

引文格式:张新霞,王小敏,陆丽红,王保君,狄文玉. 薯蓣皂苷对高糖诱导的视网膜色素上皮细胞损伤的保护作用[J]. 眼科新进展,2022,42(4):278-283. doi:10.13389/j.cnki.rao.2022.0056

【实验研究】

薯蓣皂苷对高糖诱导的视网膜色素上皮细胞损伤的保护作用[△]

张新霞 王小敏 陆丽红 王保君 狄文玉

作者简介:张新霞 (ORCID: 0000-0002-5893-0804),女,1979年11月出生,河南新乡人,硕士,副主任医师。研究方向:眼底病与小儿眼科。E-mail:zhangxinxia2008@163.com
通信作者:狄文玉 (ORCID: 0000-0002-9641-8633),男,1978年6月出生,河南新乡人,硕士,副主任医师。研究方向:头颈部及消化病理。E-mail:friend1240@163.com

收稿日期:2021-09-16

修回日期:2022-01-17

本文编辑:付中静

△基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(编号:SBCJ2018055)

作者单位:453100 河南省新乡市,新乡医学院第一附属医院眼科(张新霞,王小敏,陆丽红,王保君);453100 河南省新乡市,新乡医学院第一附属医院病理科(狄文玉)

【摘要】 目的 探讨薯蓣皂苷(Dio)对高糖(HG)诱导的视网膜色素上皮(RPE)细胞损伤的保护作用,并分析其机制。**方法** 用细胞计数试剂8(CCK-8)法筛选葡萄糖浓度和无细胞毒性的Dio剂量范围。将ARPE-19细胞分为对照组(5 mmol·L⁻¹葡萄糖处理48 h)、模型组(50 mmol·L⁻¹葡萄糖处理48 h)和低、中、高剂量Dio处理组(分别用50 mmol·L⁻¹葡萄糖联合0.5 mmol·L⁻¹、2.0 mmol·L⁻¹和8.0 mmol·L⁻¹ Dio处理48 h)。CCK-8法检测细胞活性;FITC标记膜联蛋白-V/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)染色检测细胞凋亡;荧光探针法检测活性氧(ROS)水平;试剂盒法检测丙二醛(MDA)水平、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性;JC-1染色检测线粒体膜电位;Western blot法检测B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、cleaved Caspase-3和Yes相关蛋白(YAP)的表达水平;免疫荧光法观察YAP的表达。**结果** 筛选的葡萄糖浓度为50 mmol·L⁻¹,Dio的无细胞毒性的剂量为0.5 mmol·L⁻¹、2.0 mmol·L⁻¹、8.0 mmol·L⁻¹。与对照组比较,模型组细胞活性、线粒体膜电位、CAT和GSH-Px活性以及Bcl-2蛋白和YAP蛋白表达水平均明显降低(均为 $P < 0.001$),细胞凋亡水平、ROS和MDA水平以及cleaved Caspase-3蛋白和Bax蛋白表达水平均明显升高(均为 $P < 0.001$);与模型组比较,低、中、高剂量Dio处理组细胞活性、线粒体膜电位、CAT和GSH-Px活性以及Bcl-2蛋白和YAP蛋白表达水平均明显升高(均为 $P < 0.05$),细胞凋亡水平、ROS和MDA水平以及cleaved Caspase-3蛋白和Bax蛋白表达水平均明显降低,且均呈剂量依赖性(均为 $P < 0.05$)。**结论** Dio可通过激活YAP信号,降低氧化应激反应和抑制线粒体介导的细胞凋亡途径,进而减轻HG诱导的RPE细胞损伤。

【关键词】 薯蓣皂苷;糖尿病视网膜病变;视网膜色素上皮细胞;高糖;氧化应激;细胞凋亡
【中图分类号】 R966;R774.1

糖尿病是一种严重危害人类健康的常见慢性代谢性疾病^[1]。该病引起的长期代谢紊乱可诱发糖尿病视网膜病变(DR),引起患者视力下降甚至失明^[2]。一般认为,血-视网膜屏障缺陷是诱发DR的机制之一,其中,视网膜色素上皮(RPE)细胞在维持血-视网膜屏障的完整性中发挥关键作用^[3]。高糖(HG)环境极易诱导RPE细胞发生氧化应激并引发细胞凋亡,这一作用机制在DR进展中发挥重要作用^[4]。

