

活血化癥方对糖尿病大鼠视网膜周细胞的保护作用

周洁¹, 倪茂巍², 丁旭慧³, 张宏建¹, 楼柯浪¹, 徐攀¹, 任泽明^{1*} (1.浙江省立同德医院, 杭州 310007; 2.浙江省肿瘤医院, 杭州 310022; 3.嘉兴市第二医院, 浙江 嘉兴 314000)

摘要: 目的 探究自拟活血化癥方对糖尿病大鼠视网膜周细胞(retinal capillary pericytes, RCPs)的保护作用。方法 40只SD大鼠随机分成4组,其中10只为正常组,另30只腹腔注射链脲佐菌素造糖尿病模型成功后再分为活血化癥方高(6.75 g·kg⁻¹)、低剂量组(3.375 g·kg⁻¹)及模型组,每组各10只,灌胃60d后取视网膜,对RCPs进行免疫组化及Bax、Bak、Bcl-2、caspase-3蛋白表达分析。在体外实验中,将高糖(30 mmol·L⁻¹)培养的RCPs用不同浓度的活血化癥方进行干预,CCK-8检测RCPs增殖,JC-1染色后荧光显微镜观察细胞形态和RCPs凋亡情况,并使用流式细胞仪进行定量分析。结果 糖尿病模型大鼠较正常组RCPs凋亡明显,而活血化癥方可减少RCPs凋亡。与0 μg·mL⁻¹剂量增殖效果相比,25~100 μg·mL⁻¹活血化癥方有显著性差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。在抗高糖诱导凋亡方面,25~100 μg·mL⁻¹与0 μg·mL⁻¹相比,有显著性差异。结论 活血化癥方可通过主要外膜蛋白/Bcl-2途径抑制糖尿病大鼠RCPs凋亡,且对高糖诱导的RCPs凋亡具有保护作用。

关键词: 活血化癥方; 糖尿病; 周细胞; 血-视网膜屏障

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)04-0438-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.04.012

引用本文: 周洁, 倪茂巍, 丁旭慧, 等. 活血化癥方对糖尿病大鼠视网膜周细胞的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(4): 438-443.

Protective Effect of Huoxue Huayu Prescription on Retinal Capillary Pericytes of Diabetic Rats

ZHOU Jie¹, NI Maowei², DING Xuhui³, ZHANG Hongjian¹, LOU Kelang¹, XU Pan¹, REN Zeming^{1*} (1. Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310007, China; 2. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 3. The Second Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the protective effect of Huoxue Huayu prescription on retinal capillary pericytes(RCPs) of diabetic rats. **METHODS** Forty SD rats were conducted and randomly separated into 4 groups, ten of them were in the normal group, while other 30 rats were divided into Huoxue Huayu prescription high-dose diabetes group(6.75 g·kg⁻¹, n=10), low-dose diabetes group(3.375 g·kg⁻¹, n=10) and model group(n=10) after successfully established diabetic model by intraperitoneal injection of streptozotocin. Retina was taken after gastric administration for 60 d for RCPs immunohistochemical study, while Western blot assay was adopted to test the Bax, Bak, Bcl-2, caspase-3 protein expression. *In vitro* assay, RCPs were incubated with high glucose(30 mmol·L⁻¹) and intervened by different concentrations of Huoxue Huayu prescription. CCK-8 assay was employed to measure the relative growth rate. Apoptosis of RCPs was observed with a fluorescence microscope using JC-1 stain, and quantified by flow cytometry using Annexin V-FITC stain. **RESULTS** More obvious RCPs apoptosis were observed in diabetic model rats than that in normal group, and the Huoxue Huayu prescription could inhibit the apoptosis of RCPs. Compared with 0 μg·mL⁻¹, the proliferation in 25~100 μg·mL⁻¹ of Huoxue Huayu prescription increased significantly($P<0.05$ or $P<0.01$). There was a significant difference between 25~100 μg·mL⁻¹ and 0 μg·mL⁻¹ in anti-apoptotic effect induced by high glucose. **CONCLUSION** Huoxue Huayu prescription can inhibited high glucose induced apoptosis in RCPs, and the preliminary mechanism may be associated with major outer membrane proteins/BCL-2 pathway.

