

NF- κ B-TNF- α and TGF- β 1-MAPK-fibronectin pathways. [J]. *Physiol Renal Physiol*, 2017; 313(2): F414-F422.

[13] Elmarakby A A, Baban B, Liu J Y, *et al.* The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy: Potential Use as Predictive Markers for Early Detection and Progression[M]. 2013; 233-263.

[14] Li J, Bao L, Zha D, *et al.* Oridonin protects against the inflammatory response in diabetic nephropathy by inhibiting the TLR4/p38-MAPK and TLR4/NF- κ B signaling pathways. [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 55: 9-19.

[15] Yang S, Zhang J, Wang S, *et al.* SOCS2 overexpression alleviates diabetic nephropathy in rats by inhibiting the TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(53): 91185-91198.

[16] Zhang Y Y, Tang P M, Tang P C, *et al.* LRNA9884, a Novel Smad3-Dependent Long Noncoding RNA, promotes diabetic kidney injury in db/db mice via enhancing MCP-1-dependent renal inflammation[J]. *Diabetes*, 2019, 68(7): 1485-1498.

[17] Siddiqui K, Joy S S, Al-Rubeaan K *et al.* Association of urinary monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and kidney injury molecule-1 (KIM-1) with risk factors of diabetic kidney disease in type 2 diabetes patients [J]. *Int Urol Nephrol*, 2019, 51 (8): 1379-1386.

[18] Yang H, Xie T, Li D, *et al.* Tim-3 aggravates podocyte injury in diabetic nephropathy by promoting macrophage activation via the NF- κ B/TNF- α pathway[J]. *Mol Metab*, 2019, 23: 24-36.

[19] 陈小盼, 陈 竑, 陈 韩. 2 型糖尿病肾病患者血清 chemerin 和 TNF- α 水平的变化及意义[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(39): 7593-7594.

[20] Awad AS, You H, Gao T, *et al.* Macrophage-derived tumor necrosis factor- α mediates diabetic renal injury[J]. *Kidney Int*, 2015, 88(4): 722-733.

[21] Stefanidis I, Kreuer K, Dardiotis E, *et al.* Association between the interleukin-1 β Gene (IL-1B) C-511T polymorphism and the risk of diabetic nephropathy in type 2 diabetes: a candidate-gene association study. [J]. *Dna & Cell Biology*, 2014, 33(7): 463-468.

[22] Sun T, Liu Y, Liu L, Ma F *et al.* MicroRNA-544 attenuates diabetic renal injury via suppressing glomerulosclerosis and inflammation by targeting FASN [J]. *Gene*, 2020, 723: 143986.

丹红化瘀口服液含药血清对氯化钴诱导 EA. hy926 细胞缺氧损伤的保护作用

唐 萍¹, 陈文培¹, 陆紫琪¹, 杨 威², 林宝琴¹, 桂蜀华^{1*}

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价研究企业重点实验室, 广东 广州 510990)

摘要: **目的** 研究丹红化瘀口服液含药血清对氯化钴 (CoCl₂) 诱导人脐静脉内皮细胞 (EA. hy926 细胞) 缺氧损伤的保护作用。**方法** 建立 CoCl₂ 诱导 EA. hy926 细胞缺氧模型, MTT 法检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞凋亡, 透射电镜观察细胞超微结构。试剂盒检测细胞上清液的谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力和丙二醛 (MDA) 水平, RT-PCR 检测缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子 (VEGF)、血管内皮生长因子受体 1 (VEGFR1)、血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2) 及诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) mRNA 表达。**结果** 5%~10% 丹红化瘀口服液含药血清能增强缺氧损伤细胞的活力 ($P<0.05$, $P<0.01$), 抑制细胞凋亡 ($P<0.05$, $P<0.01$), 减轻细胞结构损伤, 降低细胞 MDA 水平和升高 GSH-Px 水平 ($P<0.05$, $P<0.01$), 剂量依赖性地下调细胞 HIF-1 α 、VEGF、VEGFR1、VEGFR2 及 iNOS mRNA 表达 ($P<0.01$)。**结论** 丹红化瘀口服液含药血清通过抗氧化作用减轻氯化钴诱导的 EA. hy926 细胞缺氧损伤。

