

积雪草酸对糖尿病大鼠血—视网膜屏障的保护作用

方梦园 李秋明 杨鑫 万伟伟 龙洋 刘宏卓 王文萃

郑州大学第一附属医院眼科 450052

通信作者:王文萃,Email:13653861909@126.com

【摘要】 目的 研究积雪草酸(AA)对糖尿病大鼠血—视网膜屏障(BRB)的保护作用及其可能机制。**方法** 取健康 8 周龄雄性 SD 大鼠 96 只,按照随机数字表法分为正常对照组、糖尿病模型组、低剂量 AA 组和高剂量 AA 组,每组 24 只。取糖尿病模型组、低剂量 AA 组、高剂量 AA 组大鼠采用腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病模型,正常对照组注射等量枸橼酸盐缓冲液,模型建立后 1 个月,低剂量 AA 组和高剂量 AA 组分别给予 37.5 mg/kg、75.0 mg/kg AA 灌胃;正常对照组及糖尿病模型组给予等量 0.5% 羧甲基纤维素钠灌胃,每日 1 次。在给药第 0、1、2、3、4 周称量大鼠体重并检测鼠尾静脉血糖值。给药后 1 个月取大鼠视网膜组织进行实验。采用苏木精—伊红染色法观察大鼠视网膜组织的病理变化;采用伊文思蓝定量法检测 BRB 的破坏情况;采用免疫荧光染色法检测视网膜组织中 Occludin、Notch1、Jagged 典型 Notch 配体 1(JAG1)、Delta 样典型 Notch 配体 4(DLL4)蛋白的表达分布;采用实时荧光定量 PCR 法及 Western blot 法检测 Occludin、Notch1、JAG1、DLL4 mRNA 及蛋白的表达。**结果** 给药第 4 周,高剂量 AA 组体重明显高于糖尿病模型组,低剂量 AA 组和高剂量 AA 组血糖浓度均低于糖尿病模型组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。正常对照组大鼠视网膜细胞排列整齐,结构层次清晰。糖尿病模型组大鼠视网膜明显增厚,外核层增厚,细胞排列紊乱,结构层次不清晰。低剂量 AA 组和高剂量 AA 组大鼠视网膜厚度和结构均较糖尿病模型组明显改善。正常对照组、糖尿病模型组、低剂量 AA 组和高剂量 AA 组视网膜中伊文思蓝含量依次为(3.07±1.30)、(13.73±3.88)、(9.57±2.69)和(6.55±1.61)ng/mg,总体差异有统计学意义($F = 18.50, P < 0.01$),其中高剂量 AA 组视网膜中伊文思蓝含量明显低于糖尿病模型组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。糖尿病模型组 Occludin 蛋白相对表达量明显低于其余 3 个组,Notch1、JAG1 和 DLL4 蛋白相对表达量明显高于其余 3 个组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);高剂量 AA 组 Occludin 蛋白相对表达量明显高于低剂量 AA 组,Notch1、JAG1 和 DLL4 蛋白相对表达量明显低于低剂量 AA 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与正常对照组比较,糖尿病模型组及低剂量 AA 组 Occludin mRNA 相对表达量明显下调,Notch1、JAG1 和 DLL4 mRNA 相对表达量明显上调,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);高剂量 AA 组 Occludin mRNA 相对表达量明显高于糖尿病模型组和低剂量 AA 组,Notch1 mRNA 相对表达量明显低于糖尿病模型组和低剂量 AA 组,JAG1 和 DLL4 mRNA 相对表达量明显低于糖尿病模型组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** AA 可能通过抑制 Notch1 信号通路发挥对糖尿病大鼠 BRB 的保护作用。

【关键词】 积雪草酸;糖尿病视网膜病变;血—视网膜屏障;Notch1 信号通路

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20201024-00713

Protective effect of asiatic acid on blood-retinal barrier in diabetic rats

Fang Mengyuan, Li Qiuming, Yang Xin, Wan Weiwei, Long Yang, Liu Hongzhuo, Wan Wencui

Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Corresponding author: Wan Wencui, Email: 13653861909@126.com

[Abstract] Objective To investigate the protective effect of asiatic acid (AA) on blood-retinal barrier (BRB) in diabetic rats and its possible mechanism. **Methods** Ninety-six healthy 8-week-old male SD rats were randomly divided into normal control group, diabetes group, low-dose AA group and high-dose AA group, with 24 rats in each group. Intraperitoneal injection of streptozocin (STZ) was used to establish diabetes model. One month after the establishment of the model, the low-dose AA group and the high-dose AA group were given intragastrical administration of 37.5 mg/kg AA and 75.0 mg/kg AA, respectively, once a day according to grouping. The normal

control group and the diabetes group were administrated with the same amount of 0.5% sodium carboxymethyl cellulose. The body weight of the rats were weighted at week 0, 1, 2, 3, 4 after intragastrical administration. Blood was taken from the tail vein and the blood glucose level was measured. The retina was obtained one month following the administration. Pathological changes of the rats retina were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining. Evan's blue quantitative method was used to detect the damage of blood-retinal barrier (BRB). Immunofluorescence staining was performed to detect the distribution of Occludin, Notch1, Jagged canonical Notch ligand 1 (JAG1) and Delta like canonical Notch ligand 4 (DLL4) in retina. The mRNA and protein expressive levels of Occludin, Notch1, JAG1 and DLL4 were detected by Real-time PCR and Western blot. The study protocol was approved by a Scientific Research and Clinical Trial Ethics Committee of The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University (No. 2020-KY-228). The use and care of animals complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of National Institutes of Health and the 3R rules. **Results** At 4 weeks after intragastrical administration, the body weight of the high-dose AA group was significantly higher than that of the diabetes group, and the blood glucose values were significantly lower in the high-dose AA group and the low-dose AA group in comparison with the diabetes group (all at $P < 0.05$). The cells were arranged orderly with clear layered structure in the normal control group. In the diabetes group, the retina was thicker than that of the normal control group, with a thicker outer nuclear layer, disordered cell arrangement and unclear layered structure. Compared with the diabetes group, the total retinal thickness and structure were obviously improved in the low-dose AA group and the high-dose AA group. Evan's blue leakage in retina was (3.07 ± 1.30), (13.73 ± 3.88), (9.57 ± 2.69) and (6.55 ± 1.61) ng/mg in the normal control group, the diabetes group, the low-dose AA group and the high-dose AA group, respectively. There was a significant difference in leakage of Evan's blue among the four groups ($F = 18.50, P < 0.01$), among which the leakage of Evan's blue dye in the high-dose AA group was significantly lower than that of the diabetes group ($P < 0.01$). Compared with the diabetes group, there was significantly higher relative expression level of Occludin protein and significantly lower relative expression levels of Notch1, JAG1 and DLL4 proteins in the other three groups (all at $P < 0.05$). The relative expression level of Occludin protein was significantly higher and the relative expression levels of Notch1, JAG1 and DLL4 proteins were significantly lower in the high-dose AA group than those in the low-dose AA group (all at $P < 0.05$). Compared with the normal control group, the Occludin mRNA expression level was significantly decreased and the expression levels of Notch1, JAG1 and DLL4 mRNA were significantly increased in the diabetes group and low-dose AA group (all at $P < 0.01$). The Occludin mRNA expression level was higher and the Notch1 mRNA expression level was lower in the high-dose AA group than those in the diabetes group and the low-dose AA group, and the expression levels of JAG1 and DLL4 mRNA were lower in the high-dose AA group in comparison with the diabetes group, and the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Asiatic acid might play a protective role on BRB in diabetic rats by inhibiting Notch1 signaling pathway.

