

# 人视网膜色素上皮细胞在缺氧和高糖环境中 VEGF<sub>165</sub> 及 VEGF<sub>165b</sub> 的表达及意义

牛亚靖, 胡水清

作者单位: (121000) 中国辽宁省锦州市, 锦州医科大学附属第三医院眼科

作者简介: 牛亚靖, 本科, 主治医师, 研究方向: 眼科临床。

通讯作者: 牛亚靖. niuyajing1975@126.com

收稿日期: 2017-06-20 修回日期: 2018-02-01

## Expression of VEGF<sub>165</sub> and VEGF<sub>165b</sub> in human retinal pigment epithelial cells in hypoxia and high glucose environment

Ya-Jing Niu, Shui-Qing Hu

Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ya-Jing Niu. Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China. niuyajing1975@126.com

Received: 2017-06-20 Accepted: 2018-02-01

### Abstract

• **AIM:** Through the expression of VEGF<sub>165</sub> and VEGF<sub>165b</sub> in human retinal pigment epithelial cells *in vitro* in artificial simulated hypoxia and high glucose environment, to discuss their roles in the development of diabetic retinopathy and the relationship between each other.

• **METHODS:** After normal inoculation and cultivation of human retinal pigment epithelial cells (RPE) *in vitro*, the cells was divided into the normal group (5.56mmol/L glucose, without CoCl<sub>2</sub>), the hypoxia group (5.56mmol/L glucose + 150μmol/L CoCl<sub>2</sub>), the high glucose group (25mmol/L glucose, without CoCl<sub>2</sub>), the combination group (25mmol/L glucose + 150μmol/L CoCl<sub>2</sub>), a total of four groups. The RNA of each group was extracted respectively in 12h, 24h, 36h, and 48h. We used the MTT colorimetry to detect cell vitality and growth trend; RT-PCR method to detect VEGF<sub>165</sub> and VEGF<sub>165b</sub> relative expression of mRNA of RPE cells in four different time points.

• **RESULTS:** Hypoxia and high sugar environment limited proliferation of RPE cell division and cell vitality. After comparing cells of the same group in different time points, in the normal group there was no statistically significant different expression over time ( $P > 0.05$ ); the expression in the hypoxia group, the high glucose group and the combination group increased over time, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). At the

same time, differences of the expression between groups was not statistical significant in 12h ( $P > 0.05$ ); the difference was statistically significant in 24h, 36h, 48h ( $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** Cultured RPE cells can express VEGF<sub>165b</sub> normal. Lack of oxygen and high glucose can induce the increase of VEGF<sub>165</sub> mRNA, at the same time reduces the VEGF<sub>165b</sub> mRNA expression.

• **KEYWORDS:** retinal pigment epithelium cell; cobalt dichloride; vascular endothelial growth factor; neovascularization

**Citation:** Niu YJ, Hu SQ. Expression of VEGF<sub>165</sub> and VEGF<sub>165b</sub> in human retinal pigment epithelial cells in hypoxia and high glucose environment. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018; 18 (3): 423-428

### 摘要

**目的:** 研究体外培养的人视网膜色素上皮细胞在人工模拟的缺氧和高糖环境中 VEGF<sub>165</sub> 及 VEGF<sub>165b</sub> 表达的情况。

**方法:** 正常接种并体外培养人视网膜色素上皮细胞, 待细胞稳定生长后以 150μmol/L CoCl<sub>2</sub> 和 25mmol/L 葡萄糖浓度分别模拟细胞缺氧和高糖环境, 将接种细胞分为正常组 (5.56mmol/L 葡萄糖)、缺氧组 (5.56mmol/L 葡萄糖 + 150μmol/L CoCl<sub>2</sub>)、高糖组 (25mmol/L 葡萄糖, 不加 CoCl<sub>2</sub>)、联合组 (25mmol/L 葡萄糖 + 150μmol/L CoCl<sub>2</sub>) 共四组。每组分别于 12、24、36、48h 提取 RNA。MTT 比色法检测细胞活力及增长趋势; RT-PCR 法检测不同时间点四组 RPE 细胞 VEGF<sub>165</sub> mRNA 和 VEGF<sub>165b</sub> mRNA 的相对表达量。

