

· 实验研究 ·

迷迭香酸对高糖诱导人视网膜微血管内皮细胞血管形成及 NLRP3 炎症小体通路活化的抑制作用

范姜砾¹ 关艳玲¹ 李蓉² 姚杨²¹许昌华夏眼科医院 461000; ²西安医学院第一附属医院眼科 710077

通信作者:李蓉, Email: rechelong198222@163.com

【摘要】 目的 研究迷迭香酸(RA)对高糖诱导人视网膜微血管内皮细胞(HRMEC)血管形成及核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体通路相关蛋白表达的抑制作用。方法 根据不同处理方法将体外培养的HRMEC分为对照组、高糖组、高糖+低浓度RA组、高糖+中浓度RA组、高糖+高浓度RA组,分别采用常规培养基、含30 mmol/L D-葡萄糖培养基、含30 mmol/L D-葡萄糖+25 μmol/L RA培养基、含30 mmol/L D-葡萄糖+50 μmol/L RA培养基和含30 mmol/L D-葡萄糖+100 μmol/L RA培养基进行培养。采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞增生情况;采用Transwell法检测细胞迁移能力;采用Matrigel法检测细胞管腔形成能力;采用Western blot法检测HRMEC中NLRP3炎症小体信号通路关键分子NLRP3、凋亡相关颗粒样蛋白(ASC)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-1(Caspase-1)蛋白表达;采用酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒检测细胞培养上清液中白细胞介素(IL)-1β、IL-18的表达。结果 对照组、高糖组、高糖+低浓度RA组、高糖+中浓度RA组和高糖+高浓度RA组细胞增生率分别为(100.00±0.92)%、(163.56±1.46)%、(152.29±2.90)%、(147.72±2.22)%和(132.47±0.74)%,迁移细胞数分别为(37.67±9.02)、(117.33±7.23)、(78.67±4.04)、(65.33±4.16)和(52.67±6.81)个,细胞管腔形成数分别为(45.00±4.58)、(95.00±9.54)、(84.67±1.53)、(71.00±3.61)和(60.00±1.00)个,各组间细胞增生率、迁移细胞数及管腔形成数总体比较,差异均有统计学意义($F=537.07, 64.63, 45.58$, 均 $P<0.001$);与对照组相比,高糖组、高糖+低浓度RA组、高糖+中浓度RA组及高糖+高浓度RA组的细胞增生率明显升高,迁移细胞数及管腔形成数均明显增多,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与高糖组相比,各浓度RA组的细胞增生率明显降低,迁移细胞数和管腔形成数均明显减少,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);随着RA浓度的升高,细胞增生率明显降低,迁移细胞数和管腔形成数均明显减少,各浓度RA组间细胞增生率、迁移细胞数和管腔形成数比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。各组间细胞中NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白相对表达量以及细胞培养上清液中IL-1β和IL-18质量浓度总体比较,差异均有统计学意义($F=145.12, 422.82, 463.79, 2019.96, 33406.97$, 均 $P<0.001$);与对照组相比,高糖组、高糖+低浓度RA组、高糖+中浓度RA组及高糖+高浓度RA组细胞中NLRP3、ASC、Caspase-1蛋白相对表达量以及细胞培养上清液中IL-1β和IL-18质量浓度均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);与高糖组相比,各浓度RA组上述蛋白和细胞因子表达水平均降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);随着RA浓度的升高,各蛋白和细胞因子表达水平均降低,各浓度RA组间各蛋白和细胞因子表达水平比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 RA可抑制高糖诱导的HRMEC增生、迁移、血管形成和NLRP3炎症小体信号通路活化。

【关键词】 NLRP3炎症小体;迷迭香酸;高糖;人视网膜微血管内皮细胞;血管形成

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81500726);陕西省卫生健康科研基金项目(2018D074);西安市科技局医学研究项目[201805097YX5SF31(4)];西安医学院第一附属医院配套基金项目(XYFYPT-2020-01)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20191203-00520

Inhibitory effect of rosmarinic acid on high glucose-induced angiogenesis of human retinal microvascular endothelial cells and the activation of NLRP3 inflammasome pathway

Fan Jiangli¹, Guan Yanling¹, Li Rong², Yao Yang²

¹Xu Chang Hua Xia Eye Hospital, Xuchang 461000, China; ²Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, China

Corresponding author: Li Rong, Email: rehelrong198222@163.com

[Abstract] Objective To investigate the inhibitory effects of rosmarinic acid (RA) on high glucose-induced angiogenesis of human retinal microvascular endothelial cells (HRMEC) and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome pathway-related proteins. **Methods** The HRMEC were divided into control group, high glucose group, high glucose+low concentration RA group, high glucose+medium concentration RA group, and high glucose+high concentration RA group, and were cultured *in vitro* with conventional medium, 30 mmol/L D-glucose medium, 30 mmol/L D-glucose+25 μ mol/L RA medium, 30 mmol/L D-glucose+50 μ mol/L RA medium and 30 mmol/L D-glucose+100 μ mol/L RA medium accordingly. The 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay was used to detect the cell proliferation. Transwell assay was performed to detect the cell migration. Matrigel assay was employed to determine the tube formation ability of cells. Western blot was utilized to detect the expression levels of NLRP3, apoptosis-associated speck like protein (ASC) and cysteinyl aspartate-specific protease-1 (Caspase-1). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit was used to detect the concentrations of interleukin (IL)-1 β and IL-18 in supernatant of cell culture. **Results** The cell proliferation rate, the number of migrated cells and the number of formed tubes were (100.00 \pm 0.92)%, 37.67 \pm 9.02 and 45.00 \pm 4.58 in the control group, (163.56 \pm 1.46)%, 117.33 \pm 7.23 and 95.00 \pm 9.54 in the high glucose group, (152.29 \pm 2.90)%, 78.67 \pm 4.04 and 84.67 \pm 1.53 in the high glucose+low concentration RA group, (147.72 \pm 2.22)%, 65.33 \pm 4.16 and 71.00 \pm 3.61 in the high glucose+medium concentration RA group, (132.47 \pm 0.74)%, 52.67 \pm 6.81 and 60.00 \pm 1.00 in the high glucose+high concentration RA group, respectively. There were statistically significant differences in cell proliferation rate, the number of migrated cells and formed tubes among all groups ($F=537.07, 64.63, 45.58$; all at $P<0.001$). Compared with the control group, the cell proliferation rate, the number of migrated cells and formed tubes were significantly increased in the high glucose group, high glucose+low concentration RA group, high glucose+medium concentration RA group and high glucose+high concentration RA group, showing statistical significances (all at $P<0.05$). Compared with the high glucose group, the cell proliferation rate, the number of migrated cells and formed tubes were significantly decreased in the different concentrations RA groups (all at $P<0.05$). With the increase of RA concentration, the cell proliferation rate, the number of migrated cells and formed tubes were decreased, and there were statistical differences among high glucose+low/medium/high concentrations RA groups (all at $P<0.05$). There were significant differences in the relative expression levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 proteins in cells and the concentrations of IL-1 β and IL-18 in cell culture supernatant among all the five groups ($F=145.12, 422.82, 463.79, 2019.96, 33406.97$; all at $P<0.001$). Compared with the control group, the relative expression levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 proteins as well as the concentrations of IL-1 β and IL-18 in cell culture supernatant were significantly increased in the high glucose group, high glucose+low concentration RA group, high glucose+medium concentration RA group and high glucose+high concentration RA group (all at $P<0.05$). Compared with the high glucose group, the expression levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 proteins as well as the concentrations of IL-1 β and IL-18 were decreased in the different concentrations RA groups, and the differences were statistically significant (all at $P<0.05$). With the increase of RA concentration, the expression levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 proteins as well as the concentrations of IL-1 β and IL-18 were decreased, and there were statistically significant differences among high glucose+low/medium/high concentrations RA groups (all at $P<0.05$).

