

本文引用:梁辉,左中夫,牛雪红. 过表达 Cdh1 蛋白对糖尿病大鼠视网膜神经元损伤的保护作用[J]. 新乡医学院学报,2020,37(7):617-621. DOI:10.7683/xyxyxb.2020.07.004.

【基础研究】

过表达 Cdh1 蛋白对糖尿病大鼠视网膜神经元损伤的保护作用

梁 辉¹, 左中夫², 牛雪红¹

(1. 丹东市第一医院眼科, 辽宁 丹东 118000; 2. 锦州医科大学解剖学教研室, 辽宁 锦州 121001)

摘要: **目的** 探讨过表达 Cdh1 蛋白对糖尿病(DM)大鼠视网膜神经元损伤的影响及机制。**方法** 将40只雄性 Sprague Dawley 大鼠随机分为对照组、DM组、过表达 Cdh1 组及阴性病毒组,每组10只。DM组、过表达 Cdh1 组及阴性病毒组大鼠采用单次腹腔注射链脲佐菌素(STZ)55 mg·kg⁻¹诱导 DM 模型。模型诱导成功后,过表达 Cdh1 组大鼠玻璃体内注射 6 μL 过表达 Cdh1 蛋白的慢病毒载体,阴性病毒组大鼠玻璃体内注射 6 μL 慢病毒载体稀释液,对照组和 DM 组大鼠不进行处理。12 周后,免疫组织化学染色检测各组大鼠视网膜组织中 Cdh1 表达,免疫荧光法检测各组大鼠视网膜组织中胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达,Western blot 法检测各组大鼠视网膜组织中 GFAP、Cdh1 蛋白相对表达量,苏木精-伊红染色法检测各组大鼠视网膜神经节细胞(RGC)数量。**结果** DM 组和阴性病毒组大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白表达及 RGC 数量低于对照组和过表达 Cdh1 组,GFAP 蛋白表达高于对照组和过表达 Cdh1 组($P < 0.05$);对照组大鼠视网膜组织中 Cdh1 和 GFAP 蛋白表达均低于过表达 Cdh1 组,RGC 数量高于过表达 Cdh1 组($P < 0.05$);阴性病毒组大鼠视网膜组织中 Cdh1、GFAP 蛋白表达及 RGC 数量与 DM 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 慢病毒过表达 Cdh1 蛋白对 DM 大鼠视网膜 Müller 细胞胶质增殖具有一定的抑制作用,能够减轻 RGC 损伤。

关键词: Cdh1 蛋白;糖尿病;Müller 细胞;胶质增殖

中图分类号: R774.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2020)07-0617-05

Protective effect of the overexpression of Cdh1 protein on retinal neuron injury in diabetic rats

LIANG Hui¹, ZUO Zhongfu², NIU Xuehong¹

(1. Department of Ophthalmology, the First Hospital of Dandong City, Dandong 118000, Liaoning Province, China; 2. Department of Anatomy, Basic Medical College, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanism of the overexpression of Cdh1 protein on retinal neuron injury in diabetes mellitus (DM) rats. **Methods** Forty male Sprague Dawley rats were randomly divided into control group, DM group, Cdh1 overexpression group and negative virus group, with 10 rats in each group. The rats in the DM group, the Cdh1 overexpression group and the negative virus group were given single intraperitoneal injection of streptozotocin (55 mg·kg⁻¹) to induce the DM model. After the models were successfully induced, the rats in the Cdh1 overexpression group were injected with 6 μL constructed lentiviral vector of overexpressing Cdh1 protein by intravitreal injection, the rats in the negative virus group was injected with 6 μL lentiviral dilution solution, while the rats in the control group and DM group were not treated. After 12 weeks, the expression of Cdh1 in retina tissues was detected by immunohistochemical staining, the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in retina tissues was detected by immunofluorescence, and the relative expression of GFAP and Cdh1 protein was detected by Western blot method, the number of retinal ganglion cell (RGC) was detected by hematoxylin-eosin staining. **Results** The expression of Cdh1 protein in retina tissues and the number of RGC in the DM group and negative virus group were lower than those in the control group and the Cdh1 overexpression group, and the expression of GFAP protein in retina tissues was higher than that in the control group and the Cdh1 overexpression group ($P < 0.05$); the expression of Cdh1 and GFAP protein in retina tissues in the control group was lower than that in the Cdh1 overexpression group, and the number of RGC was higher than that in the Cdh1 overexpression group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of Cdh1 and GFAP protein in retina tissues and the number of RGC between the negative virus group and the DM group ($P > 0.05$). **Conclusion** Overexpression of Cdh1 protein by lentiviral vector can inhibit the glial proliferation of retinal Müller cells in DM rats, and it can reduce the damage of RGC.