KEYWORDS: Huoxuehuayu prescription; diabetic; retinal capillary pericytes; blood-retinal barrier

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见的并发症之一,目前该病机制尚未明确。DR属中医眼科中的“内障”“视瞻昏渺”范畴,病机为因虚致瘀^[1]。根据中医基础理论,目之能视,有赖于精血津液的滋养,精血津液属阴,阴虚必致目失所养;阴阳互根,阴虚日久,又使

阳气生化不足;而目居上位,为人之上窍,精血津液必赖阳气之温煦、固摄和推动,方能上输于目,滋养目窍^[2]。因此目前认为DR中医证型的病证发展是由阴虚内热到阴阳两虚的演化,且血瘀贯穿其始终^[3]。故认为消渴为本,消渴目病为标,血瘀是DR的基本病机^[4]。

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(2018ZQ007); 浙江省医药卫生科技计划项目(2018KY033)

作者简介: 周洁,女,硕士,助理研究员 Tel: (0571)88849079 E-mail: kenzei@163.com *通信作者: 任泽明,男,硕士,助理研究员 Tel: (0571)88849079 E-mail: rchao007@163.com

以传统中医药的“活血化瘀”理论为指导,浙江省立同德医院眼科医师根据多年临床经验,运用活血化瘀方对 DR 进行治疗。本方药由黄芪、地黄、枸杞子、决明子、蒲黄、水蛭组成,其中黄芪补中益气,扩张血管;地黄补益肝肾,滋阴凉血,益气养阴;枸杞子滋阴补血,决明子养肝明目;蒲黄、水蛭配合活血止血,疏通眼络,去瘀生新,增视明目。活血化瘀方临床效果理想,但通过何途径发挥抗高糖损伤作用尚未见文献报道。既往对血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)的研究绝大多数集中于内皮细胞,对其作用已有了较多的认识。但随着研究的深入,视网膜周细胞(retinal capillary pericytes, RCPs)在 BRB 中对血管生成、稳定、通透性起重要调控作用,且日渐受到重视,因此研究 BRB 另一重要组成——RCPs 在糖尿病视网膜病变中的分布形态学及数量改变可以提供 1 条新的研究思路。本实验拟通过活血化瘀方对糖尿病视网膜大鼠进行干预,在细胞水平上以高糖损伤的 RCPs 为模型,对用药后的抗 RCPs 凋亡作用进行探索,与动物实验结果相互佐证,以探究该方对 DR 中 RCPs 凋亡的抑制作用。

1 材料

1.1 动物

40 只健康♂ SD 大鼠由中国科学院上海实验动物中心提供,体质量(200±20)g,动物许可证号:SCXK(浙)2014-0001,饲养于浙江省中医药研究院实验动物中心,SPF 级环境,室温 18~22℃,自由饮水,普通饲料喂养,于试验前适应性喂养 1 周。

1.2 药品

黄芪 30 g、地黄 15 g、枸杞子 10 g、决明子 10 g、蒲黄 5 g、水蛭 5 g 水煎制成汤剂,置于冷冻干燥剂中,所得冻干粉用 DMSO 溶解配制成 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后除去不溶物沉淀,取上清经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,于 4℃ 保存待用于细胞实验。另取上述等量药材水煎至 100 mL,低剂量给药为 3.375 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (即 4.5 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),高剂量给药为 6.75 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (即 9 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

1.3 试剂

DMEM 高糖培养液、胎牛血清(Hyclone 公司,批号分别为 AC12557267、10100139); CCK-8、DMSO、I 型胶原酶、链脲佐菌素(Sigma 公司,批号分别为 B326KA、D2650、C9722、S0130); 0.25%

胰蛋白酶 EDTA、PBS 缓冲液、1%青霉素(Gibco 公司,批号分别为 42G3075K、170306、15070063); Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(BD 公司,批号:556547); 蛋白裂解液(Biosharp 公司,批号:161207); 抗大鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)单克隆抗体、兔抗大鼠 Bax、Bak、Bcl-2、caspase-3 及 β -actin 抗体(abcam 公司,批号分别为 ab5694、ab182733、ab45008、ab196495、ab13847、ab8227); BCA 蛋白浓度检测试剂盒、辣根过氧化物标记的山羊抗兔鼠通用二抗(碧云天生物科技有限公司,批号分别为 A0423、P0009); JC-1 试剂盒、DAB 显色剂(凯基生物公司,批号分别为 KGA601、KGP1045); 25 cm^2 培养瓶, 96 孔、6 孔培养板(Corning 公司,批号分别为 430639、04916603、3736)。

