

## · 实验研究 ·

# 根皮素对白细胞介素-1 $\beta$ 诱导 Graves 眼病眼眶成纤维细胞中炎症反应和氧化应激的抑制作用及其机制

靳玮<sup>1</sup> 张黎<sup>1</sup> 李谦<sup>1</sup> 倪瑶<sup>2</sup> 柴昌<sup>1</sup>

<sup>1</sup>河南省人民医院眼科 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所 郑州大学人民医院, 郑州 450003; <sup>2</sup>中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室 广东省眼科视觉科学重点实验室 广东省眼部疾病临床研究中心, 广州 510060

通信作者: 柴昌, Email: chaichang20202021@163.com

**【摘要】** 目的 观察根皮素对白细胞介素(IL)-1 $\beta$  诱导的 Graves 眼病(GO)患者眼眶成纤维细胞(OFs)中炎症反应和氧化应激的抑制作用及其机制。方法 收集 2019 年 1 月至 2020 年 12 月于河南省立眼科医院确诊为非活动期 GO 并行眼眶减压术的患者 6 例 6 眼的眼眶脂肪及结缔组织。采用组织块培养法分离原代 OFs 并传代, 细胞免疫荧光法鉴定 OFs。将细胞分为对照组、IL-1 $\beta$  诱导组以及不同浓度根皮素处理组。采用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)法检测 25、50、75、100 和 200  $\mu\text{mol/L}$  根皮素处理 24 和 48 h 后 OFs 的活性。采用 IL-1 $\beta$  诱导 OFs 模拟 GO 体外炎症环境。采用荧光探针 H<sub>2</sub>DCF-DA 法检测正常对照组、IL-1 $\beta$  诱导组、50  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组和 100  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组细胞内活性氧簇(ROS)水平。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测正常对照组、IL-1 $\beta$  诱导组以及 25、50、75、100  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组细胞培养上清液中促炎细胞因子 IL-6、IL-8 和 MCP-1 质量浓度。采用 Western blot 法检测正常对照组、IL-1 $\beta$  诱导组及 100  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组细胞内血红素加氧酶 1(HO-1)、核因子 NF-E2 相关因子 Nrf2 和 MAPK 信号通路蛋白 P38、细胞外调节蛋白激酶(ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)及其磷酸化蛋白表达。结果 原代分离培养的 OFs 表达 vimentin, 证明为间充质来源, desmin、S-100、cytokeratin-18 表达阴性, 鉴定为成纤维细胞。CCK-8 结果显示, 25、50、75 和 100  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组细胞处理后 24 和 48 h 吸光度(A)值与对照组比较, 差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。50  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组和 100  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组细胞内 ROS 水平分别为  $21.95 \pm 1.71$  和  $10.01 \pm 1.03$ , 明显低于 IL-1 $\beta$  诱导组的  $39.27 \pm 4.01$ , 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。ELISA 结果显示, 25  $\mu\text{mol/L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$ 、75  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组细胞培养上清液中 IL-6 质量浓度分别为  $(4\ 544.25 \pm 572.98)$ 、 $(1\ 000.25 \pm 133.96)$ 、 $(724.25 \pm 98.63)$  和  $(519.50 \pm 118.02)$  pg/ml, 均显著低于 IL-1 $\beta$  诱导组的  $(7\ 581.75 \pm 565.93)$  pg/ml, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ); 50  $\mu\text{mol/L}$ 、75  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组细胞培养上清液中 IL-8 质量浓度分别为  $(3\ 679.50 \pm 676.76)$ 、 $(2\ 143.75 \pm 616.20)$  和  $(1\ 174.75 \pm 284.18)$  pg/ml, 显著低于 IL-1 $\beta$  诱导组的  $(8\ 411.00 \pm 939.67)$  pg/ml, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ); 50  $\mu\text{mol/L}$ 、75  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组细胞培养上清液中 MCP-1 质量浓度分别为  $(3\ 783.25 \pm 610.24)$ 、 $(1\ 565.75 \pm 457.89)$  和  $(745.75 \pm 227.01)$  pg/ml, 显著低于 IL-1 $\beta$  诱导组的  $(5\ 533.00 \pm 602.87)$  pg/ml, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。100  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组 HO-1、Nrf2 蛋白相对表达量明显高于 IL-1 $\beta$  诱导组, p-P38、p-ERK、p-JNK 蛋白相对表达量明显低于 IL-1 $\beta$  诱导组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。结论 根皮素可降低 IL-1 $\beta$  诱导的 GO 患者 OFs 细胞内氧化应激水平, 抑制促炎细胞因子产生, 其作用机制与 Nrf2/HO-1 的激活及 MAPK 信号通路的抑制相关。

**【关键词】** 根皮素; Graves 眼病; 眼眶成纤维细胞; 氧化应激; 炎症

基金项目: 河南省自然科学基金项目(202300410406)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220606-00266

## Inhibitory effect of phloretin on inflammation and oxidative stress in IL-1 $\beta$ induced orbital fibroblasts in Graves orbitopathy and its mechanism

Jin Wei<sup>1</sup>, Zhang Li<sup>1</sup>, Li Qian<sup>1</sup>, Ni Yao<sup>2</sup>, Chai Chang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, Henan Eye Hospital, Henan Eye Institute, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan

Ophthalmic Center, Sun Yat-Sen University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Guangdong Provincial Clinical Research Center for Ocular Diseases, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: Chai Chang, Email: chaichang20202021@163.com