关键词: 丹红化瘀口服液; 糖尿病视网膜膜病变; EA. hy926 细胞; 缺氧; 抗氧化; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)03-0760-06

doi: 10. 3969/j.issn.1001-1528. 2021. 03. 038

收稿日期: 2019-07-01
基金项目: 广东省药物非临床评价研究企业重点实验室 (2018B030323024); 广东省科技厅公益研究与能力建设 (2016A020217016)
作者简介: 唐 萍 (1997—), 女, 硕士生, 从事新药研发。E-mail: 1379584049@qq.com
* 通信作者: 桂蜀华 (1972—), 女, 博士, 副教授, 从事新药研发。E-mail: gjl615@gzucm.edu.cn

糖尿病视网膜病变（diabetic retinopathy, DR）是糖尿病最常见和最严重的微血管并发症之一，是全球成年人致盲的主要原因^[1]。在中国，23%糖尿病患者并发 DR^[2]。随着糖尿病发病率逐年增加，DR 发病形势日益严峻，如果不采取紧急措施，2030 年全球 DR 病人将高达 191 00 万^[3]。高血糖引起血流灌注减少和内皮细胞损伤等血管功能障碍，导致视网膜局部缺血缺氧，继而诱发新生血管形成^[4-5]。氧化应激是引起 DR 的重要病理机制^[6-7]。因此，抑制氧化应激和保护内皮细胞对于防治 DR 具有重要意义。

丹红化瘀口服液由丹参、当归、川芎、桃仁、红花、柴胡和枳壳组成，具有活血化瘀、行气通络的功效，可用于气滞血瘀引起的视物模糊和视网膜中央静脉阻塞症的吸收期。本课题组发现丹红化瘀口服液有效防治自发性Ⅱ型糖尿病 ZDF 大鼠 DR^[8]和链脲佐菌素（STZ）诱导的大鼠 DR^[9]，且减轻高糖诱导的 EA.hy926 细胞损伤^[10]。本实验采用 CoCl₂ 诱导的 EA.hy926 细胞缺氧损伤模型，从抗氧化角度研究丹红化瘀口服液含药血清对内皮细胞的保护作用，进一步探讨其防治 DR 的作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠（SPF 级），体质量（220±20）g，购于广州中医药大学实验动物中心，实验动物生产许可证号 SCXK（粤）2013-0020。

1.2 细胞 EA.hy926 细胞购于中国科学院上海生命科学研究院。

1.3 药物和试剂 丹红化瘀口服液（批号 B5A002）购于广州白云山和记黄埔中药有限公司。DMEM 培养基（批号 8114125）、胰蛋白酶（批号 1369113）购于美国 Gibco 公司；胎牛血清（批号 1407738）购于以色列 Biological Industries 公司；青链霉素混合液（100X，批号 20140415）购于北京 Solarbio 公司；CoCl₂·6H₂O（批号 G7021）、噻唑蓝（MTT）（批号 MKBP4399V）购于美国 Sigma 公司；Annexin V-FITC 凋亡试剂盒，包含 Annexin V binding buffer 10X（批号 E10075-1634）、Annexin V FITC（批号 EO0887-1638）、Propidium Iodide staining soLution（批号 E14525-106），均购于美国 eBioscience 公司；硫代巴比妥酸反应物质（Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS）（批号 0458288）、谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathione peroxidase, GSH-Px）检测试剂盒（批号 0473965）购于美国 Cayman 公司；M-MLV 逆转录试剂盒（货号 6210A）、SYBR® Premix Ex Taq™ 定量 PCR 试剂盒（货号 RR420A）购于日本 TaKaRa 公司。

1.4 仪器 MCO-20AIC 型细胞培养箱（日本三洋电机株式会社）；L535R 型台式冷冻离心机（湖南湘仪实验室开发有限公司）；BDS300 型倒置生物显微镜（重庆奥特光学仪器有限公司）；SW-CJ-2FD 型洁净工作台（苏净集团苏州安泰空气技术有限公司）；Multiskan FC 型酶标仪（美国赛默飞公司）；2300-001M 型荧光酶标仪（PerkinElmer 公司）；FACSCanto™ II 型流式细胞仪（美国 BD 公司）；

7500 型实时荧光定量 PCR 仪（美国 ABI 公司）。

2 方法

2.1 溶液配制

2.1.1 丹红化瘀口服液含药血清制备 大鼠丹红化瘀口服液的给药剂量为 3.2 mL/kg，连续灌胃 5 d，于末次给药 1 h 后颈动脉采血，3 000 r/min 离心，分离血清，于 56 ℃ 温育 30 min 灭活，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，-20 ℃ 保存备用。试验时用培养基稀释至所需浓度。

2.1.2 CoCl₂ 溶液制备 称取 0.237 9 g CoCl₂·6H₂O，溶于 1 L DMEM 培养基中，混匀，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，配制母液浓度为 1 000 μmol/L，4 ℃ 避光保存。试验时用培养基稀释至所需浓度。

