

· 实验研究 ·

重组人血小板源性生长因子对人视网膜血管内皮细胞生物学行为的促进作用及其机制

李丹 刘高勤 陈磊 王梦娇 陆培荣

215006 苏州大学附属第一医院眼科

通信作者:陆培荣, Email: lupeirong@suda.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.01.008

【摘要】 目的 探讨重组人血小板源性生长因子-BB(rhPDGF-BB)对人视网膜血管内皮细胞(hRVECs)增生和迁移的影响及其作用机制。**方法** 采用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养 hRVECs, 分别将 10、50 和 200 ng/ml rhPDGF-BB 加入对数生长期 hRVECs 的培养液, 未添加 rhPDGF-BB 者作为正常对照组。采用细胞计数试剂盒-8(CCK8)法检测各组细胞的增生情况;采用细胞划痕法检测细胞相对迁移面积(迁移后无细胞区面积/划痕初期无细胞区面积);采用逆转录 PCR 法检测 hRVECs 中 rhPDGF-BB 受体(rhPDGF-BBR)mRNA 的相对表达量;采用实时荧光定量 PCR 法检测 hRVECs 中 VEGF mRNA 和整合素 mRNA 相对表达量。**结果** 培养的 hRVECs 生长良好,用 rhPDGF-BBR 引物能扩增出与引物设计长度相符的表达条带。正常对照组及 10、50 和 200 ng/ml rhPDGF-BB 组培养细胞后 24 h 细胞增值值(A)分别为 1.01 ± 0.05 、 1.09 ± 0.04 、 1.10 ± 0.02 和 1.13 ± 0.05 , 10、50 和 200 ng/ml rhPDGF-BB 组 A 值明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义($t=2.504, 3.430, 3.483$, 均 $P < 0.05$);细胞划痕试验后 24 h, 正常对照组及 10、50 和 200 ng/ml rhPDGF-BB 组细胞相对迁移面积分别为 0.42 ± 0.10 、 0.38 ± 0.09 、 0.55 ± 0.06 和 0.61 ± 0.05 , 划痕试验后 48 h 细胞相对迁移面积分别为 0.75 ± 0.06 、 0.81 ± 0.02 、 0.87 ± 0.02 和 0.98 ± 0.02 , 总体比较差异均有统计学意义($F_{\text{分组}}=16.283, P=0.000$; $F_{\text{时间}}=209.129, P=0.000$), 随着 rhPDGF-BB 剂量增加和作用时间延长, 细胞相对迁移面积均明显增加;实时荧光定量 PCR 法检测显示正常对照组及 10、50 和 200 ng/ml rhPDGF-BB 组 hRVECs 中整合素 mRNA 相对表达量分别为 1.06 ± 0.02 、 1.30 ± 0.10 、 1.20 ± 0.16 和 1.27 ± 0.08 , VEGF mRNA 相对表达量分别为 0.97 ± 0.05 、 1.06 ± 0.16 、 1.58 ± 0.18 和 1.66 ± 0.21 , 其中 50 ng/ml 和 200 ng/ml rhPDGF-BB 组细胞中整合素 mRNA 及 VEGF mRNA 相对表达量均明显高于正常对照组, 差异均有统计学意义(整合素 mRNA: $t=3.900, 4.014$, 均 $P < 0.05$; VEGF mRNA: $t=6.940, 7.210$, 均 $P < 0.05$)。**结论** rhPDGF-BBR 促进 hRVECs 的增生和迁移, 其作用呈剂量和时间依赖性, 其可能与上调 VEGF 和整合素在细胞中的表达有关。

【关键词】 血管内皮细胞/细胞学; 病理性新生血管/代谢; 血小板源性生长因子; 血小板源性生长因子受体; 重组蛋白; 人; 细胞培养; 整合素; 血管内皮生长因子

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972712); 江苏省自然科学基金项目(BK20151208); 江苏省医学重点人才项目(RC2011104)

The effects of recombinant human platelet derived growth factor-BB on biological behaviours of human retinal vascular endothelial cells Li Dan, Liu Gaoqin, Chen Lei, Wang Mengjiao, Lu Peirong

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

Corresponding author: Lu Peirong, Email: lupeirong@suda.edu.cn

【Abstract】 Objective This study was to investigate the role of recombinant human platelet derived growth factor-BB(rhPDGF-BB) in the proliferation and migration of human retinal vascular endothelial cells (hRVECs).