**[Abstract] Objective** To investigate the inhibitory effect of phloretin on inflammation and oxidative stress in interleukin (IL)-1 $\beta$  induced orbital fibroblasts (OFs) from Graves orbitopathy (GO) patients and its mechanism. **Methods** The orbital fat and connective tissue from 6 eyes of 6 patients diagnosed as inactive GO who underwent orbital decompression in Henan Eye Hospital from January 2019 to December 2020 were collected. Primary OFs were isolated and passaged by explant culture and were identified by cell immunofluorescence assay. OFs were divided into control group, IL-1 $\beta$  induced group, and groups of various phloretin concentrations (25, 50, 75, 100 and 200  $\mu\text{mol/L}$ ). The viability of OFs after 24- and 48-hour treatment of the various phloretin concentrations was determined by cell counting kit-8 (CCK-8). OFs were induced by IL-1 $\beta$  to simulate an inflammatory environment of GO *in vitro*. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels of the normal control group, IL-1 $\beta$  induced group, 50  $\mu\text{mol/L}$  phloretin group and 100  $\mu\text{mol/L}$  phloretin group were detected by fluorescent probe ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ). The concentrations of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in cell culture supernatant of the normal control group, IL-1 $\beta$  induced group and phloretin treated groups (25, 50, 75, and 100  $\mu\text{mol/L}$ ) were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expressions of heme oxygenase-1 (HO-1), nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) proteins, as well as P38, extracellular regulated protein kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) proteins as well as their phosphorylated proteins in the MAPK signal pathway of the normal control group, IL-1 $\beta$  induced group and 100  $\mu\text{mol/L}$  phloretin group, were detected by Western blot. The purpose and methods of the study were explained to the patients and their family members. Written informed consent was obtained. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Henan Provincial People's Hospital (No. HNEECKY-2020[07]). **Results** For cultured OFs, the mesenchymal origin was confirmed by positive expression of vimentin and fibroblasts were identified by negative expression of desmin, S-100 and cytokeratin-18. CCK-8 showed that there was no significant difference in absorbance value after 24- and 48-hour treatment between 25  $\mu\text{mol/L}$ , 50  $\mu\text{mol/L}$ , 75  $\mu\text{mol/L}$  and 100  $\mu\text{mol/L}$  phloretin groups and control group (all at  $P>0.05$ ). The ROS levels of 50  $\mu\text{mol/L}$  and 100  $\mu\text{mol/L}$  phloretin groups were  $21.95\pm 1.71$  and  $10.01\pm 1.03$ , respectively, which were significantly lower than  $39.27\pm 4.01$  of IL-1 $\beta$  induced group (both at  $P<0.01$ ). ELISA showed that IL-6 concentrations in 25  $\mu\text{mol/L}$ , 50  $\mu\text{mol/L}$ , 75  $\mu\text{mol/L}$  and 100  $\mu\text{mol/L}$  phloretin groups were ( $4\ 544.25\pm 572.98$ ), ( $1\ 000.25\pm 133.96$ ), ( $724.25\pm 98.63$ ), ( $519.50\pm 118.02$ ) pg/ml, respectively, which were all significantly lower than ( $7\ 581.75\pm 565.93$ ) pg/ml in IL-1 $\beta$  induced group (all at  $P<0.01$ ). IL-8 concentrations in 50  $\mu\text{mol/L}$ , 75  $\mu\text{mol/L}$  and 100  $\mu\text{mol/L}$  phloretin groups were ( $3\ 679.50\pm 676.76$ ), ( $2\ 143.75\pm 616.20$ ), ( $1\ 174.75\pm 284.18$ ) pg/ml, respectively, which were all significantly lower than ( $8\ 411.00\pm 939.67$ ) pg/ml in IL-1 $\beta$  induced group (all at  $P<0.01$ ). The concentrations of MCP-1 in 50  $\mu\text{mol/L}$ , 75  $\mu\text{mol/L}$  and 100  $\mu\text{mol/L}$  phloretin groups were ( $3\ 783.25\pm 610.24$ ), ( $1\ 565.75\pm 457.89$ ), ( $745.75\pm 227.01$ ) pg/ml, respectively, which were all significantly lower than ( $5\ 533.00\pm 602.87$ ) pg/ml in IL-1 $\beta$  induced group (all at  $P<0.01$ ). The relative expression levels of HO-1 and Nrf2 were significantly higher and the relative expression levels of p-P38, p-ERK, and p-JNK were significantly lower in 100  $\mu\text{mol/L}$  phloretin group than IL-1 $\beta$  induced group (all at  $P<0.01$ ). **Conclusions** Phloretin reduces the oxidative stress level of IL-1 $\beta$  induced OFs from GO patients and inhibits the production of pro-inflammatory cytokines. The mechanism is related to the activation of Nrf2/HO-1 and the inhibition of the MAPK signal pathway.

**[Key words]** Phloretin; Graves orbitopathy; Fibroblasts, orbital; Oxidative stress; Inflammation

**Fund program:** Natural Science Foundation of Henan Province (202300410406)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220606-00266

Graves 眼病 (Graves orbitopathy, GO) 是 Graves 病常见的甲状腺外表现, 球后组织水肿导致的眼球突出、压迫性视神经病变及眼外肌受累导致的眼球运动障碍等是其主要的临床表现<sup>[1]</sup>。GO 的发病机制尚未明确, 目前认为, 眼眶成纤维细胞 (orbital fibroblasts, OFs) 的

激活及其诱导的炎症反应是 GO 发病的关键<sup>[2-3]</sup>。既往研究发现, GO 患者体内高水平的白细胞介素 (interleukin, IL)-1 $\beta$  可刺激 OFs 分泌多种细胞因子, 包括 IL-6、IL-8 和单核细胞趋化因子 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 等, 参与眶内炎症细

细胞的募集、增生和炎症反应的激活<sup>[4-5]</sup>。此外,GO 患者眶周组织及全身处于高氧化应激状态<sup>[6-7]</sup>。OFs 内活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)水平升高可诱导自身活化并释放多种细胞因子,进一步加重眼眶的炎症反应<sup>[8-9]</sup>。Graves 病患者体内较高水平甲状腺素可加剧氧化应激过程<sup>[10]</sup>。因此,抑制 OFs 的氧化应激及炎症水平是阻止 GO 发生和发展的重要方向。目前尚缺乏针对 GO 的特异性治疗药物,糖皮质激素仍是一线治疗药物,但其存在较多不良反应且部分患者对其不敏感,因此,探索新的 GO 治疗药物十分必要。根皮素是一种天然的查尔酮类化合物,既往研究提示根皮素可抑制脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 RAW264.7 巨噬细胞的炎症反应,显著抑制炎症因子 IL-6 和 IL-8 的生成<sup>[11]</sup>。此外,根皮素可通过 Nrf/血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)-1 通路改善棕榈酸诱导的内皮细胞氧化应激反应<sup>[12]</sup>,并在糖尿病、动脉粥样硬化等疾病模型中证实有抗氧化、抗炎作用<sup>[13-14]</sup>,因此推测根皮素对 GO 患者体外培养的 OFs 具有潜在的抗氧化应激及抗炎作用。本研究拟探讨根皮素对 IL-1 $\beta$  诱导的 OFs 氧化应激和炎症反应的抑制作用及其相关分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 眼眶组织标本来源** 收集 2019 年 1 月至 2020 年 12 月于河南省立眼科医院确诊为非活动期 GO 并行眼眶减压术的患者 6 例 6 眼的眼眶脂肪及结缔组织。其中男 4 例,女 2 例;年龄 33~56 岁;手术时患者甲状腺功能均恢复正常,停止服药半年及以上。根据欧洲 Graves 眼病专家组于 2016 年提出的 NOSPECS 为标准<sup>[15]</sup>,采用临床活动性评分(clinical activity score, CAS)对疾病活动性进行评估,CAS 达到 3 分及以上为活动期,未满 3 分为非活动期。患者及家属均知晓研究目的和方法并签署知情同意书,研究方案经河南省人民医院伦理委员会审核批准[批文号:HNEECKY-2020(07)]。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 胎牛血清、DMEM 培养基、质量分数 0.25% 胰蛋白酶、磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS)、青-链霉素溶液(美国 Gibco 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(23227)、ECL 试剂盒(A38555)(美国 Thermo Fisher 公司);兔抗人磷酸化(p-)P38(4631)和 P38(8690)、兔抗人细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)(4370)和 p-ERK(4695)、小鼠抗人 c-Jun 氨基末端激

酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)(9252)和 p-JNK 抗体(9255)、兔抗人 HO-1 抗体(43966)、兔抗人核因子 NF-E2 相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor, Nrf2)抗体(12721)、小鼠抗人 S-100 抗体(5529)(美国 CST 公司);兔抗人 vimentin 抗体(ab92547)、兔抗人 desimin(ab15200)、兔抗人 cytokeratin-18(ab133263)(美国 Abcam 公司);兔抗人 GAPDH 抗体、山羊抗小鼠和山羊抗兔二抗、山羊抗兔 FITC 标记的荧光二抗、DAPI(上海碧云天生物技术有限公司);细胞计数试剂盒 8(cell counting kit-8, CCK-8)(日本 Donjindo 公司);根皮素(P7912)、H<sub>2</sub>DCF-DAROS 检测荧光探针(35845)(美国 Sigma 公司);重组人 IL-1 $\beta$ (201-LB-005)及 IL-6(D6050)、IL-8(D8000C)、MCP-1(DCP00)、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(美国 R&D System 公司)。荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);多功能酶标仪、SDS-PAGE 蛋白电泳仪(美国 BIO-RAD 公司);Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 OFs 的原代培养和传代** 术中无菌条件下取眼眶脂肪结缔组织转移至含有体积分数 20% 胎牛血清和体积分数 1% 青-链霉素双抗的 DMEM 培养基中,于手术显微镜下剔除脂肪组织和血管,保留结缔组织。用眼科剪将结缔组织剪成 1 mm<sup>3</sup> 的小块,均匀铺在培养瓶底,将培养瓶翻转,瓶底朝上,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养 4~6 h 后组织块贴壁;向培养瓶中加入 2 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,将培养瓶翻转放平,置于恒温培养箱。3~5 d 可见纺锤样细胞从组织块底部向四周爬出,移除组织块,继续培养约 2 周后细胞长满培养皿,根据细胞生长情况,每 3~5 d 传代 1 次。将 6 例 GO 患者原代培养的 OFs 制成混合细胞悬液,取第 3~4 代细胞用于后续实验。

**1.2.2 免疫荧光法鉴定 OFs** 质量分数 4% 多聚甲醛固定 OFs 15 min, PBS 浸洗 3 次,0.5% Triton-X-100 室温破膜 20 min。质量分数 5% 牛血清白蛋白于 37 °C 封闭 30 min。加入 1:1 000 稀释后的 vimentin、desimin、cytokeratin-18 和 S-100 一抗 4 °C 孵育过夜, PBS 浸洗后加 1:1 000 稀释后的 FITC 标记的荧光二抗,37 °C 孵育 30 min, PBS 浸洗, DAPI 避光孵育 2 min,于荧光显微镜下观察染色情况。

**1.2.3 CCK-8 法检测不同浓度根皮素处理后细胞活性** 将根皮素溶于二甲基亚砜制成 20 mg/ml 储备液,





分装后于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光保存,用 DMEM 培养基稀释至所需浓度。OFs 生长至 80% 融合时,胰蛋白酶消化,收集细胞,制成  $5\times 10^4$  个/ml 密度细胞悬液,接种于 96 孔板中培养。将细胞分为对照组和 25、50、75、100 和 200  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组。分别培养 24 h 和 48 h 加入 10  $\mu\text{l}$  CCK-8 溶液后置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱内孵育 1 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值。

**1.2.4 流式细胞术测定细胞中 ROS 水平** 收集对数生长期 OFs,按照  $2\times 10^5$  个/孔接种至 6 孔板,将细胞分为对照组、IL-1 $\beta$  诱导组、50  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组和 100  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组;其中 IL-1 $\beta$  诱导组培养液中加入 10 ng/ml IL-1 $\beta$ ,50  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组和 100  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组同时加入 10 ng/ml IL-1 $\beta$  和相应浓度根皮素,各组细胞处理 6 h 后 PBS 洗涤细胞 3 次,加入终浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  荧光探针,于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中静置 30 min,轻轻摇晃培养基,使荧光探针和细胞充分作用,使用荧光显微镜采集图片,在 200 倍视野下随机选取 5 个视野,ImageJ 软件行荧光定量分析。收集各组细胞,使用流式细胞仪采集数据,激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm,采用 FlowJo 软件行流式细胞学分析。

**1.2.5 ELISA 法检测细胞培养上清液中 IL-6、IL-8、MCP-1 质量浓度** 参照 1.2.4 部分将细胞分为对照组、IL-1 $\beta$  诱导组以及 25  $\mu\text{mol/L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$ 、75  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组;处理后 24 h 取各组细胞培养上清液,1:10 稀释,按照 IL-6、IL-8、MCP-1 ELISA 试剂盒说明书进行检测,用酶标仪测定 450 nm 处 A 值。

