

## · 实验研究 ·

# 敲低 GALNT2 基因对高糖培养的人视网膜血管内皮细胞凋亡的抑制作用及其机制

孙天洋<sup>1</sup> 格日勒图<sup>2</sup> 张玉凤<sup>2</sup> 李春宇<sup>3</sup> 金琳<sup>4</sup> 包岭君<sup>1</sup> 王佳乐<sup>4</sup>

<sup>1</sup>内蒙古科技大学包头医学院研究生院, 包头 014060; <sup>2</sup>内蒙古自治区人民医院眼科, 呼和浩特 010017; <sup>3</sup>长春市吉林大学白求恩第二医院眼科, 长春 130012; <sup>4</sup>内蒙古医科大学内蒙古临床医学院, 呼和浩特 010110

通信作者: 格日勒图, Email: geriletu007@sina.com

**【摘要】** 目的 探讨敲低多肽 N-乙酰半乳糖胺转移酶 2 (GALNT2) 对高糖环境中人视网膜血管内皮细胞 (HRCECs) 增生及凋亡的影响及可能的作用机制。 方法 以 GALNT2 基因为模板构建小发夹 RNA (shRNA) 干扰慢病毒载体。将 HRCECs 分为空白对照组、模型组、NC-shGALNT2 组和 shGALNT2 组, 分别于含 5.5 mmol/L 葡萄糖、25 mmol/L 葡萄糖、shGALNT2 阴性对照病毒+25 mmol/L 葡萄糖和 shGALNT2 敲低病毒+25 mmol/L 葡萄糖培养基中培养 24 h。采用实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞中 GALNT2 mRNA 相对表达量; 采用 Western blot 法检测各组细胞中 GALNT2、表皮生长因子 (EGF)、EGF 受体 (EGFR)、磷酸化 EGFR (p-EGFR) 蛋白相对表达量; 采用细胞计数试剂盒 8 (CCK8) 法检测各组细胞增值; 采用流式细胞术检测各组细胞凋亡率。 结果 模型组 GALNT2 mRNA 及蛋白相对表达量明显高于空白对照组, shGALNT2 组 GALNT2 mRNA 及蛋白相对表达量明显低于空白对照组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。模型组中细胞增值较空白对照组明显降低, shGALNT2 组中细胞增值较模型组和 NC-shGALNT2 组明显升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。空白对照组、模型组、NC-shGALNT2 组和 shGALNT2 组细胞凋亡率分别为  $(4.73 \pm 0.26)\%$ 、 $(8.66 \pm 0.25)\%$ 、 $(9.26 \pm 1.12)\%$  和  $(5.47 \pm 0.18)\%$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 342.921, P < 0.001$ ), 其中模型组细胞凋亡率明显高于空白对照组, shGALNT2 组细胞凋亡率明显低于模型组和 NC-shGALNT2 组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。模型组中 EGFR 蛋白相对表达量较空白对照组明显升高, p-EGFR 蛋白相对表达量较空白对照组明显降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。shGALNT2 组中 p-EGFR 蛋白相对表达量较模型组明显升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。 结论 敲低 GALNT2 可以提高高糖培养下 HRCECs 的增生能力, 减少 HRCECs 凋亡, 其可能与 EGFR 信号通路的激活有关。

**【关键词】** 糖尿病视网膜病变; 多肽 N-乙酰半乳糖胺转移酶 2; 人视网膜血管内皮细胞; 表皮生长因子受体

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目 (2021LHMS08064)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20221207-00576

## Inhibitory effect of GALNT2 gene knockdown on apoptosis of human retinal vascular endothelial cells in high glucose culture and its mechanism

Sun Tianyang<sup>1</sup>, Geriletu<sup>2</sup>, Zhang Yufeng<sup>2</sup>, Li Chunyu<sup>3</sup>, Jin Lin<sup>4</sup>, Bao Lingjun<sup>1</sup>, Wang Jiale<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduate School, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou 014060, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Inner Mongolia Autonomous Region People's Hospital, Hohhot 010017, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, The Second Norman Bethune Hospital of Jilin University, Changchun 130012, China; <sup>4</sup>Inner Mongolia Medical College of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China

Corresponding author: Geriletu, Email: geriletu007@sina.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (GALNT2) on the proliferation and apoptosis of human retinal vascular endothelial cells (HRCECs) cultured in high

glucose and its possible mechanism. **Methods** The small hairpin RNA (shRNA) targeting *GALNT2* gene was constructed to interfere with the lentiviral vector and infect HRCECs. HRCECs were divided into blank control group, model group, NC-sh*GALNT2* group and sh*GALNT2* group, which were cultured in medium containing 5.5 mmol/L glucose, 25 mmol/L glucose, sh*GALNT2* negative control virus 25 mmol/L glucose and sh*GALNT2* knockdown virus 25 mmol/L glucose for 24 hours, respectively. The relative expression of *GALNT2* mRNA in the four groups was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The relative expression levels of *GALNT2*, epidermal growth factor (EGF), EGF receptor (EGFR) and phosphorylated EGFR (p-EGFR) were detected by Western blot. The proliferative values of HRCECs were detected by cell counting kit-8 method. The apoptosis rate of different groups was detected by flow cytometry. **Results** The relative expression levels of *GALNT2* mRNA and protein were significantly higher in model group than in blank control group, and were significantly lower in sh*GALNT2* group than in blank control group (all at  $P < 0.05$ ). The cell proliferation value was significantly lower in model group than in blank control group, and was significantly higher in sh*GALNT2* than in model group and NC-sh*GALNT2* group (all at  $P < 0.05$ ). The apoptosis rates of blank control group, model group, NC-sh*GALNT2* group and sh*GALNT2* group were  $(4.73 \pm 0.26)\%$ ,  $(8.66 \pm 0.25)\%$ ,  $(9.26 \pm 1.12)\%$  and  $(5.47 \pm 0.18)\%$ , respectively, with a significant overall difference ( $F = 342.921, P < 0.001$ ). The apoptosis rate was significantly higher in model group than in blank control group, and was significantly lower in sh*GALNT2* group than in model group and NC-sh*GALNT2* group (all at  $P < 0.05$ ). The relative expression level of EGFR protein was significantly higher and the relative expression level of p-EGFR protein was significantly lower in model group than in blank control group (all at  $P < 0.05$ ). The relative expression of p-EGFR protein was significantly higher in sh*GALNT2* group than in model group (all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Knocking down *GALNT2* can improve the proliferative ability of HRCECs under high glucose culture and reduce apoptosis, which may be related to the activation of EGFR signaling pathway.