2.2 缺氧模型的建立 EA.hy926 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青/链霉素的 DMEM 培养基，培养于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱。取对数生长期细胞制备细胞悬液，以 5×10³/孔接种于 96 孔板，待细胞贴壁后，每孔分别加入终浓度 10、50、100、200、400、600、800、1 000 μmol/L CoCl₂ 溶液，培养 12、24、48、72 h。MTT 法检测细胞活力，筛选最佳造模浓度和时间。

2.3 丹红化瘀口服液含药血清对正常细胞活力的影响 细胞以 5×10³/孔接种于 96 孔板。待细胞贴壁后，分别加入终浓度为 1%、5%、10%、20% 的空白血清或含药血清，培养 24、48、72 h。MTT 法检测细胞活力，筛选最佳给药浓度。

2.4 丹红化瘀口服液含药血清对缺氧诱导损伤细胞的活力的影响 细胞以 5×10³/孔接种于 96 孔板，待细胞贴壁后，给药组每孔加入终浓度为 400 μmol/L 的 CoCl₂ 溶液，并分别加入终浓度为 1%、5%、10% 的含药血清，孵育 48 h，MTT 法检测细胞活力。

2.5 丹红化瘀口服液含药血清对缺氧诱导细胞凋亡的影响 按“2.4”项下的方法进行造模和给药。弃培养基，PBS 洗涤细胞，用连接缓冲液重悬细胞，调整细胞密度为 1×10⁶~5×10⁶/mL。取 100 μL 细胞悬液，加入 5 μL 的 Annexin V-FITC，室温孵育 10~15 min，连接缓冲液洗涤、重悬细胞，往细胞悬液中加入 5 μL 的 PI，流式细胞仪检测。

2.6 丹红化瘀口服液含药血清对缺氧诱导损伤细胞超微结构的影响 按“2.4”项下方法进行造模和给药。弃培养基，PBS 洗涤细胞，2.5% 戊二醛溶液固定，1% 锇酸溶液再次固定，梯度乙醇脱水，再以丙酮、环氧树脂 812 处理，超薄切片，饱和醋酸双氧铀溶液染色，水洗，烘干，于透射显微镜下观察细胞超微结构并拍照。

2.7 丹红化瘀口服液含药血清对缺氧诱导损伤细胞上清 MDA 水平和 GSH-Px 活力的影响 按“2.4”项下方法进行造模和给药，收集细胞上清液，按 TBARS 试剂盒说明书操作，采用硫代巴比妥酸法测细胞上清液 MDA 水平，酶标仪设定波长为 530~540 nm，检测各孔的 OD。按 GSH-Px 试剂盒说明书操作，采用二硫对硝基苯甲酸法测定细胞上清液 GSH-Px 活力，酶标仪设定波长为 340 nm，检测各孔的 OD，每分钟 1 次，共 5 min，计算结果。

2.8 丹红化癥口服液含药血清对缺氧诱导损伤细胞 mRNA 表达的影响 按“2.4”项下的方法进行造模和给药。TRIzol 法提取 RNA，加焦碳酸二乙酯（DEPC）水溶解沉淀。超微量紫外分光光度计测定 RNA 溶液浓度， OD_{260}/OD_{280} 值在 1.8~2.0 之间说明 RNA 纯度满足要求。取总 RNA 1.5 μg ，按逆转录试剂盒说明书进行逆转录，收集逆转录产物进行 PCR 反应。甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、*GAPDH*）、低氧诱导因子-1 α （hypoxia inducible factor-1, *HIF-1 α* ）、血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, *VEGF*）、血管内皮细胞生长因子受体 1（vascular endothelial growth factor receptor 1, *VEGFR1*）、血管内皮细胞生长因子受体 2（vascular endothelial growth factor receptor 2, *VEGFR2*）、诱导型一氧化氮合酶（inductible nitric oxide synthase, *iNOS*）引物序列见表 1，按 RT-PCR 仪操作规范进行 PCR 试验，反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，95 $^{\circ}\text{C}$ 退火 3 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 34 s，共 45 个循环。 $\Delta C_t = C_{t\text{目的基因}} - C_{t\text{GAPDH}}$ ， $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{实验}} - \Delta C_{t\text{对照}}$ ，实验结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示。