**1.2.6 Western blot 法检测 Nrf2、HO-1 和 MAPK 通路蛋白 P38、ERK、JNK 及其磷酸化蛋白表达** 将细胞分为对照组、IL-1 $\beta$  诱导组和 100  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组,处理后 24 h,弃培养基,PBS 清洗后加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,提取各组细胞总蛋白,采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,取 1  $\mu\text{g}$  蛋白样本,加入上样缓冲液,95  $^{\circ}\text{C}$  加热 10 min 使蛋白变性。各组蛋白样品加入 SDS-PAGE 凝胶孔中,浓缩胶 80 V 恒压电泳 20 min,分离胶 120 V 恒压电泳 40 min,将分离的蛋白条带转印至 PVDF 膜上,质量分数 5% 脱脂牛奶封闭后,加入 Nrf2、HO-1、P38、ERK、JNK、p-P38、p-ERK、p-JNK、GAPDH 一抗工作液(均 1:1 000 稀释)4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。TBST 液清洗 3 次后加入相应二抗工作液(1:2 000 稀释)室温避光孵育 1 h,TBST 液清洗后用 ECL 试剂显色,曝光,采用 ImageJ 软件行灰度分析,以 GAPDH 为内参,计算各目的蛋白相对表达量。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计学软件进行统计分析。本研究中计量资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以  $\bar{x}\pm s$  表示。Brown-Forsythe 方差齐性检验证实各组间方差齐,不同组间各指标总体差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 OFs 的鉴定

体外成功培养 GO 患者原代 OFs 并稳定传代,细胞呈梭形、多角形或扁平星形,符合典型 OFs 形态学特征。培养的细胞 vimentin 大量表达,而 desmin、cytokeratin-18、S-100 表达阴性,鉴定为 OFs(图 1)。

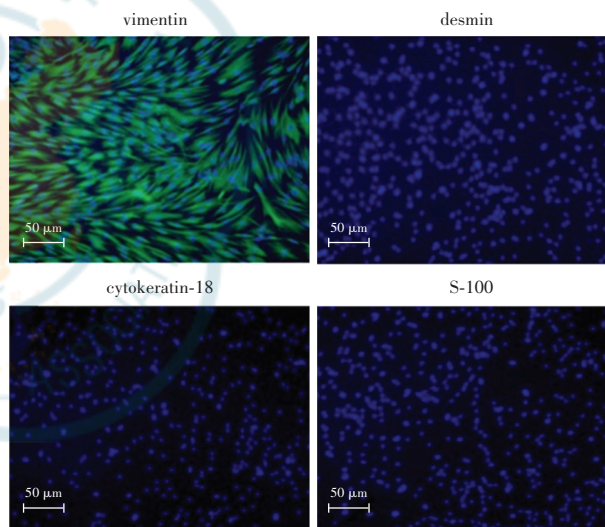


图 1 细胞免疫荧光染色结果(FITC/DAPI  $\times 200$ , 标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ) 细胞中 vimentin (绿色荧光) 大量表达,desmin、cytokeratin-18、S-100 表达呈阴性,细胞核呈蓝色荧光

**Figure 1 Immunofluorescence staining results** (FITC/DAPI  $\times 200$ , bar = 50  $\mu\text{m}$ ) Vimentin (green fluorescence) was highly expressed, while the expression of desmin, cytokeratin-18 and S-100 were negative. Nuclei showed blue fluorescence

### 2.2 不同浓度根皮素处理后 OFs 活性比较

各组细胞处理后 24 和 48 h A 值总体比较差异均有统计学意义( $F=25.47$ 、23.46,均  $P<0.01$ )。25、50、75 和 100  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组细胞处理后 24 和 48 h A 值与对照组比较,差异均无统计学意义(均  $P>0.05$ )。200  $\mu\text{mol/L}$  根皮素组处理后 24 和 48 h A 值较对照组均明显下降,差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ )(表 1)。提示 100  $\mu\text{mol/L}$  以下浓度根皮素对 OFs 无明显毒性作用。

**表 1 不同浓度根皮素处理 OFs 活性比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**  
**Table 1 Comparison of cell viability of OFs treated with different concentrations of phloretin ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	样本量	处理 24 h 细胞 A 值	处理 48 h 细胞 A 值
对照组	3	0.93±0.02	1.01±0.03
25 μmol/L 根皮素组	3	0.97±0.04	0.98±0.04
50 μmol/L 根皮素组	3	0.95±0.04	1.04±0.07
75 μmol/L 根皮素组	3	0.94±0.03	0.97±0.01
100 μmol/L 根皮素组	3	0.90±0.05	0.98±0.02
200 μmol/L 根皮素组	3	0.61±0.07 <sup>a</sup>	0.64±0.04 <sup>a</sup>
F 值		25.47	23.46
P 值		<0.01	<0.01

注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) OFs:眼眶成纤维细胞

Note: Compared with respective control group, <sup>a</sup> $P < 0.01$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test) OFs: orbital fibroblasts

**2.3 各组细胞中 ROS 表达水平比较**

荧光显微镜观察结果显示, IL-1β 诱导组 ROS 荧光强度较对照组、50 μmol/L 根皮素组和 100 μmol/L 根皮素组升高(图 2A)。对照组、IL-1β 诱导组、50 μmol/L 根皮素组和 100 μmol/L 根皮素组细胞内 ROS 水平分别为 2.07 ± 0.42、39.27 ± 4.01、21.95 ± 1.71 和 10.01 ± 1.03, 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 51.54, P < 0.01$ )。其中 50 μmol/L 根皮素组和 100 μmol/L 根皮素组细胞内 ROS 水平明显低于 IL-1β 诱导组并高于对照组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ) (图 2B)。流式细胞图显示, 对照组细胞内 ROS 水平最低, IL-1β 诱导组 ROS 水平最高, 50 μmol/L 根皮素组和 100 μmol/L 根皮素组 ROS 水平介于前 2 个组之间(图 2C)。

