# 异甘草素通过调节 VEGFA/NF-κB 通路抑制高糖诱导的 ARPE-19 细胞增殖、迁移

洪 萌， 李权达， 石荣先*
(河南大学第一附属医院眼科，河南 开封 475000)

**摘要：目的** 探讨异甘草素通过调节 VEGFA/NF-κB 通路抑制高糖诱导的 ARPE-19 细胞增殖、迁移。**方法** 异甘草素（30、60、120 μmol/L）处理 ARPE-19 细胞 24 h 后，加入 25 mmol/L 葡萄糖 24 h；将 si-con、si-VEGFA 质粒转染至 ARPE-19 细胞，加入 25 mmol/L 葡萄糖 24 h；异甘草素（60 μmol/L）处理 ARPE-19 细胞 24 h 后，将 pcDNA-con、pcDNA-VEGFA 质粒转染，加入 25 mmol/L 葡萄糖 24 h。MTT 检测细胞存活率；Western blot 检测基 MMP2、MMP9、VEGFA、CyclinD1、p-p65、p-IκBα 蛋白表达；Transwell 实验检测细胞迁移；PT-PCR 检测 *VEGFA* mRNA 表达。**结果** 高糖诱导的人视网膜上皮细胞 ARPE-19 存活率升高，MMP2、MMP9 蛋白表达升高，细胞迁移数量升高，VEGFA 蛋白 和 mRNA 表达升高（$P<0.05$）。异甘草素处理后高糖诱导的 ARPE-19 细胞中细胞存活率降低，MMP2、MMP9 蛋白表达降低，细胞迁移数量降低，VEGFA 蛋白和 mRNA 表达降低（$P<0.05$）；低表达 VEGFA 使高糖诱导的 ARPE-19 细胞中 CyclinD1、MMP2、MMP9 蛋白表达降低，细胞存活率降低，细胞迁移数量降低（$P<0.05$）。异甘草素处理后高糖诱导的 ARPE-19 细胞中 p-p65、p-IκBα 表达降低（$P<0.05$）；过表达 VEGFA 逆转了异甘草素对高糖诱导的 p-p65、p-IκBα 表达的抑制作用。**结论** 异甘草素可抑制高糖诱导的 ARPE-19 细胞增殖和迁移，其机制可能与 VEGFA 有关。

**关键词**：异甘草素；糖尿病视网膜病变；ARPE-19 细胞；VEGFA/NF-κB 通路
**中图分类号**：R285.5 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-1528(2020)10-2616-06
**doi**:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.10.014

# Isoliquiritin's inhibition on the proliferation and migration of high glucose-induced ARPE-19 cells *via* VEGFA/NF-κB pathway regulation

HONG Meng, LI Quan-da, SHI Rong-xian*
(*Department of Ophthalmology, The First Hospital Affiliated to Henan University, Kaifeng 475000, China*)

**ABSTRACT: AIM** To investigate isoliquiritin's inhibition on the proliferation and migration of high glucose-induced ARPE-19 cells *via* VEGFA/NF-κB pathway regulation. **METHODS** ARPE-19 cells treated with isoliquiritin (30, 60, 120 μmol/L) for 24 hrs were subjected to 24 hrs treatment of 25 mmol/L glucose; ARPE-19 cells transfected with si-con and si-VEGFA plasmids were treated with 25 mmol/L glucose for another 24 hrs; ARPE-19 cells treated with 24 hrs isoliquiritin (60 μmol/L) were transfected with pcDNA-con and pcDNA-VEGFA plasmids, and subsequently another 24 hrs administration of 25 mmol/L glucose. The cells had their viability detected by MTT assay; their expressions of MMP2, MMP9, VEGFA, Cyclin D1, p-p65 and p-IκBα identified by Western blot; their cellular migration determined by Transwell assay; and their *VEGFA* mRNA expression determined by RT-PC. **RESULTS** The high glucose induction led to significant survival rate increase of ARPE-19 cells, increase of MMP2 and MMP9 expression, number of cell migration, and the expressions of VEGFA protein and mRNA ($P<0.05$). Isoliquiritigenin treatment brought forth decreased cell viability, MMP2 and MMP9 expressions, cell migration number, and the expression of VEGFA protein and mRNA of ARPE-19 cells

