

· 实验研究 ·

重组人血管内皮抑素对早期糖尿病大鼠视网膜屏障相关蛋白的影响

周进华 解正高

扬州大学附属苏北人民医院眼科 225001

周进华在职研究生, 现在南京鼓楼医院集团仪征医院眼科 211900

解正高现在南京大学医学院附属鼓楼医院眼科 210008

通信作者: 解正高, Email: zgxie87@163.com

【摘要】目的 观察重组人血管内皮抑素(ES)对链脲佐菌素(STZ)诱导的早期糖尿病大鼠视网膜屏障相关蛋白表达的影响。**方法** 采用 STZ 诱导制作糖尿病大鼠模型,取 36 只造模成功后 2 周的糖尿病大鼠按照随机数字表法分为模型组、ES 1.0 μl 组、ES 2.5 μl 组、ES 5.0 μl 组、贝伐单抗 2.5 μl 组和联合治疗组,每组各 6 只,并根据分组情况右眼玻璃体腔分别注射不同剂量的重组人 ES 和贝伐单抗。同时选取 6 只正常大鼠作为空白对照组。于玻璃体腔注药后 4 周,采集各组大鼠右眼视网膜组织,采用 Western blot 法检测视网膜组织中 claudin-5、occludin、细胞间黏附分子-1(VCAM-1)、血管细胞黏附分子-1(ICAM-1)、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白的表达水平。**结果** 糖尿病模型大鼠均相继表现出多饮、多尿、多食等典型糖尿病表现,体质量明显下降,造模成功率为 100%。Western blot 检测结果显示,空白对照组、ES 2.5 μl 组、ES 5.0 μl 组、贝伐单抗 2.5 μl 组、联合治疗组 VCAM-1、ICAM-1、VEGF 相对表达量均较模型组下降,claudin-5、occludin 的相对表达量均较模型组升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。ES 1.0 μl 组 occludin 蛋白相对表达量为 0.23 ± 0.02 ,明显高于模型组的 0.13 ± 0.02 ,ES 1.0 μl 组 ICAM-1、VEGF 蛋白相对表达量分别为 0.53 ± 0.01 和 0.57 ± 0.00 ,明显低于模型组的 0.81 ± 0.01 和 0.86 ± 0.00 ,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。随着 ES 给药剂量的增加,claudin-5 和 occludin 蛋白相对表达量有升高的趋势,VCAM-1、ICAM-1、VEGF 蛋白相对表达量有下降趋势。**结论** 重组人 ES 可能通过直接或间接减少炎症因子 VCAM-1、ICAM-1 的释放、抑制 VEGF 的表达从而减少视网膜紧密连接蛋白 claudin-5 和 occludin 的缺失。

【关键词】 糖尿病/模型; 重组人血管内皮抑素; 血-视网膜屏障; Claudin-5; Occludin; 细胞间黏附分子-1; 血管细胞黏附分子-1; 血管内皮生长因子

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190228-00092

Effect of recombinant human vascular endostatin on retinal barrier related proteins in early diabetic rats

Zhou Jinhua, Xie Zhenggao

Department of Ophthalmology, Subei People's Hospital Affiliated to Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

Zhou Jinhua is the in-service graduate student and is now working in the Yizheng Hospital, Nanjing Drum Tower Hospital Group, Yangzhou 211400, China

Xie Zhenggao is now working at the Department of Ophthalmology, Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China

Corresponding author: Xie Zhenggao, Email: zgxie87@163.com

【Abstract】Objective To observe the effect of recombinant human vascular endostatin (ES) on retinal barrier related proteins in early streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. **Methods** Diabetes rat model was induced by STZ. Two weeks after the model was successfully constructed, 36 diabetic model rats were randomly divided into the model group, 1.0 μl ES group, 2.5 μl ES group, 5.0 μl ES group, 2.5 μl bevacizumab group, and the combination therapy group, with 6 rats in each group. Different doses of recombinant human ES and 2.5 μl bevacizumab were injected into the vitreous cavity of the right eye according to the grouping. Six normal rats were selected as the blank control group. At 4 weeks after intravitreal injection, the retinal tissue of the right eye in each group was collected, and the expression levels of inter cellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), occludin, claudin-5, vascular endothelial growth factor (VEGF) and other proteins in retinal tissue were detected by Western blot assay. The use and care of animals was in accordance with the regulations for the administration of experimental animals. **Results** The diabetic model rats showed polydipsia, polyuria,