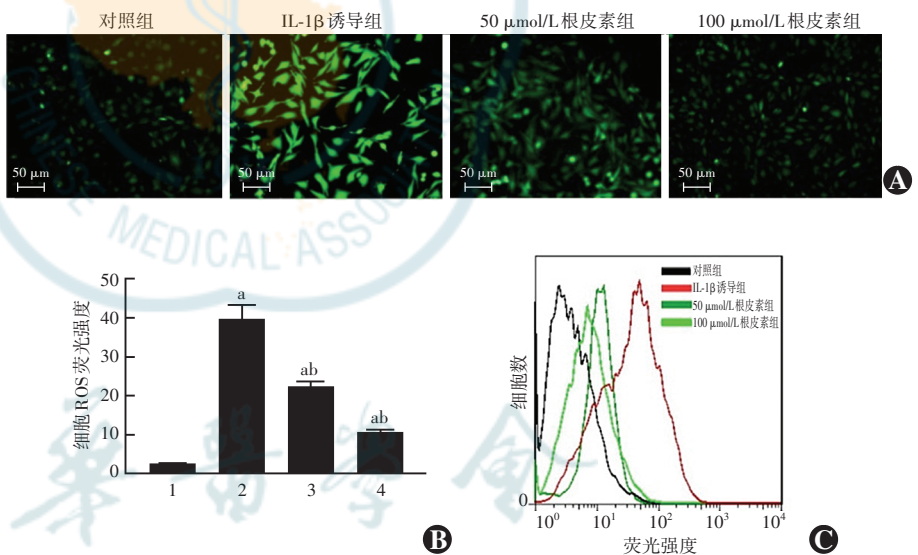
**2.4 各组细胞培养上清液中 IL-6、IL-8 和 MCP-1 浓度比较**

ELISA 检测结果显示, 各组间细胞因子 IL-6、IL-8 和 MCP-1 质量浓度总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 229.40、100.40、68.36$ , 均  $P < 0.01$ )。IL-1β 诱导组细胞培养上清液中 IL-6、IL-8

和 MCP-1 质量浓度明显高于对照组, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ); 25 μmol/L、50 μmol/L、75 μmol/L 和 100 μmol/L 根皮素组 IL-6 质量浓度均显著低于 IL-1β 诱导组, 50 μmol/L、75 μmol/L 和 100 μmol/L 根皮素组细胞培养上清液中 IL-8 和 MCP-1 质量浓度明显低于 IL-1β 诱导组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ) (表 2)。根皮素以剂量依赖性方式抑制 IL-1β 诱导的 OFs 分泌 IL-8、IL-6 和 MCP-1。

**2.5 各组细胞中氧化应激相关蛋白 HO-1、Nrf2 表达水平比较**

Western blot 检测结果显示, 各组间 HO-1、Nrf2 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ( $F = 27.77、11.57$ , 均  $P < 0.01$ )。100 μmol/L 根皮素组 HO-1、Nrf2 蛋白相对表达量分别为 2.21 ± 0.32 和 1.57 ± 0.25, 明显高于 IL-1β 诱导组的 1.17 ± 0.19、1.01 ± 0.13 和对照组的 1.00, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ) (图 3)。



**图 2 各组细胞中 ROS 表达比较** A: 荧光染色观察 ROS 表达 ( $H_2DCF-DA \times 200$ , 标尺 = 50 μm) IL-1β 诱导组荧光强度显著高于对照组, 50 μmol/L 根皮素组、100 μmol/L 根皮素组 B: 各组细胞 ROS 荧光强度量化比较  $F = 51.54, P < 0.01$ 。与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 IL-1β 诱导组相比, <sup>b</sup> $P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 3$ ) 1: 对照组; 2: IL-1β 诱导组; 3: 50 μmol/L 根皮素组; 4: 100 μmol/L 根皮素组 C: 各组细胞 ROS 荧光强度流式细胞分析 ( $H_2DCF-DA$ ) IL-1β 诱导组细胞内荧光强度较对照组显著增强, 50 μmol/L 根皮素组、100 μmol/L 根皮素组荧光强度较 IL-1β 诱导组均明显下降 IL: 白细胞介素; ROS: 活性氧簇

**Figure 2 Comparison of ROS expression among different groups** A: Fluorescence staining of ROS expression ( $H_2DCF-DA \times 200$ , bar = 50 μm) The ROS fluorescence intensity was significantly higher in IL-1β induced group than in control group, 50 μmol/L and 100 μmol/L phloretin groups B: Quantified comparison of ROS expression  $F = 51.54, P < 0.01$ . Compared with control group, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; compared with IL-1β induced group, <sup>b</sup> $P < 0.01$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 3$ ) 1: control group; 2: IL-1β induced group; 3: 50 μmol/L phloretin group; 4: 100 μmol/L phloretin group C: Flow cytometry analysis of ROS expression ( $H_2DCF-DA$ ) The intensity of ROS expression was significantly enhanced in IL-1β induced group in comparison with control group. The intensity of ROS expression was reduced in 50 μmol/L and 100 μmol/L phloretin groups in comparison with IL-1β induced group IL: interleukin; ROS: reactive oxygen species

表 2 各组细胞培养上清液中 IL-6、IL-8 和 MCP-1 质量浓度比较 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/ml)Table 2 Comparisons of mass concentrations of IL-6, IL-8 and MCP-1 in cell supernatants among different groups ( $\bar{x} \pm s$ , pg/ml)

组别	样本量	IL-6	IL-8	MCP-1
对照组	3	317.01 ± 38.07	351.50 ± 75.68	617.75 ± 183.03
IL-1β 诱导组	3	7 581.75 ± 565.93 <sup>a</sup>	8 411.00 ± 939.67 <sup>a</sup>	5 533.00 ± 602.87 <sup>a</sup>
25 μmol/L 根皮素组	3	4 544.25 ± 572.98 <sup>ab</sup>	7 606.00 ± 495.56 <sup>a</sup>	5 523.75 ± 519.15 <sup>a</sup>
50 μmol/L 根皮素组	3	1 000.25 ± 133.96 <sup>ab</sup>	3 679.5 ± 676.76 <sup>ab</sup>	3 783.25 ± 610.24 <sup>ab</sup>
75 μmol/L 根皮素组	3	724.25 ± 98.63 <sup>ab</sup>	2 143.75 ± 616.24 <sup>ab</sup>	1 565.75 ± 457.89 <sup>ab</sup>
100 μmol/L 根皮素组	3	519.50 ± 118.02 <sup>ab</sup>	1 174.75 ± 284.18 <sup>ab</sup>	745.75 ± 227.01 <sup>b</sup>
F 值		229.40	100.40	68.36
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 IL-1β 诱导组相比,<sup>b</sup> $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) IL:白细胞介素;MCP-1:单核细胞趋化蛋白 1  
 Note:Compared with respective control group,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ; compared with respective IL-1β induced group,<sup>b</sup> $P < 0.01$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) IL: interleukin; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1