[**Key words**] Asiatic acid; Diabetic retinopathy; Blood-retina barrier; Notch1 signal pathway

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20201024-00713

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病常见的微血管并发症,是目前导致中老年视力损害和不可逆盲的主要原因^[1-2]。早期干预 DR 可延缓疾病的发展,并有效提高患者的视力预后和改善患者的生活质量^[3]。因此研究控制或者改善早期 DR 病理变化的药物对于 DR 患者具有重要意义^[4]。积雪草酸(asiatic acid, AA)是从热带药用植物积雪草中提取的一种五环三萜类化合物,作为抗氧化剂和抗炎药物被广泛应用^[5]。研究表明,AA 具有改善糖尿病动物模型的组织应激及并发症的作用,控制糖尿病的进展^[6-9]。有研究报道,在青光眼大鼠模型中,AA 通过改善视网膜屏障功能障碍发挥视神经保护作用^[10]。

此外,AA 还可通过改善小鼠血—脑屏障通透性来发挥神经保护特性^[11]。血—视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)在维持内眼稳态中发挥重要作用,是包括 DR 在内的许多致盲视网膜疾病的病理生理学基础^[12-13]。目前,尚未有文献报道 AA 是否对 DR 中 BRB 的破坏有改善作用。同时,研究表明 Notch1 信号通路在 DR 患者 BRB 变化中发挥着重要作用,持续高糖环境会刺激 Jagged 典型 Notch 配体 1 (Jagged canonical Notch ligand 1, JAG1)、Delta 样典型 Notch 配体 4 (Delta like canonical Notch ligand 4, DLL4) 的产生,通过激活 Notch1 信号通路增加病理性血管通透性,参与 BRB 的破坏过程^[14]。本研究拟探讨 AA 与

Notch1 信号通路的关系,探讨 AA 能否通过抑制 Notch1 通路发挥对糖尿病大鼠 BRB 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 8 周龄 SD 健康雄性大鼠 96 只,体质量 170~200 g(辽宁长生生物科技股份有限公司),将大鼠置于 12 h 光照黑暗交替、温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 45%~55%的环境下,自由进食饮水,适应性喂养 1 周。本研究获得郑州大学第一附属医院科研和临床伦理委员会批准(批文号:2020-KY-228)。实验动物的使用遵守美国国立卫生研究院颁布的实验动物使用和护理原则以及 3R 原则。

1.1.2 主要试剂与仪器 积雪草酸(F126912)、伊文思蓝[E104208,阿拉丁试剂(上海)有限公司];链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)(S17049,上海源叶生物科技有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(PC0020)、羊抗兔 IgG-HRP(SE134)、羊抗小鼠 IgG-HRP(SE131)、SYBR Green(SY1020)(北京索莱宝科技有限公司);兔抗大鼠 Occludin 一抗(A2601,武汉爱博泰克生物科技有限公司);兔抗大鼠 Notch1 一抗(#4380,美国 CST 实业有限公司);兔抗大鼠 JAG1 一抗(DF8269,江苏亲科生物研究中心有限公司);兔抗大鼠 DLL4 一抗(WL02214,沈阳万类生物科技有限公司);Cy3 标记山羊抗兔 IgG(A0516,上海碧云天生物技术有限公司);小鼠抗大鼠 GAPDH 一抗(60004-1-Ig,武汉三鹰生物技术有限公司);Super M-MLV 反转录酶(PR6502,北京百泰克生物技术有限公司)。酶标仪(ELX-800,美国伯腾仪器有限公司);光学显微镜(BX53,日本 Olympus 公司);紫外分光光度计(NANO 2000,美国赛默飞世尔科技公司);荧光定量 PCR 仪(Exicycler 96,韩国 Bioneer 公司);凝胶成像仪(WD-9413B,北京六一生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠糖尿病模型建立及分组处理 采用随机数字表法将 96 只大鼠随机均分为正常对照组、糖尿病模型组、低剂量 AA 组和高剂量 AA 组,每组 24 只。除正常对照组外,其余各组按照 60 mg/kg 剂量给予大鼠腹腔内注射 STZ(以 pH=4.5 的 0.1 mmol/L 枸橼酸盐缓冲液稀释),正常对照组注射等量枸橼酸盐缓冲液。于注射后 4 d 测量大鼠尾静脉血糖浓度,血糖 > 16.7 mmol/L 即认定为糖尿病大鼠模型建立成功。注射 STZ 后 1 个月采用 AA 来干预大鼠,干预方法参照文献[11]的方法并加以改进,具体方法为以质量分数

0.5%羧甲基纤维素钠溶解 AA,低剂量组和高剂量组分别使用 37.5 mg/kg 或 75.0 mg/kg 的 AA 给予大鼠灌胃,每日 1 次。正常对照组及糖尿病模型组给予等量 0.5%羧甲基纤维素钠。分别记录各组给药第 0 周、1 周、2 周、3 周和 4 周体质量及血糖浓度。给药 1 个月时,取大鼠视网膜组织进行后续检测。

1.2.2 苏木精-伊红染色观察大鼠视网膜组织病理变化 给药 1 个月时,于各组中任意选取 6 只大鼠,腹腔内注射 200 mg/kg 戊巴比妥钠全身麻醉,以质量分数 1%多聚甲醛进行心内灌注固定;摘取右侧眼球,使用 4%多聚甲醛溶液固定 24 h,然后使用自来水冲洗 4 h 并进行梯度乙醇脱水,使用二甲苯透明 30 min 并透蜡 2 h 后包埋;沿矢状面垂直视神经进行石蜡切片,切片厚度为 5 μm ,使用二甲苯及梯度乙醇脱蜡至水,再行苏木素染色 5 min,盐酸乙醇分化 3 s,自来水返蓝 20 min,伊红染色 3 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,最后使用中性树脂封片,400 倍光学显微镜下观察并拍照。

