

· 实验研究 ·

黄连素对高糖培养的大鼠视网膜 Müller 细胞的抗凋亡和抗炎作用及其机制

金轶平 朱皓皓 廖宇洁 于晓彦

复旦大学附属上海市第五人民医院眼科, 上海 200240

通信作者: 朱皓皓, Email: haohao700315@163.com

【摘要】 **目的** 探讨黄连素对高糖培养大鼠离体视网膜 Müller 细胞的影响及其作用机制。 **方法** 将体外培养的 Sprague Dawley (SD) 大鼠视网膜 Müller 细胞分为正常对照组、高糖组、高糖+10 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组和高糖+25 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组, 正常对照组和高糖组细胞分别采用 5 mmol/L 葡萄糖和 25 mmol/L 葡萄糖培养, 后 2 个组分别采用 25 mmol/L 葡萄糖+相应浓度黄连素处理, 培养后 72 h 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法及实时荧光定量 PCR 法分别检测细胞培养液上清中炎症因子肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白细胞介素-8 (IL-8) 和环氧合酶 2 (COX-2), L-谷氨酸-L-天冬氨酸转运体 (GLAST) 及相关蛋白的表达情况, 采用 Western blot 法检测细胞质中 GLAST、镁离子依赖的蛋白磷酸酶 1A (PPM1A)、核因子- κB (NF- κB) 和 cleaved caspase-3 及细胞核中 NF- κB 蛋白的表达情况。 **结果** 正常对照组、高糖组、高糖+10 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组和高糖+25 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组细胞凋亡率分别为 (1.37 \pm 0.21)%、(17.67 \pm 1.17)%、(10.60 \pm 0.17)% 和 (5.57 \pm 0.35)%, 总体比较差异有统计学意义 ($F=375.97, P<0.01$), 其中高糖组细胞凋亡率较正常对照组明显升高, 高糖+10 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组和高糖+25 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组细胞凋亡率较高糖组明显降低, 高糖+25 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组较高糖+10 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组细胞凋亡率明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$)。ELISA 检测结果显示, 各组细胞中 TNF- α 、IL-8、COX-2 质量浓度总体比较差异均有统计学意义 ($F=28.36, 35.88, 41.59$, 均 $P<0.01$), 其中高糖组细胞中 TNF- α 、IL-8 和 COX-2 质量浓度均明显高于正常对照组, 高糖+10 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组和高糖+25 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组细胞中 TNF- α 和 COX-2 质量浓度明显低于高糖组, 高糖+25 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组细胞中 TNF- α 和 IL-8 浓度明显低于高糖+10 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。实时荧光定量 PCR 结果显示, 各组间 Müller 细胞中 GLAST mRNA 的相对表达量总体比较差异有统计学意义 ($F=268.60, P<0.01$), 其中高糖组 GLAST mRNA 的相对表达量明显低于正常对照组、高糖+10 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组和高糖+25 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。Western blot 分析结果显示, 各组 Müller 细胞质中 GLAST、PPM1A、cleaved caspase-3 和 NF- κB 蛋白相对表达量以及细胞核中 NF- κB 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F=135.20, 156.98, 80.96, 128.07, 47.36$, 均 $P<0.01$), 其中高糖组 Müller 细胞质中 GLAST、PPM1A 和 NF- κB 蛋白的相对表达量明显低于正常对照组、高糖+10 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组和高糖+25 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组, 细胞质中 cleaved caspase-3 和细胞核中 NF- κB 蛋白的相对表达量明显高于正常对照组、高糖+10 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组和高糖+25 $\mu\text{mol/L}$ 黄连素组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。 **结论** 高糖可诱导 SD 大鼠视网膜 Müller 细胞发生凋亡及炎症反应, 而黄连素能有效抑制高糖诱发的细胞凋亡及炎症反应, 其可能是通过抑制 NF- κB 的核易位和转录活性, 从而抑制炎症因子的表达来发挥保护作用。

【关键词】 Müller 细胞; 高糖; 黄连素; 细胞凋亡; 炎症; 细胞培养

基金项目: 上海市闵行区自然科学研究课题项目 (2013MHZ010)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200917-00647

Anti-apoptosis and anti-inflammation effects and mechanism of berberine on high-concentration glucose induced rat retinal Müller cells

Jin Yiping, Zhu Haohao, Liao Yujie, Yu Xiaoyan

Department of Ophthalmology, Shanghai Fifth People's Hospital, Fudan University, Shanghai 200240, China