1.4 仪器

ELX800 型酶标仪(BioTek 公司); SWCJ1FD 型超净工作台(江苏省苏州净化设备公司); 313339 型 CO_2 培养箱、88700 型 -80℃ 超低温冰箱(Thermo 公司); TYPE104 型倒置显微镜及数码摄像装置(尼康公司); Centrifuge5810R 型低温离心机(Eppendorf 公司); 158329 型冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 糖尿病动物模型的建立及分组

选鼠龄为 6 周的健康 SD 大鼠 40 只,适应性喂养 7 d 后随机分为正常组($n=10$)和高血糖造模组($n=30$),高血糖造模组过夜禁食 13 h 后,腹腔注射链脲佐菌素(55 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),用 pH 4.2 的 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液配成 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液,1 周后尾静脉采血测血糖,当血糖值 $\geq 16.7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[5-6]且伴有“三多一少”症状者即为糖尿病造模成功。再将造模成功大鼠($n=30$)随机分为模型组、活血化瘀方高、低剂量组,每组各 10 只。所有大鼠均为普通饲料喂养,自由饮水。

2.2 给药方法

造模成功后开始分组灌胃给药。治疗组分别采用高、低剂量(6.75, 3.375 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)活血化瘀方,模型组及正常组给予相同体积生理盐水。给药时间为 60 d。

2.3 大鼠 RCPs 免疫组化

各组大鼠皮下注射戊巴比妥钠溶液,待其完全麻醉后心脏缓缓灌注 PBS 缓冲液,迅速剥离完

整眼球,用4%多聚甲醛进行固定,石蜡包埋切片后进行 α -SMA(1:100)免疫组化,封片结束后在显微镜下进行观察。每张切片随机选取10个高倍镜视野(200 \times),计算阳性染色面积,使用图像分析软件Image-pro Plus 5.0进行分析并计算相应的阳性细胞表达率(阳性表达率=阳性表达面积/总面积 \times 100%)。

2.4 视网膜分离

参照文献[7]记录方法分离大鼠视网膜,颈椎脱臼法处死大鼠,将头部置于75%乙醇中常规消毒后,立刻摘取眼球,置于含1%青链双抗的PBS中冲洗3次,沿角巩膜缘处剪开眼球,剥离完整视网膜,置于PBS中漂洗3次,去除眼前节内容物及残留玻璃体等杂质,备用。

2.5 RCPs 分离培养及鉴定

将“2.4”项下剥离视网膜组织置于含少量PBS的培养皿中,加入胰蛋白酶3 mL,37 $^{\circ}$ C消化15 min。加入含20% FBS的DMEM培养基终止消化,4 $^{\circ}$ C下400 \times g离心5 min。吸除上清液,加入I型胶原酶3 mL,将下方沉淀轻轻吹打均匀,37 $^{\circ}$ C消化15 min。终止消化后过孔径100 μ m滤网,收集滤过液,再过孔径55 μ m滤网,用DMEM冲洗滤网反面沉积的微血管片段,收集含微血管片段洗脱液。4 $^{\circ}$ C条件下离心5 min,弃上清,加入DMEM将沉淀吹打均匀,接种于6孔板中。将6孔板置于5% CO₂的细胞培养箱中37 $^{\circ}$ C下培养。定取第3代RCPs,参照文献[8]的方法,以 α -SMA(5 mg \cdot L⁻¹)抗体进行免疫荧光染色,在倒置荧光显微镜下进行观察。

2.6 Western blot 测定大鼠 RCPs 主要外膜蛋白(major outer membrane proteins, MOMP)/Bcl-2 途径上的蛋白表达

使用裂解液提取各组RCPs中蛋白,收集上清液,用Bradford法测定蛋白含量,各浓度组的蛋白均取30 μ g,加Buffer混合等体积上样,采用Western blot法检测Bax、Bak、Bcl-2、caspase-3表达, β -actin作为内参,封闭及抗体孵育等操作步骤参照文献[9]进行,曝光、显影后拍照记录,并分析各组蛋白表达差异。