[Key words] Diabetic retinopathy; Polypeptide N-acetylgalactosamine transferase 2; Human retinal vascular endothelial cells; Epidermal growth factor receptor

**Fund program:** Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2021LHMS08064)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20221207-00576

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病严重的微血管并发症,严重影响患者的生活质量。视网膜血管内皮细胞之间连接紧密,是构成血-视网膜屏障的重要结构基础<sup>[1-3]</sup>。长期高糖环境可诱导线粒体功能障碍,促进视网膜内皮细胞凋亡,导致视网膜功能障碍<sup>[4]</sup>。同时血管内皮细胞增生是新生血管形成过程中的重要环节,可致视网膜脱离和玻璃体积血,加重 DR 的发生和发展,造成视力不同程度下降<sup>[5-6]</sup>。DR 的发病机制复杂,其治疗常采用眼内注射抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 药物、糖皮质激素及其他抗炎药物,但存在高血压、白内障发病率升高的风险<sup>[7]</sup>。各种抗氧化剂有助于改善 DR 早期微血管病变,但目前仍无法确定抗氧化治疗的时机以及治疗剂量与不良反应之间的平衡问题<sup>[8]</sup>。血管内皮细胞功能障碍被认为是 DR 的主要发病机制之一,预防血管内皮细胞功能障碍可降低糖尿病性血管并发症的风险<sup>[9-10]</sup>。因此,迫切需要阐明高糖对视网膜血管内皮细胞作用的可能分子机制,以期在一定程度上缓解 DR 的发展。多肽 N-乙酰半乳糖胺转移酶 2 (polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2,

*GALNT2*) 是一种重要的糖基转移酶,可调节表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 等受体酪氨酸激酶的活性,从而调节细胞功能<sup>[11]</sup>。目前针对 *GALNT2* 的研究大多与癌症的发生和发展相关,涉及其在不同组织中的差异表达,影响细胞增生、侵袭和转移等<sup>[12-14]</sup>。有研究显示,在糖尿病模型大鼠的视网膜中 *GALNT2* 表达下调,且促进了 EGFR 的磷酸化,对视网膜起保护作用<sup>[15]</sup>。推测 *GALNT2* 可能是预防和治理 DR 新的关键靶点或预测分子。本研究拟通过观察高糖环境下敲低 *GALNT2* 对人视网膜毛细血管内皮细胞 (human retinal capillary endothelial cells, HRCECs) 增生及凋亡的影响,为 DR 的治疗提供新的潜在治疗靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞来源** HRCECs 购自美国模式菌种收集中心。

**1.1.2 主要试剂及仪器** DMEM 培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司); BR-V108 载体、TOP10 大肠杆

菌感受态细胞(北京天根生化科技有限公司);凋亡试剂盒、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)(美国 eBioscience 公司);Trizol(美国 Sigma 公司);兔抗 GALNT2 多克隆抗体(Ab262868)、兔抗表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)多克隆抗体(Ab184265)、兔抗 EGFR 多克隆抗体(Ab52894)、兔抗磷酸化 EGFR(p-EGFR)多克隆抗体(Ab40815)(英国 Abcam 公司);兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)多克隆抗体(AP0063, 美国 Bioworld 公司);HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗、RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司);胎牛血清(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒、Hiscript QRT supermix for qPCR(+gDNA WIPER)试剂盒、AceQ qPCR SYBR Green master mix 试剂盒(南京 Vazyme 生物科技股份有限公司)。PCR 仪、凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);Nanodrop 2000c 紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher 科技公司);实时荧光定量 PCR 仪(7500, 美国 ABI 公司);SDS-Acry/Bis 蛋白电泳仪(上海天能科技有限公司);流式细胞仪(美国 Millipore 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞分组和处理** 将 HRCECs 复苏后,置于含有青/链霉素双抗混合液[每毫升含 50 U(商品单位)青霉素和 100 μg 链霉素]、体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中,放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中常规培养并传代,每 2~3 d 换液 1 次,待细胞生长至 80%~90% 融合度,取处于对数生长期且状态良好的 HRCECs 用于实验,用 0.25% 胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液。按照 1×10<sup>4</sup> 个/孔将细胞接种至 96 孔板中,待细胞贴壁后将细胞分为空白对照组、模型组、NC-shGALNT2 组和 shGALNT2 组,分别用含 5.5 mmol/L 葡萄糖、25 mmol/L 葡萄糖、shGALNT2 阴性对照慢病毒+25 mmol/L 葡萄糖和 shGALNT2 敲低慢病毒+25 mmol/L 葡萄糖的培养液在 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h。

**1.2.2 小发夹 RNA 慢病毒载体构建** 根据小发夹 RNA(small hairpin RNA, shRNA)靶序列筛选设计原则,结合人 HRCECs 的基因序列和网站分析,以 GALNT2 基因为模板,设计多个 19-21nt RNA 干扰靶点序列,利用 NCBI 数据库对确定的靶序列进行 Blast 分析,选取干扰靶点。根据已选靶点序列设计 shRNA 干扰序列,并在两端添加合适的限制性内切酶酶切位点以完成载体构建。GALNT2 shRNA 的正向引物序列为 5'-GGAAGGAGGACTGGAATGA-3', 反向引物序列为