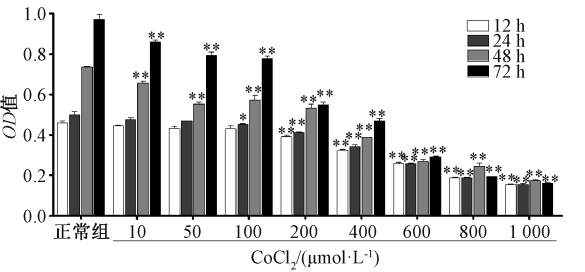
表 1 引物序列	
基因	引物序列
<i>GAPDH</i>	正向 5'-ACAGTCAGCCGCATCTTC-3'
	反向 5'-CTCCGACCTTCACCTTCC-3'
<i>HIF-1α</i>	正向 5'-GTGGTTACTCAGCACTTTTAG-3'
	反向 5'-AATCTCCGTCCTCAACCTCT-3'
<i>VEGF</i>	正向 5'-GGCAAAACGAAAGCGCAAG-3'
	反向 5'-GAGGCTCCAGGCATTAGAC-3'
<i>VEGFR1</i>	正向 5'-TTTGCCTGAAATGCTGAGTAAGG-3'
	反向 5'-TGCTTTGCTTGAGCTGTGTTC-3'
<i>VEGFR2</i>	正向 5'-GTGATCGGAAATGACACTGGAG-3'
	反向 5'-CATGTTGCTCACTAACAGAAGCA-3'
<i>iNOS</i>	正向 5'-TCCCGAAGTCTCAAGGCAC-3'
	反向 5'-TGTCTTCACTGTGGGGCTT-3'

2.9 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件，计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

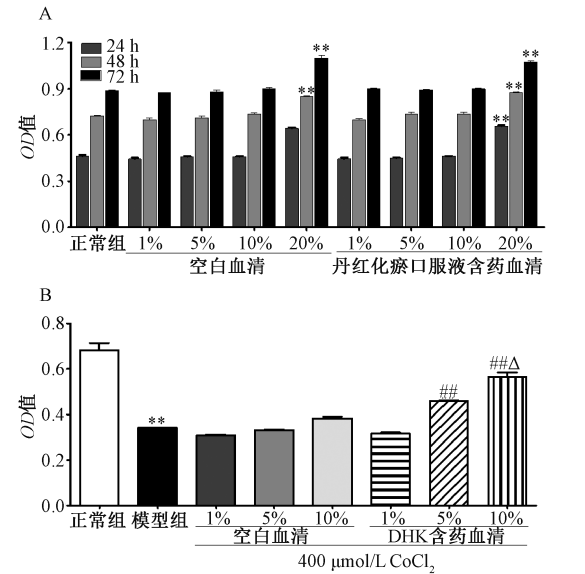
3.1 缺氧模型的建立 图 1 显示，随着培养时间延长，细胞的 *OD* 逐渐增加，提示细胞生长状态良好。随着 CoCl_2 作用浓度增加，细胞的 *OD* 逐渐降低，当 CoCl_2 浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ ，培养时间为 48 h 时，增殖抑制率约 40%。因此，选择 CoCl_2 浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ ，培养时间为 48 h 作为缺氧模型建立的条件。

3.2 丹红化癥口服液含药血清对细胞活力的影响 图 2A 显示，20% 空白血清和丹红化癥口服液含药血清处理 24、48、72 h 均能提高正常细胞的活力，而 1%~10% 空白血清和 DHK 含药血清对正常细胞的活力均无影响，因此，选择 1%、5%、10% 丹红化癥口服液含药血清进行后续实验。图 2B 显示，将 1%、5%、10% 丹红化癥口服液含药血清分别与 400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 共孵育 48 h 后，5%、10% 含药血清能剂量依赖性地促进缺氧细胞的生长 ($P<0.01$)。



注：与相应时间点正常组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 1 CoCl_2 对细胞活力的影响 ($n=6$)



注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ ；与 5% 丹红化癥口服液含药血清组比较， Δ $P<0.01$ 。

图 2 丹红化癥口服液含药血清对正常细胞 (A) 和缺氧细胞 (B) 活力的影响 ($n=4$)