**收稿日期**：2019-11-29
**基金项目**：河南省高等学校重点科研项目（18B310011）；开封市科技发展计划项目（1903065）
**作者简介**：洪 萌（1989—），女，硕士，主治医师，从事小儿眼科及斜弱视科研及教学工作。Tel：13849128749
*通信作者：石荣先（1965—），女，从事小儿眼科及斜弱视临床、科研及教学工作。Tel：13839989596

($P<0.05$). Low VEGFA expression significantly decreased expression of Cyclin D1, MMP2 and MMP9 in high glucose-induced ARPE-19 cells, cell viability, and cell migration ($P<0.05$). Isoliquiritigenin treatment significantly decreased the levels of p-p65 and p-IκBα expression in high glucose-induced ARPE-19 cells ($P<0.05$). VEGFA overexpression reversed the inhibitory effect of isoliquiritigenin on p-p65 and p-IκBα expression of high glucose-induced ARPE-19 cells. **CONCLUSION** Isoliquiritigenin inhibits the proliferation and migration of high glucose-induced ARPE-19 cells, and its mechanism may be related to VEGFA.

**KEY WORDS**: isoliquiritigenin; diabetic retinopathy; ARPE-19 cells; VEGFA/NF-κB pathway

糖尿病视网膜病变（diabetic retinopathy，DR）是糖尿病常见的微血管并发症之一，是患者致盲的重要原因之一，严重影响患者的健康和生活质量[1]，近年来，中医药对 DR 的治疗取得了一定的疗效，可从多环节、多靶点防治[2]。异甘草素是甘草中的异黄酮类化合物，具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等作用，适宜剂量下可保护糖尿病心肌病大鼠，维持心肌功能、代谢及心肌细胞结构正常[3]，在体外能够抑制骨肉瘤细胞 MG-63 的增殖与侵袭[4]；甘草黄酮可以抑制高糖诱导的人眼视网膜上皮细胞氧化损伤及凋亡的发生，预防糖尿病性视网膜病变[5]。血管内皮细胞生长因子 A（vascular endothelial growth factor A，VEGFA）为 VEGF 家族成员之一，是与微血管新生功能相关的生长因子，与 DR 的发生发展密切相关[6]，高迁移率族蛋白 A1（high mobility group protein A1，HMGA1）通过下调 VEGFA 表达来预防糖尿病性视网膜增生[7]，有研究发现中药联合激光降低 DR 患者 VEGF 水平可延缓糖尿病视网膜病变的病情发展[8]；核因子-κB（Nuclear factor κB，NF-κB）信号通路也与 DR 的发生有关，可阻断该信号通路对糖尿病大鼠视网膜起保护作用[9]，异甘草素能通过抑制 NF-κB 信号通路抑制人肺癌 H460 细胞的增殖和诱导细胞周期阻滞，并促进其凋亡[10]。然而，异甘草素对糖尿病视网膜病变的影响及其机制是否与 VEGFA 和 NF-κB 信号通路有关还尚未清楚。本实验用高糖处理人视网膜上皮细胞 ARPE-19 建立糖尿病视网膜病变模型，研究异甘草素对高糖诱导的 ARPE-19 细胞增殖和迁移的影响及其机制与 VEGFA 和 NF-κB 信号通路的关系。

## 1 材料

1.1 *细胞* 人视网膜上皮细胞系 ARPE-19，购自美国菌种保藏中心（ATCC）。

1.2 *试剂与药物* DMEM/F12 培养基（货号 SH30243.01）、胎牛血清（货号 SV30087.02）、胰蛋白酶（货号 SH30042.01）购自美国 Hyclone 公司；葡萄糖（货号 G116304）购自河北圣雪葡萄糖有限公司；异甘草素（货号 B21525-20 mg，纯度 98%）购自上海源叶生物科技有限公司；四甲基偶氮唑盐比色法（MTT）试剂盒（货号 C0009）、二辛可宁酸（BCA）试剂盒（货号 P0012S）、ECL 化学发光液（货号 P0018S）、聚偏二氟乙烯膜（polyvinylidene fluoride，PVDF）（货号 FFP39）、十二烷基硫酸钠、钠盐-聚丙烯酰胺凝胶电泳（dodecyl sulfate，sodium salt-Polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）试剂盒（货号 P0690）购自碧云天生物技术研究所；MMP2（货号 250752）、MMP9（货号 250755）抗体购自美国 Abbiotec 公司；VEGFA（货号 PL0502017）、Cyclin D1（货号 PL0502539）购自加拿大 Pllabs 公司；p-p65（货号 HZ-22488）购自美国 Santa 公司；p-IκBα 一抗抗体（货号 bs-18128R-2）购自上海玉博生物科技有限公司；山羊抗兔 IgG-HRP（货号 AAT-16793）购自美国 AAT Bioquest 公司；Transwell 小室（货号 353090）购于美国 BD 公司；LipofectamineTM 2000 转染试剂盒（货号 11668-027）美国 Invitrogen 公司；荧光定量试剂盒（货号 218073）购自德国 Qiagen 公司；载体质粒购自北京普瑞金科技有限公司。