1.2.3 伊文思蓝定量法检测 BRB 破坏程度 给药 1 个月时,于各组中任意选取 6 只大鼠,将新鲜配制的 30 mg/ml 伊文思蓝生理盐水过滤后在 10 s 内以 45 mg/kg 剂量经大鼠尾静脉注射,待染料循环 2 h 后,使用戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉大鼠后打开胸腔,并使用柠檬酸和 1%多聚甲醛通过左心室行心脏灌注,分离出大鼠视网膜组织,并将其置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下完全风干,加入适量质量分数 10%甲酰胺,在 70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 18 h,然后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\times g$ 条件下离心 1 h,吸取上清液 100 μl ,于 620 nm 波长下检测吸光度(A)值。同一样本重复检测 3 次,取平均值。以 A 值为横坐标,标准品浓度为纵坐标,建立伊文思蓝的标准曲线,根据标准曲线计算出各样本含量。

1.2.4 免疫荧光染色法检测视网膜组织中 Notch1、Occludin、JAG1 和 DLL4 蛋白的分布 参照 1.2.2 部分获取各组眼球 5 μm 厚石蜡切片进行二甲苯及梯度乙醇脱蜡至水,在高温低火条件下进行抗原修复 10 min,并使用血清封闭 15 min,滴加 Notch1、Occludin、JAG1 或 DLL4 一抗(1:100)4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜,滴加相应荧光标记二抗(1:200)室温条件下避光孵育 60 min,最后使用 DAPI 染核,抗荧光猝灭剂封片,400 倍荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 Western blot 法检测 Occludin、Notch1、JAG1、DLL4 蛋白的表达 各组选取 6 只大鼠,腹腔内注射 200 mg/kg 戊巴比妥钠过量麻醉处死,摘出双侧眼球,分离视网膜组织,使用组织总蛋白提取试剂盒提取视网膜组织总蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋

白含量,然后将提取的蛋白按照每孔 40 μg 上样量行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转印至 PVDF 膜;取 PVDF 膜行质量分数 5% 脱脂奶粉封闭,并于 DLL4 抗体 (1:400)、Occludin 抗体 (1:500)、JAG1 抗体 (1:500) 和 Notch1 抗体 (1:1 000) 中 4 ℃ 条件下孵育过夜, PBST 漂洗 3 次,每次 10 min,于相应二抗 (1:5 000) 中 37 ℃ 条件下孵育 45 min,使用 ECL 底物发光显影后在凝胶成像仪中扫描胶片。以 GAPDH 为内参照,分析目标条带的灰度值以计算目的蛋白的相对表达量,以正常对照组蛋白表达进行归一化处理。

1.2.6 Real-time PCR 法检测 Occludin、Notch1、JAG1、DLL4 mRNA 的表达 各组选取 6 只大鼠,参照 1.2.5 方法分离双侧眼球视网膜组织,使用总 RNA 提取试剂盒提取视网膜组织总 RNA,采用 NANO 2000 仪检测 RNA 浓度及纯度。将提取的总 RNA 使用 Super M-MLV 逆转录酶进行逆转录反应。以 cDNA 为模板,按照 cDNA 1.0 μl、正反向引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μl、SYBR GREEN Mastermix 10.0 μl、双蒸水补足至 20.0 μl 反应体系上机进行检测。Occludin 正向引物为 5'-CAGAGCCTATGGAACGG-3', 反向引物为 5'-CAAGGAAGCGATGAAGC-3'; Notch1 正向引物为 5'-TGGCTCCATCGTCTACCTG-3', 反向引物为 5'-GGCTCCACCGTCTACTCT-3'; JAG1 正向引物为 5'-GATTCCTGGTTCTCTG-3', 反向引物为 5'-TGGCTCCGTGTTCTCG-3'; DLL4 正向引物为 5'-GCGGAT AACCAACGACG-3', 反向引物为 5'-CAAGCCCACG GGAACT-3'; GAPDH 正向引物为 5'-CGGCAAGTT CAACGGCACAG-3', 反向引物为 5'-CGCCAGTAGAC TCCACGACAT-3'。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 20 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 进行 40 个循环。以 GAPDH 为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计

算各目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7 软件进行统计分析。本研究中计量资料经 S-W 检验符合正态分布,以 mean±SD 表示。各组间大鼠视网膜中伊文思蓝含量和 Occludin、Notch1、JAG1、DLL4 蛋白及 mRNA 相对表达量的总体差异比较采用单因素方差分析,各组大鼠不同时间点体质量、血糖浓度的总体比较采用重复测量两因素方差分析,多重比较采用 Tukey 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠给药后不同时间点体质量变化比较

给药后不同时间点糖尿病模型组、低剂量 AA 组和高剂量 AA 组大鼠体质量低于正常对照组,差异均有统计学意义 (均 P<0.01); 给药后第 0、1、2、3 周低剂量 AA 组与高剂量 AA 组体质量比较,差异均无统计学意义 (均 P>0.05); 给药后第 4 周,与低剂量 AA 组相比,高剂量 AA 组体质量显著升高,差异有统计学意义 (P<0.05) (表 1)。

2.2 各组大鼠给药后不同时间点血糖浓度变化比较

给药后不同时间点糖尿病模型组、低剂量 AA 组和高剂量 AA 组大鼠血糖浓度明显高于正常对照组,差异均有统计学意义 (均 P<0.01); 除第 3 周外,其余各给药时间点内低剂量 AA 组与高剂量 AA 组血糖浓度比较,差异均无统计学意义 (均 P>0.05); 给药后第 3 周,高剂量 AA 组血糖浓度明显低于糖尿病模型组和低剂量 AA 组,差异有统计学意义 (P<0.05); 给药后第 4 周,低剂量 AA 组和高剂量 AA 组血糖浓度均低于糖尿病模型组,差异均有统计学意义 (均 P<0.01) (表 2)。

表 1 各组大鼠给药后不同时间点体质量比较 (mean±SD, g)

Table 1 Comparison of the weight of rats among different groups at different time points after intragastric administration (mean±SD, g)

组别	样本量	给药后不同时间点体质量				
		0 周	1 周	2 周	3 周	4 周
正常对照组	6	416.67±12.66	433.33±13.58	445.67±17.62	461.33±18.88	472.33±16.50
糖尿病模型组	6	315.50± 3.87 ^a	317.00± 2.65 ^a	320.67± 3.79 ^a	325.33± 8.39 ^a	330.67±13.43 ^a
低剂量 AA 组	6	309.75± 4.65 ^a	327.33± 8.08 ^a	334.33± 8.62 ^a	340.00± 6.00 ^a	359.67± 2.08 ^{ab}
高剂量 AA 组	6	320.50± 6.66 ^a	329.33± 5.77 ^a	348.67± 9.45 ^a	365.00±21.66 ^{ab}	395.33±32.35 ^{abc}

注: F_{组别} = 276.5, P<0.01. 与同时时间点正常对照组比较, ^aP<0.01; 与同时时间点糖尿病模型组比较, ^bP<0.05; 与同时时间点低剂量 AA 组比较, ^cP<0.05 (重复测量两因素方差分析, Tukey 检验) AA: 积雪草酸