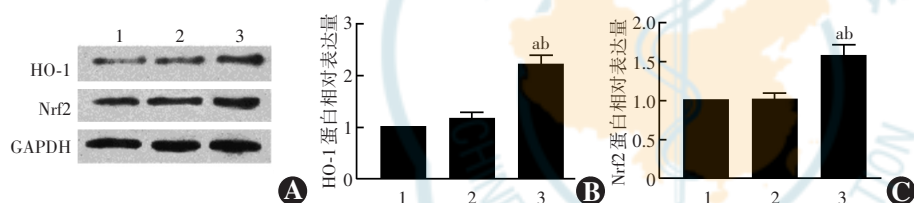


图 3 各组氧化应激相关 HO-1、Nrf2 蛋白相对表达量比较 A: 各组蛋白表达电泳图 100 μmol/L 根皮素组各蛋白条带灰度强于其他 2 个组 B: 各组 HO-1 蛋白相对表达量比较  $F = 27.77, P < 0.01$ 。C: 各组 Nrf2 蛋白相对表达量比较  $F = 11.57, P < 0.01$ 。与对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 IL-1β 诱导组相比,<sup>b</sup> $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 3$ ) 1: 对照组; 2: IL-1β 诱导组; 3: 100 μmol/L 根皮素组 HO-1: 血红素氧合酶-1; Nrf2: 核因子 NF-E2 相关因子

Figure 3 Comparison of relative expressions of HO-1 and Nrf2 proteins among various groups

A: Electrophoretogram of HO-1 and Nrf2 protein expressions The protein bands were stronger in 100 μmol/L phloretin group than in control group and IL-1β induced group B: Comparison of HO-1 relative expression  $F = 27.77, P < 0.01$ 。C: Comparison of Nrf2 relative expression  $F = 11.57, P < 0.01$ 。Compared with control group,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ; compared with IL-1β induced group,<sup>b</sup> $P < 0.01$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 3$ ) 1: control group; 2: IL-1β induced group; 3: 100 μmol/L phloretin group HO-1: heme oxygenase-1; Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor

## 2.6 各组细胞中 MAPK 通路蛋白 ERK、JNK、p38 及磷酸化蛋白表达水平比较

Western blot 检测结果显示, 各组 p-P38、p-ERK 和 p-JNK 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ( $F = 14.12, 16.74, 18.51$ , 均  $P < 0.01$ ); IL-1β 诱导组 p-ERK、p-JNK 和 p-P38 蛋白相对表达量分别为  $1.22 \pm 0.11$ 、 $1.74 \pm 0.23$  和  $2.07 \pm 0.13$ , 明显高于 100 μmol/L 根皮素组的  $0.75 \pm 0.07$ 、 $1.36 \pm 0.10$ 、 $1.51 \pm 0.21$  以及对照组的 1.00, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ) (图 4)。各组间 P38、ERK、JNK 蛋白相对表达量总体比较, 差异均无统计学意义 ( $F = 0.60, 1.04, 0.37$ , 均  $P > 0.05$ ) (图 4)。

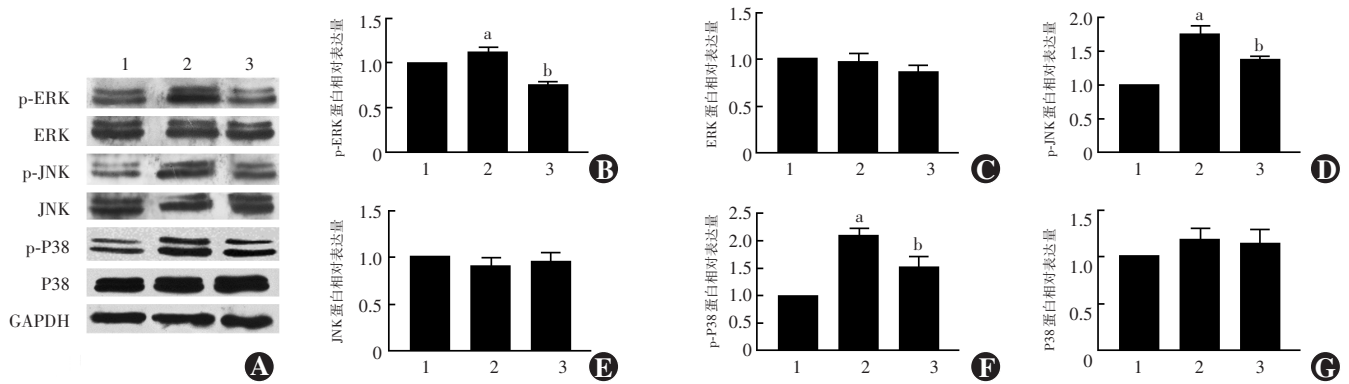
## 3 讨论

炎症和氧化应激反应等多种因素可诱导 OFs 激活并增生分化为脂肪细胞和肌成纤维细胞, 导致眼眶组织扩大、重塑和纤维化<sup>[16]</sup>。早期活动性 GO 的病理特征是眼外肌和结缔组织中出现多种炎症细胞浸润, 主要包括 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、单核细胞、巨噬细胞、B 细胞以及浆细胞, 这些炎症细胞通过分泌炎症介质或通过细胞间的直接相互作用激活 OFs, 活化的 OFs 又产生促炎细胞因子, 二者相互促进, 进一步加重眶内炎症反应<sup>[17]</sup>。与正常人 OFs 相比, GO

患者 OFs 对促炎细胞因子更敏感, IL-1β 可诱导其分泌产生较高水平的促炎细胞因子, 包括 IL-6、IL-8、MCP-1 等, 进而招募和激活多种炎症细胞<sup>[4]</sup>。此外, GO 患者常伴有 OFs 内氧化应激水平升高<sup>[6]</sup>。促炎细胞因子也可诱导 OFs 产生大量 ROS, 进而诱导 OFs 的活化和增生<sup>[18]</sup>。因此, 以 OFs 为靶点, 寻找抗炎、抗氧化应激药物, 具有重要的临床意义。

根皮素主要分布于苹果、梨等多汁水果的果皮及根皮中, 具有抗氧化应激作用及抗炎作用<sup>[19-20]</sup>。既往研究通过 E. coli 诱导的巨噬细胞炎症模型证实, 根皮素可通过调节炎症标志物环氧酶-2 和 HO-1 的表达, 下调 TLR4 介导的核因子 κB 通路, 抑制 NO 和炎





