

PEDF 对氧诱导视网膜病变小鼠视网膜 MCP-1 表达的影响

王亚娜, 张磊

基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会科研课题计划 (No. 201740052)

作者单位: (200137) 中国上海市, 上海中医药大学附属第七人民医院眼科

作者简介: 王亚娜, 毕业于上海交通大学医学院, 硕士, 住院医师, 研究方向: 眼底病、眼外伤。

通讯作者: 张磊, 硕士, 主任医师, 主任, 硕士研究生导师, 研究方向: 白内障、玻璃体视网膜疾病。sunnylei67@163.com

收稿日期: 2017-04-24 修回日期: 2018-11-30

Effects of PEDF on the expression of MCP-1 in mice retina of oxygen - induced retinopathy

Ya-Nuo Wang, Lei Zhang

Foundation item: Scientific Research Project of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (No.201740052)

Department of Ophthalmology, Shanghai Seventh People's Hospital of Shanghai University of TCM, Shanghai 200137, China

Correspondence to: Lei Zhang, Department of Ophthalmology, Shanghai Seventh People's Hospital of Shanghai University of TCM, Shanghai 200137, China. sunnylei67@163.com

Received: 2017-04-24 Accepted: 2018-11-30

Abstract

• **AIM:** To observe the effect of pigment epithelium - derived factor (PEDF) on retinal neovascularization (RNV) and monocyte chemoattractant protein - 1 (MCP-1) expressions in mice retina of oxygen - induced retinopathy (OIR), and to investigate the protective effect of PEDF on ischemia hypoxia retinopathy and the possible mechanism.

• **METHODS:** A total of 160 postnatal day (P) 7 C57BL/6 mice were obtained. All mice except normal control group were exposed to (75±2) % oxygen environment for 5d and then kept in room air for another 5d to establish the OIR mice model. All mice in normal control group (40 mice) were exposed to room air only. At P12 and P14, respectively , mice in PEDF treatment group were injected intravitreally with recombinant human PEDF (2μg/eye, 1μL) in the right eye, while mice in treatment control group were injected intravitreally with the same volume of vehicle [1μL, 10mmol/L phosphate buffered saline (PH7.4), PBS] in the right eye. All mice were euthanized at P17. Eyes were whole mounted and stained with Lectin to observe the growth of abnormal RNV; And retinal specimens were prepared for PEDF, MCP-1 protein and

mRNA analysis by Western blot and real time RT - PCR respectively.

• **RESULTS:** Changes of retinal vessels had been detected by fluorescence microscopy on flat - mounted retina. The relative RNV areas were significantly increased in OIR model group compared with those in normal control group ($P < 0.01$). However, the relative RNV areas were significantly reduced in PEDF treatment group compared with those in PBS treatment control group ($P < 0.01$). The specific expression of MCP-1 protein and mRNA in the OIR model group were higher than those of normal control group, presenting a statistically significance (both $P < 0.05$). The specific expression of PEDF protein and mRNA in the OIR model group showed a considerable decline in comparison with normal control group, presenting a statistically significance (both $P < 0.01$). And the specific expression of MCP-1 protein and mRNA in those of PEDF - treated group showed a considerable decline in comparison with PBS - treated group, and the differences were statistically significant (both $P < 0.05$). However, there were increase of the expression of MCP-1 protein and mRNA between normal control group and PEDF - treated group, presenting no statistically significance (both $P > 0.05$).

• **CONCLUSION:** PEDF could inhibit oxygen - induced retinal neovascularization and down - regulate retinal MCP-1 expression under hypoxia, which may underlie its anti - neovascularization effects and play a role of protection in ischemic retinopathy.