Methods hRVECs were cultured in DMEM with 10% fetal bovine serum. The rhPDGF-BB at the concentrations of 10, 50 and 200 ng/ml were added into the medium of exponential phase-growth cells for 24 and 48 hours, respectively, and no rhPDGF-BB was added in the normal control group. The proliferation of the cells (absorbancy) was assayed by cell counting kit 8 (CCK8) method. Cell scratch test was employed to evaluate the relative migration area of cells (migrated acellular area/initial acellular area). The relative expression of rhPDGF-BB receptor (rhPDGF-BBR) mRNA in the cells was detected by reverse transcription PCR. The relative expression of VEGF

mRNA and integrin mRNA in the cells was detected using real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** hRVECs grew well and a expressing band according with rhPDGF-BBR prime was displayed. The absorbancy values of the cells were 1.01 ± 0.05 , 1.09 ± 0.04 , 1.10 ± 0.02 and 1.13 ± 0.05 in the normal control group and 10, 50, 200 ng/ml rhPDGF-BB groups at 24 hours after culture, and those in the 10, 50 and 200 ng/ml rhPDGF-BB groups were significantly increased in comparison with the normal control group ($t=2.504, 3.430, 3.483$, all at $P<0.05$). The relative migrated areas of the cells in the normal control group and 10, 50, 200 ng/ml rhPDGF-BB groups were 0.42 ± 0.10 , 0.38 ± 0.09 , 0.55 ± 0.06 and 0.61 ± 0.05 at 24 hours after culture, and those at 48 hours were 0.75 ± 0.06 , 0.81 ± 0.02 , 0.87 ± 0.02 and 0.98 ± 0.02 , showing significant differences among the groups ($F_{\text{group}} = 16.283, P = 0.000$; $F_{\text{time}} = 209.129, P = 0.000$), and the relative migrated areas was depended upon the rhPDGF-BB dose and time. The relative expressions of integrin mRNA were 1.06 ± 0.02 , 1.30 ± 0.10 , 1.20 ± 0.16 and 1.27 ± 0.08 , and those of VEGF mRNA were 0.97 ± 0.05 , 1.06 ± 0.16 , 1.58 ± 0.18 and 1.66 ± 0.21 in the normal control group and 10, 50 ng/ml, 200 ng/ml rhPDGF-BB groups, respectively, and increased expressions of integrin mRNA and VEGF mRNA were found in the 50 and 200 ng/ml rhPDGF-BB groups compared with the normal control group (integrin mRNA: $t=3.900, 4.014$, both at $P<0.05$; VEGF mRNA: $t=6.940, 7.210$, both at $P<0.05$). **Conclusions** rhPDGF-BB/rhPDGF-BBR signal promotes the proliferation and migration of hRVECs probably by up-regulating the expressions of integrin and VEGF.

[Key words] Endothelium, vascular/cytology; Neovascularization, pathologic/metabolism; Platelet-derived growth factor; Receptors, platelet-derived growth factor; Recombinant proteins; Humans; Cells, cultured; Integrin; Vascular endothelial growth factor

Fund program: National Natural Science Foundation of China (30972712); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20151208); Jiangsu Province's Key Provincial Talents Program (RC2011104)

视网膜新生血管是多种视网膜疾病的共同病理过程,病理性新生血管非但不能为周围组织供血供氧,反而易导致严重的视力损伤,甚至致盲^[1],病理条件下视网膜内促血管生成因子和抑血管生成因子表达的失衡是导致新生血管形成的主要原因。研究表明,重组人血小板源性生长因子-BB (recombinant human platelet derived growth factor-BB, rhPDGF-BB) 能诱导血管内皮细胞的增生、迁移和管腔形成^[2-3],还可以通过招募周细胞以维持血管结构的完整性^[4-6]。然而, rhPDGF-BB 对视网膜血管内皮细胞功能发挥影响的机制有待进一步研究。本研究拟探讨不同质量浓度 rhPDGF-BB 对人视网膜血管内皮细胞 (human retinal vascular endothelial cells, hRVECs) 生物学行为的影响及其作用机制,以进一步认识视网膜新生血管的发生机制,为临床上视网膜新生血管相关病变的靶向防治研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

hRVECs 株 (上海雅吉生物科技有限公司); rhPDGF-BB (美国 ACRO Biosystems 公司); 胰蛋白酶、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 PBS (美国 Hyclone 公司); 微量 RNA 抽提试剂盒、逆转录试剂盒、Dnase 纯化剂 (德国 Qiagen 公司); PCR 试剂盒、DNA 相对分子质量标准 (DNA marker) (大连 Takara 生物技

