

α -黑素细胞刺激素抑制氧诱导视网膜病变小鼠视网膜新生血管的生成

杨千惠 张琰 薄其玉 曹云山 杨伟 王飞 李筱荣

300384 天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼科研究所 天津医科大学眼视光学院(杨千惠、张琰、薄其玉、杨伟、王飞、李筱荣);730000 兰州,甘肃省人民医院眼科(曹云山)

通信作者:张琰,Email:yanzhang04@tmu.edu.cn;李筱荣,Email:xli@tmu.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.12.004

【摘要】 背景 视网膜新生血管形成(RNV)可发生于多种眼病,导致视网膜出血甚至脱离,抑制病理性RNV已逐渐成为眼科疾病治疗中的重点。 α -黑素细胞刺激素(α -MSH)对视网膜发育过程中的生理性血管生成有抑制作用,但其在病理性RNV方面的作用尚未见报道。目的 以氧诱导视网膜病变(OIR)小鼠为模型,研究玻璃体腔注射不同质量浓度的 α -MSH对病理性RNV的作用。方法 选取健康清洁级7日龄C57BL/6J幼鼠40只,应用随机数字表法随机分为OIR+0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH组、OIR+1.67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH组、OIR+3.30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH组、OIR组和正常对照组,每组8只。不同剂量 α -MSH干预组和OIR组幼鼠在氧体积分数(75±2)%的高氧环境下饲养5 d,然后在普通空气环境中饲养5 d,正常对照组幼鼠则在普通空气环境中饲养10 d。各组取17日龄鼠,球后静脉注射高相对分子质量异硫氰酸葡聚糖(FITC-dextran),制备视网膜铺片,观察视网膜的血管形态,计算无灌注区面积相对于整个视网膜的面积。对小鼠眼球行石蜡切片和苏木精-伊红染色,计数突破内界膜突入玻璃体腔的血管内皮细胞核数。结果 视网膜铺片结果显示,正常对照组、OIR组、OIR+0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH组、OIR+1.67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH组和OIR+3.30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH组视网膜无灌注区相对面积分别为(0.00±0.00)%、(23.01±3.39)%、(18.14±7.20)%、(15.64±7.07)%和(7.62±6.52)%,各组间视网膜无灌注区相对面积总体比较,差异有统计学意义($F=19.635, P<0.05$);其中OIR组无灌注区相对面积显著高于OIR+3.30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH组,差异有统计学意义($t=4.293, P<0.01$)。组织病理学检查结果显示,正常对照组、OIR组、OIR+0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH组、OIR+1.67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH组和OIR+3.30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH组突入玻璃体腔的血管内皮细胞核数分别为(0.00±0.00)、(11.45±4.26)、(6.35±2.34)、(4.96±1.79)和(1.03±1.25)个。各组突入玻璃体腔的新生血管内皮细胞核数总体比较,差异有统计学意义($F=147.87, P<0.05$);其中OIR组突入玻璃体腔新生血管内皮细胞核数显著高于OIR+0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH组、OIR+1.67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH组和OIR+3.30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH组,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)。结论 α -MSH可减少OIR小鼠模型视网膜中无灌注区的相对面积和视网膜新生血管核数,其对病理性RNV的抑制作用呈剂量依赖性。

【关键词】 氧诱导视网膜病变; 视网膜新生血管; α -黑素细胞刺激素

基金项目:教育部博士点基金(20121202120005);教育部留学回国基金(第45批)

α -Melanocyte-stimulating hormone inhibits retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy Yang Qianhui, Zhang Yan, Bo Qiyu, Cao Yunshan, Yang Wei, Wang Fei, Li Xiaorong

Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin Medical University Eye Institute, College of Optometry and Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300384, China (Yang QH, Zhang Y, Bo QY, Yang W, Wang F, Li XR); Department of Ophthalmology, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, China (Cao YS)

Corresponding author: Zhang Yan, Email:yanzhang04@tmu.edu.cn; Li Xiaorong, Email:xli@tmu.edu.cn

