

活血通络方通过抑制 VAV2-RAC1-NLRP3 信号通路介导的视网膜血管内皮细胞焦亡改善糖尿病视网膜病变的机制研究

李能，来坚，朱琳

杭州市中医院眼科 浙江杭州

【摘要】目的 探讨活血通络方（HXTLF）通过调控 VAV2-RAC1-NLRP3 信号通路抑制视网膜血管内皮细胞焦亡，改善糖尿病视网膜病变（DR）的作用及机制。**方法** 体内实验采用高脂高糖饮食联合链脲佐菌素（STZ）腹腔注射构建 SD 大鼠 DR 模型，随机分为对照组、模型组、HXTLF 低（5 mL/kg/d）、中（10 mL/kg/d）、高（20 mL/kg/d）剂量组，连续灌胃干预 3 个月。观察各组 VAV2-RAC1-NLRP3 信号通路关键蛋白表达的影响。结果 HXTLF 干预后，各剂量组（尤以中、高剂量组为著）能显著改善上述代谢紊乱与病理损伤。在机制层面，HXTLF 有效降低了视网膜组织的氧化应激水平（降低 MDA，提升 SOD、GSH-Px 活性）并抑制炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 的释放。**结论** 活血通络方可能通过抑制 VAV2-RAC1 轴，进而阻断下游 NLRP3 炎症小体的活化与细胞焦亡进程。

【关键词】 活血通络方；糖尿病视网膜病变；细胞焦亡；VAV2-RAC1-NLRP3 通路；氧化应激；分子机制

【基金项目】 浙江省中医药科技项目（项目编号：2025ZL082）

【收稿日期】 2025 年 12 月 27 日 **【出刊日期】** 2026 年 1 月 28 日 **【DOI】** 10.12208/j.ijcr.20260040

Study on the mechanism of Huoxue Tongluo Recipe improving diabetes retinopathy by inhibiting the focal death of retinal vascular endothelial cells mediated by VAV2-RAC1-NLRP3 signal pathway

Neng Li, Jian Lai, Lin Zhu

Department of Ophthalmology, Hangzhou Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang

【Abstract】Objective To investigate the effect and mechanism of Huoxue Tongluo Recipe (HXTLF) on inhibiting retinal vascular endothelial cell pyroptosis by regulating VAV2-RAC1-NLRP3 signaling pathway, and improving diabetes retinopathy (DR). **Methods** The in vivo experiment involved constructing a DR model in SD rats using a high-fat, high-sugar diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). The rats were randomly divided into a control group, a model group, and low (5 mL/kg/day), medium (10 mL/kg/day), and high (20 mL/kg/day) dosage groups of HXTLF, with continuous gavage intervention for 3 months. The effects on the expression of key proteins in the VAV2-RAC1-NLRP3 signaling pathway were observed in each group. **Results** After HXTLF intervention, each dose group (especially the medium and high dose groups) can significantly improve the metabolic disorders and pathological damage mentioned above. At the mechanistic level, HXTLF effectively reduces oxidative stress levels in retinal tissue (decreases MDA, increases SOD and GSH Px activity) and inhibits the release of inflammatory factors IL-1 β and TNF - α . **Conclusion** The Huoxue Tongluo Formula may inhibit the VAV2-RAC1 axis, thereby blocking the activation of downstream NLRP3 inflammasomes and the process of cell pyroptosis.

【Keywords】 Huoxue Tongluo Formula; Diabetic retinopathy; Cell pyroptosis; VAV2-RAC1-NLRP3 pathway; Oxidative stress; Molecular mechanism

引言

糖尿病视网膜病变（DR）是糖尿病最常见的微血管并发症，全球患病率高达 34.6%，其特征为视网膜血管渗漏、炎症及细胞程序性死亡^[1,2]。近年研究发现，

细胞焦亡（pyroptosis）通过 NLRP3 炎症小体激活 Caspase-1/GSDMD 通路，释放 IL-1 β 等炎症因子，加剧 DR 进展^[3]。在 DR 模型和高糖诱导的视网膜血管内皮细胞中，NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路显著激活，