术公司); SYBR Premix Ex TaqTM (日本 Takara 公司); rhPDGF-BB 受体 (rhPDGF-BB receptor, rhPDGF-BBR)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF); 整合素引物由南京金思瑞生物科技有限公司设计合成; 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK8) 试剂盒 (日本 DOJINDO 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养及传代 参照文献[7]提供的实验方法,采用含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养液于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中常规培养 hRVECs 株。细胞培养后 3~4 d 按照 1:4 比例传代。倒置相差显微镜下观察培养细胞的形态,取生长活跃、处于对数生长期的 hRVECs 进行后续实验。

1.2.2 CCK8 法检测各组细胞的增生情况 取对数生长期的 hRVECs 悬液接种于 96 孔板,每孔加入约 1×10^4 个细胞,于 37 ℃、5% CO₂、相对湿度 90% 的培养箱中培养 24 h。以无菌移液管吸除原培养液,将 rhPDGF-BB 置于含有 10% FBS 的 DMEM 培养基,使终质量浓度分别为 10、50 和 200 ng/ml,每组设 3 个复孔。孵育后 24 h 每孔更换为含有 10 μl CCK8 的培养基 100 μl,置于酶联检测仪上测定波长 450 nm 下的吸光度 (A) 值。

1.2.3 逆转录 PCR 法检测 hRVECs 中 rhPDGF-BBR mRNA 的表达 分别将 0、10、50 和 200 ng/ml rhPDGF-BB 加入培养液培养 hRVECs 6~8 h,收集细胞,利用

微量 RNA 抽提试剂盒提取总 mRNA,用 DNA 试剂催化,清除总 RNA 中残留的 DNA 杂质,将 mRNA 逆转录成 cDNA,于-20 ℃ 保存备用。rhPDGF-BBR 上游引物序列:5'-GGTGACACTGCACGAGAAGA-3',下游引物序列:5'-GTCCCCAATGGTGGTTTTGC-3',扩增片段长度为 118 bp。以 cDNA 为模板扩增目的基因,逆转录 PCR 扩增条件:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,扩增 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物加入 2 μl 混有核酸染料 (Gel Red) 的 6 倍上样缓冲液,质量分数 2% 琼脂糖凝胶上样电泳,于凝胶成像仪上拍照。

1.2.4 细胞划痕法检测各组 hRVECs 的相对迁移面积 将对数期的 hRVECs 接种于 24 孔板,每孔加入约 1.0×10^5 个细胞,待细胞长至约 90% 后用无菌 200 μl 枪尖垂直于培养板底划 2 条水平直线,用无菌 PBS 洗涤 3 次以去除离壁漂浮的细胞,形成一个无细胞区,加入含有 10% FBS 的 rhPDGF-BB 蛋白的 DMEM 培养液, rhPDGF-BB 的终质量浓度分别为 0 (正常对照组) 及 10、50 和 200 ng/ml。将 24 孔板置于恒温培养箱中培养,分别于培养后即刻、24 h 和 48 h 在倒置相差显微镜下观察并拍照。用 Image J 软件的度量工具分别测量处理前、后细胞划痕处的无细胞区面积,二者的差值即为相应时间点细胞的平均迁移面积。细胞相对迁移面积 = 细胞平均迁移面积 / 划痕初期无细胞区面积。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 法检测不同质量浓度 rhPDGF-BB 干预后 hRVECs 中 VEGF 和整合素 mRNA 的表达 以 1.2.2 中提取的 cDNA,以 cDNA 为模板,扩增 VEGF 和整合素。VEGF 上游引物序列:5'-TGGTCCCAGGCTGCACCCAT-3',下游引物序列:5'-CGCATCGCATCAGGGGCACA-3',扩增片段长度为 184 bp。整合素上游引物序列:5'-CAGCTACAAGCCCCAGAAGT-3'下游引物序列:5'-CTGATTCCTGGGAGCGGTTTC-3',扩增片段长度为 149 bp。循环条件:95 ℃ 预热 5 min,95 ℃ 解旋 10 s,60 ℃ 退火并延伸 30 s,扩增 40 个循环,以 GAPDH 作为内参照,根据扩增过程中各样本产生的 Ct 值,按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。GAPDH 上游引物序列:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游引物序列:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3',扩增片段长度为 452 bp。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计学软件进行统计分析。本研究检测指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用均衡分组多水平研究设计,

正常对照组及 10、50、200 ng/ml rhPDGF-BB 组间细胞增殖值、细胞中 VEGF mRNA 和整合素 mRNA 相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Dunnett *t* 检验;不同剂量 rhPDGF-BB 作用不同时间点细胞相对移行面积的总体差异比较采用重复测量两因素方差分析,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 培养细胞的形态及 rhPDGF-BBR mRNA 的表达

