

# 低氧/高糖环境下间充质干细胞对 RPE 生物学特性的影响

燕洁静, 王海燕, 王雨生, 高凡, 李娜, 张鹏

基金项目:国家自然科学基金(No. 81300770);国家重点基础研究发展计划资助(No. 2011CB510200)

作者单位:(710032)中国陕西省西安市,第四军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所

作者简介:燕洁静,在读硕士研究生,研究方向:脉络膜新生血管。

通讯作者:王海燕,博士,讲师,研究方向:眼底病。whyeye@126.com

收稿日期:2014-12-02 修回日期:2015-03-28

## Effect of hypoxia and hyperglycemia on retinal pigment epithelial cells co-cultured with human mesenchymal stem cells

Jie-Jing Yan, Hai-Yan Wang, Yu-Sheng Wang, Fan Gao, Na Li, Peng Zhang

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81300770); National Key Basic Research Developmental Plan (No. 2011CB510200)

Department of Ophthalmology, Eye Institute of Chinese PLA, Xijing Hospital of The Fourth Military University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Hai-Yan Wang. Department of Ophthalmology, Eye Institute of Chinese PLA, Xijing Hospital of The Fourth Military University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. whyeye@126.com

Received: 2014-12-02 Accepted: 2015-03-28

### Abstract

• AIM: To evaluate cell proliferation, apoptosis and migration of human retinal pigment epithelial cells (RPE) when co-cultured with human marrow mesenchymal stem cells (hMSCs) in condition of hypoxia and hyperglycemia so as to explore possible mechanisms of diabetes aggravating choroidal neovascularization (CNV) preliminarily.

• METHODS: Both hMSCs and RPE cells were co-cultured in a transwell system. The experiment was divided into four groups: 21% O<sub>2</sub> with 5.56mmol/L glucose (control group, A), 21% O<sub>2</sub> with 30mmol/L glucose (hyperglycemia and normoxia group, B), 5% O<sub>2</sub> with 5.56mmol/L glucose (normoglycemia and hypoxia group, C) and 5% O<sub>2</sub> with 30mmol/L glucose (hyperglycemia and hypoxia group, D). Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to detect the proliferation of RPE cells in each group at 12, 24 and 48h respectively. Flow cytometry was performed to observe apoptosis of RPE cells at 24h. Additionally, we assessed migration

capabilities of RPE via transwell assay under the condition of hyperglycemia and hypoxia by co-culturing of hMSCs.

• RESULTS: In this co-culturing system, at 12, 24 and 48h, group B (1.61±0.41, 1.80±0.34; 1.91±0.35), C (1.34±0.46, 1.94±0.40, 2.14±0.41) and D (1.98±0.47, 2.26±0.42, 2.55±0.40) showed significantly higher proliferation rate than group A (0.92±0.45, 1.27±0.32, 1.59±0.41,  $P < 0.05$ ). The migration capabilities of RPE in group B (149.5±9.19), C (140±9.90) and D (170.5±7.78) increased dramatically compared with group A (114.5±7.78,  $P < 0.05$ ) at 24h, whereas there was no significant difference of apoptosis ratio among four groups ( $P > 0.05$ ).

• CONCLUSION: By coexistence with hMSCs, the synergy of hyperglycemia and hypoxia can improve migration and proliferation of RPE cells, and have no effect on apoptosis of RPE cells within short period.

• KEYWORDS: co-culture system; mesenchymal stem cells; retinal pigment epithelium cell; hypoxia; hyperglycemia

Citation: Yan JJ, Wang HY, Wang YS, et al. Effect of hypoxia and hyperglycemia on retinal pigment epithelial cells co-cultured with human mesenchymal stem cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(4):584-587

### 摘要

目的:建立人骨髓间充质干细胞(hMSCs)与视网膜色素上皮细胞(RPE)低氧高糖培养的细胞共培养模型,研究在与hMSCs共培养条件下低氧及高糖时RPE细胞增殖、凋亡和移行等生物学特征的影响,对糖尿病刺激脉络膜新生血管(CNV)的机制进行初步探讨。