Conclusions RA can inhibit proliferation, migration and tube formation of HRMEC induced by high glucose, and inhibit high glucose-induced activation of NLRP3 inflammasome signaling pathway.

[Key words] NLRP3 inflammasome; Rosmarinic acid; High glucose; Human retinal microvascular endothelial cells; Angiogenesis

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81500726); The Health Research Foundation of Shaanxi Province (2018D074); The Medical Research Project of Xi'an Science Technology Bureau (201805097 YX5SF31 [4]); Matching Funds of The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University (XYFYPT-2020-01)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20191203-00520

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病患者常见的眼部并发症,也是工作年龄人群主要的致盲眼病^[1]。DR 的发生机制与多种因素有关,表现为视网膜细胞生物化学和代谢异常。大量研究表明,氧化应激、炎症、新生血管形成是引发糖尿病视网膜病变的关键机制^[2]。炎症被认为是 DR 发生和发展的调节器,其中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors 3, NLRP3)炎症小体是一种近年来备受关注的细胞质内模式识别受体^[3]。NLRP3 炎症小体由 NLRP3、含胱天蛋白酶招募结构域的凋亡相关颗粒样蛋白(apoptosis-associated speck like protein, ASC)和半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-1(cysteiny aspartate-specific protease-1, Caspase-1)组成;高糖等危险因素可激活 NLRP3 炎症小体及其下游因子白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-18,从而引起炎症反应^[4]。有研究发现,NLRP3 炎症小体信号通路在病理性新生血管生成中起重要作用,其可能成为治疗 DR,尤其是增生性 DR(proliferative DR, PDR)的新靶点^[5]。迷迭香酸(rosmarinic acid, RA)是一种天然的水溶性酚酸类化合物,具有抗炎、抗氧化等生物学活性,其在多种炎症性疾病中展现出治疗潜能^[6]。然而 RA 对 DR 的作用及其机制尚未明确。因此,本研究拟观察不同质量浓度 RA 对高糖条件下视网膜血管内皮细胞增生、迁移及管腔形成的作用以及 NLRP3 炎症小体信号通路的表达变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人视网膜微血管内皮细胞(human retinal microvascular endothelial cells, HRMEC)系(上海中乔新舟生物科技有限公司)。

1.1.2 主要试剂及仪器 M199 培养基、胎牛血清、质量分数 0.25%胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);青霉素、链霉素(美国 Hyclone 公司);RA(上海恒斐生物科技有限公司);四甲基偶氮噻唑蓝(tetramethylazothiazole blue, MTT)(美国 Sigma 公司);Transwell 小室、Matrigel 胶(美国 BD 公司);兔抗 NLRP3 多克隆抗体(NBP2-12446,美国 Novus 公司);兔抗 ASC 单克隆抗体(ab155970)、兔抗 pro Caspase-1+p10+p12 单克隆抗体(ab179515)(英国 Abcam 公司);兔抗 GAPDH 多克隆抗体(AB-P-R 001)(杭州贤至生物科技有限公司);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔二抗(BA1054)(武汉博士德生物工程有限公司);人

IL-1 β 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒和人 IL-18 ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司)。CO₂ 恒温培养箱(日本 SANYO 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);自动酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将液氮中冻存的细胞取出并快速放入 37 °C 水浴锅中解冻,然后转移到含有 5 ml M199 培养基的离心管中,离心半径 13 cm,室温中 1 200 r/min 离心 3 min,弃上清;用含体积分数 10%胎牛血清和体积分数 1%双抗(青霉素、链霉素)的 M199 培养基悬浮细胞,轻轻吹打混匀,接种到培养皿中,于 37 °C、饱和湿度条件的体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。采用质量分数 0.25%胰蛋白酶消化细胞,终止消化后收集细胞;用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤细胞 2 次后 1 200 r/min 离心 3 min;加入完全培养基制成单细胞悬液,按 1:3 的比例传代,在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下扩大培养。待细胞达到 80%融合时,根据不同处理将细胞分为 5 个组:对照组细胞常规培养,高糖组细胞在含 30 mmol/L D-葡萄糖的培养基中培养,高糖+低浓度 RA 组细胞在含 30 mmol/L D-葡萄糖及 25 μ mol/L RA 的培养基中培养,高糖+中浓度 RA 组细胞在含 30 mmol/L D-葡萄糖及 50 μ mol/L RA 的培养基中培养,高糖+高浓度 RA 组细胞在含 30 mmol/L D-葡萄糖及 100 μ mol/L RA 的培养基中培养。

1.2.2 MTT 法检测细胞活性 取生长状态良好的细胞,制备单细胞悬液并计数细胞,将细胞密度调整至 5×10^4 个/ml,然后接种到 96 孔板中,每组设置 3 个复孔,每孔加入 100 μ l 细胞悬液,同时设置空白孔,在细胞孔的周围孔内加入 100 μ l 无菌 PBS,于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度细胞培养箱中孵育过夜;按照不同分组分别处理细胞并培养 48 h,向每孔加入 10 μ l MTT,于 37 °C 环境下继续培养 4 h,吸出培养液后加入 150 μ l 二甲基亚砷振荡 10 min;采用自动酶标仪测定各孔在 568 nm 处的吸光度(A)值。实验重复 3 次,细胞增生率(%) = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{空白对照组}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

