

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2025.04.003

❖ 基础医学研究 ❖

塞来昔布可通过抑制 HIF-1 α /VEGF 信号通路发挥对糖尿病大鼠视网膜病变的保护作用

杜鹃, 刘媛, 杨倩, 常翔, 高鸽, 马胜男, 李娜

(保定市第一中心医院眼科, 河北 保定 071000)

【摘要】目的: 基于缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)/血管内皮生长因子(VEGF)信号通路探讨塞来昔布对糖尿病大鼠视网膜病变(DR)的保护作用。**方法:** 将30只雄性Wistar大鼠分为正常对照组、模型组与塞来昔布组,每组各10只。除正常对照组外,其余两组均采用高脂饲料喂养+链脲佐菌素腹腔注射的方法构建DR模型。建模成功后,塞来昔布组予以塞来昔布灌胃干预;模型组及正常对照组则予以等量溶媒灌胃,1次/d,连续4周。于药物干预当天和干预4周后,检测大鼠体质量和空腹血糖,采用酶联免疫吸附法对大鼠血清VEGF、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平进行测定,采用苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠视网膜组织病理情况;采用Western blot法观察大鼠视网膜组织VEGF、HIF-1 α 蛋白表达水平。**结果:** 药物干预当天及干预4周后,与对照组比较,模型组及塞来昔布组体质量均下降($P < 0.05$),空腹血糖(FPG)增高($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组血清VEGF、IL-6、TNF- α 水平上升($P < 0.05$);与模型组比较,塞来昔布组血清VEGF、IL-6、TNF- α 水平下降($P < 0.05$)。HE染色显示,正常对照组大鼠视网膜组织细胞排列整齐;模型组大鼠视网膜组织神经细胞排列紊乱,内核层与外核层呈现出明显的疏松样变;与模型组比较,塞来昔布组视网膜神经细胞排列趋于正常,内核层与外核层疏松样变减轻。与对照组比较,模型组血清大鼠视网膜组织VEGF、HIF-1 α 蛋白相对表达量上升($P < 0.05$);与模型组比较,塞来昔布组视网膜组织VEGF、HIF-1 α 蛋白相对表达量下降($P < 0.05$)。**结论:** 塞来昔布对糖尿病大鼠视网膜病变具有保护作用,其机制可能与抑制HIF-1 α /VEGF信号通路激活有关。

【关键词】 糖尿病视网膜病变;塞来昔布;血管内皮生长因子;缺氧诱导因子-1 α

【中图分类号】 R774.1+3 **【文献标志码】** A

Protective effect of celecoxib on diabetic retinopathy in rats via inhibiting HIF-1 α /VEGF signaling pathway

DU Juan, LIU Yuan, YANG Qian, CHANG Hu, GAO Ge, MA Sheng-nan, LI Na

(Department of Ophthalmology, Baoding No. 1 Central Hospital, Baoding 071000, Hebei, China)

【Abstract】Objective: To investigate the protective effect of celecoxib on retinopathy (DR) in diabetic rats based on hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway. **Methods:** 30 male Wistar rats were randomly divided into normal control group, model group and celecoxib group, with 10 rats in each group. In addition to the normal control group, the other two groups were fed with high-fat diet + streptozotocin intraperitoneal injection to construct DR model. After successful modeling, the celecoxib group was given intragastric administration of celecoxib, while the model group and the normal control group received equal volumes of solvent once a day for 4 weeks. On the day of drug intervention and 4 weeks after intervention, the body weight and fasting blood glucose of rats were measured. The levels of serum VEGF, interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The pathological changes of rat retina were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression of VEGF and HIF-1 α protein in rat retina was detected by Western blot. **Results:** On the day of drug intervention and after 4 weeks of intervention, compared with the normal control group, the body weight of the model group and the celecoxib group decreased significantly ($P < 0.05$), and the FPG increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, the levels of serum VEGF, IL-6 and TNF- α in the model group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the serum levels of VEGF, IL-6 and TNF- α in the celecoxib group were significantly decreased ($P < 0.05$). HE staining showed that the retinal tissue cells in the normal control group were arranged neatly, the retinal nerve cells in the model group were disordered, and the inner nuclear layer and the outer nuclear layer showed obvious loose changes. Compared with the model group, the arrangement of retinal nerve cells in the celecoxib group was closer to normal, and the loose degeneration of the inner nuclear layer and

基金项目: 河北省卫生健康委员会医学科学研究课题计划项目(20251433)

作者简介: 杜鹃(1982-)女, 硕士, 副主任医师。E-mail: eyedj201324@163.com

the outer nuclear layer was reduced. Compared with the normal control group, the relative expression of VEGF and HIF-1 α protein in the retinal tissue of the model group was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the relative expression of VEGF and HIF-1 α protein in the retinal tissue of the celecoxib group decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Celecoxib has a protective effect on retinopathy in diabetic rats, and its mechanism may be related to the inhibition of HIF-1 α /VEGF signaling pathway activation.