• **KEYWORDS:** oxygen - induced retinopathy; pigment epithelium derived factor; monocyte chemoattractant protein-1; retinal neovascularization

Citation: Wang YN, Zhang L. Effects of PEDF on the expression of MCP-1 in mice retina of oxygen-induced retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(1):21-25

摘要

目的: 观察色素上皮衍生因子 (pigment epithelium - derived factor, PEDF) 在氧诱导视网膜病变 (oxygen - induced retinopathy, OIR) 中对小鼠视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 和单核细胞趋化因子-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 表达的影响, 探讨 PEDF 对缺血缺氧性视网膜病变的保护作用和机制。

方法: 取 7 日龄 C57BL/6J 新生小鼠 160 只, 将 120 只 7 日龄小鼠与哺乳母鼠共同置于氧浓度为 (75±2) % 的氧环境内饲养 5d, 然后返回正常氧环境中饲养 5d, 建立 OIR 模型; 40 只小鼠始终置于正常氧环境饲养。分别于 12 日龄

和14日龄给予 PEDF 药物治疗组小鼠右眼玻璃体腔注射 PEDF (2 μ g/ μ L) 各 1 μ L, 给予 PBS 治疗对照组和正常对照组小鼠右眼玻璃体腔注射等量的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)。所有小鼠于 17 日龄麻醉处死后取视网膜, 采用视网膜铺片和 Lectin 染色法观察各组小鼠病理性新生血管的生成情况; Western-blot 检测 PEDF 和 MCP-1 蛋白在各组小鼠视网膜的表达; 实时荧光定量逆转录多聚酶链反应 (RT-PCR) 检测各组小鼠视网膜 PEDF 和 MCP-1 mRNA 的表达。

结果: 视网膜铺片和 Lectin 染色结果显示 OIR 模型组 RNV 面积较正常组显著增大, 差异有统计意义 ($P < 0.01$), PEDF 药物治疗组 RNV 面积较 PBS 治疗对照组明显减小, 差异有统计意义 ($P < 0.01$)。Western-blot 和 RT-PCR 结果显示, OIR 模型组 MCP-1 蛋白和 mRNA 的表达水平均明显高于正常组, 差异有统计意义 (均 $P < 0.05$); OIR 模型组 PEDF 蛋白和 mRNA 的表达水平均明显低于正常组, 差异有统计意义 (均 $P < 0.01$); PEDF 药物治疗组 MCP-1 蛋白和 mRNA 的表达量较 PBS 治疗对照组均显著减少, 差异有统计意义 (均 $P < 0.05$); PEDF 药物治疗组 MCP-1 蛋白和 mRNA 的表达量较正常对照组升高, 但差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

结论: PEDF 能够抑制 OIR 小鼠视网膜新生血管形成, 同时下调 MCP-1 在 OIR 小鼠视网膜的表达, 后者可能是其抑制新生血管形成从而发挥视网膜保护作用的机制之一。

关键词: 氧诱导视网膜病变; 色素上皮衍生因子; 单核细胞趋化因子-1; 视网膜新生血管

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.1.04

引用: 王亚娜, 张磊. PEDF 对氧诱导视网膜病变小鼠视网膜 MCP-1 表达的影响. 国际眼科杂志 2019; 19(1): 21-25

0 引言

视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 的形成是缺血缺氧性视网膜病变中最重要的病理过程, 病变进一步发展可导致视功能不可逆性损害甚至丧失^[1]。越来越多的研究表明, 色素上皮衍生因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) 兼具抑制新生血管形成和神经保护的作用^[2]。单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 是趋化因子家族中的主要成员之一, 在肿瘤、炎症、视网膜色素变性和糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 等缺血缺氧性疾病中起着重要的作用。本研究通过建立氧诱导视网膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 小鼠模型, 观察 PEDF 对视网膜新生血管和 MCP-1 表达的影响, 旨在进一步探讨 PEDF 对缺血缺氧性视网膜病变的保护作用和机制, 为 PEDF 治疗缺血缺氧性视网膜病变提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/6J 新生小鼠 160 只, 7 日龄, 雌雄不限, 清洁级, 由上海市瑞金医院动物房提供, 动物饲养条件符合国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂和仪器 重组 PEDF 蛋白 (美国 Peprotech 公司); 荧光标记的 GS-Isolectin B4 (Vector Laboratories); RIPA 裂解液 (美国 Sigma 公司); BCA 试剂盒 (美国