1.2.3 Transwell 法检测细胞迁移 取生长状态良好的细胞,制备单细胞悬液,按照每孔 5×10^5 个细胞接种至 6 孔板,在 37 °C、饱和湿度条件的 5% CO₂ 细胞培养箱中培养过夜;根据分组处理细胞并培养 48 h,0.25%胰蛋白酶消化,收集细胞后 1 200 r/min 离心 3 min,去上清,PBS 清洗 2 次,用无血清培养基重悬细

胞,调整细胞密度至 2×10^5 个/ml 备用。在 24 孔板中加入 800 μl 含 10% 胎牛血清+1% 双抗的 M199 培养基,并放入 transwell 小室,在上室分别接种 200 μl 各组细胞悬液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h;用 PBS 小心清洗 transwell 小室 1 次,体积分数 70% 冰乙醇溶液固定细胞 1 h,质量分数 0.5% 结晶紫染液对细胞进行染色,于室温中放置 20 min;PBS 清洗后用干净棉球擦净上室一侧未迁移的细胞,在倒置显微镜下观察并拍照;计数每个小室中任意 3 个 200 倍视野的迁移细胞,取平均值为每个样本的迁移细胞数,每组设置 3 个样本。

1.2.4 Matrigel 法检测细胞管腔形成 4 $^{\circ}\text{C}$ 融化 matrigel 胶过夜,并预冷 24 孔板和移液器枪头。取 24 孔板,每孔加入 200 μl 融化的 matrigel 胶,无菌条件下低速离心除去气泡,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min。根据分组处理细胞 48 h,0.25% 胰蛋白酶消化细胞,用无血清培养基制成单细胞悬液,计数后按照每孔 2×10^5 个细胞接种至铺胶的 24 孔板中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养 24 h,于显微镜下观察并拍照,每孔任意选取 3 个 100 倍视野,采用 ImageJ 图像分析软件计算管腔形成数目,取平均值。

1.2.5 Western blot 法检测 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 的表达 分组处理细胞 48 h 后,使用细胞刮收集细胞,提取细胞总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度;每个样本取 40 μg 蛋白在质量分数 10% SDS-PAGE 上电泳,然后转印到 PVDF 膜上;用含质量分数 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液浸泡 PVDF 膜并于室温下振荡封闭 2 h;分别采用 NLRP3 抗体(1:1 000)、ASC 抗体(1:10 000)、Caspase-1 抗体(1:1 000)、GADPH 抗体(1:1 000)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜;TBST 充分洗膜后,用 HRP 标记的相应二抗(1:50 000)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡孵育 2 h;TBST 充分洗膜,ECL 显色曝光,扫描胶片;用 BandScan 软件分析胶片灰度值,以 GAPDH 为内参照,计算各目的蛋白相对表达量,每组进行 3 次生物学重复。

1.2.6 ELISA 法检测培养上清液中 IL-1 β 、IL-18 质量浓度 取 6 孔板中培养 48 h 的各组细胞上清液作为待测样品;取 ELISA 试剂盒的 96 孔酶标板,分别设置空白孔、标准孔及待测样品孔;空白孔加入样品稀释液 1 000 μl ,标准孔和待测样品孔分别加入标准品和待测样品 100 μl ,酶标板覆膜,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 90 min;弃去孔内液体,甩干后向每孔加入 100 μl 生物素化抗体工作液,覆膜后于 36 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 60 min;洗板后向每孔加入 350 μl 洗涤液,浸泡 30 s,吸干液

体,向每孔加入 100 μl 酶结合物工作液,覆膜后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min;弃去孔内液体,甩干后洗板 5 次,向每孔加入 90 μl 显色剂,覆膜后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光孵育 20 min;向每孔加入 50 μl 终止液,立即用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的 A 值。以 IL-1 β 、IL-18 标准品浓度为纵坐标,A 值为横坐标制作标准曲线,并做直线相关回归分析,根据线性方程计算待测样本中 IL-1 β 和 IL-18 质量浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。本研究中计量资料经 W 检验呈正态分布,以 mean \pm SD 表示。采用均衡分组单因素干预三水平研究设计,对照组、高糖组、高糖+低浓度 RA 组、高糖+中浓度 RA 组和高糖+高浓度 RA 组 HRMEC 中细胞增生率、迁移细胞数、细胞管腔形成数、NLRP3 蛋白相对表达量、ASC 蛋白相对表达量、Caspase-1 蛋白相对表达量及 IL-1 β 、IL-18 质量浓度的总体差异比较均采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HRMEC 增生率比较

MTT 实验结果显示,对照组、高糖组、高糖+低浓度 RA 组、高糖+中浓度 RA 组和高糖+高浓度 RA 组细胞增生率分别为(100.00 \pm 0.92)%、(163.56 \pm 1.46)%、(152.29 \pm 2.90)%、(147.72 \pm 2.22)%和(132.47 \pm 0.74)% ,各组细胞增生率总体比较,差异有统计学意义($F = 537.07, P < 0.001$)。与对照组相比,高糖组、高糖+低浓度 RA 组、高糖+中浓度 RA 组及高糖+高浓度 RA 组的细胞增生率均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。与高糖组相比,各不同浓度 RA 组细胞增生率明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) ,且随着 RA 浓度的升高细胞增生率明显降低,各浓度 RA 组间细胞增生率比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (图 1)。

2.2 各组 HRMEC 迁移能力比较

Transwell 实验结果显示,对照组、高糖组、高糖+低浓度 RA 组、高糖+中浓度 RA 组和高糖+高浓度 RA 组迁移细胞数分别为(37.67 \pm 9.02)、(117.33 \pm 7.23)、(78.67 \pm 4.04)、(65.33 \pm 4.16)和(52.67 \pm 6.81)个,各组迁移细胞数总体比较,差异有统计学意义($F = 64.63, P < 0.001$)。与对照组相比,高糖组、高糖+低浓度 RA 组、高糖+中浓度 RA 组及高糖+高浓度 RA 组的迁移细胞数均明显增多,差异均有统计学意义(均 $P <$