【Abstract】 **Background** Retinal neovascularization (RNV) occurs in multiple eye diseases, which can lead to bleeding and retinal detachment. Therefore, inhibition of pathological RNV is becoming crucial to the treatment of ocular diseases. Research has shown that α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) inhibits retinal angiogenesis during physiological development; however, the effects of α -MSH on pathological RNV remain unknown. **Objective** This study was to investigate the effects of intravitreal injection of α -MSH at different concentrations on pathological RNV in a mouse model of oxygen-induced retinopathy (OIR). **Methods** Forty healthy clean C57BL/6J mice were randomly divided into OIR+0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH, OIR+1.67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH, OIR+3.30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH, OIR, and normal control groups at postnatal day 7 (P7), with 8 pups in each group. The α -MSH intervention groups and OIR

group were exposed to high oxygen (75 ± 2)% for 5 days, then maintained under normal air condition for another 5 days; whereas the normal control group was raised under normoxia for 10 days. Retro-orbital injection of high molecular weight fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) was performed on P17 mice. The retina whole mounts were prepared to reveal retinal vasculature and quantify relative area of vessel obliteration. The mouse eyeballs were subjected to paraffin sections and hematoxylin-eosin staining, and the average number of pre-retinal nuclei per section was quantified. **Results** FITC-dextran labeled retinal whole mounts showed that the relative vessel obliteration area in normal control, OIR, OIR+0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH, OIR+1.67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH, and OIR+3.30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH groups were $(0.00 \pm 0.00)\%$, $(23.01 \pm 3.39)\%$, $(18.14 \pm 7.20)\%$, $(15.64 \pm 7.07)\%$, and $(7.62 \pm 6.52)\%$, respectively. There was a statistical significance in the relative avascular area among the groups ($F = 19.635$, $P < 0.05$). The relative avascular area in the OIR group was significantly higher than that in the OIR+3.30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH group ($t = 4.293$, $P < 0.01$). The results of histopathological examinations showed that the average number of pre-retinal nuclei per section in normal control, OIR, OIR+0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH, OIR+1.67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH, and OIR+3.30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH groups were 0.00 ± 0.00 , 11.45 ± 4.26 , 6.35 ± 2.34 , 4.96 ± 1.79 and 1.03 ± 1.25 , respectively. There was a statistical significance in the average number of pre-retinal nuclei per section among the groups ($F = 147.87$, $P < 0.05$). The average number of pre-retinal nuclei per section in the OIR group was significantly higher than that in the OIR+0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH, OIR+1.67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH, and OIR+3.30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH groups, the differences between the groups had statistical significances (all at $P < 0.001$). **Conclusions** α -MSH reduces the relative area of vessel obliteration and the average number of pre-retinal nuclei in the retinas of OIR mouse model. The inhibitory effects of α -MSH on the pathological RNV are dose-dependent.

[Key words] Oxygen-induced retinopathy; Retinal neovascularization; α -Melanocyte-stimulating hormone

Fund program: Ph. D. Programs Foundation of Ministry of Education of China (20121202120005); The 45th Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry

视网膜新生血管形成 (retinal neovascularization, RNV) 是由于视网膜缺血、缺氧引起的血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等促血管生成因子与血管生成抑制因子之间平衡失调所致^[1]。RNV 可发生于糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变以及年龄相关性黄斑变性等多种视网膜疾病^[1]。抗 VEGF 药物已逐渐成为治疗 RNV 的一线药物^[2-5], 但玻璃体腔注射抗 VEGF 药物尚存在一定的不足, 如可能出现眼内炎和眼内出血等并发症, 以及因长期拮抗 VEGF 而引起的脉络膜毛细血管和光感受器细胞的超微结构异常^[4]。另外, 临床上有一部分患者对抗 VEGF 药物不敏感^[6-7]。因此, 有必要研究并开发 VEGF 以外的、高效、毒性和不良反应少的针对 RNV 的干预手段。 α -黑素细胞刺激素 (α -melanocyte-stimulating hormone, α -MSH) 是阿片-促黑皮质素原 (pro-opiomelanocortin, POMC) 的蛋白水解产物^[8]。 α -MSH 在体内分布广泛, 主要由下丘脑、皮肤及视网膜产生^[9-11]。 α -MSH 在脑部与瘦素一起调控能量代谢^[12-13]; 在皮肤中影响色素产生和色素细胞分化^[14-15]; 在眼部维持免疫豁免, 在自身免疫性葡萄膜炎小鼠模型中抑制炎症, 在糖尿病大鼠视网膜中拮抗凋亡和氧化应激, 并抑制微血管渗漏^[16-18]。另有文献表明, α -MSH 可抑制斑马鱼和鸡胚生理性新生血管发育^[19]。而在黑色素瘤荷瘤小鼠中, α -MSH 可促进黑

