

酪氨酸激酶抑制剂对高氧诱导的视网膜新生血管的抑制作用

贺荣华 周国宏 孔丽 李宸宇

030001 太原,山西医科大学第一临床医学院(贺荣华、李宸宇);030002 太原,山西省眼科医院玻璃体视网膜病科(周国宏);030001 太原,山西医科大学解剖教研室(孔丽)

通信作者:周国宏,Email:guohongzhou2005@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.01.007

【摘要】 目的 探讨酪氨酸激酶抑制剂 Genistein 对高氧诱导的小鼠视网膜新生血管形成中的抑制作用及其机制。方法 采用随机数字表法将 36 只 7 日龄清洁级 C57BL/6J 小鼠随机分为高氧诱导组、Genistein 组、二甲亚砜(DMSO)组和正常对照组,每组 9 只。高氧诱导组、Genistein 组、DMSO 组小鼠与母鼠在氧体积分数为(75±2)%的密闭氧箱内喂养 5 d,然后返回到正常室内环境中喂养 5 d。高氧诱导组小鼠不给予药物处理,Genistein 组和 DMSO 组小鼠于出生后 12 d 玻璃体腔内分别注射 Genistein(溶于 DMSO,400 mg/L)和 DMSO 各 1 μl。正常对照组小鼠在正常室内环境中喂养。各组分别取 2 只 17 d 鼠龄小鼠,采用视网膜血管荧光造影后制备视网膜铺片,于荧光显微镜下观察小鼠双眼视网膜血管形态。另将各组各 7 只小鼠全部处死,获取双眼视网膜,采用实时荧光定量 PCR 法测定小鼠视网膜中血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)mRNA 的相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$);采用 Western blot 法测定各组小鼠视网膜中 VEGF 和 bFGF 蛋白的相对表达量。结果 荧光显微镜下可见正常对照组小鼠视网膜主要血管和毛细血管形态正常,高氧诱导组和 DMSO 处理组小鼠血管迂曲,较多新生血管簇和视网膜缺血无灌注区,Genistein 处理组小鼠视网膜血管清晰,可见无灌注区。正常对照组、高氧诱导组、DMSO 组和 Genistein 组小鼠视网膜中 VEGF mRNA 相对表达量分别为 0.04±0.02、0.64±0.25、0.37±0.23 和 0.03±0.02,bFGF mRNA 相对表达量分别为 0.67±0.23、21.40±3.07、17.22±2.63 和 0.52±0.25,与正常对照组和 Genistein 组比较,高氧诱导组和 DMSO 组小鼠视网膜中 VEGF mRNA 和 bFGF mRNA 的相对表达量均显著升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),正常对照组与 Genistein 组间小鼠视网膜中 VEGF mRNA 和 bFGF mRNA 的相对表达量比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。正常对照组、高氧诱导组、DMSO 组和 Genistein 组小鼠视网膜中 VEGF 蛋白的相对表达量分别为 0.52±0.05、1.01±0.05、1.06±0.07 和 0.73±0.05,bFGF 蛋白相对表达量分别为 0.56±0.05、0.97±0.06、1.03±0.08 和 0.76±0.07,4 个组小鼠视网膜中 VEGF 和 bFGF 蛋白相对表达量的总体比较差异均有统计学意义($F = 120.74, 57.98$, 均 $P = 0.00$)。与正常对照组和 Genistein 组比较,高氧诱导组和 DMSO 组小鼠视网膜中 VEGF 和 bFGF 蛋白相对表达量显著升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 Genistein 能抑制高氧诱导的视网膜新生血管的形成,其机制可能是通过抑制组织中 VEGF 和 bFGF 的表达。

【关键词】 血管生成抑制剂/药物;视网膜新生血管;高氧;血管内皮生长因子;成纤维细胞生长因子

基金项目: 山西省卫生厅科技攻关计划项目(2011057);山西省自然科学基金项目(2014011043-7)

Inhibitory effects of Genistein on hyperoxia-induced retinal neovascularization He Ronghua, Zhou Guohong, Kong Li, Li Chenyu

First Clinical College of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China (He RH, Li CY); Section of Vitreoretinopathy, Shanxi Eye Hospital, Taiyuan 030002, China (Zhou GH); Department of Anatomy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China (Li CY)