1.3 *仪器* Thermo FC 酶标仪购自美国 Thermo 公司；LightCycler480 荧光定量 PCR 仪购自上海仁科生物科技有限公司；荧光倒置显微镜购自日本 Olympus公司。

## 2 方法

2.1 *细胞培养* 人视网膜上皮细胞系 ARPE-19 常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中，于含 5% $CO_2$ 的 37 ℃恒温箱中培养，每 1~2 d 换 1 次新鲜培养液，细胞融合至 90% 左右时进行消化传代，取对数生长期细胞用于实验。

2.2 *细胞处理与分组* 取正常培养细胞于 6 孔板培养，细胞贴壁且状态良好时更换为葡萄糖浓度为 25 mmol/L 的培养基继续培养 24 h，作为高糖组；

取正常培养的细胞，作为对照组；用浓度分别为30、60、120 μmol/L 的异甘草素处理 ARPE-19 细胞24 h，再用 25 mmol/L 的葡萄糖处理 24 h，作为不同浓度异甘草素处理组；将 si-con、si-VEGFA 转染至 ARPE-19 细胞后用 25 mmol/L 葡萄糖处理24 h，作为高糖 + si-con 组、高糖 + si-VEGFA 组；将 pcDNA-con、pcDNA-VEGFA 转染至 ARPE-19 细胞后用60 μmol/L的异甘草素处理 24 h，再用25 mmol/L 的葡萄糖处理 24 h，作为高糖+异甘草素+pcDNA-con 组、高糖+异甘草素+pcDNA-VEGFA 组。

2.3 MTT 试剂盒检测细胞存活率 各组细胞培养 48 h 后，分别加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL，在 37 ℃培养箱中孵育 4 h，吸去培养液，每孔加入 150 μL DMSO 振荡反应 15 min，酶标仪检测490 nm 波长处光密度（*OD*），细胞存活率 =（$OD_{实验组}$/$OD_{对照组}$）×100%。实验重复 3 次，每次 3 个复孔。

2.4 Western blot 检测蛋白表达 各组细胞培养 48 h后提取总蛋白，BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取 50 μg 总蛋白，经 10% 聚丙烯酰胺凝胶转至 PVDF 上，5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h，再分别加入一抗（MMP2、MMP9、VEGFA、CyclinD1、p-p65、p-IκBα），4 ℃孵育过夜，Tris 盐吐温缓冲液（Tris Buffer Solution Tween，TBST）洗膜，加入二抗室温孵育 90 min，TBST 洗涤 3 次，ECL 化学发光液显像，Quantity One 凝胶分析软件处理，测定各组蛋白条带的灰度值，蛋白相对表达量 = 目的条带灰度值/β-actin 条带灰度值。每个蛋白样品重复 3 次。

2.5 Transwell 实验检测细胞迁移 取 200 μL 细胞悬液种于 Transwell 小室上室，下室加入 500 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液，37 ℃培养 24 h后用 4% 多聚甲醛固定，再用 0.1% 结晶紫染色，显微镜观察并随机选取 5 个视野拍照计数，计算结晶紫染色细胞数，即为迁移细胞数。

2.6 RT-PCR 检测 *VEGFA* mRNA 表达 各组细胞培养 48 h 后提取总 RNA，再反转录成 cDNA，按照荧光定量试剂盒使用说明进行 PCR，每个样品 3 个重复，反应总体系 20 μL，其中 SYBR 9 μL，正、反向引物各 0.5 μL，cDNA 0.5 μL，$H_2O$ 9.5 μL。循环条件为 95 ℃ 3 min，95 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，共 40 个循环，60 ℃延长5 min，相对表达量用 $2^{-\triangle\triangle ct}$ 计算。以 β-actin 为内参，*VEGFA* 正向 5′-CCAGCAGAAAGAGGAAAGAGGTAG-3′，反向 5′-CCCCAA AAGCAGGTCACTCAC-3′；β-actin 正向 5′-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3′，反向 5′-GCT-GTCACCTTCACCGTTCC-3′。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 20.0 软件进行处理，计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，2 组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