5'-CACCTGGTTGAACTTGTTC-3'。除此之外,在正链 3'端添加 TTTTT 终止信号,而反链 5'端添加终止信号互补序列。设计完成后送上海生工生物工程有限公司合成单链 DNA oligo。将合成的单链 DNA oligo 干粉溶解于退火缓冲液中(终浓度为 100 mol/L),90 °C 水浴 15 min,自然冷却至室温后,形成带粘性末端的双链。将退火的 shRNA 序列插入经酶切的 BR-V108 载体,连接产物转化至 TOP10 大肠杆菌感受态细胞,选取单克隆细胞,进行测序鉴定。

**1.2.3 细胞的慢病毒质粒转染** 将 HRCECs 使用胰蛋白酶进行消化,调整细胞密度为 1×10<sup>6</sup>/ml,6 孔板每孔加入 500 μl 细胞悬液,次日细胞融合度达 70%~80% 时进行慢病毒转染。从 -80 °C 冰箱取出慢病毒,4 °C 融化后根据细胞病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)值计算慢病毒用量。预设细胞 MOI 为 100,慢病毒量为 MOI×细胞数/病毒滴度(100×5×10<sup>6</sup>/1×10<sup>7</sup>=50 μl),在加入慢病毒同时加入 5 μl polybrene。于培养后 24 h 荧光显微镜下观察病毒转染效率,48 h 后收集细胞进行后续实验。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 GALNT2 mRNA 相对表达量** 取各组培养 48 h 的 HRCECs,采用 Trizol 试剂提取细胞中总 RNA, Nanodrop 2000c 紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度。参照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 反应。GALNT2 正向引物序列:5'-GGAAGGAGGACTGGAATGA-3', 反向引物序列:5'-CACCTGGTTGAACTTGTTC-3';GAPDH 正向引物序列:5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3', 反向引物序列:5'-CACCCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'。PCR 反应体系:SYBR Green mastermix 5.00 μl、正向和反向引物各 0.25 μl、Dye2 0.20 μl、cDNA 2.00 μl、RNase-Free H<sub>2</sub>O 2.30 μl,共 10.00 μl。PCR 反应条件:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火及延伸 30 s,共 40 个循环。各组设置 3 个复孔,实验重复 3 次。以 GAPDH 为内参,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算各组细胞中 GALNT2 相对表达量。

**1.2.5 Western bolt 法检测 GALNT2、EGFR、p-EGFR、EGF 蛋白相对表达量** 胰蛋白酶消化收集各组培养 48 h 的 HRCECs, PBS 洗涤,加入 500 μl RIPA 裂解液裂解细胞,提取细胞蛋白,BCA 蛋白定量。取 40 μg 总蛋白上样进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转印至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次后加入 GALNT2、EGF、EGFR、p-EGFR 一抗(均 1:2 000 稀释)和 GAPDH 一抗(1:3 000 稀释),4 °C 下孵育过夜。TBST 洗膜后再加入稀释的

HRP 标记的羊抗兔二抗(1:3 000 稀释),室温下孵育 2 h, TBST 洗膜后,采用电化学发光液显影,转至暗室采集图像,采用 ImageJ 软件分析条带灰度值,每组设置 3 个复孔,实验重复 3 次。以 GAPDH 为内参,计算各组细胞中目的蛋白相对表达水平。

**1.2.6 CCK-8 法检测 HRCECs 细胞增殖值** 取各组处于对数生长期且长势良好的 HRCECs,胰蛋白酶消化,调整细胞悬液密度为  $5 \times 10^3$  个/ml,按照每孔 200  $\mu$ l 接种于 96 孔板,向每孔中加入 10  $\mu$ l CCK-8 试剂溶液,置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 4 h,酶标仪 450 nm 波长处测定细胞吸光度(absorbance, A)值,连续测定 5 d。实验重复 3 次。

**1.2.7 流式细胞术检测 HRCECs 细胞凋亡率** 胰蛋白酶消化慢病毒感染后 48 h 各组细胞, PBS 洗涤细胞 2 次,离心半径 6 cm, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,加入结合缓冲液重悬细胞,制成  $1 \times 10^6$  个/ml 的细胞悬液,取 100  $\mu$ l 细胞悬液,加入 Annexin V-FITC 溶液 5  $\mu$ l,混匀后避光反应 10 min,再加入 PI 染液 5  $\mu$ l 轻轻混匀,于室温下避光反应 20 min,最后加入结合缓冲液 400  $\mu$ l,流式细胞仪上样检测。每组设置 3 个复孔,实验重复 3 次。计算各组 HRCECs 总凋亡率 = 早期凋亡率 + 晚期凋亡率。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间各检测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 各组细胞中 GALNT2 mRNA 相对表达量比较

空白对照组、模型组、NC-shGALNT2 组和 shGALNT2 组细胞中 GALNT2 mRNA 相对表达量分别为  $1.01 \pm 0.18$ 、 $2.95 \pm 0.53$ 、 $3.25 \pm 0.15$  和  $0.61 \pm 0.08$ , 总体比较差异有统计学意义( $F = 61.872, P < 0.001$ ),其中与空白对照组比较,模型组和 NC-shGALNT2 组中 GALNT2 mRNA 相对表达量明显升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );与模型组比较,shGALNT2 组中 GALNT2 mRNA 相对表达量明显下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 1)。

### 2.2 各组 HRCECs 增殖值比较

随培养时间延长,各组细胞增殖 A 值均有升高趋势,其中模型组和 NC-shGALNT2 组增殖 A 值接近,shGALNT2 组增殖 A 值逐渐高于模型组和 NC-

shGALNT2 组(图 2)。培养 5 d 时,空白对照组、模型组、NC-shGALNT2 组和 shGALNT2 组间细胞 A 值总体比较差异有统计学意义( $F = 6.837.899, P < 0.05$ ),其中与空白对照组比较,模型组、NC-shGALNT2 组和 shGALNT2 组中细胞增殖 A 值均减小,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );与 NC-shGALNT2 组比较,shGALNT2 组中细胞增殖 A 值明显增大,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 1)。