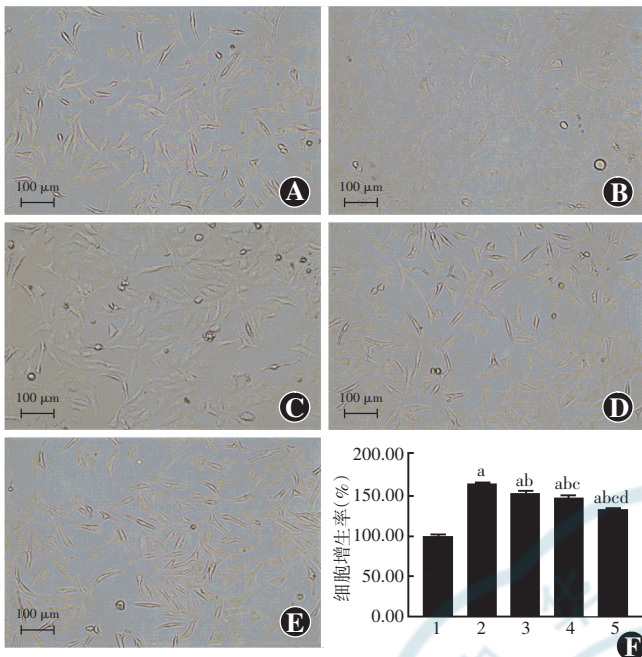


图 1 各组细胞增殖情况比较 A: 对照组细胞呈多边形贴壁生长 (标尺 = 100 μm) B: 高糖组细胞数量较对照组明显增多 (标尺 = 100 μm) C: 高糖+低浓度 RA 组细胞数量较高糖组有所下降 (标尺 = 100 μm) D: 高糖+中浓度 RA 组细胞数量较高糖+低浓度 RA 组有所下降 (标尺 = 100 μm) E: 高糖+高浓度 RA 组细胞数量较高糖+中浓度 RA 组有所下降 (标尺 = 100 μm) F: 各组细胞增殖率比较 $F = 537.07, P < 0.001$. 与对照组比较, ^a $P < 0.001$; 与高糖组比较, ^b $P < 0.05$; 与高糖+低浓度 RA 组比较, ^c $P < 0.05$; 与高糖+中浓度 RA 组比较, ^d $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) 1: 对照组; 2: 高糖组; 3: 高糖+低浓度 RA 组; 4: 高糖+中浓度 RA 组; 5: 高糖+高浓度 RA 组

Figure 1 Comparison of cell proliferation among various groups A: The cells in the control group grew in polygons and adhering to the wall (bar = 100 μm) B: There were more cells in the high glucose group than the control group (bar = 100 μm) C: There were fewer cells in the high glucose+low concentration RA group than the high glucose group (bar = 100 μm) D: There were fewer cells in the high glucose+medium concentration RA group than the high glucose+low concentration RA group (bar = 100 μm) E: There were fewer cells in the high glucose+high concentration RA group than the high glucose+medium concentration RA group (bar = 100 μm) F: Comparison of the cell proliferation rate among various groups $F = 537.07, P < 0.001$. Compared with the control group, ^a $P < 0.001$; compared with the high glucose group, ^b $P < 0.05$; compared with the high glucose+low concentration RA group, ^c $P < 0.05$; compared with the high glucose+medium concentration RA group, ^d $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n = 3$) 1: control group; 2: high glucose group; 3: high glucose+low concentration RA group; 4: high glucose+medium concentration RA group; 5: high glucose+high concentration RA group

0.01); 与高糖组相比, 各不同浓度 RA 组的迁移细胞数明显减少, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$); 随着 RA 浓度的升高, 迁移细胞数明显减少, 各浓度 RA 组间迁移细胞数比较, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 2)。

2.3 各组 HRMEC 管腔形成能力比较

Matrigel 胶实验结果显示, 对照组、高糖组、高糖+低浓度 RA 组、高糖+中浓度 RA 组和高糖+高浓度 RA 组细胞管腔形成数分别为 (45.00 \pm 4.58)、(95.00 \pm

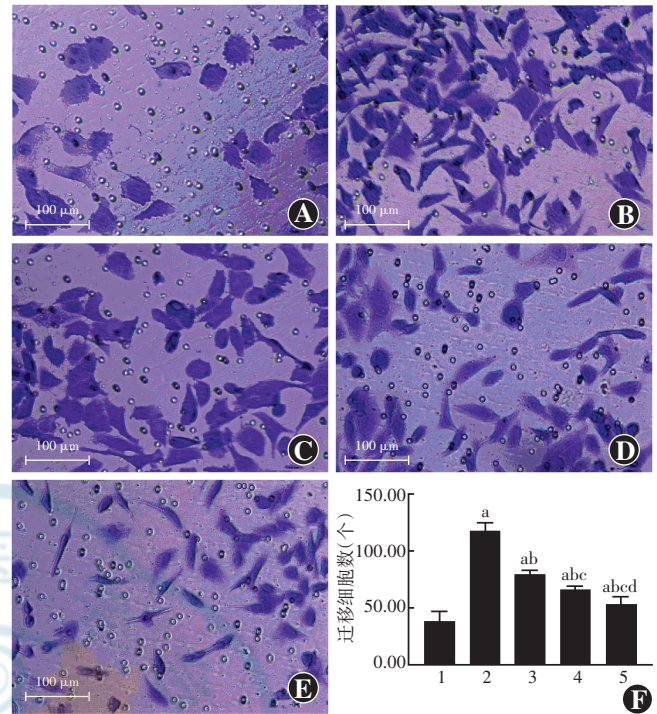


图 2 各组细胞迁移能力比较 A: 对照组迁移细胞数量较少 (结晶紫, 标尺 = 100 μm) B: 高糖组迁移细胞数量较对照组增多 (结晶紫, 标尺 = 100 μm) C: 高糖+低浓度 RA 组迁移细胞数量较高糖组有所减少 (结晶紫, 标尺 = 100 μm) D: 高糖+中浓度 RA 组迁移细胞数量较高糖+低浓度 RA 组进一步减少 (结晶紫, 标尺 = 100 μm) E: 高糖+高浓度 RA 组迁移细胞数量较高糖+中浓度 RA 组有所减少 (结晶紫, 标尺 = 100 μm) F: 各组细胞迁移细胞数比较 $F = 64.63, P < 0.001$. 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与高糖组比较, ^b $P < 0.001$; 与高糖+低浓度 RA 组比较, ^c $P < 0.05$; 与高糖+中浓度 RA 组比较, ^d $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) 1: 对照组; 2: 高糖组; 3: 高糖+低浓度 RA 组; 4: 高糖+中浓度 RA 组; 5: 高糖+高浓度 RA 组

