

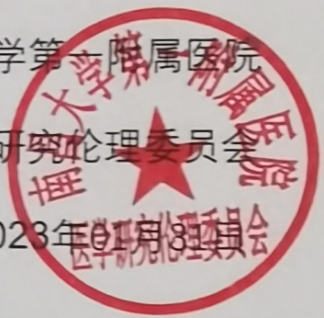
南昌大学第一附属医院医学研究伦理委员会证明

我院周琼的科学研究：“抗氧化药迷迭香酸靶向调控
RACK1/PKC/STAT3信号通路对早期糖尿病视网膜病变进展的干预作
用及其机制研究”经审查，符合国家相关伦理要求，同意其按批准方
案及免知情的前提下实施该项研究。有效期一年。伦理编号：
(2023)CDYFYLYK(01-047)。特此证明。

南昌大学第一附属医院

医学研究伦理委员会

2023年01月31日



南昌大学第一附属医院医学研究伦理委员会
The First Affiliated Hospital Of Nanchang University Ethics
Committee on Medical Research
伦理审查申请表

研究项目名称：抗氧化药迷迭香酸靶向调控RACK1/PKC/STAT3信号通路对早期糖尿病视网膜病变进展的干预作用及其机制研究	
本中心项目负责人姓名：周琼	本中心项目负责人科室：眼科
本中心项目指定联系人姓名：谭建	电话：18720997601
项目类型： 横向项目 申办方: 研究者	
是否为多中心项目： 否	
病例总数：36 本中心承担病例数：36 其他中心承担病例数：0	
项目研究涉及： 人， 使用血、尿、体液、组织标本	
预期研究期限：2022年12月28日至2026年12月27日	
项目研究内容摘要、研究目的（限300字内） 本项目拟开展抗氧化药迷迭香酸靶向调控RACK1/PKC/STAT3信号通路对早期糖尿病视网膜病变进展的干预作用及其机制研究，收集正常人及 DR 早期患者视网膜组织标本各5例（来源于本单位保存的角膜移植捐献眼球和有糖尿病史脑死亡自愿捐献者），检测和观察分析：RACK1、PKC 和 STAT3 在正常人及 DR 早期患者视网膜组织标本中的表达水平。	
项目所涉及的主要伦理问题（限100字内）： 该项目需要收集人体视网膜组织标本，但来源均为自愿捐献且不增加受试者的医疗费用和痛苦，其研究材料和研究结果用于科研目的，不存在利益冲突。	
项目负责人签名： 	日期： 2022.11.17

研究方案

项目名称（中文）：抗氧化药迷迭香酸靶向调控
RACK1/PKC/STAT3 信号通路对早期糖尿病视网膜病变进展的
干预作用及其机制研究

项目名称（英文）： The mechanistic study of antioxidant
rosmarinic acid in the prevention of early-stage
diabetic retinopathy progression through regulation of
RACK1/PKC/STAT3 signaling pathway

研究单位：南昌大学第一附属医院

研究负责人：周琼

申办者：南昌大学第一附属医院

一、研究背景

(1) 寻找糖尿病视网膜病变的早期干预和治疗方法具有重要临床意义

糖尿病视网膜病变（**Diabetic retinopathy, DR**）是一种以糖尿病（diabetes mellitus, DM）为发展诱因的致盲性眼病，有很高的发病率。几乎所有 I 型和超过 60% 的 II 型糖尿病患者都将发展为 DR，是目前中老年人群常见的致盲性眼病之一^[1]。Malanda 等^[2]指出到 2045 年，国际糖尿病联盟预计全球糖尿病患者人数将达到 6.93 亿。2020 年全球患有 DR、威胁视力的 DR 和有临床意义的黄斑水肿的成年人人数估计分别为 1.0312 亿、2854 万和 1883 万^[3]。在我国≥45 岁的人群中约有 1316 万人存在 DR，且 DR 患病人数随着糖尿病患者病程的进展而增加^[4]。**糖尿病视网膜病变已成为严重威胁人民身体健康和生活质量的重要疾病。**

目前临床上 DR 的治疗除控制血糖、血压以及调节血脂等全身治疗外，常在出现典型眼底表现（视网膜大量微动脉瘤或出血点、微血管异常、静脉串珠样改变、新生血管、增殖性视网膜脱离或黄斑水肿等^[5]）之后根据眼底病变严重程度选择不同眼局部治疗方法（如视网膜激光光凝术、手术治疗和药物治疗等）^[6]，而此时 DR 多处于中晚期阶段（重度非增殖期阶段和增殖期阶段），此病程阶段患者已经发生不可逆转的视网膜病理生理改变^[7]。**因此，寻找 DR 早期阶段有效的干预手段和方法来延缓或阻止 DR 进展、降低致盲率，具有重要的临床意义。**

(2) DR 早期进展的研究现状

DR 早期病变特征：微血管损伤、视网膜神经变性和脂质代谢异常。探讨 DR 早期的发生发展及其病理变化过程，进一步了解其分子机制有助于寻找早期干预 DR 的潜在治疗靶点。