Corresponding author: Zhou Guohong, Email: guohongzhou2005@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effect of Genistein, a tyrosinase inhibitor, on retinal neovascularization in mice. **Methods** Thirty-six 7-day-old C57BL/6J mice were randomly assigned into hyperoxia-induced group, Genistein group, DMSO group and normal control group. The mice in the hyperoxia-induced group,

Genistein group and DMSO group were fed in a static chamber with the oxygen volume fraction (75±2)% for 5 days and then sent back to natural environment for 5 days to establish retinal neovascular models, and 1 μl Genistein diluted by 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) (400 mg/L) and 1 μl DMSO were intravitreally injected in the 12-day-old mice of Genistein group and DMSO group, respectively. The mice in the normal control group were bred in natural environment. The fluorescence angiography was carried out in 17-day-old mice (2 mice in each group) to prepare the whole retinal flatmounts, and the morphology of retinal vessels was observed under the fluorescence microscope. The other mice in various groups were sacrificed and the retinas were collected. The expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in mRNA and protein levels were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot, respectively. The use and care of the mice complied with regulations for the management of laboratory animals. **Results** Retinal vessels were normal in the mice of normal control group. In the mice of the hyperoxia-induced group and DMSO group, retinal vessels were tortuous, and neovascularization and non-perfusion areas were visible. In the Genistein group, retinal vessels were clearly visible, but non-perfusion areas were exhibited. The relative expression levels of VEGF mRNA in retinas were 0.64±0.25, 0.37±0.23, 0.03±0.02 and 0.04±0.02, and the relative expression levels of bFGF mRNA in retinas were 21.40±3.07, 17.22±2.63, 0.52±0.25 and 0.67±0.23, in the hyperoxia-induced group, DMSO group, Genistein group and normal control group, and the expressions of VEGF and bFGF in mRNA level in the hyperoxia-induced group and DMSO group were significantly higher than those in the Genistein group and normal control group (all at $P < 0.05$). The protein expression levels of VEGF and bFGF were 1.01±0.05 and 0.97±0.06 in the hyperoxia-induced group, 1.06±0.07 and 1.03±0.08 in the DMSO group, 0.73±0.05 and 0.76±0.07 in the Genistein group, 0.52±0.05 and 0.56±0.05 in the normal control group. The expressions of VEGF and bFGF in protein level in the hyperoxia-induced group and DMSO group were significantly higher than those in the Genistein group and normal control group (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Genistein can inhibit hyperoxia-induced retinal neovascularization may be by down-regulating the expressions of VEGF and bFGF in retinas.

[**Key words**] Angiogenesis inhibitors/pharmacology; Neovascularization, retinal; hyperoxia; Vascular endothelial growth factor; Fibroblast growth factor

[**Fund program**] Shanxi Health Science and Technology Project (2011057); Natural Science Foundation of Shanxi Province (2014011043-7)

视网膜新生血管性眼病是临床上重要的致盲眼病之一,包括增生性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)、视网膜静脉阻塞(retinal vein obstruction, RVO)、早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)等,其主要的病理改变是视网膜新生血管形成^[1-3]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种与多种眼部疾病发病机制有关的因子^[4],近年来,抗 VEGF 药物广泛应用于血管性眼部疾病的治疗,许多临床试验表明抗 VEGF 治疗的有效性^[5-7]。虽然这些药物在减缓疾病的进程和提高视力方面显示出一定的效果,但需要多次进行眼内注射,有发生严重眼部不良反应的风险,如眼内炎、视网膜脱离、医源性白内障和外伤性白内障等^[8-9],同时也给患者带来了沉重的经济负担,因此寻找其他有效治疗视网膜新生血管药物非常必要。Genistein 是一种特异性酪氨酸激酶抑制剂^[10],多种血管源性生长因子,如 VEGF、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)等生长因子

受体均具有酪氨酸激酶特性^[11],故推测 Genistein 可作用于这些生长因子的酪氨酸酶受体,抑制生长因子的表达,从而发挥抑制视网膜新生血管形成的作用。为了验证上述假设,本研究探讨 Genistein 对高氧诱导视网膜新生血管动物模型视网膜新生血管的抑制作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 7 日龄 C57BL/6J 清洁级小鼠 36 只(本研究组自行培育),雌雄不限,与母鼠共同饲养。实验动物的饲养和实验过程遵循《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(上海生工生物技术有限公司);兔抗鼠 bFGF 一抗(sc-79, 1:1 000)、鼠抗鼠 VEGF 一抗(sc-7269, 1:3 000)、HRP 标记羊抗兔二抗(sc-2004)、HRP 标记羊抗小鼠二抗(sc-2005)(美国 Santa Cruz 公司);Genistein(上海阿拉丁生物技术有限公司);异硫

