血糖水平 >16.7 mmol/L,表明糖尿病模型成功建立^[12]。对照组大鼠正常饲养,其他组大鼠按照分组不同分别给予玻璃体腔内注射5 mmol/l的PGE2(PGE2组)、Butaprost(Butaprost组)、AH6809(AH6809组)和DMSO盐溶液(DMSO组),剂量为6 μ L,每周注射1次,共注射4周。

1.2.2 苏木精伊红(HE)染色 给药完成后,摘除大鼠眼睛,并在4%多聚甲醛中固定24 h。分离视网膜组织用梯度乙醇脱水并包埋在石蜡中,然后切取5 μ m厚的切片,用HE染色试剂进行染色,脱水,透明,固定,并在Olympus BX-51光学显微镜下观察。

1.2.3 免疫组化 将视网膜切片在60℃的烘箱中干燥1 h,用二甲苯脱蜡,用梯度乙醇脱水,然后在0.3% H₂O₂的甲醇中孵育以阻断内源性过氧化物酶。将切片在高压锅中修复以修复抗原15 min,并在冷却至室温后用含磷酸盐的生理盐水(PBS)冲

洗。然后,将切片用 5%牛血清白蛋白(BSA)在 37℃下封闭 30 min,分别于一抗 VEGF(1:500)在 4℃下过夜孵育。随后,将切片与生物素标记的二抗(1:100)在 37℃孵育 30 min。然后,将切片用过氧化链霉亲和素溶液在 37℃下培养 30 min。之后,在室温下用 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显影。然后将切片用苏木精复染 5 min,在 1%盐酸酒精中浸泡 5 s,在自来水中返蓝 20 min。PBS 代替一抗作为阴性对照。在光学显微镜下随机选择 10 个视野用 100 倍放大倍数对 100 个细胞进行计数。细胞核或细胞质中有褐色或棕褐色颗粒被视为阳性细胞。阳性表达率=(阳性细胞数/细胞总数)×100%。

1.2.4 蛋白质印迹分析 使用 1 mL RIPA 裂解液裂解视网膜组织,然后在 4℃下以 20000×g 离心 20 min,收集上清液。使用二辛可宁酸(BCA)蛋白质测定试剂盒对蛋白质进行定量。将蛋白质用 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)分离,并转移到硝酸纤维素膜上。然后在室温下用含 5%脱脂奶粉的 PBS 封闭膜 1 h,并与抗 EP2R(1:200)、IRS-1(1:500)、PI3K(1:500)、p-PI3K(1:500)、p-Akt(1:300)、Akt(1:300)、ICAM-1(1:1000)、eNOS(1:500)、NF-κBp65(1:1000)、VEGF(1:500)和 GAPDH(1:1000)一抗在 4℃下孵育过夜。接下来,将膜与辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)的二抗(1:1000)室温孵育 1 h。将膜在增强化学发光(ECL)溶液中浸泡 1 min。使用 Image J 软件确定每个蛋白条带的灰度值,GAPDH 用作内部对照。目标条带与 GAPDH 的灰度值之比代表蛋白相对表达量。

1.2.5 细胞培养 人视网膜微血管内皮细胞系(HRMEC)在含有 1.0 g/L 葡萄糖的 DMEM 培养基中培养,该培养基含有 80 U/mL 的青霉素和 0.08 mg/mL 的链霉素。然后将细胞在 37℃的 5% CO₂ 培养箱中培养。90%融合后,将细胞用 0.25%胰蛋白酶和 0.02% EDTA 混合液消化以进行传代。

1.2.6 细胞处理 在含有 4.5 g/L 葡萄糖的 DMEM 培养基中培养细胞并作为模型组^[3],将细胞在含有 1.0 g/L 葡萄糖的 DMEM 培养基中培养作为空白对照组。将细胞在 4.5 g/L 葡萄糖的 DMEM 培养基中培养,分别使用 100 μmol/L 的 PGE2(PGE2 组)、Butaprost(Butaprost 组)、AH6809(AH6809 组)及 DMSO(DMSO 组)培养细胞 24 h。另外,使用 DMSO 溶液培养细胞作为 DMSO 组。

1.2.7 MTT 法测定细胞增殖 细胞 90%融合后,将细胞接种到 96 孔板中(5000 个细胞/孔,100 μL)。将 5.0 mg/mL(100 μL)的 MTT 储备液添加到每个孔中并孵育 4 h,以形成水不溶性紫色结晶甲臜。孵育结束时,除去培养基后,添加 100 μL DMSO,轻轻振荡 10 min。在酶标仪上于 570 nm 处测量吸光度。

