

健脾清热活血方介导keap-1-Nrf2信号调控 claudin-2表达干预溃疡性结肠炎模型大鼠实验研究*

罗淑娟¹ 陈小芬² 林逸婷² 卢鑫² 张涛^{3△}

(1. 广西中医药大学赛恩斯新医药学院, 广西南宁 530222; 2. 广西中医药大学, 广西南宁 530011; 3. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西南宁 530011)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-745X(2021)11-1924-05
doi: 10.3969/j.issn.1004-745X.2021.11.010

【摘要】目的 通过观察 keap-1-Nrf2 通路调控 claudin-2 蛋白表达变化, 探讨健脾清热活血方防治溃疡性结肠炎的效用机制。**方法** 90 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 6 组, 除外正常组, 其余各组均采用 TNBS 灌肠法制备溃疡性结肠炎模型, 自第 7 日起分组给药, 模型组予等剂量生理盐水, 中药低、中、高剂量组予不同剂量健脾清热活血方, 西药组予美沙拉嗪灌胃, 连续 14 d。末次给药后腹腔麻醉处死全部大鼠, 截取病变部位肠段备测。HE 染色检测结肠组织病理学变化; 透射电镜检测结肠黏膜超微结构变化; 免疫组化 SP 法检测结肠环氧氯丙烷结合蛋白 1(keap-1)、Nrf2 以及 claudin-2 蛋白表达变化。**结果** 光镜提示模型组结肠黏膜表面出现缺损或脱落坏死, 溃疡形成, 隐窝结构消失, 脓肿形成, 固有层大量炎性细胞浸润, 黏膜下层充血肿胀; 治疗组较模型组有明显改善, 见结肠黏膜尚完整, 但存在黏膜缺损, 隐窝脓肿, 部分可见出血点, 较多炎性细胞浸润固有层。电镜下见模型组结肠上皮细胞微绒毛稀疏, 线粒体肿胀变大, 细胞间紧密连接消失, 可见细胞处于坏死期; 中药组见上皮细胞体积明显变小、核固缩、凋亡小体形成, 局灶可见坏死。模型组结肠 keap-1、Nrf2 蛋白表达下降, claudin-2 蛋白表达上升; 治疗后, 中药组结肠 keap-1、Nrf2 蛋白表达上升, claudin-2 蛋白表达下降; 经比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 但是中药组之间不存在组间差异 ($P > 0.05$)。**结论** 健脾清热活血方通过上调 Keap-1、Nrf2 表达, 下调 claudin-2 表达而发挥防治溃疡性结肠炎的效用。

【关键词】 溃疡性结肠炎 健脾清热活血方 氧化应激 keap-1-Nrf2 通路 claudin-2 大鼠

Study of Jianpi Qingre Huoxue Decoction Mediates keap-1-Nrf2 Pathway Regulation of claudin-2 Expression to Intervene Ulcerative Colitis Luo Shujuan, Chen Xiaofen, Lin Yiting, Lu Xin, Zhang Tao.

Faculty of Chinese Medicine Science Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi, Nanning 530222, China.

【Abstract】Objective: To observe the effect of keap-1-Nrf2 pathway on the expression of claudin-2 protein, and to explore the mechanism of Jianpi Qingre Huoxue Decoction in preventing and treating ulcerative colitis. **Methods:** 90 SPF male SD rats were randomly divided into 6 groups according to body weight, except for the normal group. The rest of the groups were prepared by TNBS enema method for ulcerative colitis models. They were administered in groups starting from the 7th day. The saline and treatment groups were given Jianpi Qingre Huoxue Decoction with different doses, and the control group was given gavage by mesalazine for 14 days. All rats were sacrificed by intraperitoneal anesthesia after the last administration, and the intestinal segment of the lesion was taken for testing. HE staining was used to detect the pathological changes of colonic tissue; transmission electron microscopy was used to detect the ultrastructural changes of colonic mucosa; immunohistochemical SP method was used to detect the expression of colon keap-1, Nrf2 and claudin-2. **Results:** Light microscopy showed that the surface of the colonic mucosa in the model group had defects or shedding and necrosis, ulcers formed, crypt structures disappeared, abscesses formed, a large number of inflammatory cells infiltrated the lamina propria, and the submucosa was congested and swollen. The treatment group had a more significant improvement than the model group. Under the light microscopy, the colonic mucosa was still intact, but there were mucosal defects, crypt ab-

