

· 实验研究 ·

NADPH 氧化酶 4 抑制剂对缺氧诱导的人 RPE 细胞中 VEGF 表达的抑制作用

李静¹ 杨静² 康前雁²¹陕西省人民医院眼科, 西安 710068; ²西安交通大学第一附属医院眼科, 西安 710061

通信作者: 康前雁, Email: qianyankk@163.com

【摘要】 目的 观察还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶 4 (NOX4) 抑制剂对缺氧诱导的人视网膜色素上皮 (RPE) 细胞中血管内皮生长因子 (VEGF) 表达的影响。 **方法** 将 APRE-19 细胞分为 Avastin 干预组和 VAS2870 干预组, 并按照药物剂量不同将 Avastin 干预组亚分为常氧对照组、缺氧对照组及 0.25 mg/ml、0.50 mg/ml 和 0.75 mg/ml Avastin 干预组, 将 VAS2870 干预组亚分为 1 μ mol/ml、3 μ mol/ml 和 5 μ mol/ml VAS2870 干预组, 缺氧对照组采用终浓度为 300 μ mol/L CoCl₂ 处理 ARPE-19 细胞以建立细胞化学缺氧模型。采用细胞免疫荧光染色技术对不同干预组细胞中 NOX4 和 VEGF 表达进行测定和定位, 采用 Western blot 法对不同干预组细胞中 NOX4 和 VEGF 蛋白相对表达量进行测定和比较。 **结果** Western blot 法检测显示, 常氧对照组、缺氧对照组及 0.25 mg/ml、0.50 mg/ml 和 0.75 mg/ml Avastin 干预组 NOX4 蛋白相对表达量分别为 0.657 ± 0.153 、 1.000 ± 0.200 、 1.206 ± 0.300 、 1.260 ± 0.200 和 1.413 ± 0.273 , VEGF-A 蛋白相对表达量分别为 0.821 ± 0.110 、 1.210 ± 0.100 、 0.672 ± 0.100 、 0.340 ± 0.120 和 0.300 ± 0.130 , 组间总体比较差异均有统计学意义 ($F = 17.631, P < 0.001$; $F = 4.777, P = 0.020$), 其中 0.75 mg/ml Avastin 干预组细胞中 NOX4 蛋白表达量明显高于常氧对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 0.25、0.50 和 0.75 mg/ml Avastin 干预组 VEGF-A 表达量均明显低于缺氧对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。常氧对照组、缺氧对照组及 1 μ mol/ml、3 μ mol/ml 和 5 μ mol/ml VAS2870 干预组细胞中 NOX4 的蛋白相对表达量分别为 0.970 ± 0.120 、 1.060 ± 0.130 、 0.880 ± 0.130 、 0.567 ± 0.135 和 0.450 ± 0.120 , VEGF-A 蛋白相对表达量分别为 0.387 ± 0.135 、 0.627 ± 0.125 、 0.370 ± 0.140 、 0.363 ± 0.140 和 0.160 ± 0.100 , 组间总体比较差异均有统计学意义 ($F = 12.933, P < 0.001$; $F = 4.948, P < 0.05$), 其中 3 μ mol/ml 和 5 μ mol/ml VAS2870 干预组细胞中 NOX4 蛋白相对表达量明显低于缺氧对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$); 1 μ mol/ml、3 μ mol/ml 和 5 μ mol/ml VAS2870 干预组细胞中 VEGF-A 蛋白相对表达量明显低于缺氧对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。 **结论** NOX4 抑制剂可抑制人 RPE 细胞中 VEGF-A 表达。

【关键词】 缺氧; 视网膜色素上皮细胞, 人; 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶 4; 血管内皮生长因子; 抑制剂

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2018SF-155); 西安市科技计划项目 (2016051SF/YX07)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.01.002

Inhibitory effects of NADPH oxidase 4 inhibitor on VEGF expression in hypoxia-induced human RPE cells

Li Jing, Yang Jing, Kang Qianyan

Department of Ophthalmology, Shanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Corresponding author: Kang Qianyan, Email: qianyankk@163.com