3.1 不同浓度异甘草素对人视网膜上皮细胞 ARPE-19 增殖的影响 与对照组比较，葡萄糖处理后人视网膜上皮细胞 ARPE-19 的存活率升高（$P<0.05$）；与高糖组比较，不同浓度异甘草素组人视网膜上皮细胞 ARPE-19 的存活率降低（$P<0.05$），见表 1。

**表 1 不同浓度异甘草素对人视网膜上皮细胞 ARPE-19 增殖的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）**

**Tab. 1 Effects of isoliquiritigenin at different concentrations on the proliferation of ARPE-19 cells（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）**

| 组别 | 细胞存活率/% |
|---|---|
| 对照组 | 100.00±10.25 |
| 高糖组 | 162.35±16.25* |
| 高糖+30 μmol/L 异甘草素组 | 154.25±15.45# |
| 高糖+60 μmol/L 异甘草素组 | 123.05±12.30# |
| 高糖+120 μmol/L 异甘草素组 | 117.33±11.75# |

注：与对照组比较，*$P<0.05$；与高糖组比较，#$P<0.05$。

3.2 不同浓度异甘草素对人视网膜上皮细胞 ARPE-19 迁移的影响 与对照组比较，葡萄糖处理后人视网膜上皮细胞 ARPE-19 中 MMP2、MMP9 表达和迁移细胞数升高（$P<0.05$）；与葡萄糖处理组比较，不同浓度异甘草素组人视网膜上皮细胞 ARPE-19 中 MMP2、MMP9 表达和迁移细胞数降低（$P<0.05$），见表 2、图 1。

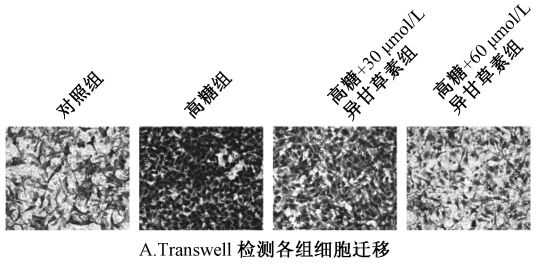
**表 2 不同浓度异甘草素对人视网膜上皮细胞 ARPE-19 迁移的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）**

**Tab. 2 Effectsof isoliquiritigenin at different concentrations on the migration of ARPE-19 cells（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）**

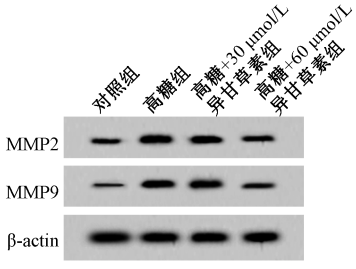
| 组别 | MMP2 | MMP9 | 迁移细胞数/个 |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 0.35±0.04 | 0.25±0.03 | 123.76±12.35 |
| 高糖组 | 0.88±0.09* | 0.75±0.07* | 324.13±32.42* |
| 高糖+30 μmol/L 异甘草素组 | 0.70±0.07 | 0.62±0.06 | 281.53±28.15 |
| 高糖+60 μmol/L 异甘草素组 | 0.48±0.05# | 0.36±0.04# | 182.46±18.25# |

注：与对照组比较，*$P<0.05$；与高糖组比较，#$P<0.05$。

3.3 异甘草素对 VEGFA 表达的影响 与对照组比较，葡萄糖处理后人视网膜上皮细胞 ARPE-19




A.Transwell 检测各组细胞迁移




B.Western blot 检测各组蛋白表达

**图 1 不同浓度异甘草素对人视网膜上皮细胞 ARPE-19 迁移的影响**

**Fig. 1 Effects of isoliquiritigenin at different concentrations on migration of ARPE-19 cells**

中 VEGFA 蛋白和 mRNA 表达升高（$P<0.05$）；与高糖组比较，高糖+60 μmol/L 异甘草素组人视网膜上皮细胞 ARPE-19 中 VEGFA 蛋白和 mRNA 表达降低（$P<0.05$），见图 2、表 3。