* 基金项目: 广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA281042)

△ 通信作者(电子邮箱: 327664246@qq.com)

ssesses, some bleeding points, and more inflammatory cells infiltrated the lamina propria. The electron microscopy showed that the microvilli of the colonic epithelial cells in the model group were sparse, the mitochondria became swollen and enlarged, and the tight junctions between the cells disappeared. The cells were in the necrotic phase. The treatment group had epithelial cells significantly smaller in size, the pyknosis, and the formation of apoptotic bodies. Necrosis was visible on the stove. The expression of keap-1 and Nrf2 protein in the model group decreased, and the expression of claudin-2 protein increased. After treatment, the expression of keap-1 and Nrf2 protein in the treatment group increased, and the expression of claudin-2 protein decreased. After comparison, there was a statistical difference ($P < 0.05$); however, there were no differences between the treatment groups ($P > 0.05$).

Conclusion: *Jianpi Qingre Huoxue Decoction* exerts the effect of preventing and treating ulcerative colitis by up-regulating the expression of keap-1 and Nrf2 and down-regulating the expression of claudin-2.

[Key words] Ulcerative colitis; *Jianpi Qingre Huoxue Decoction*; Oxidative stress; Keap-1-Nrf2 pathway; Claudin-2; Rats

本课题组前期临床研究证实,健脾清热活血方具有明确缓解轻度溃疡性结肠炎(UC)效用,其疗效与艾迪莎相仿,对于中度UC患者配合激素使用,亦有辅助作用^[1]。动物实验发现健脾清热活血方具有促进黏膜屏障修复,诱导炎症缓解的效用,但其具体的机制还有待深入研究^[2]。UC发病机制与氧自由基产生过多及脂质过氧化有密切关系,血管活性因子即肠源性缩血管物质活性增强,导致肠道缺血,同时结肠黏膜中的炎性细胞如中性粒细胞、巨噬细胞等经血液循环浸润到肠道的黏膜层、黏膜下层,引起肠黏膜受损。在还原性辅酶Ⅱ、NADPH氧化酶以及呼吸作用下产生大量脂质过氧化物如 O_2^- 、 OH^- 等,这些物质进一步加重肠黏膜损伤^[3-5]。keap-1-Nrf2路径是机体最主要的抗氧化应激反应通路之一,在促进黏膜修复、诱导细胞凋亡、降低炎症反应等多方面发挥重要的生物学作用,但健脾清热活血方是否通过介导keap-1-Nrf2通路调控claudin-2表达而发挥其防治UC的效应尚不清楚。本研究应用三硝基苯磺酸(TNBs)制备UC模型,将健脾清热活血方作用于上述模型,应用现代生物学技术检测结肠组织病理学、超微结构、环氧氯丙烷结合蛋白1(keap-1)、Nrf2以及claudin-2表达变化,客观评价健脾清热活血方的效用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 90只SPF级雄性SD大鼠,体质量150~180g,购自广西医科大学动物实验中心,实验动物生产许可证:SCXK(桂)2014-02。所有动物实验均在广西中医药大学实验动物中心完成,许可证号:SYXK(桂)2018-0012。动物饲养在恒温房间(21~23℃),每隔12h光暗循环,自由进食进水,适应性喂养1周后开始实验。所有实验均符合动物3R福利原则。

1.2 试剂及仪器 5% 2,4,6三硝基苯磺酸(TNBS)购自美国SIGMA公司(货号:P2297),10%中性甲醛、戊二醛、无水乙醇购于广西博仁生物试剂有限公司;Anti-keap-1、Anti-Nrf2以及Anti-claudin-2均购自美

国Abcam公司(货号:ab119403, ab31163, ab53032),辣根过氧化物酶标记的二抗购自武汉博士德公司(货号:GA1014),EDTA缓冲液(博士德,SN109);伊红(中杉,S133)、苏木素(中杉,S130)、DAB显色试剂盒(中杉,SB1030),免疫组化湿盒(抗体孵育用),BX43F电子显微镜(日本OLYMPUS)、透射电镜(日本日立H7650)等。