对数期生长的 hRVECs 呈梭形,大小均匀,细胞质透亮,细胞核居中且清晰可见;培养后 2~3 d 细胞生长密度达到 90% 以上,细胞排列整齐 (图 1)。逆转录 PCR 检测显示,hRVECs 中 rhPDGF-BBR mRNA 表达条带呈阳性 (图 2)。

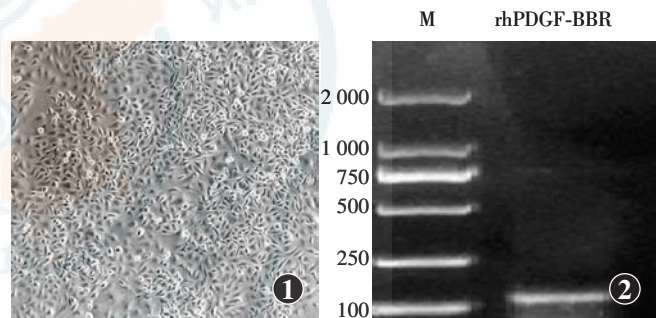


图 1 倒置显微镜下培养细胞的形态 (×200) 培养的细胞呈梭形,细胞大小均匀,排列整齐致密 图 2 逆转录 PCR 法检测细胞中 rhPDGF-BBR mRNA 的表达 可见培养的细胞中 rhPDGF-BBR mRNA 表达条带,相对分子质量为 110 M;标准蛋白相对分子质量; rhPDGF-BBR:重组人血小板源性生长因子-BB 受体

2.2 各组 hRVECs 的增殖情况比较

正常对照组及 10、50、200 ng/ml rhPDGF-BB 培养细胞后 24 h 细胞增殖值 (*A*) 分别为 1.01 ± 0.05 、 1.09 ± 0.04 、 1.10 ± 0.02 和 1.13 ± 0.05 ,各组间 *A* 值的总体比较差异有统计学意义 ($F = 6.267, P = 0.008$),10、50、200 ng/ml rhPDGF-BB 组 *A* 值均明显高于正常对照组,差异均有统计学意义 ($t = 2.504, 3.430, 3.483$, 均 $P < 0.05$) (图 3)。

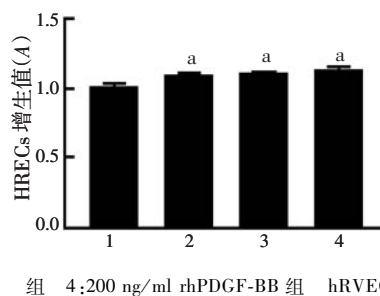


图 3 各组细胞增殖情况的量化比较 $F = 6.267, P = 0.008$. 与正常对照组比较,^a*P* < 0.05 (单因素方差分析, Dunnett *t* 检验, *n* = 3) 1: 正常对照组 2: 10 ng/ml rhPDGF-BB 组 3: 50 ng/ml rhPDGF-BB 组 4: 200 ng/ml rhPDGF-BB 组 hRVECs: 人视网膜血管内皮细胞

2.3 各组 hRVECs 的相对迁移面积

倒置显微镜下可见正常对照组随着培养时间延长, 细胞划痕面积无明显变化。培养后 24 h, 10、50 和 200 ng/ml rhPDGF-BB 组细胞划痕面积逐渐缩小。培养后 48 h, 10 ng/ml、50 ng/ml rhPDGF-BB 组细胞划痕面积均明显小于培养后 24 h, 200 ng/ml rhPDGF-BB 组细胞划痕面积消失(图 4A)。细胞划痕试验显示, 培养后 24 h 正常对照组及 10、50、200 ng/ml rhPDGF-BB 组细胞相对迁移面积分别为 0.42 ± 0.10 、 0.38 ± 0.09 、 0.55 ± 0.06 和 0.61 ± 0.05 ; 培养后 48 h 正常对照组及 10、50、200 ng/ml rhPDGF-BB 组细胞相对迁移面积分别为

0.75 ± 0.06 、 0.81 ± 0.02 、 0.87 ± 0.02 和 0.98 ± 0.02 , 总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 16.283, P = 0.000$; $F_{\text{时间}} = 209.129, P = 0.000$), 随着 rhPDGF-BB 质量浓度增加, 细胞相对迁移面积增大。与正常对照组比较, 培养后 24 h 50 ng/ml、200 ng/ml rhPDGF-BB 组细胞相对迁移面积均明显增加, 培养后 48 h 10、50、200 ng/ml rhPDGF-BB 组细胞相对迁移面积均明显增加, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 培养后 48 h 正常对照组及 10、50、200 ng/ml 组细胞相对迁移面积均明显大于培养后 24 h, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 4B)。

