

塞来昔布下调 JAML 抑制 糖尿病视网膜病变大鼠 VEGF 的表达及其机制

段梅¹,曹凡¹,桂衍超¹,陈可洋²,陶黎明¹,蒋正轩¹

摘要 目的 探讨塞来昔布对糖尿病视网膜病变(DR)大鼠视网膜血管内皮生长因子(VEGF)的作用及其机制。方法 45只SD大鼠,随机分为正常对照(NC)组、DR组、塞来昔布干预DR(DR+C)组。腹腔注射1%链尿佐菌素(STZ)建立糖尿病模型。1个月后,DR+C组给予塞来昔布(50 mg/kg)灌胃(1次/d)。2个月后检测血清总胆固醇(TC)、胰岛素(Insulin);观察视网膜组织病理特征;Western blot检测视网膜连接黏附分子样蛋白(JAML)、VEGF及其信号通路各蛋白的表达;检测视网膜白介素(IL)-10、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)等蛋白分布。HUVEC细胞分为正常葡萄糖组(NG)组、高糖(HG)组和高糖加药塞来昔布(HG+C)组,检测上述蛋白的表达水平。结果 与DR组相比,DR+C组大鼠视网膜变薄;与NC组比较,DR+C组大鼠视网膜增厚。DR+C组视网膜JAML、磷脂酰肌醇激酶3(PI3K)、磷酸化磷脂酰肌醇激酶-3(P-PI3K)、缺氧诱导因子1- α (HIF1- α)、VEGF等蛋白低于DR组,高于NC组。DR+C组与DR组比较视网膜IL-10、VCAM-1表达下降。DR+C组和DR组TC含量高于NC组($P < 0.01$);DR+C组和DR组Insulin含量低于NC组($P < 0.001$)。与HG组相比,HUVEC细胞中HG+C组JAML、P-PI3K、HIF1- α 、VEGF等表达下降($P < 0.05$),但高于NG组($P < 0.05$);三组细胞PI3K蛋白差异无统计学意义。结论 塞来昔布能降低DR大鼠视网膜VEGF和炎症因子IL-10、VCAM-1的表达水平,其机制可能与JAML介导的PI3K/HIF1- α 信号通路有关。

关键词 塞来昔布;JAML;糖尿病视网膜病变;磷脂酰肌醇中图分类号 R 774.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)08-1293-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.008

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病眼病的主要并发症之一,已成为我国成年

人群致盲的首位疾病^[1]。DR发病率高、病因复杂,发病机制尚不完全清楚。研究^[2]表明,慢性炎症和高糖导致的视网膜缺氧在DR的发病过程中发挥重要的作用。塞来昔布是一种选择性非甾体消炎药,广泛用于抗炎和镇痛等治疗。Amrite et al^[3]研究证实眼周注射塞来昔布可抑制DR视网膜中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的升高,但其机制并不清楚。连接黏附分子样蛋白(junctional adhesion molecule-like protein, JAML)主要表达于肾小球足细胞、心血管内皮细胞^[4-5]。研究^[6]显示,JAML不仅增强白细胞和内皮细胞的黏附作用,还可以介导细胞内炎症反应,在炎症和损伤修复中发挥关键作用。目前,塞来昔布减轻DR发生的机制尚不清楚。该研究将在DR中研究塞来昔布对JAML表达的影响,以及塞来昔布对DR视网膜VEGF的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级8周龄雄性SD大鼠45只,体质量180~200 g(安徽医科大学动物实验中心提供),大鼠置于12 h/12 h光照黑暗交替、温度(25 \pm 1) $^{\circ}$ C、湿度(50 \pm 5)%的环境下,自由进食饮水,适应性喂养1周。该研究获得安徽医科大学第二附属医院科研和临床伦理委员会批准(编号:2021049)。遵守实验动物使用原则、护理原则及3R原则使用实验动物。

1.1.2 主要试剂与仪器 链尿佐菌素(streptozotocin, STZ)、HE染色试剂盒(货号:1120)购于北京索莱宝科技有限公司;枸橼酸钠、枸橼酸三钠、戊巴比妥均购自北京国药集团化学有限公司;塞来昔布购于美国辉瑞制药有限公司;原代人脐静脉内皮细胞(primary human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)和ECM培养基购自美国sciencell公司;胎牛血清由以色列BI公司提供;D-葡萄糖购于德国biofrox公司;0.25%胰酶细胞消化液(货号:C0203)、青霉素-链霉素-两性霉素B溶液(货号:C0223)、

2023-06-01 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82070986,82171043);安徽省学术和技术带头人科研活动经费资助项目(编号:2021H255)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院眼科,合肥 230601

²安徽医科大学卫生检验与检疫教研室,合肥 230032

作者简介:段梅,女,硕士研究生;

