

Jagged1 在增生性糖尿病视网膜病变纤维血管膜中的表达及其意义

郭庆敏¹ 孟旭霞¹ 杨堃² 余川³

¹青岛大学附属医院眼科 266000; ²青岛大学附属医院中心实验室 266000; ³郑州大学第一附属医院眼科 450052

郭庆敏现在河北省眼科医院 河北省眼科学重点实验室 河北省眼部疾病临床医学研究中心, 邢台 054001

通信作者: 孟旭霞, Email: mengxuxia@163.com

【摘要】 目的 观察 Notch 配体 Jagged1 在增生性糖尿病视网膜病变 (PDR) 纤维血管膜中的表达及其意义。方法 于 2014 年 7 月至 2015 年 7 月在青岛大学附属医院眼科收集 PDR 患者 57 例 60 眼玻璃体切割术中纤维血管膜标本。根据术前是否行抗血管内皮生长因子药物玻璃体内注射将患眼分为未注药组 30 例 32 眼和注药组 27 例 28 眼, 其中注药组患眼于手术前 2~7 d 行雷珠单抗玻璃体内注射。收集同期非糖尿病伴特发性黄斑前膜患者 18 例 18 眼黄斑前膜标本为对照组。采用苏木精-伊红染色观察各组标本结构特征; 采用免疫组织化学染色法检测未注药组与注药组病理标本中 Jagged1、Delta 样配体 4 (Dll4) 和 Notch1 蛋白的表达; 采用实时荧光定量 PCR 测定各组标本中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 mRNA 相对表达量。采用 Pearson 线性相关分析评估 PDR 纤维血管膜标本中 Jagged1 mRNA 相对表达量与 Dll4 mRNA 和 Notch1 mRNA 相对表达量关系。结果 光学显微镜下可见 PDR 纤维血管膜中新生血管生成, 且注药组血管管腔狭窄, 未注药组血管管腔相对扩张, 黄斑前膜中未见新生血管。未注药组和注药组病理标本中均有 Jagged1、Dll4 和 Notch1 蛋白表达, 主要位于新生血管内皮组织中。未注药组病理标本中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 蛋白阳性染色吸光度 (A) 值分别为 6.25 ± 1.82 、 6.87 ± 1.89 和 5.12 ± 2.14 , 高于注药组的 1.46 ± 0.37 、 1.55 ± 0.24 和 1.32 ± 0.53 , 差异均有统计学意义 ($t = 5.168, P = 0.014$; $t = 6.012, P = 0.008$; $t = 3.453, P = 0.030$)。未注药组、注药组和对对照组病理标本中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 mRNA 相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 77.337, 62.305, 51.869$, 均 $P < 0.01$); 其中, 未注药组和注药组病理标本中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 mRNA 相对表达量均显著高于对照组, 注药组病理标本中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 mRNA 相对表达量均较未注药组明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。Jagged1 mRNA 相对表达量与 Dll4 和 Notch1 mRNA 相对表达量均呈显著正相关 ($r = 0.925, 0.950$, 均 $P < 0.05$)。结论 Jagged1 在 PDR 纤维血管膜血管内皮中呈高表达, 且与 Dll4 和 Notch1 的表达均呈正相关, Jagged1 参与新生血管形成的作用途径可能与 Dll4 及 Notch1 相关。

【关键词】 视网膜新生血管; 糖尿病视网膜病变, 增生性; Jagged1 蛋白

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20191018-00453

Expression and significance of Jagged1 in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy

Guo Qingmin¹, Meng Xuxia¹, Yang Kun², Yu Chuan³

¹Department of Ophthalmology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China; ²Central Lab, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China; ³Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Guo Qingmin is working at Hebei Eye Hospital, Hebei Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Hebei Provincial Clinical Research Center for Eye Diseases, Xingtai 054001, China

Corresponding author: Meng Xuxia, Email: mengxuxia@163.com

[Abstract] **Objective** To observe the expression and significance of Jagged1 in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy (PDR). **Methods** Sixty preretinal fibrovascular membrane specimens collected from fifty-seven patients (60 eyes) with PDR during vitrectomy in The Affiliated Hospital of Qingdao University from July 2014 to July 2015 were set as the PDR group. The patients were divided into the injection group (30 cases,