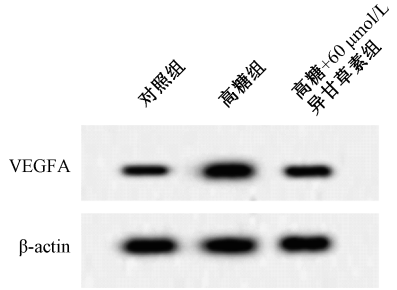



**图 2 Western Blot 检测 VEGFA 蛋白表达**

**Fig. 2 Detection of VEGFA protein expression by Western blot**

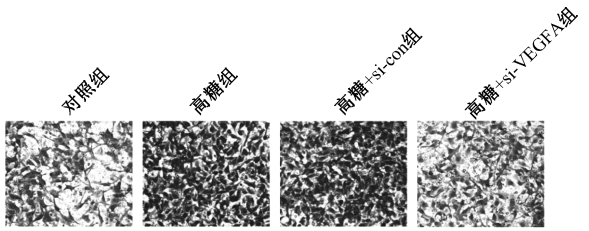
3.4 低表达 VEGFA 对人视网膜上皮细胞 ARPE-19 增殖和迁移的影响 与对照组比较，葡萄糖处理后人视网膜上皮细胞 ARPE-19 中 VEGFA、CyclinD1、MMP2、MMP9 表达，细胞存活率和迁移细胞数升高（$P<0.05$）；与高糖+si-con 组比较，高糖+si-VEGFA 组人视网膜上皮细胞 ARPE-19 中 VEGFA、CyclinD1、MMP2、MMP9 表达，细胞存活率和迁移细胞数降低（$P<0.05$），见图 3、表 4。

**表 3 异甘草素对 VEGFA 表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）**

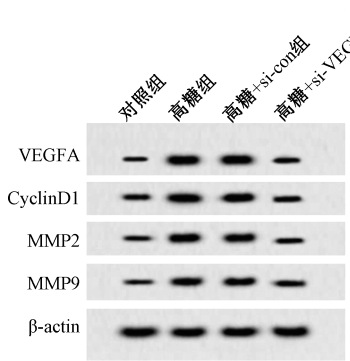
**Tab. 3 Effect of isoliquiritigenin on VEGFA expression（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）**

| 组别 | *VEGFA* mRNA | VEGFA 蛋白 |
|---|---|---|
| 对照组 | 1.05±0.10 | 0.40±0.04 |
| 高糖组 | 2.35±0.23* | 1.05±0.11* |
| 高糖+60 μmol/L 异甘草素组 | 1.35±0.14# | 0.55±0.06# |

注：与对照组比较，*$P<0.05$；与高糖组比较，#$P<0.05$。




A.Transwell 检测各组细胞迁移




B.Western blot 检测各组蛋白表达

**图 3 Western blot 检测 VEGFA、CyclinD1、MMP2、MMP9 蛋白表达（Ⅰ）**

**Fig. 3 Detection of VEGFA, CyclinD1, MMP2 and MMP9 protein expressions by Western blot（Ⅰ）**

3.5 高表达 VEGFA 可以部分逆转异甘草素对人视网膜上皮细胞 ARPE-19 增殖和迁移的抑制作用 与高糖组比较，高糖+异甘草素组人视网膜上皮细胞 ARPE-19 中 VEGFA、CyclinD1、MMP2、

**表 4 低表达 VEGFA 对人视网膜上皮细胞 ARPE-19 增殖和迁移的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）**

**Tab. 4 Effects of low VEGFA expression on the proliferation and migration of ARPE-19 cells（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）**

| 组别 | VEGFA | Cyclin D1 | MMP2 | MMP9 | 细胞存活率/% | 迁移细胞数/个 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 0.42±0.04 | 0.44±0.04 | 0.30±0.03 | 0.28±0.03 | 100.25±10.05 | 125.88±12.58 |
| 高糖组 | 1.10±0.11* | 1.06±0.10* | 0.85±0.09* | 0.76±0.08* | 162.58±16.25* | 325.27±32.53* |
| 高糖+si-con 组 | 1.08±0.12 | 1.12±0.13 | 0.86±0.09 | 0.75±0.07 | 165.04±16.50 | 321.01±32.10 |
| 高糖+si-VEGFA 组 | 0.58±0.06# | 0.60±0.06# | 0.44±0.04# | 0.38±0.05# | 128.20±12.82# | 172.35±17.25# |