蒋正轩,主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: jiangzhengxuan@ahmu.edu.cn

BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0010)均购自上海碧云天生物有限公司;无血清细胞冻存液(货号:C40100)购于苏州新赛美生物科技公司;Anti-JAML 抗体(货号:ab183714)购自英国 Abcam 公司;抗磷酸化磷脂酰肌醇激酶-3 (phosphatidylinositol kinase-3, P-PI3K) 抗体(货号:AF3242), 抗磷脂酰肌醇激酶-3 (phosphatidylinositol kinase-3, PI3K) 抗体(货号:AF6242), 抗缺氧诱导因子 1- α (hypoxia-inducible factor1- α , HIF1- α) 抗体(货号:BF8002), 抗白介素-10 抗体(DF6894), 抗 VCAM-1 抗体(DF6082) 均购自溧阳亲科生物公司;抗 VEGF 抗体(货号:R26074)购自成都正能生物公司;总胆固醇(total cholesterol, TC)检测试剂盒(货号:A111-1-1)购自南京建成公司;胰岛素(Insulin)检测试剂盒(货号:CSB-E05070r)购于武汉华美科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 SD 大鼠糖尿病模型建立 将 45 只大鼠随机分为 3 组,分别为正常对照(NC)组、DR 组、塞来昔布干预 DR(DR + C)组,每组 15 只。DR 组和 DR + C 组大鼠按 60 mg/kg 剂量腹腔注射 STZ(以 pH 为 4.5 的 0.1 mmol/L 的枸橼酸盐缓冲液稀释),NC 组注射等量枸橼酸盐溶液。注射 3 d 后禁食 8 h,采尾静脉血测血糖浓度,以空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG) > 16.7 mmol/L 为糖尿病大鼠造模成功。FPG < 16.7 mmol/L 大鼠继续普通饲料喂养 1 周,重复造模,用 2 周造模成功。建模 1 个月后使用塞来昔布以 50 mg/kg 剂量每日单次灌胃,连续 2 个月。每周 1 次观察并记录 3 组大鼠进食量,饮水量及精神状态;每周测量 1 次体质量、1 次 FPG。

1.2.2 SD 大鼠视网膜组织病理变化 按 5 ml/kg 剂量腹腔注射 1% 的戊巴比妥钠全身麻醉 SD 大鼠,摘取右侧眼球,4% 多聚甲醛固定 24 h 后流水冲洗,梯度乙醇脱水后用二甲苯透明并透蜡,然后包埋;沿矢状面垂直视神经做石蜡切片,切片厚度 3 μ m;脱蜡后苏木素染色 3 min,自来水返蓝,伊红染色,使用中性感胶封片。400 倍光学显微镜下观察拍照。

1.2.3 免疫组织化学染色法(immunohistochemistry, IHC)检测 SD 大鼠视网膜组织中白介素(interleukin, IL)-10、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecules-1, VCAM-1)蛋白表达 每组选取 3 张石蜡切片,进行 IHC 实验。60 $^{\circ}$ C 恒温烘烤切片,脱蜡、梯度乙醇(100% - 95% - 80%)浸洗 3 次,之后流水冲洗切片至透明;将切片放入高压锅中,2 min 后取出,滴加 3% H_2O_2 室温孵育 10 min, PBS-T

洗 3 次,山羊血清室温封闭 20 min,甩干后滴加 IL-10(1 : 150)、VCAM-1(1 : 100)一抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;取出滴加二抗孵育,洗净后滴加 DAB 显色剂。苏木精染色,常规脱水,封片。使用 Image J 软件计算每张切片中阳性染色区域的平均灰度值,代表蛋白的表达情况。

1.2.4 Western blot 法检测 JAML、PI3K、P-PI3K、HIF1- α 、VEGF 等蛋白在大鼠视网膜组织的表达 称取视网膜组织 20 mg,加入 RIPA 裂解液匀浆,离心,取上清液,BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测总蛋白含量。按每孔 20 μ g 上样量进行 Western blot 实验。使用 Image J 软件分析各条带灰度值。目的蛋白表达量 = 目的条带灰度值/相对内参灰度值。

1.2.5 检测血清中 TC、Insulin 含量 SD 大鼠糖尿病建模 3 个月末,1% 戊巴比妥钠麻醉 SD 大鼠,经眶静脉取空腹血,4 $^{\circ}$ C 凝固后,3 000 r/min 离心 10 min,取上层血清检测 TC、Insulin 含量。