DR 早期阶段病理变化可见视网膜毛细血管周细胞缺失、基底膜增厚、内皮屏障功能丧失和血视网膜屏障（Blood retinal barrier, BRB）破坏，导致微血管瘤形成^[8,9]。DR 早期微血管损伤是炎症因子如白细胞介素-6（interleukin-6, IL-6）、肿瘤坏死因子- α （Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α ）与血管内皮生长因子（vascular

endothelial growth factor, VEGF)以及细胞间和血管细胞粘附分子(如细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1))共同作用的结果^[10, 11]。有研究证实糖尿病微血管并发症与慢性高血糖引起的氧化应激反应有关^[12], 且其中蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的激活是介导糖尿病引起视网膜早期微血管损伤的重要途径^[13], 进一步了解和阐明 DR 进展背后的氧化应激相关机制尤显重要, 可为寻找、开发安全有效的糖尿病视网膜病变早期干预新方法提供理论基础^[14]。

尽管微循环障碍是 DR 的典型标志, 但新的证据表明视网膜神经变性也存在于 DR 早期发生发展中^[15]。在神经组织中, 微脉管系统和神经组织形成密切关系, 有助于维持适当的神经元环境以进行突触信号传导, 这种关系被称为神经血管单元^[16], 而神经血管单元的损伤被认为是 DR 早期阶段的主要病理变化^[17]。神经血管单元的损伤可导致无长突细胞、Müller 细胞的凋亡, 小胶质细胞的激活和神经营养因子的失调^[17], 如神经节细胞层(ganglion cell layer, GCL)中的细胞数量下降、Müller 细胞中神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein GFAP)的过表达^[18]以及 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 Associated X Protein, BAX)、Fas 和 caspase-3 等促凋亡分子的过度表达^[19]。多个研究证据表明视网膜神经变性发生在 DR 早期, 且与微血管病变关系密切, 因此进一步研究视网膜神经变性微血管病变之间的分子机制可能为早期干预 DR 提供潜在的治疗靶点^[20]。

此外, 脂质对于维持体内平衡和细胞代谢至关重要, 脂质代谢的失调可促进慢性炎症性疾病的发生^[21]。血浆脂质和脂蛋白一直被认为是 DR (尤其是硬性渗出)的潜在危险因素, 包括脂肪酸、氧化脂肪酸产物、视网膜特异性胆固醇代谢失调均起到致病作用^[22]。目前的脂质代谢失调模型强调血视网膜屏障(BRB)的破坏和视网膜中脂质颗粒的外渗, 而不是试图简单地将总血浆脂质 Protein kinase C/Signal transducer and activator of transcription 3 和脂蛋白水平与 DR 的发展相关联^[23]。HMG-CoA 还原酶、甘油-3-磷酸酰基转移酶(glycerol-3-phosphate acyltransferases, GPATs)、胆固醇 7 α -羟化酶(cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1)和一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的升高和脂质代谢异常密切相关^[24]。高血糖引起的细胞信号转导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)的激活反过来可通过改变参与脂质代谢基因

的表达来升高血浆甘油三酯和总胆固醇水平^[25]。脂质代谢异常和高血糖共同促进 DR 早期的发生发展，但其分子调控机制尚不完全明确^[24]。

实验室和临床证据表明，视网膜微血管病变、神经变性和脂质代谢异常均为糖尿病视网膜病变（DR）的重要特征^[20, 24, 26]。因此，深入了解其发生发展的分子机制，对早期防治 DR 发生发展、寻找合适的干预靶点，有着重要的临床意义，亦是目前 DR 防治研究的攻关焦点和难点之一。

（3）PKC/STAT3：是参与引发 DR 视网膜微血管损伤、神经变性和脂质代谢异常过程中的关键分子

PKC 是一种参与信号转导的丝氨酸/苏氨酸激酶，可对特定激素、神经元和生长因子的刺激作出反应^[27]。PKC 家族包含 12 种亚型，其中 PKC- α 、 β 、 δ 和 ϵ 在 DR 的发生发展中被激活而起重要作用^[27, 28]。视网膜细胞中各种生理过程的调节与 PKC 密切相关，包括视网膜血流动力学、内皮通透性、白细胞活化和粘附增强（白细胞停滞）以及视网膜组织中 VEGF 的表达^[29]。此外，PKC 可以增强 NADPH 氧化酶的活性，从而促进血管细胞（包括内皮细胞、平滑肌细胞、周细胞、系膜细胞等）中活性氧（reactive oxygen species, ROS）的产生，ROS 的过度积累会诱导线粒体损伤、细胞凋亡、炎症、脂质过氧化以及视网膜的结构和功能改变^[30, 31]。因此，高血糖诱导激活 PKC 途径可加重视网膜细胞的氧化应激，从而导致视网膜微血管损伤、视网膜神经变性和脂质代谢异常的发生。