1.3 实验药物 健脾清热活血方(马齿苋15g,白术10g,白芍15g,水蛭10g,三七10g,救必应15g,炙甘草6g。用蒸馏水煎煮药液,浓缩至含生药1g/1.5mL,过滤分装4℃保存备用)。美沙拉嗪(商品名艾迪莎),500mg/袋,法国爱的发制药集团生产,国药准字H20040727。药物均购自广西中医药大学附属瑞康医院药房。

1.4 分组与造模 将90只大鼠按体质量随机分为6组,即正常组、模型组、西药组和中药低、中、高剂量组,每组15只。参照文献报道^[6],正常组除外,其余各组均采用TNBS 100mg/kg+50%乙醇法灌肠法制备UC模型,连续灌肠3d,休息4d。

1.5 给药方法 造模开始第7日起,模型组予等剂量生理盐水灌胃,中药低、中、高剂量组予健脾清热活血方4.29、8.58、17.16g/kg灌胃(成人用药量的3、6、12倍,即实验动物与人按体表面积比等效剂量换算,将每天剂量折算成大鼠等效剂量作为中剂量组),西药组予美沙拉嗪灌胃(0.4g/kg),正常组同步饲养。连续给药14d。

1.6 标本采集与检测 1)大鼠一般情况。观察各组大鼠毛发、体质量、耗食耗水、大便、死亡情况。2)结肠组织病理学变化。末次给药后予10%水合氯醛腹腔注射麻醉处死全部大鼠,截取距肛门8cm处病变部位,沿纵轴切开,分别置于中性甲醛、戊二醛及液氮中备用,肉眼下放大镜检查结肠溃疡及其糜烂情况。3)HE染色检测各组UC大鼠结肠组织病理改变。具体步骤严格按说明操作,在光镜下观察标本病理学改变并摄片。4)大鼠结肠黏膜超微结构变化。采用H-7650透

射电镜检测各组 UC 大鼠结肠黏膜超微结构及细胞凋亡变化。5) 结肠 keap-1、Nrf2 以及 claudin-2 蛋白表达。采用免疫组化检测, 具体步骤严格按试剂盒说明操作, 由两名病理专业人员采用 Image Pro Plus 6.0 进行图像分析。以细胞呈棕褐色染色为阳性结果, 对照组采用 PBS 代替一抗。

1.7 统计学处理 应用 SPSS24.0 统计软件。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 符合正态分布资料采用单因素方差分析检验; 若为非正态分布资料采用秩和检验来比较两组间差异。P < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较 正常组同步生长, 造模期间各组均未见大鼠死亡, 自造模第2日起可见大鼠肛门污秽、有血便残留、食欲下降, 皮毛稀疏无光泽, 体质量无明显下降。肉眼用放大镜观察见距肛门8~12 cm 处病变最为明显, 部分糜烂表面附着少许黄白苔, 予标记后送检病理。

2.2 各组大鼠结肠组织病理学改变 光镜下见正常组结肠黏膜排列整齐, 未见炎性细胞浸润; 模型组见结肠黏膜表面出现缺损或脱落坏死, 溃疡形成, 隐窝结构消失、脓肿形成, 固有层大量炎性细胞浸润, 黏膜下层充血肿胀; 西药组见结肠黏膜不同程度缺损, 溃疡形成, 隐窝脓肿, 黏膜下层大量炎性细胞浸润; 中药各组见结肠黏膜尚完整, 但存在黏膜缺损, 隐窝脓肿, 部分可见出血点, 较多炎性细胞浸润固有层。见图1。

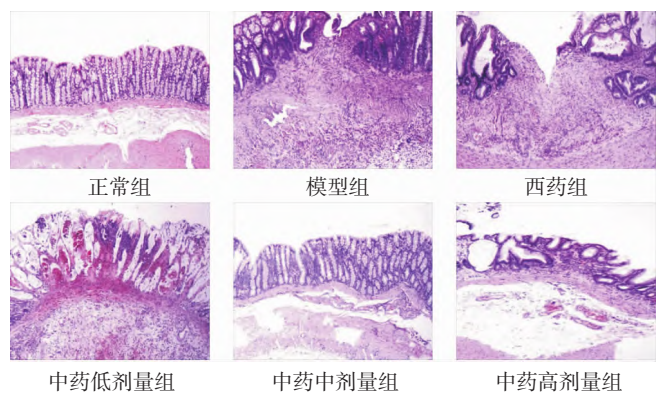


图1 各组 UC 大鼠结肠黏膜组织病理学改变(HE 染色, 10倍)