抑制该通路可有效减轻血管渗漏和神经炎症^[4]。本次研究应用的活血通络方（HXTLF）中全当归活血、养血为君，川芎活血而行气开郁，赤芍活血兼清热散瘀共为臣；诸药合用，共奏活血通络、平肝明目之功，得到了很好的临床疗效和口碑，但其作用机制尚不明确^[5]。本研究基于 VAV2-RAC1-NLRP3 信号通路假说，探讨 HXTLF 通过抑制视网膜血管内皮细胞焦亡治疗 DR 的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与 DR 模型构建

清洁级健康雄性 SD 大鼠 72 只，8 周龄，体重 180-220 g，由[斯贝福（北京）生物技术有限公司]提供，实验动物生产许可证号：[SCXK（京）2021-0010]。适应性喂养 1 周后，采用随机数字表法将大鼠分为两组：

(1) 对照组 ($n=12$)：持续给予普通维持饲料喂养；
(2) 造模组 ($n=60$)：给予高脂高糖饲料（含 20% 蔗糖、10% 猪油、2.5% 胆固醇）喂养。8 周后，造模组大鼠禁食不禁水 12 h，按 60 mg/kg 体重剂量一次性腹腔注射 1% STZ（溶于 0.1 mol/L, pH 4.5 的柠檬酸钠缓冲液）。72 h 后，尾静脉采血测定随机血糖， $\geq 16.7 \text{ mmol/L}$ 者判定为糖尿病模型成功。每周通过直接眼底镜观察，当出现微动脉瘤、点片状出血或新生血管等典型 DR 表征时，视为 DR 模型构建成功。

1.2 分组与给药

将成模的 DR 大鼠再次随机分为 4 组：(1) DR 模型组 ($n=12$)；(2) HXTLF 低剂量组 (5 mL/kg/d, $n=12$)；(3) HXTLF 中剂量组 (10 mL/kg/d, $n=12$)；(4) HXTLF 高剂量组 (20 mL/kg/d, $n=12$)。对照组和 DR 模型组每日给予等体积的 0.9% 生理盐水灌胃。HXTLF 由本院中药房统一煎制并浓缩至生药含量为 2 g/mL。所有干预均持续 3 个月。干预结束后，大鼠禁食 12 h，10% 水合氯醛腹腔注射麻醉 (0.3 mL/100g)。

1.3 检测指标与方法

(1) 免疫组织化学 (IHC) 检测视网膜 VAV2、RAC1、CD31 及 VEGFR 表达

(2) 氧化应激与炎症因子检测

取部分视网膜组织，采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛 (MDA) 含量，采用黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性，采用比色法测定谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性。同时，采用 ELISA 法检测血清中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的浓度。

(3) 细胞实验

1) 含药血清制备：另取 20 只清洁级 SD 大鼠，随

机分为 2 组：空白血清组（灌胃等量生理盐水）和 HXTLF 含药血清组（灌胃 HXTLF，剂量为 10 mL/kg/d）。连续灌胃 7 天后，于末次灌胃后 1 h，在无菌条件下经腹主动脉采血，静置、离心分离血清，56°C 水浴灭活 30 min，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，分装后 -80°C 保存。

2) 细胞模型建立与分组：人视网膜微血管内皮细胞 (hRMECs)，于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养。取对数生长期细胞，随机分为：① 正常对照组（含 5.5 mmol/L 葡萄糖）；② 等渗对照组（含 30 mmol/L D-甘露醇）；③ 高糖模型组（含 30 mmol/L 葡萄糖）；④-⑥ 高糖+含药血清组（在 30 mmol/L 葡萄糖培养基中分别加入 2.5%、7.5%、10% 浓度的 HXTLF 含药血清）。各组均干预 24 h。

3) 细胞增殖与毒性检测 (CCK-8 法)；细胞凋亡/焦亡率检测 (流式细胞术-Annexin V/PI 双染) 细胞上清液 MDA、GSH-Px 检测。

1.4 Western Blot 检测蛋白表达

提取视网膜组织或细胞总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。使用 Image J 软件分析各条带灰度值，计算目标蛋白的相对表达量。