Key words: Cdh1 protein; diabetes mellitus; Müller cells; glial proliferation

DOI: 10.7683/xyxyxb.2020.07.004

收稿日期: 2019-09-18

基金项目: 中国博士后科学基金项目(编号: 2017M612870); 辽宁省自然科学基金(编号: 201602340)。

作者简介: 梁 辉(1969-), 女, 辽宁丹东人, 学士, 副主任医师, 研究方向: 糖尿病视网膜病变。

通信作者: 牛雪红(1965-), 女, 辽宁丹东人, 学士, 主任医师, 研究方向: 糖尿病视网膜病变; E-mail: 13904153056@163.com。

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)可引起 Müller 细胞损伤,表现为胶质增殖甚至瘢痕形成^[1-2]。在 DR 进程中,损伤的 Müller 细胞可分泌众多细胞因子造成神经元功能障碍^[3],从而抑制神经元再生,最终引起视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)数量的减少^[4-5]。因此,抑制 Müller 细胞增殖可有效减轻 DR 对视网膜的损伤。Cdh1 是细胞周期末期促进复合物(anaphase promoting complex, APC)的调节亚基,可调控细胞周期^[6],近年来发现其与胶质细胞增殖关系密切^[7]。因此,本研究拟观察 DR 状态下 Cdh1 在视网膜内的表达情况,进一步探讨 Müller 细胞胶质增殖与 Cdh1 蛋白表达的关系,为研究 DR 的治疗方案拓展思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 Sprague Dawley 大鼠 40 只,体质量 220~240 g,购自锦州医科大学。

1.2 主要试剂与仪器 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自美国 Sigma 公司,过表达 Cdh1 蛋白的慢病毒载体购自上海吉玛制药技术有限公司;兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、兔抗大鼠 β -actin 一抗购自英国 Abcam 公司,兔抗大鼠 Cdh1 一抗购自北京奥维亚生物技术有限公司,二抗购自北京碧云天生物技术公司;荧光倒置显微镜购自日本 Olympus 公司,冰冻切片机构自德国 SLEE 公司,水平电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 动物分组及模型制备 采用随机数字表法将 40 只大鼠随机分为对照组、糖尿病(diabetes mellitus, DM)组、过表达 Cdh1 组和阴性病毒组,每组 10 只。DM 组、过表达 Cdh1 组及阴性病毒组大鼠单次腹腔注射 STZ 55 mg·kg⁻¹,72 h 后采集尾静脉血,检测血糖水平,血糖 >16.7 mmol·L⁻¹即为 DM 模型构建成功。模型诱导成功后,依据药品说明书,过表达 Cdh1 组大鼠双侧玻璃体腔注射 6 μ L 过表达 Cdh1 蛋白的慢病毒载体,阴性病毒组大鼠给予 6 μ L 慢病毒载体稀释液,对照组和 DM 组大鼠不任何处理。玻璃体腔注射时采用质量分数 10% 水合氯醛麻醉,实验期间大鼠正常喂养,未出现动物死亡。实验遵循国家《实验动物管理条例》。

1.4 样本制备 干预 12 周后,每组取 5 只大鼠,麻醉后以 40 g·L 多聚甲醛固定,然后使用手术剪取眼球,质量分数 10%、20%、30% 梯度蔗糖溶液脱水,最佳切削温度化合物(optimal cutting temperature compound, OCT)包埋切片,厚度为 15 μ m,湿盒内 4 $^{\circ}$ C 保存,用于免疫荧光、免疫组织化学染色及苏木