【Key words】 Diabetic retinopathy; Celecoxib; Vascular endothelial growth factor; Hypoxia-inducible factor-1 α

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是 II 型糖尿病 (T2DM) 的主要微血管并发症之一,是由高糖引起视网膜微血管内皮损伤、微血管生成及血管通透性增高等,而致视网膜组织缺氧的眼部微血管病变,对患者视力有严重影响^[1]。随着全球 T2DM 发病率的逐年上升,DR 已成为中老年人视力下降及失明的主要原因之一^[2]。DR 的发病机制尚未完全明确,越来越多证据表明,血管生成刺激因子异常表达参与了 DR 的病理过程^[3-4],其中血管内皮生长因子 (VEGF) 作为典型的血管生成刺激因子,能够诱导血管新生,促进 DR 进展^[5]。而 VEGF 的表达受缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 的调控,HIF-1 α 不但可促进 VEGF mRNA 表达,还可提升其转录活性,故抑制 HIF-1 α /VEGF 信号通路的激活可作为 DR 的治疗策略^[6]。塞来昔布是在临床中有着广泛应用的非甾体抗炎药,具有抗炎、镇痛等药理活性。研究^[7]发现,对眼周予以塞来昔布注射能够抑制视网膜组织血管新生,进而缓解大鼠视网膜细胞损伤。但其对于 DR 的防治作用及相关机制的相关报道尚少。为此,本研究分析塞来昔布对 DR 的治疗作用,并探讨 HIF-1 α /VEGF 信号通路介导的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 30 只,均为 SPF 级,体质量为 220 ~ 250 g,来源于北京维通利华实验动物技术有限公司。在实验前,对大鼠进行适应性喂养 7 d,饲养条件:温度为 (22 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$,湿度为 50% ~ 60%,12 h 光暗循环,自由摄食、饮水。本实验对动物的处理符合相关伦理规定。

1.2 仪器与试剂

高脂饲料(购于江苏协同医药生物有限公司),链脲佐菌素 (Sigma 公司),塞来昔布(美国辉瑞制药有限公司),VEGF 酶联免疫吸附法检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司),白细胞介素 6 (IL-6) 检测试剂盒(厂家为武汉云克隆),肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 检测试剂盒(上海泛科实业有限公司),HE 染色试剂盒(上海吉至生化科技有限公司),VEGF 抗体、HIF-1 α 抗体 (Abclonal 公司),离心机(德国 Eppendorf),血糖仪(济南拜尔森瑟生物技术有限公

司),切片机(德国徕卡),电泳仪(美国 Bio-Rad),显微镜(日本 Olympus 公司产品)。

1.3 建模与分组

将 30 只大鼠随机分为正常对照组 ($n = 10$)、模型组 ($n = 10$) 与塞来昔布组 ($n = 10$)。正常对照组大鼠予以普通饲料饲养;模型组与塞来昔布组予以高脂饲料饲养,进行 4 周饲养后停止,禁食 12 h 后,模型组及塞来昔布组予以 35 mg/kg 链脲佐菌素溶液腹腔注射,正常对照组则予以等量枸橼酸盐溶液注射。72 h 后,抽取尾静脉血进行空腹血糖 (FPG) 的检测,以 FPG > 16.7 mmol/L 判定糖尿病模型构建成功,对于 FPG ≤ 16.7 mmol/L 者予以链脲佐菌素溶液补注,重复造模。糖尿病大鼠造模成功后,继续饲养 4 周,然后予以眼底镜检查,若发现大鼠视网膜有微血管瘤、动静脉异常和出现静脉串珠样病理改变,则视为 DR 建模成功。然后进行药物干预,塞来昔布组予以塞来昔布 50 mg/kg 灌胃,1 次/d,而正常对照组及模型组则予以等量溶媒灌胃,连续进行 4 周。期间,正常对照组继续予以普通饲料饲养,其余两组则继续使用高脂饲料饲养。