3.3 丹红化癥口服液含药血清对缺氧诱导细胞凋亡的影响

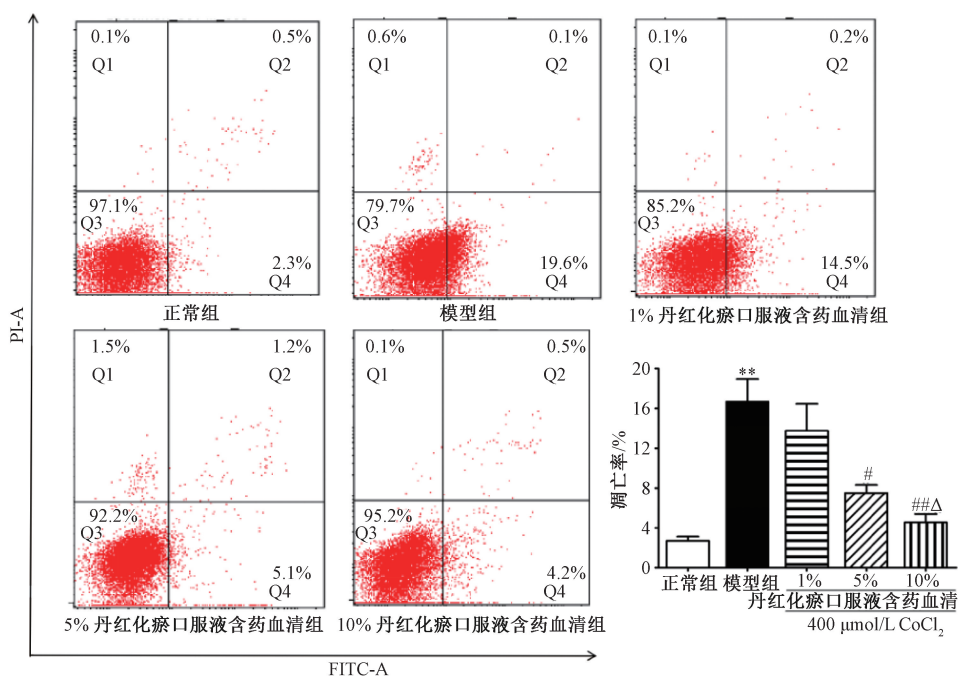
图 3 显示，与正常组相比，模型组细胞凋亡率增加 ($P<0.01$)。与模型组相比，5%、10% 丹红化癥口服液含药血清剂量依赖性降低细胞凋亡率 ($P<0.05$ ， $P<0.01$)。

3.4 丹红化癥口服液含药血清对缺氧诱导损伤细胞超微结构的影响

图 4 显示，正常组细胞胞质均匀，细胞器结构正常，少见空泡，核仁圆润明显，染色质分布均匀；模型组细胞收缩，形态扭曲，胞质中大量线粒体肿胀甚至空泡样改变，胞核固缩，核仁消失，染色质凝聚；丹红化癥口服液含药血清组细胞形态呈类圆形，结构完整，胞质中可见少量线粒体肿胀空泡样改变，胞核形态正常，核仁清晰可见，少部分染色质凝聚。

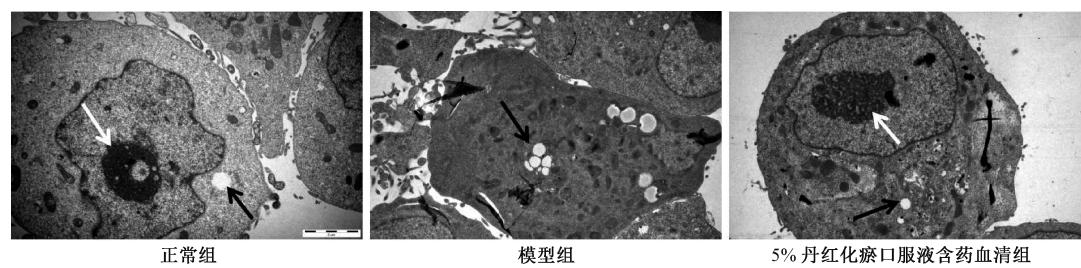
3.5 丹红化癥口服液含药血清对缺氧诱导损伤细胞上清的

MDA 水平和 GSH-Px 水平的影响 图 5 显示，与正常组相比，模型组细胞上清液 MDA 水平升高，而 GSH-Px 水平下降 ($P<0.01$)；与模型组比较，给予 10% 丹红化癥口服液含药血清培养 48 h 后，细胞 MDA 水平下降约 40%，GSH-Px 水平升高约 95% ($P<0.01$)。