1.2.8 流式细胞仪检测细胞凋亡 将 HRMEC 细胞用不含 EDTA 的胰蛋白酶分离,离心除去上清液。将细胞重悬于 PBS 中,并将细胞浓度调节为 1×10⁶ 细胞/mL。根据膜联蛋白-V(Annexin-V)-异硫氰酸荧光素(FITC)凋亡测定试剂盒的说明检测细胞凋亡。

1.2.9 HRMEC 血管形成分析 将 Matrigel 基质胶以每孔 70 μL 的量加到预冷却的 96 孔板中,并在冰上保持 1 h。基质胶凝固后,将每组 HRMEC 细胞用 0.05%的膜酶分离,用基础培养基冲洗 3 次,然后计数。将每组细胞以 5×10⁴ 细胞/100 μL 的

密度接种到 96 孔板中,用 Matrigel 包被。在 37℃孵育 12 h 后,随机选择 5 个视野观察细胞并拍照。当管状结构的长度大于或等于管状结构的宽度的四倍时,表明 HRMEC 血管形成。通过 Image-ProPlus 软件计算 HRMEC 血管形成数量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。测量数据表示为平均值±标准差,两组间比较使用 t 检验,并使用单向方差分析(ANOVA)及 Tukey 检验进行多组之间的数据比较。以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PGE2/EP2R 对糖尿病大鼠视网膜形态的影响

对照组大鼠视网膜、视网膜神经节细胞、内核层和外核层的细胞均规则排列。DR 模型组、DMSO 组、PGE2 组和 Butaprost 组视网膜表面粗糙、视网膜神经节细胞穿过内膜、内核层和外核层的细胞排列不规则排列、细胞间隙增大。此外,AH6809 组内核层和外核层的细胞均规则排列,视网膜神经节细胞未出现明显的穿过内膜,见图 1。以上结果提示抑制 PGE2/EP2R 的激活明显减轻了糖尿病大鼠视网膜病变。

2.2 PGE2/EP2R 对糖尿病大鼠 IRS-1/PI3K/Akt 信号通路相关分子的影响

与对照组相比,模型组、DMSO 组、PGE2 组和 Butaprost 组的 IRS-1、p-PI3K、p-Akt、ICAM-1、eNOS、NF-κBp65 和 VEGF 蛋白表达水平均显著升高(P<0.05)。Butaprost 组的上述蛋白表达水平显著高于其他组,PGE2 组显著高于模型组和 DMSO 组(P<0.05)。AH6809 组的上述蛋白表达水平显著低于 DMSO 组、PGE2 组和 Butaprost 组(P<0.05)。见图 2。

与对照组相比,模型组、DMSO 组、PGE2 组和 Butaprost 组的 VEGF 阳性率显著升高(P<0.05)。Butaprost 组的 VEGF 阳性率显著高于其他组,PGE2 组显著高于模型组和 DMSO 组(P<0.05)。AH6809 组的 VEGF 阳性率显著低于 DMSO 组、PGE2 组和 Butaprost 组(P<0.05),见图 3。以上结果提示 PGE2/EP2R 直接调控糖尿病大鼠 IRS-1/PI3K/Akt 信号通路及下游相关分子,RS-1/PI3K/Akt 信号通路可能介导 PGE2/EP2R 对视网膜病变的调控作用。

2.3 PGE2/EP2R 对 HRMEC 细胞增殖的影响

PGE2、Butaprost 和 AH6809 处理 HRMEC 后,与对照组相比,模型组、DMSO 组、PGE2 组和 Butaprost 组的 HRMEC 细胞活力显著升高(P<0.05)。Butaprost 组的 HRMEC 细胞活力显著高于其他组,PGE2 组显著高于模型组和 DMSO 组(P<0.05)。AH6809 组的 HRMEC 细胞活力显著低于 DMSO 组、PGE2 组和 Butaprost 组(P<0.05),见图 4。以上结果提示 PGE2/EP2R 的激活可促进 HRMEC 的细胞增殖。

2.4 PGE2/EP2R 对 HRMEC 细胞凋亡的影响

与对照组相比,模型组、DMSO 组、PGE2 组和 Butaprost 组的 HRMEC 细胞凋亡率显著降低(P<0.05)。Butaprost 组的 HRMEC 细胞凋亡率显著低于其他组,PGE2 组显著低于模型组和 DMSO 组(P<0.05)。AH6809 组的 HRMEC 细胞凋亡率显著高于 DMSO 组、PGE2 组和 Butaprost 组(P<0.05),见图 5。以上结果提示 PGE2/EP2R 的激活可抑制 HRMEC 的细胞凋亡。