Figure 2 Comparison of cell migration ability among various groups A: There were few migrated cells in the control group (crystal violet, bar = 100 μm) B: There were more migrated cells in the high glucose group than the control group (crystal violet, bar = 100 μm) C: There were fewer migrated cells in the high glucose+low concentration RA group than the high glucose group (crystal violet, bar = 100 μm) D: There were fewer migrated cells in the high glucose+medium concentration RA group than the high glucose+low concentration RA group (crystal violet, bar = 100 μm) E: The number of migrated cells in the high glucose+high concentration RA group was smaller than that in the high glucose+medium concentration RA group (crystal violet, bar = 100 μm) F: Comparison of the number of migrating cells among various groups $F = 64.63, P < 0.001$. Compared with the control group, ^a $P < 0.01$; compared with the high glucose group, ^b $P < 0.001$; compared with the high glucose+low concentration RA group, ^c $P < 0.05$; compared with the high glucose+medium concentration RA group, ^d $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n = 3$) 1: control group; 2: high glucose group; 3: high glucose+low concentration RA group; 4: high glucose+medium concentration group; 5: high glucose+high concentration RA group

9.54)、(84.67 \pm 1.53)、(71.00 \pm 3.61) 和 (60.00 \pm 1.00) 个, 各组间细胞管腔形成数总体比较, 差异有统计学意义 ($F = 45.58, P < 0.001$)。与对照组相比, 高糖组、高糖+低浓度 RA 组、高糖+中浓度 RA 组及高糖+高浓度 RA 组细胞管腔形成数均明显增多, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 与高糖组相比, 各不同浓度 RA 组细胞管腔形成数均明显减少, 差异均有统计学

意义(均 $P < 0.05$);随着 RA 浓度的升高,管腔形成数明显减少,各浓度 RA 组间细胞管腔形成数比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 3)。

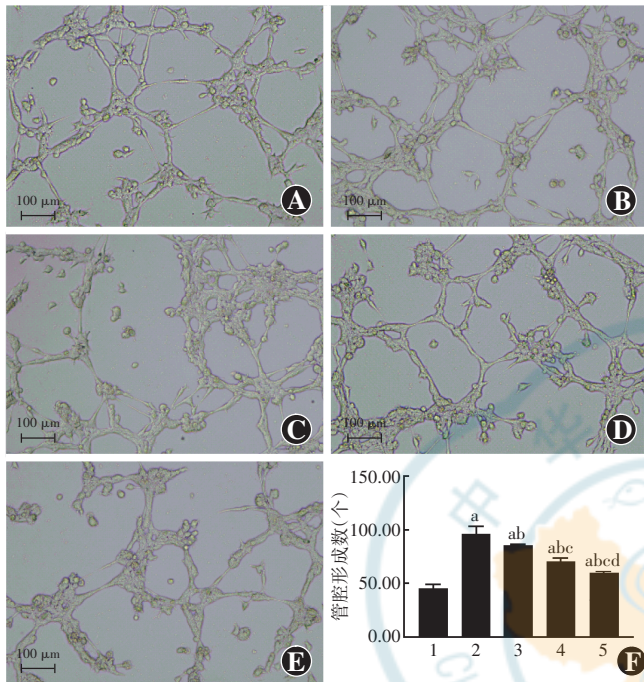


图 3 各组细胞管腔形成能力比较 A: 对照组细胞管腔形成(标尺=100 μm) B: 高糖组细胞管腔形成数较对照组明显增多(标尺=100 μm) C: 高糖+低浓度 RA 组细胞管腔形成数较高糖组有所下降(标尺=100 μm) D: 高糖+中浓度 RA 组细胞管腔形成数较高糖+低浓度 RA 组有所下降(标尺=100 μm) E: 高糖+高浓度 RA 组细胞管腔形成数较高糖+中浓度 RA 组有所下降(标尺=100 μm) F: 各组细胞管腔形成数比较 $F = 45.58, P < 0.001$ 。与对照组比较,^a $P < 0.01$;与高糖组比较,^b $P < 0.05$;与高糖+低浓度 RA 组比较,^c $P < 0.05$;与高糖+中浓度 RA 组比较,^d $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验, $n = 3$) 1: 对照组;2: 高糖组;3: 高糖+低浓度 RA 组;4: 高糖+中浓度 RA 组;5: 高糖+高浓度 RA 组

Figure 3 Comparison of tube formation ability among various groups A: Few formed tubes were observed in the control group (bar=100 μm) B: There were more formed tubes in the high glucose group than the control group (bar=100 μm) C: The number of tubes formed in the high glucose+low concentration RA group was less than that in the high glucose group (bar=100 μm) D: The number of tubes formed in high glucose + medium concentration RA group was decreased in comparison with the high glucose+low concentration RA group (bar=100 μm) E: The number of tubes formed in the high glucose + high concentration RA group was reduced in comparison with the high glucose+medium concentration RA group (bar=100 μm) F: Comparison of the number of tubes formed among various groups $F = 45.58, P < 0.001$. Compared with the control group, ^a $P < 0.01$; compared with the high glucose group, ^b $P < 0.05$; compared with the high glucose+low concentration RA group, ^c $P < 0.05$; compared with the high glucose+medium concentration RA group, ^d $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n = 3$) 1: control group; 2: high glucose group; 3: high glucose+low concentration RA group; 4: high glucose+medium concentration RA group; 5: high glucose+high concentration RA group

2.4 各组 HRMEC 中 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达比较

Western blot 实验结果显示,对照组 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 相对表达量分别为 0.05 ± 0.01 、 0.11 ± 0.01 和 0.07 ± 0.01 ,高糖组分别为 0.33 ± 0.01 、 $0.47 \pm$

0.01 和 0.39 ± 0.01 ,高糖+低浓度 RA 组分别为 0.21 ± 0.02 、 0.33 ± 0.01 和 0.26 ± 0.02 ,高糖+中浓度 RA 组分别为 0.14 ± 0.02 、 0.20 ± 0.02 和 0.17 ± 0.01 ,高糖+高浓度 RA 组分别为 0.09 ± 0.01 、 0.15 ± 0.02 和 0.09 ± 0.01 ,各组间 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白相对表达量总体比较,差异均有统计学意义($F = 145.12$ 、 422.82 、 463.79 ,均 $P < 0.001$)。与对照组相比,高糖组、高糖+低浓度 RA 组、高糖+中浓度 RA 组及高糖+高浓度 RA 组 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 相对表达量均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与高糖组相比,各浓度 RA 组 NLRP3 蛋白相对表达量均明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);随着 RA 浓度的升高,NLRP3 蛋白相对表达量降低,各浓度 RA 组间 NLRP3 蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(图 4)。