薯蓣皂素(Dio)是一种高生物活性的天然甾体皂甙元,已被证明具有抗高血脂、抗炎及抗癌的特性^[5-7],且其在糖尿病及并发症(包括糖尿病肾病、糖尿病肝病、糖尿病生殖功能障碍等)中的治疗作用亦有相关报道^[8-13]。而Dio对DR疾病的效用以及内在分子调控机制尚未完全清楚。因此,本研究通过HG诱导法构建RPE细胞株(ARPE-19)损伤模型,观察Dio对HG诱导的细胞损伤的影响并探讨可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 ARPE-19细胞购自广州吉妮欧生物科技有限公司。胎牛血清(FBS)、改良Ea-

gle培养基(DMEM)购自美国Gibco公司。细胞计数试剂8(CCK-8)试剂盒购自德国Roche公司。FITC标记膜联蛋白-V/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)凋亡检测试剂盒及流式细胞仪购自美国BD公司。丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒购自南京建成生物工程有限公司。电化学发光(ECL)试剂、JC-1线粒体膜电位检测试剂盒购自上海碧云天公司。RIPA试剂、 β -actin抗体、二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量检测试剂盒购自武汉博士德公司。B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶3(Caspase-3)、cleaved Caspase-3、Yes相关蛋白(YAP)抗体和辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗兔IgG二抗购自美国Cell Signaling Technology公司。Alexa Fluor 647-羊抗兔IgG荧光二抗购自美国Santa Cruz公司。2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针、DAPI购自美国Sigma-Aldrich公司。IX83荧光显微镜购自日本Olympus公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 在含有体积分数为10% FBS、体积分数为1%青链霉素的DMEM培养基中培养ARPE-19细胞,并置于37℃、体积分数为5% CO₂培

养箱进行孵育。培养基每周更新3次。

1.2.2 HG 诱导的 ARPE-19 细胞模型构建与分组

处理 为探讨 Dio 对 RPE 细胞的保护作用机制,本研究首先构建了 HG 诱导的 RPE 细胞损伤模型。葡萄糖的浓度筛选:ARPE-19 细胞以 5×10^7 个 $\cdot L^{-1}$ 接种于 96 孔板,分别用递增浓度 ($5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、 $10 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、 $20 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、 $30 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 和 $50 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$) 葡萄糖处理 48 h,用 CCK-8 试剂盒检测各浓度葡萄糖处理的细胞活性,选择最低细胞活性匹配的葡萄糖浓度。

Dio 的无细胞毒性剂量范围筛选:ARPE-19 细胞以 5×10^7 个 $\cdot L^{-1}$ 接种于 96 孔板,分别用递增浓度 ($0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、 $0.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、 $2.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、 $8.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 和 $16.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$) Dio 处理 48 h,用 CCK-8 试剂盒检测各浓度葡萄糖处理的细胞活性,选择无细胞毒性的 Dio 剂量范围。

根据 CCK-8 法筛选葡萄糖浓度和 Dio 无细胞毒性剂量范围后,将细胞分为对照组[仅给予正常浓度 ($5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$) 葡萄糖处理 ARPE-19 细胞 48 h]、模型组[仅给予 $50 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 葡萄糖处理 ARPE-19 细胞 48 h]和低、中、高剂量 Dio 处理组[分别用 $50 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 葡萄糖联合 $0.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、 $2.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 和 $8.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ Dio 处理 ARPE-19 细胞 48 h]。

1.2.3 细胞活性检测 用 CCK-8 试剂盒检测不同处理方式处理后 ARPE-19 细胞活性。待细胞按“1.2.2”方法分组处理后,将 CCK-8 溶液(每孔 $10 \mu L$)添加入培养基中,并将细胞再次放置于培养箱中孵育 1 h。使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度。细胞活性 = 各处理组吸光度/对照组吸光度 $\times 100\%$ 。

1.2.4 细胞凋亡检测 用 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒检测各组 ARPE-19 细胞凋亡情况。 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集各组 ARPE-19 细胞后,将细胞重悬于结合缓冲液,每组各取 $500 \mu L$ 细胞悬液,加入 $5 \mu L$ Annexin V-FITC 和 $10 \mu L$ PI 后室温避光孵育 15 min,用流式细胞仪分析并检测各组细胞凋亡情况,用 FlowJo 软件分析细胞凋亡比例。

1.2.5 细胞活性氧水平检测 用 DCFH-DA 荧光探针检测活性氧(ROS)水平。 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集各组 ARPE-19 细胞后,加入 $10 \mu \text{mol} \cdot L^{-1}$ DCFH-DA 试剂并在黑暗条件下于 $37^\circ C$ 孵育 20 min。PBS 洗涤 3 次后,用流式细胞仪在激发波长和发射波长分别为 488 nm 和 520 nm 下检测细胞,并用 FlowJo 软件分析 ROS 阳性细胞比例。

1.2.6 氧化应激指标检测 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集各组 ARPE-19 细胞后,分别按照各检测试剂盒说明,使用 MDA、CAT 和 GSH-Px 试剂盒检测各组 ARPE-19 细胞的 MDA 水平以及 CAT 和 GSH-Px 活性情况。