氰葡聚糖荧光素(美国 Sigma 公司)。高氧饲养箱(青岛科凯电子研究所有限公司);荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及高氧视网膜新生血管模型制备

采用随机数字表法将小鼠分为高氧诱导组、Genistein 组、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)组和正常对照组,每组 9 只小鼠。高氧诱导组、Genistein 组和 DMSO 组 7 日龄小鼠与母鼠共同置于氧体积分数为(75±2)%的密闭氧箱中生活 5 d,隔日清扫氧箱,更换饲料和清洁水。然后将小鼠置于正常室内环境中饲养 5 d。参照文献[12]描述的方法,Genistein 组和 DMSO 组小鼠于出生后 12 d,即出氧箱日分别行 Genistein(溶于 DMSO 溶剂中,质量浓度为 400 mg/L)或 DMSO 玻璃体腔注射,注射容量为 1 μl。正常对照组小鼠在正常室内环境中饲养。

1.2.2 小鼠视网膜铺片的制备

小鼠出生后第 17 天各组分别取 2 只小鼠腹腔内注射质量分数 5% 水合氯醛(300 ml/kg 体质量)行全身麻醉,取异硫氰酸葡聚糖荧光素(FITC-dextran, 相对分子质量为 2×10^6) 50 mg,溶于 1 ml 质量分数 4% 多聚甲醛溶液,行小鼠左心室灌注。灌注后立即摘除小鼠双侧眼球,用 4% 多聚甲醛固定 3 h,解剖显微镜下分离出视网膜。将游离视网膜行以视盘为中心的放射状切开,对称切为 4 片平铺于载玻片上,滴加少量生理盐水,加盖玻片,荧光显微镜下观察并拍片。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测小鼠视网膜中 VEGF mRNA 和 bFGF mRNA 表达

采用 RNA 提取试剂盒提取小鼠视网膜总 RNA,按 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,用 11 μl RNA(1 μg)、随机引物(0.2 μg/ml) 1 μl 在 65 °C 条件下孵育 5 min,加入 4 μl 5 倍缓冲液、3 μl dNTP(10 mmol/L)、1 μl RNA 酶抑制剂(20 U/μl)(商品单位)和 1 μl 逆转录酶[20 U(商品单位)/μl],分别于 25 °C 孵育 10 min、42 °C 孵育 1 h、72 °C 孵育 15 min。以 cDNA 为模板分别对 VEGF 和 bFGF 进行 PCR 扩增。VEGF 基因上游引物为 5'-CAGGCTGCTGTAACGATGAA-3',下游引物为 3'-AAAAACGAAAGCGCAAGAAA-5',bFGF 基因上游引物为 5'-AGCGGCTCTACTGCAAGAAC-3',下游引物为 3'-TATGAAGGAAGATGGACGGC-5';β-actin 上游引物为 5'-AAGTGTGACGTTGACATCCG-3',下游引物为 3'-TCTGCATCCTGTCAGCAATG-5'(上海生工生物科技有限公司)。加入 PCR 反应液,94 °C 预变性 10 min,活化 Tag 酶;94 °C 变性 15 s,60 °C 退火和

延伸 60 s,共 45 个循环。反应结束后通过熔解曲线检测,确认扩增的特异性,根据各组小鼠视网膜组织中 β-actin、VEGF mRNA 和 bFGF mRNA 的 Ct 值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示各组视网膜组织中 VEGF mRNA 和 bFGF mRNA 的相对表达量。