1.4 观察指标

(1) 大鼠体质量和 FPG 的检测。于药物干预当天和干预 4 周后,对各组大鼠进行称重并记录。并于禁食禁水 12 h 后,抽取尾静脉血,使用血糖仪进行 FPG。(2) 大鼠血清 VEGF 和炎症因子水平的测定。在完成体质量和 FPG 测定后,对大鼠予以麻醉,行腹主动脉采血,血样室温下静置 60 min,然后经离心 (3 500 r/min) 处理 10 min,将分离得到的血清置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。使用酶联免疫吸附法对血清 VEGF、TNF- α 和 IL-6 水平进行测定。采血后,收集大鼠两侧眼球视网膜组织,以多聚甲醛进行固定,置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,备用。(3) HE 染色。取以上备存的大鼠右侧眼球视网膜组织,经石蜡包埋、脱水、切片等处理后,予以 HE 染色,于显微镜下对大鼠视网膜组织病理改变进行观察。(4) Western blot 法检测大鼠视网膜组织 VEGF、HIF-1 α 蛋白表达水平。取冻存的大鼠左侧眼球视网膜组织,解冻后,经 RIPA 缓冲液溶解,经考马斯亮蓝法对蛋白浓度予以检测。然后进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转膜,4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。分别加入 VEGF 抗体、HIF-1 α

抗体、 β -action 抗体(1:1 000),室温孵育 1 h,使用 Western blot 法检测 VEGF、HIF-1 α 蛋白含量。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 17.0 对数据进行分析。计量资料用 ($\bar{x} \pm s$)表示,多组间对比用单因素方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量和 FPG 水平比较

药物干预当天及干预 4 周后,与对照组比较,模型组及塞来昔布组体质量均下降($P < 0.05$),FPG 显著增高($P < 0.05$),塞来昔布组与模型组之间大鼠体质量和 FPG 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠体质量和 FPG 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	体质量(g)		FPG(mmol/L)	
	干预当天	干预 4 周后	干预当天	干预 4 周后
正常对照组(n=10)	394.25 \pm 36.74	508.54 \pm 32.36	5.72 \pm 0.58	5.89 \pm 0.63
模型组(n=10)	252.37 \pm 22.41 ^①	214.41 \pm 15.69 ^①	24.78 \pm 4.79 ^①	26.92 \pm 5.11 ^①
塞来昔布组(n=10)	250.61 \pm 20.36 ^①	219.25 \pm 13.21 ^①	24.69 \pm 5.14 ^①	25.45 \pm 3.68 ^①
F 值	125.665	165.698	68.587	72.314
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

① $P < 0.05$,与正常对照组比较。

2.2 各组大鼠血清 VEGF 和炎症因子水平比较

与对照组比较,模型组大鼠血清 VEGF、TNF- α 和 IL-6 水平上升($P < 0.05$);与模型组比较,塞来昔布组大鼠血清 EGF、TNF- α 和 IL-6 水平下降($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠血清 VEGF 和炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	VEGF(ng/L)	TNF- α (pg/mL)	IL-6(pg/mL)
正常对照组(n=10)	78.69 \pm 5.41	9.54 \pm 1.32	11.23 \pm 1.56
模型组(n=10)	264.87 \pm 12.24 ^①	22.43 \pm 1.87 ^①	24.39 \pm 1.87 ^①
塞来昔布组(n=10)	152.69 \pm 10.31 ^{①②}	15.66 \pm 1.73 ^{①②}	16.21 \pm 1.75 ^{①②}
F 值	110.254	34.551	37.688
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

① $P < 0.05$,与正常对照组比较;② $P < 0.05$,与模型组比较。

2.3 各组大鼠视网膜组织病理改变

药物干预 4 周后,与正常对照组比较,模型组大鼠视网膜组织神经细胞排列紊乱,神经节细胞数目减少,内核层与外核层呈现出明显的疏松样变;与模型组比较,塞来昔布组视网膜神经细胞排列趋于正常,神经节细胞数目明显增多,内核层与外核层疏松样变减轻。见图 1。