32 eyes) and non-injection group (27 cases, 28 eyes) according to whether they received anti-vascular endothelial factor drug intravitreally before surgery. Ranibizumab injections were administered to the patients in the injection group intravitreally 2–7 days before surgery. Eighteen macular epiretinal membrane specimens obtained from 18 non-diabetic patients were served as the control group. Hematoxylin-eosin staining was applied to observe the structural features of specimens. The immunohistochemical staining was used to detect the expression levels of Jagged1, Delta-like 4 (Dll4) and Notch1 in the injection and non-injection groups, and the real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction was performed to detect the relative expression levels of Jagged1, Dll4 and Notch1 mRNA in the three groups. Pearson linear correlation analysis was used to evaluate the relationships between the expression of Jagged1 mRNA and both Dll4 mRNA or Notch1 mRNA in the PDR fibrovascular membranes. This study protocol adhered to the Declaration of Helsinki and was approved by an Ethics Committee of The Affiliated Hospital of Qingdao University (No. QYFYWZLL25645). Written informed consent was obtained from each patient. **Results** The neovascularization was found in fibrovascular membranes of PDR with a light microscope, and the lumen of the new blood vessels in the injection group was narrow, but relatively dilated in the non-injection group. There was no neovascularization found in the macular epiretinal membranes. The immunohistochemical staining revealed that there was the positive expression of Jagged1, Dll4 and Notch1 proteins in all PDR membranes, mainly located in the vascular endothelium during neovascularization. The absorbance values of Jagged1, Dll4 and Notch1 proteins were 6.25 ± 1.82 , 6.87 ± 1.89 and 5.12 ± 2.14 respectively in the non-injection group, which were all higher than 1.46 ± 0.37 , 1.55 ± 0.24 and 1.32 ± 0.53 respectively in the injection group, showing statistically significant differences ($t = 5.168$, $P = 0.014$; $t = 6.012$, $P = 0.008$; $t = 3.453$, $P = 0.030$). There were statistically significant differences in Jagged1, Dll4 and Notch1 mRNA relative expression levels among the three groups ($F = 77.337, 62.305, 51.869$; all at $P < 0.01$). The relative expression levels of Jagged1, Dll4 and Notch1 mRNA in the fibrovascular membranes with PDR were significantly higher than those of control macular epiretinal membranes, and the relative expression levels of Jagged1, Dll4 and Notch1 mRNA of the injection group were significantly lower than those of the non-injection group (all at $P < 0.05$). The expression level of Jagged1 mRNA was positively correlated with expression levels of both Dll4 and Notch1 mRNA ($r = 0.925, 0.950$; both at $P < 0.05$). **Conclusions** There is a high expression of Jagged1 in the vascular endothelium of fibrovascular membranes with PDR and the Jagged1 expression is positively correlated with the expression of Dll4 and Notch1. The effect of Jagged1 on the neovascularization in PDR may be related to Dll4 and Notch1.

[Key words] Retinal neovascularization; Diabetic retinopathy, proliferative; Jagged1 protein

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20191018-00453

Notch 信号通路是一条进化上高度保守、通过调节细胞间相互作用来调控细胞命运的信号通路^[1]。Notch 的配体 Delta 样配体 4 (Delta-like 4, Dll4) 和 Jagged1 主要表达于血管内皮细胞,并在血管发育中发挥重要作用^[2]。有研究证实 Jagged1 不仅能促进肿瘤血管生成,还可通过拮抗 Dll4/Notch 信号通路发挥较强的血管生成调节作用^[3-6]。增生性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 是以眼底新生血管形成为主要病理改变的眼底病变, Jagged1 是否参与人类 PDR 新生血管的发生尚不清楚。本研究拟检测 PDR 患眼纤维血管膜病理标本中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 的表达,探讨 Jagged1 在 PDR 新生血管形成中的作用及其与 Dll4/Notch 信号通路的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源及分组 于 2014 年 7 月至 2015 年 7 月收集在青岛大学附属医院眼科行睫状体扁平部 23G 标准三通道玻璃体切割手术的 PDR 患者 57 例 60 眼中纤维血管膜标本,其中男 32 例 34 眼,女 25 例 26 眼;年龄 36~73 岁,平均 (54.93 ± 6.42) 岁;糖尿病病程 8~20 年,平均 (15.72 ± 3.51) 年。所有患者均符合 2 型糖尿病诊断标准及 PDR 诊断标准^[7-8]。排除标准:肺部疾病、严重肝肾功能不全、心脑血管病变、恶性肿瘤及自身免疫性疾病患者。根据术前是否行抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 药物玻璃体内注射将标本分为未注药组 30 例 32 眼和注药组 27 例 28 眼,各组年龄和性别构成比差异均无统计学意义 ($t = 4.642, 3.964$, 均 $P > 0.05$),注药组于玻璃体切割术前 2~7 d 行雷珠单抗玻璃体内注射。同期选取特发性黄斑前膜患者 18 例 18 眼中黄斑前膜标本作为对照组,排除标准:(1)有糖尿病及糖尿病家族史者;(2)有眼部及全身感染、急性炎症反