STAT3 作为细胞信号转导和转录激活因子家族中的一员，存在多种细胞的胞质中，通过磷酸化激活后参与许多生物学过程，包括细胞增殖、生长、分化和血管生成^[32]。STAT3 的磷酸化可上调 DR 视网膜 VEGF 表达，而 VEGF 的上调又能促进 STAT3 的磷酸化，导致 DR 进一步发生发展。在 DR 患者视网膜血管内皮细胞中，STAT3 通过激活与炎症和血管生成相关的因子（如 VEGF）来增加内皮细胞的通透性，导致 DR 早期微血管的损伤^[33]。与此同时产生的 VEGF 可迅速诱导 STAT3 酪氨酸磷酸化并核转位^[34]，抑制视网膜促红细胞生成素的表达，导致病理性无血管视网膜发生^[35]。STAT3 的激活亦可通过改变参与脂质代谢基因的表达来升高血浆甘油三酯和总胆固醇水平介导视网膜组织中的脂质代谢异常^[25]。另外有研究证

实在神经血管单元中活化的小胶质细胞存在 STAT3 的上调，抑制其活性后对神经血管单元的损伤有一定的保护作用^[36]。已有研究显示通过对 DR 大鼠模型口饲 STAT3 小分子抑制剂可减缓其视力丧失，但是其具体机制及进一步的研究尚未见报道^[37]。

[Amani Batarseh](#) 等^[38]在细胞实验中证明 PKC- ϵ 的激活可诱导 STAT3 的磷酸化，而 PKC- ϵ 的敲低可下调 STAT3 的磷酸化。长期暴露在紫外线下的小鼠在基底表皮细胞和毛囊细胞中过度表达的 PKC- ϵ 可诱导 STAT3 磷酸化导致皮肤损伤和鳞状细胞癌^[39]。在小鼠心肌细胞中， α 1-肾上腺素能受体通过 PKC 途径调节 STAT3 的磷酸化^[40]。在小鼠视网膜组织中，PKC 可通过激活 STAT3 来阻断视视网膜祖细胞向视杆细胞的分化^[41]。Byrne 等^[42]发现在 DR 小鼠模型中视网膜 STAT3 的激活可引起血视网膜屏障的破坏。

越来越多的证据说明，PKC/STAT3 信号通路在参与引发 DR 视网膜微血管损伤、视网膜神经变性和脂质代谢异常的过程中起着重要作用。

(4) RACK1 可通过 PKC/STAT3 信号通路干预 DR 的发生发展

如上所述，PKC/STAT3 信号通路在参与引发 DR 视网膜微血管损伤、视网膜神经变性和脂质代谢异常的过程中起着重要作用。那么，有哪些基因或因素位于 PKC/STAT3 信号通路上游、启动激活和调控此信号通路，并引发 DR 的发生发展？值得深入探讨和研究。为此，本项目组做了一些前期探索和研究。

本项目组前期通过对 DR 患者和无糖尿病正常人的视网膜组织样本进行生物信息学调研，共获得 4 个枢纽基因，发现仅活化蛋白激酶 C 受体 1 (Receptor for activated protein kinase C1, RACK1) 在枢纽基因中表达量最大且差异表达明显 ($p = 0.003$)。通过调研文献所知，RACK1 是一种多功能信号转导蛋白，也被称为 PKC 的锚定蛋白^[43]。其主要作用是稳定 PKC 的活性形式和异位到不同的细胞位点上与靶蛋白激酶 PKC 一起参与许多重要的细胞反应^[44]。在细胞分裂过程中，RACK1 通过激活 STAT3 的磷酸化来调控细胞分裂周期^[45]。已有报道表明，RACK1 在血管内皮细胞中表达上调可促进血管生成^[46]，而 RACK1 的沉默可以显著减弱与肿瘤相

关的血管生成^[47]。在 小鼠脉络膜新生血管（Choroidal neovascularization, CNV）模型和恒河猴脉络膜血管内皮细胞系中，RACK1 通过上调 VEGF 表达促进 CNV 形成^[48]。故我们推测 RACK1 可能通过干预 PKC/STAT3 信号通路参与 DR 的发生发展，故我们选择 RACK1 基因进行后续研究。

此外，本项目组在前期研究中成功构建了 DR 大鼠模型，并验证了 DR 大鼠模型中 RACK1 蛋白与 mRNA 表达水平比正常大鼠视网膜组织中表达水平明显升高。在体外实验中有效敲减 RACK1 后，人视网膜色素上皮细胞增殖能力明显增强，PKC、STAT3 蛋白表达明显降低；在敲减 PKC 后，人视网膜色素上皮细胞 STAT3 蛋白表达明显降低。上述研究提示 RACK1 可能通过调控 PKC/STAT3 信号通路参与 DR 的发生发展。因此，寻找合适的 RACK1 靶向抑制剂来科学调控 PKC/STAT3 信号通路活性，对 DR 早期发生发展的干预具有重要意义。