1.2.7 线粒体膜电位检测 用 JC-1 线粒体膜电位

检测试剂盒检测各组 ARPE-19 细胞内线粒体膜电位变化情况。ARPE-19 细胞按照各组分组方法处理后,PBS 洗 3 次;向细胞中加入 $2 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 的 JC-1 染色工作液, $37^\circ C$ 避光孵育 30 min 后,PBS 洗 3 次;用荧光显微镜分别在 488 nm 激发波长和 535 nm 发射波长下检测 JC-1 单体(绿色荧光)荧光强度值;在 559 nm 激发波长和 590 nm 发射波长下检测 JC-1 聚集体(红色荧光)荧光强度值。用红绿荧光强度的相对比例来确定线粒体膜电位。

1.2.8 Western blot 检测蛋白表达水平 用 RIPA 裂解液萃取各组 ARPE-19 细胞的蛋白,并各取 $20 \mu g$ 蛋白进行 Western blot 检测。封闭非特异位点后,在 $4^\circ C$ 下孵育一抗(Bcl-2、Bax、Caspase-3 均按 1:2000 稀释;cleaved Caspase-3、YAP 均按 1:1000 稀释, β -actin 按 1:8000 稀释)过夜。TBST 洗涤后,室温孵育 HRP-羊抗兔 IgG 二抗 1 h。加入 ECL 试剂后,用化学发光成像分析仪显像,用 Quantity One 软件定量蛋白的相对表达水平。

用免疫荧光染色法观察 YAP 蛋白表达情况。将各组 ARPE-19 细胞固定并封闭后,在 $4^\circ C$ 下孵育 YAP 一抗(1:500 稀释)过夜。用 PBS 漂洗后,室温避光孵育 Alexa Fluor 647-羊抗兔 IgG 二抗 1.5 h。加入 DAPI 后,在荧光显微镜下观察,用 ImageJ 软件量化荧光强度。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件对所有数据进行分析,数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组之间比较采用单因素方差分析,同时用 Bonferroni 校正。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 HG 诱导的 ARPE-19 细胞损伤模型建立

CCK-8 法检测不同浓度葡萄糖处理 ARPE-19 细胞后的细胞活性,结果显示(图 1A),与 $5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 葡萄糖比较,葡萄糖浓度为 $30 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 和 $50 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时 ARPE-19 细胞的细胞活性均明显降低($P < 0.05$ 、 $P < 0.001$),且在 $50 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时最为明显,故后续实验选择葡萄糖浓度为 $50 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 。

2.2 Dio 对 HG 诱导的 ARPE-19 细胞损伤的影响

CCK-8 法筛选 Dio 无细胞毒性剂量范围,结果显示(图 1B),与 $0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ Dio 比较,Dio 浓度为 $16.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时的 ARPE-19 细胞的细胞活性明显降低($P < 0.01$);而与 $0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ Dio 比较, $0.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、 $2.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、 $8.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ Dio 的细胞活性均无明显改变(均为 $P > 0.05$),故后续实验选择 Dio 浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、 $2.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 、 $8.0 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 。与对照组比较,模型组细胞活性明显降低($P < 0.001$),细胞凋亡水平明显增加($P < 0.001$);与模型组比较,低、中、高剂量 Dio 处理组细胞活性均明显增加,细胞凋亡水平均显著降低,且呈浓度依赖性(均为 $P < 0.05$)(表 1)。

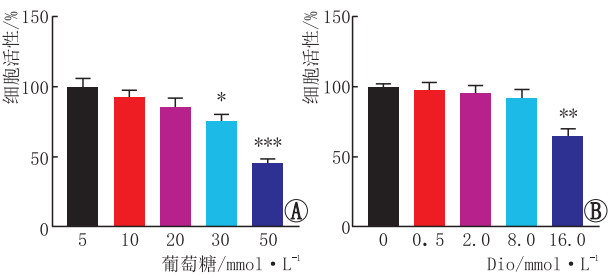


图1 不同浓度葡萄糖(A)和Dio(B)对ARPE-19细胞活性的影响 与5 mmol·L⁻¹葡萄糖比较, **P* < 0.05, ****P* < 0.001; 与0 mmol·L⁻¹ Dio比较, ***P* < 0.01。

2.3 Dio对 各组ARPE-19细胞的氧化应激水平的影响 与对照组比较,模型组细胞ROS和MDA水平均明显升高(均为*P* < 0.001),细胞CAT和GSH-Px活性均明显降低(均为*P* < 0.001);与模型组比较,低、中、高剂量Dio处理组细胞ROS和MDA水平均明显降低,CAT和GSH-Px活性均明显增加,且呈浓度依赖性(均为*P* < 0.05)(表2)。

表2 各组细胞ROS和MDA水平以及CAT和GSH-Px活性比较

(*n* = 3)