1.2.6 细胞培养 取出液氮冻存的 HUVEC 细胞放入 37 $^{\circ}$ C 水浴锅解冻,然后转移至含有 ECM 完全培养基的离心管中,离心,弃上清液;完全培养基重悬细胞,接种到培养瓶中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的培养箱中培养,待细胞融合至 80% 时使用 0.25% 胰酶细胞消化液消化,终止消化后收集细胞,并制成单细胞悬液。按每孔 2.5×10^5 个细胞含量接种于 6 孔板中培养 24 h。将细胞分为 3 组:正常葡萄糖(normal glucose, NG)组细胞采用无血清培养基培养,高糖(high glucose, HG)组细胞在含有 30 mmol/L 的葡萄糖无血清培养基中培养,高糖加药塞来昔布(high glucose and celecoxib, HG + C)组细胞在含有 30 mmol/L 葡萄糖和 10 μ mol/L 塞来昔布的无血清培养基中培养。塞来昔布溶解于二甲基亚砜(DMSO)中。

1.2.7 Western blot 法检测 3 组细胞 JAML、PI3K、P-PI3K、HIF1- α 、VEGF 等蛋白的表达 将处理后的细胞培养 24 h,使用细胞刮收集细胞,提取细胞总蛋白,按每孔 20 μ g 蛋白含量进行 Western blot 实验。用 Image J 软件分析各条带灰度值以计算目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 9 统计软件进行统计分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),两组之间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组 SD 大鼠体质量、血糖、饮食、饮水的变化

情况 NC组大鼠毛发明亮,体型肥硕;DR+C组、DR组大鼠体型瘦削,毛色暗淡。DR+C、DR组大鼠体重均低于NC组($F_{\text{组别}}=39.13, P<0.01$),而DR+C组与DR组差异无统计学意义(图1A和表1)。DR+C组、DR组FPG水平均高于NC组($F_{\text{组别}}=318.7, P<0.01$),而DR+C组与DR组FPG水平差异无统计学意义(图1B和表1)。DR+C组、DR组12h进食量与NC组比较差异无统计学意义($F_{\text{组别}}=1.704, P>0.05$)(图1C和表1);DR+C、DR组12h饮水量较NC组增多($F_{\text{组别}}=9.438, P<0.05$)(图1D和表1)。

2.2 3组SD大鼠视网膜组织病理变化情况 NC组细胞排列整齐,结构层次清晰;DR+C组和DR组视网膜疏松,层间结构不清;DR组大鼠视网膜血管扩张,内界膜不连续。3组大鼠视网膜厚度分析显示:DR+C组视网膜厚度、内丛状层(IPL)、内核层(INL)、外丛状层(OPL)、外核层(ONL)厚度低于DR组($P<0.05$);DR+C组与NC组视网膜厚度、

内核层、内丛状层厚度差异无统计学意义。见图2。

2.3 3组SD大鼠视网膜组织中IL-10、VCAM-1蛋白表达情况 对3组大鼠进行干预2个月后,采用IHC检测视网膜组织中IL-10、VCAM-1的蛋白表达水平。结果显示,DR组IL-10、VCAM-1蛋白表达水平高于NC组(分别为 $P<0.001, P<0.01$),DR+C组大鼠视网膜中IL-10、VCAM-1蛋白表达水平低于DR组(均 $P<0.01$)。见图3。

2.4 3组SD大鼠血清TC、Insulin含量变化情况

3组SD大鼠进行干预2个月后,检测大鼠血清TC、Insulin含量。DR+C组、DR组血清TC含量较NC组升高($P<0.01$);而DR+C组与DR组相比差异无统计学意义。DR+C组和DR组中血清Insulin含量较NC组均下降($P<0.001$);DR+C与DR组相比差异无统计学意义。见图4。