注：与对照组比较，*$P<0.05$；与高糖+si-con 组比较，#$P<0.05$。

MMP9 表达，细胞存活率和迁移细胞数降低（$P<0.05$）；与高糖+异甘草素+pcDNA-con 组比较，高糖+异甘草素+pcDNA-VEGFA 组人视网膜上皮细胞 ARPE-19 中 VEGFA、CyclinD1、MMP2、MMP9 表达，细胞存活率和迁移细胞数升高（$P<0.05$），见图 4、表 5。

3.6 NF-κB 信号通路相关蛋白的表达 与高糖组比较，高糖+异甘草素组人视网膜上皮细胞 ARPE-19 中 p-p65、p-IκBα 表达降低（$P<0.05$）；与高糖+异甘草素+pcDNA-con 组比较，高糖+异甘草素+pcDNA-VEGFA 组人视网膜上皮细胞 ARPE-19 中 p-p65、p-IκBα 表达升高（$P<0.05$），见图 5、表 6。

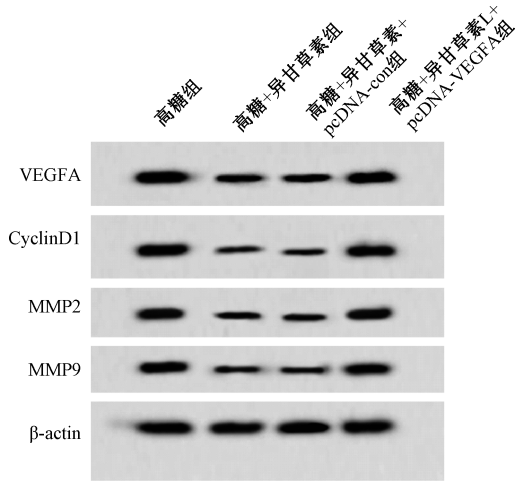



**图 4 Western blot 检测 VEGFA、CyclinD1、MMP2、MMP9 蛋白表达（Ⅱ）**

**Fig. 4 Detection of VEGFA, CyclinD1, MMP2 and MMP9 protein expressions by Western blot (Ⅱ)**

## 4 讨论

DR 的发病机理尚未完全清楚，病变晚期以增殖性糖尿病视网膜病变形成为主，在视网膜增殖性病变的增生膜中有多种细胞参与，其中视网膜色素上皮细胞的增生迁移在增殖性病变中起重要作用，高糖可促进视网膜色素上皮细胞增生[11]。本实验用高糖处理人视网膜上皮细胞系 ARPE-19，结果显示高糖诱导的人视网膜上皮细胞 ARPE-19 存活率显著升高，MMP2、MMP9 蛋白表达显著升高，细胞迁移数量显著升高，说明高糖确实促进了 ARPE-19 细胞增殖和迁移。有研究发现异甘草素可以抑制肾透明细胞癌 786-O 细胞的增殖、迁移和侵袭，并通过磷脂酰肌醇 3 激酶（phosphatidylinositol-3-kinase，PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）/哺乳动物雷帕霉素蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）信号通路诱导细胞自噬[12]，异甘草素可通过调控 PI3k/Akt 信号通路抑制小儿血管瘤内皮细胞的生长和侵袭，诱导细胞周期阻滞，并促进细胞凋亡[13]，还可通过下调 MMP2 和 MMP9 的表达抑制胶质瘤干细胞迁移和侵袭[14]。本实验结果显示，经异甘草素处理的高糖诱导 ARPE-19 细胞中细胞存活率，MMP2、MMP9 蛋白表达和细胞迁移数显著降低，说明异甘草素可以抑制 ARPE-19 细胞增殖和迁移，预防视网膜

**表 5 高表达 VEGFA 可以部分逆转异甘草素处理的人视网膜上皮细胞 ARPE-19 增殖和迁移（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）**

**Tab. 5 High VEGFA expression partially reversed proliferation and migration of isoliquiritigenin-treated ARPE-19 cells（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）**

| 组别 | VEGFA | CyclinD1 | MMP2 | MMP9 | 细胞存活率/% | 细胞迁移数/个 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 高糖组 | 1.08±0.11 | 1.05±0.10 | 0.88±0.09 | 0.75±0.07 | 100.20±10.05 | 328.01±32.81 |
| 高糖+异甘草素组 | 0.54±0.05* | 0.40±0.04* | 0.45±0.05* | 0.36±0.04* | 62.38±6.25* | 180.55±18.05* |
| 高糖+异甘草素+pcDNA-con 组 | 0.56±0.06 | 0.45±0.05 | 0.42±0.04 | 0.35±0.03 | 60.30±6.05 | 182.57±18.26 |
| 高糖+异甘草素+pcDNA-VEGFA 组 | 0.92±0.09# | 0.86±0.09# | 0.72±0.07# | 0.68±0.06# | 86.34±8.65# | 288.08±28.82# |