组别	ROS 水平/%	MDA 水平/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	CAT 活性/($\text{IU} \cdot \text{L}^{-1}$)	GSH-Px 活性/($\text{IU} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照组	101.45 ± 8.05	5.02 ± 1.58	13.24 ± 0.86	23.04 ± 1.21
模型组	256.78 ± 19.45 [#]	25.69 ± 1.34 [#]	4.75 ± 1.21 [#]	5.23 ± 0.72 [#]
低剂量 Dio 处理组	202.56 ± 15.34 *	14.73 ± 2.68 **	6.05 ± 0.47 *	8.12 ± 0.91 *
中剂量 Dio 处理组	172.39 ± 24.62 **	12.32 ± 1.42 **	8.12 ± 0.68 **	11.73 ± 1.04 **
高剂量 Dio 处理组	121.04 ± 4.03 ***	7.86 ± 1.06 ***	10.76 ± 0.93 ***	16.85 ± 0.95 ***
<i>F</i>	89.67	186.54	105.37	169.26
<i>P</i>	0.00	0.00	0.00	0.00

注:与对照组比较,[#]*P* < 0.001;与模型组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01,****P* < 0.001。

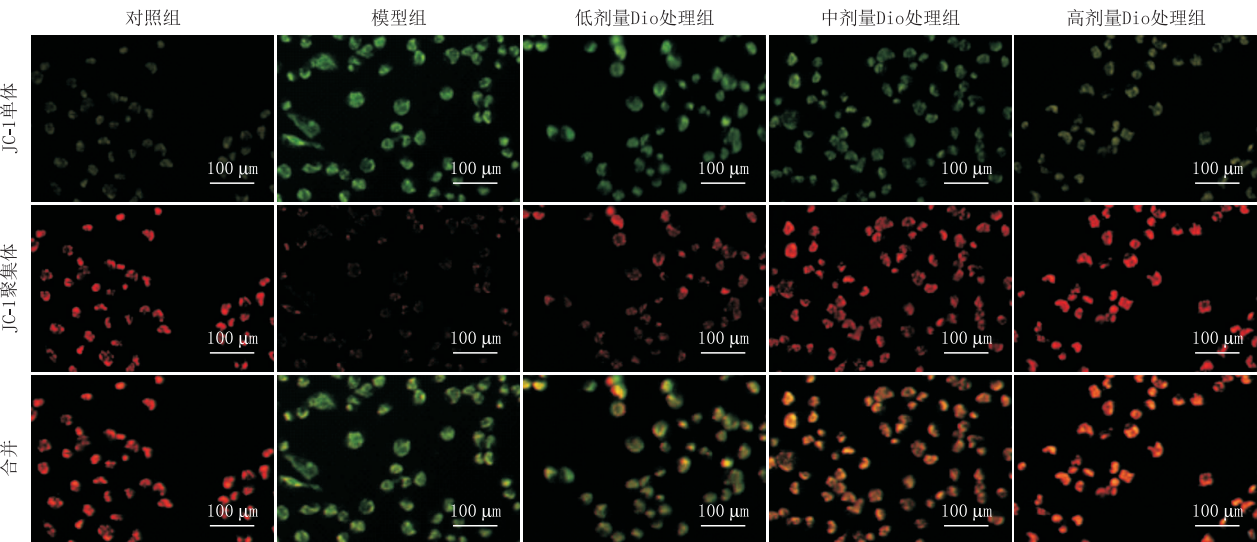


图2 各组细胞代表性JC-1免疫荧光染色图

2.5 Dio对 各组ARPE-19细胞中Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase-3和YAP蛋白表达的影响 West-

表1 各组细胞活性和细胞凋亡水平的比较 (*n* = 3)

组别	细胞活性/%	细胞凋亡水平/%
对照组	99.45 ± 6.42	3.56 ± 1.02
模型组	41.26 ± 5.89 [#]	22.78 ± 2.04 [#]
低剂量 Dio 处理组	52.63 ± 7.69 *	17.69 ± 1.54 *
中剂量 Dio 处理组	70.89 ± 3.52 **	12.59 ± 2.69 **
高剂量 Dio 处理组	84.61 ± 5.02 ***	8.24 ± 0.68 ***
<i>F</i>	112.54	235.48
<i>P</i>	0.00	0.00

注:与对照组比较,[#]*P* < 0.001;与模型组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01,****P* < 0.001。