精-伊红染色(hematoxylin eosin, HE)染色。其余大鼠麻醉处死分离视网膜,裂解,冰上剪碎,12 000 r·min⁻¹离心 30 min 后取上清液, -20 $^{\circ}$ C 保存用于后续实验。

1.5 免疫组织化学检测大鼠视网膜组织中 Cdh1 表达 取“1.4 项”制备的切片,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)洗涤 3 次,每次 5 min;体积分数 3% H₂O₂ 室温浸泡 10 min, PBS 洗涤 3 次;体积分数 3% 山羊血清室温孵育 30 min;滴加兔抗大鼠 Cdh1 (1:500), 4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 洗涤 3 次;滴加二抗,室温孵育 30 min;PBS 洗涤 3 次;滴加链霉-亲和素-生物素-酶复合物试剂,室温孵育 30 min;PBS 洗涤 3 次;3,3'-二氨基苯胺显色后显微镜观察,棕黄色为阳性表达。应用 Image J 软件分析 Cdh1 阳性表达率,阳性表达率 = 阳性区域面积/整个图片面积。

1.6 免疫荧光检测大鼠视网膜组织中 GFAP 表达

取“1.4 项”制备的切片, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;体积分数 5% 山羊血清 + 体积分数 0.5% Triton-100 室温孵育 2 h;滴加兔抗大鼠 GFAP (1:300), 4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 洗涤 4 次,每次 3 min;滴加山羊抗兔 A488, 室温孵育 2 h;PBS 洗涤 4 次,每次 3 min;封片后荧光显微镜观察并拍照,采用显微镜自带软件分析荧光吸光度值,以对照组荧光吸光度为 100%,进而换算出各组荧光密度百分比。

1.7 Western blot 法检测大鼠视网膜组织中 GFAP、Cdh1 蛋白相对表达

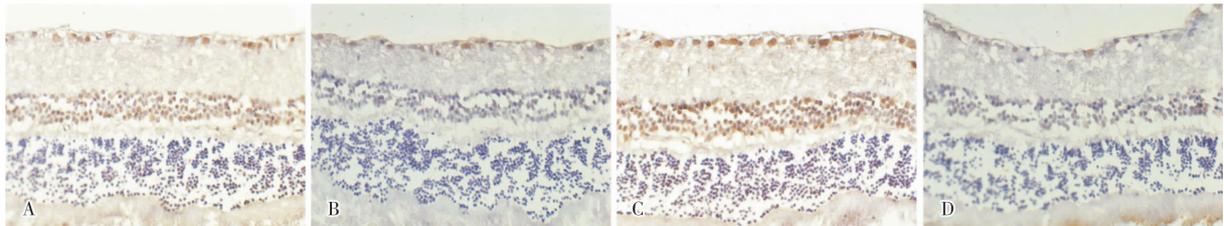
提取视网膜总蛋白,二喹啉甲酸法测蛋白浓度,最终加入 15 μ L 样品缓冲液。质量分数 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至聚偏氟乙烯膜,以含体积分数 1% 牛血清白蛋白的 TBST 室温封闭 2 h;加入一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜;TBST 洗涤 4 次;加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤 4 次;电化学发光试剂盒显影, Image J 软件分析灰度值,蛋白相对表达量 = 蛋白灰度值/内参灰度值,实验重复 6 次,取均值。

1.8 HE 染色检测 RGC 数量 取“1.4 项”制备的切片, PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;滴加苏木精反应 2 min;PBS 中浸泡 1 min,自来水冲洗;体积分数 95% 乙醇脱水 1 min;伊红浸染 2 min,自来水冲洗;脱水透明后封片,拍照后应用 Image J 软件计数 RGC 数量。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白阳性表达率比较 结果见图 1。对照组、DM 组、过表达 Cdh1 组和阴性病毒组大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白阳性表达率分别为(21.17 ± 0.15)%、(9.28 ± 0.12)%、(32.19 ± 0.13)%、(9.36 ± 0.18)%。DM 组及阴性病毒组大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白阳性表达率