Corresponding author: Zhu Haohao, Email: haohao700315@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of berberine on Sprague Dawley (SD) rat retinal Müller cells cultured by high concentration glucose. **Methods** The cultured SD rat retinal Müller cells were divided into normal-glucose group, high-glucose group, high-glucose + 10 $\mu\text{mol/L}$ berberine group and high-glucose + 25 $\mu\text{mol/L}$ berberine group, and the cells were cultured in 5 mmol/L glucose, 25 mmol/L glucose, 25 mmol/L glucose + 10 $\mu\text{mol/L}$ berberine, and 25 mmol/L glucose + 25 $\mu\text{mol/L}$ berberine, respectively. After 72 hours cultured, cell apoptosis rate was detected by flow cytometry; the expressions levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-8 (IL-8) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in the culture supernatant were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); the L-glutamate-L-aspartate transporter (GLAST) and the related protein expression levels were detected by real-time fluorescence quantitative PCR; the expressions levels of GLAST, protein phosphatase magnesium-dependent 1A (PPM1A), nuclear factor- κB (NF- κB) and cleaved caspase-3 in the cytoplasm, and the expression level of NF- κB protein in the nucleus were detected by Western blot. **Results** The cell apoptosis rate was (1.37 \pm 0.21)%, (17.67 \pm 1.17)%, (10.60 \pm 0.17)% and (5.57 \pm 0.35)% in the normal-glucose group, high-glucose group, high-glucose+10 $\mu\text{mol/L}$ berberine group and high-glucose+25 $\mu\text{mol/L}$ berberine group, respectively, and the overall comparative difference was statistically significant ($F=375.97, P<0.01$). The cell apoptosis rates in the high-glucose group was increased in comparison with those in the normal-glucose group ($P<0.01$). The cell apoptosis rates in the high-glucose + 10 $\mu\text{mol/L}$ berberine group and high-glucose + 25 $\mu\text{mol/L}$ berberine group were significantly reduced in comparison with that in the high-glucose group (both at $P<0.01$). And the cell apoptosis rate in the high-glucose+25 $\mu\text{mol/L}$ berberine group was lower than that in the high-glucose+10 $\mu\text{mol/L}$ berberine group ($P<0.01$). ELISA results revealed that the overall comparative differences of the concentrations of TNF- α , IL-8 and COX-2 among the four groups were statistically significant ($F=28.36, 35.88, 41.59$; all at $P<0.01$). The concentrations of TNF- α , IL-8 and COX-2 in the high-glucose group were significantly higher than those in the normal-glucose group ($P<0.01$). Compared with the high-glucose group, the concentrations of TNF- α and COX-2 were significantly decreased in the high-glucose+10 $\mu\text{mol/L}$ berberine group and high-glucose+25 $\mu\text{mol/L}$ berberine group (both at $P<0.05$). The concentrations of TNF- α and IL-8 in the high-glucose+25 $\mu\text{mol/L}$ berberine group were lower than those in the high-glucose+10 $\mu\text{mol/L}$ berberine group (both at $P<0.05$). Real-time fluorescence quantitative PCR showed that the relative expression levels of GLAST mRNA in Müller cells among the four groups were statistically significant ($F=268.60, P<0.01$). Compared with the normal-glucose group, the relative expression level of GLAST mRNA was significantly decreased in the high-glucose group ($P<0.01$). In the high-glucose + 10 $\mu\text{mol/L}$ berberine group and high-glucose+25 $\mu\text{mol/L}$ berberine group, the relative expression level of GLAST mRNA was significantly elevated compared with the high-glucose group (both at $P<0.05$). Western blot analysis results showed that the overall comparative differences of the GLAST, PPM1A, cleaved caspase-3, NF- κB in cytoplasm and NF- κB in nucleus among the four groups were statistically significant ($F=135.20, 156.98, 80.96, 128.07, 47.36$; all at $P<0.01$). The relative expression levels of GLAST, PPM1A and NF- κB protein in cytoplasm in the high-glucose group were significantly lower than those in the normal-glucose group, high-glucose+10 $\mu\text{mol/L}$ berberine group and high-glucose+25 $\mu\text{mol/L}$ berberine group (all at $P<0.05$). The relative expression levels of cleaved caspase-3 and NF- κB protein in nucleus in the high-glucose group were significantly higher than those in the normal-glucose group, high-glucose + 10 $\mu\text{mol/L}$ berberine group and high-glucose+25 $\mu\text{mol/L}$ berberine group (all at $P<0.05$). **Conclusions** High-concentration glucose can induce cell apoptosis and inflammatory response of SD rats retinal Müller cells *in vitro*. However, berberine can inhibit cell apoptosis and inflammatory response induced by high-concentration glucose via suppressing NF- κB translocation and transcription activity, and thereby inhibiting the expression of inflammatory cytokines.

[Key words] Müller cell; Glucose, high concentration; Berberine; Cell apoptosis; Inflammation; Cell culture

Fund program: Funded Project of Natural Science Research in Minhang District, Shanghai (2013MHZ010)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200917-00647

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病的主要并发症之一, 是成年人视力障碍和致盲的

主要原因^[1]。Müller 细胞贯穿整个视网膜,是脊椎动物视网膜内主要的神经胶质细胞,参与并调控视网膜病变的整个过程^[2]。已有研究表明,在糖尿病早期, Müller 细胞核已发生改变,而视网膜血管内皮细胞、周细胞并未见明显病理改变^[3]。DR 的发生与 Müller 细胞有着密切的关系^[4]。黄连素是从黄连、黄柏、三颗针等多种植物中提取的生物碱,亦可人工合成,其具有降脂、降血糖、抗氧化、抗炎等多重作用,可有效治疗包括糖尿病、癌症、高血压和高血脂等多种慢性疾病^[5-9]。近年来,已有研究表明黄连素可抑制高氧化、高糖化、低密度脂蛋白诱导的 Müller 细胞损伤^[10]。在受白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 或肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 刺激的人视网膜色素上皮细胞中,黄连素剂量依赖性抑制 IL-8 和单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 的表达^[11]。目前,黄连素对 DR 的作用机制尚不清楚,本研究分析黄连素对高糖培养下 Müller 细胞中炎症因子及相关基因表达的影响,探讨其在 DR 中可能的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 Sprague Dawley (SD) 大鼠视网膜 Müller 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 黄连素(美国 Sigma 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);RPMI-1640 培养基(美国 HyClone 公司);青链霉素混合液、质量分数 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 消化液(美国 Solarbio 公司);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、羊抗兔 HRP 标记二抗 (A0208)(上海碧云天生物技术有限公司);大鼠 IL-8/CXCL8 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒、大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒(上海信裕生物科技有限公司);大鼠环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) ELISA 试剂盒(上海严谨生物科技有限公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒(美国 Fermentas 公司);SYBR Green PCR 试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司);RIPA 组织细胞快速裂解液(上海基尔顿生物科技有限公司);兔抗鼠 L-谷氨酸-L-天冬氨酸转运体 (L-glutamate-L-aspartate transporter, GLAST) 抗体 (Ab416)、兔抗鼠 cleaved caspase-3 (Ab13847) 抗体、兔抗鼠核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65 抗体 (Ab16502)(美国 Abcam 公司);兔抗

鼠镁离子依赖的蛋白磷酸酶 1A (protein phosphatase magnesium-dependent 1A, PPM1A) 抗体 (12961-1-AP) (美国 Proteintech 公司);兔抗鼠 GAPDH 抗体 (#5174)、兔抗鼠 H3 抗体 (#4499)(美国 CST 公司)。流式细胞仪(美国 BD 公司);CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);Real-time PCR 检测仪(美国 ABI 公司);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);成像系统(上海天能科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 Müller 细胞培养及分组 Müller 细胞用含体积分数 10% 胎牛血清、质量分数 1% 青链霉素混合液的 RPMI-1640 培养基,置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中进行培养,显微镜下观察细胞为贴壁细胞,锥虫蓝染色细胞存活率达 95% 以上。取处于对数生长期的细胞用于实验,将细胞分为正常对照组、高糖组、高糖+10 μ mol/L 黄连素组和高糖+25 μ mol/L 黄连素组,各组细胞分别采用含 5 mmol/L 葡萄糖、25 mmol/L 葡萄糖、25 mmol/L 葡萄糖+10 μ mol/L 黄连素和 25 mmol/L 葡萄糖+25 μ mol/L 黄连素的 RPMI-1640 培养基进行培养。各组细胞培养后 72 h,采用倒置相差显微镜观察细胞的生长状态和形态。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率 将处于对数生长期的细胞用胰蛋白酶消化后,以 3×10^5 细胞/孔接种于 6 孔板中,贴壁生长 24 h,吸弃原有培养基,根据不同分组进行更换培养基处理。培养后 72 h 收集细胞,加入 195 μ l Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,加入 5 μ l Annexin V-FITC 4 °C 避光孵育 15 min,再加入 5 μ l 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色液 4 °C 避光孵育 5 min,进行流式细胞仪检测。Annexin V-FITC 为绿色荧光,对应 BD 流式细胞仪 FL1 检测通道;PI 为红色荧光,对应 BD 流式细胞仪 FL2 检测通道。