1.2.4 Western blot 法检测 VEGF 和 bFGF 蛋白在小鼠视网膜中的表达

用裂解液裂解小鼠视网膜,置于 eppendorf 管中,超声匀浆,4 °C ×10 000 g 离心 10 min,取上清,蛋白定量。加入等体积 2 倍 SDS 缓冲液,95 °C 煮沸 5 min,迅速冰浴,4 °C ×10 000 g 离心 10 min,收集上清。蛋白经 SDS-PAGE 电泳法进行分离(VEGF 用质量分数 8% 的分离胶,bFGF 用质量分数 15% 的分离胶),电转印法将电泳条带转移到 PVDF 膜上,质量分数 5% BSA 溶液,4 °C 封闭 3 h;分别加入鼠抗鼠 VEGF 单克隆抗体或兔抗鼠 bFGF 单克隆抗体,4 °C 孵育过夜,用 TBST 洗涤,再加入相应二抗,孵育 2 h,洗涤;ECL 底物化学发光,显影,定影,扫描。以 β-actin 为内参,通过 Photoshop 图像软件分析,以 VEGF/β-actin,bFGF/β-actin 的比值表示各组组织中 VEGF 和 bFGF 蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析。本研究测定指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,经 Levene 检验证实方差齐性。正常对照组、高氧诱导组、DMSO 组和 Genistein 组小鼠视网膜中 VEGF 和 bFGF 蛋白及其 mRNA 相对表达量的总体差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠视网膜血管的形态

荧光显微镜下可清晰显示视网膜的主要血管和毛细血管形态,正常对照组小鼠视网膜血管形态完整,走行清晰,未发现新生血管簇和血管渗漏,无视网膜缺血及无灌注区。高氧诱导组和 DMSO 组小鼠血管分层和分支较多,走行迂曲,可见较多新生血管簇和视网膜血管渗漏,毛细血管丰富且吻合多,可见视网膜缺血无灌注区;Genistein 组小鼠视网膜血管分层和分支较少,视网膜血管走行清晰,可见视网膜缺血无灌注区(图 1)。

2.2 各组小鼠视网膜中 VEGF mRNA 和 bFGF mRNA 表达量的比较

正常对照组、高氧诱导组、DMSO 组和 Genistein 组小鼠视网膜中 VEGF mRNA 相对表达量分别为 $0.04 \pm$

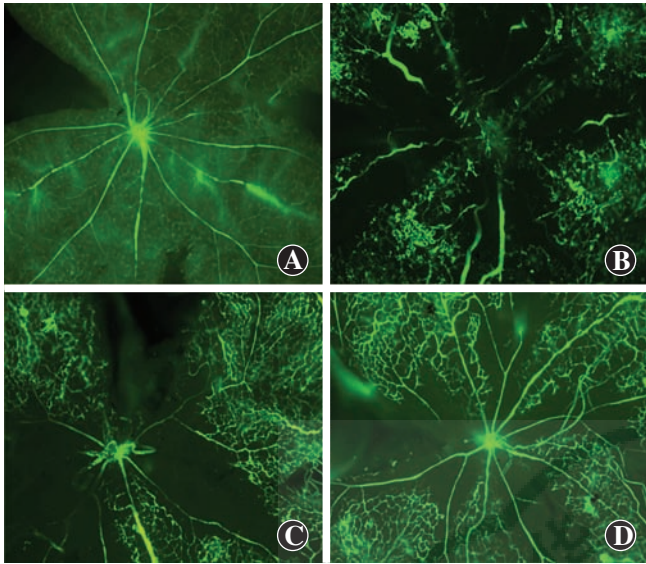


图 1 荧光显微镜下各组小鼠视网膜新生血管形态(FITC-dextran ×50)
A: 正常对照组小鼠视网膜血管正常 B: 高氧诱导组小鼠视网膜血管迂曲, 可见大量新生血管和无灌注区 C: DMSO 组小鼠视网膜有血管迂曲, 可见大量新生血管簇和无灌注区 D: Genistein 组小鼠视网膜血管走行尚清晰, 可见无灌注区

0.02、 0.64 ± 0.25 、 0.37 ± 0.23 和 0.03 ± 0.02 , bFGF mRNA 相对表达量分别为 0.67 ± 0.23 、 21.40 ± 3.07 、 17.22 ± 2.63 和 0.52 ± 0.25 , 4 个组间小鼠视网膜中 VEGF mRNA 和 bFGF mRNA 相对表达量的总体比较差异均有统计学意义 ($F = 23.91$ 、 232.83 , 均 $P = 0.00$), 其中与正常对照组和 Genistein 组比较, 高氧诱导组和 DMSO 组小鼠视网膜中 VEGF mRNA 和 bFGF mRNA 的相对表达量均显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 正常对照组与 Genistein 组间小鼠视网膜中 VEGF mRNA 和 bFGF mRNA 的相对表达量比较, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (图 2)。