【Abstract】 Objective To observe the inhibitory effects of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (NOX4) on vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in hypoxia-induced human retinal pigment epithelial cells. **Methods** The cultured APRE-19 cells were divided into Avastin group and VAS2870 group, and then the Avastin group was subdivided into the normoxic control group, hypoxia control group, 0.25 mg/ml Avastin intervention group, 0.50 mg/ml Avastin intervention group and 0.75 mg/ml Avastin intervention group, and the VAS2870 group was subdivided into 1 μ mol/ml VAS2870 intervention group, 3 μ mol/ml VAS2870 intervention group and 5 μ mol/ml VAS2870 intervention group. CoCl₂ of final concentration of 300 μ mol/L was added to the medium to establish the cytochemical hypoxia model. The expressions of NOX4 and VEGF in human retinal pigment epithelial cells were located and evaluated by immunofluorescence staining, and relative expressing levels of NOX4 and VEGF proteins were compared by Western blot assay. **Results** The relative expression of NOX4 was 0.657 ± 0.153 , 1.000 ± 0.200 , 1.206 ± 0.300 , 1.260 ± 0.200 and 1.413 ± 0.273 , and the relative expression of VEGF-A was 0.821 ± 0.110 , 1.210 ± 0.100 , 0.672 ± 0.100 , 0.340 ± 0.120 and 0.300 ± 0.130 in the normoxic control group, hypoxia control group, 0.25 mg/ml Avastin intervention group, 0.50 mg/ml Avastin intervention group and 0.75 mg/ml Avastin intervention group, respectively, with statistically significant differences among the groups ($F = 17.631, P <$

0.001; $F=4.777$, $P<0.05$). The relative expression of NOX4 protein in 0.75 mg/ml Avastin intervention group was significantly lower than that in normoxia control group ($P<0.001$). The relative expression of VEGF-A protein in the cells of the 0.25, 0.50 and 0.75 mg/ml Avastin intervention group was significantly lower than that in hypoxia control group ($P<0.05$). The expression of NOX4 protein in the cells was 0.970 ± 0.120 , 1.060 ± 0.130 , 0.880 ± 0.130 , 0.567 ± 0.135 and 0.450 ± 0.120 , and the relative expression of VEGF-A protein was 0.387 ± 0.135 , 0.627 ± 0.125 , 0.370 ± 0.140 , 0.363 ± 0.140 and 0.160 ± 0.100 in the normoxia control group, hypoxia control group, 1 $\mu\text{mol/ml}$ VAS2870 intervention group, 3 $\mu\text{mol/ml}$ VAS2870 intervention group and 5 $\mu\text{mol/ml}$ VAS2870 intervention group, respectively, with statistically significant differences among them ($F=12.933$, $P<0.001$; $F=4.948$, $P<0.05$). The relative expression of VEGF-A protein in the 1, 3 and 5 $\mu\text{mol/ml}$ VAS2870 intervention group was significantly lower than that in hypoxia control group ($P<0.05$). **Conclusions** NOX4 inhibitor can inhibit the expression of VEGF-A protein in hypoxia-induced human RPE cells by down-regulating the NOX4 level.

[Key words] Hypoxia; Retinal pigment epithelium, human; Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4; Vascular endothelial growth factor; Inhibitor

Fund program: Social Development of Shanxi Province (2018SF-155); Science&Technology Project for Social Development of Xi'an (2016051SF/YX07)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.01.002

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD)、病理性近视 (pathological myopia, PM) 的共同致病机制。研究发现, 抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 药物治疗可用于眼部新生血管的治疗, 但仍有约 30% 的患者疗效欠佳^[1-2], 若治疗不当则会导致视网膜机化膜收缩, 加重缺血, 或可造成牵拉性视网膜裂孔^[3-4]。还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶 4 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4, NOX4) 基因最初在肾脏内被发现, 作为一种非巨噬细胞型 NOX 表达于血管内皮和血管平滑肌等多种细胞内, 是血管系统活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的主要来源^[5-7]。缺氧情况下 ROS 的过量释放可导致血管内皮细胞功能障碍和凋亡, 从而加重缺血程度, 诱导血管生成^[8], VEGF 是缺氧诱导的新生血管生成的主要促进因子, 有研究证实, 在 rd 小鼠视网膜感光细胞变性过程中 NADPH 氧化酶生成 ROS 的活化反应明显增强, NADPH 氧化酶抑制剂香荚兰乙酮能够延缓 rd 小鼠感光细胞的凋亡过程^[9]。缺氧可诱导视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞中 NOX4 高表达, NOX4 高表达可能与 VEGF 促进新生血管有关, 推测下调 NOX4 表达可抑制缺氧诱导的人视网膜色素上皮细胞中 VEGF 表达, 进而抑制新生血管生成, 但相关假设有待验证。VAS2870 为 NOX4 抑制剂, 本研究拟明确 NOX4 抑制剂对 VEGF 促血管新生的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

RPE 细胞株 ARPE-19 (购自美国 ATCC 公司)。DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (fetal

bovine serum, FBS) (杭州四季青公司); CoCl₂ (C8661)、分析纯二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (美国 Sigma 公司); 兔单克隆 NOX4 抗体 (英国 abcam133303); 兔单克隆 VEGF-A 抗体 (英国 abcam46154); VAS2870 (英国 abcam145209); 山羊抗兔单克隆 IgG-HRP 抗体 (SAB #L3012)、Cy3 结合山羊抗兔 IgG 抗体 (北京康为世纪, CW0159); FITC 结合山羊抗兔 IgG 抗体 (北京康为世纪, CW0114)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 常规复苏 ARPE-19 细胞, 将细胞置于含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养液, 于 CO₂ 恒温培养箱中培养, 细胞融合至 80% 时进行传代, 取 3~6 代细胞用于实验。