方法:使用Transwell间接共培养模型。将共培养模型按照培养氧浓度及糖浓度培养基类型分为4组:常氧常糖组(21% O<sub>2</sub>加5.56mmol/L葡萄糖培养液,A组)、常氧高糖组(21% O<sub>2</sub>加30mmol/L葡萄糖培养液,B组)、低氧常糖组(5% O<sub>2</sub>加5.56mmol/L葡萄糖培养液,C组)和低氧高糖组(5% O<sub>2</sub>加30mmol/L葡萄糖培养液,D组)。通过CCK-8检测间接共培养模型在12,24,48h时RPE细胞的增殖能力、Transwell检测间接共培养模型在24h时RPE细胞的移行情况、流式细胞仪检测间接共培养模型中24h时RPE细胞的凋亡情况。

结果:与对照组相比,12,24和48h时,B组(1.61±0.41, 1.80±0.34, 1.91±0.35)、C组(1.34±0.46, 1.94±0.40, 2.14±0.41)及D组(1.98±0.47, 2.26±0.42, 2.55±0.40)中的细胞增殖能力均较对照组(0.92±0.45, 1.27±0.32, 1.59±0.41)增强( $P < 0.05$ ),并且低氧高糖联合作用组增殖能力最强。在24h时,B组(149.5±9.19)、C组(140±9.90)、D组(170.5±7.78)较对照组(114.5±7.78)的RPE

细胞移行能力增强( $P<0.05$ )。而在 24h 时各组间的凋亡情况无明显差异( $P>0.05$ )。

**结论:**与 hMSCs 共培养条件下,低氧及高糖环境促进 RPE 细胞的增殖和移行,而对其凋亡并无影响。

**关键词:**共培养;骨髓间充质干细胞;视网膜色素上皮细胞;低氧;高糖

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.4.04

**引用:**燕洁静,王海燕,王雨生,等.低氧/高糖环境下间充质干细胞对 RPE 生物学特性的影响.国际眼科杂志 2015;15(4):584-587

## 0 引言

以年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)为代表的黄斑部脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)严重影响患者中心视力,是临床常见的难治性眼底疾病。CNV 的致病因素复杂,最近的研究显示高血糖有可能是 CNV 发病的又一危险因素<sup>[1,2]</sup>。同时,CNV 的形成有多种细胞参与,其中主要包括视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞和脉络膜毛细血管内皮细胞(choroidal microvascular endothelial cells, CEC)等。近年来,骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)在 CNV 发生发展的作用逐渐受到重视<sup>[3,4]</sup>。本研究组的前期研究证实,MSCs 参与 CNV 的形成,并在低氧和高糖分别刺激下该作用增强<sup>[5,6]</sup>。因此,在糖尿病参与的 CNV 病变中,氧浓度和糖浓度的微环境变化可能通过 BMSCs 刺激 RPE 细胞的生物学特性发生了变化,从而促进了 CNV 发生发展。但 MSCs 与 RPE 细胞在低氧和高糖环境下的生物学特性尚不十分清楚,因此了解这些特点,能为进一步研究 MSCs 在高血糖刺激 CNV 的发生发展中的作用提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞来源** 骨髓取自健康成人的长骨及髌骨。

**1.1.2 实验试剂及配方** 人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19)株购于美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。常糖 DMEM、胎牛血清(Hyclone 公司),胰蛋白酶(不含 EDTA, Millipore 公司),葡萄糖、甘露醇、地塞米松、维生素 C、 $\beta$ -甘油磷酸、皮质醇、胰岛素、茜素红、油红 O、Percoll 分离液(1.073g/mL),以上均购于 Sigma 公司,PBS(北京索莱宝生物科技有限公司),荧光标记小鼠抗人单抗 CD29-FITC, CD45-PE, CD34-PE(BD 公司),Annexin-V/PI 凋亡试剂盒(Roche 公司),CCK-8 试剂盒(上海七海复泰生物科技有限公司),Transwell 培养小室(孔径 8 $\mu$ m, 0.4 $\mu$ m, Corning 公司)。流式液:1 $\times$ PBS 溶液 900mL,胎牛血清 50mL,4% 叠氮钠溶液 50mL,滤纸过滤,4 $^{\circ}$ C 保存。