2.4 Dio对 各组ARPE-19细胞线粒体膜电位的影响 JC-1 检测结果显示,对照组、模型组以及低、中、高剂量Dio处理组细胞的线粒体膜电位分别为0.67 ± 0.04、0.05 ± 0.01、0.09 ± 0.01、0.16 ± 0.02和0.28 ± 0.03;与对照组比较,模型组细胞的线粒体膜电位明显降低(*P* < 0.001);与模型组比较,低、中、高剂量Dio处理组细胞的线粒体膜电位均明显增加,且呈浓度依赖性(均为*P* < 0.05)(图2)。

ern blot 检测结果显示(图3、表3),与对照组比较,模型组细胞中cleaved-Caspase-3蛋白和Bax蛋白表

达水平均明显升高(均为 $P < 0.001$),细胞中 Bcl-2 蛋白和 YAP 蛋白表达水平均明显降低(均为 $P < 0.001$);与模型组比较,低、中、高剂量 Dio 处理组细胞中 cleaved Caspase-3 蛋白和 Bax 蛋白表达水平均明显降低,细胞中 Bcl-2 和 YAP 蛋白表达水平均明显升高,且呈浓度依赖性(均为 $P < 0.05$)。YAP 蛋白免疫荧光染色结果显示(图 4,表 3),对照组细胞中 YAP 蛋白荧光强度较强;与对照组比较,模型组细胞中 YAP 蛋白荧光强度明显降低($P < 0.001$);与模型组比较,低、中、高剂量 Dio 处理组细胞中 YAP 蛋白随着 Dio 浓度增加而逐渐增多,且 YAP 蛋白荧光强度呈浓度依赖性增强(均为 $P < 0.05$)。

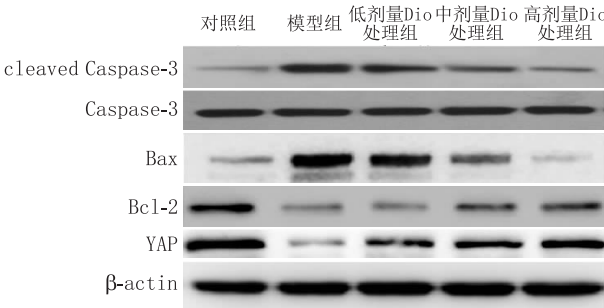


图3 Western blot 检测各组细胞中 cleaved Caspase-3、Caspase-3、Bax、Bcl-2 和 YAP 蛋白表达情况

表3 各组细胞中 cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2、YAP 蛋白表达水平及 YAP 蛋白荧光强度的比较 (n=3)

组别	cleaved Caspase-3 蛋白表达水平	Bax 蛋白表达水平	Bcl-2 蛋白表达水平	YAP 蛋白表达水平	YAP 荧光强度
对照组	1.02 ± 0.15	1.06 ± 0.24	1.03 ± 0.09	0.98 ± 0.10	542.43 ± 74.76
模型组	8.64 ± 1.23 [#]	10.52 ± 2.01 [#]	0.17 ± 0.05 [#]	0.11 ± 0.04 [#]	31.24 ± 7.15 [#]
低剂量 Dio 处理组	5.63 ± 0.76 [*]	8.02 ± 1.04 [*]	0.24 ± 0.07	0.28 ± 0.06 [*]	204.25 ± 31.62 ^{***}
中剂量 Dio 处理组	2.75 ± 0.32 ^{***}	3.71 ± 0.76 ^{***}	0.41 ± 0.06 ^{***}	0.49 ± 0.06 ^{***}	308.49 ± 44.76 ^{***}
高剂量 Dio 处理组	1.56 ± 0.21 ^{***}	1.09 ± 0.38 ^{***}	0.63 ± 0.08 ^{***}	0.71 ± 0.11 ^{***}	401.65 ± 65.83 ^{***}
F	182.61	123.14	94.86	143.75	204.89
P	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

注:与对照组比较,[#] $P < 0.001$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{***} $P < 0.001$ 。