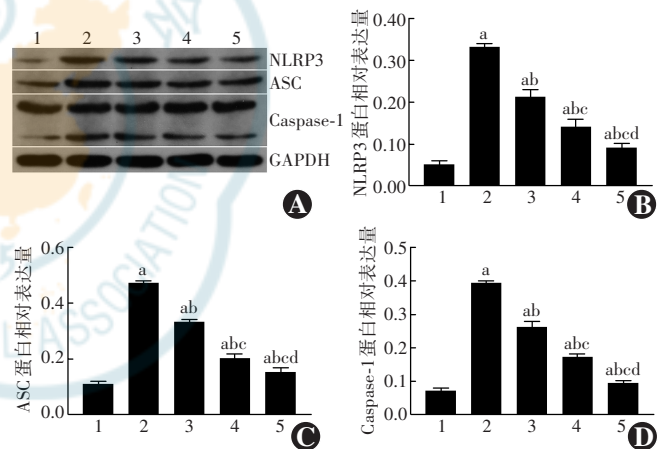


图 4 各组细胞 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白表达量比较 A: 各组 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白表达电泳图 B~D: 各组 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白相对表达量比较 NLRP3: $F = 145.12, P < 0.001$; ASC: $F = 422.82, P < 0.001$; Caspase-1: $F = 463.79, P < 0.001$ 。与对照组比较,^a $P < 0.05$;与高糖组比较,^b $P < 0.05$;与高糖+低浓度 RA 组比较,^c $P < 0.05$;与高糖+中浓度 RA 组比较,^d $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验, $n = 3$) 1: 对照组;2: 高糖组;3: 高糖+低浓度 RA 组;4: 高糖+中浓度 RA 组;5: 高糖+高浓度 RA 组;NLRP3: 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3;ASC: 凋亡相关颗粒样蛋白;Caspase: 半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶;GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶;RA: 迷迭香酸

Figure 4 Comparison of expressions levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 protein among various groups A: Electrophoretic diagram of NLRP3, ASC and Caspase-1 protein expressions in each group B~D: Comparison of relative expression levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 protein among various groups NLRP3: $F = 145.12, P < 0.001$; ASC: $F = 422.82, P < 0.001$; Caspase-1: $F = 463.79, P < 0.001$. Compared with the control group, ^a $P < 0.05$; compared with the high glucose group, ^b $P < 0.05$; compared with the high glucose+low concentration RA group, ^c $P < 0.05$; compared with the high glucose+medium concentration RA group, ^d $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n = 3$) 1: control group; 2: high glucose group; 3: high glucose+low concentration RA group; 4: high glucose + medium concentration RA group; 5: high glucose + high concentration RA group; NLRP3: nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3; ASC: apoptosis-associated speck like protein; Caspase: cysteinyl aspartate-specific protease; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; RA: rosmarinic acid

2.5 各组 HRMEC 培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 质量浓度比较

ELISA 实验结果显示,对照组、高糖组、高糖+低浓度 RA 组、高糖+中浓度 RA 组、高糖+高浓度 RA 组 IL-1 β 质量浓度分别为 (17.36 \pm 0.16)、(55.84 \pm 0.33)、(50.33 \pm 0.67)、(38.52 \pm 0.99) 和 (30.47 \pm 0.46) pg/ml, IL-18 质量浓度分别为 (30.74 \pm 0.28)、(135.46 \pm 0.61)、(125.99 \pm 0.35)、(98.22 \pm 0.41) 和 (53.25 \pm 0.43) pg/ml, 各组细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 质量浓度总体比较, 差异均有统计学意义 ($F=2\ 019.96$ 、 $33\ 406.97$, 均 $P<0.001$)。与对照组相比, 高糖组、高糖+低浓度 RA 组、高糖+中浓度 RA 组及高糖+高浓度 RA 组中 IL-1 β 和 IL-18 质量浓度均明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$); 与高糖组相比, 各 RA 处理组的 IL-1 β 和 IL-18 质量浓度均明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.001$); 随着 RA 浓度的升高, IL-1 β 和 IL-18 质量浓度降低, 各浓度 RA 组间 IL-1 β 和 IL-18 质量浓度比较, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.001$) (图 5)。

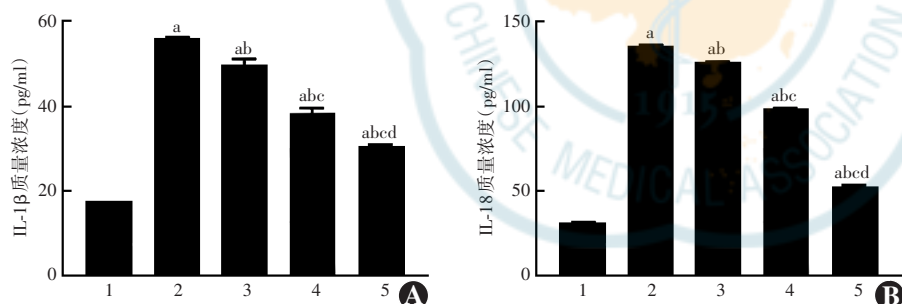


图 5 各组细胞培养上清液中 IL-1 β 和 IL-18 质量浓度比较 A: 各组 IL-1 β 质量浓度比较 $F=2\ 019.96$, $P<0.001$ B: 各组 IL-18 质量浓度比较 $F=33\ 406.97$, $P<0.001$ 。与对照组比较, $^aP<0.001$; 与高糖组比较, $^bP<0.001$; 与高糖+低浓度 RA 组比较, $^cP<0.001$; 与高糖+中浓度 RA 组比较, $^dP<0.001$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=3$) 1: 对照组; 2: 高糖组; 3: 高糖+低浓度 RA 组; 4: 高糖+中浓度 RA 组; 5: 高糖+高浓度 RA 组 IL: 白细胞介素

Figure 5 Comparison of IL-1 β and IL-18 concentrations in cell culture supernatant among various groups A: Comparison of IL-1 β concentration $F=2\ 019.96$, $P<0.001$ B: Comparison of IL-18 concentration $F=33\ 406.97$, $P<0.001$. Compared with the control group, $^aP<0.001$; compared with the high glucose group, $^bP<0.001$; compared with the high glucose+low concentration RA group, $^cP<0.001$; compared with the high glucose+medium concentration RA group, $^dP<0.001$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n=3$) 1: control group; 2: high glucose group; 3: high glucose+low concentration RA group; 4: high glucose+medium concentration RA group; 5: high glucose+high concentration RA group IL: interleukin

3 讨论

国际糖尿病联合会于 2019 年发布的数据显示, 全球已有 4.63 亿糖尿病患者, 到 2030 年将升至 5.78 亿, 到 2045 年将高达 7 亿人, 其中中国糖尿病患者达 1.16 亿^[7]。DR 是糖尿病患者常见的眼部并发症, 分为非增生性 DR (nonproliferative DR, NPDR) 和 PDR