2.5 3组SD大鼠视网膜中JAML、VEGF表达水平及PI3K/HIF1- α 信号通路的分子表达情况

Western blot法检测JAML和VEGF的表达水平,结

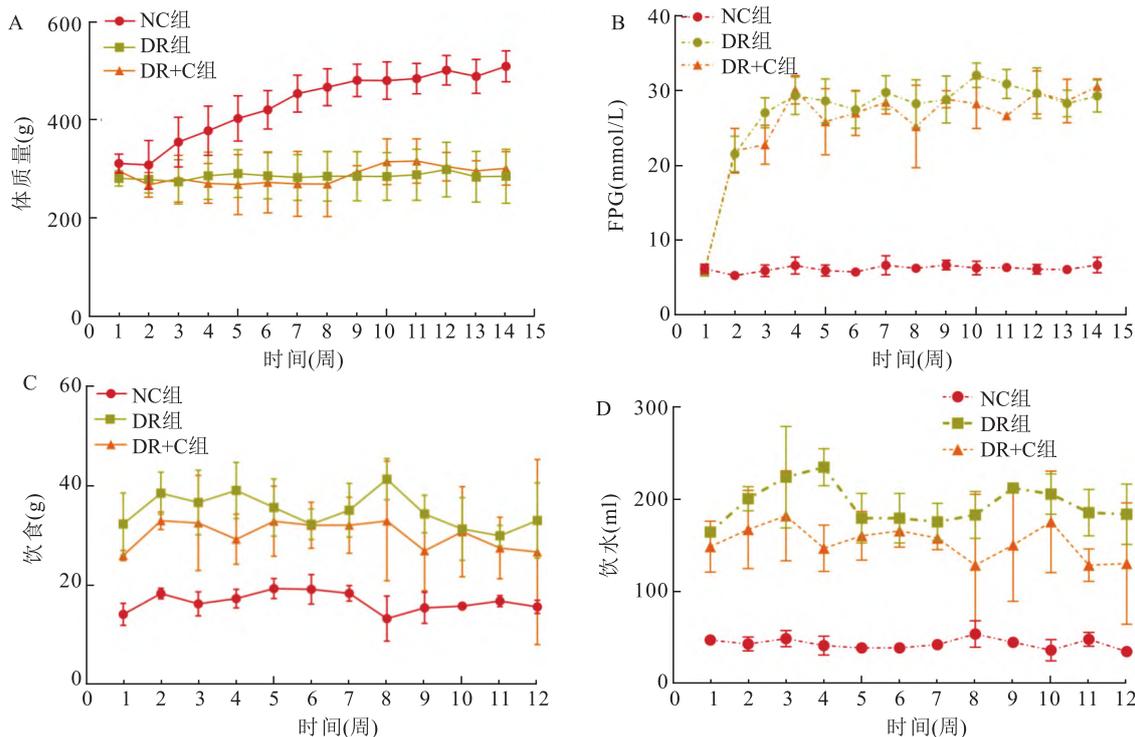


图1 3组SD大鼠体重、FPG、饮食、饮水变化情况

A: 体重; B: FPG; C: 饮食; D: 饮水

表1 3组SD大鼠造模3个月后体重、FPG、饮食、饮水比较

组别	n	体重(g)	FPG (mmol/L)	饮食(g)	饮水(ml)
NC	5	509.10 ± 31.51	6.80 ± 1.04	15.78 ± 1.30	35.00 ± 5.00
DR	6	285.90 ± 55.13	29.35 ± 2.14	33.00 ± 7.55	183.30 ± 32.53
DR+C	3	301.60 ± 34.34	30.60 ± 1.00	26.73 ± 18.50	130.00 ± 65.57