polyphagia and other typical diabetic symptoms, the body quality decreased significantly, and the success rate of modeling was 100%. Western blot results showed that the expression levels of VCAM-1, ICAM-1 and VEGF in the blank group, the 2.5 μ l ES group, the 5.0 μ l ES group, the bevacizumab group, the combination therapy group were significantly lower than those in the model group, while the expression levels of claudin-5 and occludin were significantly higher than those in the model group, the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). The relative expression of occludin protein in the 1.0 μ l ES group was significantly higher than that in the model group (0.23 ± 0.02 vs. 0.13 ± 0.02), while the relative expression of ICAM-1 and VEGF was significantly lower than that in the model group (0.53 ± 0.01 vs. 0.81 ± 0.01 ; 0.57 ± 0.00 vs. 0.86 ± 0.00), the differences were statistically significant (all at $P < 0.05$). As the dose of ES increased, the relative expressions of claudin-5 and occludin protein tended to increase, while the relative expressions of VCAM-1, ICAM-1 and VEGF tended to decrease. **Conclusions** Recombinant human vascular endostatin can directly or indirectly reduce the release of inflammatory factors VCAM-1 and ICAM-1 and inhibit the expression of VEGF, thereby reduce the loss of retinal tight junction.

[Key words] Diabetes/model; Recombinant human vascular endostatin; Blood-retinal barrier; Claudin-5; Occludin; Intercellular cell adhesion molecule-1; Vascular cell adhesion molecule-1; Vascular endothelium growth factor
DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20190228-00092

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)严重危害糖尿病患者的视力,其主要原因为视网膜水肿和视网膜新生血管形成^[1]。DR的发病机制复杂,目前认为可能与高糖环境的刺激、蛋白激酶C的激活、血流异常以及炎症因素等密切相关,炎症反应及相关细胞因子也参与了DR的发生和发展过程。细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)作为黏附分子免疫球蛋白超家族中的2个重要成员,在炎症因子刺激下与其受体结合促进内皮细胞活化,使得白细胞易于穿透血管内皮,是破坏血-视网膜屏障、诱发血管形成的主要因素之一^[2-4]。Claudin-5和occludin组成的紧密连接蛋白复合体是维持血-视网膜屏障的结构基础^[5]。研究表明重组人血管内皮抑素(vascular endostatin, ES)能够抑制实验动物脉络膜新生血管的形成和人脐静脉内皮细胞的迁移、侵袭^[6],从而发挥抑制血管生成的作用,但其对正常静止的内皮细胞无明显影响。本研究旨在观察重组人ES对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的早期糖尿病大鼠紧密连接蛋白 claudin-5、occludin以及ICAM-1、VCAM-1、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等因子表达的影响,以期通过早期抑制炎症反应,减轻炎症因子的释放来抑制DR的进展,从而为DR的治疗寻找新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性SD大鼠42只由扬州大学医学院动物中心提供,体质量200~220 g。所有大鼠均在标准化动物中心单笼单只饲料喂养,自由进

食和饮水。实验动物的饲养和使用均符合《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 贝伐单抗注射液(瑞士罗氏制药);重组人ES注射液(山东先声麦得津公司);盐酸丙美卡因滴眼液(南京瑞年百思特公司);左氧氟沙星滴眼液(日本参天制药株式会社);链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国Sigma公司);兔抗鼠claudin-5单克隆抗体(批号:ab15106)、occludin多克隆抗体(批号:ab31721)、VCAM-1多克隆抗体(批号:ab134047)、VEGF多克隆抗体(批号:ab32152)、鼠抗ICAM-1单克隆抗体(批号:ab171123)(美国Abcam公司);鼠抗GAPDH单克隆抗体(货号:YFMA0037,南京翼飞雪公司);羊抗鼠辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记IgG(货号:BK0023)、羊抗兔IgG-HRP(货号:BK0027)(广州贝斯特生物科技有限公司)。酶标仪(美国Molecular Devices公司);凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);血糖仪[强生(中国)医疗公司]。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病模型的建立及分组 取36只SD大鼠一次性腹腔注射60 mg/kg STZ(用0.1 mol/L枸橼酸盐缓冲液配成10 g/L的STZ),于注射后72 h及1周分别取鼠尾血测血糖并留取尿液行尿糖检测。血糖>16.7 mmol/L、尿糖(+++)大鼠定义为糖尿病模型^[7]。取造模成功的大鼠根据随机数字表法分为模型组、贝伐单抗2.5 μ l组、ES 1.0 μ l组、ES 2.5 μ l组、ES 5.0 μ l组和联合治疗组,每组各6只。同时纳入正常SD大鼠6只作为空白对照组。