**图 4 各组 MAPK 通路蛋白表达量比较** A: 各组蛋白表达电泳图 IL-1 $\beta$  诱导组 p-ERK、p-JNK、p-P38 条带灰度明显强于其他 2 个组 B: 各组间 p-ERK 蛋白相对表达量比较  $F=16.74, P<0.01$  C: 各组 ERK 蛋白相对表达量比较  $F=1.04, P=0.41$  D: 各组 p-JNK 蛋白相对表达量比较  $F=18.51, P<0.01$  E: 各组 JNK 蛋白相对表达量比较  $F=0.37, P=0.70$  F: 各组 p-P38 蛋白相对表达量比较  $F=14.12, P<0.01$  G: 各组 P38 蛋白相对表达量比较  $F=0.60, P=0.57$  与对照组相比, <sup>a</sup> $P<0.01$ ; 与 IL-1 $\beta$  诱导组相比, <sup>b</sup> $P<0.01$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n=3$ ) 1: 对照组; 2: IL-1 $\beta$  诱导组; 3: 100  $\mu$ mol/L 根皮素组 ERK: 细胞外信号调节激酶; JNK: 应激活化蛋白激酶; p-: 磷酸化

**Figure 4 Comparison of the relative expressions of MAPK signal pathway proteins among various groups** A: Electrophoretogram of protein expression The bands of p-ERK, p-JNK and p-P38 proteins were stronger in IL-1 $\beta$  induced group than in control group and 100  $\mu$ mol/L phloretin group B: Comparison of p-ERK relative expression  $F=16.74, P<0.01$  C: Comparison of ERK relative expression  $F=1.04, P=0.41$  D: Comparison of p-JNK relative expression  $F=18.51, P<0.01$  E: Comparison of JNK relative expression  $F=0.37, P=0.70$  F: Comparison of p-P38 relative expression  $F=14.12, P<0.01$  G: Comparison of P38 relative expression  $F=0.60, P=0.57$  Compared with control group, <sup>a</sup> $P<0.01$ ; compared with IL-1 $\beta$  induced group, <sup>b</sup> $P<0.01$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n=3$ ) 1: control group; 2: IL-1 $\beta$  induced group; 3: 100  $\mu$ mol/L phloretin group ERK: extracellular signal-regulated kinase; JNK: c-Jun N-terminal kinase; p-: phosphorylation

症因子的产生<sup>[20]</sup>。在高棕榈酸诱导的人脐静脉内皮细胞氧化应激模型中,根皮素可通过激活肝激酶 B1, 上调 Nrf2/HO-1 的表达,从而发挥抗氧化作用<sup>[12]</sup>。正常生理状态下, Nrf2 被 Keep1 锚定在细胞质中处于抑制状态,当细胞处于应激环境时可促使二者解离, Nrf2 发生核转位,诱导下游 HO-1 的表达,进而清除羟基自由基、单线态氧和超氧阴离子,防止脂质和蛋白质的过度氧化,在抗炎、抗氧化、抗凋亡中发挥有效作用<sup>[21]</sup>。本研究结果显示,根皮素对于 OFs 具有低细胞毒性,可以抑制 IL-1 $\beta$  诱导的 OFs 内 ROS 升高,诱导 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达,提示根皮素在 OFs 中可能通过 Nrf2/HO-1 通路发挥抗氧化作用。

MAPK 是细胞外信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要信号通路,可被氧化应激和多种促炎因子激活,促进炎症反应的发生。MAPK 与 Nrf2/HO-1 信号通路间具有复杂的相互作用,在不同组织中或不同刺激物下存在差异<sup>[22]</sup>。在本研究中,根皮素抑制了 MAPK 通路中 P38、ERK、JNK 的磷酸化,同时根皮素处理后 OFs 培养上清液中 IL-6、IL-8 及 MCP-1 质量浓度显著降低,提示根皮素可能通过抑制 MAPK 通路活化来抑制炎症反应。根皮素抑制 MAPK 通路的同时促进了 Nrf2/HO-1 的表达,提示其他通路可能参与了 Nrf2/HO-1 的激活<sup>[23]</sup>。由于本研究为体外研究,结论存在一定局限性。鉴于 GO 病理机制复杂,眶内微环

境、甲状腺素水平等因素均可影响 OFs 的激活,未来需通过在体动物模型来进一步验证其分子机制。

综上所述,本研究结果提示根皮素可抑制 IL-1 $\beta$  诱导的 OFs 细胞氧化应激水平,抑制促炎因子 IL-6、IL-8 和 MCP-1 的表达,其抗氧化应激和抗炎作用机制与抗氧化应激蛋白 HO-1 的激活及 MAPK 信号通路的调节相关,提示根皮素对 GO 具有潜在治疗价值,为 GO 治疗药物的研究提供了理论依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 靳玮: 论文选题、研究设计、实验实施、数据收集整理和分析、论文撰写及修改; 张黎: 研究设计与指导; 李谦: 数据收集整理和分析; 倪瑶: 研究设计及论文修改; 柴昌: 论文选题、研究设计及论文定稿

## 参考文献

- [1] Bartalena L, Tanda ML. Clinical practice. Graves' ophthalmopathy [J]. N Engl J Med, 2009, 360 (10): 994-1001. DOI: 10.1056/NEJMc0806317.
- [2] Stahnke T, Löbler M, Kastner C, et al. Different fibroblast subpopulations of the eye: a therapeutic target to prevent postoperative fibrosis in glaucoma therapy [J]. Exp Eye Res, 2012, 100: 88-97. DOI: 10.1016/j.exer.2012.04.015.
- [3] 鲁奕, 黄雅琢, 李寅炜, 等. IL-17A 和 IFN- $\gamma$  对甲状腺相关眼病患者 CD34-眼眶成纤维细胞纤维化的作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2020, 38(11): 923-928. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200719-00513. Lu Y, Huang YZ, Li YW, et al. Effects of IL-17A and IFN- $\gamma$  on the fibrosis of CD34-ocular fibroblasts in Graves orbitopathy [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2020, 38 (11): 923-928. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200719-00513.
- [4] Yoon JS, Kikkawa DO. Thyroid eye disease: from pathogenesis to targeted therapies [J]. Taiwan J Ophthalmol, 2022, 12(1): 3-11. DOI: 10.4103/tjo.tjo\_51\_21.