应及缺血缺氧性疾病史以及全身系统性疾病者。本实验中未注药组和注药组患者控制血糖的全身用药种类相同或相似,且均无其他全身用药;所有患者术前均采用相同的质量浓度 0.5% 左氧氟沙星滴眼液(日本参天制药有限公司)点眼清洁结膜囊,减轻眼部炎症反应,以确保组间患者基线资料均衡。本研究经青岛大学附属医院伦理审查委员会审查批准(批文号:QYFYWZLL25645),所有患者或其家属术前均签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔抗 Notch1(ab52627,英国 Abcam 公司);鼠抗 Dll4(A00875-1)、兔抗 Jagged1(A00901-4)、生物素标记羊抗兔 IgG(BA1003)(武汉博士德生物工程有限公司)。手术显微镜(VISU200p,德国 Carl Zeiss 公司);Constellation 玻璃体切割机(美国 Alcon 公司);高速离心机(Allegra X-22,美国 Beckman 公司);微量移液器(P4608-200°,美国 Labnet 公司);荧光定量 PCR 系统(Light Cycler 96,罗氏诊断产品有限公司);光学显微镜(DM6B)、石蜡切片机(RM2235)(德国 Leica 公司);紫外分光光度计(DR6000,美国哈希公司)。

1.2 方法

1.2.1 组织病理学染色观察各组标本结构特征 取未注药组新鲜标本 10 个、注药组新鲜标本 12 个和对照组标本 8 个,置于质量浓度 4% 多聚甲醛溶液中固定 5 h,无水乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋,沿标本最大截面处行 3 μm 厚连续切片,行常规苏木精-伊红染色,于光学显微镜下观察标本的组织结构。

1.2.2 免疫组织化学染色法检测各组标本中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 蛋白表达 选取 1.2.1 部分的石蜡切片,每个病理标本选取截面最大处连续切片 15 张,各选取 5 张按照免疫组织化学试剂盒操作步骤进行 Jagged1、Dll4 和 Notch1 蛋白的免疫组织化学染色。具体步骤为将 3 μm 厚组织切片置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温烤片箱中烤片 1 h;将切片浸于二甲苯 I、二甲苯 II 中各 5 min 进行脱蜡,梯度乙醇进行水化和除去二甲苯,自来水冲洗,0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗 2 次,每次 5 min;滴加体积分数 3% H_2O_2 室温孵育 10 min,0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;滴加抗原修复液,室温孵育 10 min,0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;滴加山羊血清封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱内孵育 20 min,甩去多余液体;滴加稀释后的 Jagged1、Dll4 和 Notch1 一抗(均 1:100 稀释),37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内孵育 2.5 h。0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;滴加生物素标记二抗

