

表没食子儿茶素没食子酸酯对人 Tenon 囊成纤维细胞活化的抑制作用及其调控机制

陈艳蕾 林宏亮 王盛 覃泳杰 张洪洋

广东省人民医院眼科 广东省医学科学院, 广州 510080

通信作者: 张洪洋, Email: hy3005716@163.com

【摘要】 目的 探讨绿茶提取物表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对人 Tenon 囊成纤维细胞(HTFs)活化的作用及其可能的作用机制。方法 收集 9 例 9 眼晚期原发性开角型青光眼患者小梁切除术中获取的结膜下 Tenon 囊组织,通过组织贴壁培养获得原代细胞,采用免疫荧光染色法(波形蛋白+角蛋白)进行细胞鉴定,取 4~6 代细胞进行后续实验。利用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测 0~80 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 干预条件下的细胞存活率。将细胞分为空白对照组、转化生长因子(TGF)- β 1 诱导组和 EGCG 干预组,分别于正常培养基、含 10 ng/ml TGF- β 1 培养基以及含 10 ng/ml TGF- β 1+50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 培养基中培养。采用 BrdU 标记法检测各组细胞增生率,采用细胞划痕实验观察各组细胞迁移情况,采用免疫荧光法检测各组细胞中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达,采用 Western blot 法检测空白对照组、TGF- β 1 诱导组、10 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组和 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组 Smad2/3、p-Smad2/3、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)及磷酸化 Akt(p-Akt)的表达。结果 体外培养 HTFs 呈长梭形,生长规律,免疫荧光鉴定波形蛋白呈阳性。CCK-8 检测显示,10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 处理细胞存活率与 0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 处理细胞比较,差异均无统计学意义(均 $P < 0.05$)。BrdU 标记实验显示,TGF- β 1 诱导组细胞增生率为 $(66.37 \pm 12.65)\%$,高于 EGCG 组的 $(14.75 \pm 12.33)\%$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。划痕实验第 3 天,TGF- β 1 诱导组相对划痕面积为 $(47.33 \pm 12.22)\%$,明显低于 EGCG 干预组的 $(92.67 \pm 4.04)\%$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。免疫荧光染色结果显示,TGF- β 1 诱导组细胞 α -SMA 蛋白荧光较空白对照组显著增强,EGCG 干预组 α -SMA 蛋白荧光则减弱至空白对照组水平。Western blot 法检测结果显示,各组间细胞中 p-Smad2/3、PI3K 和 p-Akt 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F = 58.820, 121.153, 69.289$, 均 $P < 0.001$),其中 TGF- β 1 诱导组 p-Smad2/3、PI3K 和 p-Akt 蛋白相对表达量明显高于空白对照组、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 EGCG 能够通过 Smad 通路及 PI3K/Akt 信号通路抑制 TGF- β 1 诱导的 HTFs 活化。

【关键词】 青光眼; 小梁切除术; 表没食子儿茶素没食子酸酯; Tenon 囊成纤维细胞; 瘢痕化

基金项目: 广州市基础研究计划基础与应用基础研究项目(202102080345); 广东省自然科学基金项目(2020A1515010103)

DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20211206-00672

Inhibitory effect of epigallocatechin gallate on human Tenon fibroblasts and its mechanism

Chen Yanlei, Lin Hongliang, Wang Sheng, Qin Yongjie, Zhang Hongyang

Department of Ophthalmology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: Zhang Hongyang, Email: hy3005716@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on the activation of human Tenon fibroblasts (HTFs) and its mechanism. **Methods** Tenon capsule tissues from nine eyes of nine advanced primary open angle glaucoma patients during trabeculectomy were obtained for primary cell culture. HTFs harvested were identified by immunofluorescence staining for vimentin and keratin. Cells at passage 4-6 were used for experiment. Viability of HTFs treated with EGCG at 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 $\mu\text{mol/L}$ was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. The cells were divided into blank control group, transforming growth factor (TGF)- β 1-induced group, and EGCG-treated group, which were cultured in normal medium, medium containing 10 ng/ml TGF- β , medium containing 10 ng/ml TGF- β +50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG, respectively. The proliferation rate of HTFs was detected by BrdU labeling assay. Cell migration was observed by scratch wound healing assay. The expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) was measured by immunofluorescence staining. The protein relative expression levels of Smad2/3, phosphoinositide-3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt) as well as the phosphorylated Smad2/3

(p-Smad2/3) and phosphorylated Akt (p-Akt) were measured by western blot. This study was approved by the Ethics Committee of Guangdong Provincial People's Hospital (NO. GDREC2019331H[R1]). **Results** The HTFs harvested had spindle shape, grew regularly and were vimentin-positive. CCK-8 assay showed that there was no significant difference in the variability of HTFs treated with EGCG at 10, 20, 30, 40 and 50 $\mu\text{mol/L}$ in comparison with 0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG treatment (all at $P < 0.05$). BrdU labeling assay showed that cell proliferation in the TGF- β 1-induced group was (66.37 \pm 12.65)%, which was significantly higher than (14.75 \pm 12.33)% in EGCG-treated group ($P < 0.05$). Three days after scratch, the relative scratch area in the TGF- β 1-induced group was (47.33 \pm 12.22)%, which was significantly lower than (92.67 \pm 4.04)% in the EGCG-treated group ($P < 0.05$). Immunofluorescence assay showed that α -SMA fluorescence was significantly enhanced in the TGF- β 1-induced group in comparison with the blank control group, which was reduced to blank control group level in EGCG-treated group. Western blot analysis showed that there were significant differences in the relative expression levels of p-Smad2/3, PI3K and p-Akt protein among the various groups ($F = 58.820, 121.153, 69.289$; all at $P < 0.001$). The relative expressions of p-Smad2/3, PI3K and p-Akt in the TGF- β 1-induced group were significantly higher than those in the blank control group, 10 $\mu\text{mol/L}$ and 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG-treated groups (all at $P < 0.05$). **Conclusions** EGCG can suppress TGF- β 1-induced HTFs activation through Smad and PI3K/Akt signaling pathways.