2 大类。PDR 对视力的危害尤其严重, 有研究显示, 5 年内未经正规治疗的 PDR 患者中约有 50% 视力丧失^[8]。因此, 对于 DR 病理机制和治疗策略的研究具有十分重要的科学价值和社会意义。然而, DR 的发病机制尚未完全阐明, 目前认为 DR 的发生和发展主要与多元醇通路激活、氧化应激增加、糖基化终产物形成及蛋白激酶 C 通路激活有关^[9-11]。视网膜新生血管被认为在 PDR 发展中起重要作用。近年来发现, 抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 药物并不能完全控制视网膜新生血管的持续生长^[12], 提示可能存在其他影响视网膜新生血管生成的因素。

Capitão 等^[13] 研究结果显示, 多种炎性因子及细胞因子的刺激均对 DR 新生血管形成起调控作用。其中, 已有研究证实 NLRP3 炎症小体在 DR 的发病机制中发挥关键作用^[14], 而 NLRP3 炎症小体可能与 DR 中视网膜新生血管形成相关。有研究通过高糖培养的 HRMEC 和 DR 动物模型发现, NLRP3 炎症小体信号通路的关键分子 NLRP3、ASC、Caspase-1 及 IL-1 β 与细胞凋亡、血管通透性增加、视网膜厚度和功能降低有关, 参与晚期 DR 的病理性新生血管形成过程, 是治疗 PDR 的新靶点^[15-16]。另有研究通过 DR 动物模型及暴露于高糖环境下的原代 HRMEC 模型发现, NLRP3 参与 DR 介导的炎症发生和进展, 同时还促进视网膜微血管内皮细胞的管腔形成和血管生成^[17]。在临床研究中

发现, NLRP3 蛋白在 PDR 患者的视网膜前膜内呈高表达, NLRP3 及其下游因子 IL-1 β 和 IL-18 在 PDR 患者玻璃体内呈高表达^[18]。DR 患者外周血单核细胞的 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 基因和蛋白表达明显高于正常人群, 且 PDR 患者的视网膜纤维血管膜中

NLRP3、ASC 蛋白相对表达量明显高于正常人, DR 患者外周血单核细胞和玻璃体液中 IL-1 β 及 IL-18 表达水平也明显高于正常人^[19]。以上研究均提示 NLRP3 炎症小体可能与 PDR 有关, 但其与 PDR 患者视网膜新生血管的关系尚不清楚。本研究基于高糖诱导的视网膜新生血管形成细胞模型发现, 高糖环境可明显升高 HRMEC 中 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白及下游细

胞因子 IL-1 β 、IL-18 的表达,证实高糖可激活 HRMEC 中 NLRP3 炎症小体信号通路。综上,NLRP3 炎症小体信号通路在 DR 的病理机制,尤其是 PDR 的视网膜新生血管形成中扮演重要角色,而干扰该信号通路的传导可能成为 DR 新的治疗靶点。

RA 的化学名称是 [R(E)] α -[3-(3,4-二羟基苯基)-1-氧代-2-丙烯基]氧基]-3,4-二羟基苯丙酸,在植物中广泛分布,在唇形科和紫草科植物中含量较高,如迷迭香、鼠尾草和紫苏等。目前研究认为,RA 具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗抑郁等多种药理作用^[20-21]。由于分子结构中具有多电子的酚羟基,使得 RA 具有较强的抗氧化、清除自由基的能力,因而在紫外线辐射性皮肤病、心肌病中显现出良好的治疗前景^[22-23]。此外,RA 能减弱 T 细胞受体介导的信号传导,从而减轻变态反应性鼻炎、哮喘的症状,还可减缓阿尔茨海默病的发展^[6]。RA 的来源广泛且功能多样,研究 RA 有着重要的现实意义和广阔的应用前景,然而目前对 RA 在眼部疾病,尤其是视网膜疾病中作用的研究极少。因此,本研究将不同浓度 RA 作用于高糖刺激的 HRMEC,观察其体外抑制视网膜血管生成的作用,结果提示 RA 对高糖下的 HRMEC 增生、迁移和管腔形成过程具有明显的抑制作用,且其抑制作用随着浓度的升高而增强。有研究结果显示,在氧诱导的小鼠视网膜病变模型中,RA 能使处于 G2/M 期的视网膜内皮细胞增多,处于 G0/G1 和 S 期的细胞减少,从而显著抑制视网膜内皮细胞增生,且该作用呈现剂量依赖的特点,同时还发现 RA 能抑制细胞管腔形成,且无任何视网膜毒性,推测 RA 具有治疗增生性玻璃体视网膜疾病的潜能^[24]。本研究结果发现,不同浓度 RA 组细胞中 NLRP3 炎症小体信号通路关键蛋白的表达量明显少于高糖组,且随着 RA 浓度的升高各蛋白相对表达量降低,证实 RA 可以有效抑制高糖诱导的 NLRP3 炎症小体信号通路激活且该抑制作用呈剂量依赖性。鉴于 NLRP3 炎症小体在 DR 病理机制,尤其是视网膜新生血管形成中的重要性,本研究推测 RA 可能通过抑制 NLRP3 炎症小体信号通路发挥对高糖诱导的视网膜血管内皮细胞血管生成的抑制作用,提示 RA 对 PDR 可能具有治疗潜能。

综上所述,本研究结果表明高糖培养环境可激活 HRMEC 中 NLRP3 炎症小体信号通路,并诱导细胞增生、迁移和管腔形成,RA 可能通过抑制 NLRP3 炎症小体信号通路发挥对视网膜新生血管形成的抑制作用。本研究以 DR 视网膜新生血管形成的细胞模型为基础,对 RA 进行了药效分析,为研究 RA 的临床治疗作

用提供了一定的实验依据。然而,本研究未能通过阻断 NLRP3 炎症小体信号通路来观察 RA 是否对高糖诱导的视网膜血管形成发挥抑制作用,故无法排除 RA 发挥该抑制作用的其他可能机制。此外,本研究未观察 RA 对视网膜血管形成的经典信号通路,即 VEGF 信号通路的作用以及 VEGF 与 NLRP3 炎症小体在该过程中的关系。后续我们将进行动物实验和临床研究,以进一步明确 RA 在 DR 中的作用潜能和分子机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 范姜砾参与论文选题、研究设计、实验实施、实验数据采集和分析、论文撰写;关艳玲参与实验数据采集;李蓉参与论文选题、研究设计、实验实施,对文章智力性内容修改和定稿;姚杨参与数据收集和统计分析