目前 RACK1 的常用抑制剂包括自噬抑制剂、双酚等，但是安全性不明^[49, 50]。一种新型针对 RACK1 的抑制泛素结合酶 E2T（ubiquitin-conjugating enzyme E2T, UBE2T）可以通过阻断 RACK1 的泛素化来抑制胃癌的进展，但是 UBE2T 存在一定的细胞毒性^[51]。Yu 等研究证实抗氧化药物迷迭香酸（Rosmarinic acid, RA）可以通过 RACK1/TNF- α 介导的抗氧化作用改善对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤^[52]。迷迭香酸是一种植物中提取的酚类化合物，主要通过口服、静脉输液及局部给药等方式用于治疗皮肤病、过敏和代谢综合征等疾病并通过肾脏代谢，目前的临床研究中未见严重副作用^[53]。并且 RA 眼部递送壳聚糖基纳米颗粒体外试验证实 RA 对于人视网膜色素上皮和角膜细胞均无细胞毒性^[54]，但是该药物在眼科疾病中的相关应用未见进一步报道。目前研究已表明 RA 能抑制 RACK1 的表达，在我们前期预实验中发现 RACK1 能通过 PKC/STAT3 通路影响 DR 进展，而迷迭香酸对 RACK1/PKC/STAT3 蛋白的表达有明显的调控作用。以上提示我们：RA 可通过抑制 RACK1 调控 PKC/STAT3 通路活性影响 DR 的进展。

因此，我们提出以下科学假说：RACK1/PKC/STAT3 信号通路是 DR 早期阶段发生发展的重要调控途径，因而抗氧化药物迷迭香酸（RA）通过对 RACK1 的靶向抑制可能延缓或阻止 DR 早期的发生发展。

（5）验证和阐明抗氧化药迷迭香酸靶向抑制 RACK1/PKC/STAT3 信号通路对 DR 发生发展的干预作用及机制，有望为 DR 早期防治提供新靶点和新思路

综上所述，糖尿病视网膜病变（DR）是一种以糖尿病为诱因、发病率高、严重威胁人民身体健康和生活质量的致盲性眼病。DR 早期阶段病理改变特征主要包括微血管损伤、视网膜神经变性和脂质代谢异常，中晚期阶段已发生不可逆转的视网膜病理改变，因此寻找 DR 早期防治的关键靶点和方法尤为重要。前期研究表明，PKC/STAT3 信号通路在 DR 早期病变过程中起着重要作用，RACK1 作为 PKC 的锚定蛋白可介导调控 PKC/STAT3 通路，并可能是干预 DR 进展的潜在治疗靶点。迷迭香酸是目前认为相对安全、副作用小的 RACK1 靶向抑制剂。

因此，本申请项目拟通过生物信息学分析、体外细胞培养、动物模型构建及体内实验、基因敲除、抗氧化药物靶向抑制等方法，检测在正常条件和高糖诱导条件培养下，人视网膜色素上皮细胞、血管内皮细胞、神经节细胞等细胞系以及 DR 小鼠模型中 RACK1、PKC 和 STAT3 的表达情况，观察和分析 RACK1 通过调控 PKC/STAT3 信号通路对 DR 早期病变进展的影响，探索和阐明抗氧化药物迷迭香酸靶向抑制 RACK1/PKC/STAT3 信号通路对 DR 发生发展的干预作用及机制，有望为 DR 早期防治提供新靶点、新思路和新理论。

参考文献：

1. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet Global health** 2021, 9(2): e144-e160.
2. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes research and clinical practice** 2018, 138: 271-281.
3. Teo ZL, Tham Y-C, Yu M, Chee ML, Rim TH, Cheung N, *et al.* Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. **Ophthalmology** 2021, 128(11): 1580-1591.
4. Song P, Yu J, Chan KY, Theodoratou E, Rudan I. Prevalence, risk factors and burden of diabetic retinopathy in China: a systematic review and meta-analysis. **J Glob Health** 2018, 8(1): 010803.
5. Sivaprasad S, Pearce E. The unmet need for better risk stratification of non-proliferative diabetic retinopathy. **Diabet Med** 2019, 36(4): 424-433.
6. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. **Lancet (London, England)** 2010, 376(9735): 124-136.
7. Ellis MP, Lent-Schochet D, Lo T, Yiu G. Emerging Concepts in the Treatment of Diabetic Retinopathy. **Current diabetes reports** 2019, 19(11): 137.
8. Antonetti DA, Silva PS, Stitt AW. Current understanding of the molecular and cellular pathology of diabetic retinopathy. **Nat Rev Endocrinol** 2021, 17(4): 195-206.
9. Roy S, Kim D. Retinal capillary basement membrane thickening: Role in the pathogenesis of