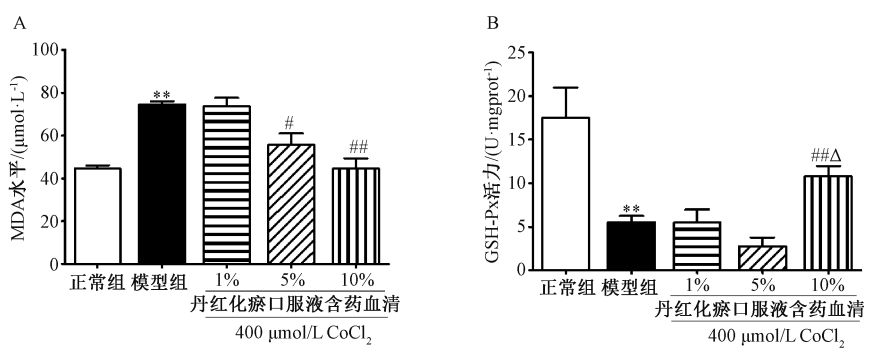
注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与 5% 丹红化瘀口服液含药血清组比较，△ $P<0.05$ 。

图 3 丹红化瘀口服液含药血清对缺氧诱导损伤细胞凋亡的影响 (n=6)



注：黑色箭头表示线粒体空泡样改变；白色箭头表示核仁。

图 4 各组细胞超微结构电子显微镜图

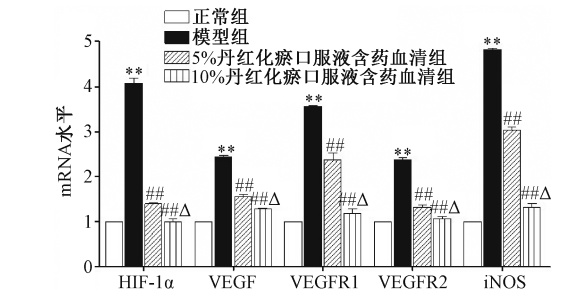


注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与 5% 丹红化瘀口服液含药血清组比较，△ $P<0.01$ 。

图 5 丹红化瘀口服液含药血清对缺氧诱导损伤细胞 MDA 水平 (A) 和 GSH-Px 水平 (B) 的影响 (n=6)

3.6 丹红化瘀口服液含药血清对缺氧诱导损伤细胞的 mRNA 表达的影响 图 6 显示，与正常组相比，模型组细胞 *HIF-1α*、*VEGF*、*VEGFR1*、*VEGFR2*、*iNOS* mRNA 表达均增加 ($P<0.01$)。与模型组相比，5%、10% 含药血清呈剂量依赖性降低细胞 *HIF-1α*、*VEGF*、*VEGFR1*、*VEGFR2* 及 *iNOS* 的 mRNA 表达 ($P<0.01$)。

4 讨论
CoCl₂ 是一种常用于体外细胞缺氧造模的诱导剂，其机制主要与稳定胞内 *HIF-α* 持续表达有关^[11]。*HIF-α* 是缺氧状态下最重要的转录因子，与 *HIF-β* 形成异源二聚体 *HIF*，识别并结合调控基因中的低氧反应元件，激活靶基因如 *VEGF* 等的转录^[12]。本实验中用 400 μmol/L *CoCl₂* 孵育



注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ ；与 5% 丹红化瘀口服液含药血清组比较， $\Delta P<0.01$ 。

图 6 丹红化瘀口服液含药血清对缺氧诱导损伤细胞的 mRNA 表达的影响 ($n=3$)

EA.hy926 细胞 48 h，使细胞活力明显下降，细胞凋亡，细胞 *HIF-1α* 的 mRNA 呈现高表达状态，说明该模型成功建立。5%~10% 含药血清剂量依赖性地提高缺氧诱导细胞的生长活力，减少凋亡，说明丹红化瘀口服液对缺氧所致损伤的细胞具有一定的保护作用。

细胞内脂质过氧化被认为在退行性眼病尤其是 DR 中扮演着重要的角色^[13]。MDA 是细胞脂质过氧化的最终产物，其浓度的高低可用于脂质过氧化损伤程度的评估^[14-15]。DR 病人血清中 MDA 水平远高于其他没有代谢性疾病的眼病患者^[16]。本实验发现在缺氧条件下细胞上清液中 MDA 水平显著升高，含药血清可以有效降低细胞的 MDA 水平。这提示着丹红化瘀口服液有降低脂质过氧化而减轻缺氧损伤的作用。

抗氧化系统在氧化应激过程中尤为重要。高血糖和缺氧状态下，GSH-Px 等抗氧化酶大量消耗，使得视网膜毛细血管内皮细胞处于氧化应激和硝基化应激状态，诱导细胞凋亡，导致早期 DR 血流动力学改变和微血管病变^[17-18]。本实验也发现在缺氧条件下，细胞上清液中 GSH-Px 水平显著下降，而含药血清可以有效地提高细胞上清液中 GSH-Px 水平。结果提示，丹红化瘀口服液能增强细胞的抗氧化能力，从而对抗缺氧损伤。