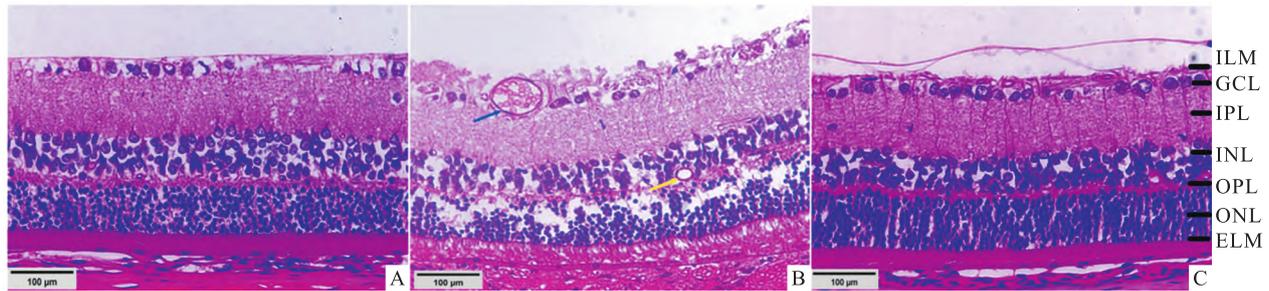


图2 3组大鼠视网膜组织病理变化 HE染色 ×400

A: NC组; B: DR组; 蓝色箭头: 指示新生血管; 黄色箭头: 指示空泡变性; C: DR+C组

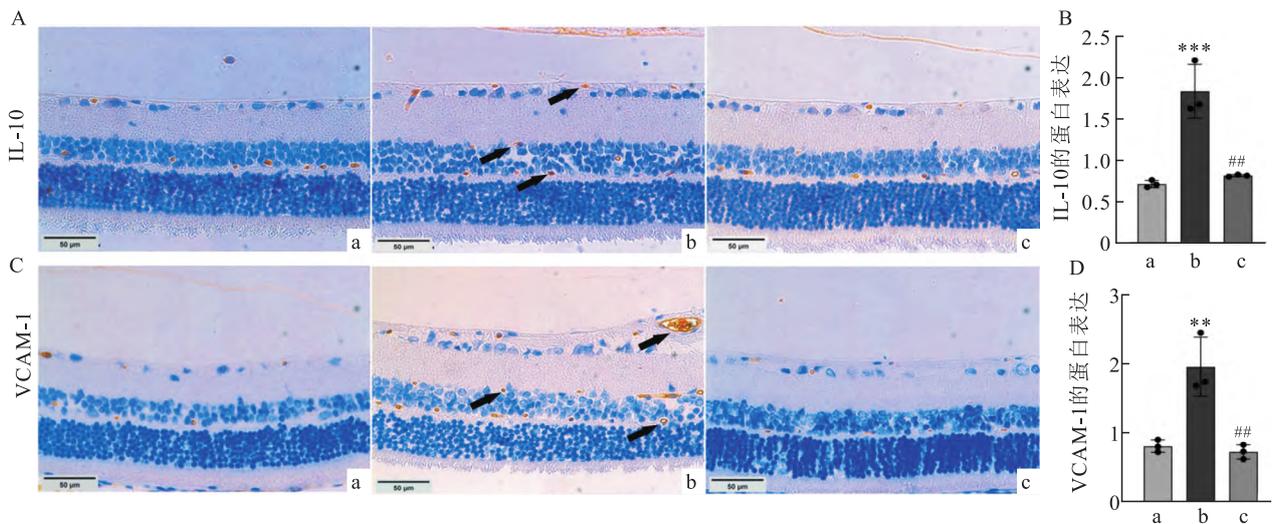


图3 3组SD大鼠视网膜组织中IL-10、VCAM-1蛋白表达情况 ×400

A、B: IHC检测视网膜组织中IL-10的蛋白表达及其直方图; C、D: IHC检测视网膜组织中VCAM-1的蛋白表达及其直方图; a: NC组; b: DR组; c: DR+C组; 黑色箭头: 指示阳性染色; 与NC组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与DR+C组比较: ## $P < 0.01$

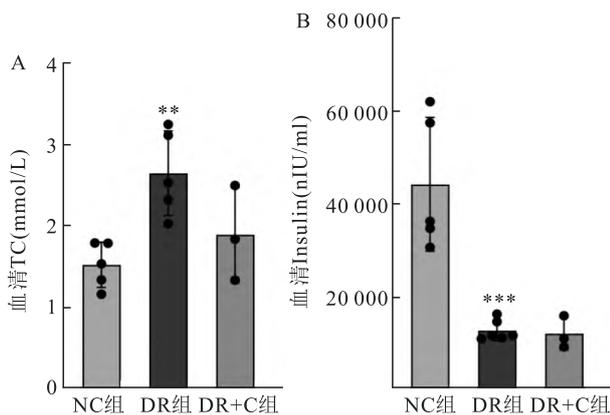


图4 3组大鼠血清TC、Insulin量变化情况

A: TC; B: 血清Insulin; 与NC组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

果显示: DR组中JAML和VEGF蛋白表达水平高于NC组($P < 0.001$); DR+C组JAML、VEGF的表达水平低于DR组($P < 0.001$)。Western blot法进一

步检测了PI3K/HIF1- α 信号通路关键分子的表达水平,结果显示: DR组中PI3K、p-PI3K、HIF1- α 蛋白表达水平较NC组升高($P < 0.001$); DR+C组中PI3K、p-PI3K、HIF1- α 蛋白表达较DR组降低($P < 0.001$)。见图5。

2.6 3组HUVEC细胞中JAML、VEGF表达水平及PI3K/HIF1- α 信号通路的分子表达情况 Western blot法检测HUVEC细胞中JAML和VEGF的蛋白表达水平,结果显示: HG组细胞中JAML和VEGF的表达水平高于NG组($P < 0.05$); HG+C组JAML、VEGF蛋白水平低于HG组($P < 0.05$)。Western blot法进一步检测PI3K/HIF1- α 信号通路的分子表达水平; HG组细胞P-PI3K、HIF1- α 的分子表达水平高于NG组($P < 0.05$)。HG+C组P-PI3K、HIF1- α 蛋白水平低于HG组; 3组HUVEC细胞中PI3K表达水平差异无统计学意义。见图6。