2.3 各组大鼠结肠黏膜超微结构及细胞凋亡情况 电镜下见正常组结肠上皮细胞单层柱状排列, 微绒毛发达密集, 整齐排列, 未见细胞坏死和凋亡; 模型组结肠上皮细胞微绒毛稀疏, 线粒体肿胀变大, 细胞间紧密连接消失, 可见细胞处于坏死期; 西药组见上皮细胞单层柱状排列, 但排列欠整齐, 线粒体肿胀、凋亡小体形成, 局灶可见坏死; 中药各组见上皮细胞体积明显变小、核固缩、凋亡小体形成, 局灶可见坏死。见图2。

2.4 各组大鼠结肠 keap-1、Nrf2 以及 claudin-2 蛋白表

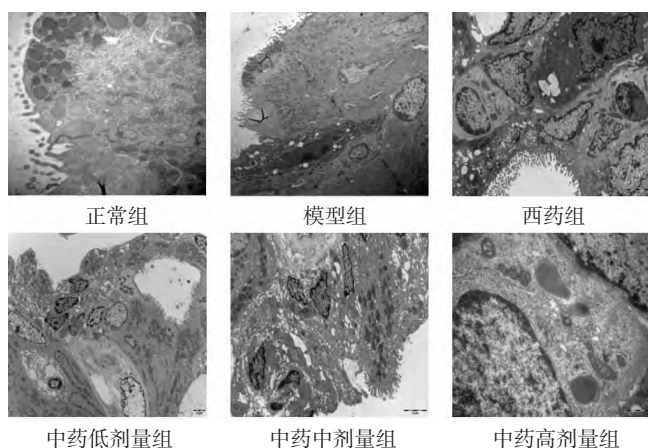


图2 各组 UC 大鼠电镜下结肠黏膜超微结构及细胞凋亡 (8 000倍)

达比较 与正常组比较, 模型组结肠 Keap-1、Nrf2 蛋白表达下降, claudin-2 蛋白表达上升。与模型组比较, 各给药组 Keap-1、Nrf2 蛋白表达上升, claudin-2 蛋白表达下降, 但西药组与模型组之间无统计学差异 (P > 0.05), 中药各剂量组与模型组、西药组比较有统计学差异 (P < 0.05), 中药低、中、高剂量组之间不存在组间差异 (P > 0.05)。见图3~图5, 表1。

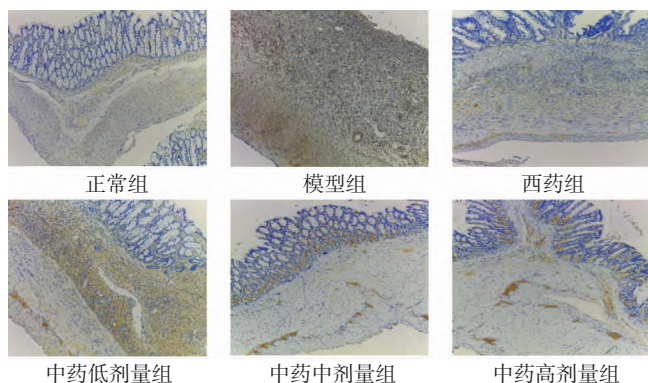


图3 各组 UC 大鼠结肠 keap-1 蛋白表达(10倍)