注：与高糖组比较，* $P<0.05$；与高糖+异甘草素+pcDNA-con 组比较，# $P<0.05$。

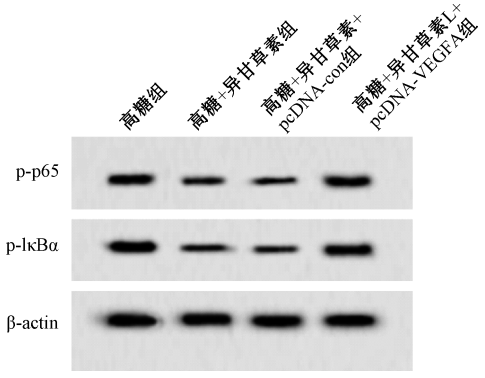



**图 5 Western blot 检测 p-p65、p-IκBα 的蛋白表达**

**Fig. 5 Detection of p-p65 and p-IκBα protein expressions by Western blot**

**表 6 NF-κB 信号通路相关蛋白的表达（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）**

**Tab. 6 Expressions of NF-κB signaling pathway-associated proteins（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）**

| 组别 | p-p65 | p-IκBα |
|---|---|---|
| 高糖组 | 0.76±0.08 | 0.92±0.10 |
| 高糖+异甘草素组 | 0.25±0.02* | 0.35±0.04* |
| 高糖+异甘草素+pcDNA-con 组 | 0.28±0.03 | 0.38±0.05 |
| 高糖+异甘草素+pcDNA-VEGFA 组 | 0.65±0.07# | 0.80±0.08# |

注：与高糖组比较，* $P<0.05$；与高糖+异甘草素+pcDNA-con 组，# $P<0.05$。

病变。

VEGF 高表达可促进血管的异常生长，影响 DR 的发生[15]。VEGFA 是 VEGF 成员之一，是促血管生成因子，在促进内皮细胞的存活、迁移和增殖以及增强血管通透性中发挥作用，可下调 VEGFA 来减轻 DR 的发展[16]，同时 miR-195-5p 能通过靶向 VEGFA 抑制宫颈癌 HeLa 细胞侵袭和转移[17]。本实验结果显示，高糖诱导的人视网膜上皮细胞 ARPE-19 中 *VEGFA* mRNA 和蛋白表达升高，进一步转染 si-VEGFA 后发现，ARPE-19 细胞中 CyclinD1、MMP2、MMP9 蛋白表达，细胞存活率和细胞迁移数量降低，说明 VEGFA 低表达可抑制 ARPE-19 细胞增殖和迁移；经异甘草素处理后，*VEGFA* mRNA 和蛋白表达降低，说明该成分可下调 VEGFA 表达，从而抑制 ARPE-19 细胞增殖和迁移。

NF-κB 信号通路与糖尿病血管并发症有关，糖尿病视网膜病变患者血清中其表达显著增加[18]，银杏叶提取物可通过抑制 NF-κB 活性抑制视网膜色素上皮细胞炎症反应，保护视网膜色素上皮细胞，防治糖尿病视网膜病变[19]；柚皮苷能通过抑制炎症，氧化应激和 NF-κB 活化来减轻糖尿病性视网膜病变[20]。本实验结果显示，异甘草素处理后高糖诱导的 ARPE-19 细胞中 p-p65、p-IκBα 表达降低，说明该成分可抑制 NF-κB 信号通路的激活，而过表达 VEGFA 逆转了它对高糖诱导 p-p65、p-IκBα 表达的抑制作用，可能通过 VEGFA 影响 NF-κB 信号通路。

综上所述，异甘草素可抑制高糖诱导的 ARPE-19 细胞增殖和迁移，其机制可能与 VEGFA 及 NF-κB 信号通路有关，可为糖尿病视网膜病变的防治提供新方法。

**参考文献：**

[1] 刘 旭，王 霞，何 媛. 糖尿病视网膜病变危险因素与预防研究进展[J]. 眼科新进展，2018，38(7)：687-691.