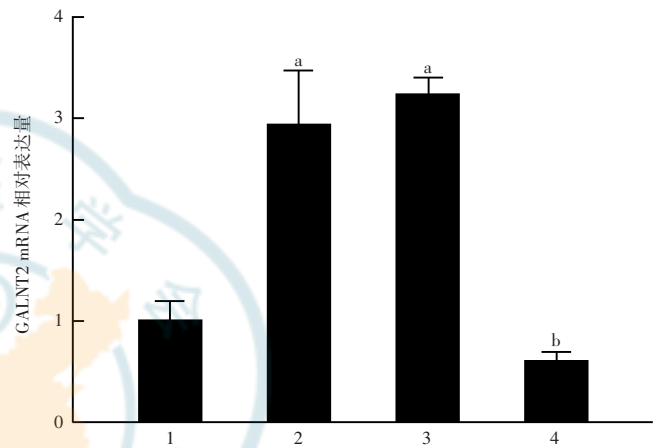


图 1 各组细胞中 GALNT2 mRNA 相对表达量比较  $F = 61.872, P < 0.001$ 。与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t*检验, $n = 3$ ) 1:空白对照组;2:模型组;3:NC-shGALNT2 组;4:shGALNT2 组 GALNT:多肽 N-乙酰半乳糖胺转移酶  
Figure 1 Comparison of relative expression of GALNT2 mRNA among different groups  $F = 61.872, P < 0.001$ . Compared with blank control group,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;compared with model group,<sup>b</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 3$ ) 1: blank control group; 2: model group; 3: NC-shGALNT2 group; 4: shGALNT2 group GALNT: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase

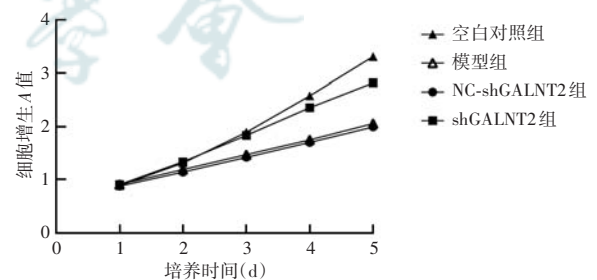


图 2 各组 HRCECs 不同时间点增殖 A 值变化 随着培养时间的延长,各组细胞增殖 A 值均有升高趋势,其中模型组和 NC-shGALNT2 组增殖 A 值接近,shGALNT2 组增殖 A 值逐渐高于模型组和 NC-shGALNT2 组 A:吸光度;GALNT:多肽 N-乙酰半乳糖胺转移酶  
Figure 2 Changes in the proliferation A value of HRCECs in different groups The proliferation A values in four groups were increased with the extension of culture. The proliferation A values in model group and NC-shGALNT2 group were close, while the proliferation A value in shGALNT2 group was gradually higher than that in model group and NC shGALNT2 group A: absorbance; GALNT: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase

**表 1 各组培养 5 d 时细胞增生 A 值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**  
**Table 1 Comparison of cell proliferation A values on the fifth day of culture among different groups ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	样本量	A 值
空白对照组	3	3.31±0.00
模型组	3	2.05±0.02 <sup>a</sup>
NC-shGALNT2 组	3	1.99±0.00 <sup>ab</sup>
shGALNT2 组	3	2.82±0.01 <sup>abc</sup>
F 值		6 837.899
P 值		<0.001

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 NC-shGALNT2 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) A:吸光度;GALNT:多肽 N-乙酰半乳糖胺转移酶

Note: Compared with blank control group,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with model group,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ; compared with NC-shGALNT2 group,<sup>c</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test) A: absorbance; GALNT: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase

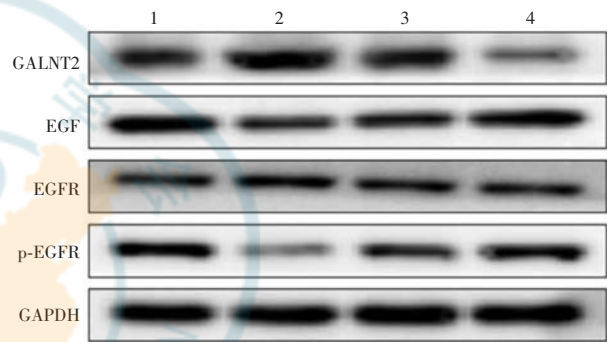
### 2.3 各组细胞凋亡率比较

空白对照组、模型组、NC-shGALNT2 组和 shGALNT2 组细胞凋亡率分别为 (4.73±0.26)%、(8.66±0.25)%、(9.26±1.12)% 和 (5.47±0.18)%，总体比较差异有统计学意义 ( $F = 342.921, P < 0.001$ )，其中与空白对照组比较，模型组细胞凋亡率显著升高，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；与模型组和 NC-shGALNT2 组比较，shGALNT2 组中 HRCECs 凋亡率明显下降，差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 3)。