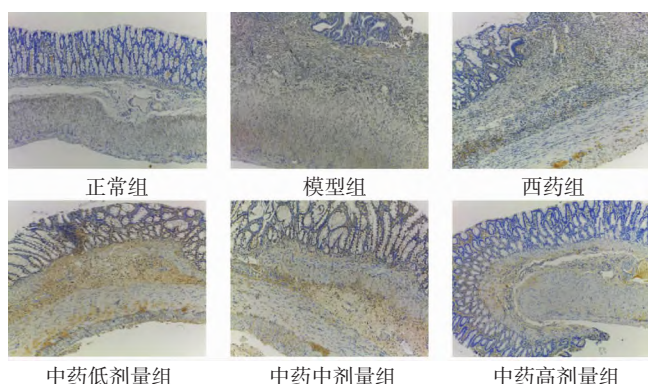


图4 各组 UC 大鼠结肠 Nrf2 蛋白表达(10倍)

3 讨论

本课题组在中医药理论指导下, 传承全国名老中

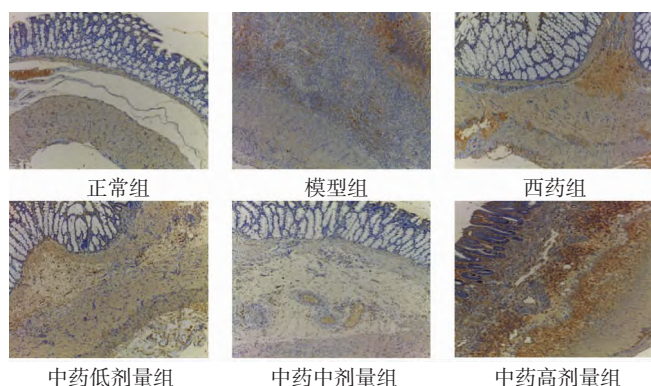


图5 各组UC大鼠结肠 claudin-2 蛋白表达(10倍)

表1 各组大鼠结肠黏膜 keap-1、Nrf2、claudin-2 蛋白表达比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	keap-1	Nrf2	claudin-2
正常组	6	6 543.92±834.83*	8 163.03±318.04*	3 352.83±633.96*
模型组	6	3 352.83±833.96	4 517.53±909.53	8 533.08±659.29
西药组	6	3 907.27±718.01	4 568.19±712.11	8 413.49±617.34
中药低剂量组	6	5 412.21±622.25 [△]	5 123.03±678.04 [△]	6 426.86±818.79 [△]
中药中剂量组	6	5 793.00±693.49 [△]	6 578.62±634.39 [△]	6 336.08±698.27 [△]
中药高剂量组	6	5 864.43±793.03 [△]	6 907.57±718.51 [△]	6 123.49±578.24 [△]

注:与模型组比较,* $P < 0.05$;与西药组比较,[△] $P < 0.05$ 。

医胡珂、谢建群、马贵同等教授临证经验,指出溃结当以“脾虚为本,湿热瘀毒为标”为基本特点。脾虚无以运化水液,聚湿成痰,痰随气而升无处不致,日久阻塞经络,化为瘀血,痰瘀互结,损伤肠络;而溃结之所以反复发作,其关键在于“湿”“热”“瘀”之邪留于体内,没有得到彻底根除,每遇外感或内伤的诱因而复发,如“邪气或动或静,其病乍发乍止”,由此提出“健脾清热活血”的基本大法。

基于“提高UC黏膜愈合质量是减少UC复发关键所在”的理念^[6-7],本研究从氧化应激介导炎症持续角度出发,探讨健脾清热活血方介导 keap-1-Nrf2 通路调控 claudin-2 表达干预溃疡性结肠炎的机制研究。健脾清热活血方主要由救必应、马齿苋、白术、白芍、水蛭、三七、炙甘草等药物组成,以救必应泻火解毒、清热利湿、行气止痛、凉血止血,归于大肠经,直抵病所为君药,马齿苋、水蛭、三七活血化瘀、祛腐生新为臣,佐以白术健脾益胃、燥湿和中,芍药甘草缓急止痛,全方共奏清热活血、健脾和胃之功效。笔者通过组织病理学证实与模型组比较,治疗组所见黏膜损伤程度较模型组有不同程度改善,部分可见出血点,较多炎性细胞浸润固有层。表明健脾清热活血方药具有减少组织损伤、促进修复黏膜、缓解溃结炎症,防治溃疡性结肠炎的效用。