1.5 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 26.0 统计软件进行处理，计量资料以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。若数据符合正态分布且方差齐性，多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)，组间两两比较采用 LSD-t 检验 (方差齐) 或 Dunnett's T3 检验 (方差不齐)。若数据不符合正态分布，则采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HXTLF 抑制 DR 大鼠氧化应激与全身炎症反应

如表 1 所示，与对照组相比，DR 模型组大鼠视网膜组织中 MDA 含量显著升高 ($P<0.01$)，而 SOD 和 GSH-Px 活性则显著降低 ($P<0.01$)。同时，ELISA 结果显示，模型组大鼠血清中促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 的浓度也显著高于对照组 ($P<0.01$)。

2.2 HXTLF 抑制高糖诱导的 hRMECs 损伤

体外实验结果表明 (图 1)，与正常对照组相比，等渗对照组细胞增殖率无显著差异 ($P>0.05$)，而高糖模型组细胞增殖率显著降低 ($P<0.01$)。流式细胞术检测结果 (图 2) 显示，高糖诱导后，hRMECs 的死亡率 (Annexin V+/PI- 及 Annexin V+/PI+ 细胞比例之和) 显著升高 ($P<0.01$)。此外，高糖模型组细胞上清液中 MDA 含量升高，GSH-Px 活性下降 (均 $P<0.05$)。

2.3 HXTLF 下调 VAV2-RAC1-NLRP3 通路及焦亡相关蛋白表达

Western Blot 结果 (图 3 及表 2) 显示, 在 DR 模

型大鼠视网膜组织中, VAV2、RAC1、Cleaved Caspase-1 (活性形式)、GSDMD-N 以及成熟 IL-1 β 的蛋白表达水平均较对照组显著上调 ($P<0.01$)。

表 1 各组大鼠氧化应激与炎症因子比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	MDA (U/mg)	SOD (U/mg)	GSH-Px (U/mg)	IL-1 β (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
对照组	8.5±1.0	185.2±15.3	175.6±14.2	15.3±2.1	20.1±3.0
DR 模型组	25.3±3.1*	94.3±10.1*	89.5±9.8*	45.2±5.1*	52.8±6.2*
HXTLF 低剂量	20.1±1.1	165±12.3	165±12.3	32.7±3.2#	41.6±4.2
HXTLF 中剂量	12.5±0.9#	156±13.1#	162±15.9	28.9±2.7#	32.5±3.4#
HXTLF 高剂量	11.2±2.0#	149.4±12.1#	159.1±12.3#	22.3±3.0#	28.5±3.5#