### 2.4 各组细胞中 GALNT2、EGFR、EGF、p-EGFR 蛋白相对表达量比较

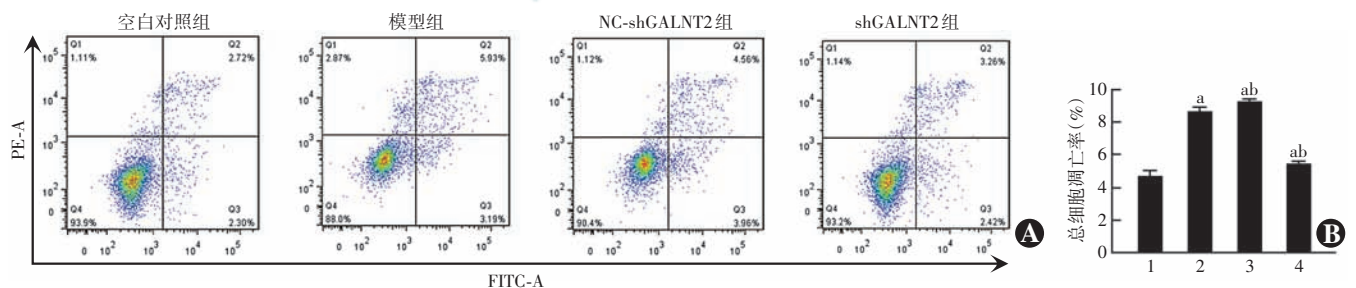
蛋白电泳结果显示，与空白对照组比较，模型组中 GALNT2、EGFR 蛋白条带强度增加，EGF、p-EGFR 蛋白条带强度减弱；与模型组比较，shGALNT2 组中 GALNT2、EGFR 蛋白条带强度减弱，p-EGFR 蛋白条带

强度增加 (图 4)。空白对照组、模型组、NC-shGALNT2 组和 shGALNT2 组细胞中 GALNT2、EGFR 和 p-EGFR 蛋白相对表达量总体比较，差异均有统计学意义 ( $F = 21.023, 7.393, 15.005$ ，均  $P < 0.05$ )，其中模型组中 GALNT2、EGFR 蛋白相对表达量较空白对照组明显升高，p-EGFR 蛋白相对表达量较空白对照组明显减少；shGALNT2 组中 GALNT2 蛋白相对表达量较模型组明显降低，p-EGFR 蛋白相对表达量较模型组明显升高，差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。各组间 EGF 蛋白相对表达量总体比较，差异无统计学意义 ( $F = 2.604, P = 0.100$ ) (表 2)。



**图 4 Western blot 法检测各组 HRCECs 中 EGF、EGFR、p-EGFR 蛋白相对表达量** 1:空白对照组;2:模型组;3: NC-shGALNT2 组;4: shGALNT2 组 GALNT:多肽 N-乙酰半乳糖胺转移酶;EGF:表皮生长因子;EGFR:表皮生长因子受体;p-EGFR:磷酸化表皮生长因子受体;GAPDH:磷酸甘油醛脱氢酶

**Figure 4 Relative expressions of EGF, EGFR and p-EGFR proteins in HRCECs of four groups detected by Western blot** 1: blank control group; 2: model group; 3: NC-shGALNT2 group; 4: shGALNT2 group GALNT: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase; EGF: epidermal growth factor; EGFR: epidermal growth factor receptor; p-EGFR: phosphoglated epidermal growth factor; GAPDH: phosphoglyceraldehyde dehydrogenase



**图 3 Aannexin V-FITC/PI 双荧光染色流式细胞仪检测各组 HRCECs 细胞凋亡情况** A:各组细胞凋亡流式细胞检测图 shGALNT2 组细胞凋亡数少于模型组和 NC-shGALNT2 组 B:各组细胞凋亡率比较  $F = 324.921, P < 0.001$ 。与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 3$ ) 1:空白对照组;2:模型组;3: NC-shGALNT2 组;4: shGALNT2 组 GALNT:多肽 N-乙酰半乳糖胺转移酶

**Figure 3 Apoptosis of HRCECs in four groups detected by flow cytometry with Aannexin V-FITC/PI double fluorescence staining** A: Apoptosis by flow cytometry The number of apoptotic cells in the shGALNT2 group was lower than that in the model and NC-shGALNT2 groups B: Comparison of cell apoptosis rate among four groups  $F = 324.921, P < 0.001$ . Compared with blank control group,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with model group,<sup>b</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 3$ ) 1: blank control group; 2: model group; 3: NC-shGALNT2 group; 4: shGALNT2 group GALNT: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase

表 2 各组细胞中 GALNT2、EGF、EGFR 和 p-EGFR 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )Table 2 Comparison of relative expressions of GALNT2, EGF, EGFR and p-EGFR proteins among four groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本量	不同蛋白相对表达量			
		GALNT2	EGF	EGFR	p-EGFR
空白对照组	3	0.89±0.09	1.14±0.11	0.67±0.06	0.91±0.09
模型组	3	1.09±0.10 <sup>a</sup>	0.93±0.09	0.90±0.09 <sup>a</sup>	0.57±0.05 <sup>a</sup>
NC-shGALNT2 组	3	0.96±0.09	0.98±0.14	0.89±0.08 <sup>a</sup>	0.77±0.07 <sup>ab</sup>
shGALNT2 组	3	0.62±0.06 <sup>abc</sup>	1.05±0.10	0.78±0.07 <sup>b</sup>	0.79±0.07 <sup>ab</sup>
F 值		21.023	2.604	7.393	15.005
P 值		<0.001	0.100	<0.05	<0.001

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 NC-shGALNT2 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) GALNT2:多肽 N-乙酰半乳糖胺转移酶;EGF:表皮生长因子;EGFR:表皮生长因子受体;p-:磷酸化

Note: Compared with blank control group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; compared with model group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; compared with NC-shGALNT2 group, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test) GALNT2: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase; EGF: epidermal growth factor; EGFR: epidermal growth factor receptor; p-: phosphorylated

### 3 讨论

DR 是导致糖尿病患者盲的主要原因,也是发达国家劳动年龄人口可预防盲的主要原因<sup>[16-17]</sup>。视网膜内皮细胞是高血糖的主要攻击目标,阐明高糖诱导 HRCECs 凋亡的潜在机制并寻找新的治疗靶点,对于 DR 防治具有重要的临床意义。