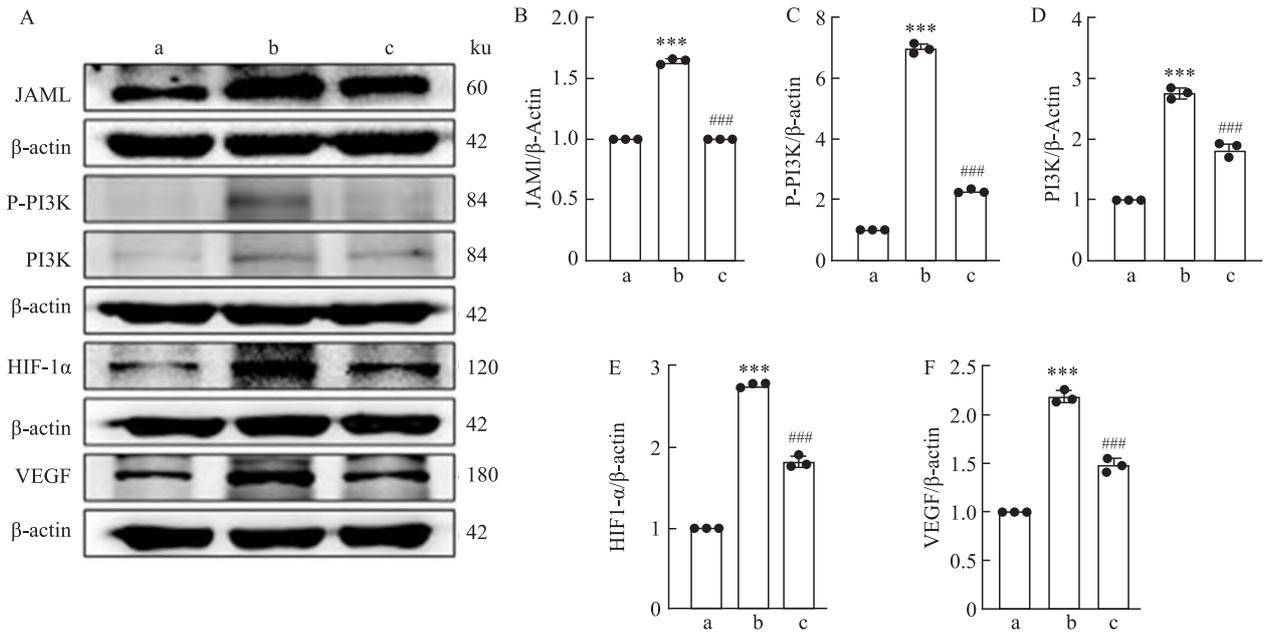


图5 3组大鼠视网膜组织 JAML、P-PI3K、PI3K、HIF1-α、VEGF 等蛋白分布情况

A: JAML、P-PI3K、PI3K、HIF1-α、VEGF 等蛋白的蛋白实验结果; B~F: 分别为 JAML、P-PI3K、PI3K、HIF1-α、VEGF 的蛋白实验结果直方图; a: NC 组; b: DR 组; c: DR + C 组; 与 NC 组比较: *** $P < 0.001$; 与 DR + C 组比较: ### $P < 0.001$

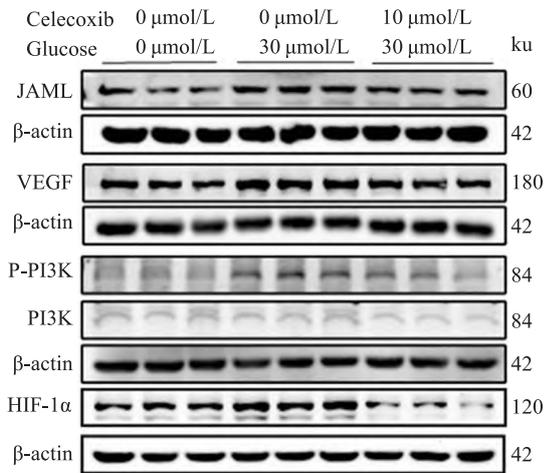


图6 3组 HUVEC 细胞 JAML、P-PI3K、PI3K、HIF1-α、VEGF 蛋白表达水平

3 讨论

DR 是糖尿病引起的视网膜微血管的严重并发症。研究^[3]表明,塞来昔布能降低视网膜中炎症因子水平,延缓 DR 的发生,但具体的分子机制尚不清楚。基于塞来昔布可延缓 DR 进展的重要作用,本研究旨在探讨其在 DR 视网膜炎症反应中的作用机制。本研究结果显示:DR 大鼠经塞来昔布灌胃后视网膜中的 IL-10、VCAM-1、HIF1-α、VEGF 蛋白的

表达降低;体外高糖诱导后的 HUVEC 细胞中证实,塞来昔布可降低高糖环境下内皮细胞 HIF1-α、VEGF 蛋白的表达。以上结果表明,塞来昔布可以减轻 DR 视网膜组织的炎症反应,降低 VEGF 的水平从而延缓 DR 的发生。