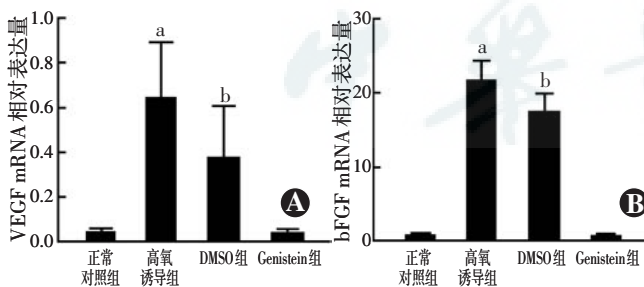


图 2 各组小鼠视网膜中 VEGF mRNA 和 bFGF mRNA 相对表达量的比较 A: 正常对照组、高氧诱导组、DMSO 组和 Genistein 组间小鼠视网膜中 VEGF mRNA 表达量比较 $F = 23.91$, $P = 0.00$. 与正常对照组、Genistein 组比较, $^a P < 0.01$, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 8$) B: 正常对照组、高氧诱导组、DMSO 组和 Genistein 组间小鼠视网膜中 bFGF mRNA 表达量比较 $F = 232.83$, $P = 0.00$. 与正常对照组、Genistein 组比较, $^a P < 0.01$, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 8$) VEGF: 血管内皮生长因子; DMSO: 二甲亚砜; bFGF: 碱性成纤维生长因子

2.3 各组小鼠视网膜中 bFGF 和 VEGF 蛋白表达水

平的比较

正常对照组小鼠视网膜中均可见少量 bFGF 和 VEGF 蛋白的表达, 高氧诱导组和 DMSO 组小鼠视网膜中 bFGF 和 VEGF 蛋白表达条带较正常对照组明显增强, Genistein 组小鼠视网膜中 bFGF 和 VEGF 蛋白表达条带较高氧诱导组和 DMSO 组明显减弱 (图 3A)。正常对照组、高氧诱导组、DMSO 组和 Genistein 组小鼠视网膜中 VEGF 蛋白的相对表达量分别为 0.52 ± 0.05 、 1.01 ± 0.05 、 1.06 ± 0.07 和 0.73 ± 0.05 , bFGF 蛋白相对表达量分别为 0.56 ± 0.05 、 0.97 ± 0.06 、 1.03 ± 0.08 和 0.76 ± 0.07 , 4 个组小鼠视网膜中 VEGF 和 bFGF 蛋白相对表达量的总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 120.74$ 、 57.98 , 均 $P = 0.00$)。与正常对照组和 Genistein 组比较, 高氧诱导组和 DMSO 组小鼠视网膜中 VEGF 和 bFGF 蛋白相对表达量显著升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3B, C)。

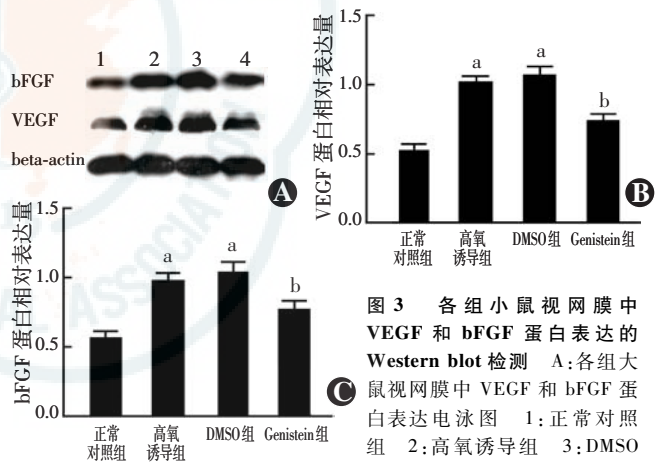


图 3 各组小鼠视网膜中 VEGF 和 bFGF 蛋白表达的 Western blot 检测 A: 各组大鼠视网膜中 VEGF 和 bFGF 蛋白表达电泳图 1: 正常对照组 2: 高氧诱导组 3: DMSO 组 4: Genistein 组 B: 各组大鼠视网膜中 VEGF 蛋白表达的量化比较 $F = 120.74$, $P = 0.00$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.01$, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 6$) C: 各组大鼠视网膜中 bFGF 蛋白表达的量化比较 $F = 57.98$, $P = 0.00$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.01$, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 6$) bFGF: 碱性成纤维生长因子; VEGF: 血管内皮生长因子; DMSO: 二甲亚砜