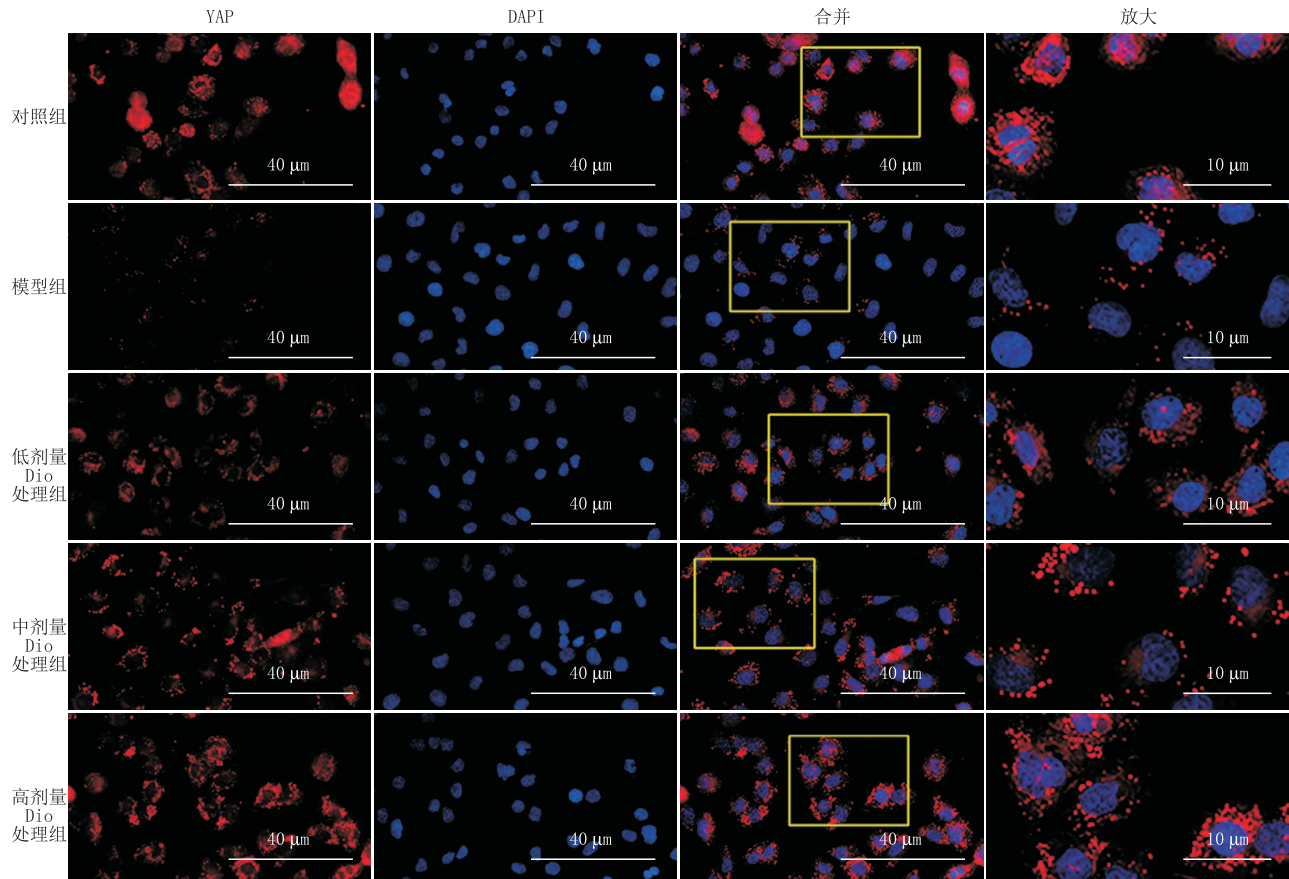


图4 各组细胞中 YAP 蛋白免疫荧光染色情况

3 讨论

糖尿病是一种慢性代谢性疾病,影响了全世界超过 4.25 亿人口,其中约有 1/3 的 2 型糖尿病患者合并有 DR^[1]。DR 还是导致糖尿病患者失明的首要元凶^[2],而目前对于 DR 的防治效果并不令人满意。因此,寻找安全有效的防治 DR 的药物具有重要的临床意义。在体动物模型中,Dio 已被证明具有降糖和改善胰岛素抵抗的药理作用^[8-13]。此外,众所周知,DR 不仅与葡萄糖代谢异常有关,还与炎症和氧化应激密切相关^[4,14]。而目前已有研究报道,Dio 具有良好的抗炎和抗氧化作用^[5,7]。以上研究提示,Dio 可能具有改善 DR 的作用,但目前相关报道尚少。因此,本研究探讨了 Dio 是否具有治疗 DR 的潜力,发现无细胞毒性剂量范围内的 Dio 能有效缓解 HG 诱导的 RPE 细胞活性减弱和凋亡增加,提示 Dio 是潜在的抗 DR 药物。

DR 患者处于长期高血糖状态,RPE 细胞则极易发生活化、抗氧化物酶损伤等病理性改变,诱发氧化应激反应^[15]。另外,众多研究^[16-17]均已证明,在 DR 动物模型中给予抗氧化剂可减缓 DR 进展。本研究同样检测了 Dio 对 HG 诱导的 RPE 细胞氧化应激的影响,结果显示,Dio 可逆转 HG 诱导的 RPE 细胞 ROS 和 MDA 水平增加以及 CAT 和 GSH-Px 活性的降低,说明 Dio 可缓解 HG 诱导的细胞氧化应激。氧化应激可激活凋亡基因 Bax 表达,破坏线粒体膜,进而激活线粒体凋亡途径;另一方面,抑制氧化应激可上调线粒体膜上抗凋亡蛋白 Bcl-2,并进一步抑制 Bax 及 Caspase 蛋白激活,发挥保护线粒体和维持膜稳定性作用^[18-19],故维持线粒体膜稳定性在缓解细胞损伤中发挥关键作用。本研究中,我们通过检测线粒体膜电位及 cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达情况,发现 Dio 可抑制 HG 诱导的 RPE 细胞线粒体膜电位降低,并降低 cleaved Caspase-3、Bax 蛋白表达水平和增加 Bcl-2 蛋白表达水平,说明 Dio 具有维持线粒体膜稳定性和降低细胞凋亡的作用。