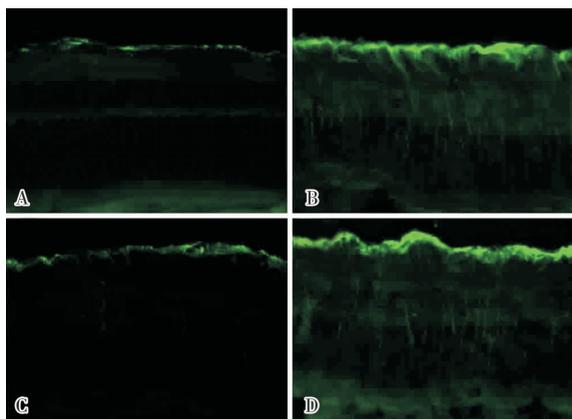
A:对照组;B:DM组;C:过表达 Cdh1 组;D:阴性病毒组。

图 1 各组大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白表达 (免疫组织化学染色, ×400)

Fig. 1 Expression of Cdh1 protein in retinal tissues of rats in each group (immunohistochemistry staining, ×400)

2.2 各组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白表达比较

结果见图 2。对照组、DM 组、过表达 Cdh1 组和阴性病毒组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白表达分别为(100.00 ± 0.00)%、(183.72 ± 1.42)%、(125.80 ± 1.12)%、(178.26 ± 1.05)%。DM 组、过表达 Cdh1 组及阴性病毒组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白表达高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);过表达 Cdh1 组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白表达低于 DM 组和阴性病毒组,差异有统计学意义($P < 0.05$);阴性病毒组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白表达与 DM 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A:对照组;B:DM组;C:过表达 Cdh1 组;D:阴性病毒组。

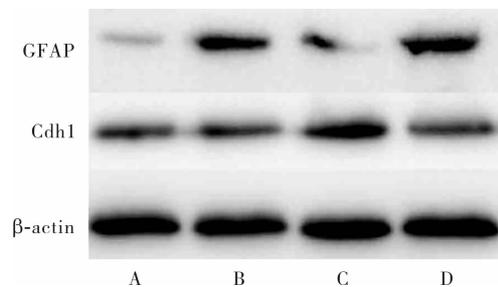
图 2 各组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白表达 (免疫荧光染色, ×400)

Fig. 2 Expression of GFAP protein in retina tissues of rats in each group (immunofluorescent staining, ×400)

2.3 各组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白、Cdh1 蛋白相对表达量比较 结果见图 3 和表 1。DM 组和阴性病毒组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白相对表达量

低于对照组,过表达 Cdh1 组大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白阳性表达率高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);过表达 Cdh1 组大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白阳性表达率高于 DM 组和阴性病毒组,差异有统计学意义($P < 0.05$);阴性病毒组大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白阳性表达率与 DM 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

高于对照组,Cdh1 表达低于对照组,差异有统计意义($P < 0.01$)。过表达 Cdh1 组大鼠视网膜组织中 GFAP、Cdh1 蛋白相对表达量高于对照组($P < 0.05$);过表达 Cdh1 组大鼠视网膜组织中 GFAP 蛋白相对表达量低于阴性病毒组,Cdh1 蛋白相对表达量高于阴性病毒组;而阴性病毒组与 DM 组 GFAP、Cdh1 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A:对照组;B:DM组;C:过表达 Cdh1 组;D:阴性病毒组。

图 3 各组大鼠视网膜组织中 GFAP、Cdh1 蛋白表达 (Western blot)

Fig. 3 Expression of GFAP and Cdh1 proteins in retinal tissues of rats in each group (Western blot)