[**Key words**] Glaucoma; Trabeculectomy; Epigallocatechin gallate; Tenon fibroblasts; Scarring

Fund program: Basic and Applied Basic Research Program of Guangzhou Basic Research Plan (202102080345); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2020A1515010103)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20211206-00672

青光眼是世界主要的不可逆性致盲眼病, 预计 2040 年全球青光眼患病人数将达到 1.2 亿^[1]。以小梁切除术为代表的滤过手术是青光眼治疗的经典手段, 能够使患者眼压长期维持在目标值, 延缓视功能的损伤^[2]。但是, 由于人 Tenon 囊成纤维细胞 (human Tenon fibroblasts, HTFs) 介导的滤过泡瘢痕化, 导致长期手术成功率并不理想, 即使局部使用抗代谢药物丝裂霉素 C 或 5 氟尿嘧啶, 小梁切除术后 1 年失败率仍为 9.35%~17.3%^[3-4]。转化生长因子 β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1) 被认为是创伤修复中促使 HTFs 向具有强收缩性的肌成纤维细胞分化的关键分子^[5]。TGF- β 1 介导的 Smad 通路是促纤维化的经典途径, 也是促使 HTFs 合成 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA), 并向肌成纤维细胞转化的主要机制^[6]。研究证实, TGF- β 1 还能够通过激活非 Smad 依赖性的信号通路发挥促纤维化作用, 如丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphoinositide-3-kinase, PI3K) 和 Rho 等^[7], 其中, PI3K/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路被证实滤过泡瘢痕化中发挥着重要作用^[8]。因此, 寻找安全并且同时对多条促纤维化信号通路均有抑制作用的治疗药物具有重要意义。近年来的细胞和动物相关实验研究发现, 绿茶提取物中含量最丰富的表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 在肝脏、肾脏、肺脏等脏器相关的纤维化疾病中发挥着显著的治疗作用^[9-12]。EGCG 可通过调控 ERK 的磷酸化水平而抑

制晶状体上皮细胞的增生^[13]。但 EGCG 的功能随着不同的组织或实验模型而改变, 甚至有可能出现相反的作用^[14-15]。目前, EGCG 对青光眼术后滤过泡瘢痕化的影响尚不清楚。本研究拟分离培养原发性开角型青光眼患者 HTFs, 探讨 EGCG 对 TGF- β 1 诱导 HTFs 纤维化的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织取材 收集 2019 年 8—12 月于广东省人民医院眼科行小梁切除手术的 9 例 9 眼晚期原发性开角型青光眼患者结膜下 Tenon 囊组织, 患者病程均 > 10 年, 其中男 5 例, 女 4 例, 平均年龄 (58 \pm 8) 岁。本研究方案符合《赫尔辛基宣言》原则, 并通过广东省人民医院伦理委员会批准 [批文号: GDREC2019331H (R1)], 所有患者均知晓实验目的并签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 EGCG、DAPI 染料 (美国 Sigma 公司); TGF- β 1 (美国 Peprotech 公司); DMEM/F12 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Gibco 公司); 青霉素/链霉素双抗、BCA 试剂盒 (美国 Thermo 公司); 兔抗人波形蛋白 (ab92547)、兔抗人角蛋白 (ab185627)、鼠抗人 α -SMA (ab124964)、鼠抗人 PI3K (ab86714)、兔抗人 Akt (ab235958)、兔抗人 p-Akt (ab81283) 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); Smad2/3 (#8685)、p-Smad2/3 (#8828)、GAPDH (#8884) 单克隆抗体、FITC 标记羊抗鼠二抗 (ab150115) (美国 CST 公司); 蛋白提取剂 (上海 BestBio 公司); ECL 显影试剂

盒(美国 Abbkine 公司)。低温离心机(美国 Eppendorf 公司);Varioskan Flash 酶标仪(美国 Thermo 公司);荧光倒置显微镜(德国 Zeiss 公司);垂直平板微电泳槽及电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 组织培养 取术中手术区域结膜下 Tenon 囊组织块,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)反复冲洗,剪切至约 $1\sim 3\text{ mm}^3$ 的组织块,以 5 mm 左右间隔,均匀铺于 60 mm 培养皿上,稍倾斜置于 CO_2 培养箱约 0.5 h 后,加入含体积分数 10% FBS 和 100 U/ml 双抗的 DEME/F12 完全培养基,水平放置于培养箱。待细胞长满皿底后进行传代培养,加入 0.5 ml 质量分数 0.25% 胰蛋白酶溶液消化 2 min,加入 3 ml 完全培养基终止消化,1:2 或 1:3 比例传代。取第 4~6 代细胞进行后续实验。

1.2.2 免疫荧光染色鉴定 HTFs 细胞传代于铺有细胞爬片的六孔板,培养过夜,吸除旧培养液, PBS 清洗 3 次,质量分数 4% 多聚甲醛固定 20~30 min, PBS 清洗 3 次,体积分数 0.1% Triton X-100 破膜 5 min, PBS 清洗 3 次,体积分数 5% 山羊血清封闭 20~30 min;吸除封闭液,滴加波形蛋白和角蛋白一抗(均 1:200), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;PBS 浸洗后滴加荧光二抗(1:200),室温下孵育 1 h, DAPI 染核 5 min 至干燥后封片,于荧光显微镜下拍摄图像。

1.2.3 CCK-8 法检测不同浓度 EGCG 处理 HTFs 的存活率 将细胞接种至 96 孔板,分别用 0、10、20、30、40、50、60、70、80 $\mu\text{mol/L}$ 的 EGCG 干预,每个浓度设置 5 个复孔,培养 48 h 后,光学显微镜下观察细胞形态;弃培养基,每孔加入 10 μl CCK-8 检测液,放入温箱中孵育 4 h 后,酶标仪检测 450 nm 波长吸光度(A)值,计算各组细胞存活率(%) = 各组 A 值/0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组 A 值 $\times 100\%$ 。实验重复 5 次。