2.7 CCK-8 检测高糖培养条件下活血化瘀方对离体 RCPs 的增殖效应

取RCPs,用含EDTA的0.25%胰酶消化并收集细胞。以DMEM培养液(含10% FBS)吹打均匀

制成细胞悬液,进行细胞计数,调整细胞密度为 $1\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$,分别接种于96孔培养板中,每孔100 μ L,常规培养24 h,之后换用含有30 mmol \cdot L⁻¹高糖的培养液培养48 h。将96孔板中细胞进行分组给药,实验分为不同浓度(0, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g \cdot mL⁻¹)的活血化瘀方给药组及正常组。继续培养48 h,每孔加入10 μ L(0.5 mg \cdot mL⁻¹)的CCK-8溶液,37 $^{\circ}$ C孵育4 h。吸弃培养基和CCK-8的混合物,每孔加入DMSO 150 μ L,室温条件下振荡10 min,使结晶充分溶解,在酶标仪450 nm处测定7组吸光度A值,空白孔调零,每组浓度设6个复孔,实验重复3次,计算细胞增殖率:增殖率=实验组A值/对照组A值 \times 100%。

2.8 高糖培养条件下活血化瘀方对离体 RCPs 凋亡影响的检测

2.8.1 JC-1 凋亡试剂盒的检测 同“2.7”项下细胞分组给药后培养48 h,按照JC-1凋亡试剂盒操作说明^[10]进行检测。

2.8.2 Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测 取RCPs按每孔 2×10^5 个接种于6孔板,加入含10%胎牛血清的细胞培养液,置37 $^{\circ}$ C、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养24 h。细胞用不含EDTA的胰酶消化收集;用PBS洗涤细胞2次(2 000 r \cdot min⁻¹离心5 min)收集 5×10^5 细胞;加入500 μ L的Binding Buffer悬浮细胞后加入5 μ L Annexin V-FITC混匀后,再加入5 μ L PI混匀;室温避光反应15 min后进行流式细胞仪的观察和检测。

2.9 统计学方法

所有数据均采用SPSS 19.0软件进行统计处理,计量数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠造模

活血化瘀方高、低剂量组及模型组糖尿病大鼠与正常组大鼠比较,血糖水平在腹腔注射链脲佐菌素7 d后差异显著($P<0.01$),体质量随造模时间推移差异逐渐明显。结果见图1~2。

3.2 RCPs 形态学观察及鉴定

RCPs原散在分布的细胞此时呈现出典型的RCPs形态,细胞体贴壁后呈不规则三角形,伴有多个突起,结果见图3。本实验选用 α -SMA最具代表性的RCPs标志物^[11]进行标记鉴定,结果显示所培养的RCPs纯度达96%。

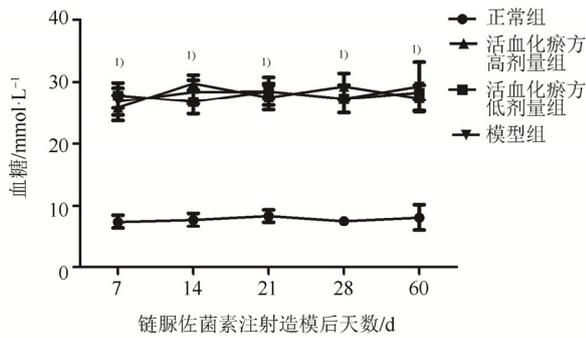


图1 血糖浓度变化曲线

与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Curve of blood glucose concentration change

Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.01$.

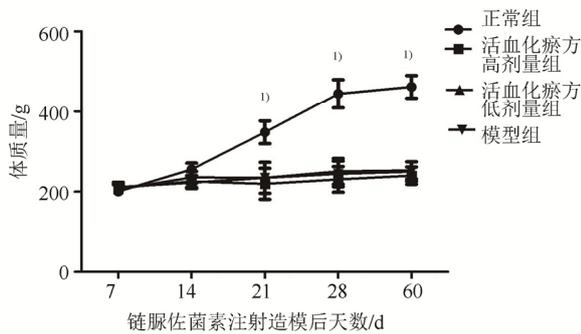


图2 体质量变化曲线

与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Curve of weight change

Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.01$.