- [5] Hwang CJ, Afifiyan N, Sand D, et al. Orbital fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy overexpress CD40: CD154 hyperinduces IL-6, IL-8, and MCP-1 [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(5): 2262-2268. DOI: 10.1167/iovs.08-2328.
- [6] Tsai CC, Wu SB, Cheng CY, et al. Increased oxidative DNA damage, lipid peroxidation, and reactive oxygen species in cultured orbital fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy: evidence that oxidative stress has a role in this disorder [J]. *Eye (Lond)*, 2010, 24(9): 1520-1525. DOI: 10.1038/eye.2010.31.
- [7] 姬璇, 张朝霞, 闫春芳, 等. 甲状腺相关性眼病氧化应激反应的研究进展 [J]. *中华眼科学杂志: 电子版*, 2021, 11(2): 124-128. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-2007.2021.02.012.
- Ji X, Zhang ZX, Yan CF, et al. Advances on the oxidative stress and thyroid associated ophthalmopathy [J]. *Chin J Ophthalmol Med (Electronic Edition)*, 2021, 11(2): 124-128. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-2007.2021.02.012.
- [8] Khong JJ, McNab AA, Ebeling PR, et al. Pathogenesis of thyroid eye disease: review and update on molecular mechanisms [J]. *Br J Ophthalmol*, 2016, 100(1): 142-150. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2015-307399.
- [9] 鲁奕, 周慧芳. 甲状腺相关眼病的泪液标志物及其临床意义 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38(11): 993-996. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20201023-00710.
- Lu Y, Zhou HF. The tear biomarkers in thyroid associated ophthalmopathy and its clinical significance [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2020, 38(11): 993-996. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20201023-00710.
- [10] Bednarek J, Wysocki H, Sowiński J. Oxidative stress peripheral parameters in Graves' disease: the effect of methimazole treatment in patients with and without infiltrative ophthalmopathy [J]. *Clin Biochem*, 2005, 38(1): 13-18. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2004.09.015.
- [11] 李潭, 孙一涵, 李国峰. 根皮素对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞的体外抗炎作用机制 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(7): 812-818. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2021.07.008.
- Li T, Sun YH, Li GF. Anti inflammatory mechanism of phloretin on RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide *in vitro* [J]. *Chin J Immunol*, 2021, 37(7): 812-818. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2021.07.008.
- [12] Yang Q, Han L, Li J, et al. Activation of Nrf2 by phloretin attenuates palmitic acid-induced endothelial cell oxidative stress via AMPK-dependent signaling [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(1): 120-131. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b05025.
- [13] Pérez-Torres I, Castrejón-Téllez V, Soto ME, et al. Oxidative stress, plant natural antioxidants, and obesity [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1786 [2022-06-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33670130>. DOI: 10.3390/ijms22041786.
- [14] Zhou Q, Gong J, Wang M. Phloretin and its methylglyoxal adduct: implications against advanced glycation end products-induced inflammation in endothelial cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 129: 291-300. DOI: 10.1016/j.fct.2019.05.004.
- [15] Bartalena L, Baldeschi L, Boboridis K, et al. The 2016 European Thyroid Association/European Group on Graves' orbitopathy guidelines for the management of Graves' orbitopathy [J]. *Eur Thyroid J*, 2016, 5(1): 9-26. DOI: 10.1159/000443828.
- [16] Smith TJ. Potential roles of CD34<sup>+</sup> fibrocytes masquerading as orbital fibroblasts in thyroid-associated ophthalmopathy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019, 104(2): 581-594. DOI: 10.1210/je.2018-01493.
- [17] Philipp S, Horstmann M, Hose M, et al. An early wave of macrophage infiltration intertwined with antigen-specific proinflammatory T cells and browning of adipose tissue characterizes the onset of orbital inflammation in a mouse model of Graves' orbitopathy [J]. *Thyroid*, 2022, 32(3): 283-293. DOI: 10.1089/thy.2021.0464.
- [18] Hou TY, Wu SB, Kau HC, et al. The role of oxidative stress and therapeutic potential of antioxidants in Graves' ophthalmopathy [J/OL]. *Biomedicines*, 2021, 9(12): 1871 [2022-06-30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34944687>. DOI: 10.3390/biomedicines9121871.
- [19] Wu CS, Lin SC, Li S, et al. Phloretin alleviates dinitrochlorobenzene-induced dermatitis in BALB/c mice [J/OL]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2020, 34: 2058738420929442 [2022-06-30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32571120>. DOI: 10.1177/2058738420929442.
- [20] Chauhan A, Jang M, Kim Y. Phloretin protects macrophages from E. coli-induced inflammation through the TLR4 signaling pathway [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2020, 30(3): 333-340. DOI: 10.4014/jmb.1910.10063.
- [21] Wang Y, Yang C, Elsheikh N, et al. HO-1 reduces heat stress-induced apoptosis in bovine granulosa cells by suppressing oxidative stress [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(15): 5535-5547. DOI: 10.18632/aging.102136.
- [22] 李彦霖, 郁叶, 郭婷莉, 等. 氧化应激和炎症反应中 Nrf2/HO-1 与 MAPK 的相关性 [J]. *医学综述*, 2021, 27(1): 8-13. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2021.01.002.
- Li YL, Yu Y, Guo TL, et al. Correlation between Nrf2/HO-1 and MAPK in oxidative stress and inflammatory response [J]. *Medical Recapitulate*, 2021, 27(1): 8-13. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2021.01.002.
- [23] Zhang J, Li M, Zhao T, et al. E Se tea alleviates acetaminophen-induced liver injury by activating the Nrf2 signaling pathway [J]. *Food Funct*, 2022, 13(13): 7240-7250. DOI: 10.1039/d1fo02491d.

(收稿日期: 2022-09-08 修回日期: 2023-02-01)

(本文编辑: 张宇)

读者 · 作者 · 编者

## 本刊对来稿中作者署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件: (1) 参与课题的选题和实验设计, 参与实验资料的收集、分析和论证。 (2) 参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改。 (3) 能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修, 能够答辩并承担责任。 (4) 对论文的诚信负责。 仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。 文中如有外籍作者, 应附外籍作者亲笔签名的在本刊发表的同意函。 集体署名的文章应于题名下列出署名单位, 于文末列出论文整理者的姓名, 并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方, 每篇论文须列出通信作者 1 名。 如无特殊约定, 则视第一作者为通信作者。 作者 (包括通信作者) 的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定, 在编排过程中不宜变更或增减, 尤其是通信作者和前三名作者, 若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。 有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音, 列于英文文题之下。

(本刊编辑部)