1.2.4 BrdU 标记法检测各组细胞增生情况 将细胞接种至 96 孔板,分为空白对照组、TGF- $\beta 1$ 诱导组和 EGCG 干预组,每组设置 5 个复孔,分别于正常培养基、含 10 ng/ml TGF- $\beta 1$ 培养基和含 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 培养基中培养 24 h,用含 BrdU 的无血清培养液孵育 4 h, FixDenat 孵育 2 h, BrdU-POD 抗体工作液孵育 1 h,洗脱液清洗 3 次,显色剂孵育 30 min;酶标仪中检测 A 值,获得 370 nm 波长与 492 nm 波长 A 差值,计算各组细胞增生率(%) = (各组 A 差值-空白对照组 A 差值)/空白对照组 A 差值 $\times 100\%$ 。实验重复 5 次。

1.2.5 细胞划痕实验检测各组细胞迁移能力 以 7.5×10^6 个/孔的密度将细胞传代于 6 孔板中,培养过

夜,用 200 μl 枪头在皿底呈“井”字划线后,弃去旧培养液, PBS 清洗 2 次,加入含 1% FBS 的培养基,将细胞分为空白对照组、TGF- $\beta 1$ 诱导组和 EGCG 干预组;参照 1.2.4 部分进行分组处理,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 3 d,倒置显微镜观察并拍照,采用 ImageJ 软件测量各组剩余划痕面积,计算各组相对划痕面积(%) = 各组剩余划痕面积/最初划痕面积 $\times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.2.6 免疫荧光染色观察各组细胞 α -SMA 表达分布 将细胞接种于铺有细胞爬片的 6 孔板中,培养过夜,将细胞分为空白对照组、TGF- $\beta 1$ 诱导组和 EGCG 干预组;参照 1.2.4 部分进行分组处理,每组设置 2 个复孔;培养 48 h 后,参照 1.2.2 部分进行免疫荧光染色, α -SMA 一抗稀释比例为 1:250,羊抗鼠荧光二抗稀释比例为 1:200,封片后于荧光显微镜下拍摄图像。实验重复 3 次。

1.2.7 Western blot 法检测各组 Smad 通路和 Akt 通路相关因子的表达情况 将细胞接种至 6 孔板中,分为空白对照组、TGF- $\beta 1$ 诱导组、10 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组和 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组,每组设置 3 个复孔,其中空白对照组和 TGF- $\beta 1$ 诱导组细胞分别在正常培养基和含有 10 ng/ml TGF- $\beta 1$ 的培养基中培养,各 EGCG 干预组细胞在含 10 ng/ml TGF- $\beta 1$ 培养基中培养 24 h 后,于含 10 $\mu\text{mol/L}$ 或 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 新的培养基中继续培养 48 h。吸除旧培养液,预冷 PBS 清洗,加入 RIPA 裂解液提取蛋白,使用细胞刮收集液体,离心后取上清蛋白液,使用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度定量并配平蛋白液后,加入蛋白液体 1/3 的 loading buffer 震荡混匀, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴蛋白变性 8 min。使用 SDS-PAGE 凝胶 80 V 恒压电泳 1.5 h, 200 mA 恒流转印 2 h,将蛋白条带转至 PVDF 膜;取 PVDF 膜在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, Smad2/3 (1:2 000)、PI3K (1:1 000)、Akt (1:2 000)、p-Smad2/3 (1:1 000)、p-Akt (1:1 000) 和 GAPDH (1:2 000) 一抗 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;TBST 清洗 3 次,辣根过氧化物酶标记二抗常温孵育 1 h, TBST 清洗 3 次,使用 ECL 系统显色,采用多功能成像仪获取条带图像,采用 ImageJ 软件对条带灰度进行定量分析。以 GAPDH 为内参,计算各目的蛋白相对表达量。使用不同标本重复实验 6 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析。本研究中计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间差异比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。采用双尾检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HTFs 的体外原代培养及鉴定

培养 1 d 时,人 Tenon 囊组织块贴壁(图 1A);组织贴壁培养第 1 周,可见少量长梭形细胞从组织块边缘爬出(图 1B);培养第 10 天,细胞增生速度加快,细胞间相互连接,呈束状排列;培养第 2 周,细胞生长速度减缓,生长密度 >90%(图 1C)。第 2~3 次传代后的细胞大小形态趋于稳定,生长规律,细胞核呈卵圆形,位于细胞中部,快速生长期细胞呈放射状或漩涡状,符合成纤维细胞的一般特点。免疫荧光鉴定结果显示,细胞波形蛋白呈强阳性(图 1D),角蛋白呈阴性(图 1E),鉴定为 HTFs。

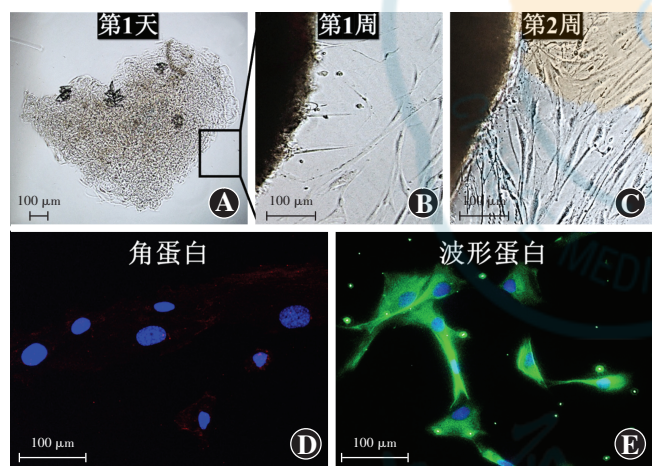


图 1 HTFs 的原代培养及免疫荧光鉴定 A:培养 1 d,结膜下 Tenon 囊组织贴壁($\times 40$,标尺 = 100 μm) B:培养 1 周,可见长梭形细胞从组织边缘爬出($\times 200$,标尺 = 100 μm) C:培养 2 周,细胞密集生长,细胞间相互连接($\times 200$,标尺 = 100 μm) D:细胞角蛋白免疫荧光染色呈阴性(FITC/DAPI $\times 200$,标尺 = 100 μm) E:成纤维细胞标志物波形蛋白免疫荧光染色呈强阳性(FITC/DAPI $\times 200$,标尺 = 100 μm)