3.3 活血化癥方对RCPs增殖的影响

在一定浓度范围内,活血化癥方对高糖诱导RCPs凋亡均有抑制作用,在浓度为 $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,对RCPs生长的增殖率仅为114.58%,作用不显著。而浓度为25, 50, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,增殖率分别为121.08%, 135.85%, 141.98%,与模型组相比具有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),作用显著且呈浓度相关性。但浓度增加到 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,细胞增殖率开始降低,为61.98%,结果见图4。

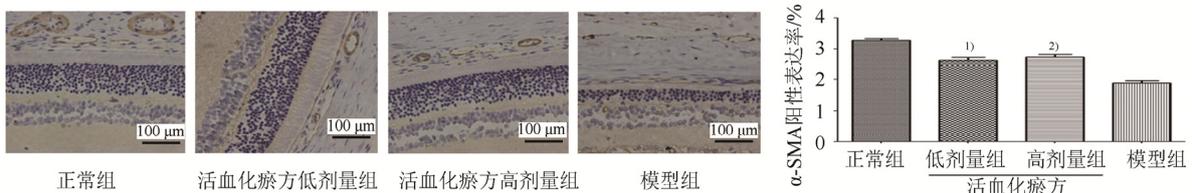


图5 各组α-SMA阳性表达比较

与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 5 The positive expression of α-SMA in each group

Compared with model group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

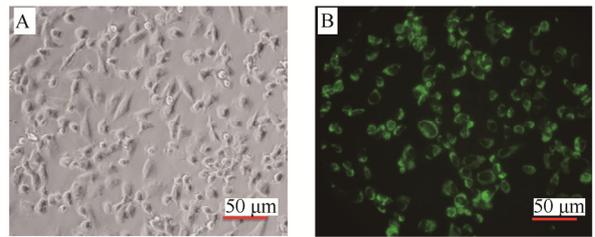


图3 RCPs形态学观察及鉴定图(400×)

A-RCPs形态图; B-RCPs α-SMA免疫荧光图

Fig. 3 Morphological observation and identification of pericytes(400×)

A-morphology of RCPs; B-α-SMA immunofluorescence of RCPs.

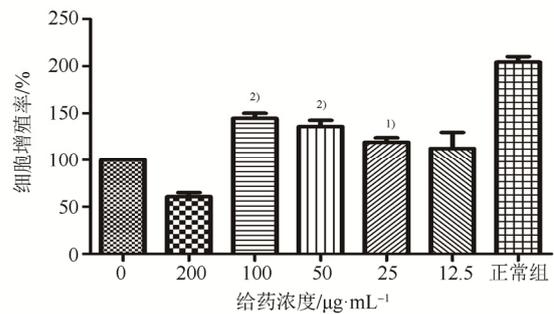


图4 活血化癥方对RCPs增殖的影响

与 $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 4 The proliferation of RCPs in different concentrations of Huoxuehuayu prescription,

Compared with $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

3.4 大鼠RCPs免疫组化

α-SMA的免疫组化可特异性地将视网膜微血管的RCPs膜染色。活血化癥方高、低剂量组α-SMA阳性表达率均有不同程度的提高,且与模型组比有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图5。

3.5 MOMP/Bcl-2通路上相关蛋白分析

与模型组相比,活血化癥方高低剂量组对糖尿病大鼠视网膜MOMP/Bcl-2蛋白通路上相关蛋白Bax、Bak、caspase-3水平均有抑制作用,而对抗凋亡Bcl-2蛋白表达量则相应上升,呈一定的剂量相关性,结果见图6。

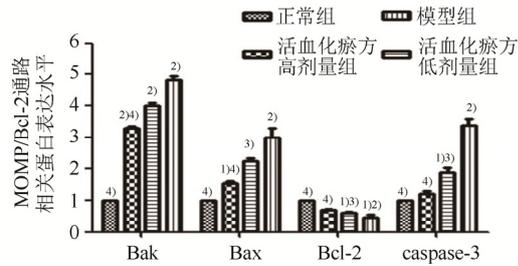
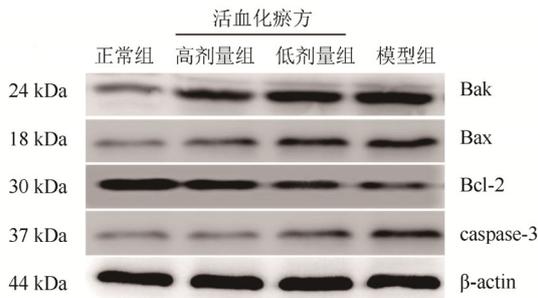


图6 MOMP/Bcl-2通路上相关蛋白表达水平
与正常组比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与模型组比, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 6 Expression levels of related proteins in MOMP/Bcl-2 pathway
Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with model group, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.6 活血化瘀方对高糖诱导 RCPs 凋亡的保护作用