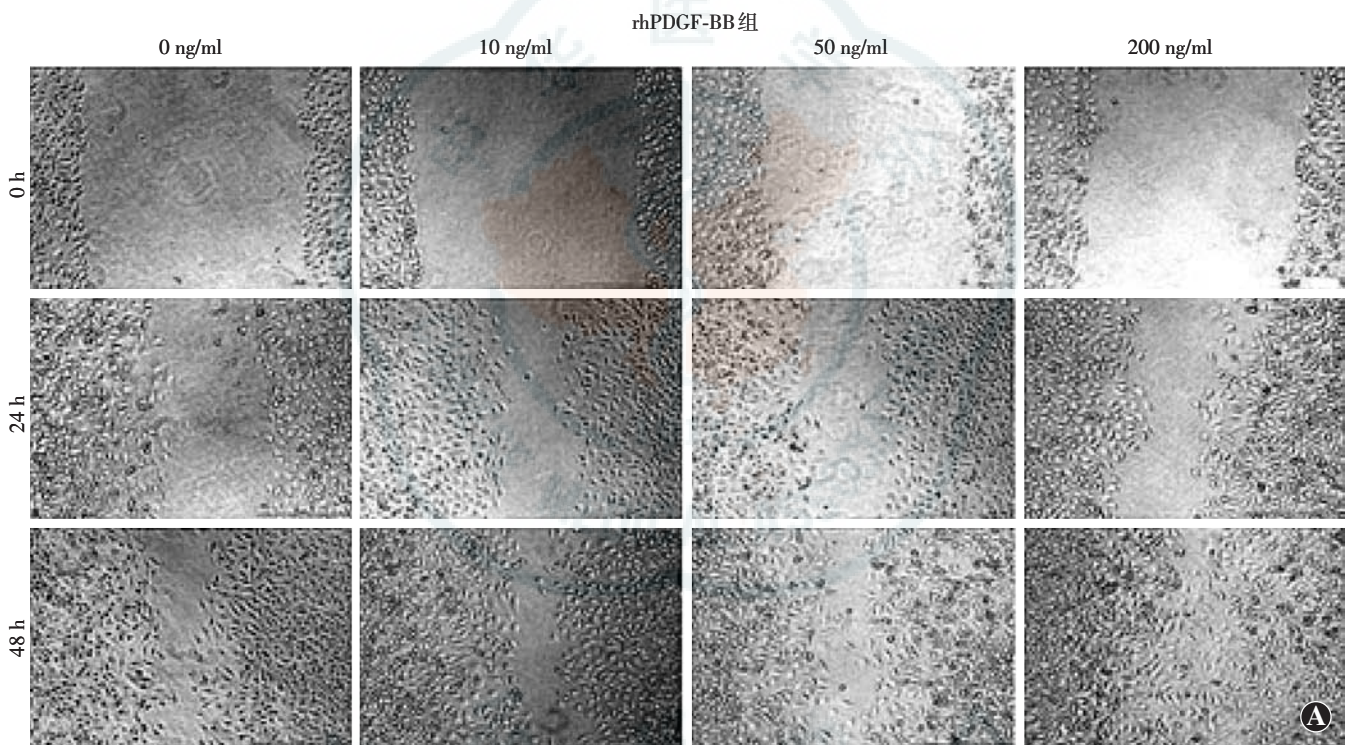


图 4 各组 hRVECs 的相对迁移面积 A: 倒置显微镜下各组细胞迁移变化($\times 100$) 正常对照组随着培养时间延长, 细胞划痕面积无明显变化; 培养后 24 h, 随着 rhPDGF-BB 质量浓度的增加, 细胞划痕面积逐渐缩小; 培养后 48 h, 10、50 ng/ml rhPDGF-BB 组细胞划痕面积均明显小于培养后 24 h, 200 ng/ml rhPDGF-BB 组细胞划痕面积消失 B: 各组 hRVECs 相对迁移面积的量化比较 $F_{\text{分组}} = 16.283, P = 0.000$; $F_{\text{时间}} = 209.129, P = 0.000$ 。与培养后 24 h 正常对照组比较, $^a P < 0.05$; 与培养后 48 h 正常对照组比较, $^b P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-t 检验, $n = 3$) 1: 正常对照组 2: 10 ng/ml rhPDGF-BB 组 3: 50 ng/ml rhPDGF-BB 组 4: 200 ng/ml rhPDGF-BB 组 rhPDGF-BB: 重组人血小板源性生长因子-BB