JAML 是连接黏附分子(JAMs)家族成员,可促进白细胞在内皮细胞的黏附,破坏血管屏障功能,导致炎症的发生^[6]。最近研究^[7]表明,当细胞受到损伤刺激后,JAML 的表达增加从而影响创伤修复。Fu et al^[4]在糖尿病肾病的研究中发现 JAML 参与足细胞脂质代谢的稳态调控。糖尿病肾病与 DR 均是糖尿病导致的微血管病变,两者在发病的过程中有相似的病理特征。因此,本研究检测 JAML 是否参与塞来昔布减轻 DR 的作用机制。研究结果也显示高糖刺激下 HUVEC 细胞以及 STZ 诱导 DR 大鼠视网膜组织中 JAML 表达水平上调,其表达水平与炎症因子 IL-10、VCAM-1 等相关。塞来昔布干预后,JAML 在 DR 大鼠视网膜和 DR 细胞模型中表达下降。这些结果显示,塞来昔布降低了 JAML 的表达,减轻了 DR 视网膜组织和高糖诱导的 HUVEC 细胞的炎症反应。研究表明,JAML 蛋白位于内皮细胞的细胞膜,其胞内结构所具有的蛋白序列能够聚集 PI3K,从而将外界的信号传递到细胞内进而介导细胞内下游分子的表达。JAML 胞内段具有的 PI3K

聚集序列可以激活细胞的 HIF1- α 信号通路^[8-10]；并且有研究^[11]表明，抑制 HIF1- α 的活化可以上调 HUVEC 细胞中 VEGF 的表达水平。基于以上的研究成果，本研究进一步探讨了 JAML 参与 DR 发生的信号通路。结果显示，DR 大鼠视网膜 PI3K、P-PI3K、HIF1- α 的表达增高。塞来昔布干预后，DR 大鼠视网膜 PI3K、P-PI3K、HIF1- α 蛋白表达下降。因此，塞来昔布可以减轻 DR 发生，其机制可能与 JAML 介导的 PI3K/HIF1- α 信号通路有关。

本研究首先通过 HE 染色证实了 DR 大鼠视网膜新生血管形成，并通过 Western blot 检测出 JAML、IL-10、VCAM-1 在 DR 中表达升高；塞来昔布干预后，JAML 表达降低，DR 大鼠的视网膜病变缓解，炎症因子降低。本研究在 HUVEC 细胞和大鼠视网膜中进一步证实了 JAML 介导的 PI3K/HIF1- α 信号通路在 DR 中的作用。但该研究仍存在以下不足之处：首先，研究未干预 JAML 的表达来证实其调控炎症的作用机制；其次，研究中运用 HE 染色结果证明塞来昔布对 DR 发生的延缓作用，未进行视网膜造影来显示 DR 导致的视网膜血管的渗漏情况；再次，研究中 DR 大鼠的数量尽管符合统计的要求，但是需要更大的样本量来证实该研究结果；最后，研究未探究塞来昔布是如何调控 JAML 的表达，以及调控的机制。这些不足之处，将在以后的研究进一步完善。

综上所述，该研究通过体内和体外实验证实了塞来昔布具有延缓 DR 发生的作用。其机制可能是塞来昔布通过降低 JAML 的表达，从而介导 PI3K/HIF1- α 信号通路减少 VEGF 的生成以及发挥抗炎作用，延缓 DR 的发生。

参考文献

[1] Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, et al. Global data on visual

impairment in the year 2002[J]. *Bull World Health Organ*, 2004, 82(11):844-51.

- [2] Antonetti D A, Klein R, Gardner T W. Diabetic retinopathy[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(13):1227-39.
- [3] Amrite A C, Ayalasonmayajula S P, Cheruvu N P, et al. Single periorcular injection of celecoxib-PLGA microparticles inhibits diabetes-induced elevations in retinal PGE₂, VEGF, and vascular leakage[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(3):1149-60.
- [4] Fu Y, Sun Y, Wang M, et al. Elevation of JAML promotes diabetic kidney disease by modulating podocyte lipid metabolism[J]. *Cell Metab*, 2020, 32(6):1052-62. e8.
- [5] Sokeechand B S H, Trigatti B L. Un-jamming atherosclerotic arteries: JAM-L as a target to attenuate plaque development[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(14):1581-5.
- [6] Guo Y L, Bai R, Chen C X, et al. Role of junctional adhesion molecule-like protein in mediating monocyte transendothelial migration[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(1):75-83.
- [7] Huang W, Wang B O, Hou Y F, et al. JAML promotes acute kidney injury mainly through a macrophage-dependent mechanism[J]. *JCI Insight*, 2022, 7(14):e158571.
- [8] hong H, Chiles K, Feldser D, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor-1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PDEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells; implications for tumor angiogenesis and therapeutics[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(6):1541-5.
- [9] Li L, Qu Y, Mao M, et al. The involvement of phosphoinositid 3-kinase/Akt pathway in the activation of hypoxia-inducible factor-1 α in the developing rat brain after hypoxia-ischemia[J]. *Brain Res*, 2008, 1197:152-8.
- [10] Verdino P, Witherden D A, Havran W L, et al. The molecular interaction of CAR and JAML recruits the central cell signal transducer PI3K[J]. *Science*, 2010, 329(5996):1210-4.
- [11] Zhang L D, Chen L, Zhang M, et al. Downregulation of ERR α inhibits angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells through regulating VEGF production and PI3K/Akt/STAT3 signaling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 769:167-76.