**结果:** 缺氧和高糖环境下 RPE 细胞分裂增殖受限, 细胞活力降低。同一组细胞不同时间点比较, 正常组 VEGF<sub>165</sub> 和 VEGF<sub>165b</sub> 随时间变化的表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而缺氧组、高糖组、联合组 VEGF<sub>165</sub> 和 VEGF<sub>165b</sub> 的表达则随时间变化而变化, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。同一时间点各组相互比较, 在缺氧模型建立后 12h 各组细胞间 VEGF<sub>165</sub> 和 VEGF<sub>165b</sub> 的表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而 24、36、48h 时各组细胞 VEGF<sub>165</sub> 和 VEGF<sub>165b</sub> 的表达差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**结论:** 体外培养 RPE 细胞能够正常表达 VEGF<sub>165b</sub>, 缺氧和高糖是在转录水平诱导 VEGF<sub>165</sub> mRNA 的表达上调, 同时降低了 VEGF<sub>165b</sub> mRNA 的表达量。

**关键词:** 视网膜色素上皮细胞; 二氯化钴; 血管内皮生长因子; 新生血管

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.3.05

引用:牛亚靖,胡水清.人视网膜色素上皮细胞在缺氧和高糖环境中 VEGF<sub>165</sub>及 VEGF<sub>165b</sub>的表达及意义.国际眼科杂志 2018;18(3):423-428

## 0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病在眼部最常见和最严重的微血管并发症,也是50岁以上人群主要致盲眼病之一<sup>[1-2]</sup>。在病变的整个过程中,新生血管的形成是视网膜病变进展至晚期的标志,也是致盲的主要原因。在DR的众多发病机制中,细胞因子的作用受到了广泛关注<sup>[3]</sup>。而VEGF作为与新生血管形成有直接关系的细胞因子已被证实在DR的发生发展中起着关键作用<sup>[4-5]</sup>。近年来的研究发现,基因转录后根据外显子8的剪接方式不同,形成了两个蛋白家族,即:VEGF<sub>xxx</sub>家族和VEGF<sub>xxxb</sub>家族<sup>[6-7]</sup>。而在VEGF<sub>xxxb</sub>家族的多种异构体中VEGF<sub>165b</sub>是最早分离出来的,与VEGF<sub>165</sub>蛋白长度相等,却能够抑制VEGF<sub>165</sub>所介导的内皮细胞增殖、迁移及血管舒张、血管形成作用。人体内可能存在着VEGF<sub>165</sub>和VEGF<sub>165b</sub>两者之间的转换开关,这种由促进性向抑制性变构体的转换将有望成为治疗血管增生性眼部疾病等的关键,因此观察研究DR患者病程中VEGF<sub>165</sub>、VEGF<sub>165b</sub>的表达情况及变化趋势,对DR发病机制的探讨提供了新思路,也对研究DR新的治疗策略有着重要价值。

## 1 材料和方法

1.1 材料 实验细胞:人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞系D407购自实验动物中心细胞库。主要试剂:低糖DMEM培养基(美国GIBCO公司);高糖DMEM培养基(美国GIBCO公司);胎牛血清(FBS,美国GIBCO公司);DMSO(美国Sigma公司);噻唑兰(MTT,美国Amresco公司);Trizol Reagent(美国Invitrogen公司);TIANscript cDNA第一链合成试剂盒(天根生化科技有限公司);2×TapPCR Master mix[(含染料)天根生化科技有限公司];GoldView I型核酸染色剂[(10000×)北京Solarbio公司];DNA Marker(天根生化科技有限公司);其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 采用含10% FBS、青-链霉素混合液的DMEM/F12培养液培养细胞,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养。当细胞融合率达到80%~90%时,用0.25%胰酶(含EDTA)消化细胞,稳定传代至少两次,选择生长状态良好且形态正常的细胞用于实验。根据处理条件不同进行分组:正常组(5.56mmol/L葡萄糖)、缺氧组(5.56mmol/L葡萄糖+150μmol/L CoCl<sub>2</sub>)、高糖组(25mmol/L葡萄糖)、联合组(25mmol/L葡萄糖+150μmol/L CoCl<sub>2</sub>)。分别于处理后12、24、36、48h在显微镜下观察比较各组细胞的形态,摄片记录。

1.2.2 MTT法检测细胞增殖 收集对数生长期的细胞,拟铺板密度为5000个/孔,用含10% FBS的DMEM/F12培养液配成细胞悬液,接种于96孔板中,每孔细胞悬液体积为200μL,根据分组处理细胞,分别于处理后12、24、36、48h终止培养,弃原培养液,PBS清洗3次,每孔加入180μL DMEM培养液和20μL MTT溶液(5mg/L)。置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中继续孵育4h。选择490nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸光度(OD)值。