Figure 1 Primary culture and immunofluorescence identification of HTFs A:The subconjunctival Tenon capsule tissue was adherent after one-day culture ($\times 40$, bar = 100 μm) B:After one week of culture, elongated cells could be seen climbing out of the tissue edge ($\times 200$, bar = 100 μm) C:After two weeks of culture, cells grew densely and adhered to each other ($\times 200$, bar = 100 μm) D:Negative immunostaining for keratin (FITC/DAPI $\times 200$, bar = 100 μm) E:Strongly positive immunostaining for vimentin, a fibroblast marker (FITC/DAPI $\times 200$, bar = 100 μm)

2.2 不同浓度 EGCG 处理 HTFs 存活率比较

光学显微镜下观察不同浓度 EGCG 处理 48 h 细

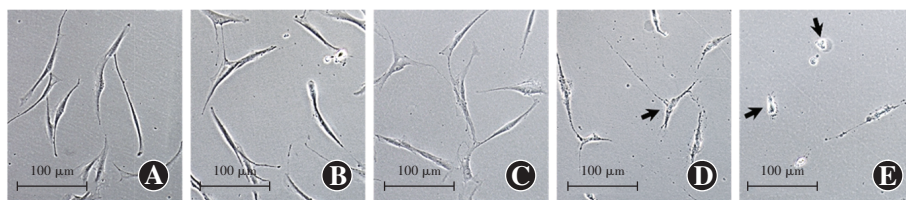


图 2 不同浓度 EGCG 处理 HTFs 的形态变化($\times 400$,标尺 = 100 μm) 光学显微镜下,0、10、50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 处理细胞形态符合正常成纤维细胞,无明显异常,60、80 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 处理细胞出现皱缩变圆,甚至漂浮(箭头) A:0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG;B:10 $\mu\text{mol/L}$ EGCG;C:50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG;D:60 $\mu\text{mol/L}$ EGCG;E:80 $\mu\text{mol/L}$ EGCG

Figure 2 Morphology of HTFs treated with EGCG at different concentrations ($\times 400$, bar = 100 μm) Under an optical microscope, HTFs in 0, 10 and 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG groups were like normal fibroblast without obvious abnormalities. HTFs in 60 and 80 $\mu\text{mol/L}$ EGCG groups showed shrunken, rounded and even floating (arrow) A:0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG;B:10 $\mu\text{mol/L}$ EGCG;C:50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG;D:60 $\mu\text{mol/L}$ EGCG;E:80 $\mu\text{mol/L}$ EGCG

胞形态,其中 10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组细胞均表现为典型的成纤维细胞形态,60、70、80 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组细胞开始出现皱缩变圆,贴附能力减弱,甚至出现细胞漂浮(图 2)。不同浓度 EGCG 组 HTFs 存活率总体比较差异有统计学意义($F = 64.492, P < 0.001$)。10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组细胞存活率均稍低于 0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组,但差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);60、70、80 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组细胞存活率较 0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组明显下降,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),其中 80 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组细胞存活率为 $(32.13 \pm 8.81)\%$,低于 50%(表 1)。因此,选择 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 作为后续实验的工作浓度。

表 1 不同浓度 EGCG 组 HTFs 存活率比较($\bar{x} \pm s, \%$)
Table 1 Comparison of HTFs viability among groups containing various concentrations of EGCG ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	细胞存活率
0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组	5	100.00 \pm 0.00
10 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组	5	94.12 \pm 6.40
20 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组	5	96.41 \pm 5.81
30 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组	5	92.70 \pm 6.01
40 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组	5	93.55 \pm 8.36
50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组	5	92.26 \pm 5.89
60 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组	5	83.39 \pm 6.30 ^a
70 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组	5	58.79 \pm 4.56 ^a
80 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组	5	32.13 \pm 8.81 ^a
<i>F</i> 值		64.492
<i>P</i> 值		< 0.001

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组比较,^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) EGCG:表没食子儿茶素没食子酸酯;HTFs:人 Tenon 囊成纤维细胞
Note:Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG group,^a $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) EGCG:epigallocatechin gallate;HTFs:human Tenon fibroblasts

2.3 各组 HTFs 细胞增生率比较

空白对照组、TGF- β 1 诱导组和 EGCG 干预组 HTFs 细胞增生率总体比较差异有统计学意义 ($F=58.361, P<0.001$)。其中, TGF- β 1 诱导组细胞增生率明显高于空白对照组, EGCG 干预组细胞增生率明显低于空白对照组和 TGF- β 1 诱导组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (表 2)。

表 2 各组 HTFs 增生率比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)
Table 2 Comparison of proliferation rate of HTFs among three groups ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	样本量	细胞增生率
空白对照组	5	0.00 \pm 0.00
TGF- β 1 诱导组	5	66.37 \pm 12.65 ^a
EGCG 干预组	5	14.75 \pm 12.33 ^{ab}
F 值		58.361
P 值		<0.001

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与 TGF- β 1 诱导组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) HTFs: 人 Tenon 囊成纤维细胞; TGF: 转化生长因子; EGCG: 表没食子儿茶素没食子酸酯

Note: Compared with blank control group, ^a $P<0.05$; compared with TGF- β 1-induced group, ^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) HTFs: human Tenon fibroblasts; TGF: transforming growth factor; EGCG: epigallocatechin gallate

2.4 各组 HTFs 相对迁移能力比较

划痕后第 3 天, 空白对照组可见少量细胞向划痕内迁移, TGF- β 1 诱导组可见较多细胞向划痕内迁移, EGCG 干预组未见有明显的细胞迁移 (图 3)。各组相对划痕面积总体比较差异有统计学意义 ($F=25.716, P=0.001$)。其中, TGF- β 1 诱导组相对划痕面积明显小于空白对照组, EGCG 干预组相对划痕面积明显大于空白对照组和 TGF- β 1 诱导组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (表 3)。