1.2.2 实验分组 双蒸水将 CoCl₂ 粉末稀释配置成终浓度 300 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ 备用。将细胞接种至 6 孔板并分为 Avastin 干预组和 VAS2870 干预组, 根据药物剂量不同将 Avastin 干预组亚分为常氧对照组、缺氧对照组及 0.25 mg/ml、0.50 和 0.75 mg/ml Avastin 干预组; 将 VAS2870 干预组亚分为 1 $\mu\text{mol/ml}$ 、3 $\mu\text{mol/ml}$ 和 5 $\mu\text{mol/ml}$ VAS2870 干预组。常氧对照组采用含体积分数 10% FBS 的 DMEM 培养液培养, 缺氧对照组参照文献[10]的方法用终浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ 的 DMEM 培养液建立化学缺氧模型。各组细胞均培养 24 h。

1.2.3 细胞免疫荧光法检测 各组细胞中 NOX4 和 VEGF-A 表达 细胞接种至 12 孔板, 用 100 μl 预冷甲醇固定 30 min, 用质量分数 0.5% Triton X-100 透膜处理 30 min, 以质量分数 1% 牛血清蛋白 (bull serum albumin, BSA) 封闭 1 h。培养液中分别滴加 PBS 稀释的 NOX4 和 VEGF-A 一抗 (1:200), 孵育过夜; 滴相应二抗 (1:200), 孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次, 用含 DAPI 的抗淬灭封片剂封片, 倒置荧光显微镜下观察。利用

NIS-Elements D 3.2 显微照相系统进行拍照。实验重复 3 次。

1.2.4 Western blot 法检测各组细胞中 NOX4 和 VEGF-A 蛋白表达 取对数生长期细胞,根据分组用不同方法处理 24 h,收集细胞,加入 RIPA 裂解液常规提取细胞总蛋白,采用 BCA 法测定细胞总蛋白,配制 SDS-PAGE 凝胶。取适量样本加到上样孔进行电泳,湿转法转膜至 PVDF 膜。采用质量分数 5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h。分别滴加相应一抗 (1:1 000),4 ℃ 孵育过夜,洗膜;滴加相应二抗 (1:10 000),室温下孵育 4 h,洗膜。采用凝胶图像 Quantity One 分析软件分析特异条带灰度。以 β -actin 为内参。实验重复 3 次。目的蛋白相对表达量 = 目标蛋白条带灰度值/ β -actin 条带灰度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计分析。本研究测定指标中计量资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。采用均衡分组单因素干预多水平研究设计,不同干预组细胞中 NOX4 和 VEGF-A 蛋白相对表达量的总体差异比较采用单因素方差分析,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 不同干预组细胞中 NOX4 蛋白表达

免疫荧光染色结果显示,常氧对照组细胞中 NOX4 主要表达于细胞质,呈微弱绿荧光。缺氧对照组细胞中 NOX4 表达明显增强。0.75 mg/ml Avastin 干预组细胞中 NOX4 荧光强度无明显变化,5 $\mu\text{mol/ml}$ VAS2870 干预组细胞中 NOX4 表达明显减弱 (图 1)。

2.2 不同干预组细胞中 VEGF-A 蛋白表达

免疫荧光染色结果显示,常氧对照组细胞中 VEGF-A 主要表达于细胞质中,呈红色荧光,缺氧对照组细胞中 VEGF-A 表达明显增强。0.75 mg/ml Avastin 干预组细胞中 VEGF-A 荧光强度明显减弱,5 $\mu\text{mol/ml}$ VAS2870 干预组细胞中 VEGF-A 表达明显减弱 (图 2)。

2.3 不同干预组细胞中 NOX4 和 VEGF-A 蛋白相对表达量比较

常氧对照组、缺氧对照组及 0.25 mg/ml、0.50 mg/ml 和 0.75 mg/ml Avastin 干预组细胞中 NOX4 蛋白相对表达量分别为 0.657 ± 0.153 、 1.000 ± 0.200 、 1.206 ± 0.300 、 1.260 ± 0.200 和 1.413 ± 0.273 ,组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 17.631$, $P < 0.001$),其中 0.75 mg/ml Avastin 干预组 NOX4 蛋白相对表达量明显高于常氧对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