1.2.3 ELISA 检测细胞上清培养液中 TNF- α 、IL-8 和 COX-2 的质量浓度 于培养后 72 h 收集各组细胞上清培养液,分别根据大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒、大鼠 IL-8/CXCL8 ELISA 试剂盒和大鼠 COX-2 ELISA 试剂盒说明书进行操作,在波长 450 nm 处测量各组的吸光度(A)值,并根据标准品浓度曲线计算得出各组样品 TNF- α 、IL-8 和 COX-2 的实际质量浓度。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测细胞中 GLAST 的相对表达量 于培养后 72 h 收集各组细胞,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,用 DNase I 消除总 RNA 中的 DNA,然后用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。取 2 μ l cDNA 构成 25 μ l 反应体系,在 ABI-7300 real-

time PCR 检测仪上进行 PCR 扩增,反应程序:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,扩增 40 个循环。目的基因 *GLAST* 正向引物:5'-ATTGGTAGCGGTGATAATGTGG-3',反向引物:5'-GGTGGCAGAACTTGAGGAGG-3';内参基因 *GAPDH* 正向引物:5'-GGAGTCTACTGGCGTCTTCAC-3',反向引物:5'-ATGAGCCCTTCCACGATGC-3'。以 *GAPDH* 为内参,数据采用仪器自带的软件(ABI Prism 7300 SDS Software)进行分析,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *GLAST* mRNA 的相对表达量。

1.2.5 Western blot 法检测细胞质中 *GLAST*、PPM1A、NF- κ B 和 cleaved caspase-3 及细胞核中 NF- κ B 蛋白的表达情况 各组细胞培养 72 h 后,用含有 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞,500 $\times g$ 离心 5 min 收集细胞,加适量磷酸盐缓冲液洗涤 1 次,再次 500 $\times g$ 离心 5 min 收集蛋白,去除上清,干燥细胞沉淀,先后加入预冷的 CER I 和 CER II (细胞膜裂解液、细胞核裂解液 4 °C 条件下 16 000 $\times g$ 离心 5 min) 后抽提细胞核蛋白和细胞质蛋白,用 BCA 法进行蛋白质定量。每孔上样量为 25 μ g 蛋白,根据蛋白定量结果取所需蛋白加入适量上样缓冲液,沸水浴 10 min 后离心取上清上样,浓缩胶 80 V 20 min,分离胶 120 V 60 min,25 V 转膜 30 min,然后将 PVDF 膜置于质量分数 5% 脱脂奶粉中室温封闭 1 h。将 PVDF 膜分别置于 *GLAST* (1:1 000)、PPM1A (1:1 000)、cleaved caspase-3 (1:1 000)、NF- κ B p65 (1:2 000)、H3 (1:1 000) 和 *GAPDH* (1:1 000) 抗体中室温孵育 2 h,用 TBST 洗涤 3 次,每次 5 min;置于羊抗兔 HRP 标记的二抗 (1:1 000) 中 37 °C 孵育 1 h,用 TBST 洗涤 3 次,每次 5 min;采用化学发光法显色。*GAPDH* 和 H3 分别为细胞质和细胞核中的内参,计算各目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析。本研究中各检测指标的数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 mean \pm SD 表示,并经 Levene 检验证实方差齐。正常对照组、高糖组、高糖+10 μ mol/L 黄连素组和高糖+25 μ mol/L 黄连素组间细胞 TNF- α 、IL-8 和 COX-2 质量浓度,细胞凋亡率和 *GLAST* 相对表达量的总体差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 Müller 细胞的形态

光学显微镜下观察可见,正常对照组、高糖组、

高糖+10 μ mol/L 黄连素组和高糖+25 μ mol/L 黄连素组培养 72 h 的 Müller 细胞形态均较一致,呈扁平细胞体大的梭形、多角形、不规则形;但各组贴壁细胞数量有差异,尤其是高糖组 Müller 细胞贴壁数量明显少于正常对照组和高糖+25 μ mol/L 黄连素组(图 1)。

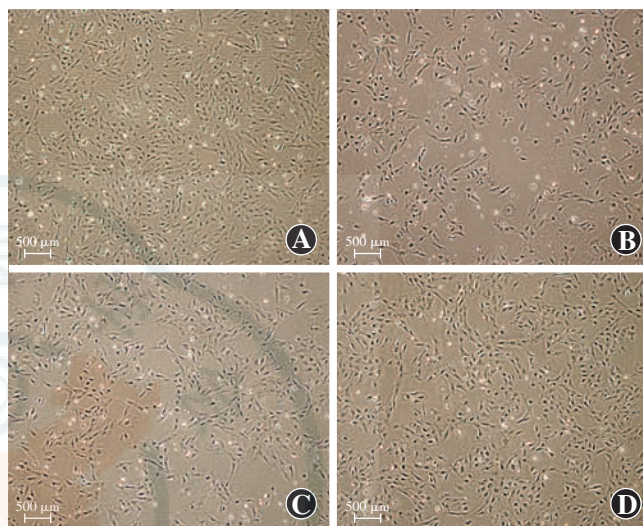


图 1 光学显微镜下各组 Müller 细胞的形态($\times 100$,标尺=500 μ m) 随着细胞培养液中葡萄糖浓度的升高,贴壁细胞的数量明显减少;而随着高糖培养液中黄连素浓度的增加,贴壁细胞的数量明显增多 A:正常对照组 B:高糖组 C:高糖+10 μ mol/L 黄连素组 D:高糖+25 μ mol/L 黄连素组

Figure 1 Morphology of Müller cells in each group under optical microscope ($\times 100$, scale bar=500 μ m) The number of adherent cells was significantly decreased with the increase of glucose concentration in cell culture medium. With the increase of berberine concentration in high-glucose culture medium, the number of adherent cells was increased A: normal control group B: high-glucose group C: high-glucose + 10 μ mol/L berberine group D: high-glucose+25 μ mol/L berberine group

2.2 各组 Müller 细胞凋亡率比较

流式细胞仪检测结果显示,正常对照组、高糖组、高糖+10 μ mol/L 黄连素组和高糖+25 μ mol/L 黄连素组 Müller 细胞凋亡率分别为 (1.37 \pm 0.21)%、(17.67 \pm 1.17)%、(10.60 \pm 0.17)% 和 (5.57 \pm 0.35)%, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 375.97, P < 0.01$), 其中与正常对照组比较,高糖组、高糖+10 μ mol/L 黄连素组和高糖+25 μ mol/L 黄连素组细胞凋亡率均明显上升,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 与高糖组比较,高糖+10 μ mol/L 黄连素组和高糖+25 μ mol/L 黄连素组细胞凋亡率明显下降,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 高糖+25 μ mol/L 黄连素组细胞凋亡率明显低于高糖+10 μ mol/L 黄连素组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 2)。