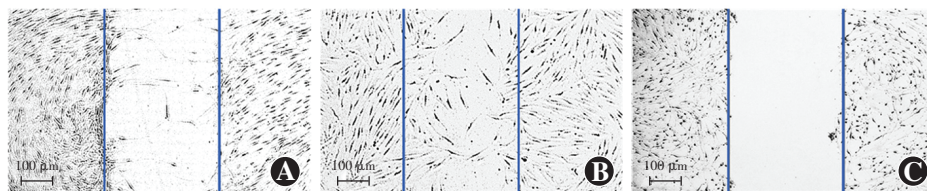


图 3 各组 HTFs 的迁移情况 ($\times 100$, 标尺 = 100 μm) 划痕后第 3 天, 空白对照组有少量细胞向划痕内迁移, TGF- β 1 诱导组有大量细胞向划痕内迁移, EGCG 干预组未见明显的细胞迁移。蓝线所示为划痕边界线 A: 空白对照组; B: TGF- β 1 诱导组; C: EGCG 干预组

Figure 3 HTFs migration in each group ($\times 100$, bar = 100 μm) On the third day after scratch, a small amount of cells in blank control group migrated into the scratch. A large number of cells migrated into the scratch in TGF- β 1-induced group. No significant cell migration was observed in EGCG intervention group. Blue lines were the scratch boundaries A: blank control group; B: TGF- β 1-induced group; C: EGCG intervention group

表 3 各组相对划痕面积比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)
Table 3 Comparison of relative scratch area among three groups ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	样本量	相对划痕面积
空白对照组	3	74.33 \pm 4.04
TGF- β 1 诱导组	3	47.33 \pm 12.22 ^a
EGCG 干预组	3	92.67 \pm 4.04 ^{ab}
F 值		25.716
P 值		0.001

注:与空白对照组比较,^a $P<0.05$;与 TGF- β 1 诱导组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) TGF: 转化生长因子; EGCG: 表没食子儿茶素没食子酸酯

Note: Compared with blank control group, ^a $P<0.05$; compared with TGF- β 1-induced group, ^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) TGF: transforming growth factor; EGCG: epigallocatechin gallate

2.5 各组 HTFs 中 α -SMA 蛋白表达分布

免疫荧光染色显示, α -SMA 主要表达于细胞质, 呈红色荧光。与空白对照组比较, TGF- β 1 诱导组 α -SMA 蛋白荧光明显增强, 细胞形态发生变化, 呈薄翼状或不规则状, 胞体胞核变大, 提示 HTFs 活化; 与 TGF- β 1 诱导组比较, EGCG 干预组 α -SMA 蛋白荧光明显减弱至空白对照组水平, 细胞形态恢复至长梭形, 胞体缩小 (图 4)。

2.6 各组 HTFs 中 Smad 通路和 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达比较

空白对照组、TGF- β 1 诱导组、10 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组和 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组细胞中 Smad2/3 和 Akt 蛋白相对表达量总体比较差异均无统计学意义 ($F=0.452, 1.293$, 均 $P>0.05$)。各组细胞中 p-Smad2/3、PI3K、p-Akt 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F=58.820, 121.153, 69.289$, 均 $P<0.001$)。TGF- β 1 诱导组 HTFs 中 p-Smad2/3、PI3K、p-Akt 蛋白相对表达量明显高于空白对照组、10 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组和 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组, 呈剂量依赖性, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.001$)。10 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组 HTFs 中 p-Smad2/3、PI3K、p-Akt 蛋白相对表达量高于 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组 (均 $P<0.001$) (图 5, 表 4)。