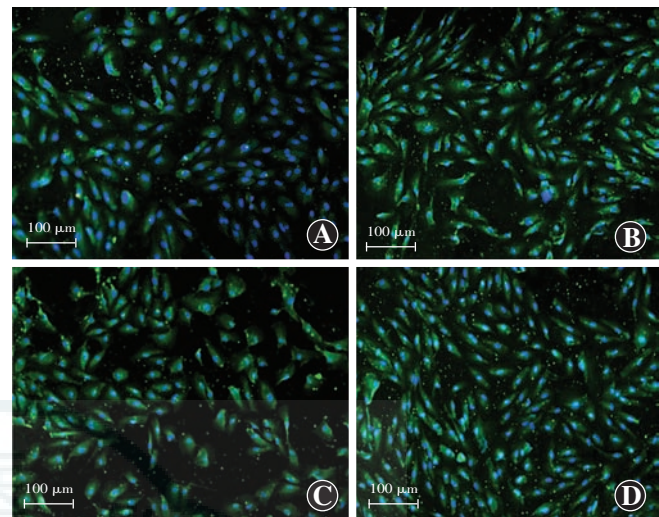


图 1 各组细胞中 NOX4 的免疫荧光染色表现 ($\times 200$, 标尺 = 100 μm) NOX4 主要表达于细胞质,呈绿色荧光 (FITC),细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) A:常氧对照组细胞中 NOX4 弱表达 B:缺氧对照组 NOX4 表达明显增强于常氧对照组 C:0.75 mg/ml Avastin 干预组细胞中 NOX4 表达强度弱于缺氧对照组 D:0.5 $\mu\text{mol/ml}$ VAS2870 干预组 NOX4 表达强度明显减弱

Figure 1 Immunofluorescence staining of NOX4 among various groups ($\times 200$, bar = 100 μm) NOX4 expressed mainly in cytoplasm, showing the green fluorescence (FITC), and the nuclei showed the blue fluorescence (DAPI) A: The expression of NOX4 was weakened in the normoxic control group B: The expression intensity of NOX4 was increased in the hypoxia control group C: The expression intensity of NOX4 was slightly weakened in the 0.75 mg/ml Avastin group D: The expression intensity of NOX4 was obviously weakened in the 5 $\mu\text{mol/ml}$ VAS2870 group

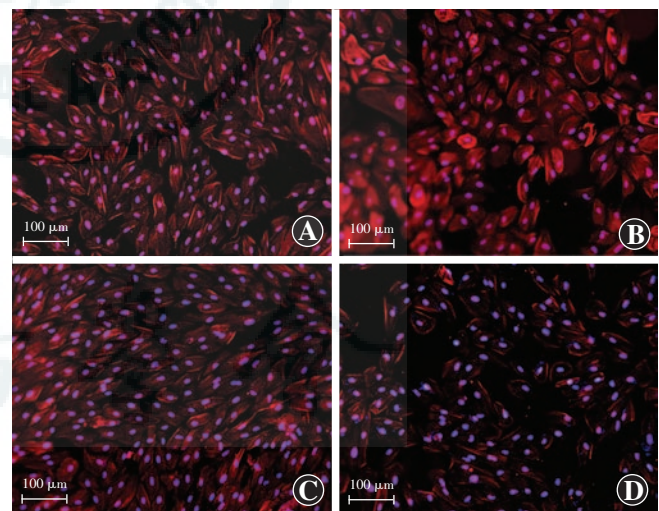


图 2 各组细胞中 VEGF-A 的免疫荧光染色表现 ($\times 200$, 标尺 = 100 μm) VEGF-A 主要表达于细胞质中,呈红色荧光 (Cy3),细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) A:常氧对照组可见 VEGF-A 表达 B:缺氧对照组细胞中 VEGF-A 表达明显增加 C:0.75 mg/ml Avastin 干预组细胞中 VEGF-A 表达强度弱于缺氧对照组 D:5 $\mu\text{mol/ml}$ VAS2870 干预组 VEGF-A 表达强度明显减弱

Figure 2 Immunofluorescence staining of VEGF-A among various groups ($\times 200$, bar = 100 μm) VEGF-A expressed mainly in cytoplasm, showing the red fluorescence (Cy3), and the nuclei showed the blue fluorescence (DAPI) A: The expression of VEGF-A was weakened in the normoxic control group B: The expression intensity of VEGF-A was increased in the hypoxia control group C: The expression intensity of VEGF-A was slightly weakened in the 0.75 mg/ml Avastin group D: The expression intensity of VEGF-A was obviously weakened in the 5 $\mu\text{mol/ml}$ VAS2870 group