-
- diabetic retinopathy. **Progress in retinal and eye research** **2021**, 82: 100903.
10. Videm V, Albrigtsen M. Soluble ICAM-1 and VCAM-1 as markers of endothelial activation. **Scandinavian journal of immunology** **2008**, 67(5): 523-531.
 11. Gustavsson C, Agardh C-D, Zetterqvist AV, Nilsson J, Agardh E, Gomez MF. Vascular cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in mice retinal vessels is affected by both hyperglycemia and hyperlipidemia. **PloS one** **2010**, 5(9): e12699.
 12. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes** **2005**, 54(6): 1615-1625.
 13. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation research** **2010**, 107(9): 1058-1070.
 14. Kang Q, Yang C. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. **Redox Biol** **2020**, 37: 101799-101799.
 15. Simó R, Hernández C. Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. **Trends Endocrinol Metab** **2014**, 25(1): 23-33.
 16. Antonetti DA. The neuroscience of diabetic retinopathy. **Vis Neurosci** **2021**, 38: E001.
 17. Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. **The New England journal of medicine** **2012**, 366(13): 1227-1239.
 18. Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** **2003**, 27(2): 283-290.
 19. Oshitari T. The Pathogenesis and Therapeutic Approaches of Diabetic Neuropathy in the Retina. **International journal of molecular sciences** **2021**, 22(16): 9050.
 20. Oshitari T. The Pathogenesis and Therapeutic Approaches of Diabetic Neuropathy in the Retina. **International journal of molecular sciences** **2021**, 22(16).
 21. Tse C, Warner A, Farook R, Cronin JG. Phytochemical Targeting of STAT3 Orchestrated Lipid Metabolism in Therapy-Resistant Cancers. **Biomolecules** **2020**, 10(8): 1118.
 22. Busik JV. Lipid metabolism dysregulation in diabetic retinopathy. **J Lipid Res** **2021**, 62: 100017.
 23. Modjtahedi BS, Bose N, Papakostas TD, Morse L, Vavvas DG, Kishan AU. Lipids and Diabetic Retinopathy. **Seminars in ophthalmology** **2016**, 31(1-2): 10-18.
 24. Rao H, Jalali JA, Johnston TP, Koulen P. Emerging Roles of Dyslipidemia and Hyperglycemia in Diabetic Retinopathy: Molecular Mechanisms and Clinical Perspectives. **Frontiers in endocrinology** **2021**, 12: 620045-620045.
 25. Kinoshita S, Ogawa W, Okamoto Y, et al. Role of hepatic STAT3 in the regulation of lipid metabolism. **Kobe J Med Sci** **2008**, 54(4): E200-E208.
 26. Hammes H-P. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. **Diabetologia** **2018**, 61(1): 29-38.
 27. Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. **Diabetologia** **2001**, 44(6): 659-673.
 28. Griner EM, Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. **Nat Rev Cancer** **2007**, 7(4): 281-294.
 29. Yuan T, Yang T, Chen H, Fu D, Hu Y, Wang J, et al. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. **Redox Biol** **2019**, 20: 247-260.
 30. Birkenfeld AL, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and
-

-
- type 2 diabetes. **Hepatology** **2014**, 59(2): 713-723.
31. George A, Pushkaran S, Konstantinidis DG, Koochaki S, Malik P, Mohandas N, *et al.* Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. **Blood** **2013**, 121(11): 2099-2107.
 32. Zou S, Tong Q, Liu B, Huang W, Tian Y, Fu X. Targeting STAT3 in Cancer Immunotherapy. **Molecular cancer** **2020**, 19(1): 145-145.
 33. JH Y, SW P, KJ K, JS B, EH L, SH P, *et al.* Endothelial STAT3 Activation Increases Vascular Leakage Through Downregulating Tight Junction Proteins: Implications for Diabetic Retinopathy. **Journal of Cellular Physiology** **2017**, 232(5): 1123-1134.
 34. Bartoli M, Dan P, Lemtalsi T, Gu X, Caldwell RB. VEGF differentially activates STAT3 in microvascular endothelial cells. **Faseb Journal** **2003**, 17(11): 1562-1564.
 35. Wang H, Byfield G, Jiang Y, Smith GW, McCloskey M, Hartnett ME. VEGF-mediated STAT3 activation inhibits retinal vascularization by down-regulating local erythropoietin expression. **The American journal of pathology** **2012**, 180(3): 1243-1253.
 36. Riemann S, Kolibabka M, Busch S, Lin J, Hoffmann S, Gretz N, *et al.* Microglial Activation Is Associated With Vasoprotection in a Rat Model of Inflammatory Retinal Vasoregression. **Front Physiol** **2021**, 12: 660164-660164.
 37. Vanlandingham PA, Nuno DJ, Quiambao AB, Phelps E, Wassel RA, Ma J-X, *et al.* Inhibition of Stat3 by a Small Molecule Inhibitor Slows Vision Loss in a Rat Model of Diabetic Retinopathy. **Investigative ophthalmology & visual science** **2017**, 58(4): 2095-2105.
 38. Batarseh A, Li J, Papadopoulos V. Protein kinase C epsilon regulation of translocator protein (18 kDa) Tspo gene expression is mediated through a MAPK pathway targeting STAT3 and c-Jun transcription factors. **Biochemistry** **2010**, 49(23): 4766-4778.
 39. Aziz MH, Manoharan HT, Verma AK. Protein kinase C epsilon, which sensitizes skin to sun's UV radiation-induced cutaneous damage and development of squamous cell carcinomas, associates with Stat3. **Cancer Res** **2007**, 67(3): 1385-1394.
 40. Shi T, Papay RS, Perez DM. α (1A)-adrenergic receptor differentially regulates STAT3 phosphorylation through PKC ϵ and PKC δ in myocytes. **J Recept Signal Transduct Res** **2012**, 32(2): 76-86.
 41. Pinzon-Guzman C, Shaomin Zhang S, Barnstable CJ. Protein kinase C regulates rod photoreceptor differentiation through modulation of STAT3 signaling. **Advances in experimental medicine and biology** **2010**, 664: 21-28.
 42. Byrne EM, Llorián-Salvador M, Lyons TJ, Chen M, Xu H. Tofacitinib Ameliorates Retinal Vascular Leakage in a Murine Model of Diabetic Retinopathy with Type 2 Diabetes. **International journal of molecular sciences** **2021**, 22(21).
 43. McCahill A, Warwicker J, Bolger GB, Houslay MD, Yarwood SJ. The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. **Mol Pharmacol** **2002**, 62(6): 1261-1273.
 44. Zhang X-Y, Tang L-Z, Ren B-G, Yu YP, Nelson J, Michalopoulos G, *et al.* Interaction of MCM7 and RACK1 for activation of MCM7 and cell growth. **The American journal of pathology** **2013**, 182(3): 796-805.
 45. Mamidipudi V, Zhang J, Lee KC, Cartwright CA. RACK1 regulates G1/S progression by suppressing Src kinase activity. **Mol Cell Biol** **2004**, 24(15): 6788-6798.
 46. Berns H, Humar R, Hengerer B, Kiefer FN, Battegay EJ. RACK1 is up-regulated in
-