色素细胞分化并抑制肿瘤新生血管生成^[20]。目前, α -MSH 对病理性 RNV 的作用尚未见报道。本研究中拟建立氧诱导视网膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 小鼠模型, 研究 α -MSH 对 OIR 模型中 RNV 的抑制作用, 为进一步研究以 α -MSH 为导向的新型 RNV 干预手段奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取 40 只健康清洁级 7 日龄 C57BL/6J 幼鼠及相应母鼠 (许可证号: SYXK2009-0001, 购自解放军军事医学科学院实验动物中心), 按随机数字表法将幼鼠分为 OIR+0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH 组、OIR+1.67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH 组、OIR+3.30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -MSH 组、OIR 组和正常对照组, 每组 8 只。实验动物的使用遵循天津医科大学及 ARVO 有关眼科与视觉科学研究中动物使用的相关规定。

1.1.2 主要试剂及仪器 高相对分子质量 (平均相对分子质量为 2 000 000) 异硫氰酸葡聚糖 (fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-dextran) (美国 Sigma 公司); 抗淬灭封片剂 (美国 Vectashield 公司)。CY-12C 数字测氧仪 (浙江省建德市梅城电化分析仪器厂); 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 OIR 小鼠模型的建立 OIR+0.33 μg/μl α-MSH 组、OIR + 1.67 μg/μl α-MSH 组、OIR + 3.30 μg/μl α-MSH 组、OIR 组幼鼠在通入体积分数(75±2)%氧气的密闭玻璃容器中饲养,并用 CY-12C 数字测氧仪每 4 h 监测出气口的氧体积分数,每日打开密闭容器 1 次,更换鼠粮、垫料和水,并轮换母鼠;幼鼠在高氧环境中饲养 5 d 后,再于普通空气环境中饲养 5 d。正常对照组幼鼠则在普通空气环境中饲养 10 d。

1.2.2 玻璃体腔注射 α-MSH 用 33G 针头连接 10 μl 微量注射器,于幼鼠高氧饲养结束时在角膜缘后 2 mm 处以 45°进针,缓慢将 3 μl 质量浓度分别为 0.33、1.67 和 3.30 μg/μl 的 α-MSH 溶液注入 OIR+0.33 μg/μl α-MSH 组、OIR+1.67 μg/μl α-MSH 组、OIR+3.30 μg/μl α-MSH 组小鼠的双眼玻璃体腔。注射完毕,静置 15 s 后缓慢撤针。OIR 组和正常对照组幼鼠同法注射等容积生理盐水。

1.2.3 各组小鼠荧光素眼底血管造影 根据文献 [21] 的方法,将高相对分子质量 FITC-dextran 粉末溶于去离子水中,制成质量浓度 50 mg/ml 的 FITC-dextran 溶液。分别取各组 17 日龄小鼠 8 只,左手抓住幼鼠头颈部皮肤,轻压眼眶使眼球突出,然后将按照小鼠眼球形状弯成弧形的 1 ml 注射器针头刺入右眼内眦 Tenon 筋膜,到达球后静脉丛后,缓慢注入 50 μl FITC-dextran 溶液。静置数秒后缓慢撤针,待 FITC-dextran 循环 5 min 后,颈椎脱臼法处死小鼠,取小鼠眼球在质量分数 4% 多聚甲醛中固定 40 min。手术显微镜下剥离视网膜,以视盘为中心将视网膜剪成 4 瓣,用含 DAPI 的抗淬灭封片剂封片。在荧光显微镜下观察并照相。并用 CellSens Standard 软件(日本 Olympus 公司)测量无灌注区占全视网膜的相对面积。

1.2.4 各组眼球组织常规组织病理学检查 取各组 8 只 17 日龄幼鼠眼球,制成蜡块,并行 3 μm 厚矢状位石蜡切片,相邻 2 张切片间隔 40 μm,每只眼球连续取 10 张切片,行苏木精-伊红染色,排除含视神经的切片,计数平均每张切片中突破内界膜并且突入玻璃体腔的新生血管内皮细胞核数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件(IBM SPSS Statistics, USA) 进行统计分析。各组量化的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。经 Levene 检验证实方差齐。各组视网膜无灌注区相对面积及突入玻璃体腔的新生血管内皮细胞核数的总体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Scheffé 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠荧光素眼底血管造影及视网膜无灌注区相对面积比较