1.2.3 RT-PCR检测VEGF<sub>165</sub> mRNA、VEGF<sub>165b</sub> mRNA的表达 收集对数生长期的细胞,按3×10<sup>5</sup>个/孔的细胞密度分别接种于6孔板,根据分组处理细胞,分别于处理后12、24、36、48h终止培养,弃原培养液,PBS清洗3次。按照试剂盒说明提取细胞总RNA,应用Nanodrop2000(超微量紫外分光光度计)测定浓度。记录RNA浓度、A<sub>260</sub>、A<sub>280</sub>及A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>比值为1.7~2.0说明提取的RNA纯度高,若低于1.7则表明可能存在蛋白质污染。通过Pubmed检索Genebank获得对应mRNA的核苷酸序列,Primer5.0软件设计所需引物序列,引物由上海生物技术有限公司合成,引物序列如下:VEGF<sub>165</sub> F: 5'-CAGCTACTGCCATCCAATCGA-3'; R: 5'-TGCTGGCCTTGGTGAGGT-3'; VEGF<sub>165b</sub> F: 5'-GAGATGAGCTTCTACAGCAC-3'; R: 5'-TCAGTCTTTCTCTGCTGAGAGATCTGCA-3'; β-actin F: 5'-TGGATGATGATATCGCCGC-3'; R: 5'-CTAGATGGGCA CAGTGTGGGT-3'。

反应结束后,将产物用于琼脂糖凝胶电泳或置于-20℃冰箱中保存备用。重复实验6次,应用凝胶图像处理系统Quantity One 6.0软件测量目的基因VEGF<sub>165</sub>、VEGF<sub>165b</sub>及内参β-actin的积分吸光度值(A值),即A<sub>VEGF165</sub>/A<sub>β-actin</sub>及A<sub>VEGF165b</sub>/A<sub>β-actin</sub>,以此作为各组VEGF<sub>165</sub> mRNA及VEGF<sub>165b</sub> mRNA的相对表达量。分别计算各条带相对积分吸光度。

统计学分析:采用SPSS18.0统计软件进行分析,实验数据保留至小数点后三位,以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。不同的时间点,采用重复测量数据的方差分析,行正态性检验、方差齐性检验,两样本均数的比较采用LSD-t检验,组间多样本均数比较采用方差分析,以P<0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 细胞形态学观察 如图1所示,缺氧组、联合组细胞在干预后12h内与正常组细胞相比较,细胞形态变化并不明显。培养至24h,可见正常组细胞状态及生长速度优于缺氧组、高糖组和联合组,细胞快速分裂增殖,胞浆内含有大量色素颗粒。36h后,各组细胞数目均明显增多,但缺氧组、高糖组、联合组与正常组细胞比较开始逐渐出现细胞变圆、皱缩现象,甚至出现悬浮状态,胞浆内的色素颗粒从破裂死亡的细胞内释放入培养液中,细胞核也开始皱缩,细胞分裂增殖速度明显减慢。继续培养至48h,与正常组比较,其余三组细胞皱缩明显,悬浮、死亡细胞大量增加,色素颗粒大量丢失于培养液中,其中联合组较缺氧组、高糖组最为明显。

2.2 细胞OD值变化 四组细胞不同时间点细胞OD值变化比较差异有统计学意义(F=14.660, P<0.01; F=4.721, P<0.05)。在缺氧高糖模型建立后12、24h时间点4组细胞OD值比较,差异无统计学意义(P>0.05);在36、48h时间点4组细胞OD值比较,差异有统计学意义(P<0.05),缺氧组、高糖组、联合组在缺氧高糖模型建立后的36~48h与正常组比较,细胞增殖减慢,OD值上升趋势受限。缺氧组、高糖组、联合组分别与正常组比较,差异均具有统计学意义(P<0.05),说明自缺氧高糖模型建立后24h开始,3组细胞OD值均较正常组降低。另外,缺氧组、高糖组分别与联合组细胞比较,差异有统计学意义(P<0.05),说明缺氧联合高糖作用于RPE细胞较单纯缺