-
- angiogenesis and human carcinomas. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology** 2000, 14(15): 2549-2558.
47. Wang F, Osawa T, Tsuchida R, Yuasa Y, Shibuya M. Downregulation of receptor for activated C-kinase 1 (RACK1) suppresses tumor growth by inhibiting tumor cell proliferation and tumor-associated angiogenesis. **Cancer Sci** 2011, 102(11): 2007-2013.
 48. Liu X, Zhu M, Yang X, Wang Y, Qin B, Cui C, *et al.* Inhibition of RACK1 ameliorates choroidal neovascularization formation in vitro and in vivo. **Exp Mol Pathol** 2016, 100(3): 451-459.
 49. Buoso E, Kenda M, Masi M, Linciano P, Galbiati V, Racchi M, *et al.* Effects of Bisphenols on RACK1 Expression and Their Immunological Implications in THP-1 Cells. **Frontiers in pharmacology** 2021, 12: 743991.
 50. Xiao T, Zhu W, Huang W, Lu S-S, Li X-H, Xiao Z-Q, *et al.* RACK1 promotes tumorigenicity of colon cancer by inducing cell autophagy. **Cell death & disease** 2018, 9(12): 1148-1148.
 51. Yu Z, Jiang X, Qin L, Deng H, Wang J, Ren W, *et al.* A novel UBE2T inhibitor suppresses Wnt/ β -catenin signaling hyperactivation and gastric cancer progression by blocking RACK1 ubiquitination. **Oncogene** 2021, 40(5): 1027-1042.
 52. Yu Y, Wu Y, Yan H-Z, Xia Z-R, Wen W, Liu D-Y, *et al.* Rosmarinic acid ameliorates acetaminophen-induced acute liver injury in mice via RACK1/TNF- α mediated antioxidant effect. **Pharm Biol** 2021, 59(1): 1286-1293.
 53. Hitl M, Kladar N, Gavarić N, Božin B. Rosmarinic Acid-Human Pharmacokinetics and Health Benefits. **Planta Med** 2021, 87(4): 273-282.
 54. da Silva SB, Ferreira D, Pintado M, Sarmiento B. Chitosan-based nanoparticles for rosmarinic acid ocular delivery--In vitro tests. **Int J Biol Macromol** 2016, 84: 112-120.

二、研究目的

- 1) 明确 RACK1 在正常及 DR 视网膜组织中的表达差异及对 DR 进展的影响。
- 2) 探索和阐释 RACK1 通过调控 PKC/STAT3 信号通路干预 DR 早期的发生发展。
- 3) 验证和阐明抗氧化药迷迭香酸靶向抑制 RACK1/PKC/STAT3 信号通路对 DR 发生发展的干预作用及机制，为 DR 早期防治提供新靶点、新思路。

三、研究概况

第一部分. 检测 RACK1 在正常及 DR 视网膜组织中的表达差异并观察分析其对 DR 早期进展的影响

- 1) 检测在正常条件和高糖诱导条件细胞培养下, RACK1 在 ARPE-19、HRECs 和 HRGCs 细胞系中的表达差异, 并观察分析其对 DR 发生发展的影响。
-

（注：人视网膜色素上皮细胞（Adult Retinal Pigment Epithelial cell line-19, ARPE-19）、人视网膜血管内皮细胞（Human retinal vascular endothelial cells, HRECs）、人视网膜神经节细胞（Human retinal ganglion cells, HRGCs））