Note: F_{group} = 276.5, P<0.01. Compared with the normal control group at the corresponding time points, ^aP<0.01; compared with the diabetes group at the corresponding time points, ^bP<0.05; compared with the low-dose AA group at the corresponding time point, ^cP<0.05 (Two-way ANOVA of repeated measurement, Tukey test) AA: asiatic acid

表 2 各组大鼠给药后不同时间点血糖浓度比较 (mean±SD, mmol/L)

Table 2 Comparison of blood glucose value among different groups at different time points after intragastrical administration (mean±SD, mmol/L)

组别	样本量	给药后不同时间点血糖浓度				
		0 周	1 周	2 周	3 周	4 周
正常对照组	6	4.50±0.40	4.60±0.30	4.70±0.46	4.37±0.38	4.73±0.15
糖尿病模型组	6	23.70±2.16 ^a	23.93±1.40 ^a	25.07±1.15 ^a	25.43±1.40 ^a	25.33±0.68 ^a
低剂量 AA 组	6	23.98±2.54 ^{ad}	23.80±1.65 ^{ad}	23.33±1.66 ^{ad}	22.17±1.63 ^{ad}	17.43±1.96 ^{ab}
高剂量 AA 组	6	21.70±1.31 ^{ad}	24.47±1.65 ^{ade}	22.37±2.80 ^{adc}	18.03±3.16 ^{abc}	15.73±3.15 ^{ab}

注: $F_{\text{组别}} = 407.18, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 7.36, P < 0.01$. 与同时点正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与同时点糖尿病模型组比较, ^b $P < 0.01$; 与同时点低剂量 AA 组比较, ^c $P < 0.05$; 与组内第 4 周比较, ^d $P < 0.05$; 与组内第 3 周比较, ^e $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, Tukey 检验) AA: 积雪草酸

Note: $F_{\text{group}} = 407.18, P < 0.01; F_{\text{time}} = 7.36, P < 0.01$. Compared with the control group at corresponding time point, ^a $P < 0.01$; compared with the diabetes group at corresponding time point, ^b $P < 0.01$; compared with the low-dose AA group at corresponding time point, ^c $P < 0.05$; compared with week 4 within group, ^d $P < 0.05$; compared with week 3 within group, ^e $P < 0.05$ (Two-way ANOVA of repeated measurement, Tukey test) AA: asiatic acid

2.3 各组大鼠视网膜组织病理变化情况

糖尿病模型组大鼠视网膜较正常对照组明显增厚, 外核层 (outer nuclear layer, ONL) 明显增厚, 细胞排列紊乱, 结构层次不清晰。低剂量 AA 组和高剂量 AA 组视网膜表面光滑, 各层结构较为清晰完整, 细胞排列整齐, 视网膜总厚度、ONL、外丛状层 (outer plexiform layer, OPL)、内核层 (inner nuclear layer, INL)、内丛状层 (inner plexiform layer, IPL) 及神经节细胞层 (ganglion cell layer, GCL) 均较糖尿病模型组变薄 (图 1)。

2.4 各组大鼠视网膜中伊文思蓝含量比较

正常对照组、糖尿病模型组、低剂量 AA 组和高剂量 AA 组视网膜中伊文思蓝含量分别为 (3.07±1.30)、(13.73±3.88)、(9.57±2.69) 和 (6.55±1.61) ng/mg, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 18.50, P < 0.01$), 其中糖尿病模型组和低剂量 AA 组视网膜中伊文思蓝质量浓度明显高于正常对照组, 高剂量 AA 组视网膜中伊文思蓝质量浓度明显低于糖尿病模型组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (图 2)。

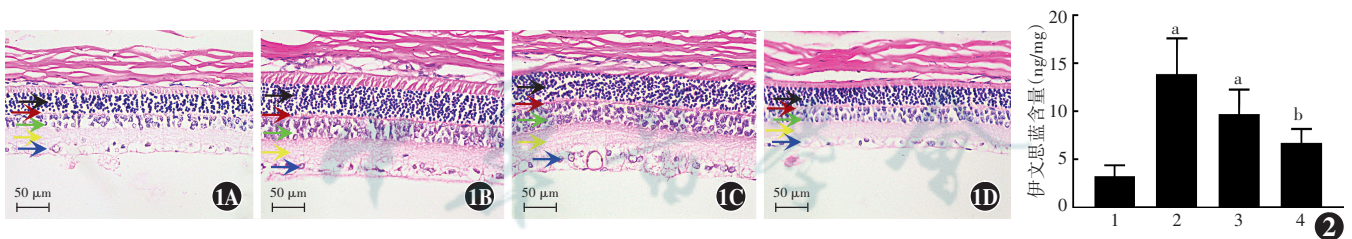


图 1 各组大鼠视网膜组织病理变化情况 (HE ×400, 标尺 = 50 μm) A: 正常对照组大鼠视网膜细胞排列整齐, 结构层次清晰 B: 糖尿病模型组大鼠视网膜增厚明显, ONL 增厚, 细胞排列紊乱, 结构层次不清晰 C: 低剂量 AA 组视网膜总厚度及各层厚度均较糖尿病模型组变薄 D: 高剂量 AA 组视网膜表面光滑, 各层结构清晰完整, 细胞排列整齐, 视网膜总厚度及各层厚度均较糖尿病模型组变薄 黑色箭头示 ONL; 红色箭头示 OPL; 绿色箭头示 INL; 黄色箭头示 IPL; 蓝色箭头示 GCL 图 2 各组大鼠视网膜中伊文思蓝含量比较 $F = 18.50, P < 0.01$. 与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与糖尿病模型组比较, ^b $P < 0.01$ (单因素方差分析, Tukey 检验, $n = 6$) 1: 正常对照组; 2: 糖尿病模型组; 3: 低剂量 AA 组; 4: 高剂量 AA 组

Figure 1 Pathological changes of rat retina tissue in each group (HE ×400, bar = 50 μm) A: The cells in the normal control group were arranged neatly and the layered structure was clear B: In the diabetes group, the retina was thickened obviously with thicker ONL as well as disorderly arranged cells and the layers of retina were unclear C: The total retinal thickness and single layer thickness in the low-dose AA group were thinner than those in the diabetes group D: Compared with the diabetes group, the retina surface was smoother in the high-dose AA group, and the structure of each layer was much more clear, and cells were in better arrangement and the thickness of full retina and single layer thickness were thinner Black arrow indicated ONL; red arrow indicated OPL; green arrow indicated INL; yellow arrow indicated IPL; blue arrow indicated GCL Figure 2 Comparison of Evan's blue content in rat retina among four groups $F = 18.50, P < 0.01$ Compared with the normal control group, ^a $P < 0.01$; compared with the diabetes group, ^b $P < 0.01$ (One-way ANOVA, Tukey test, $n = 6$) 1: normal control group; 2: diabetes group; 3: low-dose AA group; 4: high-dose AA group