1.2.2 玻璃体腔注射药物 造模成功后2周进行玻璃体腔注射,所有实验组操作均为右眼玻璃体腔注射药物1次^[8-10],在眼内注射前均常规左氧氟沙星滴眼

液点右眼,每日 3 次。腹腔内注射戊巴比妥钠麻醉,注药前常规聚维酮碘结膜囊消毒后大量生理盐水冲洗,微量注射器在大鼠角膜缘后约 1 mm 处垂直进针,根据分组分别向贝伐单抗 2.5 μl 组、ES 1.0 μl 组、ES 2.5 μl 组、ES 5.0 μl 组和联合治疗组玻璃体腔注射 2.5 μl 贝伐单抗、1.0 μl 重组人 ES、2.5 μl 重组人 ES、5.0 μl 重组人 ES、2.5 μl 贝伐单抗 + 2.5 μl 重组人 ES,其中重组人 ES 质量浓度均为 5 mg/ml^[11-12]。术毕显微手术镊夹闭针孔并左氧氟沙星滴眼液点眼。术后左氧氟沙星滴眼液点眼,每日 4 次,共 7 d。

1.2.3 Western blot 法检测 claudin-5、occludin、VCAM-1、ICAM-1 和 VEGF 的表达 玻璃体腔注药后 4 周,颈椎脱臼法处死各组大鼠,迅速摘除眼球并分离视网膜组织后转移至干净的 1.5 ml 离心管中,加入 500 μl PBS,使用匀浆机将组织在冰盒上匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 10 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,再加入 200 μl 含 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 的 IP 裂解液,重悬细胞后用移液器将裂解液移入 1.5 ml 离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 30 min,期间摇晃数次,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 000 r/min 离心 10 min 后将上清液转移到 1.5 ml 离心管中并于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。BCA 法测定蛋白含量。聚丙烯酰胺凝胶电泳后转印至 PVDF 膜并封闭。取出已封闭的 PVDF 膜,加入相应一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后,1 倍 TBST 缓冲液中洗膜,于摇床上洗涤 3 次,每次 5 min;再加入对应的二抗,于室温摇床上孵育 1 h。将 PVDF 膜浸于 1 倍 TBST 缓冲液中,置摇床上洗涤 3 次,每次 5 min。ECL 化学发光显影,凝胶成像仪检测各蛋白条带灰度值,以 GAPDH 为内参照,计算各组蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。本研究中计量资料经 W 检验呈正态分布,以 mean \pm SD 表示。各组间不同蛋白相对表达量总体差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Dunnett-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组实验大鼠的一般表现

造模后 72 h 及 1 周,所有模型大鼠血糖均 > 16.7 mmol/L、尿糖(+++),造模成功率达 100%。随着造模后时间的延长,糖尿病大鼠均相继表现出多饮、多尿、多食等典型糖尿病表现,并且糖尿病大鼠从造模后第 1 周开始体重均明显下降(图 1),消瘦明显,毛色灰暗,符合糖尿病表现。

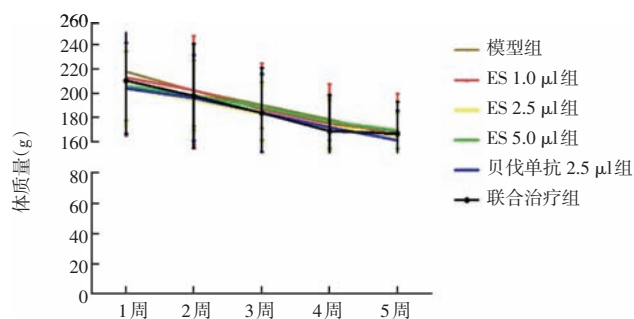


图 1 SD 大鼠造模后不同时间点体质量变化 ES:血管内皮抑素

Figure 1 Body mass changes in SD rats at different time points after modeling ES:vascular endothelin

2.2 各组 claudin-5 相对表达量比较

空白对照组、模型组、ES 1.0 μl 组、ES 2.5 μl 组、ES 5.0 μl 组、贝伐单抗 2.5 μl 组、联合治疗组 claudin-5 蛋白的相对表达量分别为 0.75 ± 0.02 、 0.15 ± 0.02 、 0.19 ± 0.02 、 0.33 ± 0.02 、 0.50 ± 0.01 、 0.49 ± 0.01 和 0.66 ± 0.01 ,总体比较差异有统计学意义 ($F = 698.099, P < 0.01$)。与模型组比较,空白对照组、ES 2.5 μl 组、ES 5.0 μl 组、贝伐单抗 2.5 μl 组、联合治疗组 claudin-5 蛋白的相对表达量明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),模型组与 ES 1.0 μl 组 claudin-5 蛋白的相对表达量比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)(图 2A, B)。