常氧对照组、缺氧对照组及 0.25 mg/ml、0.50 mg/ml 和 0.75 mg/ml Avastin 干预组细胞中 VEGF-A 相对表达量分别为 0.821 ± 0.110 、 1.210 ± 0.100 、 0.672 ± 0.100 、 0.340 ± 0.120 和 0.300 ± 0.130 ，组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 4.777$, $P = 0.020$)，其中缺氧对照组 VEGF-A 蛋白相对表达量明显高于常氧对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；0.25 mg/ml、0.50 mg/ml 和 0.75 mg/ml Avastin 干预组细胞中 VEGF-A 蛋白相对表达量均低于缺氧对照组，差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3)。

2.4 不同浓度 NOX4 抑制剂组细胞中 NOX4 和 VEGF-A 蛋白相对表达量比较

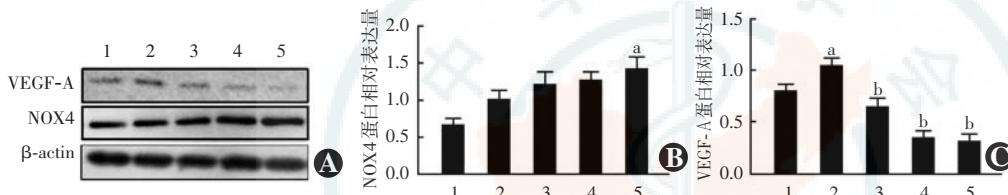


图 3 不同干预组细胞中 NOX4 和 VEGF-A 蛋白相对表达量比较 A: Western blot 检测电泳图 B: 各组 NOX4 相对表达量量化比较 $F = 17.631$, $P < 0.001$ 。与常氧对照组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 15$) C: 各组 VEGF-A 相对表达量量化比较 与常氧对照组比较, $^a P < 0.05$; 与缺氧对照组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 15$) 1: 常氧对照组 2: 缺氧对照组 3: 0.25 mg/ml Avastin 干预组 4: 0.50 mg/ml Avastin 干预组 5: 0.75 mg/ml Avastin 干预组 VEGF: 血管内皮细胞生长因子; NOX4: 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶 4

Figure 3 Comparison of NOX4 and VEGF-A expression among various groups A: Protein electrophoretogram of NOX4 and VEGF-A by Western blot assay B: Comparison of NOX4 relative expression among various groups $F = 17.631$, $P < 0.001$. Compared with the normoxia control group, $^a P < 0.05$ (ANOVA, LSD- t test, $n = 15$) C: Comparison of VEGF-A relative expression among various groups $F = 4.777$, $P = 0.020$. Compared with the normoxia control group, $^a P < 0.05$; Compared with the hypoxia control group, $^b P < 0.05$ (ANOVA, LSD- t test, $n = 15$) 1: normoxia control group 2: hypoxia control group 3: 0.25 mg/ml Avastin intervention group 4: 0.50 mg/ml Avastin intervention group 5: 0.75 mg/ml Avastin intervention group VEGF: vascular endothelial growth factor; NOX4: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4

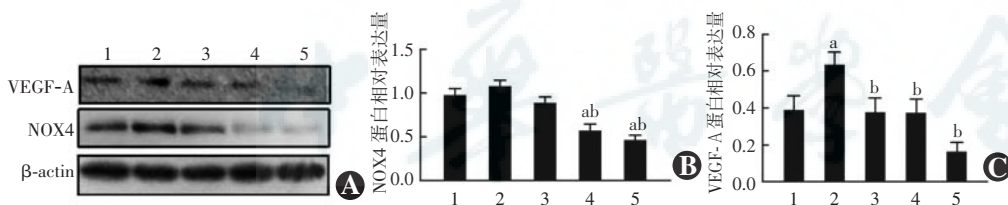


图 4 不同浓度 VAS2870 干预组细胞中 NOX4 和 VEGF-A 蛋白表达量比较 A: Western blot 检测电泳图 B: 各组细胞中 NOX4 蛋白相对表达量量化比较 $F = 12.933$, $P < 0.001$ 。与常氧对照组比较, $^a P < 0.05$; 与缺氧对照组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 15$) C: 各组细胞中 VEGF-A 蛋白相对表达量量化比较 $F = 4.948$, $P < 0.05$ 。与常氧对照组比较, $^a P < 0.05$; 与缺氧对照组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 15$) 1: 常氧对照组 2: 缺氧对照组 3: 1 μmol/ml VAS2870 干预组 4: 3 μmol/ml VAS2870 干预组 5: 5 μmol/ml VAS2870 干预组 VEGF: 血管内皮细胞生长因子; NOX4: 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶 4