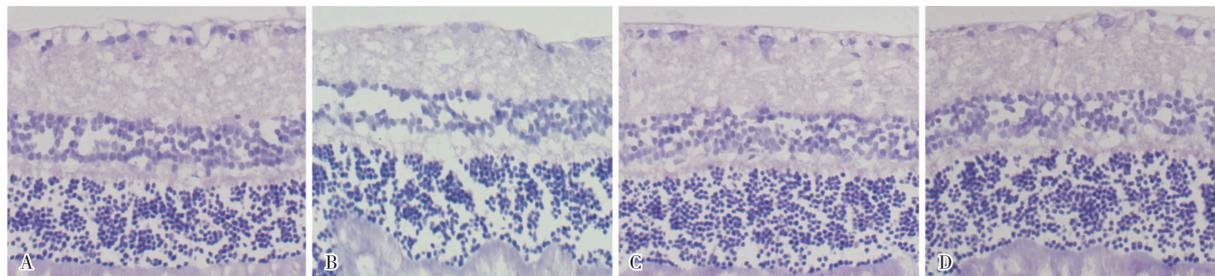
表 1 4 组大鼠视网膜组织中 GFAP、Cdh1 蛋白相对表达量比较

Tab. 1 Comparison of the relative expression of GFAP and Cdh1 protein in retinal tissues of rats among the four groups

组别	n	GFAP 蛋白	Cdh1 蛋白
对照组	10	0.09 ± 0.02	0.18 ± 0.07
DM 组	10	0.25 ± 0.12 ^a	0.11 ± 0.01 ^a
过表达 Cdh1 组	10	0.15 ± 0.05 ^{ab}	0.24 ± 0.04 ^a
阴性病毒组	10	0.25 ± 0.09 ^{ab}	0.11 ± 0.03 ^a

注:与对照组比较^a $P < 0.05$;与 DM 组比较^b $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠视网膜组织中 RGC 数量比较 结果见图4。对照组、DM 组、过表达 Cdh1 组和阴性病毒组大鼠视网膜组织中 RGC 数量分别为 (15.62 ± 0.47) 、 (7.19 ± 0.34) 、 (12.42 ± 0.39) 、 (8.24 ± 0.41) 个。DM 组、过表达 Cdh1 组及阴性病毒组大鼠视网膜组织中



A:对照组;B:DM组;C:过表达 Cdh1 组;D:阴性病毒组。

图4 各组大鼠视网膜组织中 RGC 数量(HE 染色, $\times 400$)

Fig.4 RGC number in retinal tissues of rats in each group(HE staining, $\times 400$)

3 讨论

Cdh1 可负性调节细胞周期,从而使细胞从 G_1 期向 S 期进行^[8]。有学者研究发现,Cdh1 可下调周期调节蛋白 Skp2,进而调控 p27 的变化,使细胞停滞在 G_1 期,避免异常增殖^[9]。由此推测,调控 Cdh1 活性可能对 DR 状态下 Müller 细胞的胶质增殖有抑制作用。本课题通过构建慢病毒 Cdh1 蛋白过表达载体,并注射入大鼠玻璃体腔,使视网膜内过表达外源性 Cdh1 蛋白,观察其对 DR 状态下 Müller 细胞增殖是否具有调控作用。本研究发现,DR 状态下,大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白表达明显降低,提示高血糖会引起细胞周期末期促进复合物-Cdh1 活性下降。这与邱瑾等^[10]的研究结果一致。

研究发现,DR 状态下 Müller 细胞胶质增殖随病程的延长可造成胶质瘢痕,最终打破视网膜稳态,引起神经细胞损伤^[11]。因此,在 DR 早期减少 Müller 细胞胶质增殖,对防治 DR 尤为重要。GFAP 为中间丝骨架蛋白,研究证实,GFAP 与视网膜胶质增殖密切相关^[12-13],可作为 Müller 细胞增殖的标志物。GFAP 在 Müller 细胞中的作用尚不完全清楚,但 GFAP 表达量的改变与神经退行性疾病密切相关^[14-15]。在 DR 状态下,视网膜 GFAP 表达的增加会引起谷氨酸代谢的改变,而谷氨酸的长期堆积会对视网膜产生毒性作用^[16]。本研究通过大鼠玻璃体腔注射慢病毒载体过表达 Cdh1,成功上调了大鼠视网膜组织中 Cdh1 蛋白表达量。免疫荧光检测结果显示,过表达 Cdh1 蛋白后视网膜组织中 GFAP 表达明显降低,说明调节视网膜组织中 Cdh1 蛋白的表达可抑制 DR 状态下 Müller 细胞胶质增殖。