2.4 各组 hRVECs 中整合素和 VEGF mRNA 的表达

正常对照组及 10、50、200 ng/ml rhPDGF-BB 组细胞中整合素 mRNA 相对表达量分别为 1.06 ± 0.02 、 1.30 ± 0.10 、 1.20 ± 0.16 和 1.27 ± 0.08 , VEGF mRNA 相对表达量分别为 0.97 ± 0.05 、 1.06 ± 0.16 、 1.58 ± 0.18 和 1.66 ± 0.21 , 总体比较差异均有统计学意义 ($F = 3.077, P =$

0.091 ; $F = 22.915, P = 0.000$)。与正常对照组相比, 10 ng/ml、200 ng/ml rhPDGF-BB 组细胞中整合素 mRNA 相对表达量明显增高, 差异均有统计学意义 ($t = 3.900$ 、 4.014 , 均 $P < 0.05$), 50 ng/ml 和 200 ng/ml rhPDGF-BB 组细胞中 VEGF mRNA 相对表达量明显增高, 差异均有统计学意义 ($t = 6.940$ 、 7.210 , 均 $P < 0.05$)(图 5)。

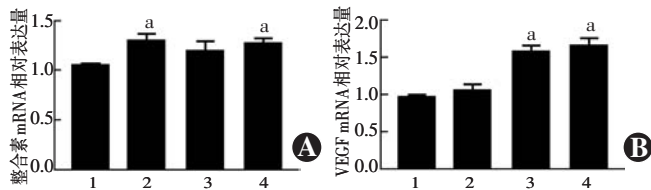


图5 实时荧光定量 PCR 法检测各组 hRVECs 中整合素和 VEGF mRNA 表达的量化比较 A: 各组细胞中整合素 mRNA 相对表达水平的量化比较 $F=3.077, P=0.091$. 与正常对照组比较, $^a P<0.05$ (单因素方差分析, Dunnett t 检验, $n=3$) B: 各组细胞中 VEGF mRNA 相对表达水平的量化比较 $F=22.915, P=0.000$. 与正常对照组比较, $^a P<0.05$ (单因素方差分析, Dunnett t 检验, $n=3$) VEGF: 血管内皮生长因子 1: 正常对照组 2: 10 ng/ml rhPDGF-BB 组 3: 50 ng/ml rhPDGF-BB 组 4: 200 ng/ml rhPDGF-BB 组

3 讨论

视网膜新生血管的形成是增生性糖尿病视网膜病变、缺血性视网膜静脉阻塞、早产儿视网膜病变、Eales 病等多种视网膜疾病的共同病理机制。病理性新生血管属于畸形血管,常导致视网膜出血而引起视力损害,因此如何有效地抑制视网膜新生血管形成是目前的研究热点。

PDGF 是一种肽类生长因子, rhPDGF-BB 是其中一个重要的亚型。早期研究证实, rhPDGF-BB 促进肿瘤血管的形成及生长^[8-11], 之后的研究发现其在眼部新生血管的形成中也发挥一定的作用^[12-15]。后续的临床检测中发现, 年龄相关性黄斑变性患者比非增生期糖尿病患者及正常人血浆中 rhPDGF-BB 含量明显增加, 增生期糖尿病视网膜病变和中心性视网膜静脉阻塞患者房水中 rhPDGF-BB 含量明显增加^[16-17]。以上研究均提示 rhPDGF-BB 可能参与视网膜新生血管的发生, hRVECs 是新生血管形成的主要靶细胞^[18], 本研究以 hRVECs 为研究对象, 用不同质量浓度的 rhPDGF-BB 进行干预, 探讨不同剂量 rhPDGF-BB 对 hRVECs 功能的影响及其作用机制。

本研究发现 hRVECs 表面表达 rhPDGF-BBR, 为后续实验用 rhPDGF-BB 蛋白干预 hRVECs 奠定了基础。细胞划痕法及 CCK8 法检测发现, rhPDGF-BB 可以明显促进 hRVECs 的迁移和增生能力, 且 rhPDGF-BB 的这种作用呈剂量依赖性, 与以往报道的 rhPDGF-BB 能诱导血管内皮细胞的增生、迁移及管腔样结构形成的结果一致^[2-3], 血管内皮细胞的迁移和增生能力越强, 其成管能力越强, 对新生血管的形成越有利, 因此血管内皮细胞的迁移和增生能力常作为评价新生血管形成能力的指标。

以往研究发现, PDGF 可以促进细胞中 VEGF 和整合素的表达^[19-20], 为进一步探讨其中的机制, 本研究通过实时荧光定量 PCR 法检测了 rhPDGF-BB 干预