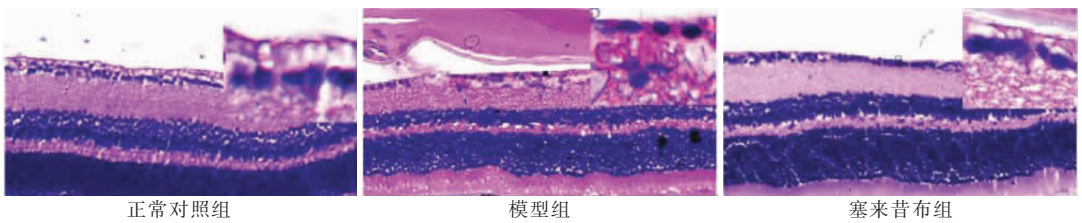


图 1 各组大鼠大鼠视网膜组织病理改变(HE \times 400)

2.4 各组大鼠视网膜组织 VEGF、HIF-1 α 蛋白表达比较

与对照组比较,模型组大鼠视网膜组织 VEGF、HIF-1 α 蛋白相对表达量上升($P < 0.05$);与模型组比较,塞来昔布组视网膜组织 VEGF、HIF-1 α 蛋白相对表达量下降($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠视网膜组织 VEGF、HIF-1 α 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	VEGF	HIF-1 α
正常对照组(n=10)	0.22 \pm 0.05	0.26 \pm 0.06
模型组(n=10)	0.85 \pm 0.10 ^①	0.98 \pm 0.11 ^①
塞来昔布组(n=10)	0.41 \pm 0.13 ^{①②}	0.47 \pm 0.09 ^{①②}
F 值	13.687	17.894
P 值	<0.001	<0.001

① $P < 0.05$,与正常对照组比较;② $P < 0.05$,与模型组比较。

3 讨论

视网膜微血管生成被认为是 DR 形成的重要因素^[8]。故研究 DR 视网膜微血管生成的相关机制,并探讨抑制视网膜微血管新生的有效药物成为 DR 防治研究的热点。

VEGF 是视网膜血管生成的重要调控因子,是 DR 病理改变中的核心因子^[9-10]。VEGF 是促血管新生的关键调控因子,其表达程度与微血管形成数量正相关^[11]。另外,炎症因子在 DR 病理过程中也有重要作用,IL-6、TNF- α 等促炎因子的高表达可使得血管通透性增高,与 VEGF 发挥协同作用,促进血管新生,加速病情进展^[12]。研究^[13]认为,TNF- α 还可诱导 VEGF 表达,促进视网膜血管新生。本研究中,VEGF 表达及 IL-6、TNF- α 表达增高,视网膜神经细胞排列紊乱。

研究^[14]发现,塞来昔布能够下调视网膜组织炎症因子水平,从而延缓 DR 进展。本研究中,与模型组比较,塞来昔布组血清 VEGF、IL-6 和 TNF- α 水平显著降低,这表明塞来昔布能够减轻 DR 大鼠炎症反应,降低 VEGF 水平,有助于延缓 DR 的进展。本研究 HE 染色结果还显示,与模型组比较,塞来昔布组视网膜神经细胞排列趋于正常,神经节细胞数目明显增多,内核层与外核层疏松样变减轻,再次提示塞来昔布对 DR 有保护作用,能够减轻视网膜结构损伤,延缓病情发展。

HIF-1 α 是一种受氧调节的转录调节因子,与视网膜血管生成有着紧密联系^[15]。糖尿病患者视网膜血管堵塞,视网膜缺血缺氧状态下,HIF-1 α 表达上调,进而启动下游基因转录,而促进 DR 的病理过程^[16]。VEGF 作为受 HIF-1 α 调控的一种下游效应因子,有着促血管生成的作用,能够促进血管内皮细胞活化,使得血管通透性增高,从而加速血管新生^[17]。既往研究^[18]显示,阻断 HIF-1 α /VEGF 信号通路抑制血管新生是防治糖尿病微血管并发症的重要途径。塞来昔布已被证实具有抑制血管生成的作用^[19]。梁冰等^[20]研究表明,塞来昔布能够抑制膀胱癌组织 VEGF 表达,进而使得血管生成抑制。本研究发现,与模型组比较,塞来昔布组大鼠视网膜组织 VEGF、HIF-1 α 蛋白相对表达量下降,提示塞来昔布通过下调 HIF-1 α /VEGF 蛋白表达抑制视网膜血管生成,延缓 DR 进展。

综上,塞来昔布对 DR 大鼠有保护作用,能够抑制视网膜微血管生成,延缓 DR 进展,可能与抑制 HIF-1 α /VEGF 信号通路的激活有关。

参考文献

[1] Everett LA, Paulus YM. Laser therapy in the treatment of diabetic retinopathy and diabetic macular edema[J]. *Current Diabetes Reports*, 2021, 21(9):35.

[2] Teo ZL, Tham Y-C, Yu M, et al. Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045 systematic review and meta-analysis [J]. *Ophthalmology*, 2021, 128(11):1580-1591.

[3] Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy[J]. *New England Journal of Medicine*, 2012, 366(13):1227-1239.

[4] 王漫峤,李筱荣. 分泌蛋白 III 在糖尿病性视网膜病变新生血管形成中的作用及意义[J]. *中华实验眼科杂志*, 2024, 42(1):93-96.

[5] 陈焱,李志洪. 血清 VEGF、HIF-1 α 及 Hey 与 2 型糖尿病视网膜病变的相关性[J]. *川北医学院学报*, 2022, 37(2):

220-223.

[6] Yang Y, Liu Y, Li Y, et al. microRNA-15b targets VEGF and inhibits angiogenesis in proliferative diabetic retinopathy [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2020, 105(11):3404-3415.

[7] 李鹏,任兵,高晓唯,等. 玻璃体腔注射塞来昔布抑制大鼠视网膜新生血管的作用[J]. *国际眼科杂志*, 2017, 17(4):635-638.

[8] Xu ZH, Gao YY, Zhang HT, et al. Progress in experimental and clinical research of the diabetic retinopathy treatment using traditional Chinese medicine [J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2018;1-27.

[9] Zhang M, Zhou M, Cai X, et al. VEGF promotes diabetic retinopathy by upregulating the PKC/ET/NF- κ B/ICAM-1 signaling pathway [J]. *European Journal of Histochemistry*, 2022, 66(4):3522.

[10] Li J, Song LL, Song H. Chemerin promotes microangiopathy in diabetic retinopathy via activation of ChemR23 in rat primary microvascular endothelial cells [J]. *Molecular Vision*, 2021, 27:575-587.

[11] Wang N, Zhang C, Xu Y, et al. Berberine improves insulin-induced diabetic retinopathy through exclusively suppressing Akt/mTOR-mediated HIF-1 α /VEGF activation in retina endothelial cells [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2021, 17(15):4316-4326.

[12] 汪霞,刘静,田利民,等. 凝集素样氧化低密度脂蛋白受体 1 敲减抑制糖尿病小鼠视网膜血管损伤和肿瘤进展位点 2 磷酸化影响的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2023, 31(10):769-776.

[13] 李蓉,杜军辉,常远. TNF- α 通过刺激 RF/6A 细胞表达 SDF-1 促进血管生成[J]. *临床眼科杂志*, 2016, 24(2):175-180.

[14] Amrite AC, Ayalasonmayajula SP, Cheruvu NPS, et al. Single periocular injection of celecoxib-PLGA microparticles inhibits diabetes-induced elevations in retinal PGE2, VEGF, and vascular leakage [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006, 47(3):1149-1160.

[15] Yan HT, Su GF. Expression and significance of HIF-1 α and VEGF in rats with diabetic retinopathy [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2014, 7(3):237-240.

[16] 张梅,李春霞. HIF-1 α 与自噬在糖尿病视网膜病变中的相关性研究现状[J]. *临床眼科杂志*, 2017, 25(5):471-474.

[17] 唐晓蕾,代艳,丁倩,等. LncRNA H19 和 VEGF-b 在糖尿病视网膜病变患者中的表达及临床意义[J]. *中国实验诊断学*, 2022, 26(5):642-647.

[18] 柏小金,徐林,刘福英,等. 基于 HIF-1 α /VEGF 信号通路探讨 Hizarov 技术治疗糖尿病足溃疡的机制[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(21):5300-5303.

[19] 郝玉华,李瑾,赵欣. 塞来昔布对实验性脉络膜新生血管的抑制作用[J]. *中华眼底病杂志*, 2010, 26(1):32-36.

[20] 梁冰,罗后宙. 塞来昔布对膀胱癌细胞移植小鼠的治疗作用及机制[J]. *基础医学与临床*, 2021, 41(2):240-244.

(收稿日期:2024-10-29

修回日期:2024-12-25)