DR 状态下视网膜血管通透性增加,炎症因子、

RGC 数量显著少于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);过表达 Cdh1 组大鼠视网膜组织中 RGC 数量显著多于 DM 组和阴性病毒组,差异有统计学意义($P < 0.05$);阴性病毒组与 DM 组大鼠视网膜组织中 RGC 数量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

谷氨酸等毒性物质进入视网膜,从而破坏神经元和胶质细胞的完整性,最终引起神经元凋亡或死亡^[17]。RGC 轴突构成视神经,越来越多的证据表明,在 DR 早期即发生视网膜 RGC 死亡,且 RGC 数量减少是 DR 进程中的重要组成部分^[18]。与正常大鼠比较,DR 大鼠视网膜神经细胞发生凋亡,特别是在视网膜节细胞层^[19]。本研究发现,DR 状态下视网膜组织中 RGC 数量明显减少,而过表达 Cdh1 蛋白后 RGC 数量有所增加。

综上所述,Cdh1 蛋白表达下降预示着视网膜细胞周期再循环,异常进入细胞周期可能导致 RGC 凋亡或死亡,而 Müller 细胞则发生反应性增殖。因此,慢病毒过表达 Cdh1 蛋白对 DM 大鼠视网膜 Müller 细胞胶质增殖具有一定的抑制作用,能够减轻 RGC 损伤。Cdh1 作为 DR 状态下视网膜神经损伤的重要参与者,探讨调控其活性对 DR 损伤的影响具有重要的研究价值。

参考文献:

- [1] BRESSLER S B, BEAULIEU W T, GLASSMAN A R, *et al.* Factors associated with worsening proliferative diabetic retinopathy in eyes treated with panretinal photocoagulation or ranibizumab [J]. *Ophthalmology*, 2017, 124(4):431-439.
- [2] LIU L, ZUO Z, LU S, *et al.* Naringin attenuates diabetic retinopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress and NF- κ B activation *in vivo* and *in vitro*[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, 20(7):813-821.
- [3] LE Y Z. VEGF production and signaling in Müller glia are critical to modulating vascular function and neuronal integrity in diabetic retinopathy and hypoxic retinal vascular diseases [J]. *Vis Res*, 2017, 139(10):108-114.
- [4] REN H L, LV C N, XING Y, *et al.* Downregulated nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) aggravates cognitive impairments via

- neuroinflammation and synaptic plasticity in the senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mouse: a model of accelerated senescence[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24(2):1132-1144.
- [5] SALVI L, PLATEROTI P, BALDUCCI S, et al. Abnormalities of retinal ganglion cell complex at optical coherence tomography in patients with type 2 diabetes: a sign of diabetic polyneuropathy, not retinopathy[J]. *J Diabetes Complicat*, 2015, 30(3):469-476.
- [6] CHENG R, LIANG X, ZHAO Q, et al. APC (Cdh1) controls cell cycle entry during liver regeneration[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 354(2):78-84.
- [7] SILIES M, KLÄMBT C. APC/CFzr/Cdh1-dependent regulation of cell adhesion controls glial migration in the *Drosophila* PNS[J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(11):1357-1364.
- [8] ONDRACKA A, ROBBINS J A, CROSS F R. An APC/C-Cdh1 biosensor reveals the dynamics of Cdh1 inactivation at the G₁/S transition[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7):159-166.
- [9] LIU W, WU G, LI W, et al. Cdh1-anaphase-promoting complex targets Skp2 for destruction in transforming growth factor β -induced growth inhibition[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(8):2967-2979.
- [10] 邱瑾,姚文龙,张玥,等. 氧糖剥夺对体外培养大鼠星形胶质细胞内 Cdh1 蛋白表达的影响及机制[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2012, 41(3):274-277.
- [11] COUGHLIN B A, FEENSTRA D J, MOHR S. Müller cells and diabetic retinopathy[J]. *Vision Res*, 2017, 139(10):93-100.
- [12] IVAN F B, ROBERT J, SORIANO-ROMAN LAURA, et al. Histologic characterization of retina neuroglia modifications in diabetic zucker diabetic fatty rats[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(11):4925-4933.
- [13] LIU B, LV C, ZHANG J, et al. Effects of eldepryl on glial cell proliferation and activation in the substantia nigra and striatum in a rat model of Parkinson's disease. [J]. *Neurol Res*, 2017, 39(5):459-467.
- [14] BRENNER M, NICHOLAS A P. The significance of deiminated GFAP in neurodegenerative diseases with special emphasis on alexander disease[J]. *Pro Dei Hum Heal Dis*, 2017, 21(9):391-412.
- [15] 刘晓斌,李民,黄卫东. 血清肿瘤坏死因子- α 和胶质纤维酸性蛋白水平与脑胶质瘤恶性程度及患者预后的相关性[J]. *新乡医学院学报*, 2017, 34(12):1097-1100.
- [16] JHA K A, NAG T C, WADHWA S, et al. Immunohistochemical localization of GFAP and glutamate regulatory proteins in chick retina and their levels of expressions in altered photoperiods[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 37(6):1-14.
- [17] DEHDASHTIAN E, MEHRZADI S, YOUSEFI B, et al. Diabetic retinopathy pathogenesis and the ameliorating effects of melatonin; involvement of autophagy, inflammation and oxidative stress[J]. *Life Sci*, 2017, 193(1):20-33.
- [18] NG D S, CHIANG P P, TAN G, et al. Retinal ganglion cell neuronal damage in diabetes and diabetic retinopathy [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2016, 44(4):243-250.
- [19] HUANG W J, GAO F J, HU F Y, et al. Asiatic acid prevents retinal ganglion cell apoptosis in a rat model of glaucoma[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12(8):489-498.