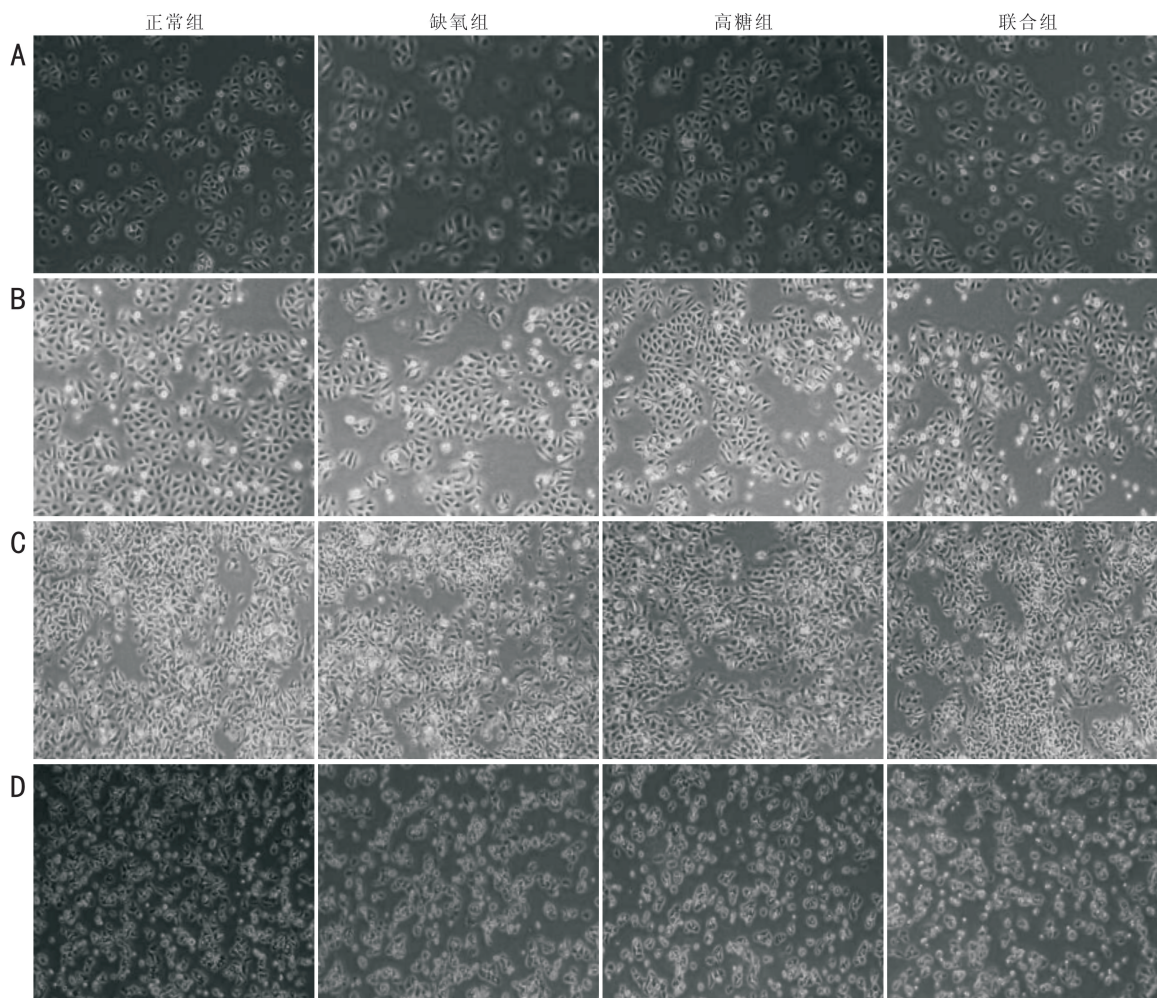


图1 各组细胞形态变化 A: 12h;B: 24h;C: 36h;D: 48h。

表1 各组 RPE 细胞不同时间点吸光度 OD 值变化

( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

组别	12h	24h	36h	48h
正常组	0.508±0.084	0.583±0.121	0.830±0.118	1.044±0.142
缺氧组	0.458±0.040	0.513±0.055	0.664±0.083	0.779±0.123
高糖组	0.493±0.056	0.557±0.097	0.712±0.080	0.814±0.101
联合组	0.463±0.039	0.513±0.033	0.578±0.064	0.610±0.041

表2 各组 RPE 细胞不同时间点吸光度 OD 值两两比较统计值

时间点	统计值	正常-缺氧	正常-高糖	正常-联合	缺氧-高糖	缺氧-联合	高糖-联合
12h	<i>t</i>	1.422	0.393	1.285	1.345	0.236	1.163
	<i>P</i>	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
24h	<i>t</i>	1.393	0.443	1.476	1.043	0.001	1.136
	<i>P</i>	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
36h	<i>t</i>	3.044	2.189	4.966	1.101	2.177	3.461
	<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05
48h	<i>t</i>	4.461	3.492	7.768	2.117	3.441	4.95
	<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.01	0.07	<0.05	<0.05

氧和单纯高糖作用更为显著的降低了 OD 值。而缺氧组与高糖组比较,两者差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见表 1、2。