Thermo Scientific 公司); 5% 脱脂奶粉; SYBR green PCR 试剂盒 (日本 Takara 公司); Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司); PEDF 兔抗单克隆抗体一抗 (sc-25594, 美国 Santa Cruz 公司), MCP-1 兔抗单克隆抗体一抗 (ab25124, 美国 Abcam 公司), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 兔抗单克隆抗体一抗 (ab9485, 美国 Abcam 公司), 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔二抗 (碧云天生物技术公司, A0208); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司); Quantity One 图像处理系统、蛋白电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司); 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 OIR 模型的建立 采用随机数字表法将 160 只 7 日龄小鼠分为正常组 (24 只)、正常对照组 (16 只)、OIR 模型组 (40 只)、PBS 治疗对照组 (40 只)、PEDF 药物治疗组 (40 只)。参照既往方法^[3]制作 OIR 模型。取 7 日龄 C57BL/6J 新生小鼠与哺乳母鼠共同置于氧浓度为 (75 \pm 2)% 的氧环境内饲养 5d, 然后返回正常氧环境中饲养 5d, 建立 OIR 模型; 正常组及正常对照组小鼠始终置于正常氧环境饲养。

1.2.2 小鼠玻璃体腔注射 所有小鼠均取右眼为实验眼。参照既往 PEDF 玻璃体腔注射的方法^[4], 12、14 日龄时 PEDF 药物治疗组和 PBS 治疗对照组小鼠玻璃体分别注射等量的 PEDF (1 μ L, 2 μ g/ μ L) 和 PBS (1 μ L, 10mmol/L, pH=7.4); 正常组小鼠不作任何干预, 正常对照组小鼠分别于 12、14 日龄时玻璃体腔注射等量 PBS (1 μ L, 10mmol/L, pH=7.4), 注射后氧氟沙星眼膏涂眼预防感染。

1.2.3 小鼠视网膜铺片和染色 造模结束 17 日龄时, 所有小鼠过量麻醉处死。各组随机抽取 8 只小鼠摘除右眼球, 立即浸泡于 40g/L 多聚甲醛溶液中固定 2h, 手术显微镜下用角膜剪沿眼球的角巩膜剪开, 去除角膜、虹膜、晶状体和玻璃体, 分离出完整视网膜组织, 用 PBS (10mmol/L, pH=7.4) 漂洗后以 1:50 稀释的 GS-Isolectin B4 染色液对游离视网膜进行染色, 室温避光 45min ~ 1h; 用 PBS 漂洗后在手术显微镜下以视盘为中心做 5~6 个放射状切口, 平铺于载玻片上, 树脂胶封片。全部视网膜分为 5~6 瓣, 荧光显微镜下照相, 观察是否出现血管迂曲扩张、微血管瘤和新生血管的形态。Image Pro Plus 6.0 计算各组 RNV 面积进行统计。

1.2.4 Western-blot 检测视网膜组织中 PEDF 和 MCP-1 蛋白的表达 造模结束后 (P17), 所有小鼠过量麻醉处死。手术显微镜下分离取出所有小鼠视网膜, 液氮迅速冷冻后转移至 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。取出冰箱中保存的各组视网膜放入匀浆杯中, 4 $^{\circ}$ C 条件下 12000g 离心 10min 后, 加入预冷的蛋白裂解液 200 μ L, 冰上作用 30min, 振荡混匀, 4 $^{\circ}$ C 条件下 14000g 离心 15min 后取上清液提取蛋白, 后酶标仪测蛋白浓度, 计算含 40 μ g 蛋白的溶液体积为上样量, 与蛋白上样缓冲液混合后 100 $^{\circ}$ C 加热 5min 使其变性, 常规聚丙烯酰胺凝胶电泳, 半干法将蛋白转移至硝酸纤维素薄膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1~2h, 三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (TBST) 洗膜后分别加入按 1:100 稀释的 PEDF、MCP-1 一抗以及 1:1000 稀释的 GAPDH 一抗; 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜后洗膜, 分别加入 1:500 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的相应二抗。室温下孵育 2h, TBST 洗膜 10min \times 3 次。进行 ECL 化学发光显色并拍照, 以 GAPDH 作为内参照。用 GIS-2020 凝胶图像分析