GALNT2 是介导黏蛋白 O-型糖基化起始步骤的酶,黏蛋白 O-型糖基化是 O-型糖基化的常见类型。GALNT2 通过将 N-乙酰半乳糖胺(N-acetylgalactosamine, GalNAc)添加到蛋白质的丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)残基上,启动黏蛋白 O-型糖基化<sup>[18-19]</sup>。White 等<sup>[20]</sup>首次在 1995 年从人胎盘中鉴定和纯化出 GALNT2。既往研究证实, GALNT2 可能作为新的肿瘤标志物发挥重要作用。在 GALNT2 基因敲除的肝癌细胞中, EGFR 的磷酸化增加,从而改变 EGF、EGFR 的表达,增强了 EGF 诱导的细胞生长和迁移<sup>[11]</sup>。在口腔鳞状细胞癌中, GALNT2 过表达, EGFR 上 GalNAc (TN 抗原) 结构发生改变, EGFR 及其下游信号分子的磷酸化增强,证实抑制 GALNT2 的表达可以抑制口腔癌细胞的侵袭行为<sup>[21]</sup>。高糖环境中,下调 GALNT2 可促进人子宫内膜癌细胞增生<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,模型组细胞中 GALNT2 表达较空白对照组增加,提示 GALNT2 可能参与 DR 的发生和发展,而 shGALNT2 组细胞中 GALNT2 mRNA 和蛋白表达均减少,视网膜血管内皮细胞增值明显升高,且明显抑制了视网膜血管内皮

细胞凋亡,提示敲低 GALNT2 具有抑制 DR 进展的作用。

EGFR 是一种黏蛋白,其与配体结合后可形成同源或异源的二聚体,导致激酶结构域的磷酸化和激活,随后刺激下游信号通路丝裂原活化蛋白激酶等通路,从而调节细胞迁移、侵袭以及增生<sup>[22]</sup>。EGFR 在眼发育和光感受器分化中起关键作用<sup>[23-24]</sup>。有研究表明,在增生性玻璃体视网膜病变中,EGF 与 EGFR 促进视网膜色素上皮细胞发生迁移、增生,而 EGFR 抑制剂可以减轻胰岛素治疗后视网膜血管渗漏的增加<sup>[25]</sup>。Maugeri 等<sup>[25]</sup>在注射链脲佐菌素的大鼠视网膜模型中检测出视网膜色素上皮细胞中的 p-EGFR 表达水平极低。Patel 等<sup>[26]</sup>研究发现,增生性 DR 患者视网膜中 EGFR 表达增加。本研究结果亦显示,模型组 HRCECs 中 EGFR 相对表达量显著升高, p-EGFR 相对表达量显著降低,而敲低 GALNT2 的表达可逆转 EGFR 和 p-EGFR 的表达。已有研究显示,下调 GALNT2 可通过促进 RTKs 的磷酸化来促进胃癌细胞增生<sup>[13]</sup>,结合本研究结果推测, p-EGFR 表达升高是敲低 GALNT2 发挥保护效应的一种可能机制。本研究中, shGALNT2 组较模型组 EGF 蛋白相对表达量差异无统计学意义,但 shGALNT2 组 EGFR 表达较模型组显著降低。Hu 等<sup>[12]</sup>关于胃腺癌的研究显示,当 EGFR 的糖基化调节时,其与配体 EGF 的结合亲和力会发生改变,并提出敲低 GALNT2 激活 EGFR 可能与其配体表达量无关。结合本研究结果,推测在高糖条件下培养的 HRCECs 中,敲低 GALNT2 可能通过调控 EGFR、p-EGFR 参与 DR 的发生和发展进程,其激活 EGFR 可能也与 EGF 配体无关,但仍需进一步证实。

本研究尚存在一些不足,仅从细胞实验层面对敲低 GALNT2 在高糖培养 HRCECs 中的作用进行了观察,后续实验将进行血管侵袭实验等以证明 GALNT2-EGFR 激活通路对细胞增生、迁移及侵袭能力的影响。

综上,本研究结果表明,在高糖环境下,敲低 GALNT2 可以提高 HRCECs 细胞增生能力,减少 HRCECs 细胞凋亡,该过程可能与 EGFR 信号通路的激活有关。敲低 GALNT2 可能是防治 DR 的重要靶点,有待进一步经在体研究及临床转化研究进行验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 孙天洋:实验操作、论文撰写;张玉凤、李春宇、金琳、包岭君、王佳乐:数据整理、统计分析;格日勒图:实验操作、论文撰写、论文智力性内容审阅及修改