2) 检测 RACK1 在正常小鼠和 DR 早期小鼠模型视网膜组织中的表达差异并观察分析其对 DR 早期进展的影响。

第二部分. 通过体外实验了解和证实, RACK1 通过调控 PKC/STAT3 信号通路对 DR 早期阶段发生发展的影响

1) 检测和观察分析: 在高糖诱导培养条件下, ARPE-19、HRECs 和 HRGCs 细胞系中 PKC、STAT3 的表达情况。

2) 检测和观察分析: 在高糖诱导培养条件下, RACK1 激活 PKC 后, RACK1 和 PKC 在 ARPE-19、HRECs 和 HRGCs 细胞系中的表达情况, 并验证它们的靶向关系。

3) 检测和观察分析: 在高糖诱导培养条件下, RACK1 激活 STAT3 后, RACK1 和 STAT3 在 ARPE-19、HRECs 和 HRGCs 细胞系中的表达情况, 并验证它们的靶向关系。

4) 检测和观察分析: 在高糖诱导培养条件下, PKC 激活 STAT3 后, PKC 和 STAT3 在 ARPE-19、HRECs 和 HRGCs 细胞系中的表达, 并验证它们的靶向关系。

第三部分. 通过体内实验了解和证实, RACK1 通过调控 PKC/STAT3 信号通路对 DR 早期阶段发生发展的影响

1) 观察和分析: 在敲除 RACK1 和未敲除 RACK1 的两组 DR 早期模型小鼠中, 视网膜神经血管单元的不同病理表现。

2) 检测和观察分析: 敲除 RACK1 基因后, DR 早期模型小鼠的视网膜组织中 PKC、STAT3、IL-6、VEGF、GFAP 等基因的表达情况。

通过以上实验观察和分析, 进一步了解和证实 RACK1 通过调控 PKC/STAT3 信号通路影响 DR 早期阶段的发生发展。

第四部分. 探明及验证迷迭香酸 (RA) 对 RACK1/PKC/STAT3 的靶向调控作用及机制, 为 DR 早期防治提供新靶点和新思路

1) 检测和观察分析: RACK1、PKC 和 STAT3 在正常人及 DR 早期患者视网膜组织标本中 (来源于本单位保存的角膜移植捐献眼球和有糖尿病史脑死亡自愿捐献者) 的表达水平。

2) 观察和验证: 迷迭香酸 (RA) 通过靶向抑制 RACK1 调控 PKC/STAT3 信号通路活性, 对高糖诱导和不同 RA 浓度培养下的 ARPE-19、HRECs 和 HRGCs 细胞系中细胞增殖生长的影响。

3) 观察和验证: 迷迭香酸 (RA) 通过靶向抑制 RACK1 调控 PKC/STAT3 信号通路活性, RA 的不同给药剂量对 DR 小鼠模型中 DR 早期病变特征的影响。

四、不良事件观察

4.1 不良事件的定义

4.1.1 定义

不良事件: 病人或临床试验受试者接受一种药品后出现的不良医学事件, 但并不一定与治疗有因果关系。

严重不良事件: 临床试验过程中发生需住院治疗、延长住院时间、伤残、影响工作能力、危及生命或死亡、导致先天畸形等事件。

4.1.2 程度

轻度: 受试者可忍受, 不影响治疗, 不需要特别处理, 对受试者康复无影响。

中度: 受试者难以忍受、需要特殊处理, 对受试者康复有直接影响。

重度: 危及受试者生命, 致死或致残, 需立即做紧急处理。

4.2 不良事件的记录及报告途径

受试者治疗过程中可能发生临床不良事件, 一旦发生不良事件 (包括重要不良事件), 应在病例报告表上详细记录不良事件的发生时间、临床表现、处理经过和持续时间、转归以及与药物的关系; 出现实验室检查异常者, 须随访患者至检查结果恢复正常, 或至用药前水平, 或确定与试验药物无关。发生严重不良事件应填写严重不良事件表, 并在 24 小时内报告申办者、伦理委员会、CFDA 安监局和卫生行政部门。

五、统计分析

5.1 样本含量估计

检验水准 α : $\alpha = 0.05$

检验效能 $1 - \beta$: 90%

正常组与DR组的比例: 1: 1。

确定样本含量为36

5.2 研究数据的统计与分析

$$n = \left(\frac{Z_{1-\alpha/2} \times \sqrt{p \times (1-p)}}{\delta} \right)^2$$

根据上述公式计算得 $n=35$

六、研究相关伦理学

6.1 伦理委员会审核

本方案和书面知情同意书及与受试者直接相关的资料必须提交伦理委员会，获得伦理委员会书面批准后方可正式开展研究。研究者必须至少每年向伦理委员会提交研究年度报告。在研究中止和/或完成时，研究者必须书面通知伦理委员会；研究者必须及时向伦理委员会报告所有研究工作中发生的变化（如方案和/或知情同意数的修订），并且在未获得伦理委员会批准之前不得执行这些变动，除非是为了消除对受试者明显且直接的风险而做出的变更。在发生这类情况时，将通知伦理委员会。