Figure 4 Comparison of NOX4 and VEGF-A expression among different VAS2870 intervention groups A: Protein electrophoretogram of NOX4 and VEGF-A by Western blot assay B: Comparison of NOX4 relative expression among various groups $F = 12.933$, $P < 0.001$. Compared with the normoxia control group, $^a P < 0.05$; Compared with the hypoxia control group, $^b P < 0.05$ (ANOVA, LSD- t test, $n = 15$) C: Comparison of VEGF-A relative expression among various groups $F = 4.948$, $P < 0.05$. Compared with the normoxia control group, $^a P < 0.05$; Compared with the hypoxia control group, $^b P < 0.05$ (ANOVA, LSD- t test, $n = 15$) 1: normoxia control group 2: hypoxia control group 3: 1 μmol/ml VAS2870 intervention group 4: 3 μmol/ml VAS2870 intervention group 5: 5 μmol/ml VAS2870 intervention group VEGF: vascular endothelial growth factor; NOX4: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4

常氧对照组、缺氧对照组及 1 μmol/ml、3 μmol/ml 和 5 μmol/ml VAS2870 干预组细胞中 NOX 蛋白相对表达量分别是 0.970 ± 0.120 、 1.060 ± 0.130 、 0.880 ± 0.130 、 0.567 ± 0.135 和 0.450 ± 0.120 ，组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 12.933$, $P < 0.001$)，其中 3 μmol/ml VAS2870 干预组和 5 μmol/ml VAS2870 干预组细胞中 NOX4 蛋白相对表达量明显低于常氧对照组和缺氧对照组，差异均有统计学意义 (均 $P < 0.001$)。常氧对照组、缺氧对照组及 1 μmol/ml、3 μmol/ml 和 5 μmol/ml VAS2870 干预组细胞中 VEGF-A 蛋白相对表达量分别为 0.387 ± 0.135 、 0.627 ± 0.125 、 0.370 ± 0.140 、 0.363 ± 0.140 和 0.160 ± 0.100 ，组间总体比较

差异有统计学意义 ($F = 4.948$, $P < 0.05$)，其中缺氧对照组 VEGF-A 蛋白相对表达量高于常氧对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；1 μmol/ml、3 μmol/ml 和 5 μmol/ml VAS2870 干预组细胞中 VEGF-A 蛋白相对表达量明显低于缺氧对照组，差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4)。

3 讨论

CNV 形成是由多种细胞和细胞因子共同参与的复杂的病理过程，VEGF 是血管内皮细胞激活和血管生成的诱导因子。生理状态下，VEGF 主要表达于视网膜神经元和胶质细胞，血管中几乎不存在，但在氧化应激及缺血状态下，VEGF 的表达和分泌显著增加^[11]。VEGF 通过旁分泌机制与细胞表面 VEGFR 1/Flt-1、VEGFR 2/Flk-1/KDR、VEGFR 3 等受体结合，促进血管内皮细胞的存活、增生、迁移和管状结构形成^[12]。

氧化应激和炎症是相互关联的 2 个关键致病因素及病理过程。研究发现,氧化应激下产生的过量 ROS 与许多眼病的新生血管形成有直接或间接关联^[13-17]。低水平或中等水平的 ROS 是刺激血管生成的信号转换器^[18],而过量的 ROS 可引起血管内皮功能障碍和凋亡,导致血管细胞的丢失和缺血,进而触发血管生成^[19]。ROS 还可活化肿瘤坏死因子- α 和 β -catenin,激活 VEGF 受体及相关通路,破坏视网膜内外屏障,介导视网膜新生血管的生成^[20-21]。RPE 细胞因吞噬光感受器外节盘膜产生 ROS,病理情况下更易受 ROS 的影响^[22]。

NOX 是产生 ROS 的主要来源。NOX 家族由 Nox 1~5、Doux 1 和 Doux 2 等 7 个亚型组成,各种异构体的功能各不相同。研究表明,NOX 4 在缺血脑组织的新生血管中呈高表达,促进肢体缺血的恢复^[23-24]。Bhatt 等^[25]研究发现,应激状态下视网膜中的光感受器细胞产生大量 ROS,而 NOX 4 是其主要原因之一,提示 NOX 4 参与组织缺血诱导的血管生成反应,NADPH-ROS 途径在氧化应激下新生血管的形成中发挥重要作用。最近的研究发现,NOX2 上调可抑制 RPE 细胞的增生和迁移,对视网膜组织有一定的保护作用^[26]。我们的前期研究发现,NOX4 可表达于人 RPE 细胞中,且缺氧可以上调 NOX4 的表达,NOX4 表达量与缺氧时间成正比^[27]。研究发现,NOX 4 高表达通过 ROS 机制调节 VEGF/VEGFR 2 信号通路而促进视网膜新生血管的形成^[28],证明 NOX4 与 VEGF 通路激活有关,但 NOX4 的抑制剂对 VEGF 表达的影响以及二者的相互作用尚未见报道,了解 VEGF 抑制剂 Avastin 是否能抑制 NOX4 的表达对于新生血管疾病的防治具有重要意义。