(1:50 稀释),室温孵育 15 min。0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 20 min,0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色 3 min, PBS 代替一抗作为阴性对照。细胞质内出现黄色、棕黄色或棕褐色颗粒为阳性表达。采用 Image pro plus 6.0 软件计算每张切片中阳性染色区域的平均吸光度(A)值,以各组病理标本中蛋白表达的平均值作为相应蛋白的表达量。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法测定标本中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 mRNA 的表达 分别取未注药组标本 22 个、注药组标本 16 个和对照组标本 10 个,置于消毒的离心管中,-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中冻存。取 50~100 mg 标本置于玻璃管中,加入 1 ml RNAiso plus 裂解液,提取总 RNA,采用紫外分光光度计检测其质量浓度和纯度,取 A_{260}/A_{280} 为 1.7~2.1 的样本用于后续实验。将提取的 RNA 逆转录成 cDNA,采用双链嵌合荧光染色法扩增相应基因。引物序列由北京六合华大基因科技有限公司合成。Jagged1 引物:正向 5'-AACTGGTACCGGTGCGAA-3',反向 5'-TGATGCAAGA TCTCCCTGAAAC-3';Dll4 引物:正向 5'-CCCTGGC AATGTACTTGTGAT-3',反向 5'-TGTTGGGTGCAGTA GTTGAG-3';Notch1 引物:正向 5'-GTCAACGCCGTAG ATGACC-3',反向 5'-TTGTTAGCCCCGTTCTTCAG-3';磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物:正向 5'-CACGATGGA GGGGCCGACTCATC-3',反向 5'-TAAAGACCTCTA TGCCAACACAGT-3'。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火及延伸 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各目的基因相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。计量资料数据经 Kolmogoror-Smirnov 检验证实呈正态分布,以 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示。未注药组、注药组和对照组标本间 Jagged1、Dll4 和 Notch1 蛋白及 mRNA 相对表达量差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。PDR 纤维血管膜标本中 Jagged1 mRNA 相对表达量与 Dll4 和 Notch1 mRNA 表达量关系评估采用 Pearson 线性相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组标本中组织病理学表现

光学显微镜下可见 PDR 纤维血管膜中新生血管

生成,注药组纤维血管膜中血管管腔狭窄,部分管腔闭合;未注药组纤维血管膜中血管管腔充盈,且形态较完整;对照组黄斑前膜组织疏密均匀,未见新生血管结构(图 1)。

2.2 未注药组与注药组标本中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 蛋白的表达比较

未注药组 10 个标本血管内皮细胞中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 蛋白表达均呈强阳性,主要表达在细胞质中,阳性细胞主要位于新生血管内皮组织,而非血管内皮部位的阳性染色考虑主要在切片及标本制作过程中,部分血管内皮细胞被牵拉移位至血管外部位所致;注药组 12 个标本血管内皮细胞中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 蛋白表达均呈弱阳性(图 2)。未注药组纤维血管膜病例标本中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 蛋白阳性区域平均 A 值明显高于注药组,差异均有统计学意义

($t = 5.168, P = 0.014; t = 6.012, P = 0.008; t = 3.453, P = 0.030$) (表 1)。

表 1 未注药组与注药组 Jagged1、Dll4 和 Notch1 蛋白免疫组织化学阳性染色平均 A 值比较 (mean±SD)
Table 1 Comparison of the average absorbance value of Jagged1, Dll4 and Notch1 between the two groups (mean±SD)

组别	样本量	阳性染色 A 值		
		Jagged1	Dll4	Notch1
未注药组	10	6.25±1.82	6.87±1.89	5.12±2.14
注药组	12	1.46±0.37	1.55±0.24	1.32±0.53
t 值		5.168	6.012	3.453
P 值		0.014	0.008	0.030

注:(独立样本 t 检验) Dll4:Delta 样配体 4
Note:(Independent samples t-test) Dll4:Delta-like 4

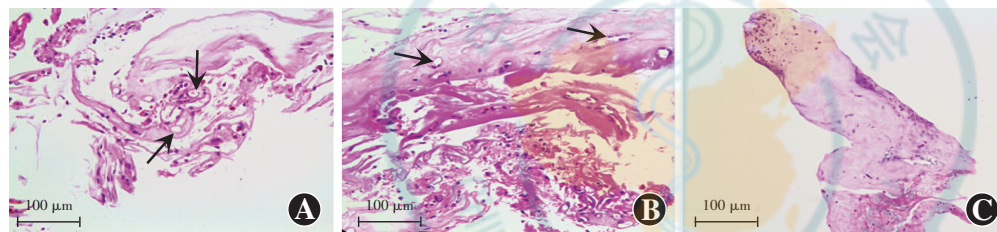


图 1 各组病理标本中新血管情况(HE ×100, 标尺=100 μm) A:未注药组纤维血管膜中可见新生血管管腔充盈(箭头) B:注药组纤维血管膜中血管管腔狭窄(箭头) C:对照组黄斑前膜中未见新生血管
Figure 1 Neovascularization in pathological specimens of each group(HE ×100, bar=100 μm) A: Dilated lumen (arrow) of new blood vessels was found in fibrovascular membranes of the non-injection group B: Narrow lumen (arrow) of new blood vessels was found in fibrovascular membranes of the injection group C: No neovascularization was found in macular epiretinal membranes of the control group