3 讨论

Genistein 是大豆异黄酮的主要成分^[13-15], 因其对心血管疾病、骨质疏松、雌激素相关性癌症及退行病变有防治作用而引起广泛关注^[14-15]。有研究表明, Genistein 具有抗氧化和抗炎作用^[16], Akiyama 等^[10]首次报道 Genistein 是蛋白酪氨酸激酶 (protein tyrosine kinases, PTK) 的抑制剂, PTK 为许多生长因子受体的胞内结构域, 是一类催化 ATP 上 γ -磷酸基转移到蛋白酪氨酸残基上的激酶, 能催化多种底物蛋白质酪氨酸残基磷酸化, 在细胞生长、增生和分化过程中发挥重要

作用。研究发现,玻璃体腔注射 Genistein 能够减轻糖尿病早期的炎症反应,其机制之一是通过阻断 PTK 通路减少肿瘤坏死因子 α 的分泌^[17]。Pan 等^[18]发现 Genistein 可以抑制缺氧引起的 ARPE-19 细胞 bFGF mRNA 和蛋白的表达; Sylvi 等^[19]研究表明, Genistein 可能是通过抑制 VEGF-A 和缺氧诱导因子 1 α 的表达而抑制腹膜上子宫内膜组织血管生成,与本研究结果一致。本研究中用高氧诱导 C57BL/6J 小鼠视网膜新生血管^[20]。用 Genistein 对出生 12 d 出氧箱后的部分小鼠进行药物干预,于出生后 17 d 将小鼠处死,结果表明 Genistein 治疗组小鼠视网膜中 VEGF 和 bFGF mRNA 及蛋白表达量明显低于高氧诱导组和 DMSO 组,荧光造影铺片中视网膜血管走行相对清晰,未见明显新生血管簇,说明 Genistein 能显著抑制小鼠视网膜新生血管的形成。VEGF 和 bFGF 可能是通过结合胞外特异性受体,通过跨膜结构域,激活胞质内酪氨酸激酶的活性而刺激细胞生长^[21], Genistein 可能通过竞争性抑制 ATP 结合到酪氨酸激酶催化结构域,特异性地抑制酪氨酸激酶的活性^[22],从而抑制 VEGF 和 bFGF 的表达。

VEGF 和 bFGF 受体均具有酪氨酸激酶的特性,二者在视网膜新生血管形成过程中起着重要作用, Genistein 作为酪氨酸激酶抑制剂,能有效抑制小鼠视网膜新生血管的形成,具有防治视网膜新生血管的潜能。目前有研究显示,低剂量 Genistein 眼内注射对视网膜的毒性不大,本研究注射的 Genistein 剂量为 400 mg/L, 低于其最低毒性剂量^[23]。因此,用 Genistein 来防治视网膜新生血管的形成有望成为一种新的途径,需要我们进一步探讨和研究。