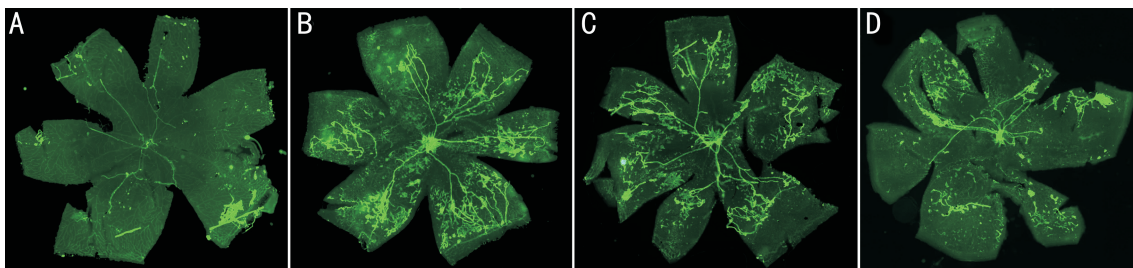


图1 全视网膜铺片染色观察各组视网膜新生血管形态的变化($\times 400$) A:正常组;B:OIR模型组;C:PBS治疗对照组;D:PEDF药物治疗组。

系统扫描蛋白条带的光密度(OD)值,以目的蛋白与内参蛋白GAPDH OD值的比值作为目的蛋白的相对表达量,并依此进行统计分析。

1.2.5 RT-PCR检测视网膜组织中PEDF和MCP-1 mRNA的表达 取出冰箱中保存的各组视网膜,每组随机取8个视网膜样本,Trizol试剂一步法提取总RNA,分光光度计测定A260、A280及其浓度,根据A260/A280和A280/A260的比值鉴定总RNA纯度,后逆转录合成cDNA第一链。各引物序列利用Gene Runner软件设计并经NCBI BLAST检索无显著同源性序列,引物设计合成:PEDF上游引物:5'-TCTGGGAGCTGAACATCGA-3',下游引物:5'-GGGCAGTAACAGAGGCAAG-3';MCP-1上游引物:5'-ACTGAAGCCAGCTCTCTCTTCCCTC-3',下游引物:5'-TTCCTTCTTGGGTCAGCACAGAC-3'; β -actin上游引物:5'-CTTCTTTGCAGCTCCTTCGT-3',下游引物:5'-GTGCCAGATCTTCTCCATGT-3'。采用SYBR green PCR试剂盒优化反应条件,使目的基因和管家基因的扩增效率保持一致,接近于1。ABI Prism 7500-HT定量PCR仪扩增,反应完成后,软件进行自动数据分析, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的基因相对表达量。每组8个样品,实验重复3次。

统计学分析:应用SPSS19.0统计软件进行统计学分析。本研究中数据资料经Skewness-Kurtosis检验呈正态分布,数据结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间方差经Levene检验方差齐。两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,并进行两两比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PEDF对氧诱导小鼠视网膜新生血管的影响 各组小鼠视网膜血管染色铺片显示,造模结束时(P17),正常组小鼠视网膜血管呈放射状自视盘发出,走行平滑自然,分支良好(图1A);OIR模型组和PBS治疗对照组小鼠视网膜中央均出现程度不同的无血管化区及迂曲扩张的放射状新生血管丛,新生血管成簇或成团分布(图1B、C);PEDF药物治疗组小鼠视网膜新生血管团较PBS治疗对照组明显减少(图1D)。统计分析显示:正常组、OIR模型组、PBS治疗对照组、PEDF药物治疗组病理性新生血管面积分别为 1.055 ± 0.163 、 8.538 ± 0.975 、 6.860 ± 1.397 、 $2.306\pm 0.984\text{mm}^2$,组间差异有统计学意义($F=93.386$, $P<0.001$)。OIR模型组、PBS治疗对照组小鼠视网膜新生血管面积较正常对照组都增高,差异有统计学意义(均 $P<0.01$);PEDF药物治疗组小鼠视网膜新生血管面积较PBS治疗对照组显著减少,差异有统计学意义($P<0.01$);正常组小鼠视网膜新生血管面积与PEDF药物治疗组比较,差异无统计学意义($P=0.121$,图2)。