**2.3 各组 RPE 细胞 VEGF<sub>165</sub> mRNA 表达情况** 四组细胞不同时间点 RPE 细胞 VEGF<sub>165</sub> mRNA 表达情况比较差异有统计学意义 ( $F = 218.383, P < 0.01$ ;  $F = 172.149, P < 0.01$ )。正常组细胞在分别培养 12、24、36、48h 的 VEGF<sub>165</sub>

mRNA 的相对表达量相互比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),说明在正常环境下培养的 RPE 细胞稳定表达 VEGF<sub>165</sub>,不随时间的变化而变化。缺氧组、高糖组和联合组 VEGF<sub>165</sub> mRNA 的相对表达量随着培养时间的增加而增加,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),说明缺氧组、高糖组、联合组细胞 VEGF<sub>165</sub> mRNA 的相对表达量随着缺氧、高糖作用时间长短而产生了变化。12h 时,各组之间两两

表3 各组细胞在不同时间点 VEGF<sub>165</sub> mRNA 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	12h	24h	36h	48h
正常组	0.356±0.014	0.374±0.027	0.380±0.028	0.368±0.024
缺氧组	0.368±0.019	0.533±0.017	0.613±0.018	0.719±0.023
高糖组	0.384±0.022	0.496±0.013	0.597±0.021	0.696±0.016
联合组	0.375±0.020	0.593±0.020	0.717±0.021	0.821±0.020

表4 VEGF<sub>165</sub> mRNA 相对表达量两两比较的统计值

时间点	统计值	正常-缺氧	正常-高糖	正常-联合	缺氧-高糖	缺氧-联合	高糖-联合
12h	<i>t</i>	1.345	2.841	2.059	1.456	0.671	0.801
	<i>P</i>	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
24h	<i>t</i>	10.090	8.193	13.050	3.653	4.759	8.345
	<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	0.003	0.0005	<0.01
36h	<i>t</i>	15.380	13.580	20.810	1.234	8.108	8.649
	<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	0.241	<0.01	<0.01
48h	<i>t</i>	22.550	24.090	29.630	1.761	7.114	10.130
	<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	0.104	<0.01	<0.01

表5 各组细胞在不同时间点 VEGF<sub>165b</sub> mRNA 相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	12h	24h	36h	48h
正常组	0.125±0.021	0.123±0.015	0.128±0.014	0.127±0.010
缺氧组	0.122±0.018	0.090±0.014	0.066±0.011	0.038±0.013
高糖组	0.118±0.022	0.082±0.010	0.063±0.011	0.036±0.011
联合组	0.116±0.013	0.057±0.009	0.035±0.009	0.019±0.007

比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),而在 24、36、48h 时,各组细胞 VEGF<sub>165</sub> mRNA 的相对表达量两两比较,差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。说明四组细胞在最初 12h 内 VEGF<sub>165</sub> mRNA 的表达量差异不明显,而自 24h 开始,逐渐发生了变化,见表 3,图 2。缺氧组、高糖组、联合组分别与正常组比较,差异均具有统计学意义 ( $P<0.05$ ),说明自缺氧高糖模型建立后 24h 开始,3 组细胞 VEGF<sub>165</sub> mRNA 的表达量均较正常组升高。另外,缺氧组、高糖组分别与联合组细胞比较,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),说明缺氧联合高糖作用于 RPE 细胞较单纯缺氧和单纯高糖作用更为显著地升高了 VEGF<sub>165</sub> mRNA 的表达量。而缺氧组与高糖组比较,仅在缺氧高糖模型建立 24h 时,两者的差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),高糖组 VEGF<sub>165</sub> mRNA 的表达量低于缺氧组,而在 36h、48h 时间点,两者差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),说明缺氧作用在模型建立早期 (12~24h) 促进 VEGF<sub>165</sub> mRNA 的表达的作用较高糖作用强,见表 4。

**2.4 各组 RPE 细胞 VEGF<sub>165b</sub> mRNA 表达情况** 四组细胞不同时间点 RPE 细胞 VEGF<sub>165b</sub> mRNA 表达情况比较差异有统计学意义 ( $F=25.512, P<0.01; F=51.480, P<0.01$ )。正常组细胞在分别培养 12、24、36、48h 后 VEGF<sub>165b</sub> mRNA 的相对表达量差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),说明在正常环境下 RPE 细胞 VEGF<sub>165b</sub> mRNA 的表达不随时间的变化而变化。缺氧组、高糖组和联合组 VEGF<sub>165b</sub> mRNA 的相对表达量随着培养时间的增加而降低。说明 RPE 细胞在缺氧高糖环境下随着培养时间的延长,VEGF<sub>165b</sub> mRNA 的表达量逐渐降低,见表 5,图 3。缺氧组、高糖组、联合组在缺氧高糖模型建立后 12h 时 VEGF<sub>165b</sub> mRNA 的表达与正常组相比差异无统计学意义

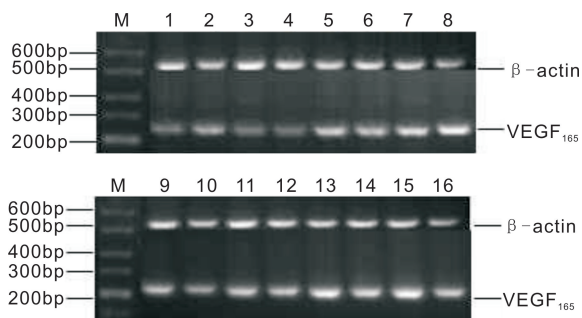


图2 RT-PCR 凝胶电泳结果 M: Marker; 1~4 泳道依次为 12h 时正常组、缺氧组、高糖组、联合组; 5~8 泳道依次为 24h 时正常组、缺氧组、高糖组、联合组; 9~12 泳道依次为 36h 时正常组、缺氧组、高糖组、联合组; 13~16 泳道依次为 48h 时正常组、缺氧组、高糖组、联合组。

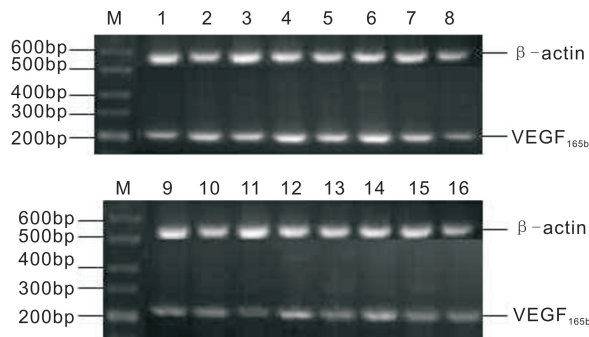


图3 RT-PCR 凝胶电泳结果 M: Marker; 1~4 泳道依次为 12h 时正常组、缺氧组、高糖组、联合组; 5~8 泳道依次为 24h 时正常组、缺氧组、高糖组、联合组; 9~12 泳道依次为 36h 时正常组、缺氧组、高糖组、联合组; 13~16 泳道依次为 48h 时正常组、缺氧组、高糖组、联合组。



表6 VEGF<sub>165b</sub> mRNA 相对表达量两两比较的统计值

时间点	统计值	正常-缺氧	正常-高糖	正常-联合	缺氧-高糖	缺氧-联合	高糖-联合
12h	<i>t</i>	0.286	0.608	0.964	0.372	0.714	0.207
	<i>P</i>	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
24h	<i>t</i>	3.256	5.118	7.841	0.976	3.749	3.834
	<i>P</i>	0.007	0.0003	<0.01	0.348	0.003	0.002
36h	<i>t</i>	7.013	7.244	10.640	0.342	4.415	4.015
	<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	0.739	0.0008	0.0017
48h	<i>t</i>	10.210	11.89	16.18	0.255	2.555	2.738
	<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	0.803	0.025	0.018

( $P>0.05$ )。而 24、36、48h 时,缺氧组、高糖组、联合组分别与正常对照组比较,VEGF<sub>165b</sub> mRNA 的相对表达量均降低,且差异有统计学意义( $P<0.05$ )。联合组分别与缺氧组、高糖组比较,VEGF<sub>165b</sub> mRNA 的相对表达量更为降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),说明了缺氧联合高糖比单纯缺氧和单纯高糖对 RPE 细胞 VEGF<sub>165b</sub> mRNA 的表达影响更大。同时,将同一时间点的缺氧组和高糖组细胞进行比较,结果显示:两者 VEGF<sub>165b</sub> mRNA 的相对表达量的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),说明单纯缺氧和单纯高糖环境对 RPE 细胞 VEGF<sub>165b</sub> mRNA 表达的影响作用相似(表 6)。

### 3 讨论

随着近年来国内外专家们对 VEGF<sub>xxx</sub> 家族的了解,VEGF<sub>xxx</sub> 与 VEGF<sub>xxx</sub> 得以区分,VEGF<sub>xxx</sub> 在肿瘤疾病方面表现出与 VEGF<sub>xxx</sub> 促血管生成作用相反的抗血管生成作用受到广泛关注。2005-09, Diabetologia 发表了第一篇关于 VEGF<sub>xxx</sub> 在眼组织中表达的文献,揭示了其在正常眼及糖尿病眼中的表达变化<sup>[8]</sup>。Perrin 等<sup>[8]</sup> 为研究玻璃体细胞中是否存在 VEGF<sub>xxx</sub> 家族的表达,结果显示 5 名正常人玻璃体都表达 VEGF<sub>xxx</sub>,而 8 例糖尿病患者中,仅 1 例玻璃体中有 VEGF<sub>xxx</sub> 表达,且 VEGF<sub>xxx</sub> 条带在非糖尿病人群中的表达强度明显高于糖尿病患者中 VEGF<sub>xxx</sub> 的表达强度,说明在糖尿病患者眼组织中,VEGF<sub>xxx</sub>/VEGF<sub>xxx</sub> 比值变大。这两种具有相反作用的异构体之间平衡关系被破坏说明剪接的调节可能发生了改变。在正常的眼部组织,血管生成的自身稳定是由血管生成的促进物质和抑制物质之间的平衡所控制,多数正常组织内抑制因素占主导地位。VEGF<sub>xxx</sub> 与 VEGF<sub>xxx</sub> 的区分意味着过去大量的关于人视网膜、玻璃体、血浆及各种与 VEGF 表达有关的眼部疾病的研究在一定程度上存在着局限性<sup>[8-9]</sup>。在 VEGF<sub>xxx</sub> 家族的多种异构体中 VEGF<sub>165b</sub> 是最早分离出来的,基于国内外的众多研究中 VEGF<sub>165</sub> 数量和功能上的主导地位,研究其异构体 VEGF<sub>165b</sub> 的生物学特性及两者之间可能存在的联系就变得有意义了。

有学者将初生鼠从高氧条件转入正常环境,诱导产生视网膜新生血管模型后,眼球内注射 1ng 重组人 VEGF<sub>165b</sub>,结果显示 VEGF<sub>165b</sub> 明显抑制了视网膜新生血管的形成,同时并未发现其抗血管生成效应导致视网膜缺血情况的出现,对视网膜生理性的血管无抑制作用<sup>[10-12]</sup>。由此推断 VEGF<sub>165b</sub> 具有内源性抗血管生成的作用。但引人思考的是 VEGF<sub>165b</sub> 是否在常氧环境下的 RPE 细胞中正

常表达,缺氧环境中 RPE 细胞 VEGF<sub>165</sub> 表达上调的同时是否存在 VEGF<sub>165b</sub> 表达的下降,VEGF<sub>165</sub> 与 VEGF<sub>165b</sub> 在不同环境下的 RPE 细胞表达有什么关系? 本研究分别利用化学诱导剂 CoCl<sub>2</sub> 和高浓度葡萄糖培养基模拟 DR 患者 RPE 细胞的缺氧状态和局部高血糖环境,传代后培养正常 RPE 细胞 24h,待细胞同步化后,分为正常组、缺氧组、高糖组及联合组共 4 组。根据细胞活力检测找出细胞有明显反映差异的关键时间点,以缺氧、高糖模型建立后 12~48h 内 RPE 细胞反映差异最为明显。正常状态下 RPE 细胞在最初 12h 增殖速度缓慢,24h 则开始对数生长,48h 达高峰,此后则出现一定程度的生长受限。与之相比较,缺氧和高糖环境下的 RPE 细胞活力明显低于正常对照组。DR 发生、发展的重要病理基础即视网膜局部持续的缺氧、高糖状态引起视网膜毛细血管的周细胞减少、基底膜增厚、血-视网膜屏障的破坏、新生血管形成。有学者研究显示与正常条件下 RPE 细胞相比,高糖环境下的 RPE 细胞明显受到抑制<sup>[13-14]</sup>;李漫丽等<sup>[15]</sup> 则发现,缺氧环境会诱导人或其他种属 RPE 细胞发生凋亡。由此说明,DR 的发生与缺氧、高糖状态下 RPE 细胞功能受损有关。

综上所述,本研究认为正常人眼组织中可能存在着 VEGF<sub>165</sub> 和 VEGF<sub>165b</sub> 这两种具有相反作用的异构体之间的平衡,在 DR 的发生发展过程中,持续的缺氧和高糖环境在促进 RPE 细胞 VEGF<sub>165</sub> 表达上调的同时降低了 VEGF<sub>165b</sub> 的表达,两者的平衡关系被打破,两个同型异构体剪接的调节可能发生了变化。在今后 DR 的预防和治疗方面,将有促进新生血管生成作用的 VEGF<sub>165</sub> 向有抑制血管生成作用的 VEGF<sub>165b</sub> 转化有望成为新的治疗思路和策略。