2.3 各组 occludin 相对表达量比较

空白对照组、模型组、ES 1.0 μl 组、ES 2.5 μl 组、ES 5.0 μl 组、贝伐单抗 2.5 μl 组、联合治疗组 occludin 蛋白的相对表达量分别为 0.71 ± 0.02 、 0.13 ± 0.02 、 0.23 ± 0.02 、 0.38 ± 0.01 、 0.52 ± 0.01 、 0.54 ± 0.01 和 0.74 ± 0.01 ,总体比较差异有统计学意义 ($F = 735.737, P < 0.01$)。与模型组比较,空白对照组、ES 1.0 μl 组、ES 2.5 μl 组、ES 5.0 μl 组、贝伐单抗 2.5 μl 组、联合治疗组视网膜紧密连接蛋白 occludin 相对表达量明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 2A, C)。

2.4 各组视网膜 VCAM-1 蛋白相对表达量比较

空白对照组、模型组、ES 1.0 μl 组、ES 2.5 μl 组、ES 5.0 μl 组、贝伐单抗 2.5 μl 组、联合治疗组 VCAM-1 蛋白的相对表达量分别为 0.18 ± 0.01 、 0.85 ± 0.01 、 0.85 ± 0.01 、 0.52 ± 0.01 、 0.33 ± 0.01 、 0.41 ± 0.01 和 0.17 ± 0.02 ,总体比较差异有统计学意义 ($F = 1663.133, P < 0.01$)。与模型组比较,空白对照组、ES 2.5 μl 组、ES 5.0 μl 组、贝伐单抗 2.5 μl 组、联合治疗组 VCAM-1 蛋白相对表达量明显减少,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),模型组与 ES 1.0 μl 组

VCAM-1 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P=1.000$) (图 2A, D)。

2.5 各组视网膜 ICAM-1 蛋白相对表达量比较

空白对照组、模型组、ES 1.0 μl 组、ES 2.5 μl 组、ES 5.0 μl 组、贝伐单抗 2.5 μl 组、联合治疗组 ICAM-1 蛋白相对表达量分别为 0.14 ± 0.01 、 0.81 ± 0.01 、 0.53 ± 0.01 、 0.43 ± 0.01 、 0.32 ± 0.01 、 0.34 ± 0.01 和 0.18 ± 0.02 , 总体比较差异有统计学意义 ($F=1990.544, P<0.01$)。与模型组比较, 空白对照组、ES 1.0 μl 组、ES 2.5 μl 组、ES 5.0 μl 组、贝伐单抗 2.5 μl 组、联合治疗组 ICAM-1 蛋白相对表达量明显

减少, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (图 2A, E)。

2.6 各组视网膜 VEGF 蛋白相对表达量比较

空白对照组、模型组、ES 1.0 μl 组、ES 2.5 μl 组、ES 5.0 μl 组、贝伐单抗 2.5 μl 组、联合治疗组 VEGF 蛋白相对表达量分别为 0.16 ± 0.01 、 0.86 ± 0.00 、 0.57 ± 0.00 、 0.35 ± 0.01 、 0.30 ± 0.00 、 0.38 ± 0.01 和 0.15 ± 0.01 , 总体比较差异有统计学意义 ($F=2233.426, P<0.01$)。与模型组比较, ES 1.0 μl 组、ES 2.5 μl 组、ES 5.0 μl 组、贝伐单抗 2.5 μl 组、联合治疗组视网膜 VEGF 蛋白相对表达量明显减少, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (图 2A, F)。