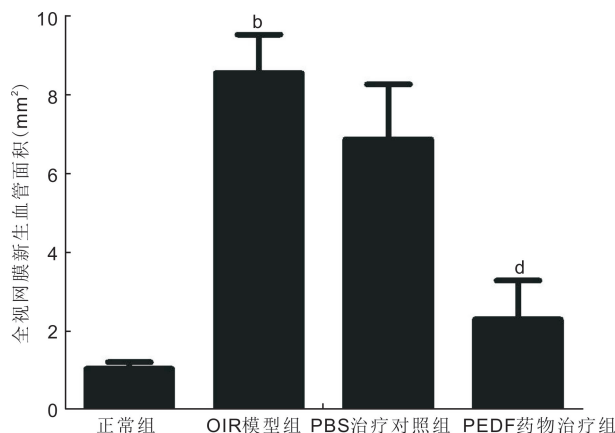


图2 各组小鼠视网膜新生血管面积的比较 ^b $P<0.01$ vs 正常组; ^d $P<0.01$ vs PBS治疗对照组。



图3 Western blot检测正常组和OIR模型组视网膜PEDF和MCP-1蛋白表达量 A:PEDF;B:MCP-1。

2.2 氧诱导视网膜病变中MCP-1、PEDF蛋白和mRNA的表达 Western-blot检测结果显示,与正常组小鼠视网膜PEDF蛋白的相对表达量相比,OIR模型组小鼠视网膜PEDF蛋白相对表达减少,差异有统计学意义(0.82 ± 0.44 vs 0.55 ± 0.23 , $t=5.67$, $P<0.01$,图3A)。与正常组小鼠视网膜MCP-1蛋白的相对表达量相比,OIR模型组小鼠视网膜MCP-1蛋白相对表达增加,差异有统计学意义(0.45 ± 0.06 vs 0.88 ± 0.10 , $t=5.61$, $P=0.04$,图3B)。

RT-PCR检测结果显示,与正常组小鼠视网膜PEDF mRNA的相对表达量比较,OIR模型组小鼠视网膜PEDF mRNA相对表达减少,差异有统计学意义(0.27 ± 0.03 vs 1 , $t=3.35$, $P<0.01$,图4A)。与正常组小鼠视网膜MCP-1 mRNA的相对表达量比较,OIR模型组小鼠视网膜MCP-1 mRNA相对表达增加,差异有统计学意义(3.63 ± 1.05 vs 1 , $t=4.43$, $P=0.046$,图4B)。

2.3 PEDF对氧诱导视网膜病变中MCP-1蛋白和mRNA表达的影响 Western-blot检测结果显示,各组间差异有统计学意义($F=17.12$, $P<0.01$),PEDF药物治疗组MCP-1蛋白的相对表达量(0.30 ± 0.15)较PBS治疗对照组(0.78 ± 0.11)显著减少,差异有统计学意义($P<0.01$);PEDF药物治疗组MCP-1蛋白的表达量较正常对照组(0.28 ± 0.10)升高,但差异无统计学意义($P>0.05$,图5)。

RT-PCR检测结果显示,正常对照组、PBS治疗对照组、PEDF药物治疗组视网膜MCP-1 mRNA相对表达量

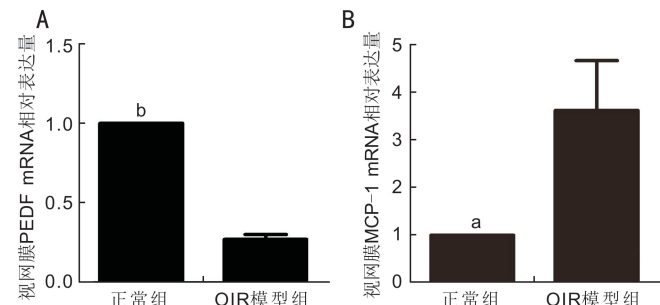


图4 RT-PCR检测正常组和OIR模型组视网膜PEDF和MCP-1 mRNA相对表达量 A:PEDF;B:MCP-1;^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ vs OIR模型组。