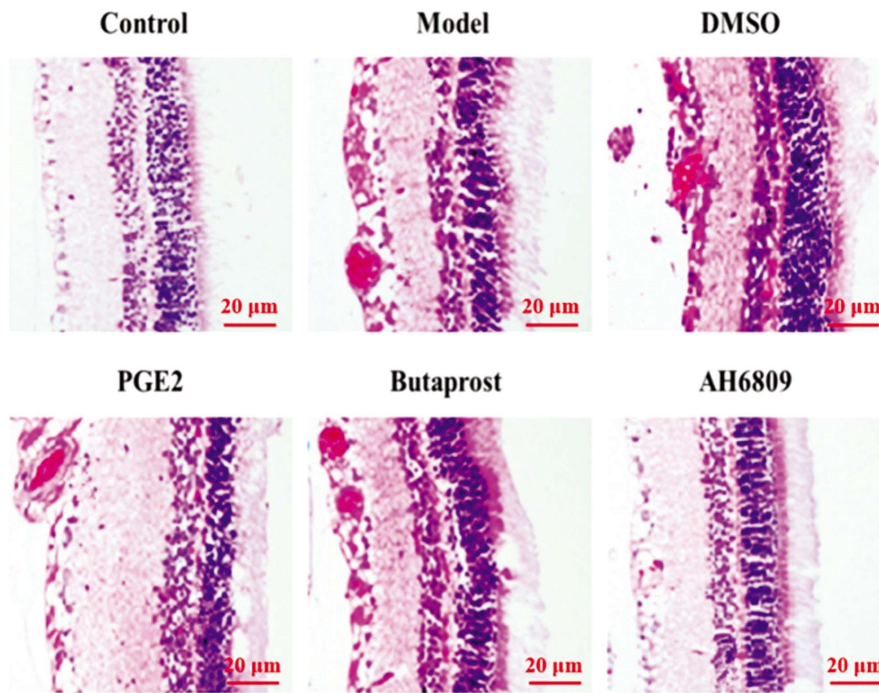


图 1 大鼠视网膜组织苏木精伊红(HE)染色(× 400)

Fig.1 Hematoxylin and eosin (HE) staining of rat retinal tissue (× 400)