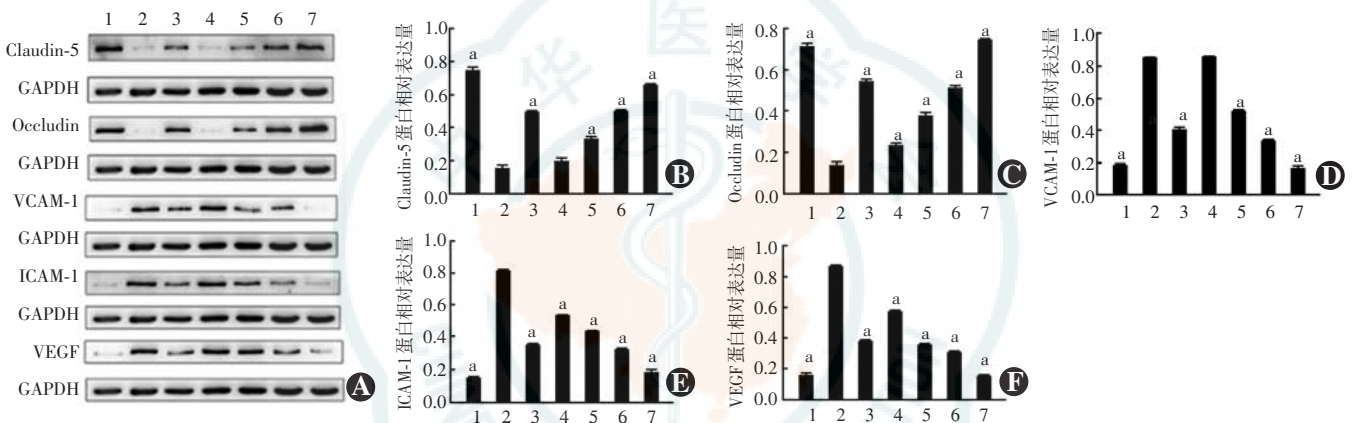


图 2 各组视网膜 claudin-5、occludin、VCAM-1、ICAM-1、VEGF 蛋白相对表达量比较 A: 各组不同蛋白电泳图 B: 各组视网膜 claudin-5 蛋白相对表达量比较 $F=698.009, P<0.01$ 。与模型组比较, $^a P<0.01$ (单因素方差分析, Dunnett- t 检验, $n=6$) C: 各组视网膜 occludin 相对表达量比较 $F=735.737, P<0.01$ 。与模型组比较, $^a P<0.01$ (单因素方差分析, Dunnett- t 检验, $n=6$) D: 各组视网膜 VCAM-1 相对表达量比较 $F=1663.133, P<0.01$ 。与模型组比较, $^a P<0.05$ (单因素方差分析, Dunnett- t 检验, $n=6$) E: 各组视网膜 ICAM-1 相对表达量比较 $F=1990.544, P<0.01$ 。与模型组比较, $^a P<0.01$ (单因素方差分析, Dunnett- t 检验, $n=6$) F: 各组视网膜 VEGF 相对表达量比较 $F=2233.426, P<0.01$ 。与模型组比较, $^a P<0.01$ (单因素方差分析, Dunnett- t 检验, $n=6$) 1: 空白对照组 2: 模型组 3: 贝伐单抗 2.5 μl 组 4: ES 1.0 μl 组 5: ES 2.5 μl 组 6: ES 5.0 μl 组 7: 联合治疗组 GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶; VCAM: 血管细胞黏附分子; ICAM: 细胞间黏附分子; VEGF: 血管内皮生长因子

Figure 2 Comparison of the relative expression of claudin-5, occludin, VCAM-1, ICAM-1, and VEGF in the retina tissues among different groups A: Electrophoretogram of different proteins in each group B: Comparison of the relative expression of retinal claudin-5 among different groups $F=698.009, P<0.01$. Compared with the model group, $^a P<0.01$ (One-way ANOVA, Dunnett- t test, $n=6$) C: Comparison of the relative expression of retinal occludin among different groups $F=735.737, P<0.01$. Compared with the model group, $^a P<0.01$ (One-way ANOVA, Dunnett- t test, $n=6$) D: Comparison of the relative expression of retinal VCAM-1 among different groups $F=1663.133, P<0.01$. Compared with the model group, $^a P<0.05$ (One-way ANOVA, Dunnett- t test, $n=6$) E: Comparison of the relative expression of retinal ICAM-1 among different groups $F=1990.544, P<0.01$. Compared with the model group, $^a P<0.01$ (One-way ANOVA, Dunnett- t test, $n=6$) F: Comparison of the relative expression of retinal VEGF among different groups $F=2233.426, P<0.01$. Compared with the model group, $^a P<0.01$ (One-way ANOVA, Dunnett- t test, $n=6$) 1: blank control group 2: model group 3: bevacizumab 2.5 μl group 4: ES 1.0 μl group 5: ES 2.5 μl group 6: ES 5.0 μl group 7: combination therapy group GAPDH: glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; VCAM: vascular cell adhesion molecule-1; ICAM: intercellular cell adhesion molecule; VEGF: vascular endothelial growth factor

3 讨论

视网膜屏障功能的完整性与视网膜正常代谢功能的维持密切相关。血-视网膜屏障是由血管的周细胞、视网膜毛细血管内皮细胞间的闭合小带以及细胞基质共同构成的紧密连接复合体所形成的^[13-14]。研究认为, DR 是多因素参与、多种因子共同调节的结果, 早期 DR 的发生与炎症有着密切的关系^[15]。炎症因子的刺激可使白细胞增多并黏附于视网膜血管壁,