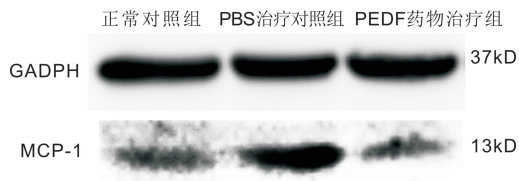


图5 Western blot检测各组视网膜MCP-1蛋白的相对表达量。

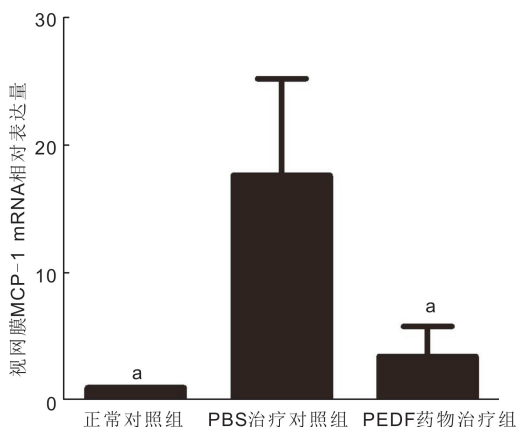


图6 RT-PCR检测各组视网膜MCP-1 mRNA相对表达量^a $P < 0.05$ vs PBS治疗对照组。

分别为1、 17.63 ± 7.58 、 3.47 ± 2.34 ，三组间差异有统计学意义($F = 3.842, P = 0.041$)。PBS治疗对照组小鼠视网膜MCP-1 mRNA相对表达量较正常对照组增高，差异有统计学意义($P = 0.019$)；PEDF药物治疗组小鼠视网膜MCP-1 mRNA相对表达量较PBS治疗对照组减少，差异有统计学意义($P = 0.042$)；正常对照组小鼠视网膜MCP-1 mRNA相对表达量与PEDF治疗组比较，差异无统计学意义($P = 0.707$,图6)。

3 讨论

诸多致盲性眼病如年龄相关性黄斑变性、糖尿病视网膜病变、视网膜中央/分支静脉阻塞和早产儿视网膜病变等的病理基础在于视网膜微血管异常，缺血缺氧致RNV形成^[5-6]。越来越多的研究表明，PEDF在缺血缺氧性视网膜病变中发挥重要作用^[2,7]。同时关于炎症趋化因子MCP-1在缺血缺氧性视网膜病变中的作用也日渐显现^[8-10]，PEDF作为抑炎因子，两者是否存在某种关联尚未阐明。本研究通过建立OIR小鼠模型模拟缺血缺氧性视网膜病变，再用重组PEDF玻璃体腔注射进行干预，观察PEDF对氧诱导视网膜新生血管形成及对炎症因子MCP-1表达的影响，并进一步探讨PEDF对缺血缺氧性视网膜病变的保护作用。

PEDF最初是从胎儿视网膜色素上皮细胞培养液中分离出来的一种糖蛋白，具有营养神经、抗炎等多种生物学作用而于近年来备受关注。既往研究证实PEDF具有促进视网膜和中枢神经系统神经元生长和分化的功能^[11]，同时还具有抑制视网膜、玻璃体和角膜血管形成的作用^[12]。组织中高水平的PEDF还可以抑制缺血性视网膜病变中的细胞凋亡，抑制视网膜和脉络膜新生血管的形成^[13]。既往研究还发现视网膜细胞产生PEDF的量与氧浓度呈正相关^[14]，但其机制尚不清楚。研究显示早产儿视网膜病变患者玻璃体中PEDF蛋白表达水平较对照组明显降低^[15]。Notari等^[16]利用动物和细胞模型证实缺氧显著下调由色素上皮细胞产生的PEDF，而这一过程是通过细胞外基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)介导的蛋白降解作用实现的，PEDF对于缺氧或血管内皮生长因子诱导的蛋白降解很敏感。PEDF的低表达进一步促进RNV的生成和神经节细胞的死亡。本研究中OIR小鼠视网膜PEDF的表达较正常组明显降低，同时病理性新生血管显著增生，这与既往研究相一致。