注: 与对照组比, * $P<0.05$; 与 DR 组比, # $P<0.05$

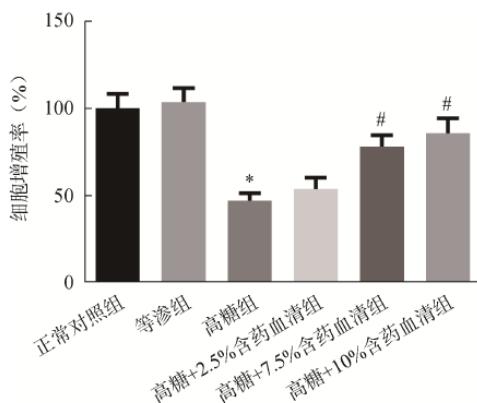


图 1 各组细胞增殖率情况比较

注: 与正常对照组比较, * $P<0.05$; 与高糖组比较, # $P<0.05$

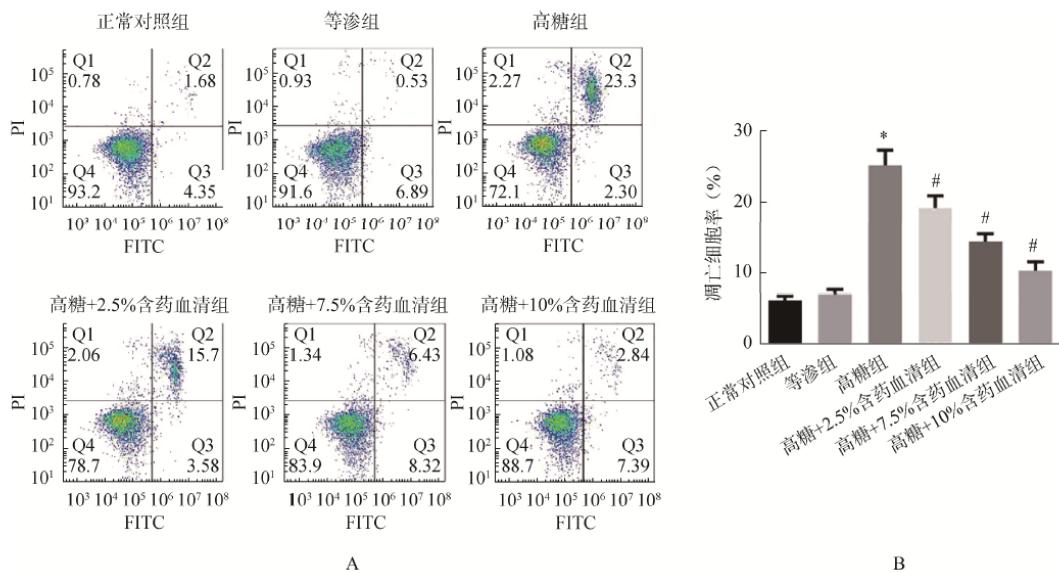
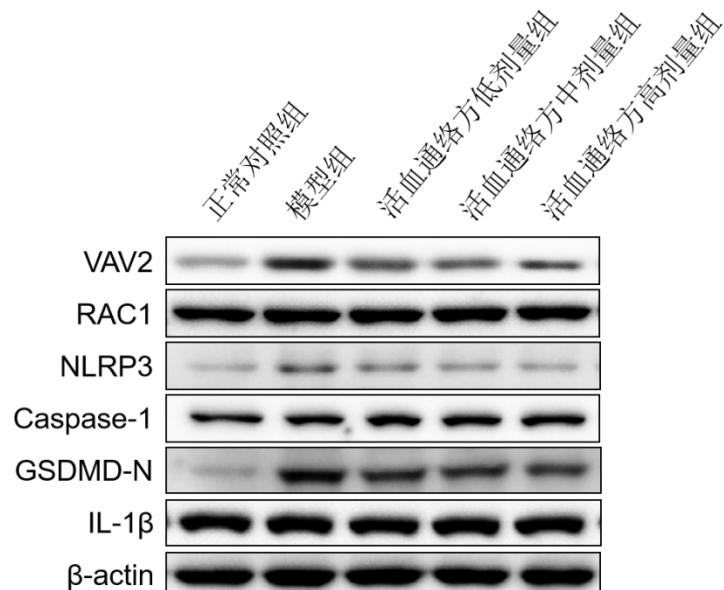


图 2 各组细胞凋亡情况比较

A.各组细胞凋亡情况; B.各组细胞凋亡率比较

注: 与正常对照组比较, * $P<0.05$; 与高糖组比较, # $P<0.05$

图3 各组视网膜组织中VAV2、RAC1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD-N、IL-1 β 蛋白表达图表2 各组大鼠视网膜组织VAV2-RAC1-NLRP3通路相关蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	VAV2/ β -actin	RAC1/ β -actin	NLRP3/ β -actin	Cleaved Caspase-1/ β -actin	GSDMD-N/ β -actin
对照组	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.08
DR模型组	1.95 \pm 0.20*	2.93 \pm 0.29*	2.45 \pm 0.22*	2.78 \pm 0.25*	2.61 \pm 0.24*
HXTLF低剂量组	1.65 \pm 0.18#	2.35 \pm 0.25#	1.89 \pm 0.20#	2.10 \pm 0.22#	1.95 \pm 0.20#
HXTLF中剂量组	1.38 \pm 0.15#	1.87 \pm 0.20#	1.52 \pm 0.16#	1.61 \pm 0.18#	1.50 \pm 0.15#
HXTLF高剂量组	1.14 \pm 0.12#	1.47 \pm 0.15#	1.18 \pm 0.11#	1.25 \pm 0.13#	1.16 \pm 0.10#