### 参考文献

[1] 陈晓云,李建桥,朱晓波,等.复方血栓通对人视网膜血管内皮细胞

- 抗氧化损伤的保护作用及其机制[J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(10): 872-878. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.10.003.
- Chen XY, Li JQ, Zhu XB, et al. Protective effects and mechanism of fufang xueshuantong on tert-butyl hydroperoxide-induced injury of human retinal vascular endothelial cells[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2011, 29(10): 872-878. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.10.003.
- [2] 吴绵绵, 郭芳, 李亚红, 等.  $\alpha$ -黑色素细胞刺激素作用后高糖高脂下视网膜血管内皮细胞差异表达基因分析[J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(9): 694-700. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.09.002.
- Wu MM, Guo F, Li YH, et al. Differentially expressed genes analysis of retinal vascular endothelial cells under hyperglycemia and hyperlipidemia induced by  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37(9): 694-700. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.09.002.
- [3] Huang H. Pericyte-endothelial interactions in the retinal microvasculature[J/OL]. Int J Mol Sci, 2020, 21(19): 7413 [2022-11-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33049983>. DOI: 10.3390/ijms21197413.
- [4] Tien T, Zhang J, Muto T, et al. High glucose induces mitochondrial dysfunction in retinal Müller cells; implications for diabetic retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(7): 2915-2921. DOI: 10.1167/iovs.16-21355.
- [5] 蔡晖, 石华宗, 杨豫湘. 过表达低氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 对外培养人视网膜血管内皮细胞增殖、炎症反应及血管生成的影响[J]. 眼科新进展, 2019, 39(1): 32-35. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2019.0007.
- Cai H, Shi HZ, Yang YX. The effects of over-expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  on cell proliferation, inflammatory response and angiogenesis *in vitro* cultured human retinal capillary endothelial cells[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2019, 39(1): 32-35. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2019.0007.
- [6] Fresta CG, Fidilio A, Caruso G, et al. A new human blood-retinal barrier model based on endothelial cells, pericytes, and astrocytes[J/OL]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1636 [2022-11-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32121029>. DOI: 10.3390/ijms21051636.
- [7] 陈若瑜, 曹丹, 张良. 糖尿病视网膜病变药物治疗研究进展[J]. 眼科新进展, 2022, 42(3): 244-248. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2022.0050.
- Chen RY, Cao D, Zhang L. Advances in drug therapy for diabetic retinopathy[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2022, 42(3): 244-248. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2022.0050.
- [8] 万光明, 薛榕. 从视网膜氧化应激与微血管改变谈糖尿病视网膜病变的发病机制和防治策略[J]. 眼科新进展, 2022, 42(7): 505-509. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2022.0103.
- Wan GM, Xue R. Discussion on the pathogenesis and prevention of diabetic retinopathy from retinal oxidative stress and microvascular changes[J]. Rec Adv Ophthalmol, 2022, 42(7): 505-509. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2022.0103.
- [9] 贾杨雪, 王志玲, 魏莹莹, 等. 高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞中环状 RNA 差异表达分析[J]. 中华实验眼科杂志, 2022, 40(7): 617-622. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200602-00390.
- Jia YX, Wang ZL, Wei YY, et al. Differential expression analysis of circular RNA in human retinal vascular endothelial cells induced by high glucose[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2022, 40(7): 617-622. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200602-00390.
- [10] 刘茜, 刘长庚, 李海军, 等. 杨梅苷对高糖环境下视网膜微血管内皮细胞的保护作用及其调控机制[J]. 中华实验眼科杂志, 2022, 40(7): 623-631. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210809-00451.
- Liu Q, Liu CG, Li HJ, et al. Protective effect of myricitrin on retinal microvascular endothelial cells induced by high glucose and its regulation mechanism[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2022, 40(7): 623-631. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210809-00451.
- [11] Wu YM, Liu CH, Hu RH, et al. Mucin glycosylating enzyme GALNT2 regulates the malignant character of hepatocellular carcinoma by modifying the EGF receptor[J]. Cancer Res, 2011, 71(23): 7270-7279. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1161.
- [12] Hu WT, Yeh CC, Liu SY, et al. The O-glycosylating enzyme GALNT2 suppresses the malignancy of gastric adenocarcinoma by reducing EGFR activities[J]. Am J Cancer Res, 2018, 8(9): 1739-1751.
- [13] Liu SY, Shun CT, Hung KY, et al. Mucin glycosylating enzyme GALNT2 suppresses malignancy in gastric adenocarcinoma by reducing MET phosphorylation[J/OL]. Oncotarget, 2016, 7(10): 11251-11262 [2022-11-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26848976>. DOI: 10.18632/oncotarget.7081.
- [14] Zhou X, Xu Y, Yin D, et al. Type 2 diabetes mellitus facilitates endometrial hyperplasia progression by activating the proliferative function of mucin O-glycosylating enzyme GALNT2[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110764 [2022-11-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33152927>. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110764.
- [15] 李春宇, 格日勒图. GALNT2 与 P-EGFR 在糖尿病模型鼠视网膜中的表达研究[J]. 内蒙古医学杂志, 2022, 54(5): 517-520.
- Li CY, Geriletu. Expression of GALNT2 and P-EGFR in the retina of diabetic mice[J]. Inner Mongolia Med J, 2022, 54(5): 517-520.
- [16] Simó-Servat O, Hernández C, Simó R. Diabetic retinopathy in the context of patients with diabetes[J]. Ophthalmic Res, 2019, 62(4): 211-217. DOI: 10.1159/000499541.
- [17] Wang W, Lo A. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments[J/OL]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6): 1816 [2022-11-30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29925789>. DOI: 10.3390/ijms19061816.
- [18] Bennett EP, Mandel U, Clausen H, et al. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family[J]. Glycobiology, 2012, 22(6): 736-756. DOI: 10.1093/glycob/cwr182.
- [19] Hagen FK, Van Wuyckhuysse B, Tabak LA. Purification, cloning, and expression of a bovine UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase[J/OL]. J Biol Chem, 1993, 268(25): 18960-18965 [2022-11-30]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8360184>.
- [20] White T, Bennett EP, Takio K, et al. Purification and cDNA cloning of a human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase[J]. J Biol Chem, 1995, 270(41): 24156-24165. DOI: 10.1074/jbc.270.41.24156.
- [21] Lin MC, Huang MJ, Liu CH, et al. GALNT2 enhances migration and invasion of oral squamous cell carcinoma by regulating EGFR glycosylation and activity[J]. Oral Oncol, 2014, 50(5): 478-484. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2014.02.003.
- [22] Sabbah DA, Hajjo R, Sweidan K. Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors[J]. Curr Top Med Chem, 2020, 20(10): 815-834. DOI: 10.2174/1568026620666200303123102.
- [23] D'Amico AG, Maugeri G, Bucolo C, et al. Nap interferes with hypoxia-inducible factors and VEGF expression in retina of diabetic rats[J]. J Mol Neurosci, 2017, 61(2): 256-266. DOI: 10.1007/s12031-016-0869-6.
- [24] D'Amico AG, Maugeri G, Rasà DM, et al. Modulation of IL-1 $\beta$  and VEGF expression in rat diabetic retinopathy after PACAP administration[J]. Peptides, 2017, 97: 64-69. DOI: 10.1016/j.



peptides. 2017. 09. 014.