2.3 各组标本 Jagged1、Dll4 和 Notch1 mRNA 的表达比较

对照组、注药组和未注药组标本中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 77.337、62.305、51.869$, 均 $P < 0.01$);其中,未注药组和注药组标本中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 mRNA 相对表达量明显高于对照组,注药组 Jagged1、Dll4 和 Notch1 mRNA 相对表达量明显低于未注药组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$) (表 2)。

2.4 PDR 患者纤维血管膜标本中 Jagged1 与 Dll4 mRNA 和 Notch1 mRNA 相对表达量的相关性

所有 PDR 患者纤维血管膜标本中 Jagged1 mRNA 相对表达量与 Dll4 和 Notch1 mRNA 相对表达量均呈显著正相关,差异均有统计学意义 ($r = 0.925、0.950$, 均 $P < 0.05$) (图 3)。

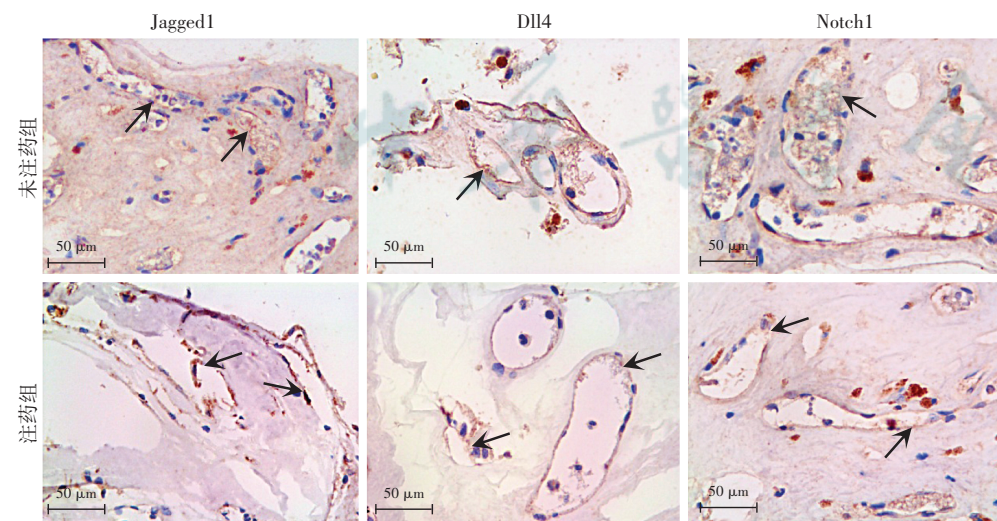


图 2 未注药组及注药组纤维血管膜病理标本中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 蛋白免疫组织化学染色图 (DAB ×400, 标尺=50 μm) 未注药组纤维血管膜中 Jagged1、Dll4 和 Notch1 蛋白均呈强阳性表达,注药组纤维血管膜中各蛋白表达减弱 箭头所示为染色阳性细胞
Figure 2 Immunohistochemical staining images of Jagged1, Dll4 and Notch1 proteins in specimens of the two groups(DAB ×400, bar=50 μm) Strong positive expression of Jagged1, Dll4 and Notch1 proteins could be seen in the non-injection group, and attenuated expression of the three proteins was found in the injection group Arrows indicated the positively stained cells

表 2 各组 Jagged1、Dll4 和 Notch1 mRNA 相对表达量比较 (mean±SD)

Table 2 Comparison of the relative expression levels of Jagged1, Dll4 and Notch1 mRNA among the three groups (mean±SD)

组别	样本量	各基因 mRNA 相对表达量		
		Jagged1	Dll4	Notch1
对照组	10	1.89±0.18	2.20±0.75	1.24±0.17
未注药组	22	21.33±2.22 ^a	38.85±11.34 ^a	9.91±2.33 ^a
注药组	16	7.56±0.49 ^{ab}	10.24±1.36 ^{ab}	4.67±1.19 ^{ab}
F 值		77.337	62.305	51.869
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与未注药组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) Dll4:Delta 样配体 4

Note:Compared with the control group,^a $P<0.05$;compared with the non-injection group,^b $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) Dll4:Delta-like 4