注：与对照组比较，*P<0.01；与DR模型组比较，#P<0.05，##P<0.01。

3 讨论

本研究通过整合动物模型与细胞实验，多层次、多角度地证实了活血通络方对糖尿病视网膜病变的显著治疗作用，并首次深入揭示了其作用机制与抑制VAV2-RAC1-NLRP3信号通路介导的视网膜血管内皮细胞焦亡密切相关。首先，我们在整体动物水平验证了HXTLF的综合疗效。氧化应激与慢性炎症是贯穿DR始终的核心病理环节。本研究最主要的发现在于从分子层面阐明了HXTLF的作用靶点。在DR状态下，VAV2-RAC1信号轴被异常激活，进而驱动下游NLRP3炎症小体的组装与活化，最终导致Caspase-1依赖的细胞焦亡发生。这一通路串联的发现，为理解DR中血管内皮损伤的机制提供了新的视角。VAV2作为RAC1的特异性鸟嘌呤核苷酸交换因子，其上调可直接导致RAC1-GTP（活性形式）水平升高。活化的RAC1一方面可通过促进NADPH氧化酶（如NOX4，本研究中也观察到其表达上调）产生大量ROS，直接激活NLRP3。

HXTLF能够剂量依赖性地抑制该通路从上游（VAV2、RAC1）到下游（NLRP3、Cleaved Caspase-1、GSDMD-N）所有关键节点的活化，这强有力地说明，靶向干预VAV2-RAC1-NLRP3轴是HXTLF抑制细胞焦亡、治疗DR的核心分子机制之一。本研究的意义在于，将传统中医药理论与现代疾病分子机制相结合，用科学数据诠释了“活血通络”法治疗DR的深刻内涵，即不仅改善微循环，更在于调控细胞死亡与炎症这一现代病理学过程。且首次系统报道了VAV2-RAC1-NLRP3这一新型信号通路在DR发病中的作用，丰富了DR的发病机制理论。

参考文献

- [1] Al Mamun A, Mimi AA, Zaeem M, et al. Role of pyroptosis in diabetic retinopathy and its therapeutic implications. Eur J Pharmacol. 904:174166.
- [2] Meng C, Gu C, He S, et al. Pyroptosis in the Retinal

- Neurovascular Unit: New Insights Into Diabetic Retinopathy. *Front Immunol.* 12:763092. Published 2021 None.
- [3] Gu J, Geng K, Guo M, et al. Targeting Pyroptosis: New Insights into the Treatment of Diabetic Microvascular Complications. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2022:5277673. Published 2022 None.
- [4] Li N, Chen JL, Sun YJ, et al. Berberine attenuates the expression of NLRP3 and downstream inflammasome effectors in diabetic retinopathy. *J Nat Med.* 2025; 79(5): 1091-1105.
- [5] Li N, Guo XL, Xu M, et al. Network pharmacology mechanism of Scutellarin to inhibit RGC pyroptosis in diabetic retinopathy. *Sci Rep.* 2023;13(1):6504. Published 2023 Apr 20.
- [6] Al Mamun A, Mimi AA, Zaeem M, et al. Role of pyroptosis in diabetic retinopathy and its therapeutic implications. *Eur J Pharmacol.* 904:174166.
- [7] Conley SM, Abais-Battad JM, Yuan X, Zhang Q, Boini KM, Li PL. Contribution of guanine nucleotide exchange factor Vav2 to NLRP3 inflammasome activation in mouse podocytes during hyperhomocysteinemia. *Free Radic Biol Med.* 106:236-244.
- [8] 徐素芝,王静,赵璨,等.补气,活血,通络法治疗糖尿病性周围神经病变的临床疗效观察[J].检验医学与临床, 2024, 21(S02):38-42.

版权声明: ©2026 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS