

# 水蛭提取液通过 VEGF/PI3K/AKT 通路抑制 WERI-RB-1 细胞表达 VEGF

李园媛<sup>1</sup>, 郑燕林<sup>2</sup>, 李建超<sup>1</sup>, 惠延年<sup>3</sup>, 马士航<sup>1</sup>, 黄慧<sup>2</sup>, 王芳<sup>2</sup>, 马宏杰<sup>4</sup>

引用: 李园媛, 郑燕林, 李建超, 等. 水蛭提取液通过 VEGF/PI3K/AKT 通路抑制 WERI-RB-1 细胞表达 VEGF. 国际眼科杂志 2022;22(12):1955-1959

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.81774372); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (No.2020JM-698)

作者单位:<sup>1</sup>(710000) 中国陕西省西安市中医医院眼科;  
<sup>2</sup>(610000) 中国四川省成都市, 成都中医药大学附属医院眼科;  
<sup>3</sup>(710032) 中国陕西省西安市, 空军军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所;  
<sup>4</sup>(450000) 中国河南省郑州市, 郑州爱尔眼科医院

作者简介: 李园媛, 博士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合眼病。

通讯作者: 马士航, 毕业于西藏民族大学, 主治医师, 研究方向: 中西医结合眼病. nicetymyself@163.com

收稿日期: 2022-04-13 修回日期: 2022-11-10

## 摘要

**目的:** 研究水蛭提取液对视网膜母细胞瘤细胞 (WERI-RB-1 细胞) 表达血管内皮生长因子 (VEGF) 的影响及相关分子机制。

**方法:** 将体外培养的 WERI-RB-1 细胞分为对照组、0.04U/mL 水蛭提取液组、0.08U/mL 水蛭提取液组, 对照组采用完全培养基培养 48h, 水蛭提取液组分别采用含 0.04、0.08U/mL 含药培养基培养 48h。采用 ELISA 法检测各组细胞培养基上清液中 VEGF 表达水平; 采用 RT-PCR 法检测各组细胞缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 和基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) mRNA 相对表达水平; 采用 Western Blot 法检测各组细胞 HIF-1 $\alpha$ 、MMP-9、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、人磷酸化蛋白激酶 (p-AKT) 相对表达水平。

**结果:** 与对照组比较, 水蛭提取液组细胞培养基上清液中 VEGF 表达均降低 ( $P < 0.05$ ), 0.04、0.08U/mL 水蛭提取液对 VEGF 表达抑制率分别为 32.43%、38.92%。与对照组比较, 水蛭提取液组细胞 HIF-1 $\alpha$  和 MMP-9 mRNA 相对表达水平均明显降低 ( $P < 0.05$ ), 0.04、0.08U/mL 水蛭提取液对 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达抑制率分别为 27.64%、24.75%, 对 MMP-9 mRNA 表达抑制率分别为 43.97%、51.48%。与对照组比较, 水蛭提取液组细胞 HIF-1 $\alpha$ 、MMP-9、PI3K、p-AKT 蛋白相对表达水平均明显降低 ( $P < 0.05$ ), 0.04、0.08U/mL 水蛭提取液对 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达抑制率分别为 55.81%、43.85%, 对 MMP-9 蛋白表达抑制率分别为 39.49%、47.23%, 对 PI3K 蛋白表达抑制率分别为 33.27%、29.83%, 对 p-AKT 蛋白表达抑制率分别为 52.07%、30.21%。

**结论:** 水蛭提取液可能通过 VEGF/PI3K/AKT 通路及 HIF-1 $\alpha$ 、MMP-9 因子抑制 WERI-RB-1 细胞 VEGF 的表达。

**关键词:** 水蛭提取液; 视网膜母细胞瘤; 血管内皮生长因子 (VEGF); 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 (PI3K/AKT); 信号通路

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2022.12.04

## Leech extract inhibits VEGF expression in WERI-RB-1 cells possibly via VEGF/PI3K/AKT signal pathway

Yuan-Yuan Li<sup>1</sup>, Yan-Lin Zheng<sup>2</sup>, Jian-Chao Li<sup>1</sup>, Yan-Nian Hui<sup>3</sup>, Shi-Hang Ma<sup>1</sup>, Hui Huang<sup>2</sup>, Fang Wang<sup>2</sup>, Hong-Jie Ma<sup>4</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No.81774372); Natural Science Basic Research Project of Shaanxi Province (No.2020JM-698)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710000, Shaanxi Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610000, Sichuan Province, China; <sup>3</sup>Eye Institute of PLA; Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China; <sup>4</sup>Zhengzhou Aier Eye Hospital, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

**Correspondence to:** Shi-Hang Ma. Department of Ophthalmology, Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710000, Shaanxi Province, China. nicetymyself@163.com

Received: 2022-04-13 Accepted: 2022-11-10

## Abstract

• **AIM:** To study the effect of leech extract on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in retinoblastoma (WERI-RB-1 cells) and the related molecular mechanism.

• **METHODS:** WERI-RB-1 cells cultured *in vitro* were divided into control group, 0.04U/mL leech extract group and 0.08U/mL leech extract group. The control group was cultured with complete medium for 48h, and the leech extract group was cultured with 0.04 and 0.08U/mL drug-containing medium for 48h, respectively. The expression level of VEGF in conditioned medium of cell culture was detected by ELISA. The mRNA levels of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were detected by RT-PCR. The expression levels of HIF-1 $\alpha$ , MMP-9, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and human phosphorylated AKT (p-AKT) were detected by Western Blot.

• **RESULTS:** Compared with the control group, the

expression of VEGF in the conditioned medium with the concentration of 0.04U/mL and 0.08U/mL of leech extract was decreased ( $P < 0.05$ ), and the inhibition rate was 32.43% and 38.92%, respectively. The expression levels of HIF-1 $\alpha$  and MMP-9 mRNA were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The inhibition rates of HIF-1 $\alpha$  mRNA expression of the two leech extracts were 27.64% and 24.75%, respectively. The inhibition rate of MMP-9 mRNA expression was 43.97% and 51.48%, respectively. The protein expression levels of HIF-1 $\alpha$ , MMP-9, PI3K and p-AKT were significantly decreased compared with the control group ( $P < 0.05$ ). The inhibition rates of 0.04 and 0.08U/mL leech extracts on the protein expression of HIF-1 $\alpha$ , MMP-9, PI3K and p-AKT were 55.81% and 43.85%, 39.49% and 47.23%, 33.27% and 29.83%, 52.07% and 30.21%, respectively.

• CONCLUSION: Leech extract may inhibit the expression of VEGF in WERI-RB-1 cells via the VEGF/PI3K/AKT pathway or HIF-1 $\alpha$  and MMP-9 factors.

• KEYWORDS: leech extract; retinoblastoma; vascular endothelial growth factor (VEGF); phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT); signal pathway

**Citation:** Li YY, Zheng YL, Li JC, et al. Leech extract inhibits VEGF expression in WERI-RB-1 cells possibly via VEGF/PI3K/AKT signal pathway. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022; 22(12):1955-1959

## 0 引言

视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 是3岁以下婴幼儿最常见的眼内恶性肿瘤,也可见于年长的儿童甚至成年人<sup>[1-3]</sup>。肿瘤早期局限于眼球内,随病程进展可发生眼外转移甚至致命<sup>[4]</sup>。近30a来,RB的治疗取得明显进展,静脉化学药物疗法、眼动脉超选介入化疗等可以保留患眼,但存在明显的副作用<sup>[5]</sup>。寻求更有效、安全的药物或生物疗法是必要的。

RB细胞可分泌多种生长因子,如血管内皮生长因子(VEGF)。研究发现,VEGF蛋白在RB细胞中呈高表达<sup>[6]</sup>,VEGF是RB研究中最彻底和广泛被探索的促血管生成因子,在调节肿瘤血管生成和转移中起重要作用<sup>[7-10]</sup>。另有研究发现,磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶(PI3K/AKT)信号通路调控与增殖、转化、存活、迁移、血管生成相关的多种因子,包括基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )<sup>[11-13]</sup>。有报道称,PI3K信号通路可被包括VEGF在内的多种生长因子激活<sup>[14-15]</sup>。PI3K/AKT信号通路激活后,下游靶基因HIF-1 $\alpha$ 被激活,调节刺激血管生成基因的转录,如VEGF和MMP-9<sup>[16-19]</sup>。HIF-1 $\alpha$ 、MMP-9在肿瘤细胞侵袭中具有特殊作用,二者可通过多种信号作用方式相互调节<sup>[20-21]</sup>。机体缺氧时,组织缺氧释放大量的MMP-9,从而促使MMP-9信号通路相关因子的表达增加,即HIF-1 $\alpha$ 上调MMP-9的表达。阻断HIF-1 $\alpha$ /MMP-9信号通路可促进肿瘤无功能血管的发生,这些无功能血管不能有效输送肿瘤生长所需的氧气和营养物质,达到延缓和抑制肿瘤生长的目的<sup>[22-25]</sup>。因此,VEGF/PI3K/AKT、HIF/MMP-9等信

号通路为靶点的研究可作为抑制RB的重点。然而,目前关于VEGF/PI3K/AKT、HIF/MMP-9信号通路在RB中的研究较少,其作用仍需进一步探索。前期研究发现,水蛭提取物具有抑制成纤维细胞增生的作用<sup>[26]</sup>,水蛭提取液可有效抑制人视网膜母细胞瘤细胞WERI-Rb-1细胞系增殖和侵袭,并诱导细胞凋亡<sup>[27]</sup>。因此,本研究通过VEGF/PI3K/AKT通路及相关因子,丰富和完善水蛭提取液对视网膜母细胞瘤细胞增殖、凋亡和侵袭作用的影响,为其潜在的治疗作用提供理论基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** WERI-RB-1细胞(中国科学院上海生命科学研究院, No.3131C0001001200012)。水蛭干粉(兰州安泰堂中药饮片公司;生产批号:14082702;GMP证书号:甘J0071;水蛭提取液提取方法及浓度选择参考文献<sup>[26]</sup>); Human VEGF Elisa试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司);总RNA抽提试剂TRIZOL、PrimeScript RT reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq II Kit、HIF-1 $\alpha$ 、MMP-9鼠单克隆抗体(美国Santa公司);预染蛋白Marker(美国NEB公司);ECL发光试剂盒(美国Thermo公司);PVDF膜(美国Hybond公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(南京凯基生物公司)。RT-PCR仪(美国Thermo Fisher公司);垂直电泳槽、DYY-6C电泳仪、Image Lab凝胶分析系统(美国Bio-rad公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** WERI-RB-1细胞从液氮容器中快速取出,提前备好约50℃无菌水,迅速解冻,2500g 20℃离心10min,丢弃上清液,加入2mL完全培养基RPMI-1640重悬细胞,以适当密度接种到6孔板中,然后在恒温培养箱中培养。培养基每隔1天更换1次。待培养皿内细胞生长至70%~80%时以1:2比例进行传代培养。

**1.2.2 实验分组及药物干预** 取对数生长期的WERI-RB-1细胞,以 $5 \times 10^5$  cells/mL接种于6孔板中,每孔加入800 $\mu$ L细胞悬液,细胞培养箱中培养过夜后分3组,对照组加完全培养基,0.04U/mL水蛭提取液组、0.08U/mL水蛭提取液组分别加入含0.04、0.08U/mL的含药培养基,置培养箱培养48h。

**1.2.3 ELISA检测VEGF表达水平** 将试剂盒和样品(各组细胞培养基上清液)平衡至室温,样品分别用标本稀释液稀释(1:100),混合均匀后各取100 $\mu$ L加入到96板孔。设阴阳性对照各一孔组,同时设加入100 $\mu$ L标准通用稀释液作为空白对照孔,每组设6孔。37℃孵育60min。吸取孔内液体,用洗涤液连续洗涤3次,每次停留30s后吸取孔内液体,并在吸水纸上拍干,空白孔加生物素化抗体稀释液,其余孔加生物素化抗体工作液(每孔100 $\mu$ L),37℃孵育60min。用洗涤液连续洗涤3次,吸水纸上拍干。空白孔加酶结合物稀释液,其余孔加酶结合物工作液(每孔100 $\mu$ L),37℃孵育30min。每孔加入显色底物(TMB)100 $\mu$ L,37℃避光孵育15min。每孔加入终止液100 $\mu$ L,混匀后即刻测量450nm处OD值。

**1.2.4 RT-PCR检测HIF-1 $\alpha$ 和MMP-9 mRNA相对表达水平** 收集各组细胞,分别加入1mL TRIZOL,充分匀浆、萃取RNA。逆转录试剂盒逆转录合成cDNA。RT-PCR

法检测 HIF-1 $\alpha$  和 MMP-9 mRNA 表达情况,配制 20 $\mu$ L PCR 反应体系,反应条件:95 $^{\circ}$ C 10min,95 $^{\circ}$ C 15s,58 $^{\circ}$ C 50s,58 $^{\circ}$ C 50s,45 个循环, $\beta$ -Actin 为内参基因,使用 Thermo Scientific PikoReal 软件(Thermo 公司)分析各检测样本的 CT 值,并通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算目的基因相对表达水平。所有样本重复检测 3 次,取平均值。引物序列见表 1。

**1.2.5 Western Blot 检测 HIF-1 $\alpha$ 、MMP-9、PI3K、p-AKT 蛋白相对表达水平** 收集各组细胞,裂解提取蛋白,BCA 法进行蛋白定量,35 $\mu$ g 样本蛋白混合等体积上样,电泳后转移至 PVDF 膜,封闭液封闭,室温孵育 2h,加入 PI3K (1:800)、p-AKT (1:500)、HIF-1 $\alpha$  (1:500)、MMP-9 (1:800)一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10min,加入二抗(1:10000),室温孵育 45min,显色,并采用 LabWorks 软件分析蛋白条带灰度值,以目的条带与内参条带  $\beta$ -Actin 比值表示目的蛋白的表达水平,计算 p-AKT、PI3K、HIF-1 $\alpha$  及 MMP-9 蛋白相对表达量。

统计学分析:采用 GraphPad Prism 7 软件进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,三组间比较采用单因素方差分析,若差异有统计学意义进一步两两比较采用 LSD- $t$  检验。 $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 水蛭提取液对 WERI-RB-1 细胞表达 VEGF 的影响

ELISA 检测结果显示,对照组、0.04U/mL 水蛭提取液组、0.08U/mL 水蛭提取液组细胞培养基上清液中 VEGF 表达差异有统计学意义( $F=93.4, P<0.05$ ),且水蛭提取液组均低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 1。0.04、0.08U/mL 水蛭提取液对 VEGF 表达的抑制率分别为 32.43%、38.92%。

**2.2 水蛭提取液对 WERI-RB-1 细胞表达 HIF-1 $\alpha$  和 MMP-9 mRNA 的影响** RT-PCR 检测结果显示,对照组、0.04U/mL 水蛭提取液组、0.08U/mL 水蛭提取液组细胞 HIF-1 $\alpha$  和 MMP-9 mRNA 的相对表达水平差异均有统计学意义( $F=36.7, 74.5$ , 均  $P<0.05$ ),且水蛭提取液组均低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2。0.04、0.08U/mL 水蛭提取液对 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达的抑制率分别为 27.64% 和 24.75%,对 MMP-9 mRNA 表达的抑制率分别为 43.97% 和 51.48%。

**2.3 水蛭提取液对 WERI-RB-1 细胞表达 PI3K 和 p-AKT 蛋白的影响** Western Blot 检测结果显示,对照组、0.04U/mL 水蛭提取液组、0.08U/mL 水蛭提取液组细胞 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平差异均有统计学意义( $F=51.8, 70.4$ , 均  $P<0.05$ ),且水蛭提取液组均低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 3。0.04、0.08U/mL 水蛭提取液对 PI3K 蛋白表达的抑制率分别为 33.27%、29.83%,对 p-AKT 蛋白表达的抑制率分别为 52.07%、30.21%。

**2.4 水蛭提取液对 WERI-RB-1 细胞表达 HIF-1 $\alpha$  和 MMP-9 蛋白的影响** Western Blot 检测结果显示,对照组、0.04U/mL 水蛭提取液组、0.08U/mL 水蛭提取液组细胞 HIF-1 $\alpha$ 、MMP-9 蛋白表达水平差异均有统计学意义

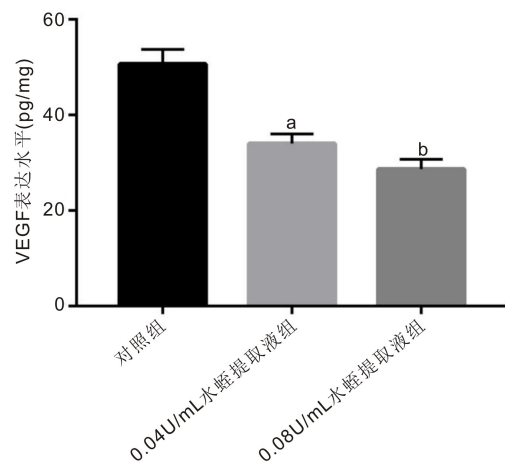


图 1 ELISA 检测 VEGF 蛋白的表达 <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 对照组。

( $F=66.2, 80.9$ , 均  $P<0.05$ ),且水蛭提取液组均低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 4。0.04、0.08U/mL 水蛭提取液对 MMP-9 蛋白表达的抑制率分别为 39.49%、47.23%,对 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的抑制率分别为 55.81%、43.85%。

## 3 讨论

本研究首先观察水蛭提取液处理 WERI-RB-1 细胞后 VEGF 的表达情况,通过 ELISA 分析发现,0.04、0.08U/mL 水蛭提取液处理 WERI-RB-1 细胞 48h 后,VEGF 表达被抑制,0.04、0.08U/mL 水蛭提取液对 VEGF 表达的抑制率分别为 32.43%、38.92%,呈现剂量依赖趋势。李先建等<sup>[28]</sup>关于水蛭素对肝癌细胞 HepG2 的抑制作用及其分子机制的研究发现,水蛭素能抑制肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭,其机制可能是通过下调 VEGF 表达。诸佳瑜<sup>[29]</sup>研究水蛭含药血浆、血清对人胰腺癌 PANC-1 细胞的影响,结果表明水蛭含药血浆、血清对人胰腺癌 PANC-1 细胞具有抑制增殖、迁移及抑制 VEGF 表达的作用。上述研究结果与本研究结果一致。本研究采用 RT-PCR 法检测经 0.04、0.08U/mL 水蛭提取液处理的 WERI-RB-1 细胞中 MMP-9 和 HIF-1 $\alpha$  mRNA 相对表达水平,采用 Western Blot 法检测细胞中 MMP-9 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白及 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白 PI3K 和 p-AKT 蛋白的相对表达水平。结果显示,与对照组比较,水蛭提取液干预下细胞 HIF-1 $\alpha$  和 MMP-9 mRNA 相对表达水平下降,HIF-1 $\alpha$ 、MMP-9、PI3K 和 p-AKT 蛋白相对表达水平均降低。张景容等<sup>[30]</sup>研究水蛭素对特发性肺间质纤维化病的影响,结果发现水蛭素能降低模型小鼠肺中 AKT、p-AKT 蛋白的表达量。另有研究发现,雷帕霉素可通过抑制 PI3K/AKT 信号通路抑制 RB 细胞增殖,促进细胞凋亡<sup>[31]</sup>。

此外,本研究结果表明,水蛭提取液可能通过抑制 WERI-RB-1 细胞表达 VEGF 降低 VEGF 下游 PI3K 的表达,抑制 p-AKT 活性,进一步抑制下游靶基因 HIF-1 $\alpha$  和 MMP-9 的表达,从而抑制 RB 血管生成和肿瘤生长。其次,水蛭提取液可能直接抑制了 HIF-1 $\alpha$  的表达,进一步抑制下游靶基因 VEGF 和 MMP-9 的表达,而 VEGF 又抑制了 PI3K/AKT 通路的活性,从而发挥抑制肿瘤血管生成和生长的作用。此外,水蛭提取液也可能直接抑制 MMP-9 的活性,进而抑制 MMP-9 对 WERI-RB-1 细胞外

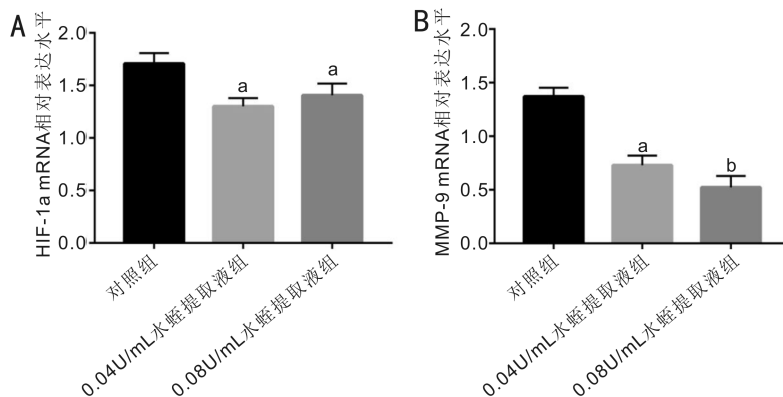


图2 RT-PCR检测HIF-1a和MMP-9 mRNA的表达 A: HIF-1a; B: MMP-9。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

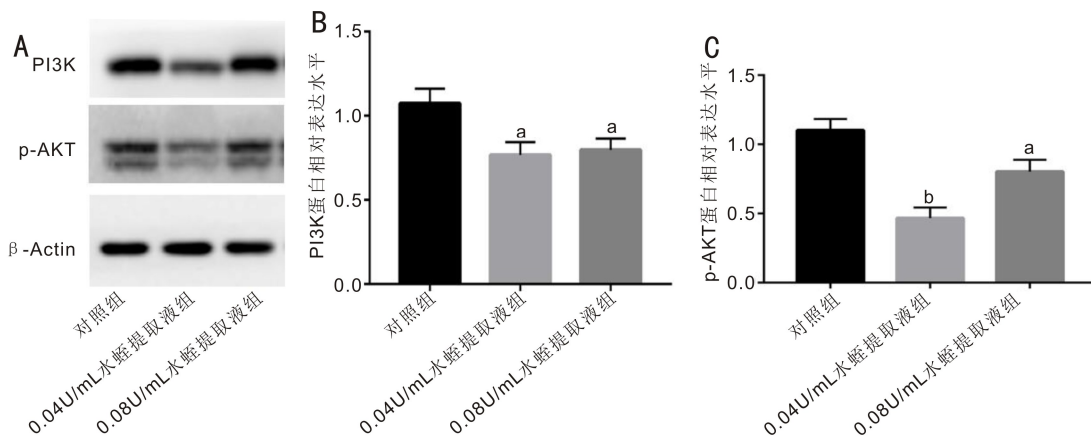


图3 Western Blot检测PI3K和p-AKT蛋白相对表达水平 A: Western Blot检测结果; B: PI3K蛋白相对表达水平; C: p-AKT蛋白相对表达水平。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

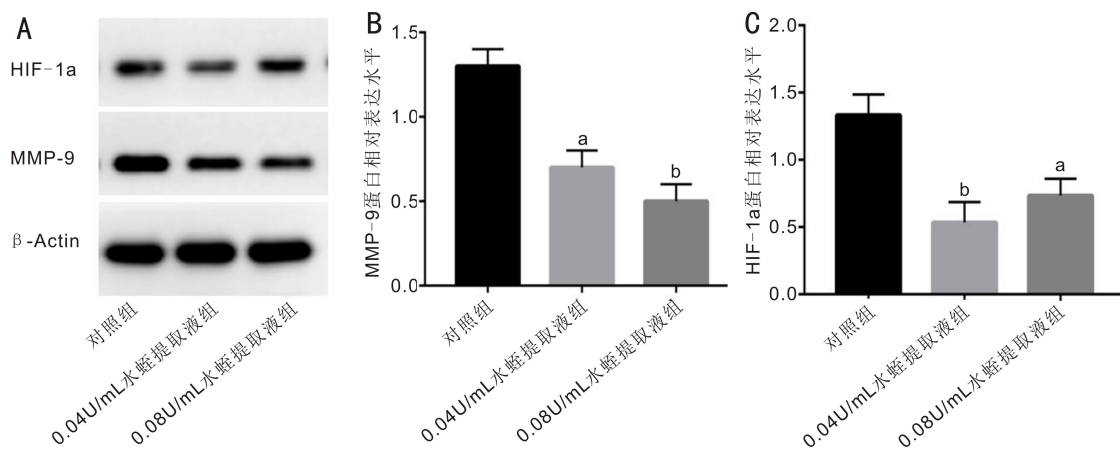


图4 Western Blot检测MMP-9和HIF-1a蛋白相对表达水平 A: Western Blot检测结果; B: MMP-9蛋白相对表达水平; C: HIF-1a蛋白相对表达水平。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

表1 引物序列

引物名称	上游	下游
β-Actin	5'-ATGG-GGAAGGTGAAGCTCG-3'	5'-GGTCATTGATGGCAACAATATC-3'
MMP-9	5'-ATCCCCAACCTTTACCA-3'	5'-TCAGAACCGACCCTACAA-3'
HIF-1a	5'-AAGTCCCGC-CGTGAAGTG-3'	5'-ACG-CCAAGGTCTGAAGGTC-3'

基质(ECM)的降解,从而抑制VEGF从ECM中释放,并在一定程度上抑制VEGF-VEGF受体的相互作用,最终抑制PI3K/AKT通路的活性,抑制RB血管生成和转移。既往研究观察水蛭素对化疗诱导的周围神经病变(CIPN)的影响发现,水蛭素可明显减轻奥沙利铂(L-OHP)化疗副作用,显著抑制L-OHP诱导的CIPN小鼠体内p38、HIF-1的过表达和MMP-9/2的活化,达到改善CIPN的作用<sup>[32]</sup>。