6.2 知情同意

因生物样本捐献者已经签署了知情同意书，同意所捐献样本及相关信息可用于所有医学研究的。故已经申请免除另外签订知情同意书。

七、保密措施

通过本项目研究的结果可能会在医学杂志上发表，但是我们会按照法律的要求为患者的信息保密，除非应相关法律要求，患者的个人信息不会被泄露。必要时，政府管理部门和医院伦理委员会及其有关人员可以按规定查阅患者的资料。

八、研究项目的预期进度和完成日期

2023 年 1 月～2023 年 12 月

-
- 1) 查阅文献，准备实验各项事项（C57BL/6 小鼠采购并饲养、实验相关试剂采购等），繁育 RACK1 基因敲除小鼠，准备实验所需的小鼠。
 - 2) 进行预实验，分别利用 qRT-PCR、Western blot 实验测定在正常条件和高糖条件诱导下的 ARPE-19、HRECs 和 HRGCs 及正常小鼠和 DR 早期小鼠视网膜组织中 RACK1 在 mRNA、蛋白水平的表达情况。
 - 3) 通过慢病毒载体转染 ARPE-19、HRECs 和 HRGCs 技术沉默 RACK1 基因和基因敲除小鼠 RACK1 基因技术验证 RACK1 对 DR 早期的影响。

2024 年 1 月~2024 年 12 月

- 1) 构建沉默 RACK1 或 PKC 基因 ARPE-19、HRECs 和 HRGCs 来体外实验验证 RACK1 通过 PKC/STAT3 信号通路干预 DR 的发生发展。
- 2) 阶段性整理和分析 2023 年实验数据，探讨和改进实验研究措施等。

2025 年 1 月~2025 年 12 月

- 1) 活体下视网膜荧光血管造影和视觉敏锐度测试观察 RACK1 基因敲除 DR 早期小鼠与普通 DR 早期小鼠的视网膜血管及神经病变特征。
- 2) 分别利用 qRT-PCR、Western blot 实验验证 RACK1 基因敲除对抑制 DR 早期小鼠视网膜中 PKC、STAT3、IL-6、VEGF、GFAP 等基因的表达。
- 3) 阶段性整理和分析前两年的实验数据，撰写并发表阶段性论文。

2026 年 1 月~2026 年 12 月

- 1) 收集相关标本并利用 qRT-PCR、Western blot 实验测定在正常视网膜和 DR 早期患者视网膜中 RACK1 在 mRNA、蛋白水平的表达情况。
 - 2) 体内体外实验验证 RA 在 DR 早期阶段的有效性和安全性。
 - 3) 收集、整理资料，分析实验结果，撰写并发表学术论文，参加学术交流，提交结题报告
-

南昌大学第一附属医院医学研究伦理委员会
免除知情同意伦理审核申请表

项目名称：抗氧化药迷迭香酸靶向调控 RACK1/PKC/STAT3 信号通路对早期糖尿病视网膜病变进展的干预作用及其机制研究			
项目来源	国家自然科学基金	申请科室	眼科
项目负责人	周琼	职称	主任医师/教授
联系人	谭建	联系人电话	18720997601
拟研究样本/信息的来源：	(例：某某管理系统、某某电子病历系统等) 人视网膜组织样本来源于本单位保存的角膜移植捐献眼球和有糖尿病史脑死亡自愿捐献者。		
研究风险：样本捐献者信息泄露等风险。			
拟研究时间：2023 年 01 月 01 日 – 2026 年 12 月 31 日			
申请免除理由：生物样本捐献者已经签署了知情同意书，同意所捐献样本及相关信息可用于所有医学研究的。			
本人承诺，切实保护受试者的隐私，不将受试者个人信息向第三方透露。泄露患者隐私或未经授权公开其病历资料，造成患者损害的，应当承担侵权责任。			
项目负责人签名： 			
时间：2022.11.17			

备注：以下情形经伦理委员会审查批注后，可以免除签署知情同意书：1、利用可识别身份信息的人体材料或者数据进行研究，已无法找到该受试者，且研究项目不涉及个人隐私泄露和商业利益的；2、生物样本捐献者已经签署了知情同意书，同意所捐献样本及相关信息可用于所有医学研究的。

保密承诺书

南昌大学第一附属医院医学研究伦理委员会：

本人 南昌大学第一附属医院（单位名称）眼科
（科室）周琼（姓名），工号为 00822，身份证号为
360102196208065821，我已被告知各项安全保密管理制度，
知悉并应当承担的安全保密义务和法律责任，因此在项目开
展全过程中，本人郑重承诺：

1. 将严格遵守《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》
以及《中华人民共和国人类遗传资源管理条例》等相关法律
法规，绝不开展法律规定及医院允许以外的任何样本的采
集、保藏及使用活动；
2. 将严格遵守《赫尔辛基宣言》等伦理相关的道德原则，
绝不开展伦理规定以外的、或对受试者/捐献者产生不良影响
的相关活动；
3. 在项目开展期间，将严格保守所涉及的受试者或捐献
者的隐私信息；
4. 本人将严格依照医院相关规定，在未经允许下，绝不
将我院人遗样本或临床信息外送他人。

承诺人签名：



日期：

2022.11.17