Mechanism of celecoxib inhibiting the expression of retinal VEGF in diabetic retinopathy rats *via* JAML

Duan Mei¹, Cao Fan¹, Gui Yanchao¹, Chen Keyang², Tao Liming¹, Jiang Zhengxuan¹

¹*Dept of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;*

²*Dept of Inspection and Quarantine Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)*

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of celecoxib on retinal vascular endothelial growth factor(VEGF) in rats with diabetic retinopathy. **Methods** Forty - five SD rats were divided into normal control group (NC), diabetic retinopathy group (DR), celecoxib intervention diabetic retinopathy group (DR + C). The

diabetic model was established by intraperitoneal injection of 1% STZ. After one month, celecoxib (50 mg/kg) was given intragastric administration (1/day) in the DR + C group. Two months later, serum total cholesterol (TC) and insulin were detected. The histopathological changes of the retina were observed. The expression of junctional adhesion molecule-like protein (JAML), VEGF and their signal pathway proteins and the distributions of interleukin-10 (IL-10), vascular cell adhesion molecules-1 (VCAM-1) were detected by Western blot. HUVEC cells were divided into normal glucose group (NG), high glucose group (HG) and high glucose plus celecoxib group (HG + C) to detect the expression of the above proteins. **Results** Compared with DR, retina in DR + C group was thinner. The retina in the DR + C group was thicker than that in the NC group. The levels of retinal JAML, phosphatidylinositol kinase3 (PI3K), phosphorylphosphatidylinositol kinase3 (P-PI3K), hypoxia-inducible factor1- α (HIF1- α), and VEGF in DR + C group were lower than those in DR group, while higher than those in NC group. The expression of retinal IL-10 and VCAM-1 decreased. The content of TC in DR + C and DR group was higher than those in NC group ($P < 0.01$), while the content of insulin in DR + C and DR group was lower than those in NC group ($P < 0.001$). Compared with HG group, the expressions of JAML, PI3K, P-PI3K, HIF1- α , VEGF in HG + C group decreased, but was higher than those in NG group. There was no significant difference in PI3K among the three groups. **Conclusion** Celecoxib can decrease the expression of VEGF, IL-10, VCAM-1 in retina of DR rats, which may be related to the PI3K/HIF1- α signaling pathway mediated by JAML.

Key words celecoxib; JAML; diabetes retinopathy; phosphatidylinositol

(上接第 1292 页)

LC-MS/MS simultaneous determination of 22 bile acids in serum, liver, amniotic fluid and placenta of pregnant mice

Zhao Fan^{1,2,3}, Zhang Lun^{2,3}, Ye Lu^{1,2,3}, Zhang Jiayi^{1,2,3}, Yu Yun^{2,3}, Huang Qianqian^{2,3}, Wang Jianqing^{1,2,3}
(¹School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230012; ³Anhui Public Health Clinical Center, Hefei 230012)

Abstract Objective High performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) system was used to accurately determine 22 bile acids in serum, liver, amniotic fluid and placenta of pregnant mice, and a LC-MS/MS method was established for efficient detection and analysis of bile acids in serum, liver, amniotic fluid and placenta of mice. **Methods** Pregnant mice serum, liver, amniotic fluid and placenta samples were processed, with 0.1% glacial acetic acid in 4 mmol/L ammonium acetate aqueous solution as mobile phase A and pure methanol as mobile phase B, the flow rate was 0.4 ml/min, a gradient elution program was used to elute with Phenomenex Gemini 3 μ m NX-C18 110A (100 mm \times 2.0 mm) chromatographic column elution, and mass spectrometry detection system used an electrospray ion source for negative ion multiple reaction monitoring. **Results** The linear relationship of 22 bile acids in the quantitative range was good. The RSD of inter-day and intra-day precision at low, medium and high concentrations was 0.5% - 7.4%, the matrix effect was 88% - 110%, and the extraction recovery was 84% - 108%. **Conclusion** In this experiment, LC-MS/MS was established to detect 22 bile acids in serum, liver, amniotic fluid and placenta of pregnant mice. The method not only has high sensitivity and selectivity, but also can stably detect a large number of samples.

Key words bile acids; high performance liquid chromatography-mass spectrometry system; pregnant mice; methodology