另有研究观察水蛭素对急性肺损伤大鼠的影响发现,水蛭素可减少大鼠体内肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和MMP-12的释放,推测水蛭素可抑制肺损伤引起的炎症和纤维化,并作为抗炎介质在肺保护中发挥作用<sup>[33]</sup>。因此,初步推测,水蛭提取液可能通过VEGF/PI3K/AKT信号通路和HIF-1a、MMP-9因子发挥抑制RB的作用,这为水蛭提取液的抗肿瘤作用机制提供了新的见解。然而,本研究的局

限性和不足在于采用的药物干预剂量分组较少,且0.04U/mL水蛭提取液的干预剂量对HIF-1 $\alpha$ 、PI3K和p-AKT的抑制作用强于0.08U/mL水蛭提取液,后期研究应进一步缩小剂量之间的跨度,设置更多剂量组,寻找最佳的药物干预剂量。此外,由于时间和经费限制,本研究观察时间点较少,不能够显示动态的量效、时效曲线,同时缺少阳性对照,未进行刺激、抑制信号通路的实验证实相关通路的作用,后期研究将力争进一步完善。

综上所述,水蛭提取液可能通过VEGF/PI3K/AKT信号通路介导的信号及抑制MMP-9和HIF-1 $\alpha$ 的表达抑制RB的发生发展,提示VEGF/PI3K/AKT可能是水蛭提取液在RB治疗中的一个有前途的靶点。虽然该结论还需要进一步完善和验证,如进行动物实验/体内试验等,但本研究结果是目前研究RB提出了新的兴趣点和潜在的研究价值。

#### 参考文献

- 1 Li YY, Zheng YL. Hypoxia promotes invasion of retinoblastoma cells *in vitro* by upregulating HIF-1 $\alpha$ /MMP9 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21(23): 5361-5369
- 2 Li ZR, Guo ZH, Chu DD, et al. Effectively suppressed angiogenesis-mediated retinoblastoma growth using celastrol nanomicelles. *Drug Deliv* 2020; 27(1): 358-366
- 3 Chairissy MD, Wulandari LR, Sujuti H. Pro-apoptotic and anti-proliferative effects of physalis angulata leaf extract on retinoblastoma cells. *Int J Ophthalmol* 2019; 12(9): 1402-1407
- 4 Friedman DN, Hsu M, Moskowitz CS, et al. Whole-body magnetic resonance imaging as surveillance for subsequent malignancies in preadolescent, adolescent, and young adult survivors of germline retinoblastoma; an update. *Pediatr Blood Cancer* 2020; 67(7): e28389
- 5 Almontaser E, Ritchie C, Madison J, et al. Perioperative care of children undergoing intra-arterial chemotherapy for retinoblastoma. *J Perianesth Nurs* 2019; 34(3): 476-482
- 6 Wu AL, Wu WC. Anti-VEGF for ROP and pediatric retinal diseases. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 2018; 7(3): 145-151
- 7 Yang F, Guo ZH, Shi LQ, et al. Antiangiogenic and antitumor therapy for retinoblastoma with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  siRNA and celastrol Co-delivery nanomicelles. *J Biomed Nanotechnol* 2020; 16(10): 1471-1481
- 8 Wen NY, Guo BF, Zheng HW, et al. Bromodomain inhibitor jql induces cell cycle arrest and apoptosis of glioma stem cells through the VEGF/PI3K/AKT signaling pathway. *Int J Oncol* 2019; 55(4): 879-895
- 9 Chen WJ, Sun CX, Li W. Mechanism of FGF<sub>7</sub> gene silencing in regulating viability, apoptosis, invasion of retinoblastoma cell line HXO-Rb44 and angiogenesis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020; 24(7): 3538-3547
- 10 Mu YT, Feng HH, Yu JQ, et al. Curcumin suppressed proliferation and migration of human retinoblastoma cells through modulating NF- $\kappa$ B pathway. *Int Ophthalmol* 2020; 40(10): 2435-2440
- 11 Fu K, Zhang K, Zhang XY. LncRNA HOTAIR facilitates proliferation and represses apoptosis of retinoblastoma cells through the miR-20b-5p/RRM2/PI3K/AKT axis. *Orphanet J Rare Dis* 2022; 17(1): 119
- 12 Zhu JY, Zhang X, Ai L, et al. Clinicohistopathological implications of MMP/VEGF expression in retinoblastoma; a combined meta-analysis and bioinformatics analysis. *J Transl Med* 2019; 17(1): 226
- 13 Liu Y, Liang GD, Zhou TT, et al. Silencing UHRF<sub>1</sub> inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis in retinoblastoma via the PI3K/