2.5 各组大鼠视网膜中 Occludin、Notch1、JAG1 及 DLL4 表达分布情况比较

在正常对照组视网膜中, Occludin 主要分布于 GCL、IPL 和 OPL, Notch1 及 JAG1 均主要分布于 GCL 和 OPL, 并少量表达于 IPL, DLL4 主要分布于 OPL 和 ONL。与正常对照组相比, 糖尿病模型组视网膜

中 Occludin 分布明显减少, Notch1、JAG1 及 DLL4 的分布明显增加。与糖尿病模型组相比, 低剂量 AA 组和高剂量 AA 组视网膜中 Occludin 分布增加, Notch1、JAG1 和 DLL4 分布减少。高剂量 AA 组视网膜中各蛋白表达分布情况与正常对照组无明显差异 (图 3)。

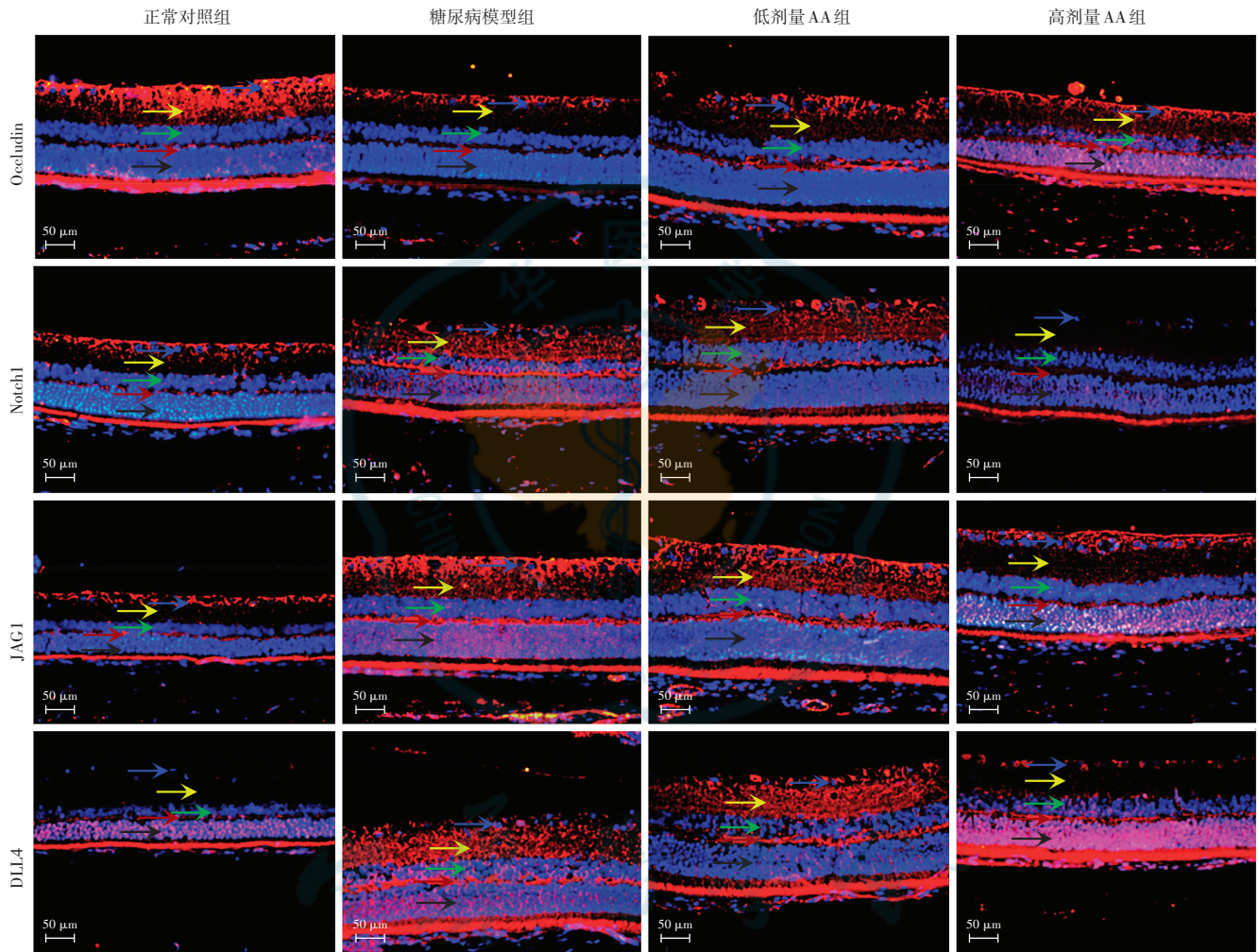


图 3 各组大鼠视网膜 Occludin、Notch1、JAG1 和 DLL4 免疫荧光染色情况 (×400, 标尺 = 50 μm) Occludin、Notch1、JAG1、DLL4 的表达均呈红色荧光 (Cy3), 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI)。正常对照组 Occludin 主要分布于 GCL、IPL 和 OPL, Notch1 和 JAG1 主要分布于 GCL 和 OPL, 少量表达于 IPL, DLL4 主要分布于 OPL 和 ONL。糖尿病模型组 Occludin 表达明显减少, 仅表达于 GCL, Notch1、JAG1 和 DLL4 表达明显增多, 均主要表达于 GCL、IPL、OPL 和 ONL。低剂量 AA 组及高剂量 AA 组 Occludin 表达较糖尿病模型组增加, 主要分布于 GCL、IPL、OPL 和 ONL; Notch1、JAG1 和 DLL4 表达较糖尿病模型组减少, 主要分布于 GCL、IPL 和 OPL 黑色箭头示 ONL; 红色箭头示 OPL; 绿色箭头示 INL; 黄色箭头示 IPL; 蓝色箭头示 GCL AA: 积雪草酸; JAG1: Jagged 典型 Notch 配体 1; DLL4: Delta 样典型 Notch 配体 4

Figure 3 Distribution of Occludin, Notch1, JAG1 and DLL4 in rat retina in each group by immunofluorescence staining (×400, bar = 50 μm) The expression of Occludin, Notch1, JAG1 and DLL4 in rat retina showed red fluorescence (Cy3), and the nucleus presented blue fluorescence (DAPI). In the normal control group, Occludin was mainly distributed in GCL, IPL and OPL; Notch1 and JAG1 were mainly in GCL and OPL, with a little expression in IPL; DLL4 was mainly distributed in OPL and ONL. In the diabetes group, decreased Occludin was only expressed in GCL; increased Notch1, JAG1 and DLL4 were mainly expressed in GCL, IPL, OPL and ONL. In the low-dose AA group and high-dose AA group, Occludin was increased in comparison with the diabetes group and was mainly distributed in GCL, IPL, OPL and ONL; Notch1, JAG1 and DLL4 were mainly distributed in GCL, IPL and OPL, which were decreased in comparison with the diabetes group Black arrow indicated ONL; red arrow indicated OPL; green arrow indicated INL; yellow arrow indicated IPL; blue arrow indicated GCL AA: asiatic acid; JAG1: Jagged canonical Notch ligand 1; DLL4: Delta like canonical Notch ligand 4