[2] 杨 敏，罗向霞，康 莉，等. 中医药防治糖尿病视网膜病变机制研究进展[J]. 中华中医药杂志，2018，33(11)：5041-5044.

[3] 黎心四. 异甘草素对糖尿病心肌病大鼠的保护效应及机制[D]. 福州：福建医科大学，2014.

[4] 高焕涛，张 达，季 峰，等. 异甘草素对人骨肉瘤细胞 MG-63 增殖及侵袭的影响[J]. 解剖科学进展，2019，25(1)：60-62；69.

[5] 王 鹤，厉新新，孙晓会，等. 甘草黄酮拮抗高糖诱导的视网膜色素上皮细胞损伤及分子机制[J]. 中国中医眼科杂志，2019，29(1)：10-13；18.

[6] 闫 配，张晓红，张 莉，等. HMW-ADP、TNF-α、VEGF 与糖尿病视网膜病变的关系研究[J]. 中国医药导报，2019，16(9)：106-109.

[7] Chiefari E，Ventura V，Capula C，*et al*. A polymorphism of HMGA1 protects against proliferative diabetic retinopathy by impairing HMGA1-induced VEGFA expression[J]. *Sci Rep*，2016，6：39429.

[8] 金 梅. 中药联合激光及抗 VEGF 治疗糖尿病视网膜病变 22 例[J]. 中医外治杂志，2019，28(1)：8-10.

[9] 王海彬，董志军，郭立涛，等. 菩人丹超微粉对 STZ 诱导糖尿病大鼠视网膜病变的保护作用及其对 NF-κB 信号通路的影响[J]. 吉林大学学报（医学版），2018，44(4)：759-763.

[10] 覃月穆，姜泽群，马艳霞，等. 异甘草素对人肺癌细胞株 H460 增殖、凋亡及 NF-κB 信号通路的影响[J]. 天然产物研究与开发，2018，30(5)：847-855.

[11] 侯文文，石焕琦，张 真，等. 自噬抑制剂 3-MA 对高糖诱导的人视网膜色素上皮细胞增生的抑制作用[J]. 中华实验眼科杂志，2017，35(1)：5-9.

[12] 辛 红，孙鹏然，宋 鹏，等. 异甘草素对人肾透明细胞癌 786-O 细胞抗癌作用及分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25(12)：83-89.

[13] 李 燕，张瑞丽. 异甘草素对小儿血管瘤内皮细胞生物学特性及 PI3K/AKT 信号通路的影响[J]. 郑州大学学报（医学版），2019，54(1)：24-28.

[14] 党 莹，林瑜亮，孙红军，等. 异甘草素通过下调基质金属蛋白酶抑制人脑胶质瘤干细胞迁移和侵袭[J]. 浙江大学学报（医学版），2018，47(2)：181-186.

[15] 贾明利，李庆雨. VEGF、bFGF 在糖尿病视网膜病变中的表达及意义[J]. 中国实用医药，2017，12(21)：37-39.

[16] Li E H，Huang Q Z，Li G C，*et al*. Effects of miRNA-200b on the development of diabetic retinopathy by targeting VEGFA gene[J]. *Biosci Rep*，2017，37(2)：BSR20160572.

[17] 张 巍，李 芳，赵曼曼. miR-195-5p 通过靶向调控 VEGFA 的表达对宫颈癌 HeLa 细胞侵袭和迁移能力的影响[J]. 医学分子生物学杂志，2019，16(2)：99-106.

[18] 周垂仁，黄 卫，江 玲. 糖尿病视网膜病变血清 miR-146a 与核转录因子-kB 和 VEGF 的相关性[J]. 国际眼科杂志，2018，18(8)：91-93.

[19] 南 娜，赵 萍，张 睿. 银杏叶提取物对 NF-κB 活性抑制人视网膜色素上皮细胞炎症反应的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23(18)：163-167.

[20] Liu L，Zuo Z，Lyu S，*et al*. Naringin attenuates diabetic retinopathy by inhibiting inflammation，oxidative stress and NF-κB activation *in vivo* and *in vitro*[J]. *Iran J Basic Med Sci*，2017，20(7)：813-821.