本研究发现,缺氧条件下 RPE 细胞中 NOX4 和 VEGF-A 均呈高表达,Avastin 可抑制 VEGF-A 的表达,Avastin 的浓度越高,VEGF-A 的表达量越低。然而,Avastin 不能抑制 NOX4 的表达,NOX4 的表达量随着缺氧时间的延长而增加,同时,NOX4 抑制剂 VAS2870 可明显抑制缺氧条件下 NOX4 和 VEGF-A 的表达,VAS2870 浓度越高,NOX4 和 VEGF-A 表达量也越低。NOX4 与 VEGF-A 的表达密切相关,下调 NOX4 对缺氧诱导的人 RPE 细胞中 VEGF 表达有抑制作用,推测 NOX4 可能参与 VEGF 通路的调控。NOX4 表达下调,ROS 释放减少,进而抑制 VEGF-A 的表达,减少 VEGF-A 与 VEGFR2 受体的结合,抑制 VEGF/VEGFR2 通路的激活,从而抑制 CNV 的产生。Chen 等^[29]研究发现,给予 NOX 抑制剂或抗氧化剂可以缓解糖尿病动物视

网膜的血管渗漏,与本研究结果相符。Avastin 仅抑制 VEGF-A 的表达,但不能抑制 NOX4 的表达,为临床抗 VEGF 治疗应答不良的患者提供了新的思路。

综上所述,NOX 4 在 CNV 的形成中可能发挥重要调节作用,抑制 NOX 4 表达可能为年龄相关性黄斑变性等 CNV 疾病的治疗提供新的靶点和治疗策略。今后应进行相关动物实验,进一步检测参与 ROS 氧化应激中调控 VEGFR 通路的缺氧诱导因子 1、上下游相关因子及各炎性因子变化,并探讨 NOX4 激动剂在相关通路中的作用。

利益冲突 本研究所有作者均声明不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Chen L, Zhong J, Li S, et al. The long-term effect of tacrolimus on alkali burn-induced corneal neovascularization and inflammation surpasses that of anti-vascular endothelial growth factor[J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 2959-2969. DOI: 10.2147/DDDT.S175297.
- [2] Morfioisse F, Renaud E, Hantelys F, et al. Role of hypoxia and vascular endothelial growth factors in lymphangiogenesis [J/OL]. Mol Cell Oncol, 2015, 2(4): e1024821 [2018-08-09]. https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23723556.2015.1024821. DOI: 10.1080/23723556.
- [3] di Lauro R, de Ruggiero P, di Lauro R, et al. Intravitreal bevacizumab for surgical treatment of severe proliferative diabetic retinopathy [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2010, 248(6): 785-791. DOI: 10.1007/s00417-010-1303-3.
- [4] Hattori T, Shimada H, Nakashizuka H, et al. Dose of intravitreal bevacizumab (Avastin) used as preoperative adjunct therapy for proliferative diabetic retinopathy[J]. Retina, 2010, 30(5): 761-764. DOI: 10.1097/IAE.0b013e3181c70168.
- [5] Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, et al. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney [J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97(14): 8010-8014. DOI: 10.1073/pnas.130135897.
- [6] Osaadon P, Fagan XJ, Lifshitz T, et al. A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy [J]. Eye (Lond), 2014, 28(5): 510-520. DOI: 10.1038/eye.2014.13.
- [7] Smith JM, Steel DH. Anti-vascular endothelial growth factor for prevention of postoperative vitreous cavity haemorrhage after vitrectomy for proliferative diabetic retinopathy [DB/OL]. Cochrane Database Syst Rev, 2015, 8: CD008214 [2015-08-07]. https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD008214.pub3/full. DOI: 10.1002/14651858.CD008214.pub3.
- [8] Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth [J]. Nature, 2003, 422(6930): 442-446. DOI: 10.1038/nature01485.
- [9] 丁敏, 卢清君, 武坤, 等. NADPH 氧化酶抑制剂对遗传性视网膜色素变性感光细胞凋亡的抑制作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(4): 313-317. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.04.006.
- [10] Ding M, Lu QJ, Wu K, et al. Inhibitor of NADPH oxidase slow photoreceptor cell death in the retinal degeneration of rd mice [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(4): 313-317. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.04.006.
- [11] Bylund J, Brown KL, Movitz C, et al. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for? [J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(12): 1834-1845. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.016.
- [12] Lekha T, Prasad HN, Sarwate RN, et al. Intravitreal bevacizumab for choroidal neovascularization associated with angioid streaks: long-term