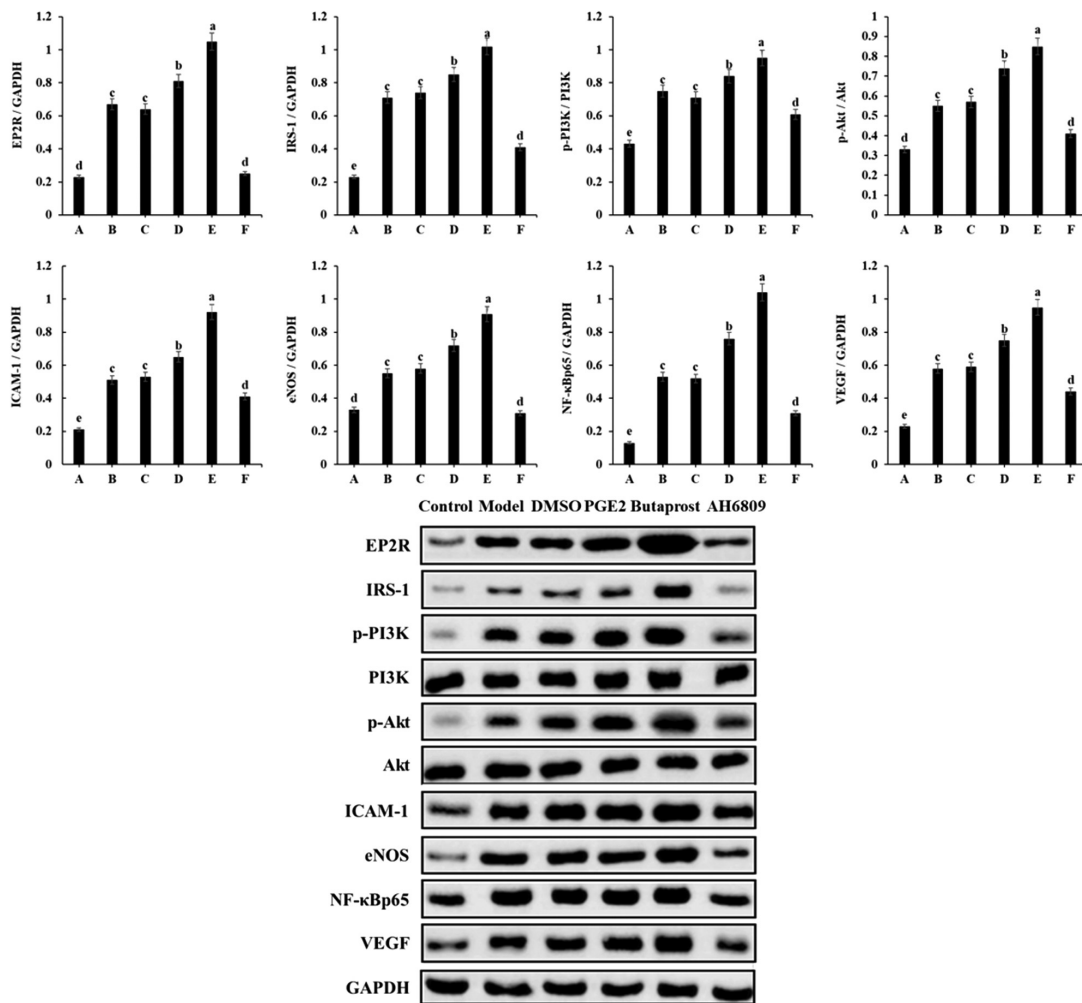


图 2 蛋白质印迹分析大鼠视网膜组织中 IRS-1、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、ICAM-1、eNOS、NF-κBp65 和 VEGF 的表达

Fig.2 Western blot analysis of IRS-1, p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, ICAM-1, eNOS, NF-κBp65 and VEGF expression in rat retinal tissue

Note: A: Control group; B: Model group; C: DMSO group; D: PGE2 group; E: Butaprost group; F: AH6809 group; Different letters indicate comparison between groups, $P < 0.05$; Same letters indicate comparison between groups, $P > 0.05$.

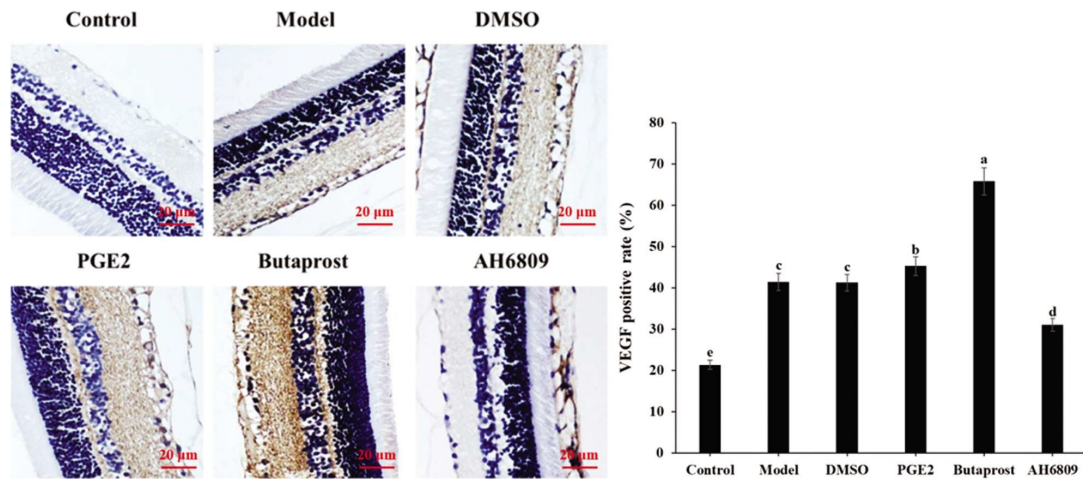


图3 免疫组化分析大鼠视网膜组织中 VEGF 的阳性表达(× 400)

Fig.3 Positive expression of VEGF in rat retinal tissue by immunohistochemical analysis (× 400)

Note: Positive cells are stained brown-yellow; Different letters indicate comparison between groups, $P < 0.05$; Same letters indicate comparison between groups, $P > 0.05$.