YAP 分子是 Hippo 通路调控细胞存活和增殖的关键下游级联效应分子,可促进细胞增殖,抑制细胞凋亡^[20-21]。近期有研究提示^[22],在糖尿病肾病细胞和动物模型中敲除 Ras 同源基因家族成员 A (RhoA) 可促使凋亡基因 Bax 升高、Bcl-2 和 YAP 表达降低,而过表达 YAP 可抑制 RhoA 敲除诱导的足细胞凋亡。本研究通过检测 YAP 蛋白表达和免疫荧光染色发现,Dio 可上调 HG 刺激的 RPE 细胞中 YAP 蛋白的表达,说明 Dio 对 HG 诱导的 RPE 细胞损伤的保护作用至少部分与上调 YAP 信号相关。

综上所述,Dio 对 HG 诱导的 RPE 细胞损伤具有细胞保护作用,且这一作用与激活 YAP 信号、降低氧化应激、维持线粒体膜电位和抑制线粒体介导的细胞凋亡途径有关。另外,本研究还提示 Dio 是潜

在的抗 DR 药物。

参考文献

- [1] MA Q, LI Y, WANG M, TANG Z, WANG T, LIU C, et al. Progress in metabonomics of type 2 diabetes mellitus [J]. *Molecules*, 2018, 23 (7): 1834.
- [2] SIMÓ-SERVAT O, HERNÁNDEZ C, SIMÓ R. Diabetic retinopathy in the context of patients with diabetes [J]. *Ophthalmic Res*, 2019, 62 (4): 211-217.
- [3] JO D H, YUN J H, CHO C S, KIM J H, KIM J H, CHO C H. Interaction between microglia and retinal pigment epithelial cells determines the integrity of outer blood-retinal barrier in diabetic retinopathy [J]. *Glia*, 2019, 67 (2): 321-331.
- [4] SHI Y, ZHANG Y, LI Y, TONG C. Sauchinone inhibits high glucose-induced oxidative stress and apoptosis in retinal pigment epithelial cells [J]. *RSC Adv*, 2019, 9 (30): 17065-17071.
- [5] YU L, LU H, YANG X, LI R, SHI J, YU Y, et al. Diosgenin alleviates hypercholesterolemia via SRB1/CES-1/CYP7A1/FXR pathway in high-fat diet-fed rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 412: 115388.
- [6] LIAN Y, WEN D, MENG X, WANG X, LI H, HAO L, et al. Inhibition of invadopodia formation by diosgenin in tumor cells [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20 (6): 283.
- [7] JUNG D H, PARK H J, BYUN H E, PARK Y M, KIM T W, KIM B O, et al. Diosgenin inhibits macrophage-derived inflammatory mediators through downregulation of CK2, JNK, NF-kappa B and AP-1 activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10 (9): 1047-1054.
- [8] GAN Q, WANG J, HU J, LOU G, XIONG H, PENG C, et al. The role of diosgenin in diabetes and diabetic complications [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2020, 198: 105575.
- [9] MAHMOUDI N, KIASALARI Z, RAHMANI T, SANAHERAD A, AFSHIN-MAJD S, NADERI G, et al. Diosgenin attenuates cognitive impairment in streptozotocin-induced diabetic rats; underlying mechanisms [J]. *Neuropsychobiology*, 2021, 80 (1): 25-35.
- [10] ROGHANI-DEHKORDI F, ROGHANI M, BALUCHNEJADMO-JARAD T. Diosgenin mitigates streptozotocin diabetes-induced vascular dysfunction of the rat aorta: the involved mechanisms [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2015, 66 (6): 584-592.
- [11] LONDZIN P, KISIEL-NAWROT E, KOCIK S, JANAS A, TRAWCZYNSKI M, CEGIELA U, et al. Effects of diosgenin on the skeletal system in rats with experimental type 1 diabetes [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110342.
- [12] UEMURA T, HIRAI S, MIZOGUCHI N, GOTO T, LEE J Y, TAKETANI K, et al. Diosgenin present in fenugreek improves glucose metabolism by promoting adipocyte differentiation and inhibiting inflammation in adipose tissues [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54 (11): 1596-1608.
- [13] KISS R, PESTI-ASBÓTH G, SZARVAS M, STÜNDL L, CZÍÁKY Z, HEGEDÜS C, et al. Diosgenin and its fenugreek based biological matrix affect insulin resistance and anabolic hormones in a rat based insulin resistance model [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 7213913.
- [14] KANG Q, YANG C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications [J]. *Redox Biol*, 2020, 37: 101799.
- [15] CHEN Q, TANG L, XIN G, LI S, MA L, XU Y, et al. Oxidative stress mediated by lipid metabolism contributes to high glucose-induced senescence in retinal pigment epithelium [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 130: 48-58.
- [16] BERKOWITZ B A. Preventing diabetic retinopathy by mitigating subretinal space oxidative stress in vivo [J]. *Vis Neurosci*, 2020, 37: E002.
- [17] ZHOU P, XIE W, MENG X, ZHAI Y, DONG X, ZHANG X, et al. Notoginsenoside R1 ameliorates diabetic retinopathy through PINK1-dependent activation of mitophagy [J]. *Cells*, 2019, 8 (3): 213.
- [18] WU M Y, YANG G T, LAI T T, LI C J. The oxidative stress and mitochondrial dysfunction during the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 3420187.
- [19] TAKAHASHI A, MASUDA A, SUN M, CENTONZE V E, HER-