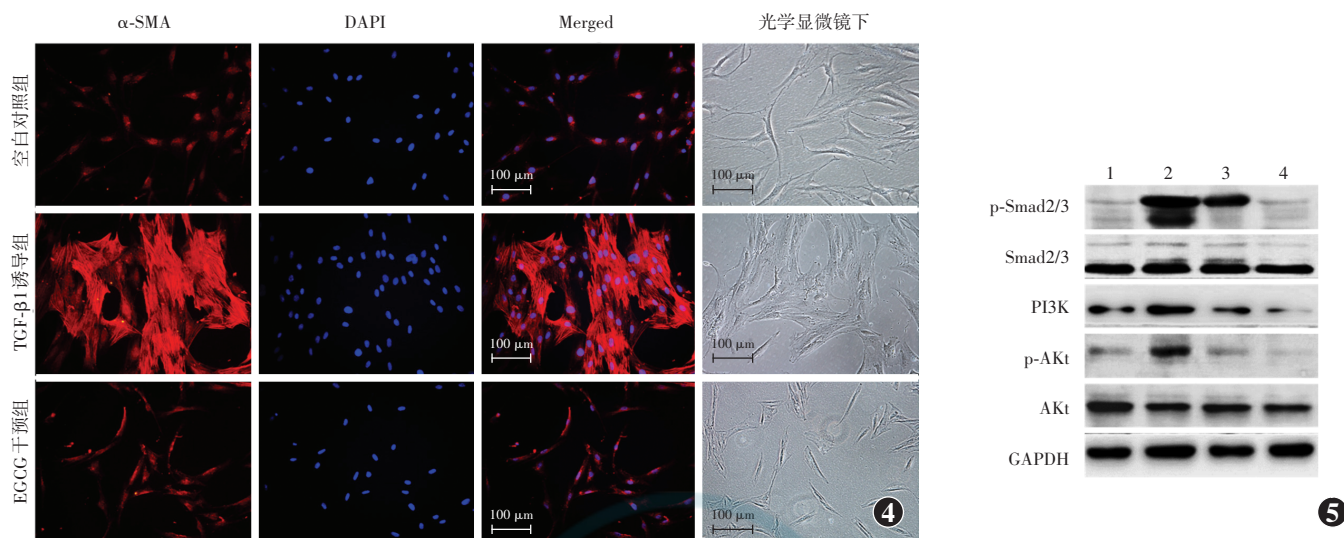


图 4 HTFs 的 α -SMA 荧光染色 ($\times 200$, 标尺 = $100 \mu\text{m}$) 空白对照组 α -SMA 红色荧光微弱, 细胞呈长梭形; TGF- β 1 诱导组 α -SMA 呈强荧光, 胞体变大, 呈薄翼状或不规则状, 细胞间连接紧密; EGCG 干预组 α -SMA 荧光强度较 TGF- β 1 诱导组明显减弱, 细胞恢复至长梭形 SMA: 平滑肌动蛋白; TGF: 转化生长因子; EGCG: 表没食子儿茶素没食子酸酯 **图 5** Western blot 检测 Smad-2/3、PI3K、Akt 及磷酸化蛋白 p-Smad2/3 和 p-Akt 表达电泳图 各组 Smad2/3、Akt 条带灰度无明显差异; TGF- β 1 诱导组 p-Smad2/3、PI3K、p-Akt 条带灰度明显强于空白对照组和不同浓度 EGCG 干预组 1: 空白对照组; 2: TGF- β 1 诱导组; 3: $10 \mu\text{mol/L}$ EGCG 组; 4: $50 \mu\text{mol/L}$ EGCG 组; PI3K: 磷脂酰肌醇-3-激酶; Akt: 蛋白激酶 B

Figure 4 Immunofluorescence of α -SMA in HTFs ($\times 200$, bar = $100 \mu\text{m}$) Weak red fluorescence of α -SMA and typical fibroblast cell morphology was seen in blank control group. Strong positive fluorescence of α -SMA, large cell bodies in thin wing shape or irregular shape, and tight intercellular connection were observed in TGF- β 1-induced group. Significantly decreased α -SMA fluorescence was found in EGCG-treated group in comparison with TGF- β 1-induced group, and the HTFs returned to elongated shape SMA: smooth muscle actin; TGF: transforming growth factor; EGCG: epigallocatechin gallate **Figure 5** Expression of Smad2/3, PI3K, Akt, p-Smad2/3 and p-Akt by western blot There was no significant difference in band grayscale of Smad2/3 and Akt among the four groups. The band grayscale of p-Smad2/3, PI3K and p-Akt in the TGF- β 1-induced group was significantly stronger than that in the blank control group and the different concentrations EGCG groups 1: blank control group; 2: TGF- β 1-induced group; 3: $10 \mu\text{mol/L}$ EGCG intervention group; 4: $50 \mu\text{mol/L}$ EGCG intervention group; PI3K: phosphoinositide-3-kinase; Akt: protein kinase B

表 4 各组细胞中 Smad2/3、p-Smad2/3、PI3K、Akt、p-Akt 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of protein relative expression levels of Smad2/3, p-Smad2/3, PI3K, Akt, p-Akt in HTFs among four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	Smad2/3	p-Smad2/3	PI3K	Akt	p-Akt
空白对照组	6	1.03 ± 0.14	0.15 ± 0.14	0.37 ± 0.76	0.81 ± 0.08	0.25 ± 0.12
TGF- β 1 诱导组	6	0.96 ± 0.17	1.20 ± 0.20 ^a	1.10 ± 0.09 ^a	0.88 ± 0.09	0.90 ± 0.09 ^a
10 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组	6	1.02 ± 0.11	0.73 ± 0.18 ^{ab}	0.37 ± 0.13 ^b	0.91 ± 0.09	0.22 ± 0.13 ^b
50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组	6	0.97 ± 0.11	0.18 ± 0.12 ^b	0.15 ± 0.05 ^{ab}	0.85 ± 0.10	0.12 ± 0.08 ^{ab}
F 值		0.452	58.820	121.153	1.293	69.289
P 值		0.719	<0.001	<0.001	0.304	<0.001

注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 TGF- β 1 诱导组比较, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) PI3K: 磷脂酰肌醇-3-激酶; TGF: 转化生长因子; EGCG: 表没食子儿茶素没食子酸酯; Akt: 蛋白激酶 B

Note: Compared with blank control group, ^a $P < 0.05$; compared with TGF- β 1-induced group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) PI3K: phosphoinositide-3-kinase; TGF: transforming growth factor; EGCG: epigallocatechin gallate; Akt: protein kinase B

3 讨论

青光眼是一类以特征性视神经损害和视野渐进性、不可逆性改变为主的眼部疾病, 降低眼压是目前其唯一证实有效的治疗方法。小梁切除术可以有效降低眼压, 减少抗青光眼药物的使用, 延缓视神经损害的发展; 但术后滤过泡瘢痕化严重影响了手术效果^[16]。因此寻找有效的抗青光眼滤过泡瘢痕化方法是临床需要

解决的问题。

茶多酚 EGCG 相对分子质量为 458.372, 是绿茶中含量丰富的化合物, 其被证实具有抗氧化、抗衰老、抗炎症、降血压、降血糖等多种作用^[17]。EGCG 能够通过多种机制抑制细胞增生、迁移、转化和细胞外基质沉积以发挥抗纤维化作用^[12]。此外, 已有研究证实, EGCG 能够通过抑制一氧化氮合酶或胶原纤维酸性蛋白的表达, 提高视网膜神经节细胞的生存率以及对上

位神经元的保护作用^[18-19]。本研究发现 10~50 μmol/L EGCG 对 HTFs 的存活率无明显影响。

TGF-β1 是介导成纤维细胞活化的主要因子,也是导致滤过泡瘢痕化的关键因子^[20]。TGF-β1 作用于细胞膜受体 TGFβR,启动细胞核内目的基因转录,促使 α-SMA 表达增加。α-SMA 是成纤维细胞活化为肌成纤维细胞的标志蛋白。本研究发现,50 μmol/L EGCG 能够有效减少 TGF-β1 诱导 HTFs 内 α-SMA 的表达,表明 EGCG 具有抑制 TGF-β1 诱导 HTFs 转化的作用。