反复炎症刺激形成氧化应激产生的线粒体内的活性氧(ROS)爆发直接或间接地损伤细胞内蛋白质、脂

质、核酸等大分子物质的生理功能,是众多疾病发生的病理生理基础^[8]。keap-1-Nrf2-ARE 路径是机体最主要的抗氧化应激反应通路之一,参与机体炎癌转化、细胞凋亡、炎症反应及黏膜修复等多方面^[9]。Nrf2 属于 CNC 转录因子家族成员之一,广泛存在于机体多个组织器官中,Kelch 样环氧氯丙烷结合蛋白 1(keap 1)是 Nrf2 的重要受体,生理状态下,Nrf2 位于细胞质中,与 keap 1 结合,处于被抑制状态,当受到氧化应激信号刺激后,Nrf2 迅速与变构的 keap 1 解耦连,以稳定状态转位进入细胞核,与小 Maf 蛋白结合形成异二聚物,并与一顺式作用元件即抗氧化反应元件(ARE)结合,结合 ARE 上的 GCTGAGTCA 位点,参与下游一系列 II 相解毒酶及抗氧化酶基因的转录与调控。ARE 是一个特异的 DNA 启动子结合序列,位于所调控的抗氧化酶基因和 II 相解毒酶基因的 5'端启动序列^[10-11]。Claudin 蛋白家族作为反映肠黏膜屏障最重要的生物标记物,在维护肠黏膜屏障完整中发挥重要的生物学作用^[12]。claudin 蛋白是构成紧密连接复合体的主要骨架,不同的 claudin 分子对紧密连接的通透性有不同的影响。一部分 claudin 分子可以形成特异性离子通道而增加上皮、内皮通透性,称为“leaking”claudin,包括 claudin-2、claudin-10 等^[13-14]。本研究发现模型组 keap-1、Nrf2 蛋白表达明显下降,claudin-2 蛋白表达上升,说明 UC 炎症持续会导致体内抗氧化应激水平下降,导致细胞内 ROS 爆发、超载,导致细胞坏死、损伤,加重炎症的进程,甚至异型增生。同时也反映肠上皮通透性增加,由此可能造成大量的抗原通过受损肠黏膜屏障渗入肠道内,与食物抗原交互反应而导致炎症持续,导致靶器官受损。治疗后,治疗组 keap-1、Nrf2 蛋白表达上升,claudin-2 蛋白表达下降,说明健脾清热活血方可能通过促进机体内源性的反应性氧化应激的清除而达到缓解炎症的效用。

总的来说,本次研究初步证实健脾清热活血方通过上调 keap-1、Nrf2 表达,下调 claudin-2 表达,修复黏膜屏障减少抗原刺激而发挥防治 UC 的效用。

参考文献

[1] 李华燕,张涛,张颖芹.健脾清热活血方与美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎的对比研究[J].中国中西医结合消化杂志,2011,19(4):227-230.

[2] Patlevi P, Vaková J, vorc P Jr, et al. Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases[J]. Integr Med Res, 2016, 5(4): 250-258.

[3] Schwerdt T, Bryant RV, Pandey S, et al. NOX1 loss-of-function genetic variants in patients with inflammatory bowel disease[J]. Mucosal Immunol, 2018, 11(2): 562-574.

[4] Ma J, Yin G, Lu Z, et al. Casticin prevents DSS induced ulcerative colitis in mice through inhibitions of NF-κB pathway and ROS signaling[J]. Phytother Res, 2018, 32(9): 1770-

1783.

[5] Perera AP, Kunde D, Eri R. NLRP3 inhibitors as potential therapeutic agents for treatment of inflammatory bowel disease[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(16):2321-2327.

[6] 张涛, 谢建群. 大鼠溃疡性结肠炎模型的实验研究[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2006, 14(4):240-242.

[7] Yan Y, Ren F, Wang P, et al. Synthesis and evaluation of a prodrug of 5-aminosalicylic acid for the treatment of ulcerative colitis[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2019, 22(12):1452-1461.

[8] Yang S, Lian G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 467(1-2):1-12.

[9] Rojo de la Vega M, Chapman E, Zhang DD. NRF2 and the Hallmarks of Cancer[J]. *Cancer Cell*, 2018, 4(1):21-43.

[10] Li J, Wang H, Zheng Z, et al. Mkp-1 cross-talks with Nrf2/Ho-1 pathway protecting against intestinal inflammation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 124:541-549.