### 参考文献

- 1 郑志. 糖尿病视网膜病变临床防治:进展、挑战与展望. 中华眼底病杂志 2012;28(3):209-214
- 2 彭金娟,黄建南,陆丽娜,等. 糖尿病视网膜病变远程筛查系统的研究进展. 中华眼科杂志 2016;52(11):868-871
- 3 睢瑞芳. 认识糖尿病视网膜病变易感基因研究现状与挑战,提高糖尿病视网膜病变易感基因研究水平. 中华眼底病杂志 2016;32(2):122-125
- 4 谢安明,王雅君,崔丽珺,等. 血管内皮祖细胞与 VEGF 对增生性糖尿病视网膜病变新生血管形成的影响. 西安交通大学学报(医学版) 2013;34(2):233-236
- 5 刘波,林海,史纪文,等. 细胞因子 VEGF、IGF-1 与 2 型糖尿病视网膜病变的相关性研究. 中国实验诊断学 2012;16(7):1206-1208

6 郭露,吕红彬. 血管内皮生长因子-2578C/A 基因的多态性与糖尿病视网膜病变发生风险的 Meta 分析. 中华实验眼科杂志 2015;33(1):70-75

7 郭露,吕红彬. 亚洲及欧洲人群血管内皮生长因子基因多态性与糖尿病视网膜病变的相关性 meta 分析. 中华眼底病杂志 2015;31(2):173-178

8 Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y, et al. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia* 2005; 48(11):2422-2427

9 范思均,何守志. 抗血管生成作用的 VEGF<sub>xxx</sub>b 在缺氧视网膜色素上皮细胞中的表达. 中华实验眼科杂志 2014;32(11):1014-1020

10 侯亚南,雷宁玉,宋斌,等. 音猬因子信号通路在缺氧诱导的人视网膜色素上皮细胞中血管内皮生长因子表达中的作用. 中华眼底病杂志 2016;32(1):62-65

11 范妍,路宏,侯定善,等. 缺氧条件下 1-磷酸鞘氨醇对人视网膜色素上皮细胞的促增生和抗凋亡作用. 中华实验眼科杂志 2015;33(1):33-37

12 Qiu Y, Bevan H, Weempemma S, et al. Mammary alveolar development during lactation is inhibited by the endogenous antiangiogenic growth factor isoform, VEGF<sub>165b</sub>. *Faseb J* 2008;22(4):1104-1112

13 邵珺,姚勇. 高糖缺氧环境下转甲状腺素蛋白对视网膜血管内皮细胞的影响. 中华眼底病杂志 2016;32(2):159-162

14 张春侠,胡建民,庄铭忠,等. 高糖对人视网膜色素上皮细胞 VEGF 及 PEDF 表达的影响. 中国实用眼科杂志 2012;30(11):1373-1376

15 李漫丽,戚卉,吴雅臻,等. 缺氧、氧化应激对视网膜色素上皮细胞增殖及葡萄糖调节蛋白 78 表达的影响. 眼科新进展 2014;34(9):826-829

## 2016 中国眼科期刊 CiteScore 世界排名 (全球共收录 101 种)

近期,学术出版巨头爱思唯尔(Elsevier)依据 Scopus 数据库发布了 2016 年度期刊引用指数榜 CiteScore。CiteScore,这是一个全新的衡量期刊影响因子的指标。计算方法是:期刊连续 3 年论文在第 4 年度的篇均引用次数,且不剔除任何类型的文章。以下是 2016 CiteScore 中国眼科期刊在全球 101 种眼科期刊的排名:

刊名	出版地	语言	CiteScore	排名
International Journal of Ophthalmology (国际眼科杂志英文版)	中国大陆	英文	1.31	44/101
Asia-Pacific Journal of Ophthalmology (亚太眼科杂志)	中国香港	英文	0.35	74/101
Chinese Journal of Ophthalmology (中华眼科杂志)	中国大陆	中文	0.26	79/101
Chinese Journal of Experimental Ophthalmology (中华实验眼科杂志)	中国大陆	中文	0.14	82/101
Taiwan Journal of Ophthalmology (台湾眼科杂志)	中国台湾	英文	0.11	84/101
International Eye Science (国际眼科杂志中文版)	中国大陆	中文	0.03	93/101
Ophthalmology in China (眼科)	中国大陆	中文	0.03	93/101

源自:<https://journalmetrics.scopus.com>