2.3 各组 Müller 细胞上清培养液中 TNF- α 、IL-8 和 COX-2 质量浓度变化

正常对照组、高糖组、高糖+10 μ mol/L 黄连素组和高糖+25 μ mol/L 黄连素组 Müller 细胞上清培养液

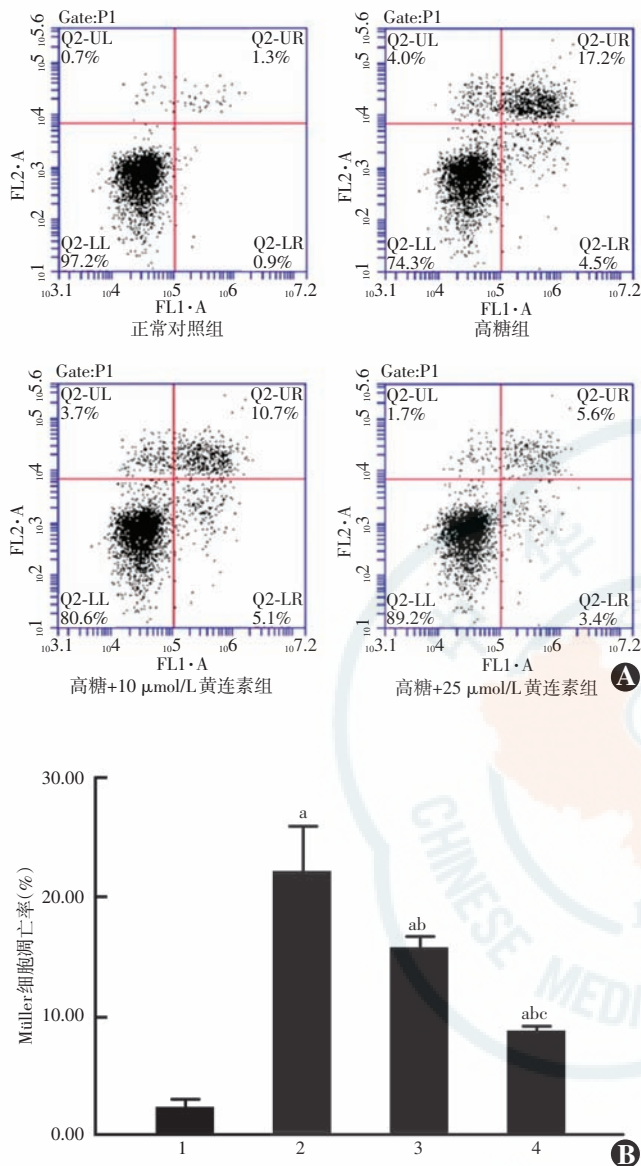


图 2 流式细胞仪检测各组 Müller 细胞的凋亡率 A: 各组 Müller 细胞凋亡流式细胞图 B: 各组 Müller 细胞凋亡率比较 $F = 375.97, P < 0.01$ 。与正常对照组比较, $^a P < 0.01$; 与高糖组比较, $^b P < 0.01$; 与高糖+10 μmol/L 黄连素组比较, $^c P < 0.01$ (单因素方差分析, Tukey 检验, $n = 3$) 1: 正常对照组; 2: 高糖组; 3: 高糖+10 μmol/L 黄连素组; 4: 高糖+25 μmol/L 黄连素组

Figure 2 The apoptosis rates of Müller cells in each group detected by flow cytometry A: Flow cytometry results of the four groups B: Quantitative comparison of apoptosis rates of Müller cells among the four groups $F = 375.97, P < 0.01$. Compared with the normal control group, $^a P < 0.01$; compared with the high-glucose group, $^b P < 0.01$; compared with the high-glucose + 10 μmol/L berberine group, $^c P < 0.01$ (one-way ANOVA, Tukey test, $n = 3$) 1: normal-glucose group; 2: high-glucose group; 3: high-glucose+10 μmol/L berberine group; 4: high-glucose+25 μmol/L berberine group

中 TNF-α 质量浓度总体比较差异有统计学意义 ($F = 28.36, P < 0.01$)。其中, 高糖组和高糖+10 μmol/L 黄连素组细胞上清培养液中 TNF-α 质量浓度明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 高糖+25 μmol/L 黄连素组细胞上清培养液中 TNF-α 质

量浓度与正常对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 高糖+10 μmol/L 黄连素组和高糖+25 μmol/L 黄连素组细胞上清培养液中 TNF-α 质量浓度明显低于高糖组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 高糖+25 μmol/L 黄连素组细胞上清培养液中 TNF-α 质量浓度明显低于高糖+10 μmol/L 黄连素组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。

各组细胞上清培养液中 IL-8 质量浓度总体比较差异有统计学意义 ($F = 35.88, P < 0.01$)。其中, 高糖组和高糖+10 μmol/L 黄连素组细胞上清培养液中 IL-8 质量浓度明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 高糖+25 μmol/L 黄连素组细胞上清培养液中 IL-8 质量浓度明显低于高糖组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 高糖+25 μmol/L 黄连素组细胞上清培养液中 IL-8 质量浓度明显低于高糖+10 μmol/L 黄连素组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 高糖+10 μmol/L 黄连素组细胞上清培养液中 IL-8 质量浓度低于高糖组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

各组细胞上清培养液中 COX-2 质量浓度总体比较差异有统计学意义 ($F = 41.59, P < 0.01$)。其中, 高糖组、高糖+10 μmol/L 黄连素组和高糖+25 μmol/L 黄连素组细胞上清培养液中 COX-2 质量浓度明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 高糖+10 μmol/L 黄连素组和高糖+25 μmol/L 黄连素组细胞上清培养液中 COX-2 质量浓度均明显低于高糖组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 高糖+10 μmol/L 黄连素组和高糖+25 μmol/L 黄连素组之间 COX-2 质量浓度比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

2.4 各组 Müller 细胞中细胞损伤相关基因和蛋白表达变化

2.4.1 各组 GLAST mRNA 的表达变化

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 正常对照组、高糖组、高糖+10 μmol/L 黄连素组和高糖+25 μmol/L 黄连素组组间 Müller 细胞中 GLAST mRNA 的相对表达量总体比较差异有统计学意义 ($F = 268.60, P < 0.01$)。其中, 与正常对照组比较, 高糖组、高糖+10 μmol/L 黄连素组和高糖+25 μmol/L 黄连素组细胞中 GLAST mRNA 的相对表达量明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 高糖+10 μmol/L 黄连素组和高糖+25 μmol/L 黄连素组细胞中 GLAST mRNA 的相对表达量明显高于高糖组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 25 μmol/L 黄连素组细胞中 GLAST mRNA 的相对表达量明显高于高糖+10 μmol/L 黄连素组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 1 各组 Müller 细胞上清中 TNF-α、IL-8 和 COX-2 质量浓度比较 (mean ±SD, ng/L)