下 hRVECs 中整合素和 VEGF mRNA 的表达变化, 结果显示 rhPDGF-BB 干预后, hRVECs 中整合素和 VEGF 表达上调。VEGF 是重要的促血管生成因子, 其表达水平与 hRVECs 的迁移和增生密切相关^[21]。整合素在视网膜新生血管的形成中也是重要的维持因素之一, 整合素活化后可增加对细胞外基质的亲和力, 向细胞内传递信息, 进而产生导致细胞骨架重排, 启动细胞迁移, 促进细胞存活和生长分化的长期效应。在视网膜疾病中, 有研究发现整合素抑制剂可抑制促血管生成因子诱导的血管内皮细胞的迁移、黏附和增生, 降低鼠视网膜病理性新生血管的形成, 而对正常血管无影响^[22-23]。因此, 整合素和 VEGF 表达水平的改变可能是 hRVECs 功能发生改变的分子学依据。综上所述, PDGF-BB 蛋白与 hRVECs 表面的 rhPDGF-BBR 结合后可上调整合素和 VEGF 的表达, 进而增强 hRVECs 的迁移和增生的能力。

目前, 临床上对视网膜新生血管的治疗主要为应用抗 VEGF 药物, 该治疗方式虽然已经取得了良好的效果, 但仍有很大的研究空间。关于肿瘤治疗的临床前试验发现, 抗 PDGF 与抗 VEGF 联合使用拮抗肿瘤新生血管的效果优于单独使用抗 VEGF 药物, 并能减少不良反应的发生^[24]。本研究结果可为临床上应用抗 PDGF 药物治疗视网膜新生血管性疾病的研究提供依据。

参考文献

- [1] Rezzola S, Paganini G, Semeraro F, et al. Zebrafish (Danio rerio) embryo as a platform for the identification of novel angiogenesis inhibitors of retinal vascular diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(7): 1291-1296. DOI: 10.1016/j.bbdis.2016.04.009.
- [2] Bategay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, et al. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis *in vitro* via PDGF beta-receptors[J]. J Cell Biol, 1994, 125(4): 917-928.
- [3] Sano H, Ueda Y, Takakura N, et al. Blockade of platelet-derived growth factor receptor-beta pathway induces apoptosis of vascular endothelial cells and disrupts glomerular capillary formation in neonatal mice[J]. Am J Pathol, 2002, 161(1): 135-143.
- [4] Betsholtz C, Lindblom P, Bjarnegard M, et al. Role of platelet-derived growth factor in mesangium development and vasculopathies: lessons from platelet-derived growth factor and platelet-derived growth factor receptor mutations in mice[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2004, 13(1): 45-52.
- [5] Kitadai Y, Sasaki T, Kuwai T, et al. Targeting the expression of platelet-derived growth factor receptor by reactive stroma inhibits growth and metastasis of human colon carcinoma[J]. Am J Pathol, 2006, 169(6): 2054-2065.
- [6] Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors[J]. J Clin Invest, 2003, 112(8): 1142-1151.
- [7] 张文朋, 刘高勤, 李龙标, 等. 外源性小鼠干扰素诱导蛋白-10 抑制实验性角膜新生血管的作用机制[J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(4): 302-305. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.04.005. Zhang WP, Liu GQ, Li LB, et al. Inhibition of experimental corneal neovascularization by exogenous mouse interferon-inducible protein-10 [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2012, 30(4): 302-305. DOI: 10.3760/

- cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 04. 005.
- [8] Cao R, Bråkenhielm E, Pawliuk R, et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2[J]. Nat Med, 2003, 9(5): 604-613.
- [9] Li X, Eriksson U. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(2): 91-98.
- [10] Ostman A. PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(4): 275-286.
- [11] Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family[J]. FEBS J, 2005, 272(22): 5723-5741.
- [12] Dell S, Peters S, Mütter P, et al. The role of PDGF receptor inhibitors and PI3-kinase signaling in the pathogenesis of corneal neovascularization[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(5): 1928-1937.
- [13] Robbins SG, Mixon RN, Wilson DJ, et al. Platelet-derived growth factor ligands and receptors immunolocalized in proliferative retinal diseases[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(10): 3649-3663.
- [14] Betsholtz C. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(4): 215-228.
- [15] Dong A, Seidel C, Snell D, et al. Antagonism of PDGF-BB suppresses subretinal neovascularization and enhances the effects of blocking VEGF-A[J]. Angiogenesis, 2014, 17(3): 553-562. DOI: 10.1007/s10456-013-9402-5.
- [16] Suzuki Y, Nakazawa M, Suzuki K, et al. Expression profiles of cytokines and chemokines in vitreous fluid in diabetic retinopathy and central retinal vein occlusion[J]. Jpn J Ophthalmol, 2011, 55(3): 256-263. DOI: 10.1007/s10384-011-0004-8.
- [17] Zehetner C, Kirchmair R, Neururer SB, et al. Systemic upregulation of PDGF-B in patients with neovascular AMD[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(1): 337-344. DOI: 10.1167/iovs.13-12978.
- [18] 底煜, 张铁欧, 王爱媛, 等. CCN1 siRNA 对视网膜血管内皮细胞活性的抑制及其机制[J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(1): 24-29. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 01. 005.
- Di Y, Zhang YO, Wang AY, et al. Inhibition of CCN1 siRNA on retinal endothelial cells[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(01): 24-29. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 01. 005.
- [19] Chang HJ, Park JS, Kim MH, et al. Extracellular signal-regulated kinases and AP-1 mediate the up-regulation of vascular endothelial growth factor by PDGF in human vascular smooth muscle cells[J]. Int J Oncol, 2006, 28(1): 135-141.
- [20] Schneller M, Vuori K, Ruoslahti E. Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF[J]. EMBO J, 1997, 16(18): 5600-5607.
- [21] 李钰洁, 侯旭, 胡丹. 新生血管性青光眼患者房水中血小板源性生长因子-C 和血管内皮生长因子水平的测定和分析[J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(7): 619-623. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 07. 010.
- Li YJ, Hou X, Hu D. Detection and analysis of platelet-derived growth factor-c and vascular endothelial growth factor in ocular aqueous humor with neovascular glaucoma[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(7): 619-623. DOI: 10.3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2016. 07. 010.
- [22] Santulli RJ, Kinney WA, Ghosh S, et al. Studies with an orally bioavailable alpha V integrin antagonist in animal models of ocular vasculopathy: retinal neovascularization in mice and retinal vascular permeability in diabetic rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 324(3): 894-901. DOI: 10.1124/jpet.107.131656.
- [23] Wilkinson-Berka JL, Jones D, Taylor G, et al. SB-267268, a nonpeptidic antagonist of alpha (v) beta3 and alpha (v) beta5 integrins, reduces angiogenesis and VEGF expression in a mouse model of retinopathy of prematurity[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(4): 1600-1605.
- [24] Mabry R, Gilbertson DG, Frank A, et al. A dual-targeting PDGFRbeta/VEGF-A molecule assembled from stable antibody fragments demonstrates anti-angiogenic activity *in vitro* and *in vivo*[J]. MAbs, 2010, 2(1): 20-34.

(收稿日期: 2016-06-11)

(本文编辑: 尹卫靖)

读者·作者·编者

欢迎订阅《中华实验眼科杂志》

《中华实验眼科杂志》为中国科技论文统计源期刊、中国中文核心期刊,月刊,80面,每月10日出版,每期定价16元,邮发代号:36-13,国内外公开发行,欢迎到各地邮局或直接与本刊编辑部联系订阅。联系电话:0371-65580157。

本刊对医学研究中知情同意和医学伦理学描述的要求

根据国际医学期刊编辑委员会提供的“生物医学期刊投稿统一要求”的表述,本刊对作者撰写稿件时关于“知情同意”和“医学伦理学”的描述提出如下要求:

(1) 知情同意 在未事先获得知情同意的情况下,患者有隐私不被侵犯的权力。患者的身份信息,包括姓名、来源、住院号等均不应该以文字、图片或家系信息的方式在出版物上公开,除非这些信息对于本研究是必需的,如需在出版物上显示,应征得患者(或者父母、监护人)签署的书面同意书。

发表的文章中应该省略不必要的患者个人信息,但难以做到完全匿名时(如在照片中掩盖患者的眼部,不足以保护患者的隐私权),应提供知情同意的信息。如果用改变患者的身份特征(如遗传家系等)以保护患者隐私权的方法,作者应该确保这些改变不影响研究的科学性,并且编辑应在文中对此予以说明。

(2) 医学伦理学 以人体为实验对象的研究,作者应该提及试验步骤是否符合相应的负责机构、国家委员会或1975年赫尔辛基宣言(2005年修订)的医学伦理学标准。如果研究过程对是否符合赫尔辛基宣言有疑问或存在一定的问题,作者应当做出客观说明并解释研究的合理性,提交已通过审查机构的批准情况。以动物为实验对象的研究,作者应当说明是否遵循当地的相关机构、学会(国内或国外)及国家实验动物保护和和使用指南。

(本刊编辑部)