而 ICAM-1 和 VCAM-1 是黏附分子免疫球蛋白超家族中的 2 个重要成员, 炎症因子也可以刺激 ICAM-1 与其受体特异性结合, 促进内皮细胞活化, 从而使得白细胞以及肿瘤细胞等更容易穿透内皮^[2-4]。因此目前认为糖尿病大鼠视网膜血管早期的病理表现与 ICAM-1 刺激促进白细胞与内皮细胞之间的反复黏附和脱落、毛细血管内白细胞的增多和聚集, 导致毛细血管阻塞、无灌注形成、毛细血管内皮细胞损害和死亡, 进而破坏血-视网膜屏障密切相关, 导致视网膜缺血, VEGF 表

达增加。VEGF 作为直接的眼内新生血管形成因子,其能够特异性地作用于糖尿病视网膜血管内皮细胞,进一步破坏血-视网膜屏障、增加血管的渗漏和促进新生血管的形成。因此目前抗 VEGF 治疗已成为临床上减少渗出、减轻出血、抑制新生血管形成、短期控制和稳定视力的主要手段^[16]。雷珠单抗、康柏西普以及阿柏西普玻璃体腔注射治疗在临床上取得了较好的疗效^[17-18],也进一步证明了使用 VEGF 抗体可拮抗 VEGF 的渗透作用,降低糖尿病患者视网膜血管的通透性^[19]。

重组人 ES 作为一种内源性血管生成抑制剂,目前主要用于非小细胞肺癌的临床治疗,具有价格低、毒性低、耐受性好、不良反应少等优势,并且它能够特异性地作用于病理性新生血管,但不影响正常的血管系统或者非内皮细胞起源的细胞^[20]。重组人 ES 联合标准化疗方案的研究表明,联合用药并没有增加治疗的不良反应,而且总缓解率、无进展生存率等指标均有不同程度提高^[21-22]。近年来,大鼠 DR 模型体外实验研究发现 ES 能够下调 VEGF 的表达水平、诱导细胞凋亡、抑制人脐静脉内皮细胞的增生和迁移^[23]。Campochiaro 等^[24]也通过将载有 ES 的病毒载体直接注入黄斑变性患者的视网膜下发现,ES 对改善病变部位的荧光素渗漏具有一定作用。

本实验采取 SD 大鼠经典的糖尿病造模方式,通过一次性腹腔内注射 STZ 制作糖尿病模型,在造模成功后 2 周进行 1 次重组人 ES 和贝伐单抗玻璃体腔注射,结果显示 claudin-5 和 occludin 在模型组视网膜中相对表达量最低,在空白对照组中相对表达量最高,各干预组视网膜 claudin-5 和 occludin 相对表达量较模型组均有不同程度增加,且随着重组人 ES 浓度的升高,紧密连接蛋白含量也有增加的趋势,且联合干预组 claudin-5 和 occludin 相对表达量较高;说明重组人 ES 与贝伐单抗均可通过减少紧密连接蛋白的缺失来保护视网膜屏障功能。进一步通过对 VCAM-1、ICAM-1、VEGF 相关蛋白的表达水平进行检测发现,VCAM-1、ICAM-1、VEGF 的相对表达量在模型组中最高,在空白对照组中最低,不同干预组 VCAM-1、ICAM-1、VEGF 的相对表达量较模型组均有不同程度下降,推测重组人 ES 能够减少 VCAM-1、ICAM-1 炎性因子的释放,从而减少白细胞对血管内皮细胞的刺激和黏附,减轻白细胞对视网膜毛细血管的阻塞,有效地延缓了毛细血管无灌注区的形成,同时 VEGF 的表达降低,糖尿病微血管病变减轻,从而保护血-视网膜屏障。