Table 1 Comparison of TNF-α, IL-8 and COX-2 concentrations in the supernatant of Müller cells among the four groups (mean ±SD, ng/L)

| 组别 | 样本量 | TNF-α | IL-8 | COX-2 |
|-------------------|-----|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| 正常对照组 | 3 | 103.52±9.15 | 105.63±18.73 | 43.51±5.35 |
| 高糖组 | 3 | 255.55±33.58 ^a | 244.93±20.15 ^a | 102.77±5.78 ^a |
| 高糖+10 μmol/L 黄连素组 | 3 | 190.88±24.07 ^{ab} | 200.90±12.47 ^a | 75.28±9.70 ^{ab} |
| 高糖+25 μmol/L 黄连素组 | 3 | 132.74±11.04 ^{bc} | 140.91±19.28 ^{bc} | 61.34±4.93 ^{ab} |
| F 值 | | 28.36 | 35.88 | 41.59 |
| P 值 | | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

注:与各自正常对照组比较,^a*P*<0.05;与各自高糖组比较,^b*P*<0.05;与各自高糖+10 μmol/L 黄连素组比较,^c*P*<0.05(单因素方差分析,Turkey 检验) TNF-α:肿瘤坏死因子 α;IL-8:白细胞介素-8;COX-2:环氧化酶-2

Note:Compared with the normal control group,^a*P*<0.05;compared with the high-glucose group,^b*P*<0.05;compared with the high-glucose+10 μmol/L berberine group,^c*P*<0.05 (one-way ANOVA, Turkey test) TNF-α:tumor necrosis factor-α;IL-8:interleukin-8;COX-2:cyclooxygenase-2

表 2 各组 Müller 细胞中 GLAST mRNA 相对表达量的比较 (mean ±SD)

Table 2 Comparison of the relative expressions of GLAST mRNA in Müller cells among the four groups (mean ±SD)

| 组别 | 样本量 | GLAST mRNA |
|-------------------|-----|--------------------------|
| 正常对照组 | 3 | 1.00±0.02 |
| 高糖组 | 3 | 0.38±0.02 ^a |
| 高糖+10 μmol/L 黄连素组 | 3 | 0.53±0.02 ^{ab} |
| 高糖+25 μmol/L 黄连素组 | 3 | 0.78±0.05 ^{abc} |
| F 值 | | 268.60 |
| P 值 | | <0.01 |

注:与正常对照组比较,^a*P*<0.05;与高糖组比较,^b*P*<0.05;与高糖+10 μmol/L 黄连素组比较,^c*P*<0.05(单因素方差分析,Turkey 检验) GLAST:L-谷氨酸-L-天冬氨酸转运体

Note:Compared with the normal control group,^a*P*<0.05;compared with the high-glucose group,^b*P*<0.05;compared with the high-glucose+10 μmol/L berberine group,^c*P*<0.05 (one-way ANOVA, Turkey test) GLAST:L-glutamate-L-aspartate transporter

2.4.2 各组细胞损伤相关蛋白的表达变化 Western blot 法检测结果显示,正常对照组、高糖组、高糖+10 μmol/L 黄连素组和高糖+25 μmol/L 黄连素组组间 Müller 细胞质中 GLAST、PPM1A、cleaved caspase-3 和 NF-κB 蛋白相对表达量以及细胞核中 NF-κB 蛋白相对表达量总体比较,差异均有统计学意义(*F*=135.20、156.98、80.96、128.07、47.36,均 *P*<0.01)。其中,与正常对照组比较,高糖组 Müller 细胞质中 GLAST、PPM1A 和 NF-κB 蛋白相对表达量明显降低,细胞质中 cleaved caspase-3 和细胞质中 NF-κB 蛋白相对表达量明显升高,差异均有统计学意义(均 *P*<0.05);与高糖组比较,高糖+10 μmol/L 黄连素组和高糖+25 μmol/L 黄连素组细胞质中 GLAST、PPM1A 和

NF-κB 蛋白相对表达量明显升高,细胞质中 cleaved caspase-3 和细胞核中 NF-κB 蛋白相对表达量明显降低,差异均有统计学意义(均 *P*<0.05);高糖+25 μmol/L 黄连素组细胞质中 GLAST、PPM1A 和 NF-κB 蛋白的相对表达量均明显高于高糖+10 μmol/L 黄连素组,细胞质中 cleaved caspase-3 和细胞核中 NF-κB 蛋白的相对表达量均明显低于高糖+10 μmol/L 黄连素组,差异均有统计学意义(均 *P*<0.05)(图 3,表 3)。

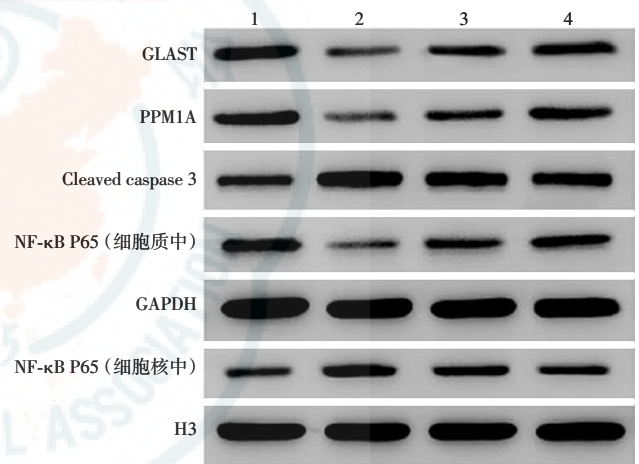


图 3 Western blot 法检测各组细胞损伤相关蛋白表达变化 与正常对照组比较,高糖组 Müller 细胞质中 GLAST、PPM1A 和 NF-κB 蛋白相对表达量显著降低,而细胞质中 cleaved caspase-3 和细胞质中 NF-κB 蛋白相对表达量显著升高。随着黄连素浓度的增加,Müller 细胞质中 GLAST、PPM1A 和 NF-κB 蛋白相对表达量显著升高,而细胞质中 cleaved caspase-3 和细胞核中 NF-κB 蛋白相对表达量则显著降低 1:正常对照组;2:高糖组;3:高糖+10 μmol/L 黄连素组;4:高糖+25 μmol/L 黄连素组 GLAST:L-谷氨酸-L-天冬氨酸转运体;PPM1A:镁离子依赖的蛋白磷酸酶 1A;caspase:半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶;NF-κB:核因子 κB

Figure 3 The expression levels of the proteins related with cell damage in Müller cells detected by Western blot in the four groups