- MAN B. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm) [J]. *Brain Res Bull*, 2004, 62(6):497-504.
- [20] XING W, SONG Y, LI H, WANG Z, WU Y, LI C, *et al*. Fufang Xueshuantong protects retinal vascular endothelial cells from high glucose by targeting YAP [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120:109470.
- [21] HE L, YUAN L, YU W, SUN Y, JIANG D, WANG X, *et al*. A regulation loop between YAP and NR4A1 balances cell proliferation and apoptosis [J]. *Cell Rep*, 2020, 33(3):108284.
- [22] HUANG Z S, PENG Y H, YU H, YU X, ZHOU J, XIAO J. RhoA protects the podocytes against high glucose-induced apoptosis through YAP and plays critical role in diabetic nephropathy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(4):949-956.

Protective effect of diosgenin on retinal pigment epithelial cell injury induced by high glucose

ZHANG Xinxia¹, WANG Xiaomin¹, LU Lihong¹, WANG Baojun¹, DI Wenyu²

1. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, Henan Province, China

2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, Henan Province, China

Corresponding author: DI Wenyu, E-mail: friend1240@163.com

[Abstract] Objective To investigate the protective effect of diosgenin (Dio) on retinal pigment epithelial (RPE) cell injury induced by high glucose (HG), and to analyze its mechanism. **Methods** Glucose concentration and non-cytotoxic Dio dose range were screened by CCK-8 assay. ARPE-19 cells were divided into the control group (treated with 5 mmol · L⁻¹ glucose for 48 h), model group (treated with 50 mmol · L⁻¹ glucose for 48 h), and low-, medium- and high-dose Dio groups (treated with 50 mmol · L⁻¹ glucose combined with 0.5 mmol · L⁻¹, 2.0 mmol · L⁻¹ and 8.0 mmol · L⁻¹ Dio, respectively for 48 h). Cell viability was detected by CCK-8 assay. Apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI staining. The levels of reactive oxygen species (ROS) were measured by fluorescence probe. The level of malondialdehyde (MDA) and the activity of catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured by assay kits. Mitochondrial membrane potential was tested by JC-1 staining. The expression levels of B-cell lymphoma/leukaemia-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cleaved Caspase-3 and Yes-associated protein (YAP) were tested by Western blot. The expression of YAP was observed by immunofluorescence. **Results** The screened glucose concentration was 50 mmol · L⁻¹, and the non-cytotoxic dose range of Dio was 0.5 mmol · L⁻¹, 2.0 mmol · L⁻¹ and 8.0 mmol · L⁻¹. Compared with the control group, cell viability, mitochondrial membrane potential, CAT and GSH-Px activity, Bcl-2 and YAP levels in the model group were significantly decreased (all $P < 0.001$), while apoptosis, ROS and MDA levels, cleaved Caspase-3 and Bax levels were significantly increased (all $P < 0.001$). Compared with the model group, cell viability, mitochondrial membrane potential, CAT and GSH-Px activity, Bcl-2 and YAP levels in low-, medium- and high-dose Dio groups were significantly increased, while apoptosis, ROS and MDA levels, cleaved Caspase-3 and Bax levels were significantly decreased, all in a dose-dependent manner (all $P < 0.05$). **Conclusion** Dio can reduce HG-induced RPE cell injury by activating YAP signal, reducing oxidative stress response and inhibiting mitochondria-mediated apoptosis pathway.

[Key words] diosgenin; diabetic retinopathy; retinal pigment epithelium cells; high glucose; oxidative stress; apoptosis