在实验性糖尿病视网膜膜中，PEDF作为眼内最强的抑炎因子之一，能够减少促炎因子的表达^[17]。而多种视网膜病变的病理过程往往有免疫炎症因素参与。我们前期研究^[18]表明，缺氧情况下PEDF可能通过下调视网膜Müller细胞中白细胞介素1-β的表达，上调Müller细胞谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)和谷氨酸/天冬氨酸转运体(glutamate/aspartate transporter, GLAST)的表达，从而改善谷氨酸循环而发挥神经保护作用。同时缺氧情况下PEDF可能通过下调视网膜白细胞介素1-β的表达，以抑制RNV的形成^[3]。Park等^[19]利用大量表达PEDF的转基因小鼠制作OIR模型，研究发现氧诱导后的PEDF转基因小鼠视网膜RNV和视网膜炎症因子较氧诱导后的野生小鼠明显减少。在激光诱导脉络膜新生血管模型中，与野生型小鼠相比，PEDF转基因小鼠视网膜中炎症因子、血管内皮生长因子、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、MCP-1、转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)、肿瘤坏死因子-α(tumour necroses factor-α, TNF-α)和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)mRNA表达明显降低。其中趋化因子MCP-1具有趋化单核细胞和T淋巴细胞聚集并激活单核细胞和巨噬细胞的作用，其不仅是参与炎症的重要因子，还参与正常血管的发育和病理性新生血管的形成^[20]。糖尿病视网膜损伤中单核细胞与巨噬细胞聚集，促进糖尿病视网膜病变的进展^[21]。而且，玻璃体中MCP-1的表达水平与PDR的严重程度密切相关^[8]。Yoshida等^[9]研究显示，缺血性视网膜病变中MCP-1和巨噬细胞炎症蛋白-1α(macrophage inflammatory protein-1α, MIP-1α)与RNV形成有关，同时两者还参与了炎症反应的过程。董宁等^[10]研究证实，小鼠视网膜发育过程中始终伴随着MCP-1的表达，MCP-1的表达上调可能与小鼠视网膜血管发育和OIR模型中RNV的形成密切相关。本研究亦显示OIR小鼠于17日龄时视网膜MCP-1蛋白与mRNA表达较正常组均上调。

结合PEDF的抗新生血管形成及其抑炎作用，那么缺血缺氧条件下PEDF能否抑制视网膜MCP-1的高表达？为此，本研究采用玻璃体腔注射的方法对OIR小鼠视网膜进行PEDF干预，结果显示其较PBS治疗对照组MCP-1

表达水平明显降低、新生血管面积显著减少,提示在缺血缺氧环境下,PEDF能够抑制视网膜MCP-1的高表达,而且PEDF可能通过下调MCP-1的表达而减弱或抑制RNV的形成。既往研究显示,与对照组病例相比,PDR患者和糖尿病黄斑水肿患者玻璃体中均有高水平的IL-6、MCP-1和VEGF蛋白表达量,而PEDF蛋白表达量则显著下调^[22-23]。同时在DR动物模型中,玻璃体腔注射低剂量的PEDF即可降低视网膜血管通透性,而且PEDF玻璃体腔注射组较对照组视网膜中炎症因子VEGF、ICAM-1和MCP-1水平均有明显的降低^[17],这与本研究结果一致。现有研究证实葡萄糖炎患者房水中PEDF的表达水平亦与MCP-1密切相关^[24];在培养的人微血管内皮细胞中,PEDF抑制晚期糖基化终产物诱导的活性氧生成以及后续MCP-1 mRNA和蛋白的高表达,而PEDF的替代物可以通过抑制晚期糖基化终产物的不利因素来抑制DR的发展进程^[25]。因此,缺血缺氧条件下,PEDF可能通过抑制MCP-1的表达从而减弱或抑制单核细胞与巨噬细胞聚集,最终发挥其抑制RNV形成的作用。

综上,本研究利用OIR小鼠模型观察了缺血缺氧环境下PEDF对RNV的形成和MCP-1表达的影响,证实了PEDF能够下调氧诱导视网膜病变中视网膜MCP-1的表达,这可能是其抑制RNV形成而发挥视网膜保护作用的机制之一。这为将来寻找RNV潜在治疗靶点提供了新的思路。但本实验还存在一些缺陷,比如尚缺乏PEDF对MCP-1相关效应细胞的影响以及MCP-1诱导RNV形成的直接证据,因此需要更深入的研究。