VEGF 是 DR 发病机制中的关键因子，与其特异性受体结合后，既可刺激血管内皮细胞增殖及移行来诱导视网膜新生血管形成，又可显著增加视网膜血管的通透性，加速 DR 的发展^[8,19]。本实验中缺氧诱导的细胞中 *VEGF*、*VEGFR1* 以及 *VEGFR2* mRNA 均明显上升。含药血清下调 *VEGF*、*VEGFR1* 以及 *VEGFR2* mRNA 过表达，提示丹红化瘀口服液可以抑制 *VEGF*、*VEGFR1* 以及 *VEGFR2* 的高表达，从而保护内皮细胞。

缺氧时，细胞 iNOS 表达异常高，诱导 NO 大量合成^[20]。过量的 NO 会与超氧阴离子自由基反应，生成具有强氧化性的过氧化亚硝酸离子，进而分解成有毒物质，加速细胞膜发生脂质过氧化，促使内皮细胞凋亡^[21]。含药血清降低缺氧诱导细胞中 *iNOS* 的 mRNA 高表达，提示丹红化瘀口服液可以抑制 *iNOS* 高表达来保护内皮细胞。

综上所述，丹红化瘀口服液含药血清可抑制缺氧所致

细胞增殖、凋亡和形态改变，升高细胞 GSH-Px 水平，降低 MDA 水平，下调 *HIF-1α*、*VEGF*、*VEGFR1*、*VEGFR2*、*iNOS* mRNA 过表达，可见其可通过抗氧化作用来减轻缺氧所致的内皮细胞损伤。

参考文献：

[1] Solomon S D, Chew E, Duh E J, *et al.* Diabetic retinopathy: a position statement by the American diabetes association [J]. *Diabetes Care*, 2017, 40(9) : 412-418.

[2] Liu L, Wu X, Liu L, *et al.* Prevalence of diabetic retinopathy in mainland China: a meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (9) : e45264.

[3] Zheng Y, He M, Congdon N. The worldwide epidemic of diabetic retinopathy [J]. *Indian J Ophthalmol*, 2012, 60(5) : 428-431.

[4] Semeraro F, Cancarini A, dell' Omo R, *et al.* Diabetic retinopathy: vascular and inflammatory disease [J]. *J Diabetes Res*, 2015, 2015 : 582060.

[5] Barot M, Gokulgandhi M R, Patel S, *et al.* Microvascular complications and diabetic retinopathy: recent advances and future implications [J]. *Future Med Chem*, 2013, 5 (3) : 301-314.

[6] Li C, Miao X, Li F, *et al.* Oxidative stress-related mechanisms and antioxidant therapy in diabetic retinopathy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017 : 9702820.

[7] Al-Kharashi A S. Role of oxidative stress, inflammation, hypoxia and angiogenesis in the development of diabetic retinopathy [J]. *Saudi J Ophthalmol*, 2018, 32(4) : 318-323.

[8] Chen W P, Wang Y D, Ma Y, *et al.* Danhong Huayu Koufuye combined with metformin attenuated diabetic retinopathy in Zucker diabetic fatty rats [J]. *Int J Ophthalmol*, 2015, 8(6) : 1094-1100.

[9] Chen W, Yao X, Zhou C, *et al.* Danhong Huayu Koufuye prevents diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats via antioxidation and anti-inflammation [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017 : 3059763.

[10] Zhang Z, Chen W, Wang Y, *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory effects of DHK-mediated serum on high glucose-induced injury in endothelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16 (5) : 7745-7751.

[11] Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, *et al.* Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(18) : 15911-15916.

[12] Wang G L, Semenza G L. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(29) : 21513-21518.

[13] Njie-Mbye Y F, Kulkarni-Chitnis M, Opere C A, *et al.* Lipid peroxidation: pathophysiological and pharmacological implications in the eye [J]. *Front Physiol*, 2013, 4 : 366.

[14] Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges [J]. *Anal Biochem*, 2017,

524; 13-30.

[15] Ayala A, Muñoz M F, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 360438.

[16] Brzović-Šarić V, Landeka I, Šarić B, *et al.* Levels of selected oxidative stress markers in the vitreous and serum of diabetic retinopathy patients[J]. *Mol Vis*, 2015, 21: 649-664.

[17] Fan Y, Qiao Y, Huang J, *et al.* Protective effects of *Panax notoginseng* saponins against high glucose-induced oxidative injury in rat retinal capillary endothelial cells[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 5326382.