2.6 各组大鼠视网膜中 Occludin、Notch1、JAG1 和 DLL4 蛋白表达情况比较

正常对照组、糖尿病模型组、低剂量 AA 组和高剂量 AA 组 Occludin 蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.12 、 0.30 ± 0.05 、 0.54 ± 0.07 和 0.74 ± 0.07 ，Notch1 蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.05 、 7.75 ± 0.74 、 5.80 ± 0.62 和 2.75 ± 0.51 ，JAG1 蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.08 、 4.64 ± 0.51 、 2.20 ± 0.22 和 1.28 ± 0.18 ，DLL4 蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.15 、 5.77 ± 0.93 、 3.96 ± 0.62 和 1.13 ± 0.13 ，总体比较差异均有统计学意义 ($F = 39.13$ 、 92.57 、 94.24 、 49.47 ，均 $P < 0.01$)。糖尿病模型组 Occludin 蛋白相对表达量明显低于其余 3 个组，Notch1、JAG1 和 DLL4 蛋白相对表达量明显高于其余 3 个组，差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)；高剂量 AA 组 Occludin 蛋白相对表达量明显高于低剂量 AA 组，Notch1、JAG1 和 DLL4 蛋白相对表达量明显低于低剂量 AA 组，差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4)。

2.7 各组大鼠视网膜中 Occludin、Notch1、JAG1 和 DLL4 mRNA 相对表达量比较

各组大鼠视网膜中 Occludin、Notch1、JAG1、DLL4 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 37.36$ 、 18.31 、 18.76 、 17.21 ，均 $P < 0.01$)。与正常对照组比较，糖尿病模型组及低剂量 AA 组 Occludin mRNA 相对表达量明显下调，Notch1、JAG1 和 DLL4 mRNA 相对表达量明显上调，差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)；高剂量 AA 组 Occludin mRNA 相对表达量明显高于糖尿病模型组和低剂量 AA 组，Notch1 mRNA 相对表达量明显低于糖尿病模型组和低剂量 AA 组，JAG1 和 DLL4 mRNA 相对表达量明显低于糖尿病模型组，差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 3)。

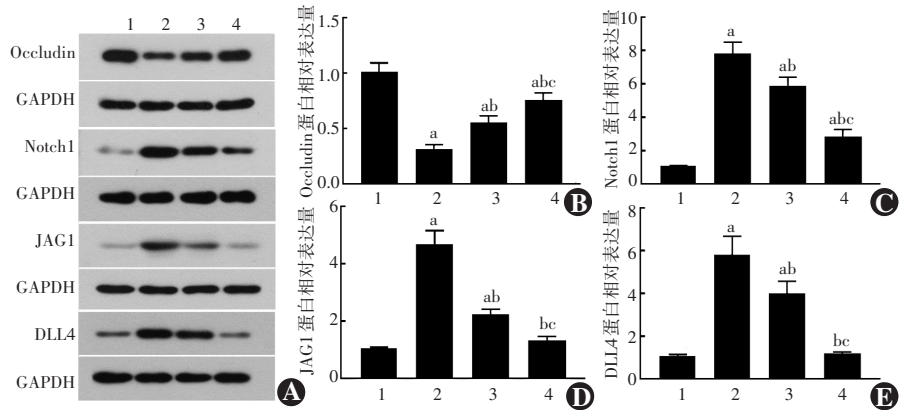


图 4 各组大鼠视网膜中 Occludin、Notch1、JAG1、DLL4 蛋白相对表达量比较 A: 各组蛋白电泳图 B: 各组视网膜中 Occludin 蛋白相对表达量比较 $F = 39.13$, $P < 0.01$ C: 各组视网膜中 Notch1 蛋白相对表达量比较 $F = 92.57$, $P < 0.01$ D: 各组视网膜中 JAG1 蛋白相对表达量比较 $F = 94.24$, $P < 0.01$ E: 各组视网膜中 DLL4 蛋白相对表达量比较 $F = 49.47$, $P < 0.01$ 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与糖尿病模型组比较, ^b $P < 0.01$; 与低剂量 AA 组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验, $n = 6$) 1: 正常对照组; 2: 糖尿病模型组; 3: 低剂量 AA 组; 4: 高剂量 AA 组 GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶; JAG1: Jagged 典型 Notch 配体 1; DLL4: Delta 样典型 Notch 配体 4

Figure 4 Comparison of Occludin, Notch1, JAG1 and DLL4 protein expression in rat retina among four groups A: Electrophoretogram of different proteins in each group B: The relative expression of Occludin protein in retina of each group $F = 39.13$, $P < 0.01$ C: The relative expression of Notch1 protein in retina of each group $F = 92.57$, $P < 0.01$ D: The relative expression of JAG1 protein in retina of each group $F = 94.24$, $P < 0.01$ E: The relative expression of DLL4 protein in retina of each group $F = 49.47$, $P < 0.01$ Compared with the normal control group, ^a $P < 0.05$; Compared with the diabetes group, ^b $P < 0.01$; Compared with the low-dose AA group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test, $n = 6$) 1: normal control group; 2: diabetes group; 3: low-dose AA group; 4: high-dose AA group GAPDH: glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; JAG1: Jagged canonical Notch ligand 1; DLL4: Delta like canonical Notch ligand 4

表 3 各组大鼠视网膜中 Occludin、Notch1、JAG1 和 DLL4 mRNA 相对表达量比较 (mean±SD)

组别	样本量	Occludin	Notch1	JAG1	DLL4
正常对照组	6	1.00±0.12	1.00±0.05	1.00±0.08	1.00±0.15
糖尿病模型组	6	0.29±0.06 ^a	3.53±0.71 ^a	3.01±0.55 ^a	2.79±0.54 ^a
低剂量 AA 组	6	0.56±0.09 ^{ab}	2.81±0.54 ^a	2.21±0.41 ^a	2.02±0.36 ^a
高剂量 AA 组	6	0.84±0.14 ^{bc}	1.52±0.29 ^{bc}	1.39±0.22 ^b	1.22±0.21 ^b
F 值		37.36	18.31	18.76	17.21
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与糖尿病模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与低剂量 AA 组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验) JAG1: Jagged 典型 Notch 配体 1; DLL4: Delta 样典型 Notch 配体 4; AA: 积雪草酸

Note: Compared with the normal control group, ^a $P < 0.01$; compared with the diabetes group, ^b $P < 0.05$; compared with low-dose AA group, ^c $P < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test) JAG1: Jagged canonical Notch ligand 1; DLL4: Delta like canonical Notch ligand 4; AA: asiatic acid