Compared with the normal control group, the relative expression levels of GLAST, PPM1A, and NF-κB decreased significantly in cytoplasm in the high-glucose group, while the relative expression levels of cleaved caspase-3 in cytoplasm and NF-κB increased significantly in nucleus. As berberine concentration increased in the high-glucose group, the relative expression levels of GLAST, PPM1A and NF-κB in the cytoplasm were significantly enhanced, while those of cleaved caspase-3 in cytoplasm and NF-κB in nucleus were significantly reduced 1:normal control group; 2: high-glucose group; 3: high-glucose+10 μmol/L berberine group; 4: high-glucose+10 μmol/L berberine group GLAST: L-glutamate-L-aspartate transporter; PPM1A: magnesium ion-dependent protein phosphatase; caspase: cysteine aspartic acid protease; NF-κB: nuclear factor-κB

表 3 Western blot 法检测各组 Müller 细胞中细胞损伤相关蛋白表达量的比较 (mean ±SD)
Table 3 Comparison of the expression levels of the proteins related with cell damage in Müller cells by Western blot analysis among the four groups (mean ±SD)

| 组别 | 样本量 | GLAST | PPM1A | Cleaved caspase-3 | NF-κB (细胞质中) | NF-κB (细胞核中) |
|-------------------|-----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 正常对照组 | 3 | 0.76±0.04 | 0.76±0.03 | 0.55±0.03 | 0.72±0.04 | 0.36±0.03 |
| 高糖组 | 3 | 0.36±0.01 ^a | 0.32±0.02 ^a | 0.90±0.02 ^a | 0.33±0.01 ^a | 0.59±0.01 ^a |
| 高糖+10 μmol/L 黄连素组 | 3 | 0.50±0.02 ^{ab} | 0.51±0.02 ^{ab} | 0.82±0.03 ^{ab} | 0.56±0.03 ^{ab} | 0.52±0.03 ^{ab} |
| 高糖+25 μmol/L 黄连素组 | 3 | 0.68±0.02 ^{abc} | 0.67±0.02 ^{abc} | 0.74±0.02 ^{abc} | 0.69±0.02 ^{bc} | 0.41±0.01 ^{bc} |
| F 值 | | 135.20 | 156.98 | 80.96 | 128.07 | 47.36 |
| P 值 | | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

注:与各自正常对照组比较,^a*P*<0.05;与各自高糖组比较,^b*P*<0.05;与各自高糖+10 μmol/L 黄连素组比较,^c*P*<0.05(单因素方差分析,Turkey 检验) GLAST:L-谷氨酸-L-天冬氨酸转运体;PPM1A:镁离子依赖的蛋白磷酸酶 1A;caspase:半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶;NF-κB:核因子 κB

Note:Compared with the normal control group,^a*P*<0.05;compared with the high-glucose group,^b*P*<0.05;compared with the high-glucose+10 μmol/L berberine group,^c*P*<0.05 (one-way ANOVA, Turkey test) GLAST: L-glutamate-L-aspartate transporter; PPM1A: magnesium ion-dependent protein phosphatase; caspase: cysteine aspartic acid protease; NF-κB: nuclear factor-κB

3 讨论

DR 是一种低度慢性炎症性疾病^[12]。炎症反应和炎性因子在 DR 的发生和发展过程中起着重要作用,可上调 VEGF 的表达,导致视网膜炎症、血管新生、血管渗漏和血管损伤^[13-14]。通过对条件性敲除视网膜 Müller 细胞来源 VEGF 的小鼠模型研究发现,在高糖状态下,该基因改造动物模型可导致视网膜 VEGF 的表达量减少约 50%,证实了 Müller 细胞是糖尿病小鼠主要的视网膜 VEGF 来源^[15]。同时体内高血糖和体外高糖培养基可诱导视网膜 Müller 胶质细胞发生炎症反应^[16]。GLAST 作为 Müller 神经胶质细胞的表面标志物,在视网膜中特异性表达^[17]。在高糖培养基中,Müller 细胞的 GLAST 相对表达量较正常对照显著降低,细胞线粒体功能异常,诱导细胞凋亡^[17-19]。而在糖尿病状态下,视网膜 Müller 细胞内 GLAST 功能下降,导致细胞外谷氨酸蓄积,引起视网膜神经功能异常^[20]。本实验采用 25 mmol/L 葡萄糖高糖培养基模拟糖尿病患者体内的高糖状态培养 Müller 细胞,结果证实在体外高糖环境下,Müller 细胞凋亡增加,炎性因子 TNF-α、IL-8 和 COX-2 质量浓度明显升高,GLAST 的相对表达量明显降低。本研究中,在高糖培养基中同时添加黄连素后,Müller 细胞凋亡率明显降低,炎性因子 TNF-α、IL-8 和 COX-2 质量浓度明显下降,GLAST 的相对表达量明显升高,且随着黄连素浓度的增加,作用效果增强。以上结果表明,黄连素可抑制高糖引起的 Müller 细胞炎症反应及细胞凋亡,但是其具体的信号调节通路有待进一步研究。

目前已有研究显示,重组人促红细胞生成素、白藜

芦醇、脑源性神经营养因子、叔丁基对苯二酚和 5,6-二氢环戊烯 1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮(5,6-dihydrocyclopenta-1,2-dithiole-3-thione, CPDT)等多种物质可增加高糖环境下视网膜 Müller 细胞的活性^[21],抑制细胞凋亡,对高糖培养的 Müller 细胞发挥保护作用^[22-25]。其中,叔丁基对苯二酚和 CPDT 通过 Nrf2/HO-1 氧化应激通路降低 Müller 细胞中活性氧含量,调节 bcl-2 和 bax 蛋白表达平衡,抑制细胞凋亡,从而对高糖培养的 Müller 细胞发挥保护作用^[24-25]。此外,柚皮苷、载脂运载蛋白 2 和糖皮质激素诱导的亮氨酸拉链蛋白来源的多肽(glucocorticoid-induced leucine zipper peptide, GILZ-p)等通过调节炎症反应对 DR 大鼠和高糖或脂多糖刺激的 Müller 细胞起保护作用。柚皮苷通过抑制高糖诱导的 DR 大鼠视网膜 Müller 细胞中 NF-κB p65 的核易位下调 TNF-α、IL-β 和 IL-6 等炎性因子的表达水平,发挥抗炎作用^[26]。脂多糖可诱导眼部炎症,受脂多糖刺激的 Müller 细胞中 TNF-α、IL-β 和 IL-6 等炎性因子的表达水平上调,而载脂运载蛋白 2 和 GILZ-p 可通过抑制 NF-κB p65 的磷酸化和核易位下调炎性因子的表达水平,抑制炎症反应^[27-28]。