**1.1.3 主要设备** CO<sub>2</sub> 培养箱(37 $^{\circ}$ C, 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>),低氧 CO<sub>2</sub> 培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, Thermo 公司),超净工作台(Airtech 公司),倒置荧光显微镜(Olympus 公司),酶标仪(Bio-rad 公司),流式细胞仪(BD 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 hMSCs 的分离和培养** 抽取健康成人骨髓 3~5mL,抗凝处理后与等体积常糖 DMEM 培养液混匀。室温 1000r/min 离心 10min,舍弃含脂肪层和血小板的上清,用常糖 DMEM 培养液将细胞重悬,加入含等体积 Percoll 分

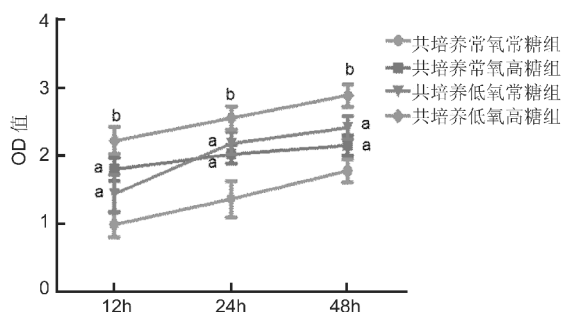


图1 不同氧和糖浓度环境的 RPE 细胞增殖情况,并有时间依赖性 <sup>a</sup> $P<0.05$ ; <sup>b</sup> $P<0.001$  vs 常氧常糖组。

离液(1.073g/mL)的离心管内,2500r/min 离心 30min,将吸取出上层与中间层交界的白色浑浊的细胞层用 5 倍以上体积常糖 DMEM 稀释混匀,1000r/min 离心 5min,重悬细胞于含双抗和 10% FBS 的常糖 DMEM 培养液中,接种于 25cm<sup>2</sup> 一次性培养瓶中,置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。48h 后换液除去未贴壁细胞,以后每 3d 换液 1 次。倒置显微镜下每天观察细胞生长情况和形态特征,当细胞生长至 80%~90% 融合时用 0.25% 胰酶(不含 EDTA)消化,按 1:3 传代培养。本实验选用第 3,4 代 hMSCs。

**1.2.2 诱导 hMSCs 向成骨和成脂细胞分化** 以成骨诱导液或成脂诱导液代替普通培养液培养 hMSCs。成骨诱导液为包含地塞米松、维生素 C、 $\beta$ -甘油磷酸和 10% FBS 的 DMEM F12 培养液。诱导 19d 后,茜素红染色检测成骨矿化结节。成脂诱导液为含有皮质醇、地塞米松、胰岛素和 10% FBS 的 DMEM F12 培养液。诱导 10d 后,行油红 O 染色检测细胞内脂滴。以上两种诱导分化均以常规培养的 hMSCs 染色作为阴性对照。

**1.2.3 流式细胞仪鉴定 hMSCs 的表面标记物** 将第三代贴壁的 hMSCs 经胰酶消化后制备成单细胞悬液,与 FITC 标记的 CD29 抗体,PE 标记的 CD34、CD45 抗体分别孵育 30min。使用流式液将细胞洗 3 次,并于 500 $\mu$ L 的流式液重悬后上机检测。

**1.2.4 实验分组** A 组(常氧常糖组):21% O<sub>2</sub>+5.6mmol/L 葡萄糖 DMEM; B 组(常氧高糖组):21% O<sub>2</sub>+30mmol/L 葡萄糖 DMEM; C 组(低氧常糖组):5% O<sub>2</sub>+5.6mmol/L 葡萄糖 DMEM; D 组(低氧高糖组):5% O<sub>2</sub>+30mmol/L 葡萄糖 DMEM。