(本文编辑:杨 博)

(上接第 616 页)

- [7] GALM O, WILOP S, REICHEL T, et al. DNA methylation changes in multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2004, 18(10):1687-1692.
- [8] GONZALEZ-PAZ N, CHNG W J, MCCLURE R F, et al. Tumor suppressor p16 methylation in multiple myeloma: biological and clinical implications[J]. *Blood*, 2007, 109(3):1228-1232.
- [9] BRAGGIO E, MAIOLINO A, GOUVEIA M E, et al. Methylation status of nine tumor suppressor genes in multiple myeloma[J]. *Int J Hematol*, 2010, 91(1):87-96.
- [10] 马媛,史进方,仇惠英,等. CMTM5 表达对多发性骨髓瘤细胞增殖的影响及其机制研究[J]. *中华血液学杂志*, 2019, 40(1):58-62.
- [11] 贾谷,马艳萍,张灵,等. 多发性骨髓瘤患者骨髓单个核细胞与 U266 细胞中 ICSBP/IRF8 基因表达沉默的初步研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2012, 20(5):1127-1130.
- [12] KANTARJIAN H, ISSA J P J, ROSENFELD C S, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study[J]. *Cancer*, 2006, 106(8):1794-1803.
- [13] WU D, DU X, JIN J, et al. Decitabine for treatment of myelodysplastic syndromes in Chinese patients: an open-label, phase-3b study[J]. *Adv Ther*, 2015, 32(11):1140-1159.
- [14] ZHANG C, XIANG T, LI S, et al. The novel 19q13 KRAB zinc-finger tumour suppressor ZNF382 is frequently methylated in oesophageal squamous cell carcinoma and antagonises Wnt/ β -catenin signalling[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5):573.
- [15] LIU Z, ZHANG J, GAO Y, et al. Large-scale characterization of DNA methylation changes in human gastric carcinomas with and without metastasis [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(17):4598-4612.
- [16] ECCO G, IMBEAULT M, TRONO D, et al. KRAB zinc finger proteins[J]. *Development*, 2017, 144(15):2719-2729.
- [17] WANG W, CAI J, LIN Y, et al. Zinc fingers function cooperatively with KRAB domain for nuclear localization of KRAB-containing zinc finger proteins[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e92155.
- [18] KUANG S Q, TONG W G, YANG H, et al. Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia [J]. *Leukemia*, 2008, 22(8):1529-1538.
- [19] TAO Y F, HU S Y, LU J, et al. Zinc finger protein 382 is down-regulated by promoter hypermethylation in pediatric acute myeloid leukemia patients[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(6):1505-1515.

(本文编辑:孟 月)