- results[J]. Mid East Afr J Ophthalmol, 2017, 24(3): 136–142. DOI: 10. 4103/meajo. MEAJ_O_17_17.
- [12] Cervia D, Catalani E, dal Monte M, et al. Vascular endothelial growth factor in the ischemic retina and its regulation by somatostatin[J]. J Neurochem, 2012, 120(5): 818–829. DOI: 10. 1111/j. 1471-4159. 2011. 07622. x.
- [13] Dong A, Xie B, Shen J, et al. Oxidative stress promotes ocular neovascularization[J]. J Cell Physiol, 2009, 219(3): 544–552. DOI: 10. 1002/jep. 21698.
- [14] Loane E, Kelliher C, Beatty S, et al. The rationale and evidence base for a protective role of macular pigment in age-related maculopathy[J]. Br J Ophthalmol, 2008, 92(9): 1163–1168. DOI: 10. 1136/bjo. 2007. 135566.
- [15] Dong A, Shen J, Zeng M, et al. Vascular cell-adhesion molecule-1 plays a central role in the proangiogenic effects of oxidative stress[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(35): 14614–14619. DOI: 10. 1073/pnas. 1012859108.
- [16] Kowluru RA. Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death[J]. Antioxid Redox Sig, 2005, 7(11–12): 1581–1587. DOI: 10. 1089/ars. 2005. 7. 1581.
- [17] Wang H, Zhang SX, Hartnett ME. Signaling pathways triggered by oxidative stress that mediate features of severe retinopathy of prematurity[J]. JAMA Ophthalmol, 2013, 131(1): 80–85. DOI: 10. 1001/jamaophthalmol. 2013. 986.
- [18] Kim YM, Kim KE, Koh GY, et al. Hydrogen peroxide produced by angiopoietin-1 mediates angiogenesis[J]. Cancer Res, 2006, 66(12): 6167–6174. DOI: 10. 1158/0008-5472. CAN-05-3640.
- [19] Parfenova H, Basuroy S, Bhattacharya S, et al. Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290(5): 1399–1410. DOI: 10. 1152/ajpcell. 00386. 2005.
- [20] Wang H, Han X, Wittchen ES, et al. TNF- α mediates choroidal neovascularization by upregulating VEGF expression in RPE through ROS-dependent β -catenin activation[J]. Mol Vis, 2016, 22(3): 116–128.
- [21] Kwak N, Okamoto N, Wood JM, et al. VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(10): 3158–3164.
- [22] Kaamiranta K, Kajdaneck J, Morawiec J, et al. PGC-1 α protects RPE cells of the aging retina against oxidative stress-induced degeneration through the regulation of senescence and mitochondrial quality control. The significance for AMD pathogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(8): 595–603. DOI: 10. 3390/ijms19082317.
- [23] Vallet P, Charnay Y, Steger K et al. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia[J]. Neuroscience, 2005, 132(2): 233–238. DOI: 10. 1016/j. neuroscience. 2004. 12. 038.
- [24] Craige SM, Chen K, Pei Y, et al. NADPH oxidase 4 promotes endothelial angiogenesis through endothelial nitric oxide synthase activation[J]. Circulation, 2011, 124(6): 731–740. DOI: 10. 1161/CIRCULATIONAHA. 111. 030775.
- [25] Bhatt L, Groeger G, McDermott K, et al. Rod and cone photoreceptor cells produce ROS in response to stress in a live retinal explant system[J]. Mol Vis, 2010, 16: 283–293.
- [26] Li J, L Hui, Kang QY, et al. Down-regulation of microRNA-27b promotes retinal pigment epithelial cell proliferation and migration by targeting Nox2[J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(7): 925–933. DOI: 10. 1016/j. prp. 2018. 05. 025.
- [27] 李静, 杨静, 康前雁. 缺氧对培养的人视网膜色素上皮细胞中 NOX4 表达的影响[J]. 国际眼科杂志, 2017, 17(1): 34–37. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2017. 1. 08.
- Li J, Yang J, Kang QY. Effect of hypoxia on expression of NOX4 in human retinal pigment epithelium[J]. Int Eye Sci, 2017, 17(1): 34–37. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2017. 1. 08.
- [28] Li J, Wang JJ, Zhang SX. NADPH oxidase 4-derived H₂O₂ promotes aberrant retinal neovascularization via activation of VEGF receptor 2 pathway in oxygen-induced retinopathy[J/OL]. J Diabetes Res, 2015, 2015: 963289 [2018–10–21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25866826>. DOI: 10. 1155/2015/963289.
- [29] Chen P, Guo AM, Edwards PA, et al. Role of NADPH oxidase and ANG II in diabetes-induced retinal leukostasis[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 293(4): 1619–1629. DOI: 10. 1152/ajpregu. 00290. 2007.

(收稿日期: 2019-05-09 修回日期: 2019-12-25)

(本文编辑: 杜娟 尹卫靖)

读者·作者·编者

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利用指南。

(本刊编辑部)