**1.2.5 CCK-8 法检测间接共培养时 RPE 细胞的增殖能力** Transwell 小室置于 24 孔板中,取第 7 代 RPE 细胞使用胰酶消化成单细胞悬液,细胞密度为 1 $\times$ 10<sup>4</sup> 个/mL,200 $\mu$ L/孔接种于 Transwell 小室内底面,将第 2 代生长状态良好的 hMSCs,胰酶消化制成单细胞悬液,细胞密度为 1 $\times$ 10<sup>4</sup> 个/mL,200 $\mu$ L/孔接种于 24 孔板底面,将小室置于接种有 hMSCs 的孔内,使用仅含 1% 胎牛血清,5.6mmol/L 葡萄糖或 30mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养液内,分别在常氧及低氧环境中分别进行培养 12,24,48h。上清中加入 10% CCK-8,将上清液移入 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C 孵育 3h 后 450nm 测吸光度值。实验重复 3 次。

**1.2.6 Transwell 共培养检测 RPE 细胞的移行能力** Transwell 小室置于 24 孔板中,取第 7 代 RPE 细胞使用胰酶消化成单细胞悬液,细胞密度为 1 $\times$ 10<sup>4</sup> 个/mL,200 $\mu$ L/孔接种于 Transwell 小室内底面,将第 2 代生长状态良好

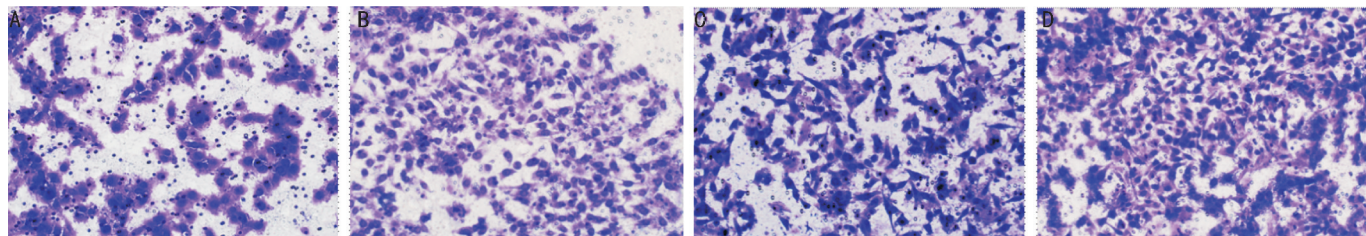


图2 与hMSCs共培养条件下低氧/高糖时RPE细胞移行情况(Bars=200 $\mu$ m) A:共培养常氧常糖组;B:共培养常氧高糖组;C:共培养低氧常糖组;D:共培养低氧高糖组。

的hMSCs,胰酶消化制成单细胞悬液,细胞密度为 $1 \times 10^4$ 个/mL,200 $\mu$ L/孔接种于24孔板底面,将小室置于接种有hMSCs的孔内,使用仅含1%胎牛血清,5.6mmol/L葡萄糖或30mmol/L葡萄糖的DMEM培养液内,分别在常氧及低氧环境中分别进行培养24h。培养结束后用棉签擦去小室内表面未移行的细胞,使用0.1%结晶紫溶液染色。倒置显微镜200倍镜下随机取6个视野拍照、计数。实验重复3次。

**1.2.7 流式细胞仪检测RPE细胞的凋亡** 采用Transwell间接共培养模型(孔径0.4 $\mu$ m),取第3代生长状态良好的hMSCs,使用胰酶消化成单细胞悬液,细胞密度为 $1 \times 10^4$ 个/mL,200 $\mu$ L/孔接种于Transwell小室内底面。取第7代RPE细胞,胰酶消化制成单细胞悬液,按不同分组将细胞接种于24孔板底面,将小室置于接种有RPE细胞的孔内,分别使用含5.6mmol/L葡萄糖或30mmol/L葡萄糖的DMEM培养液,在常氧及低氧环境中分别进行培养24h。Annexin-V/PI法检测其凋亡,操作按试剂说明。流式细胞术分析各组细胞凋亡率。实验重复3次。