正常对照组的视网膜血管呈均匀网状结构分布,视网膜中央未见无灌注区;OIR 组视网膜中央可见大片无灌注区,在无灌注区和灌注区的交界处可见大量新生血管芽(图 1)。定量分析结果显示,正常对照组、OIR 组、OIR+0.33 μg/μl α-MSH 组、OIR+1.67 μg/μl α-MSH 组和 OIR+3.30 μg/μl α-MSH 组视网膜无灌注区相对面积分别为 (0.00±0.00)%、(23.01±3.39)%、(18.14±7.20)%、(15.64±7.07)% 和 (7.62±6.52)%, 各组间视网膜无灌注区相对面积总体比较,差异有统计学意义 ($F=19.635, P<0.05$);其中 OIR 组无灌注区相对面积显著高于 OIR+3.30 μg/μl α-MSH 组,差异有统计学意义 ($t=4.293, P<0.01$) (图 2)。

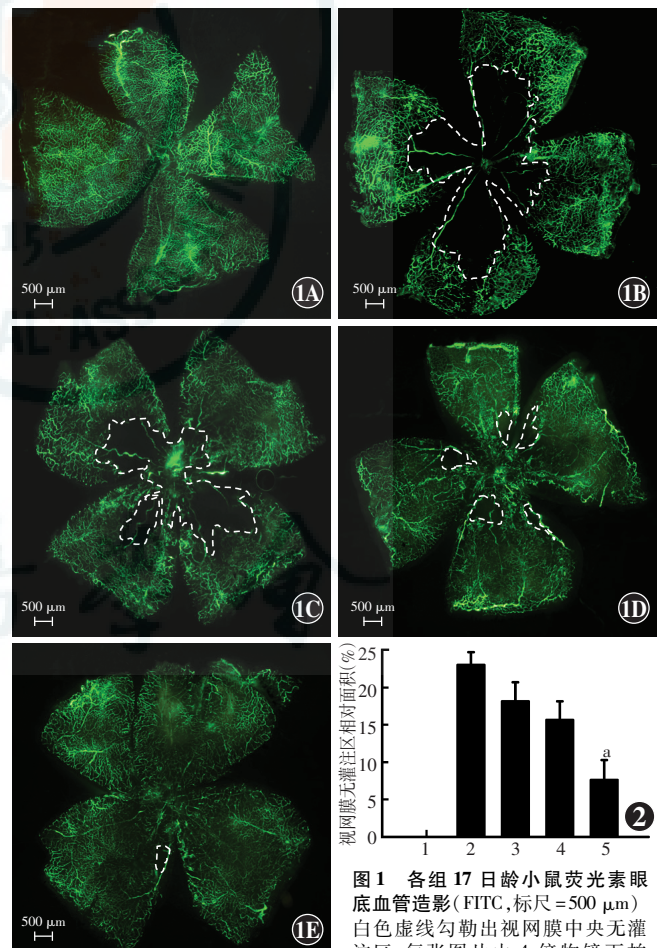


图 1 各组 17 日龄小鼠荧光素眼底血管造影(FITC, 标尺=500 μm) 白色虚线勾勒出视网膜中央无灌注区,每张图片由 4 倍物镜下拍摄的 9 张图片拼接而成 A:正常对照组视网膜血管正常 B:OIR 组可见较大面积无灌注区 C:OIR+0.33 μg/μl α-MSH 组无灌注区面积小于 OIR D:OIR+1.67 μg/μl α-MSH 组无灌注区面积明显缩小 E: OIR+3.30 μg/μl α-MSH 组视网膜接近正常 **图 2** 各组视网膜无灌注区相对面积比较 (n=8) $F=19.635, P<0.05$ 。与 OIR 组比较, ^a $P<0.01$, ^b $P<0.001$ (单因素方差分析, Scheffé 检验) 1. 正常对照组 2: OIR 组 3: OIR + 0.33 μg/μl α-MSH 组 4: OIR + 1.67 μg/μl α-MSH 组 5: OIR+3.30 μg/μl α-MSH 组