TGF-β1 激活 Smad 信号通路发挥促纤维化作用是研究最早、最广泛的经典机制,也被视为 HTFs 活化的主要原因^[6,20]。TGF-β1 激活 TGFβR 后,促使下游蛋白 Smad2/3 磷酸化,p-Smad2/3 与运载蛋白 Smad4 结合后,进入细胞核内与 SBE 启动子结合,激发 α-SMA、Col-I、纤连蛋白以及结缔组织生长因子等相关因子的转录和翻译,因此,抑制 Smad2/3 磷酸化可以有效抑制 TGF-β1 诱导的纤维化发生。本研究结果显示,EGCG 能够抑制 TGF-β1 诱导的 HTFs 中 Smad2/3 的磷酸化,并呈浓度依赖性。

近年来,TGF-β1 介导的非 Smad 信号通路也逐渐引起重视,目前被众多研究者认可的包括 MAPK、PI3K 和 Rho/Rock 信号途径等。Tian 等^[21]发现,TGF-β1 抑制剂 SB431542 (10 μmol/L)能够有效抑制氧化镍纳米粒子诱导的人肺腺癌上皮细胞(A549 细胞)胶原过度形成,p38 MAPK 信号通路的激活,显著抑制肺纤维化;Yin 等^[22]发现中医药方中补阳还五汤(BYHWT)通过特异性地抑制 PI3K/Akt 信号通路,减少 TGF-β1 诱导的 A549 细胞上皮间质化,从而抑制纤维化的发生。Chung 等^[8]发现,TGF-β 与蛋白酶抑制剂 Bortezomib 可以通过 PI3K/Akt 信号通路发挥协同诱导 HTFs 凋亡的作用。本研究结果显示,EGCG 能有效减少 HTFs 中 PI3K 合成和 Akt 磷酸化,并呈浓度依赖性,证明 EGCG 能够通过抑制非 Smad 信号通路-PI3K/Akt 来抑制 TGF-β1 介导的 HTFs 活化。

本研究利用体外 HTFs 活化模型证实,安全浓度范围内 EGCG 能够通过 Smad 依赖和非 Smad 依赖途径减少 α-SMA 的合成,抑制 TGF-β1 介导的 HTFs 活化,为治疗青光眼术后滤过泡瘢痕化的药物选择提供一种新的思路。但是,目前尚未有相应的动物实验结果,未来仍需要通过体内实验进一步探索绿茶提取物 EGCG 在抗青光眼术后瘢痕化中应用的可行性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

志谢 感谢汕头大学医学院硕士研究生张雨林、赖春心,以及华南理工大学医学院硕士研究生何倍婷对本项目实验开展过程中提供的协助

作者贡献声明 陈艳蕾:参与研究设计、实施研究、数据分析,论文撰写及修改;林宏亮:参与研究设计、实施研究、数据分析、论文修改;王盛:参与部分实验和数据分析;覃泳杰:参与选题和研究设计、实施研究、数据分析;张洪洋:参与选题和研究设计、论文智力性内容修改和定稿

参考文献

- [1] Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 [J]. Br J Ophthalmol, 2006, 90 (3): 262-267. DOI:10.1136/bjo.2005.081224.
- [2] Lim R. The surgical management of glaucoma; a review [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2022, 50(2): 213-231. DOI:10.1111/ceo.14028.
- [3] Kalarn S, Le T, Rhee DJ. The role of trabeculectomy in the era of minimally invasive glaucoma surgery [J]. Curr Opin Ophthalmol, 2022, 33(2): 112-118. DOI:10.1097/ICU.0000000000000811.
- [4] Cabourne E, Clarke JC, Schlottmann PG, et al. Mitomycin C versus 5-fluorouracil for wound healing in glaucoma surgery [J/OL]. Cochrane Database Syst Rev, 2015, (11): CD006259 [2022-03-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26545176>. DOI:10.1002/14651858.CD006259.pub2.
- [5] Stahnke T, Gajda-Derylo B, Jünemann AG, et al. Suppression of the TGF-β pathway by a macrolide antibiotic decreases fibrotic responses by ocular fibroblasts *in vitro* [J/OL]. R Soc Open Sci, 2020, 7(9): 200441 [2022-03-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33047019>. DOI:10.1098/rsos.200441.
- [6] Lee SY, Chae MK, Yoon JS, et al. The effect of CHIR 99021, a glycogen synthase kinase-3β inhibitor, on transforming growth factor β-induced tenon fibrosis [J/OL]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2021, 62(15): 25 [2022-03-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34940783>. DOI:10.1167/iovs.62.15.25.
- [7] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling [J]. Nature, 2003, 425(6958): 577-584. DOI:10.1038/nature02006.
- [8] Chung EJ, Sohn YH, Kwon SH, et al. Lithium chloride inhibits TGF-β1-induced myofibroblast transdifferentiation via PI3K/Akt pathway in cultured fibroblasts from Tenon's capsule of the human eye [J]. Biotechnol Lett, 2014, 36(6): 1217-1224. DOI:10.1007/s10529-014-1487-4
- [9] Chen C, Liu Q, Liu L, et al. Potential biological effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on the treatment of nonalcoholic fatty liver disease [J/OL]. Mol Nutr Food Res, 2018, 62(1): 1700483 [2022-03-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28799714>. DOI:10.1002/mnfr.201700483.
- [10] Tsai MJ, Chang WA, Liao SH, et al. The effects of epigallocatechin gallate (EGCG) on pulmonary fibroblasts of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)-a next-generation sequencing and bioinformatic approach [J/OL]. Int J Mol Sci, 2019, 20(8): 1958 [2022-03-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31013581>. DOI:10.3390/ijms20081958.
- [11] Kanlaya R, Thongboonkerd V. Protective effects of epigallocatechin-3-gallate from green tea in various kidney diseases [J]. Adv Nutr, 2019, 10(1): 112-121. DOI:10.1093/advances/nmy077.
- [12] Matsuzaki S, Darcha C. Antifibrotic properties of epigallocatechin-3-gallate in endometriosis [J]. Hum Reprod, 2014, 29(8): 1677-1687. DOI:10.1093/humrep/deu123.
- [13] 黄文勇, 曾骏文, 刘奕志. 儿茶素通过 ERK 抑制兔晶状体上皮细胞增殖 [J]. 中华实验眼科杂志, 2005, 23(5): 501-503. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2005.05.016.
- [14] Huang WY, Zeng JW, Liu YZ. Decreased proliferation of rabbit lens epithelial cells induced by EGCG depending on the inhibition of MEK activation [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2005, 23(5): 501-503. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2005.05.016.
- [14] 邱梅园, 丁芝祥, 靳荷, 等. EGCG 诱导人视网膜色素上皮细胞凋亡作用的研究 [J]. 国际眼科杂志, 2022, 22(8): 1257-1261. DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2022.8.04.
- Qiu MY, Ding ZX, Jin H, et al. Study on the apoptosis of human retinal