统计学分析:实验数据以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用SPSS 19.0统计软件进行分析,多样本均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间交互作用采用析因分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 人原代BMSCs的培养及鉴定情况** 在接种24h左右即可见以散在方式贴壁生长的不规则圆形或多角形的细胞,即为原代hBMSCs(PO)。继续培养后,细胞形体变大,并有克隆性细胞增殖,初始细胞的大小、形态不一。1wk后可见在较均匀平铺的细胞中有克隆性细胞增殖加速,2wk左右见有90%融合,可传代。传代后,细胞呈均匀梭形、漩涡状生长。当成骨诱导第19d,培养的hMSCs有钙结节形成,经茜素红染色呈现红色;脂肪诱导第7d,培养的骨髓间充质干细胞胞浆内形成脂滴,第10d时经油红O染色呈现红色强阳性。对照组细胞密集重叠生长,无明显钙结节或脂滴形成,茜素红及油红O染色均为阴性。流式细胞仪分析细胞表面标志显示:CD29(+),CD34(-),CD45(-)。以上结果证实其为BMSCs。

**2.2 与hMSCs共培养条件下低氧/高糖对RPE细胞增殖能力的影响** CCK-8结果显示,12,24h及48h时,四组间差异均有统计学意义( $F = 21.27, 36.47, 29.83; P < 0.01$ ),各时间点时低氧组均较常氧组细胞增殖能力增强( $F = 24.42, 28.53, 19.43; P < 0.01$ ),高糖组均较常糖组细胞增殖能力增强( $F = 37.53, 45.37, 39.84; P < 0.01$ ),而低氧高糖组在12h( $1.98 \pm 0.47$ )、24h( $2.26 \pm 0.42$ )及48h( $2.55 \pm 0.40$ )时较其他组均为最高( $F = 47.32, 39.29; P < 0.01$ ),析因分析结果显示二者的联合作用有叠加效应( $P < 0.05$ ,图1)。

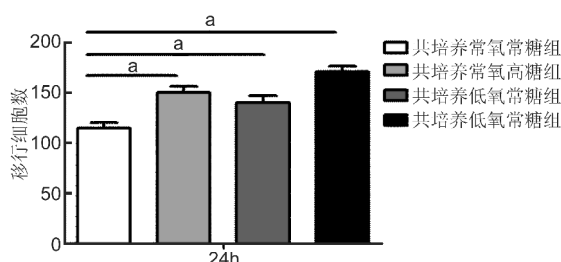


图3 与hMSCs共培养条件下低氧/高糖时RPE移行细胞数<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 常氧常糖组。

**2.3 与hMSCs共培养条件下低氧/高糖对RPE细胞移行能力的影响** 在加入hMSCs的共培养条件下,Transwell结果显示,24h时常氧高糖( $149.5 \pm 9.19$ )和低氧常糖组( $140 \pm 9.90$ )均使RPE细胞移行增多,与常氧常糖组( $114.5 \pm 7.78$ )间比较有统计学差异( $P < 0.05$ )。低氧高糖组RPE细胞移行最多( $170.5 \pm 7.78$ ),差异有统计学意义( $F = 29.34, P < 0.05$ ;图2,3)。

**2.4 与hMSCs共培养条件下低氧/高糖对RPE细胞凋亡的影响** 流式细胞仪检测结果显示,在24h时,各组间凋亡情况未见明显差异( $F = 0.98, P > 0.05$ ;图4,5)。

## 3 讨论

目前已证实,RPE细胞是CNV的主要参与细胞之一,而BMSCs也在CNV的发生发展中起着重要作用<sup>[2-4,7]</sup>,我们的前期研究已证实,骨髓来源细胞(bone marrow derived cells, BMCs)可特异性地趋化至眼局部,通过血管发生的模式参与了CNV的形成,并且低氧和高糖可以加重这种作用<sup>[3,5,6]</sup>。而在CNV发生发展重要刺激因素——低氧和高糖作用下,趋化到眼部的MSCs对RPE细胞生物学特性的影响尚不十分清楚,目前在与hMSCs共培养条件下低氧及高糖对RPE细胞增殖及凋亡的影响尚无文献报道。因此,我们在与MSCs共培养后,利用低氧孵箱同时加入高糖刺激因素观察RPE细胞的增殖、移行和凋亡情况。