2.2 各组小鼠视网膜组织病理学表现及突入玻璃体腔血管内皮细胞核数比较

视网膜石蜡切片的苏木精-伊红染色结果显示,正常对照组的内界膜结构平滑完整,视网膜血管细胞结构整齐,未见突入玻璃体腔的视网膜血管。OIR 组内界膜形态不规则,内界膜下细胞增生明显,排列紊乱,可见大量突入玻璃体腔的新生血管管腔,平均每张切片突入玻璃体腔的血管内皮细胞核数为(11.45±4.26)个。OIR+0.33 μg/μl α-MSH 组、OIR+1.67 μg/μl α-MSH 组和 OIR+3.30 μg/μl α-MSH 组均可见突入玻璃体腔的新生血管,突入玻璃体腔的血管内皮细胞核数分别为(6.35±2.34)、(4.96±1.79)和(1.03±1.25)个,新生血管内皮细胞核数随着 α-MSH 剂量的增加而呈减少趋势。各组突入玻璃体腔的新生血管内皮细胞核数总体比较,差异有统计学意义($F = 147.87$, $P < 0.05$);其中 OIR 组突入玻璃体腔的新生血管内皮细胞核数显著高于 OIR+0.33 μg/μl α-MSH 组、OIR+1.67 μg/μl α-MSH 组和 OIR+3.30 μg/μl α-MSH 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$) (图 3, 4)。

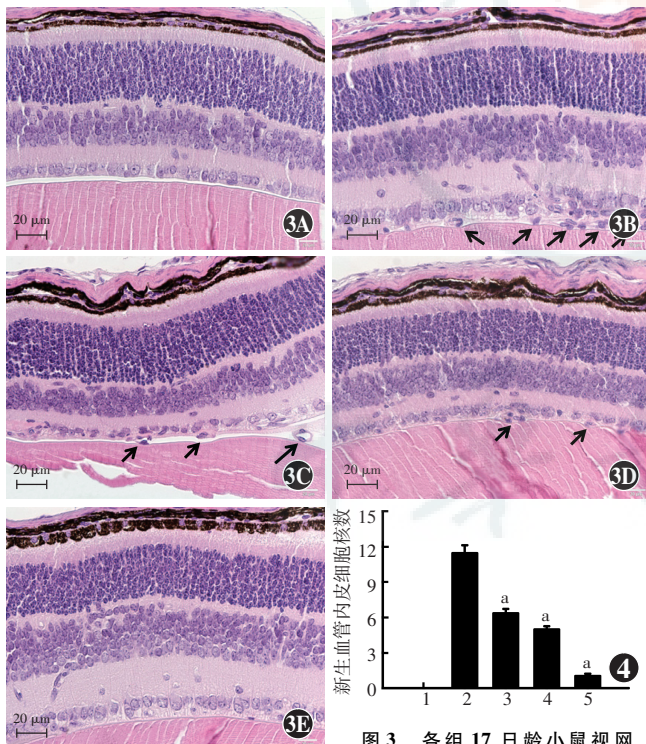


图 3 各组 17 日龄小鼠视网膜

膜切片组织病理学表现(HE, 标尺=20 μm) A: 正常对照组未见突入玻璃体腔的新生血管 B: OIR 组可见大量突破内界膜, 突向玻璃体腔的新生血管(箭头) C: OIR+0.33 μg/μl α-MSH 组可见突破内界膜的新生血管(箭头) D: OIR+1.67 μg/μl α-MSH 组可见突破内界膜的新生血管较少(箭头) E: OIR+3.30 μg/μl α-MSH 组视网膜未见新生血管 图 4 各组突入玻璃体腔的新生血管内皮细胞核数比较($n=8$) $F = 147.87$, $P < 0.05$. 与 OIR 组比较, $^*P < 0.001$ (单因素方差分析, Scheffé 检验) 1: 正常对照组 2: OIR 组 3: OIR+0.33 μg/μl α-MSH 组 4: OIR+1.67 μg/μl α-MSH 组 5: OIR+3.30 μg/μl α-MSH 组

3 讨论

由于视网膜新生血管的通透性高,可引起出血,进而引起结缔组织的增生、牵拉以及视网膜脱离,因此研制针对 RNV 的新型、有效干预手段对防盲、治盲工作的意义重大。

本研究中证明了 α-MSH 对 OIR 小鼠病理性 RNV 的抑制作用。不同质量浓度 α-MSH 干预组视网膜无灌注区的相对面积明显小于 OIR 组,而且视网膜无灌注区的相对面积随 α-MSH 的剂量升高而呈下降趋势。小鼠眼球组织病理学结果显示,不同质量浓度 α-MSH 干预组中突破内界膜进入玻璃体腔的新生血管内皮细胞核数显著低于 OIR 组,且数量随 α-MSH 质量浓度的上升而呈降低趋势。这些研究结果提示,α-MSH 对于高氧诱导的 RNV 的抑制作用呈剂量依赖性。