- [25] Mauerer G, D'Amico AG, Bucolo C, et al. Protective effect of PACAP-38 on retinal pigmented epithelium in an *in vitro* and *in vivo* model of diabetic retinopathy through EGFR-dependent mechanism [J/OL]. Peptides, 2019, 119: 170108 [2022-12-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31247223>. DOI:10.1016/j.peptides.2019.170108.
- [26] Patel B, Hiscott P, Charteris D, et al. Retinal and preretinal localisation

of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and their receptor in proliferative diabetic retinopathy [J]. Br J Ophthalmol, 1994, 78(9): 714-718. DOI:10.1136/bjo.78.9.714.

(收稿日期:2023-03-17 修回日期:2023-08-12)

(本文编辑:张宇 骆世平)

## · 病例报告 ·

# 重复低强度红光治疗高度近视后视网膜结构损伤恢复 1 例

田彧 肖志刚

湖南省儿童医院眼科,长沙 410016

通信作者:田彧,Email:2733324706@qq.com

### Recovery of retinal structural damage after repeated low-intensity red light therapy for high myopia: a case report

Tian Yu, Xiao Zhigang

Department of Ophthalmology, Hunan Provincial Children's Hospital, Changsha 410016, China

Corresponding author: Tian Yu, Email: 2733324706@qq.com

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20221119-00539

患者,女,12岁,近视4年,因佩戴角膜塑形镜后反复眼红、眼痒、分泌物增多1年于2022年3月12日在湖南省儿童医院就诊。患儿因变应性结膜炎病史曾双眼用奥洛他定滴眼液和玻璃酸钠滴眼液,其母亲中度近视,否认其他眼病家族史。患儿右眼裸眼视力0.04,复方托吡卡胺滴眼液扩瞳后矫正视力-6.50 DS/-0.50 DC $\times$ 5°=0.8;左眼裸眼视力0.04,矫正视力为-5.75 DS/-1.00 DC $\times$ 180°=0.8。由于患儿曾用角膜塑形镜矫正近视且反复出现双眼结膜炎,在其监护人要求及眼底检查排除黄斑病变后(图1),采用红光治疗仪(型号RS-200)行单纯低强度红光重复照射疗法(repeated low-level red-light, RLRL)。仪器为Ⅱ类设备B型,光源输出功率为(2.0 $\pm$ 0.5)mW,瞳孔直径4.0mm状态下进入瞳孔的光功率约为0.25mW,照射参数为AC(220 $\pm$ 22)V,(50 $\pm$ 1)Hz;输入功率 $\leq$ 30VA。患儿每天照射双眼2次,间隔至少4h,每次3min。RLRL治疗1个月双眼屈光度降低约-2.00D,更换镜片;治疗3个月矫正视力为1.0,分别于治疗后1、3个月行眼底和光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)检查,均未发现异常(图2,3)。治疗后5个月(2022年8月10日)患儿出现治疗后彩虹样后像,持续时间偶超8min,未就诊并自行继续治疗。2022年8月30日患儿出现视力下降,咨询后建议停用RLRL并及时复诊。2022年9月3日患儿于湖南省儿童医院就诊,诉右眼眼红、畏光伴咳嗽、流涕1周,不伴发热。眼科检查见双眼结膜充血,右眼中央角膜可见片状荧光素钠染色,双眼调节和放松不足。超广角眼底成像可见黄斑中心凹圆形病灶;OCT检查示双眼中心凹视网膜外层椭圆体带欠连续,直径712 $\mu$ m(图4)。屈光科与眼底病科会诊后诊断为双眼高度近视、右眼角膜炎、左眼结膜炎、双眼视网膜病变。以更昔洛韦医用凝胶、玻璃酸钠滴眼液点眼2周;甲泼尼龙片晨服,8mg/d,连续1周;球旁注射曲安奈德注射液40mg1次。患者随后在中南大学湘雅二院、上海交通大学新华医院、中山大学中山眼科中心就诊,视神经磁

共振成像平扫+增强检查示双侧视神经未见异常,双眼视野明显异常;多焦视网膜电图(multifocal electroretinogram, mfERG)检查示双眼1环振幅密度下降,中心反应峰消失;双眼视杆、视锥反应波振幅均轻度下降。嘱患者口服叶黄素1个月并停用RLRL。2个月后患者自觉视力逐渐恢复,2022年10月19日于湖南省儿童医院复诊,双眼矫正视力恢复至0.8,OCT成像示双眼黄斑中心凹椭圆体带完整性和连续性均恢复(图5)。给予玻璃酸钠滴眼液点眼和左旋多巴片250mg/d口服,2022年12月21日(停用RLRL后4个月)检查角膜透明,视网膜结构完整,双眼视力未查(图6)。

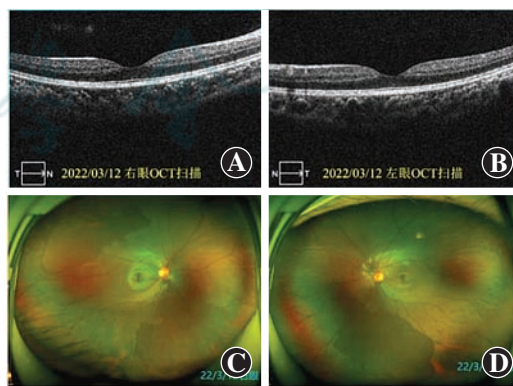


图1 RLRL治疗前双眼眼底和OCT影像 双眼眼底和OCT检查未见明显异常 A:右眼OCT B:左眼OCT C:右眼眼底彩色照相 D:左眼眼底彩色照相

讨论 RLRL是近年来发展的近视防控方法,其治疗6~24个月对近视屈光度和眼轴进展的有效控制率已得到7项随机对照临床试验<sup>[1-9]</sup>和2项非随机对照研究<sup>[10-11]</sup>的证实。2022年3月,我国教育部等15部门发布《教育部等十五部门2021年扎实推进综合防控儿童青少年近视工作》,提出加强近视防