参考文献

- [1] Lee R, Wong TY, Sabanayagam C. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss [J/OL]. *Eye Vis (Lond)*, 2015, 2: 17 [2021-03-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26605370>. DOI: 10.1186/s40662-015-0026-2.
- [2] Wong TY, Cheung CM, Larsen M, et al. Diabetic retinopathy [J/OL]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16012 [2021-03-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27159554>. DOI: 10.1038/nrdp.2016.12.
- [3] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes [J]. *Cell*, 2010, 140 (6): 821-832. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.040.
- [4] Man SM, Kanneganti TD. Regulation of inflammasome activation [J]. *Immunol Rev*, 2015, 265 (1): 6-21. DOI: 10.1111/imr.12296.
- [5] Chaurasia SS, Lim RR, Parikh BH, et al. The NLRP3 inflammasome may contribute to pathologic neovascularization in the advanced stages of diabetic retinopathy [J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 2847 [2020-10-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29434227>. DOI: 10.1038/s41598-018-21198-z.
- [6] 李珂, 胡志敏. 迷迭香酸生物学作用研究进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40 (9): 1032-1036. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.09.003.
Li K, Hu ZM. Advances in biological effects of rosmarinic acid [J]. *Int J Lab Med*, 2019, 40 (9): 1032-1036. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.09.003.
- [7] Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition [J/OL]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 157: 107843 [2021-03-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31518657>. DOI: 10.196/j.diabetes.2019.107843.
- [8] Chhablani J, Sambhana S, Mathai A, et al. Clinical efficacy of navigated panretinal photocoagulation in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Am J Ophthalmol*, 2015, 159 (5): 884-889. DOI: 10.1016/j.ajo.2015.02.006.
- [9] Stitt AW. AGEs and diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51 (10): 4867-4874. DOI: 10.1167/iov.10-5881.
- [10] Durham JT, Herman IM. Microvascular modifications in diabetic retinopathy [J]. *Curr Diab Rep*, 2011, 11 (4): 253-264. DOI: 10.1007/s11892-011-0204-0.
- [11] 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.
- [12] Osaadon P, Fagan XJ, Lifshitz T, et al. A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy [J]. *Eye (Lond)*, 2014, 28 (5):

- 510-520. DOI:10. 1038/eye. 2014. 13.
- [13] Capitão M, Soares R. Angiogenesis and inflammation crosstalk in diabetic retinopathy[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(11): 2443-2453. DOI:10. 1002/jcb. 25575.
- [14] Lim RR, Wieser ME, Ganga RR, et al. NOD-like receptors in the eye: uncovering its role in diabetic retinopathy[J/OL]. Int J Mol Sci, 2020, 21(3): 899 [2021-09-16]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32019187>. DOI:10. 3390/ijms21030899.
- [15] Chen W, Zhao M, Zhao S, et al. Activation of the TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway contributes to inflammation in diabetic retinopathy: a novel inhibitory effect of minocycline[J]. Inflamm Res, 2017, 66(2): 157-166. DOI:10. 1007/s00011-016-1002-6.
- [16] Chaurasia SS, Lim RR, Parikh BH, et al. The NLRP3 inflammasome may contribute to pathologic neovascularization in the advanced stages of diabetic retinopathy[J/OL]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2847 [2021-03-16]. <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29434227>. DOI: 10. 1038/s41598-018-21198-z.
- [17] Zou W, Luo S, Zhang Z, et al. ASK1/p38-mediated NLRP3 inflammasome signaling pathway contributes to aberrant retinal angiogenesis in diabetic retinopathy[J]. Int J Mol Med, 2021, 47(2): 732-740. DOI: 10. 3892/ijmm. 2020. 4833.
- [18] Loukovaara S, Piippo N, Kinnunen K, et al. NLRP3 inflammasome activation is associated with proliferative diabetic retinopathy[J]. Acta Ophthalmol, 2017, 95(8): 803-808. DOI:10. 1111/aos. 13427.
- [19] Chen H, Zhang X, Liao N, et al. Enhanced expression of NLRP3 inflammasome-related inflammation in diabetic retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59(2): 978-985. DOI:10. 1167/iovs. 17-22816.
- [20] Li Z, Wang X, Zhang H. Balancing the non-linear rosmarinic acid biosynthetic pathway by modular co-culture engineering[J]. Metab Eng, 2019, 54: 1-11. DOI:10. 1016/j.ymben. 2019. 03. 002.
- [21] Elufioye TO, Habtemariam S. Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: insight into its mechanisms of action [J/OL]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108600 [2021-03-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30780110>. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2019. 108600.
- [22] Fernando PM, Piao MJ, Kang KA, et al. Rosmarinic acid attenuates cell damage against UVB radiation-induced oxidative stress via enhancing antioxidant effects in human HaCaT cells[J]. Biomol Ther (Seoul), 2016, 24(1): 75-84. DOI:10. 4062/biomolther. 2015. 069.
- [23] Zhang X, Zhu JX, Ma ZG, et al. Rosmarinic acid alleviates cardiomyocyte apoptosis via cardiac fibroblast in doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(3): 556-567. DOI: 10. 7150/ijbs. 29907.
- [24] Kim JH, Lee BJ, Kim JH, et al. Rosmarinic acid suppresses retinal neovascularization via cell cycle arrest with increase of p21 (WAF1) expression[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 615(1-3): 150-154. DOI:10. 1016/j. ejphar. 2009. 05. 015.

(收稿日期:2021-04-11 修回日期:2021-09-18)

(本文编辑:张宇)

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。

本刊对存在科研诚信问题或发表流程中存在严重缺陷稿件的撤稿及其流程

依据中华医学会系列杂志论文发表后撤稿的推荐规范,如发生下列情况本刊将予以撤稿处理:(1)编辑部收到举报并已经证实论文存在较严重的不可信、学术不端或非主观的错误,以致于该论文所报道的发现和结果不可信。(2)论文存在剽窃问题。(3)论文所报道的研究违反医学伦理规范。(4)未被允许的重复发表。(5)在稿件发表流程中存在严重缺陷。上述问题经编辑部严格调查属实后,本刊编辑部将按照撤稿流程分别在纸版期刊、本刊网站刊登撤稿声明,刊登前编辑部和所有作者就撤稿声明的内容达成一致,以保证各方利益。但在无法就撤稿声明的内容与作者达成一致时,如已有充足证据表明必须撤稿,本刊将尽快刊出撤稿声明。撤稿声明对所有读者免费开放,以最大限度地减少该论文发表带来的负面影响。编辑对存在科研诚信问题或发表流程中存在严重缺陷稿件的撤稿拥有最终决定权。

(本刊编辑部)