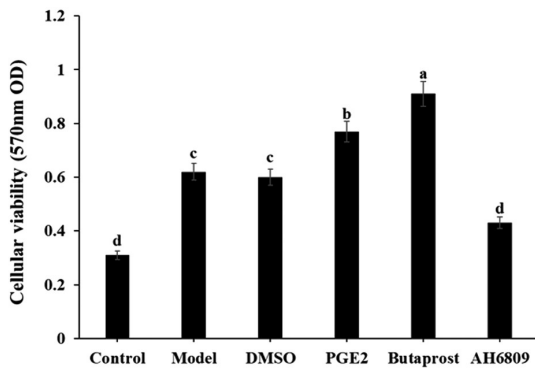


图4 MTT 法测定 HRMEC 细胞增殖

Fig.4 MTT assay to measure HRMEC cell proliferation

Note: Different letters indicate comparison between groups, $P < 0.05$; Same letters indicate comparison between groups, $P > 0.05$.

2.5 PGE2/EP2R 对 HRMEC 血管形成的影响

与对照组相比,模型组、DMSO 组、PGE2 组和 Butaprost 组的 HRMEC 血管生成数量显著升高 ($P < 0.05$)。Butaprost 组的 HRMEC 血管生成数量显著高于其他组,PGE2 组显著高于模型组和 DMSO 组($P < 0.05$)。AH6809 组的 HRMEC 血管生成数量显著低于 DMSO 组、PGE2 组和 Butaprost 组($P < 0.05$),见图 6。以上结果提示 PGE2/EP2R 的激活可促进 HRMEC 的血管生成。

3 讨论

糖尿病性视网膜病变的典型特征是视网膜微血管系统的异常改变,导致视网膜血管通透性增加和眼内增生^[14-16]。本研究通过在 STZ 诱导的糖尿病大鼠的玻璃体内注射 PGE2、EP2R 激动剂(Butaprost)和拮抗剂(AH6809)4 周,考察 PGE2/EP2R 信号通路在糖尿病引起的微血管并发症中的潜在调节机制。研究结果显示糖尿病大鼠糖尿病大鼠视网膜组织发生明显损伤,EP2R 的表达水平明显上调,PGE2 和 Butaprost 处理进一步加重了视网膜病变,而 AH6809 则明显减轻了视网膜病变,提示糖尿病大鼠视网膜病变过程中 EP2R 被异常激活,而 EP2R 的高表达进一步加重了组织损伤,抑制 EP2R 可能通过多种途径来减轻视网膜病变。

DR 的发生和发展涉及多种机制。VEGF 是最重要的促血管生成因子^[17-19],通过促进依赖 Akt 下游的 eNOS 磷酸化和 NO 的产生来增强人类胰腺癌细胞的内皮细胞存活和血管生成^[20]。VEGF 可调节糖尿病患者视网膜的结构和功能变化^[21-23]。核因子 κ B(NF- κ B)是一种重要的多态性核因子,在 PGE2 信号通路和糖尿病性视网膜病的发展中起着关键作用^[24],并参与细胞凋亡和新血管形成^[25]。研究表明视网膜中 NF- κ B p65 的高表达可以促进促炎因子 ICAM-1 的表达,而促炎因子 ICAM-1 是参与 DR 发病的主要粘附分子^[26]。在正常视网膜中,ICAM-1 的表达水平较低,而在糖尿病中,ICAM-1 的表达则异常升高。长时间处于高葡萄糖环境下,NF- κ B 通路被激活,进一步诱导了视网膜内皮细胞中 NF- κ Bp65 的磷酸化并上调了 ICAM-1 的表达。eNOS 是一种 NO 的合成酶,其表达水平决定了体内的 NO 水平。在视网膜病变状态下,eNOS 被激活,高糖刺激诱导的 NO 的合成和释放可以与 VEGF 相互作用并引起视网膜新血管形成^[27]。本研究结果显示糖尿病大鼠视网膜组织中 ICAM-1、eNOS、NF- κ Bp65 和 VEGF 的表述水平均明显升高,应用 PGE2 处理或 EP2R 选择性激动剂处理可维持或升高上述蛋白表达水平,而用 EP2R 抑制剂处理则均抑制了上述蛋白表达,提示 PGE2/EP2R 可通过促进多种促炎因子、粘附因子、促血管生成因子的表达来加重糖尿病大鼠视网膜病变。

PI3K/Akt 信号传导途径在 DR 的发病过程中被异常激活^[28]。IRS-1/PI3K/Akt 是经典的细胞存活通路,该通路调节细胞增殖、凋亡、运动等多种细胞行为。大量研究显示 ICAM-1、eNOS、NF- κ Bp65 和 VEGF 均是 PI3K/Akt 信号通路的下游分子。在本研究中,糖尿病大鼠视网膜组织中 IRS-1/PI3K/Akt 信号通路被激活,并且抑制 EP2R 可降低改通路活性,提示 IRS-1/PI3K/Akt 信号通路可能介导 PGE2/EP2R 对视网膜病变的调控作用。