近年来,ES 在眼科主要用于抑制角膜、视网膜、脉

络膜新生血管方面的研究^[23-24],但其具体机制尚不明确。本实验通过早期对炎症因素及黏附分子的干预减少了视网膜紧密连接蛋白的缺失,延缓了 DR 的进程,有望为 DR 的预防和治疗开辟新的思路。但本实验仅从玻璃体腔注射这一途径并且是通过早期干预来观察 ES 对血-视网膜相关蛋白的影响,而其最佳给药浓度、长期疗效观察、能否用于人眼的治疗、能否通过其他给药途径以及能否在血-视网膜屏障功能破坏后起到治疗作用等还需要进一步探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Farnoodian M, Halbach C, Slinger C, et al. High glucose promotes the migration of retinal pigment epithelial cells through increased oxidative stress and PEDF expression [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 311(3): C418-436. DOI: 10.1152/ajpcell.00001.2016.
- [2] Sharma S, Purohit S, Sharma A, et al. Elevated serum levels of soluble TNF receptors and adhesion molecules are associated with diabetic retinopathy in patients with type-1 diabetes [J/OL]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 279393 [2019-10-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26339132>. DOI: 10.1155/2015/279393.
- [3] 马燕, 姜燕荣. 炎症反应和炎性因子与糖尿病视网膜病变的研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31(1): 86-90. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.01.021.
Ma Y, Jiang YR. Research advance in the relationship of inflammatory reaction and inflammatory factor with diabetic retinopathy [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2013, 31(1): 86-90. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.01.021.
- [4] 于宏飞, 董志军, 张铁民, 等. 丝胶对糖尿病大鼠视网膜微血管的保护作用及其作用机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(1): 32-37. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.01.007.
Yu HF, Dong ZJ, Zhang TM, et al. Protection of sericin to retinal microvessels and its mechanism in diabetic rats [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35(1): 32-37. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.01.007.
- [5] Runkle EA, Antonetti DA. The blood-retinal barrier: structure and functional significance [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 686: 133-148. DOI: 10.1007/978-1-60761-938-3_5.
- [6] Xu X, Mao W, Chen Q, et al. Endostar, a modified recombinant human endostatin, suppresses angiogenesis through inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107463 [2019-10-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25232946>. DOI: 10.1371/journal.pone.0107463.
- [7] 付云杰, 刘学政. NgR-Rhoa-Rock 信号通路在早期糖尿病大鼠 RGC 凋亡中的作用 [J]. *国际眼科杂志*, 2014, (9): 1570-1573. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.09.03.
Fu YJ, Liu XZ. The role of NgR-Rhoa-Rock signal pathway in retinal ganglion cell apoptosis of early diabetic rats [J]. *Int J Ophthalmol*, 2014, (9): 1570-1573. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.09.03.
- [8] 周琼, 肖昂. 雷珠单抗对糖尿病大鼠早期视网膜组织结构的影响 [J]. *眼科新进展*, 2015, 35(9): 827-831. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2015.0226.
Zhou Q, Xiao A. Effects of ranibizumab on retinal structure at early stage of diabetic rats [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2015, 35(9): 827-831. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2015.0226.
- [9] Ye YF, Gao YF, Xie HT, et al. Pharmacokinetics and retinal toxicity of various doses of intravitreal triamcinolone acetonide in rabbits [J]. *Mol Vis*, 2014, 20: 629-636. DOI: 10.1186/2241-5793-21-5.
- [10] Ye Z, Ji YL, Ma X, et al. Pharmacokinetics and distributions of bevacizumab by intravitreal injection of bevacizumab-PLGA microspheres in rabbits [J]. *Int J Ophthalmol*, 2015, 8(4): 653-658. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2015.04.02.
- [11] Bai Y, Zhao M, Zhang C, et al. Anti-angiogenic effects of a mutant endostatin: a new prospect for treating retinal and choroidal neovascularization [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112448 [2019-10-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25380141>. DOI: 10.1371/journal.pone.0112448.