[18] 马英琦, 黄延芹, 徐云生. 糖尿病视网膜病变瘀血病机及 VEGF 作用初探[J]. 亚太传统医药, 2019, 15 (4): 210-212.

[19] 陈小红, 王云鹏, 陈梅珠. VEGF 在糖尿病性视网膜病变发病机制中的作用及抗 VEGF 治疗新进展[J]. 眼科新进展, 2015, 35(7) : 692-696.

[20] Yuan X, Guo X, Deng Y, *et al.* Chronic intermittent hypoxia-induced neuronal apoptosis in the hippocampus is attenuated by telmisartan through suppression of iNOS/NO and inhibition of lipid peroxidation and inflammatory responses[J]. *Brain Res*, 2015, 1596: 48-57.

[21] Albrecht E W, Stegeman C A, Heeringa P, *et al.* Protective role of endothelial nitric oxide synthase[J]. *J Pathol*, 2003, 199(1) : 8-17.

白花蛇舌草多糖对肾癌荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫调节作用的影响

张林超
(河南省中医院泌尿外科, 河南 郑州 450002)

摘要: **目的** 探讨白花蛇舌草多糖对肾癌荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫调节作用的影响。**方法** 通过皮下接种 Renca 细胞建立肾癌荷瘤小鼠模型, 将小鼠随机分为荷瘤模型组、黄芪多糖 (100 mg/kg) 组及白花蛇舌草多糖高 (200 mg/kg)、低 (100 mg/kg) 剂量组, 每组 12 只; 另随机选取未造模小鼠 12 只作为正常组。灌胃给药, 1 次/d, 持续给药 14 d。实验结束后, 评价各组小鼠体质量、瘤质量、免疫器官指数、淋巴细胞转化及 CTL 杀伤活性、外周血 T 淋巴 CD4+和 CD8+细胞亚群、血清 IFN-γ 和 IL-2 水平等指标改变情况。**结果** 与荷瘤模型组比较, 白花蛇舌草多糖高剂量组小鼠体质量增加 ($P<0.05$), 高、低剂量组小鼠瘤质量下降 ($P<0.05$); 与荷瘤模型组比较, 白花蛇舌草多糖高、低剂量组小鼠脾脏指数、胸腺指数、淋巴细胞转化程度、CTL 杀伤活性、CD4+细胞百分比、CD4+/CD8+比值、血清 IFN-γ 和 IL-2 水平均增加 ($P<0.05$), 而 CD8+细胞百分比降低 ($P<0.05$)。**结论** 白花蛇舌草多糖对肾癌荷瘤小鼠肿瘤生长具有抑制作用, 该作用与免疫调节作用有关。

关键词: HDP; 肾癌; 免疫; T 淋巴细胞亚群; 细胞因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)03-0765-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.03.039

白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd 属茜草科耳草属植物, 别名尖刀草、白花十字草、二叶葎等, 始载于《广西中药志》, 具有利尿除湿、消痛散结及清热解毒之功效。现代药学研究^[1]发现, 白花蛇舌草具有抗肿瘤、抗氧化、抗病毒、抗感染及免疫调节等作用, 其活性成分包括黄酮类、蒽醌类、挥发油类、烷烃类、甾体类、萜类及多糖类。白花蛇舌草多糖为白花蛇舌草的活性成分之一, 具有抗肿瘤、免疫调节及抗氧化等多种生物活性^[2]。白花蛇舌草多糖对肝癌、宫颈癌、非小细胞肺癌及胃癌等的增殖均有抑制作用, 对肾癌的研究报道较少^[3-5]。同时, 鉴于白花蛇舌草多糖具有较好的增强免疫能力^[6], 而肾癌又被公认为免疫原

性肿瘤, 对免疫治疗较敏感^[7]。因此, 本研究通过皮下接种 Renca 细胞建立肾癌荷瘤小鼠模型, 主要探讨白花蛇舌草多糖对肾癌荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫调节作用的影响, 为其进一步的临床应用奠定基础。

1 材料

- 1.1 动物与细胞株 昆明种小鼠, 雄性, SPF 级, 体质量 (20±2) g, 购于斯贝福实验动物公司, 动物生产许可证号 SCXK (京) 2016-0002。小鼠肾癌 Renca 细胞, 购于中科院上海细胞库。
- 1.2 药物与试剂 白花蛇舌草多糖 (纯度>80%), 批号 20180216, 西安天瑞生物技术有限公司; 黄芪多糖 (纯度>