既往研究显示,低氧可上调RPE细胞中的HIF-1 $\alpha$ 及SDF-1,从而趋化骨髓来源细胞参与新生血管<sup>[8]</sup>。同时,低氧可通过粘着斑激酶信号通路促进RPE细胞的增殖及移行<sup>[9]</sup>。高糖可能通过促分裂原激活蛋白激酶促进大鼠RPE细胞的增殖<sup>[10]</sup>。而低氧联合高糖可调控RPE细胞中HIF-1 $\alpha$ 的水平,在诱导视网膜新生血管的形成起着十分重要的作用<sup>[11]</sup>。而在高糖环境下可促进RPE细胞表达VEGF增加和PEDF减少,从而打破促血管生成因子和抑血管生成因子之间的平衡,导致眼内新生血管的发生发展<sup>[12]</sup>。本实验证实,与MSCs共培养情况下,低氧及高糖刺激RPE细胞增殖和移行( $P < 0.05$ );并且有时间依赖性,随时间延长,增殖及移行增多。在低氧高糖环境中,趋化到眼局部的hMSCs有可能通过刺激RPE细胞加重CNV的发展。

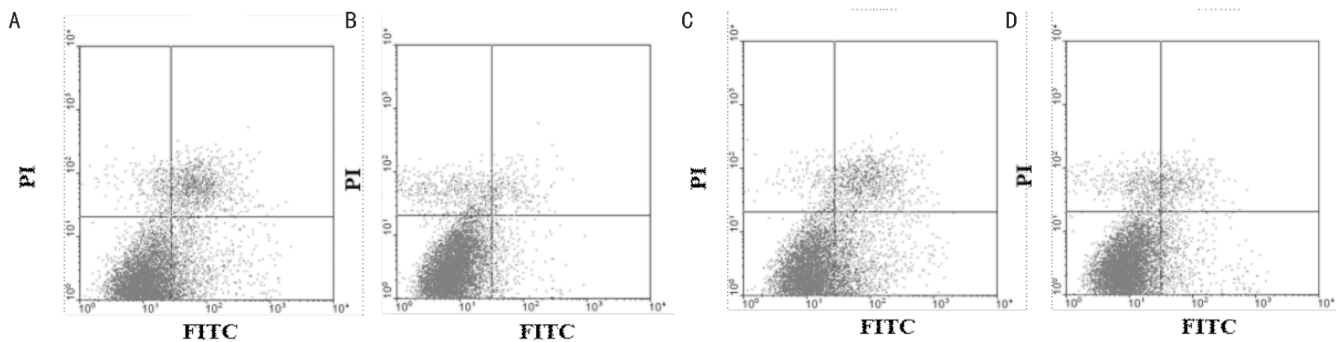


图4 与hMSCs共培养条件下低氧/高糖时RPE细胞凋亡的流式图 A:常氧常糖组;B:常氧高糖组;C:低氧常糖组;D:低氧高糖组。

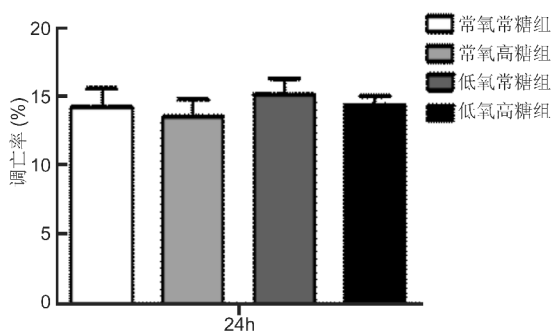


图5 与hMSCs共培养条件下低氧/高糖时RPE细胞凋亡率。

Kim等<sup>[13]</sup>证实高糖可通过下调胰高血糖素样肽受体1 (Glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R) 诱导RPE细胞的凋亡。而氯化钴诱导的低氧也会促使RPE细胞的凋亡增多<sup>[14]</sup>。有动物实验结果显示, MSCs视网膜下移植后可分泌碱性成纤维生长因子及脑源性神经营养因子,对神经细胞及感光细胞潜在地起到保护和营养作用<sup>[15,16]</sup>。而本研究中,在低氧和高糖环境下作用24h,与MSCs共培养条件下,RPE的凋亡并不增加,这可能与MSCs自身的保护作用有关。