在糖尿病性视网膜病变中,内皮细胞的损伤是造成血 - 视网膜屏障破坏和随后的血管通透性增加的最初病理变化之一^[29]。在晚期糖尿病性视网膜病中,由于视网膜灌注不足和缺氧以及新血管的异常形成,内皮细胞功能发生明显异常。RMEC 功能障碍在 DR 的病因和发病机制中至关重要^[30]。研究

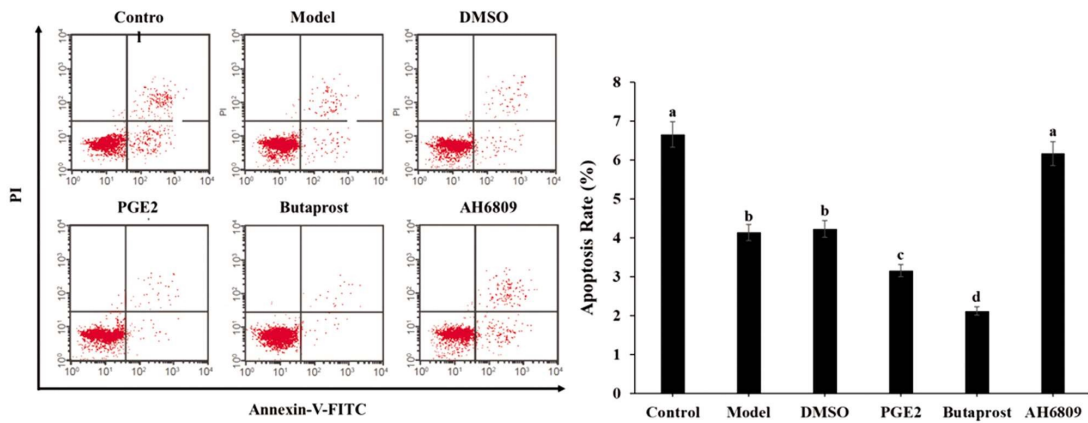


图 5 流式细胞仪检测 HRMEC 细胞凋亡

Fig.5 Flow cytometry to detect apoptosis in HRMEC cells

Note: Different letters indicate comparison between groups, $P < 0.05$; Same letters indicate comparison between groups, $P > 0.05$.

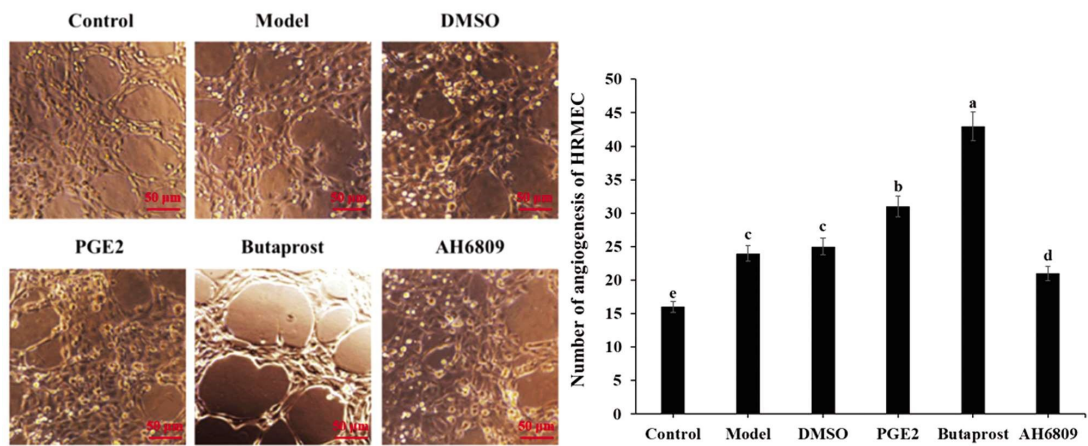


图 6 前列腺素 E2 对 HRMEC 血管形成的影响($\times 200$)

Fig.6 Effect of prostaglandin E2 on HRMEC angiogenesis ($\times 200$)

Note: Different letters indicate comparison between groups, $P < 0.05$; the same letters indicate comparison between groups, $P > 0.05$.