JC-1 染色观察到 RCPs 正常细胞线粒体膜呈正常的染色,轮廓边界清晰。高糖诱导凋亡的 RCPs 随浓度增加,绿染比例逐渐减少, $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组的线粒体膜出现阳性染色的比例最大,结果见图7。

进一步采用流式细胞仪检测活血化瘀方对 RCPs 凋亡的影响,结果显示,从整体趋势来看,凋亡比例随浓度增高而降低, $25\sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 活血化瘀方能明显抑制高糖诱导的 RCPs 细胞的凋亡,在晚期凋亡细胞中同样呈现出明显的浓度依赖性,结果见图8。

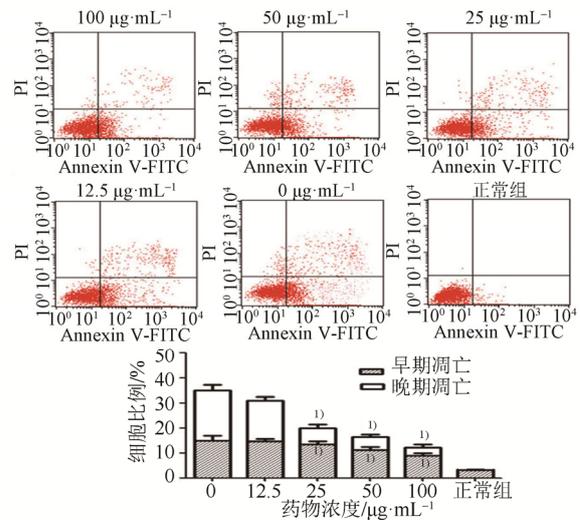


图8 活血化瘀方对高糖诱导 RCPs 凋亡的保护作用
与 $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 比较, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 8 Protective effect of Huoxue Huayu prescription on RCPs apoptosis induced by high glucose
Compared with $0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

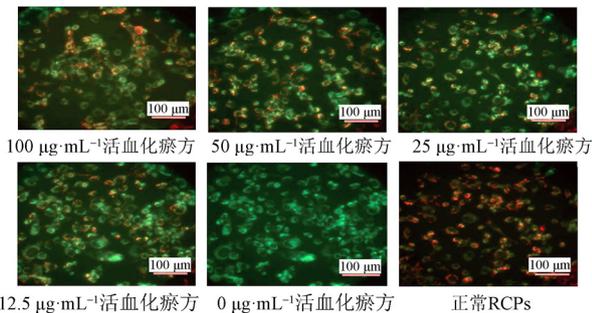


图7 RCPs 的 JC-1 染色图

Fig. 7 JC-1 staining of RCPs

4 讨论

与中医重视血瘀基本病机相似,现代医学研究表明,视网膜所需氧气和营养比人体其他组织都要高,甚至超过大脑[12]。视网膜神经节细胞层和内核层的营养供应均来自中心视网膜动脉形成的 BRB。已有文献报道[13]BRB 破坏是导致 DR 的重要原因之一。而维持 BRB 功能的细胞主要有 2 种:血管内皮细胞和 RCPs[14]。既往对 BRB 研究绝大多数集中于内皮细胞,对其作用已有了较多的认识。但随着实验研究的深入,RCPs 在 BRB

中调节血管生成、稳定、通透性中起重要调控作用且日渐受到重视[15]。本课题组通过免疫组化观察到 DR 大鼠 BRB 功能中 RCPs 与正常大鼠 RCPs 的差异,发现 DR 大鼠 RCPs 出现明显的缺失现象;后又在离体 RCPs 高糖损伤模型建立基础上,用 JC-1 对凋亡的 RCPs 数量进行统计分析,发现该方对高糖环境下 RCPs 凋亡有一定抑制作用。综合前期实验推测,活血化瘀方可能对 BRB 功能中 RCPs 缺失具有抑制作用。

本研究进一步对该方抗 RCPs 凋亡的机制进行探索, Bcl-2 家族抗凋亡蛋白成员通过与促凋亡蛋白成员 Bax 和 Bak 形成异源二聚体而抑制 Bax 和 Bak 的促凋亡作用,从而维持线粒体膜的完整性、线粒体跨膜电位以及 ATP 的生成,防止线粒体膜间隙蛋白的释放[16-18]。本实验组对糖尿病大