- Akt signalling pathway. *Pathol Oncol Res* 2020; 26(2): 1079-1088
- 14 李小菊, 卢宏达, 陈卫群, 等. 水蛭抑制肿瘤血管生成的作用及其机制. *肿瘤防治研究* 2013; 40(1): 46-50
- 15 Wu QZ, Sun X, Zheng GY. VEGF overexpression is associated with optic nerve involvement and differentiation of retinoblastoma; a PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97(51): e13753
- 16 Wu S, Ai NP, Liu Q, et al. [Retracted] microRNA-448 inhibits the progression of retinoblastoma by directly targeting ROCK1 and regulating PI3K/AKT signalling pathway. *Oncol Rep* 2018; 39(5): 2402-2412
- 17 Ge YS, Li F, He Y, et al. L-arginine stimulates the proliferation of mouse mammary epithelial cells and the development of mammary gland in pubertal mice by activating the GPRC6A/PI3K/AKT/mTOR signalling pathway. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2022[Epub ahead of print]
- 18 Yan J, Deng YX, Cai YL, et al. LncRNA MIR17HG promotes the proliferation, migration, and invasion of retinoblastoma cells by up-regulating HIF-1 $\alpha$  expression via sponging miR-155-5p. *Kaohsiung J Med Sci* 2022; 38(6): 554-564
- 19 Wang JX, Yang Y, Li K. Long noncoding RNA DANCR aggravates retinoblastoma through miR-34c and miR-613 by targeting MMP-9. *J Cell Physiol* 2018; 233(10): 6986-6995
- 20 Li H, Zhao B, Liu Y, et al. Angiogenesis in residual cancer and roles of HIF-1 $\alpha$ , VEGF, and MMP-9 in the development of residual cancer after radiofrequency ablation and surgical resection in rabbits with liver cancer. *Folia Morphol (Warsz)* 2020; 79(1): 71-78
- 21 李园媛. 水蛭提取液对视网膜母细胞瘤的抑制作用及相关分子机制研究. 成都中医药大学 2020
- 22 Han QC, Ma L, Shao L, et al. Circ\_0075804 regulates the expression of LASP1 by targeting miR-1287-5p and thus affects the biological process of retinoblastoma. *Curr Eye Res* 2022; 47(7): 1077-1086
- 23 Wen YL, Li L. Correlation between matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor expression in lung adenocarcinoma. *Genet Mol Res* 2015; 14(4): 19342-19348
- 24 Wu ND, Chen SL, Luo Q, et al. Kruppel-like factor 2 acts as a tumor suppressor in human retinoblastoma. *Exp Eye Res* 2022; 216: 108955
- 25 Li ZR, Li JG, Zhu L, et al. Celastrol nanomicelles attenuate cytokine secretion in macrophages and inhibit macrophage-induced corneal neovascularization in rats. *Int J Nanomedicine* 2016; 11: 6135-6148
- 26 Peng L, Pan XY, Yin GQ. Natural hirudin increases rat flap viability by anti-inflammation via PARs/p38/NF- $\kappa$ B pathway. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 597264
- 27 李园媛, 郑燕林, 刘晓莉, 等. 水蛭提取液对人视网膜母细胞瘤细胞的抑制作用. *国际眼科杂志* 2020; 20(10): 1693-1698
- 28 李先建, 何剑波, 陈闯, 等. 水蛭素对肝细胞癌 HepG2 细胞抑制作用机制探讨. *中国癌症防治杂志* 2016; 8(1): 7-11
- 29 诸佳瑜. 水蛭含药血浆、血清对人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖、迁移及 VEGF 影响的研究. 广西中医药大学 2017
- 30 张景容, 谢海彬, 沈明霞, 等. 水蛭素对博莱霉素致特发性肺间质纤维化大鼠肺组织中 AKT、p-AKT 蛋白表达的影响. *中医临床研究* 2019; 11(11): 5-9
- 31 Yao J, Xu M, Liu ZY. Rapamycin inhibits proliferation and apoptosis of retinoblastoma cells through PI3K/AKT signaling pathway. *Oncol Lett* 2020; 19(4): 2950-2956
- 32 Yang Y, Hu L, Wang CY, et al. p38/TF/HIF- $\alpha$  signaling pathway participates in the progression of CIPN in mice. *Biomed Res Int* 2019; 2019: 5347804
- 33 Bao YX, Geng Y, Jing H. Effect of hirudin on the levels of acute lung injury rat tumor necrosis factor- $\alpha$  and matrix metalloproteinase-12. *Mol Med Rep* 2012; 5(3): 873-875