有研究表明,在大鼠主动脉环体外培养物实验中,α-MSH 可抑制微血管的生长;在斑马鱼体内模型中,α-MSH 对血管内皮细胞基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 分泌的抑制作用呈剂量依赖性;α-MSH 对体外培养的人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 的增生影响很小,主要抑制 HUVECs 分泌 MMP-2、移行和管腔形成^[19]。这些结果提示 α-MSH 细胞毒性极低,并可抑制生理状态下的新生血管生成;而本研究结果证实 α-MSH 对病理性新生血管生成也存在抑制作用。

本研究证明了 α-MSH 对 OIR 小鼠 RNV 的抑制作用,但其作用的分子机制还有待进一步研究。近年研究发现,α-MSH 可抑制血管内皮细胞中转录因子核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 的活性,而 NF-κB 又可分别在视网膜色素上皮细胞和血管内皮细胞中直接调控 VEGF 和 VEGF 受体 2 的表达^[22-25]。另一方面,α-MSH 还在 HUVECs 中通过抑制磷脂酰肌醇(-3)激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/Akt 通路的活性来降调节 VEGF 和 VEGF 受体 2 的表达^[19]。我们在今后的研究中,将从 NF-κB 通路和 PI3K/Akt 通路探索 α-MSH 在 OIR 模型中对病理性新生血管的作用机制,为 α-MSH 干预和治疗 RNV 提供理论依据。

综上所述,本研究证实 α-MSH 可在 OIR 小鼠模型中呈剂量依赖性地抑制病理性 RNV,为进一步研制针对 RNV 的新型、有效的干预手段提供了实验基础。

参考文献

- [1] 薄其玉,张琰,吴玉伟,等. 血小板源性生长因子家族在新生血管性眼病中作用的研究进展[J]. 中华眼科杂志, 2014, 50(6): 471-475.

- DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2014.06.26.
Bo QY, Zhang Y, Wu YW, et al. Research advances of platelet derived growth factor family and its significance in neovascular eye diseases[J]. Chin J Ophthalmol, 2014, 50 (6) : 471-475. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2014.06.26.
- [2] Mititelu M, Chaudhary KM, Lieberman RM. An evidence-based meta-analysis of vascular endothelial growth factor inhibition in pediatric retinal diseases: part 1. Retinopathy of prematurity [J]. J Pediatr Ophthalmol Strabismus, 2012, 49 (6) : 332-340. DOI: 10.3928/01913913-20120821-03.
- [3] Sivaprasad S. Role of pegaptanib sodium in the treatment of neovascular age-related macular degeneration [J]. Clin Ophthalmol, 2008, 2 (2) : 339-346.
- [4] Zhang Y, Han Q, Ru Y, et al. Anti-VEGF treatment for myopic choroid neovascularization: from molecular characterization to update on clinical application [J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9 : 3413-3421. DOI: 10.2147/DDDT.S87920.
- [5] Agarwal A, Sarwar S, Sepah YJ, et al. What have we learnt about the management of diabetic macular edema in the antivascular endothelial growth factor and corticosteroid era? [J]. Curr Opin Ophthalmol, 2015, 26 (3) : 177-183. DOI: 10.1097/ICU.000000000000152.
- [6] Broadhead GK, Hong T, Chang AA. Treating the untreatable patient: current options for the management of treatment-resistant neovascular age-related macular degeneration [J]. Acta Ophthalmol, 2014, 92 (8) : 713-723. DOI: 10.1111/aos.12463.
- [7] Byon IS, Kwon HJ, Kim SI, et al. Reduced-fluence photodynamic therapy in polypoidal choroidal vasculopathy nonresponsive to ranibizumab [J]. Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina, 2014, 45 (6) : 534-541. DOI: 10.3928/23258160-20141118-08.
- [8] Brzoska T, Luger TA, Maaser C, et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects *in vitro* and *in vivo*, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases [J]. Endocr Rev, 2008, 29 (5) : 581-602. DOI: 10.1210/er.2007-0027.
- [9] Cyr NE, Steger JS, Toorie AM, et al. Central Sirt1 regulates body weight and energy expenditure along with the POMC-derived peptide α -MSH and the processing enzyme CPE production in diet-induced obese male rats [J]. Endocrinology, 2015, 156 (3) : 961-974. DOI: 10.1210/en.2014-1970.
- [10] Oh CT, Lee D, Koo K, et al. Superoxide dismutase 1 inhibits alpha-melanocyte stimulating hormone and ultraviolet B-induced melanogenesis in murine skin [J]. Ann Dermatol, 2014, 26 (6) : 681-687. DOI: 10.5021/ad.2014.26.6.681.
- [11] Dräger UC, Edwards DL, Kleinschmidt J. Neurofilaments contain alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH)-like immunoreactivity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983, 80 (20) : 6408-6412.
- [12] Nohara K, Zhang Y, Waraich RS, et al. Early-life exposure to testosterone programs the hypothalamic melanocortin system [J]. Endocrinology, 2011, 152 (4) : 1661-1669. DOI: 10.1210/en.2010-1288.
- [13] Zhang Y, Kerman IA, Laque A, et al. Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits [J]. J Neurosci, 2011, 31 (5) : 1873-1884. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3223-10.2011.
- [14] Song HS, Sim SS. Acteoside inhibits α -MSH-induced melanin production in B16 melanoma cells by inactivation of adenylyl cyclase [J]. J Pharm Pharmacol, 2009, 61 (10) : 1347-1351. DOI: 10.1211/jpp/61.10.0011.
- [15] Le PE, Passeron T, Giubellino A, et al. Microarray analysis sheds light on the dedifferentiating role of agouti signal protein in murine melanocytes via the Mc1r [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106 (6) : 1802-1807. DOI: 10.1073/pnas.0806753106.
- [16] Shiratori K, Ohgami K, Ilieva IB, et al. Inhibition of endotoxin-induced uveitis and potentiation of cyclooxygenase-2 protein expression by α -melanocyte-stimulating hormone [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45 (1) : 159-164.
- [17] Zhang L, Dong L, Liu X, et al. α -Melanocyte-stimulating hormone protects retinal vascular endothelial cells from oxidative stress and apoptosis in a rat model of diabetes [J/OL]. PLoS One, 2014, 9 (4) : e93433 [2015-08-03]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093433>. DOI: 10.1371/journal.pone.0093433.
- [18] 韩倩, 张琰, 薄其玉, 等. α -黑素细胞刺激素对早期糖尿病大鼠视网膜血管渗漏的保护作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33 (4) : 316-322. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.006.
Han Q, Zhang Y, Bo QY, et al. Alleviating effects of α -melanocyte-stimulating hormone on retinal vessel leakage in diabetic rats [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33 (4) : 316-322. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.006.
- [19] Weng WT, Huang SC, Ma YL, et al. α -Melanocyte-stimulating hormone inhibits angiogenesis through attenuation of VEGF/VEGFR2 signaling pathway [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840 (6) : 1850-1860. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.02.005.
- [20] Liu GS, Tsai HE, Weng WT, et al. Systemic pro-opiomelanocortin expression induces melanogenic differentiation and inhibits tumor angiogenesis in established mouse melanoma [J]. Hum Gene Ther, 2011, 22 (3) : 325-335. DOI: 10.1089/hum.2010.090.
- [21] Li S, Li T, Luo Y, et al. Retro-orbital injection of FITC-dextran is an effective and economical method for observing mouse retinal vessels [J]. Mol Vis, 2011, 17 : 3566-3573.
- [22] Campochiaro PA. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases [J]. Prog Retin Eye Res, 2015, 49 : 67-81. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.002.
- [23] Kalden DH, Scholzen T, Brzoska T, et al. Mechanisms of the antiinflammatory effects of α -MSH. Role of transcription factor NF-kappa B and adhesion molecule expression [J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 885 : 254-261.
- [24] Cervellati F, Cervellati C, Romani A, et al. Hypoxia induces cell damage via oxidative stress in retinal epithelial cells [J]. Free Radic Res, 2014, 48 (3) : 303-312. DOI: 10.3109/10715762.2013.867484.
- [25] Dong F, Zhou X, Li C, et al. Dihydroartemisinin targets VEGFR2 via the NF- κ B pathway in endothelial cells to inhibit angiogenesis [J]. Cancer Biol Ther, 2014, 15 (11) : 1479-1488. DOI: 10.4161/15384047.2014.955728.

(收稿日期:2016-06-23)

(本文编辑:刘艳 张宇)