表明激活PI3K/Akt/VEGF 信号通路可促进 DR 大鼠的视网膜 RMEC 异常增殖和血管生成^[1]。本研究中,PGE2 或 EP2R 激动剂处理明显提高了 HRMEC 的增殖和血管生成能力并抑制了细胞凋亡,而应用 EP2R 抑制剂则可逆转上述细胞行为。上述结果说明 PGE2/EP2R 信号通路可通过促进 HRMEC 的异常增殖和血管生成促进糖尿病视网膜病变的发生和发展。

综上所述,PGE2/EP2R 可能通过促进 IRS-1/PI3K/Akt 信号通路介导的炎症反应、细胞凋亡和血管生成促进糖尿病视网膜病变的发生和发展。PGE2/EP2R 信号通路可能是治疗糖尿病性视网膜病变的新靶点。

参考文献(References)

[1] Olivares A M, Althoff K, Chen G F, et al. Animal models of diabetic retinopathy[J]. Current Diabetes Reports, 2017, 17(10): 93-109
 [2] Duh E J, Sun J K, Stitt A W. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies[J]. Jci Insight, 2017, 2(14): e93751
 [3] Monaghan K, Mcnaughten J, Mcgahon M K, et al. Hyperglycemia and diabetes downregulate the functional expression of TRPV4 channels in retinal microvascular endothelium[J]. Plos One, 2015, 10: e128359
 [4] Zaslona Z, Pålsson-McDermott EM, Menon D, et al. The induction of pro-IL-1 β by lipopolysaccharide requires endogenous prostaglandin

E2 production[J]. J Immunol, 2017, 198(9): 3558-3564
 [5] Li H, Luo Y, Xu Y, et al. Meloxicam Improves Cognitive Impairment of Diabetic Rats through COX2-PGE2-EPs-cAMP/pPKA Pathway[J]. Molecular Pharmaceutics, 2018, 15(9): 4121-4131
 [6] Li W, Jin D, Zhong T P, et al. Photoreceptor cell development requires prostaglandin signaling in the zebrafish retina [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 510(2): 230-235
 [7] Wang M, Wang Y, Xie T, et al. Prostaglandin E2/EP2 receptor signalling pathway promotes diabetic retinopathy in a rat model of diabetes[J]. Diabetologia, 2019, 62(2): 335-348
 [8] Wang L, Wang J, Fang J, et al. High glucose induces and activates Toll-like receptor 4 in endothelial cells of diabetic retinopathy[J]. Diabetol Metab Syndr, 2015, 7(1): 89-98
 [9] Fang S, Ma X, Guo S, et al. MicroRNA-126 inhibits cell viability and invasion in a diabetic retinopathy model via targeting IRS-1 [J]. Oncology Letters, 2017, 14(4): 4311-4318
 [10] Di J, Gao K, Qu D, et al. Rap2B promotes angiogenesis via PI3K/AKT/VEGF signaling pathway in human renal cell carcinoma [J]. Tumor Biology, 2017, 39(7): 1010428317701653
 [11] Ran Z, Zhang Y, Wen X, et al. Curcumin inhibits high glucose-induced inflammatory injury in human retinal pigment epithelial cells