鼠视网膜 MOMP/Bcl-2 蛋白通路上相关蛋白 Bax、Bak、caspase-3 水平均有抑制作用, 而对抗凋亡 Bcl-2 蛋白表达量则相应上升。证明 MOMP/Bcl-2 途径是该方降低糖尿病视网膜 RCPs 凋亡途径之一。是否还可通过其他途径来发挥治疗 DR 作用, 还需进一步探索研究。

本研究为传统化療方类药物治疗糖尿病视网膜病变的临床应用提供新的理论依据, 为临床靶向治疗方向增加更多的参考, 推动研究者从中药资源中筛选出更多有效的、特异性强的药物。

REFERENCES

- [1] WANG X A, XU Y S. Train of thought about differentiation of symptoms and signs in treatment of changes in retina caused by diabetes by TCM [J]. Jilin J Tradit Chin Med(吉林中医药), 2010, 30(7): 565-566.
- [2] 刘峥嵘, 秦裕辉. 中医治疗糖尿病视网膜病变的现代研究概况[J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(2): 156-158.
- [3] SUN R, HUI S X. In different periods of diabetic retinopathy in the observation of the curative effect of treatment of Huayumingmu decoction and its influence on VEGF [J]. World Chin Med(世界中医药), 2016, 11(1):75-78.
- [4] 黄建良, 喻干龙. 活血化療法治疗糖尿病视网膜病变 38 例 [J]. 湖南中医杂志, 2000, 16(1): 29.
- [5] RAO V R, PRESCOTT E, SHELKE N B, et al. Delivery of sar 1118 to the retina via ophthalmic drops and its effectiveness in a rat streptozotocin (stz) model of diabetic retinopathy (DR) [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(10): 5198-5204.
- [6] WANG J, CHENG X X, ZHU X L, et al. Effect of the union of Yiqi Bushen fang and tripterygium wilfordii polyglycosidum on expression of VEGF and secretion of IL-6 and TNF- α in rats with diabetic nephropathy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(6): 711-716.
- [7] EJAZ S, CHEKAROVA I, EJAZ A, et al. Importance of pericytes and mechanisms of pericyte loss during diabetes retinopathy [J]. Diabetes Obes Metab, 2008, 10(1): 53-63.
- [8] MOGENSEN C, BERGNER B, WALLNER S, et al. Isolation and functional characterization of pericytes derived from hamster skeletal muscle [J]. Acta Physiol, 2011, 201(4): 413-426.
- [9] PFISTER F, FENG Y H F, HOFFMANN S, et al. Pericyte migration: a novel mechanism of pericyte loss in experimental diabetic retinopathy [J]. Diabetes, 2008, 57(9): 2495-2502.
- [10] REERS M, SMILEY S T, MOTTOLA-HARTSHORN C, et al. Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye [J]. Method Enzymol, 1995(260): 406-417.
- [11] SMITH S W, CHAND S, SAVAGE C O. Biology of the renal pericyte [J]. Nephrol Dial Transpl, 2012, 27(6): 2149-2155.
- [12] SABANAYAGAM C. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and vision loss due to diabetes [J]. Diabetes Res Clin Pr, 2016, 120(1): S14.
- [13] KLAASSEN I, NOORDEN C J F V, SCHLINGEMANN R O. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions [J]. Prog Retin Eye Res, 2013, 34(5): 19-48.
- [14] WANG Y L, HUI Y N, GUO B. Inhibition of proliferation of retinal microvascular endothelial cells by pericytes through down-regulating KDR/Flk-1 in a co-culture system [J]. Int J Ophthalmol(国际眼科杂志), 2006, 6(2): 255-263.
- [15] ARMULIK A, GENOVÉ G, MÅE M, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier [J]. Nature, 2010, 468(7323): 557-561.
- [16] WILLIMOTT S, MERRAM T, WAGNER S D. Apoptosis induces Bcl-XS and cleaved Bcl-XL in chronic lymphocytic leukaemia [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 405(3): 480-485.
- [17] WANG J, BEANCHEMIN M, BERTRAND R. Bcl-xL phosphorylation at Set49 by polo kinase 3 during cell cycle progression and checkpoints [J]. Cell Signat, 2011, 23(12): 2030-2038.
- [18] GU X, YAO Y. Plasminogen K5 activates mitochondrial apoptosis pathway in endothelial cells by regulating Bak and Bcl-xl subcellular distribution [J]. Apoptosis, 2011, 16(8): 846-855.

收稿日期: 2018-04-20

(本文责编: 李艳芳)