- pigment epithelium cells induced by EGCG [J]. *Int Eye Sci*, 2022, 22(8): 1257-1261. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.8.04.
- [15] 张妍淞, 李文娟, 宁佳鸣, 等. EGCG 表没食子儿茶素没食子酸酯对阿霉素所致小鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. *中国食品学报*, 2017, 17(10): 16-22. DOI: 10.16429/j.1009-7848.2017.10.003.
- Zhang YS, Li WJ, Ning JM, et al. The effect of EGCG on myocardial cell apoptosis in mice induced by DOX [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2017, 17(10): 16-22. DOI: 10.16429/j.1009-7848.2017.10.003.
- [16] Seibold LK, Sherwood MB, Kahook MY. Wound modulation after filtration surgery [J]. *Surv Ophthalmol*, 2012, 57(6): 530-550. DOI: 10.1016/j.survophthal.2012.01.008.
- [17] Ng KW, Cao ZJ, Chen HB, et al. Oolong tea: a critical review of processing methods, chemical composition, health effects, and risk [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58(17): 2957-2980. DOI: 10.1080/10408398.2017.1347556.
- [18] 姜利斌, 谢君, 张婷, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对大鼠视神经钳夹伤后胶质纤维酸性蛋白表达的影响 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2011, 29(1): 49-52. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.01.013.
- Jiang LB, Xie J, Zhang T, et al. Effects of epigallocatechin-3-gallate on expression of glial fibrillary acidic protein in optic nerve crush model [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2011, 29(1): 49-52. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.01.013.
- [19] 张婷, 姜利斌, 谢君, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对大鼠视神经钳夹伤后外侧膝状体神经元保护作用的研究 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2011, 29(6): 505-510. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.06.006.
- Zhang T, Jiang LB, Xie J, et al. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate on lateral geniculate nucleus after optic nerve crush in rats [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2011, 29(6): 505-510. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.06.006.
- [20] Wen J, Lin X, Gao W, et al. Inhibition of LPA1 signaling impedes conversion of human tenon's fibroblasts into myofibroblasts via suppressing TGF- β /Smad2/3 signaling [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2019, 35(6): 331-340. DOI: 10.1089/jop.2018.0120.
- [21] Tian M, Chang X, Zhang Q, et al. TGF- β 1 mediated MAPK signaling pathway promotes collagen formation induced by Nano NiO in A549 cells [J]. *Environ Toxicol*, 2019, 34(6): 719-727. DOI: 10.1002/tox.22738.
- [22] Yin ZF, Wei YL, Wang X, et al. Buyang Huanwu Tang inhibits cellular epithelial-to-mesenchymal transition by inhibiting TGF- β 1 activation of PI3K/Akt signaling pathway in pulmonary fibrosis model *in vitro* [J/OL]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 13 [2022-04-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32020862>. DOI: 10.1186/s12906-019-2807-y.

(收稿日期: 2022-06-02 修回日期: 2022-09-30)

(本文编辑: 张宇 骆世平)

消息

《眼科手术相关性角结膜病变》出版发行

由吉林大学第一医院贾卉教授和北京同仁眼科中心北京市眼科研究所孙旭光教授主编的眼表及角膜疾病临床诊治系列丛书之《眼科手术相关性角结膜病变》(ISBN 978-7-117-33120-3)由人民卫生出版社正式出版。

眼科手术后的角膜结膜并发症越来越受到临床关注,其病因与病情均有异于眼科一般常见病症,所以更要求临床医生具备对其及时诊断、合理处置等诸多方面的能力。作者根据多年的临床经验总结、大量的临床病例分析,参考国内外相关文献完成此书。本书分为七章,包括翼状胬肉手术、白内障手术、青光眼手术、玻璃体视网膜手术、角膜移植手术、美容整形手术,以及眼科其他手术相关的角结膜并发症,对相关并发症的临床表现、发生的可能原因、处置方法以及预防措施等,结合临床典型病例解析和四百余幅彩色图片进行系统介绍,力图为各级医师和医护人员提供实用性参考。

本书定价 108 元,人民卫生出版社网(<http://www.pmph.com>)、人卫智网(www.ipmph.com)、当当网、京东商城、卓越亚马逊网均有销售,或联系人民卫生出版社销售部(联系电话:010-59787226、010-59787074)咨询购买。

(孙旭光)



读者·作者·编者

本刊对一稿两投的处理

作者投稿请勿一稿两投或一稿多投。本刊编辑部发现一稿两投并经证实后,稿件将不予审理并对作者进行告知。如果发现一稿两用,本刊将做出如下处理:(1)在本刊杂志及网站上刊登撤销该论文及该文系重复发表的声明,并在中华医学会系列杂志上通报。(2)向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。(3)2年内拒绝发表其作为第一作者或通信作者的任何来稿。

文章未在公开发表物上发表者、以不同文字分别投往国外期刊和国内期刊以供不同受众者阅读者不属于一稿两投的行为,但本刊严格遵照国际医学期刊编辑委员会《国际生物医学期刊投稿统一要求》(http://www.icmje.org/urm_main.html),属于以不同语言文字二次发表者,请作者在首次接受稿件的期刊发表后1周再另行投稿,并请提供首次发表期刊同意以不同语言发表的同意函。

(本刊编辑部)