- through the ROS-PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 19(2): 1024-1031
- [12] Xie X, Peng J, Huang K, et al. Polydatin ameliorates experimental diabetes-induced fibronectin through inhibiting the activation of NF- κ B signaling pathway in rat glomerular mesangial cells [J]. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 2012, 362(1-2): 183-193
- [13] Wu Y, Feng B, Chen S, et al. ERK5 regulates glucose-induced increased fibronectin production in the endothelial cells and in the retina in diabetes [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2012, 53(13): 8405
- [14] Safi H, Safi S, Hafezi-Moghadam A, et al. Early detection of diabetic retinopathy[J]. *Survey of Ophthalmology*, 2018, 63(5): 601-608
- [15] Simoservat O, Hernandez C, Simo R, et al. Somatostatin and diabetic retinopathy: an evolving story[J]. *Endocrine*, 2018, 60(1): 1-3
- [16] Rajalakshmi R, Subashini R, Anjana R M, et al. Automated diabetic retinopathy detection in smartphone-based fundus photography using artificial intelligence[J]. *Eye*, 2018, 32(6): 1138-1144
- [17] Turkowski K, Brandenburg S, Mueller A, et al. VEGF as a modulator of the innate immune response in glioblastoma [J]. *Glia*, 2018, 66(1): 161-174
- [18] Wu X, Liu S, Hu Z, et al. Enriched housing promotes post-stroke neurogenesis through calpain 1-STAT3/HIF-1 α /VEGF signaling [J]. *Brain Research Bulletin*, 2018, 139: 133-143
- [19] Ruan W, Zhao F, Zhao S, et al. Knockdown of long noncoding RNA MEG3 impairs VEGF-stimulated endothelial sprouting angiogenesis via modulating VEGFR2 expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Gene*, 2018, 649: 32-39
- [20] Ma J, Sawai H, Ochi N, et al. PTEN regulate angiogenesis through PI3K/Akt/VEGF signaling pathway in human pancreatic cancer cells [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2009, 331(1-2): 161-171
- [21] Ruiz M A, Feng B, Chakrabarti S. Polycomb repressive complex 2 regulates miR-200b in retinal endothelial cells: potential relevance in diabetic retinopathy[J]. *PLOS One*, 2015, 10(4): e0123987
- [22] Gong Q, Li F, Xie J, et al. Upregulated VEGF and Robo4 correlate with the reduction of miR-15a in the development of diabetic retinopathy[J]. *Endocrine*, 2019, 65(1): 35-45
- [23] Yang F, Yu J, Ke F, et al. Curcumin alleviates diabetic retinopathy in experimental diabetic rats [J]. *Ophthalmic Research*, 2018, 60(1): 43-54
- [24] Luan B, Yoon YS, Le Lay J, et al. CREB pathway links PGE2 signaling with macrophage polarization [J]. *PNAS*, 2015, 112(51): 15642-15647
- [25] Jiang N, Chen X L, Yang H W, et al. Effects of nuclear factor κ B expression on retinal neovascularization and apoptosis in a diabetic retinopathy rat model [J]. *International Journal of Ophthalmology*, 2015, 8(3): 448-452
- [26] Yao Y, Du J, Li R, et al. Association between ICAM-1 level and diabetic retinopathy: a review and meta-analysis [J]. *Postgraduate Medical Journal*, 2019, 95(1121): 162-168
- [27] Gardlik R, Fusekova I. Pharmacologic therapy for diabetic retinopathy[J]. *Seminars in Ophthalmology*, 2015, 30(4): 252-263
- [28] Cui J, Gong R, Hu S, et al. Gambogic acid ameliorates diabetes-induced proliferative retinopathy through inhibition of the HIF-1 α /VEGF expression, via, targeting PI3K/AKT pathway [J]. *Life Sciences*, 2018, 192: 293-303
- [29] Wang N, Zou C, Zhao S, et al. Fenofibrate exerts protective effects in diabetic retinopathy via inhibition of the ANGPTL3 pathway [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2018, 59(10): 4210-4217
- [30] Monaghan K, Mcnaughten J, Mcgahon M K, et al. Hyperglycemia and diabetes downregulate the functional expression of TRPV4 channels in retinal microvascular endothelium[J]. *PLOS One*, 2015, 10(6): e0128359
- [31] Xiong J, Li Z, Zhang Y, et al. PRL-3 promotes the peritoneal metastasis of gastric cancer through the PI3K/Akt signaling pathway by regulating PTEN[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(4): 1819-1828

(上接第 4269 页)

- [25] Hardy J, Baggott C, Fingleton J, et al. Budesonide-formoterol reliever therapy versus maintenance budesonide plus terbutaline reliever therapy in adults with mild to moderate asthma (PRACTICAL): a 52-week, open-label, multicentre, superiority, randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2019, 394(10202): 919-928
- [26] 柳旻. 射干麻黄汤联合布地奈德对小儿毛细支气管炎患者血清 PCT、hs-CRP 水平的影响[J]. *陕西中医*, 2018, 39(9): 1184-1186
- [27] Kitcharoensakkul M, Bacharier LB, Yin-Declue H, et al. Impaired tumor necrosis factor- α secretion by CD4 T cells during respiratory syncytial virus bronchiolitis associated with recurrent wheeze [J]. *Immun Inflamm Dis*, 2020, 8(1): 30-39
- [28] 杨亚茹, 何文, 阎进晓, 等. 布地奈德联合高渗盐水治疗毛细支气管炎临床疗效研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(23): 4523-4525, 4570
- [29] Hardy J, Baggott C, Fingleton J, et al. Budesonide-formoterol reliever therapy versus maintenance budesonide plus terbutaline reliever therapy in adults with mild to moderate asthma (PRACTICAL): a 52-week, open-label, multicentre, superiority, randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2019, 394(10202): 919-928
- [30] 李雯, 张赛, 侯世科, 等. 特布他林联合布地奈德雾化吸入预防甲型流感后咳嗽的疗效研究[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2020, 20(1): 27-29