本组前期研究和其他报道证实,在低氧和高糖分别刺激下的RPE细胞定向趋化骨髓来源细胞参与了CNV的发生发展。而本实验证实,在联合hMSCs共培养系统的条件下,低氧和高糖环境对RPE细胞的增殖、移行在一定时间内均有刺激效应,并且对低氧/高糖环境诱导的RPE凋亡有抑制作用,进一步证实MSCs可能加重CNV的发展。当然,本实验仅对在共培养条件下,改变糖浓度和氧浓度条件下RPE细胞的生物学特性进行了初步探讨,并没有涉及分子机制方面的研究,这将在下一步实验中进行完善,为进一步阐述低氧高糖作用下CNV的发生发展机制提供依据。

志谢:感谢全军眼科实验室的苏静波技术员及第四军医大学生化教研室的路凡副教授在实验中给予的支持与帮助,感谢西京医院骨科孟国林副主任医师提供骨髓来源,感谢第四军医大学统计教研室的王侠副教授在统计分析中给予的帮助。另外,本研究得到德国洪堡基金会(Alexander von Humboldt Foundation)仪器设备捐赠基金资助,特此感谢!

参考文献

1 王雨生,李夏. 关注糖尿病对年龄相关性黄斑变性发生的影响. 中华实验眼科杂志 2011;29(1):1-3

2 Li X, Cai Y, Wang YS, et al. Hyperglycaemia exacerbates choroidal neovascularisation in mice via the oxidative stress-induced activation of STAT3 signalling in RPE cells. *PLoS One* 2012;7(10):e47600

3 Hou HY, Wang YS, Xu JF, et al. The dynamic conduct of bone marrow-derived cells in the choroidal neovascularization microenvironment. *Curr Eye Res* 2006;31(12):1051-1061

4 Hou HY, Liang HL, Wang YS, et al. A therapeutic strategy for choroidal neovascularization based on recruitment of mesenchymal stem cells to the sites of lesions. *Mol Ther* 2010;18(10):1837-1845

5 Zhang ZX, Wang YS, Shi YY, et al. Hypoxia specific SDF-1 expression by retinal pigment epithelium initiates bone marrow-derived cells to participate in Choroidal neovascularization in a laser-induced mouse model. *Curr Eye Res* 2011;36(9):838-849

6 Cai Y, Li X, Wang YS, et al. Hyperglycemia promotes vasculogenesis in choroidal neovascularization in diabetic mice by stimulating VEGF and SDF-1 expression in retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2014;123(6):87-96

7 侯阳,李福智,左中夫,等. pEGFP/Ang-1 转染 BMSCs 对高糖环境中 RF/6A 细胞的保护作用. 国际眼科杂志 2014;14(5):807-810

8 Dar A, Goichberg P, Shinder V, et al. Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nat Immunol* 2005;6(10):1038-1046

9 Zhu J, Wang YS, Zhang J, et al. Focal adhesion kinase signaling pathway participates in the formation of choroidal neovascularization and regulates the proliferation and migration of choroidal microvascular endothelial cells by acting through HIF-1 and VEGF expression in RPE cells. *Exp Eye Res* 2009;88(5):910-918

10 Al-Hussaini H, Kilarakaje N. Effects of diabetes on retinal pigment epithelial cell proliferation and mitogen-activated protein kinase signaling in dark Agouti rats. *Exp Toxicol Pathol* 2015;67(2):117-124

11 吕明良. 高糖及其联合缺氧对 HIF-1 $\alpha$  表达的影响和 shRNA 抑制人 RPE 细胞 HIF-1 $\alpha$  表达的研究. 华中科技大学 2006

12 姚毅,关明,赵秀琴,等. 缺氧和高浓度葡萄糖对体外培养人视网膜色素上皮衍生因子表达的影响. 中华医学杂志 2003;83(22):1989-1992

13 Kim DI, Park MJ, Choi JH, et al. Hyperglycemia-induced GLP-1R downregulation causes RPE cell apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2015;59(2):41-51

14 Li KR, Zhang ZQ, Yao J, et al. Ginsenoside Rg-1 protects retinal pigment epithelium (RPE) cells from cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>) and hypoxia assaults. *PLoS One* 2013;8(12):e84171

15 Zhang Y, Wang W. Effects of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on light-damaged retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(7):3742-3748

16 Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, et al. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(4):2051-2059