参考文献

- 1 Neroev VV, Zueva MV, Kalamkarov GR. Molecular mechanisms of retinal ischemia. *Vestn Oftalmol* 2010;126(3):59-64
- 2 Barnstable CJ, Tombran-Tink J. Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. *Prog Retin Eye Res* 2004;23(5):561-577
- 3 王亚娜,高莎,沈玺.色素上皮衍生因子对氧诱导视网膜新生血管的抑制作用. *中华眼底病杂志* 2014;30(6):588-593
- 4 Duh EJ, Yang HS, Suzuma I, et al. Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(3):821-829
- 5 Campochiaro PA, Aiello LP, Rosenfeld PJ. Anti-vascular endothelial growth factor agents in the treatment of retinal disease: from bench to bedside. *Ophthalmology* 2016;123(10S):S78-S88
- 6 Sapielha P, Hamel D, Shao Z, et al. Proliferative retinopathies: angiogenesis that blinds. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42(1):5-12
- 7 Tombran-Tink J, Barnstable CJ. PEDF, a multifaceted neurotrophic factor. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(8):628-636
- 8 Mitamura Y, Takeuchi S, Matsuda A, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmologica* 2001;215(6):415-418
- 9 Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T, et al. Role of MCP-1 and MIP-1 alpha in retinal neovascularization during postischemic inflammation in a mouse model of retinal neovascularization. *J Leukoc Biol* 2003;73(1):137-144

- 10 董宁,褚利群,肖林,等.单核细胞趋化蛋白-1在氧诱导视网膜膜病变新生小鼠模型中的表达. *中华实验眼科杂志* 2012;30(4):293-296
- 11 Ogata N, Tombran-Tink J, Nishikawa M, et al. Pigment epithelium-derived factor in the vitreous is low in diabetic retinopathy and high in rhegmatogenous retinal detachment. *Am J Ophthalmol* 2007;132(3):378-382
- 12 Bouck N. PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends Mol Med* 2002;8(7):330-334
- 13 Cao W, Tombran-Tink J, Chen W, et al. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurosci Res* 1999;57(6):789-800
- 14 Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285(5425):245-248
- 15 Sugioka K, Saito A, Kusaka S, et al. Identification of vitreous proteins in retinopathy of prematurity. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;488(3):483-488
- 16 Notari L, Miller A, Martínez A, et al. Pigment epithelium-derived factor is a substrate for matrix metalloproteinase type 2 and type 9: implications for downregulation in hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(8):2736-2747
- 17 Zhang SX, Wang JJ, Gao G, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous anti-inflammatory factor. *FASEB J* 2006;20(2):323-325
- 18 Wang Y, Lu Q, Gao S, et al. Pigment epithelium-derived factor regulates glutamine synthetase and L-glutamate/L-aspartate transporter in retinas with oxygen-induced retinopathy. *Curr Eye Res* 2015;40(12):1232-1244
- 19 Park K, Jin J, Hu Y, et al. Overexpression of pigment epithelium-derived factor inhibits retinal inflammation and neovascularization. *Am J Pathol* 2011;178(2):688-698
- 20 Yamada M, Kim S, Egashira K, et al. Molecular mechanism and role of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 induction by vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vase Biol* 2003;23(11):1996-2001
- 21 Schroder S, Palinski W, Schmid-Schonbein GW. Activated monocytes and granulocytes, capillary nonperfusion, and neovascularization in diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 1991;139(1):81-100
- 22 Murugeswari P, Shukla D, Rajendran A, et al. Proinflammatory cytokines and angiogenic and anti-angiogenic factors in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy and eales' disease. *Retina* 2008;28(6):817-824
- 23 Funatsu H, Noma H, Mimura T, et al. Association of vitreous inflammatory factors with diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2009;116(1):73-79
- 24 Yoshida Y, Yamagishi S, Matsui T, et al. Positive correlation between pigment epithelium-derived factor and monocyte chemoattractant protein-1 levels in the aqueous humour of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol* 2007;91(6):737-738
- 25 Inagaki Y, Yamagishi S, Okamoto T, et al. Pigment epithelium-derived factor prevents advanced glycation end products-induced monocyte chemoattractant protein-1 production in microvascular endothelial cells by suppressing intracellular reactive oxygen species generation. *Diabetologia* 2003;46(2):284-287