研究表明,黄连素通过 NF-κB p65 信号通路在多种细胞和疾病中发挥抗炎作用^[29-32]。在眼部,黄连素可能通过抑制 NF-κB 的核易位而影响人视网膜色素上皮细胞中 IL-8 和 MCP-1 的表达^[11]。此外,PPM1A 可去磷酸化 NF-κB p65 的 S536 和 S276 残基,选择性抑制 NF-κB 的转录活性,从而抑制 IL-6 等细胞因子的表达^[33]。PPM1A 磷酸化 IKKβ,促进 NF-κB 的核易位以及 NF-κB 相关蛋白 IL-6 的表达^[34]。本研究中采用 Western blot 法检测细胞质中 PPM1A、NF-κB p65 和

cleaved caspase-3, 以及细胞核中 NF- κ B p65 的表达水平, 结果显示高糖环境下 Müller 细胞的细胞质中 PPM1A 和 NF- κ B p65 蛋白相对表达量明显降低, 细胞质中 cleaved caspase-3 和细胞核中 NF- κ B p65 蛋白相对表达量明显升高; 添加黄连素后能有效逆转相关蛋白的表达变化。因此, 在高糖培养下的 Müller 细胞中, 黄连素很可能通过上调 PPM1A 的表达, 抑制 NF- κ B p65 的核易位和 NF- κ B 的转录活性, 从而下调促炎性因子的表达, 发挥抗炎和抗凋亡作用。

本研究结果表明, 高糖可引起 Müller 细胞中炎性相关因子表达上调, 诱导细胞凋亡; 而黄连素明显降低炎性因子的表达, 抑制细胞凋亡, 为其用于治疗 DR 提供了实验依据。DR 的病理机制复杂, 本研究阐述了黄连素对体外高糖环境中 Müller 细胞的影响, 详尽的体内和临床试验结果仍有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Stitt AW, Curtis TM, Chen M, et al. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2016, 51: 156-186. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.08.001.
- [2] Wang J, O'Sullivan ML, Mukherjee D, et al. Anatomy and spatial organization of Müller glia in mouse retina [J]. *J Comp Neurol*, 2017, 525(8): 1759-1777. DOI: 10.1002/cne.24153.
- [3] Yong PH, Zong H, Medina RJ, et al. Evidence supporting a role for N-(3-formyl-3,4-dehydropiperidino) lysine accumulation in Müller glia dysfunction and death in diabetic retinopathy [J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 2524-2538.
- [4] 陈晶, 王华, 李强翔. Müller 细胞与糖尿病视网膜病变关系的研究 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(18): 5329-5331. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2015.18.145.
- [5] Kong W, Wei J, Abidi P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins [J]. *Nat Med*, 2004, 10(12): 1344-1351. DOI: 10.1038/nm1135.
- [6] 蔡江怀, 王理理. 三七总甙、丹参、黄连素联合治疗早期 DR 42 例 [J]. *江苏中医药*, 2004, 25(6): 36-37. DOI: 10.3969/j.issn.1672-397X.2004.06.019.
Cai JH, Wang LL. Treatment of 42 cases of early DR with notoginseng total glycoside, radix salviae miltiorrhizae and berberine [J]. *Jiangsu J Traditional Chin Med*, 2004, 25(6): 36-37. DOI: 10.3969/j.issn.1672-397X.2004.06.019.
- [7] Bhutada P, Mundhada Y, Bansod K, et al. Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 220(1): 30-41. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.01.022.
- [8] Wang Q, Qi J, Hu R, et al. Effect of berberine on proinflammatory cytokine production by ARPE-19 cells following stimulation with tumor necrosis factor- α [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(4): 2395-2402. DOI: 10.1167/iovs.11-8982.
- [9] Vuddanda PR, Chakraborty S, Singh S. Berberine: a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, 19(10): 1297-1307. DOI: 10.1517/13543784.2010.517745.
- [10] Fu D, Yu JY, Connell AR, et al. Beneficial effects of berberine on oxidized LDL-induced cytotoxicity to human retinal Müller cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(7): 3369-3379. DOI: 10.1167/iovs.16-19291.
- [11] Cui HS, Hayasaka S, Zhang XY, et al. Effect of berberrubine on interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression in human retinal pigment epithelial cell line [J]. *Life Sci*, 2006, 79(10): 949-956. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.05.004.
- [12] 刘巨平, 李筱荣. 糖尿病视网膜病变: 一种非可控性炎症 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(1): 94-96. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.019.
Liu JP, Li XR. Diabetic retinopathy: a nonresolving inflammation [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(1): 94-96. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.01.019.
- [13] Semeraro F, Cancarini A, dell'Omo R, et al. Diabetic retinopathy: vascular and inflammatory disease [J/OL]. *J Diabetes Res*, 2015, 2015: 582060 [2020-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4475523/>. DOI: 10.1155/2015/582060.
- [14] 马燕, 姜燕荣. 炎症反应和炎性因子与糖尿病视网膜病变的研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31(1): 86-90. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.01.021.
Ma Y, Jiang YR. Research advance in the relationship of inflammatory reaction and inflammatory factor with diabetic retinopathy [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2013, 31(1): 86-90. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.01.021.
- [15] Wang J, Xu X, Elliott MH, et al. Müller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage [J]. *Diabetes*, 2010, 59(9): 2297-2305. DOI: 10.2337/db09-1420.
- [16] Zong H, Ward M, Madden A, et al. Hyperglycaemia-induced pro-inflammatory responses by retinal Müller glia are regulated by the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) [J]. *Diabetologia*, 2010, 53(12): 2656-2666. DOI: 10.1007/s00125-010-1900-z.
- [17] Namekata K, Harada C, Guo X, et al. Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAAC1-deficient mice [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 465(2): 160-164. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.09.029.
- [18] Zeng K, Yang N, Wang D, et al. Resveratrol prevents retinal dysfunction by regulating glutamate transporters, glutamine synthetase expression and activity in diabetic retina [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(5): 1050-1064. DOI: 10.1007/s11064-015-1793-9.
- [19] Tien T, Zhang J, Muto T, et al. High glucose induces mitochondrial dysfunction in retinal Müller cells: implications for diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(7): 2915-2921. DOI: 10.1167/iovs.16-21355.
- [20] 毛静海, 许迅. 糖尿病视网膜 Müller 细胞 GLAST 功能变化的研究进展 [J]. *国际眼科纵览*, 2006, 30(2): 117-119.
- [21] 曲虹, 房泉. 重组人促红细胞生成素对高糖培养大鼠视网膜 Müller 细胞的影响 [J]. *临床眼科杂志*, 2015, (5): 461-463, 464. DOI: 10.3969/j.issn.1006-8422.2015.05.024.
Qu H, Li Q. Effects of recombinant human erythropoietin on high glucose cultured retinal Müller cells [J]. *J Clin Ophthalmol*, 2015, (5): 461-464. DOI: 10.3969/j.issn.1006-8422.2015.05.024.
- [22] 曾凯宏, 王元, 邓波, 等. 白藜芦醇调节微小 RNA-29b 表达抑制高糖诱导的大鼠视网膜 Müller 细胞凋亡 [J]. *实用医院临床杂志*, 2017, 14(4): 22-26. DOI: 10.3969/j.issn.1672-6170.2017.04.006.
Zeng KH, Wang Y, Deng B, et al. Resveratrol inhibits the apoptosis of rats retinal muller cells induced by high glucose via regulating miRNA-