3 讨论

DR 是糖尿病常见且严重的微血管并发症之一, 研究发现, 对 DR 进行早期及时合理治疗可有效控制其发展, 延缓其致盲程度^[15]。DR 的经典病理学特征

包括微动脉瘤的形成、火焰状和斑点状出血、硬性渗出、静脉扩张和视网膜内微血管异常^[16]。这些病变均与 BRB 完整性的丧失有关,而且 BRB 的破坏可进一步导致视网膜发生缺血性变化,从而加重疾病进展^[17]。因此探索 DR 中保护 BRB 屏障的药物对于控制 DR 早期病变具有重要意义。

AA 具有很强的抗氧化作用,兼具抗炎、改善血管的特性,常用于疾病的抗氧化及抗炎治疗^[18]。研究发现,AA 对于改善糖尿病的各种并发症有一定的作用^[8-9,19]。近些年,AA 的神经保护作用逐渐受到国内外学者的广泛关注,其发挥神经保护作用的途径包括改善视网膜屏障功能障碍及血-脑屏障通透性等^[10-11]。Liu 等^[20]研究发现,AA 可能通过保护 STZ 诱导的糖尿病模型大鼠胰岛 β 细胞改善其高血糖状态。本研究采用 AA 干预糖尿病模型大鼠,结果发现 37.5 mg/kg 及 75.0 mg/kg 剂量的 AA 均能够在一定程度上增加糖尿病大鼠的体质量并降低血糖值,AA 治疗后 4 周均能够使糖尿病大鼠的血糖值显著降低。本研究中还发现 AA 能够抑制糖尿病大鼠的视网膜增生,稳定视网膜结构,改善视网膜病变程度。因此推测 AA 可能对糖尿病大鼠的视网膜病变有一定的改善作用。

在发生 DR 时,BRB 受到破坏并使视网膜的渗透性增强,导致外周血液中伊文思蓝染料在视网膜中大量积累。本实验结果显示,在糖尿病模型大鼠视网膜中伊文思蓝浓度明显增加,而各 AA 干预组视网膜中伊文思蓝浓度有所降低,表明 AA 可能具有保护 DR 中 BRB 的作用。

Notch 通路是调节发育性血管生成的关键通路,并且能够调控成人血管稳态^[21]。其中,Notch1 信号通路的畸变已被证明可引起血管紊乱,影响 BRB 的完整性^[22]。据报道,Notch1 信号除了激活典型的转录途径外,还可以通过非典型机制引起内皮连接的破坏,且抑制 Notch1 的配体 JAG1 和 DLL4 的表达能够降低糖尿病视网膜中病理性血管的通透性,维持 BRB 的正常屏障功能^[14]。目前对 Notch 的研究主要在血管发育的背景下进行,其在病理学中的研究相对较少,在驱动疾病发病机制中的潜在作用仍不明确^[12,23]。本研究结果显示,糖尿病模型大鼠视网膜 Notch1、JAG1 和 DLL4 表达增多,主要分布于 GCL、IPL 和 OPL,推测高血糖刺激了 JAG1 和 DLL4 的产生,从而可能通过 Notch1 影响 BRB 的完整性;采用 AA 干预糖尿病大鼠发现,AA 能够抑制 Notch1 及其配体 JAG1 和 DLL4 的表达,推测 AA 可能通过抑制 Notch1 信号通路发挥改善糖

尿病大鼠 BRB 通透性的作用。

内皮细胞之间的紧密连接是维持 BRB 功能的重要结构基础,Occludin 是紧密连接蛋白中的主要成分之一,能够改变细胞的通透性,在维持 BRB 正常功能中发挥至关重要的作用^[24-26]。有研究显示,Notch1 可通过调控 Occludin 介导癌症进展,过表达 Notch1 后可显著抑制 Occludin 的表达^[27]。本研究结果显示,在糖尿病模型大鼠视网膜组织中 Occludin 蛋白及 mRNA 表达量较正常对照组明显减少,仅有少量量的 Occludin 蛋白分布于 GCL;而经 AA 干预后,Occludin 蛋白及 mRNA 表达量有所增加,且与 Notch1 的表达趋势相反,推测 AA 可能通过 Notch1 影响 Occludin 的表达及分布,从而维持 BRB 的完整性,但 AA 与 Notch1/Occludin 通路确切的靶向关系尚待进一步研究证明。

综上所述,AA 可能通过抑制 JAG1、DLL4 和 Notch1 表达及增强 Occludin 的表达改善糖尿病大鼠视网膜的血管通透性,保护 BRB 的完整性。本研究结果为糖尿病诱导 BRB 屏障破坏相关疾病的治疗提供了实验基础和新的方向,后续可在动物模型内进一步证实其安全性和有效性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 何森,皮荣标,黄文勇. 糖尿病视网膜病变的动物模型及药理研究进展[J]. 中华实验眼科杂志,2015,33(1): 87-92. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.01.019.
He M, Pi RB, Huang WY. Advance in animal model and pharmacological research for diabetic retinopathy [J]. Chin J Exp Ophthalmol,2015,33(1): 87-92. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.01.019.
- [2] Ting DS, Cheung GC, Wong TY. Diabetic retinopathy: global prevalence, major risk factors, screening practices and public health challenges: a review [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2016, 44(4): 260-277. DOI:10.1111/ceo.12696.
- [3] Vujosevic S, Aldington SJ, Silva P, et al. Screening for diabetic retinopathy: new perspectives and challenges [J]. Lancet Diabetes Endocrinol,2020,8(4): 337-347. DOI:10.1016/S2213-8587(19)30411-5.
- [4] Cheung N, Mitchell P, Wong, TY. Diabetic retinopathy [J]. The Lancet,2010,376(9735): 124-136. DOI:10.1016/s0140-6736(09)62124-3.
- [5] Yarmohammadi F, Rezaee R, Karimi G. Natural compounds against doxorubicin-induced cardiotoxicity: a review on the involvement of Nrf2/ARE signaling pathway [J]. Phytother Res, 2021, 35(3): 1163-1175. DOI:10.1002/ptr.6882.
- [6] Yan SL, Wang ZH, Mong MC, et al. Combination of carnosine and asiatic acid provided greater anti-inflammatory protection for HUVE cells and diabetic mice than individual treatments of carnosine or asiatic acid alone [J]. Food Chem Toxicol, 2019, 126: 192-198. DOI:10.1016/j.fct.2019.02.027.
- [7] Masola B, Oguntibeju OO, Oyenih AB. Centella asiatica ameliorates diabetes-induced stress in rat tissues via influences on antioxidants and inflammatory cytokines [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101: 447-457. DOI:10.1016/j.biopha.2018.02.115.