[11] Wang Y, Wang H, Qian C, et al. 3-(2-Oxo-2-phenylethylidene)-2,3,6,7-tetrahydro-1H-pyrazino[2,1-a]isoquinolin-4(11bH)-one (compound 1), a novel potent Nrf2/ARE inducer, protects against DSS-induced colitis via inhibiting NLRP3 inflammasome[J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 101:71-86.

[12] Fouad MR, Salama RM, Zaki HF, et al. Vildagliptin attenuates acetic acid-induced colitis in rats via targeting PI3K/Akt/NFκB, Nrf2 and CREB signaling pathways and the expression of lncRNA IFNG-AS1 and miR-146a[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 92:107354.

[13] Taman H, Fenton CG, Hensel IV, et al. Transcriptomic landscape of treatment-Naïve ulcerative colitis[J]. *J Crohns Colitis*, 2018, 12(3):327-336.

[14] Amasheh S, Fromm M, Günzel D. Claudins of intestine and nephron—a correlation of molecular tight junction structure and barrier function[J]. *Acta Physiologica*, 2011, 201(1):133-140.

[15] Markov AG, Veshnyakova A, Fromm M, et al. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2010, 180(4):591-598.

(收稿日期 2021-05-30)

(上接第 1901 页)

[3] 阳正国. 中医治疗急性心肌梗死研究进展[J]. *实用中医药杂志*, 2012, 28(5):433-436.

[4] 任宏强, 赵利, 王忠, 等. 复方丹参滴丸对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡和凋亡相关蛋白的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(12):1084-1088.

[5] 李建, 蒋涛. 复方丹参滴丸对急性心肌梗死左心室重构的影响[J]. *天津药学*, 2003, 15(1):36-38.

[6] David G, Aurélien G, Matthias W, et al. Swiss Target Prediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules[J]. *Nucleic acids research*, 2014, 42(Web Server issue):W32-38.

[7] Shannon, Paul, Markeil, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks.[J]. *Genome Research*, 2003, 13(11):2498-2504.

[8] 单宏丽, 张莉, 张勇, 等. MAPK/SRF/microRNA—丹参酮ⅡA心肌保护作用新机制[C]. *中国生理学会第八届海峡两岸心血管科学研讨会论文集*, 2011:2.

[9] 唐玉, 成亮, 高建, 等. 槲皮素对急性心肌梗死大鼠模型白细胞黏附分子表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2005, 25(1):80-82.

[10] 史艳霞, 马微. 基于Nrf2/HO-1及NF-κB途径探讨积雪草酸对急性心肌梗死大鼠的影响及其作用机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(11):1133-1139.

[11] 荣霞, 史艳霞, 杜宇. 积雪草酸通过SIRT3/β-catenin/PPARγ信号通路影响急性心肌梗死模型大鼠血管新生及心室重构[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(6):593-599.

[12] Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers[J]. *Human Genetics*, 2004, 115(2):112-115.

[13] Sonal PS, Paresh CS, Marissa A, et al. Human carboxylesterases: an update on CES1, CES2 and CES3 [J]. *Protein and peptide letters*, 2009, 16(10):1207-1214.

[14] Wang X, Wang G, Shi J, et al. CES1 genetic variation affects the activation of angiotensin-converting enzyme inhibitors[J]. *Pharmacogenomics*, 2016, 16:220-230.

[15] 杨新玲. 长非编码RNAs与癌症通路[J]. *生理科学进展*, 2017, 48(4):309-314.

[16] Zhang D, Lv FL, Wang GH. Effects of HIF-1α on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression [J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2018, 22(16):5071-5076.

[17] Cheng L, Yu H, Yan N, et al. Hypoxia-Inducible Factor-1α Target genes contribute to retinal neuroprotection [J]. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2017, 11(20):1-15.

[18] 万俊, 王爱玲, 吕浩敏. HIF-1α在骨髓间充质干细胞治疗大鼠急性心肌梗死中的作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(12):1234-1238.

[19] JR, Bradley. TNF-mediated inflammatory disease [J]. *The Journal of pathology*, 2008, 214(2):149-160.

(收稿日期 2021-04-29)