- 29b expression[J]. Pract J Clin Med, 2017, 14(4): 22-26. DOI: 10.3969/j.issn.1672-6170.2017.04.006.
- [23] 梁汇珉, 刘学政. 脑源性神经营养因子(BDNF)对高糖环境下视网膜 Müller 细胞的保护作用[J]. 眼科新进展, 2018, 38(8): 714-718. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2018.0168.
- Liang HM, Liu XZ. Effect of brain-derived neurotrophic factor on high glucose induced apoptosis of retinal Müller cell [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2018, 38(8): 714-718. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2018.0168.
- [24] 田敏, 吴进川, 何薇, 等. 叔丁基对苯二酚对高糖培养视网膜 Müller 细胞核因子 E2 相关因子 2、血红素氧合酶 1 和磷脂酰肌醇-3 激酶表达的影响[J]. 中华眼底病杂志, 2018, 34(4): 382-387. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2018.04.015.
- Tian M, Wu JC, He W, et al. Effect of tert-butylhydroquinone on the expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2, heme oxygenase-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in high glucose cultured retinal Müller cells [J]. Chin J Ocul Fund Dis, 2018, 34(4): 382-387. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2018.04.015.
- [25] 黄棋, 田敏, 周琦, 等. 5,6-二氢环戊烯 1,2-二硫杂环戊烯-3-硫酮对高糖环境下大鼠视网膜 Müller 细胞的影响[J]. 中华眼底病杂志, 2017, 33(3): 290-294. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2017.03.016.
- Huang Q, Tian M, Zhou Q, et al. Effect of 5,6-dihydrocyclopenta-1,2-dithiole-3-thione on Müller cells under the high glucose [J]. Chin J Ocul Fundus Dis, 2017, 33(3): 290-294. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2017.03.016.
- [26] Liu L, Zuo Z, Lu S, et al. Naringin attenuates diabetic retinopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress and NF- κ B activation *in vivo* and *in vitro* [J]. Iran J Basic Med Sci, 2017, 20(7): 813-821. DOI: 10.22038/IJBMS.2017.9017.
- [27] Tang W, Ma J, Gu R, et al. Lipocalin 2 suppresses ocular inflammation by inhibiting the activation of NF- κ B pathway in endotoxin-induced uveitis [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(1): 375-388. DOI: 10.1159/000488472.
- [28] Gu R, Ding X, Tang W, et al. A synthesized glucocorticoid-induced leucine zipper peptide inhibits retinal Müller cell gliosis [J/OL]. Front Pharmacol, 2018, 9: 331 [2020-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5897418/>. DOI: 10.3389/fphar.2018.00331.
- [29] Liu L, Luo N, Guo J, et al. Berberine inhibits growth and inflammatory invasive phenotypes of ectopic stromal cells: imply the possible treatment of adenomyosis [J]. J Pharmacol Sci, 2018, 137(1): 5-11. DOI: 10.1016/j.jphs.2017.12.001.
- [30] Zhu JR, Lu HD, Guo C, et al. Berberine attenuates ischemia-reperfusion injury through inhibiting HMGB1 release and NF- κ B nuclear translocation [J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39(11): 1706-1715. DOI: 10.1038/s41401-018-0160-1.
- [31] Yu Y, Zhang M, Hu Y, et al. Increased bioavailable berberine protects against myocardial ischemia reperfusion injury through attenuation of NF κ B and JNK signaling pathways [J]. Int Heart J, 2018, 59(6): 1378-1388. DOI: 10.1536/ihj.17-458.
- [32] Xu L, Zheng X, Wang Y, et al. Berberine protects acute liver failure in mice through inhibiting inflammation and mitochondria-dependent apoptosis [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 819: 161-168. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.11.013.
- [33] Lu X, An H, Jin R, et al. PPM1A is a RelA phosphatase with tumor suppressor-like activity [J]. Oncogene, 2014, 33(22): 2918-2927. DOI: 10.1038/onc.2013.246.
- [34] Sun W, Yu Y, Dotti G, et al. PPM1A and PPM1B act as IKK β phosphatases to terminate TNF α -induced IKK β -NF- κ B activation [J]. Cell Signal, 2009, 21(1): 95-102. DOI: 10.1016/j.cellsig.2008.09.012.

(收稿日期: 2020-09-17 修回日期: 2020-11-01)

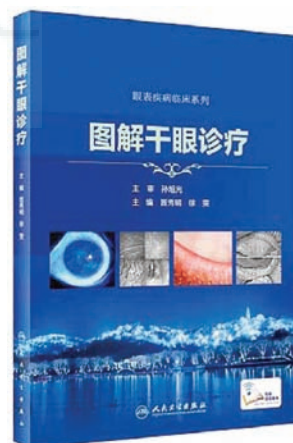
(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

消 息

《图解干眼诊疗》出版发行

由浙江大学医学院附属第二医院晋秀明教授和徐雯教授团队编写的《图解干眼诊疗》一书于 2020 年 8 月由人民卫生出版社正式出版发行。本书内容包括干眼的检查与诊断篇、疾病篇及相关病例展示、治疗篇及相关病例展示 3 个篇章。全书共有千余幅图片资料, 向读者展示了各类干眼的检查和诊断、干眼相关各类眼表疾病的临床特征以及相应治疗策略的影像资料, 揭示干眼相关的眼表形态和功能变化, 并梳理干眼相关疾病的诊疗要点, 分享干眼门诊建设的思路, 总结实际操作经验策略。本书以大量图片和视频为特色, 贴合临床, 不仅利于基层眼科医生熟悉干眼门诊诊疗步骤和具体操作, 对于复杂顽固性干眼也能获得深入的认识和了解; 广大患者也能通过本书了解自身病情, 正确对待, 不忽视不焦虑。随书附赠 15 个高清视频, 内容覆盖干眼检查及治疗相关操作技巧, 手机扫描二维码即可实时观看。希望本书能为广大医生了解认识干眼诊治、掌握操作要领、建设干眼门诊提供切实有效的指导。

本书为大 16 开精装, 全书共 195 千字, 彩色印刷, 配网络增值服务(检查、治疗视频), 定价 128.00 元。全国各大新华书店、医药书店、当当网、卓越亚马逊网均有销售, 也可登陆人民智慧服务商城(<http://www.ppmhmall.com>)或人卫天猫旗舰店(<http://rmws.tmall.com>)在线购买, 或联系人民卫生出版社销售部购买, 电话: 010-59787226/59787033。



(人民卫生出版社五官编辑部)