- [8] Kalidhindi S, Uddandrao V, Sasikumar V, et al. Mitigating perspectives of asiatic acid in the renal derangements of streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats [J]. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2020, 18(1): 37-44. DOI: 10. 21 74/1871525718666200131121419.
- [9] Hung YC, Yang HT, Yin MC. Asiatic acid and maslinic acid protected heart via anti-glycative and anti-coagulatory activities in diabetic mice [J]. Food Funct, 2015, 6(9): 2967-2974. DOI: 10. 1039/c5fo00549c.
- [10] Huang W, Gao F, Hu F, et al. Asiatic acid prevents retinal ganglion cell apoptosis in a rat model of glaucoma [J/OL]. Front Neurosci, 2018, 12: 489 [2020-10-15]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30079010>. DOI: 10. 3389/fnins. 2018. 00489.
- [11] Krishnamurthy RG, Senut MC, Zemke D, et al. Asiatic acid, a pentacyclic triterpene from *Centella asiatica*, is neuroprotective in a mouse model of focal cerebral ischemia [J]. J Neurosci Res, 2009, 87(11): 2541-2550. DOI: 10. 1002/jnr. 22071.
- [12] Mei X, Zhang T, Ouyang H, et al. Scutellarin alleviates blood-retinal barrier oxidative stress injury initiated by activated microglia cells during the development of diabetic retinopathy [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 159: 82-95. DOI: 10. 1016/j. bcp. 2018. 11. 011.
- [13] Xu H, Chen M. Diabetic retinopathy and dysregulated innate immunity [J]. Vision Res, 2017, 139: 39-46. DOI: 10. 1016/j. visres. 2017. 04. 013.
- [14] Miloudi K, Oubaha M, Ménard C, et al. NOTCH1 signaling induces pathological vascular permeability in diabetic retinopathy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(10): 4538-4547. DOI: 10. 1073/pnas. 1814711116.
- [15] Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies [J/OL]. JCI Insight, 2017, 2(14): e93751 [2020-10-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28724805>. DOI: 10. 1172/jci. insight. 93751.
- [16] Aiello LP, DCCT/EDIC Research Group. Diabetic retinopathy and other ocular findings in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study [J]. Diabetes Care, 2014, 37(1): 17-23. DOI: 10. 2337/dc13-2251.
- [17] Kollias AN, Ulbig MW. Diabetic retinopathy: early diagnosis and effective treatment [J]. Dtsch Arztebl Int, 2010, 107(5): 75-83; quiz 84. DOI: 10. 3238/arzte bl. 2010. 0075.
- [18] Hashim P, Sidek H, Helan MH, et al. Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica* [J]. Molecules, 2011, 16(2): 1310-1322. DOI: 10. 3390/molecules 16021310.
- [19] Chen YN, Wu CG, Shi BM, et al. The protective effect of asiatic acid on podocytes in the kidney of diabetic rats [J]. Am J Transl Res, 2018, 10(11): 3733-3741.
- [20] Liu J, He T, Lu Q, et al. Asiatic acid preserves beta cell mass and mitigates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2010, 26(6): 448-454. DOI: 10. 1002/dmrr. 1101.
- [21] Dimova I, Karthik S, Makanya A, et al. SDF-1/CXCR4 signalling is involved in blood vessel growth and remodelling by intussusception [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(6): 3916-3926. DOI: 10. 1111/jcmm. 14269.
- [22] Man J, Yu X, Huang H, et al. Hypoxic induction of Vasorin regulates Notch1 turnover to maintain glioma stem-like cells [J]. Cell Stem Cell, 2018, 22(1): 104-118. e6. DOI: 10. 1016/j. stem. 2017. 10. 005.
- [23] Ferrandino F, Grazioli P, Bellavia D, et al. Notch and NF- κ B: coach and players of regulatory T-cell response in cancer [J/OL]. Front Immunol, 2018, 9: 2165 [2020-10-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30364244>. DOI: 10. 3389/fimmu. 2018. 02165
- [24] Zhang C, Xie H, Yang Q, et al. Erythropoietin protects outer blood-retinal barrier in experimental diabetic retinopathy by up-regulating ZO-1 and occludin [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2019, 47(9): 1182-1197. DOI: 10. 1111/ceo. 13619.
- [25] Zhang T, Ouyang H, Mei X, et al. Erianin alleviates diabetic retinopathy by reducing retinal inflammation initiated by microglial cells via inhibiting hyperglycemia-mediated ERK1/2-NF- κ B signaling pathway [J/OL]. FASEB J, 2019, 33(11): 11776-11790 [2020-10-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31365278>. DOI: 10. 1096/fj. 201802614RRR.
- [26] Wang J, Yao Y, Liu X, et al. Protective effects of lycium barbarum polysaccharides on blood-retinal barrier via ROCK1 pathway in diabetic rats [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(10): 6304-6315.
- [27] Zhang X, Zhao X, Shao S, et al. Notch1 induces epithelial-mesenchymal transition and the cancer stem cell phenotype in breast cancer cells and STAT3 plays a key role [J]. Int J Oncol, 2015, 46(3): 1141-1148. DOI: 10. 3892/ijo. 2014. 2809.

(收稿日期:2020-10-24 修回日期:2021-06-04)

(本文编辑:张宇 骆世平)

读者·作者·编者

本刊稿件处理流程

本刊实行以同行审稿为基础的三级审理制度(编辑初审、专家外审、编委会终审)稿件评审。编辑部在稿件审理过程中坚持客观、公平、公正的原则,郑重承诺审稿过程中尊重和保护审稿专家、作者及稿件的私密权。专家审理认为不宜刊用的稿件,编辑部将告知作者专家的审理意见,对稿件处理有不同看法的作者有权向编辑部申请复议,但请写出申请理由和意见。

稿件审理过程中作者可通过“中华医学会杂志社远程稿件管理系统”查询稿件的审理结果。作者如需要采用通知或退稿通知可与编辑部联系。编辑部发给作者修改再评的稿件,如2个月没有修回,视为作者自行撤稿。编辑部的各种通知将通过Email发出,投稿后和稿件审理期间请作者留意自己的电子信箱。作者自收到采用通知之日起,即视为双方建立合约关系,作者如撤稿必须向编辑部申诉理由并征得编辑部同意。一旦稿件进入编排阶段,作者不应提出自撤稿件,在此期间因一稿两投或强行撤稿而给本刊造成不良影响和/或经济损失者,编辑部有权给以公开曝光、通报并实施经济赔偿,作者自行承担一切责任和后果。

根据《中华人民共和国著作权法》的相关条文,本刊编辑可对待发表的来稿按照编辑规范和专业知 识进行文字加工、修改和删减,修改后的稿件作者须认真校对核实,修改涉及文章的核心内容时双方应进行沟通并征得作者同意。除了编辑方面的技术加工以外,作者对已经发表论文的全部内容文责自负。稿件编辑流程中编辑退回作者修改的稿件逾期2个月不修回者,视作自行撤稿。

(本刊编辑部)