- [12] 许文俊, 高永峰, 胡萍. 局部应用尿激酶对大鼠血-视网膜屏障外向通透性的影响[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(1): 38-41. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 01. 008.
Xu WJ, Gao YF, Hu P. Effect of urokinase on the outward permeability of blood-retinal barrier following local injection in rats[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(1): 38-41. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 01. 008.
- [13] Liu YX, Liu GM, Cao MJ, et al. Potential retinal benefits of dietary polyphenols based on their permeability across the blood-retinal barrier [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(15): 3179-3189. DOI: 10. 1021/acs. jafc. 7b00844.
- [14] Cunha-Vaz J. The blood-retinal barrier in the management of retinal disease: EURETINA award lecture[J]. Ophthalmologica, 2017, 237(1): 1-10. DOI: 10. 1159/000455809.
- [15] Bing H, Tang J, An XL, et al. Study of the effect of leukostasis in diabetic retinopathy[J]. Int Eye Sci, 2012, 12(2): 218-220. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2012. 02. 08.
- [16] Falavarjani KG, Nguyen QD. Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature [J]. Eye (Lond), 2013, 27(7): 787-794. DOI: 10. 1038/eye. 2013. 107.
- [17] Panos GD, Gatzoufas Z, Petropoulos IK, et al. Effect of ranibizumab on serous and vascular pigment epithelial detachments associated with exudative age-related macular degeneration [J]. Drug Des Devel Ther, 2013, 7: 565-569. DOI: 10. 2147/DDDT. S46610.
- [18] Yamashiro K, Mori K, Honda S, et al. A prospective multicenter study on genome wide associations to ranibizumab treatment outcome for age-related macular degeneration [J/OL]. Sci Rep, 2017, 7(1): 9196 [2019-10-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28835685>. DOI: 10. 1038/s41598-017-09632-0.
- [19] Astern JM, Collier AC, Kendal-Wright CE. Pre-B cell colony enhancing factor (PBEF/NAMPT/Visfatin) and vascular endothelial growth factor (VEGF) cooperate to increase the permeability of the human placental amnion [J]. Placenta, 2013, 34(1): 42-49. DOI: 10. 1016/j.placenta. 2012. 10. 008.
- [20] Lu J, Tang Y, Cheng Y, et al. ING4 regulates JWA in angiogenesis and their prognostic value in melanoma patients [J]. Br J Cancer, 2013, 109(11): 2842-2852. DOI: 10. 1038/bjc. 2013. 670.
- [21] Huang W, Liu J, Wu F, et al. The efficacy and safety of endostar combined with taxane-based regimens for HER-2-negative metastatic breast cancer patients [J]. Oncotarget, 2016, 7(21): 31501-31507. DOI: 10. 18632/oncotarget. 8967.
- [22] Xu R, Ma N, Wang F, et al. Results of a randomized and controlled clinical trial evaluating the efficacy and safety of combination therapy with Endostar and S-1 combined with oxaliplatin in advanced gastric cancer [J]. Onco Targets Ther, 2013, 6: 925-929. DOI: 10. 2147/OTT. S46487.
- [23] Bai YJ, Huang LZ, Zhou AY, et al. Antiangiogenesis effects of endostatin in retinal neovascularization [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2013, 29(7): 619-626. DOI: 10. 1089/jop. 2012. 0225.
- [24] Campochiaro PA, Lauer AK, Sohn EH, et al. Lentiviral vector gene transfer of endostatin/angiostatin for macular degeneration (GEM) study [J]. Hum Gene Ther, 2017, 28(1): 99-111. DOI: 10. 1089/hum. 2016. 117.

(收稿日期: 2020-02-20 修回日期: 2020-08-03)

(本文编辑: 张宇)

读者·作者·编者

眼科常用英文缩略语名词解释

- AMD: 年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration)
- ANOVA: 单因素方差分析 (one-way analysis of variance)
- BUT: 泪膜破裂时间 (breakup time of tear film)
- DR: 糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy)
- EAU: 实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveitis)
- EGF: 表皮生长因子 (epidermal growth factor)
- ELISA: 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay)
- ERG: 视网膜电图 (electroretinogram)
- FFA: 荧光素眼底血管造影 (fundus fluorescein angiography)
- FGF: 成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor)
- GFP: 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein)
- IFN- γ : γ 干扰素 (interferon- γ)
- IL: 白细胞介素 (interleukin)
- IOL: 人工晶状体 (intraocular lens)
- IRBP: 光间受体视黄类物质结合蛋白 (interphotoreceptor retinoid binding protein)
- LASIK: 准分子激光角膜原位磨镶术 (laser in situ keratomileusis)
- ICGA: 吲哚菁绿血管造影 (indocyanine green angiography)
- LECs: 晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells)
- miRNA: 微小 RNA (microRNA)
- MMP: 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase)
- mTOR: 哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin)
- MTT: 四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium)
- NF: 核转录因子 (nuclear factor)
- OCT: 光相干断层扫描 (optical coherence tomography)
- OR: 优势比 (odds ratio)
- PACG: 原发性闭角型青光眼 (primary angle-closure glaucoma)
- PCR: 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)
- RGCs: 视网膜节细胞 (retinal ganglion cells)
- POAG: 原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma)
- RB: 视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma)
- RPE: 视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium)
- RNV: 视网膜新生血管 (retinal neovascularization)
- RP: 视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa)
- S I t: 基础泪液分泌试验 (Schirmer I test)
- shRNA: 小发夹 RNA (short hairpin RNA)
- siRNA: 小干扰 RNA (small interfering RNA)
- α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin)
- TAO: 甲状腺相关眼病 (thyroid-associated ophthalmopathy)
- TGF: 转化生长因子 (transforming growth factor)
- TNF: 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor)
- UBM: 超声生物显微镜 (ultrasound biomicroscope)
- VEGF: 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor)
- VEP: 视觉诱发电位 (visual evoked potential)

(本刊编辑部)