参考文献

- [1] Suzuma K, Takagi H, Otani A, et al. Expression of thrombospondin-1 in ischemia-induced retinal neovascularization [J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(2): 343-354. DOI:10.1016/S0002-9440(10)65281-9.
- [2] Krzystolik MG, Afshari MA, Adamis AP, et al. Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment [J]. *Arch Ophthalmol*, 2002, 120(3): 338-346.
- [3] Ambati J, Fowler BJ. Mechanisms of age-related macular degeneration [J]. *Neuron*, 2012, 75(1): 26-39. DOI:10.1016/j.neuron.2012.06.018.
- [4] Kim J, Kim CS, Jo K, et al. HL-217, a new topical anti-angiogenic agent, inhibits retinal vascular leakage and pathogenic subretinal neovascularization in Vldlr^{-/-} mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 456(1): 53-58. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.11.033.
- [5] Rofagha S, Bhisitkul RB, Boyer DS, et al. Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP) [J]. *Ophthalmology*, 2013, 120(11): 2292-2299. DOI:10.1016/j.ophtha.2013.03.046.
- [6] Lang GE, Berta A, Eldem BM, et al. Two-year safety and efficacy of ranibizumab 0.5 mg in diabetic macular edema: interim analysis of the RESTORE extension study [J]. *Ophthalmology*, 2013, 120(10): 2004-2012. DOI:10.1016/j.ophtha.2013.02.019.
- [7] Heier JS, Campochiaro PA, Yau L, et al. Ranibizumab for macular edema due to retinal vein occlusions; long-term follow-up in the HORIZON trial [J]. *Ophthalmology*, 2012, 119(4): 802-809. DOI:10.1016/j.ophtha.2011.12.005.
- [8] Diago T, McCannel CA, Bakri SJ, et al. Infectious endophthalmitis after intravitreal injection of antiangiogenic agents [J]. *Retina*, 2009, 29(5): 601-605. DOI:10.1097/IAE.0b013e31819d2591.
- [9] Fintak DR, Shah GK, Blinder KJ, et al. Incidence of endophthalmitis related to intravitreal injection of bevacizumab and ranibizumab [J]. *Retina*, 2008, 28(10): 1395-1399. DOI:10.1097/IAE.0b013e3181884fd2.
- [10] Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262(12): 5592-5595.
- [11] 游江, 姜德咏. Genistin 防治增生性玻璃体视网膜病变的研究 [J]. *中南大学学报: 医学版*, 2010, 35(7): 749-753. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2010.07.017.
- [12] 周国宏, 孔丽. Cathepsin B-RNAi-lentivirus 抑制小鼠视网膜新生血管形成的研究 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31(5): 452-455. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.05.009.
- [13] Han L, Zhang HW, Zhou WP, et al. The effects of genistein on transforming growth factor- β 1-induced invasion and metastasis in human pancreatic cancer cell line Panc-1 *in vitro* [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(11): 2032-2040.
- [14] Nagarajan S. Mechanisms of anti-atherosclerotic functions of soy-based diets [J]. *J Nutr Biochem*, 2010, 21(4): 255-260. DOI:10.1016/j.jnutbio.2009.09.002.
- [15] Si H, Liu D. Phytochemical genistein in the regulation of vascular function: new insights [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(24): 2581-2589.
- [16] Chang T, DeFine L, Alexander T, et al. *In vitro* investigation of antioxidant, anti-inflammatory, and antiplatelet adhesion properties of genistein-modified poly (ethersulfone)/poly (vinylpyrrolidone) hemodialysis membranes [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2015, 103(3): 539-547. DOI:10.1002/jbm.b.33215.
- [17] Ibrahim AS, El-Shishtawy MM, Peña A, et al. Genistein attenuates retinal inflammation associated with diabetes by targeting of microglial activation [J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 2033-2042.
- [18] Pan JS, Zhu HJ, Zhang B, et al. Inhibitive effect of genistein on hypoxia-induced basic fibroblast growth factor expression in human retinal pigment epithelium cells [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2006, 22(2): 103-109. DOI:10.1089/jop.2006.22.103.
- [19] Sylvi W, Nur A, Yu Y, et al. The expression of vascular endothelial growth factor is affected by hypoxia inducible factor-1 α in peritoneum of endometriosis mice treated with genistein [J]. *Mid East Fertility Society J*, 2016, 21: 180-183. DOI:10.1016/j.mefs.2015.12.005.
- [20] Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(1): 101-111.
- [21] 游江, 姜德咏. 金雀异黄素对外伤性增生性玻璃体视网膜病变中 bFGF 和 PCNA 表达的抑制 [J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2008, 37(4): 535-537.
- [22] You J, Jiang DY. Inhibitory effects of genistein on the expression of bFGF and PCNA in traumatic proliferative vitreoretinopathy [J]. *Acta Med Univ Sci Et Tech Huazhong*, 2008, 37(4): 535-537.
- [23] 郑杰. 金雀异黄素 [J]. *国外医学卫生学分册*, 1998, 25(5): 260-263.
- [23] Lüke C, Krott R, Lüke M, et al. Effects of protein tyrosine kinase inhibitor genistein on retinal function in superfused vertebrate retina [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2001, 17(2): 151-158. DOI:10.1089/10807680151125474.

(收稿日期:2016-05-21 修回日期:2017-11-28)

(本文编辑:张荻)