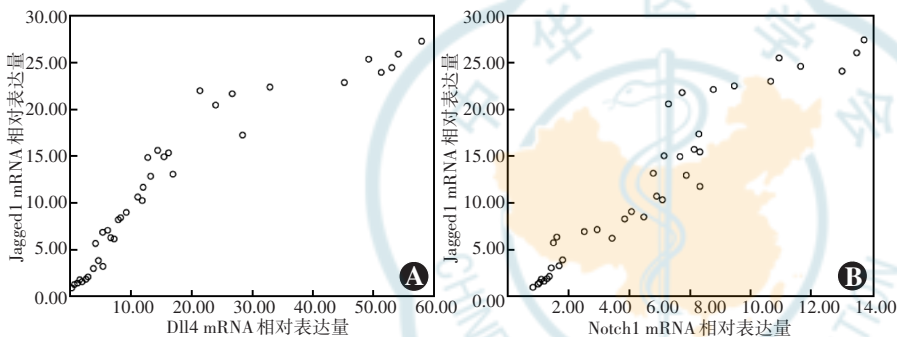


图 3 PDR 患者纤维血管膜标本中 Jagged1 与 Dll4 和 Notch1 mRNA 相对表达量相关分析散点图 (Pearson 线性相关分析, $n=38$) A: Jagged1 mRNA 相对表达量与 Dll4 mRNA 相对表达量呈显著正相关 ($r=0.925, P<0.05$) B: Jagged1 mRNA 相对表达量与 Notch1 mRNA 相对表达量呈显著正相关 ($r=0.950, P<0.05$) Dll4: Delta 样配体 4

Figure 3 Scatter diagram of the relative expression levels of Jagged1, Dll4 and Notch1 mRNA in fibrovascular membrane specimens from PDR patients (Pearson linear correlation analysis, $n=38$)

A: The relative expression level of Jagged1 mRNA was positively correlated with that of Dll4 mRNA ($r=0.925, P<0.05$) B: The relative expression level of Jagged1 mRNA was positively correlated with that of Notch1 mRNA ($r=0.950, P<0.05$) Dll4: Delta-like 4

3 讨论

糖尿病是一种常见的慢性疾病,约有 70% 的患者会并发全身小血管和微血管病变,其中糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病常见的眼底微血管并发症^[9-10]。PDR 可继发玻璃体反复积血、纤维增生,继而形成纤维条索,甚至出现牵拉性视网膜脱离,严重者致盲^[11]。

作为 Notch 信号通路的配体之一, Jagged1 主要表达于血管内皮细胞,参与血管的生成和发育,其基因突变将导致 Alagille 综合征,表现为严重的血管缺陷^[12],而卵巢癌及三阴乳腺癌的血管形成与 Jagged1 的表达上调密切相关^[13-15]。Guo 等^[16]对 2 型糖尿病模型大鼠进行研究发现,缺氧可通过激活 Jagged1-Notch1 信号通路诱导脑部新生血管生成;而 Zhao 等^[17]研究发

现,细胞色素 P450 2J2 可通过激活 Jagged1/Notch1 信号通路促进心肌血管形成,进而改善心衰患者的心功能状况。本研究结果显示, Jagged1 在 PDR 患者纤维血管膜中的表达显著高于对照组,考虑可能由于黄斑前膜组织无新生血管的形成和出芽,而注药组由于玻璃体内注射抗 VEGF 药物,造成部分视网膜新生血管消退萎缩,因此其 Jagged1 表达量较未注药组低。此外,本研究结果显示 Jagged1 与 Notch1 mRNA 相对表达量呈显著正相关,推测 Jagged1 与 Notch1 联合发挥调控新生血管生成的作用。

有研究证实, Jagged1 可促进血管增生,增加新生血管数量, Dll4 则抑制无功能血管的过度增生,使其功能成熟,二者相互拮抗,并保持动态平衡,共同促进血管正常生长发育,以保证血液循环系统的有效建立^[3,18]。同时,有研究发现, Jagged1 可作用于 Dll4/Notch1 信号通路下游,激活相邻细胞 Notch3 受体,参与平滑肌细胞分化过程并调节血管成熟;而内皮细胞特异性敲除 Jagged1 基因可导致血管平滑肌细胞分化障碍^[19-20]。史少阳等^[21]研究发现, Dll4 在视网膜新生血管形成的过程中发挥重要作用,并可能通过对 VEGFR 的反馈抑制发挥抑制病理性新生血管过度形成的作用。而本研究结果显示,注药组患眼纤维血管膜组织 Jagged1 和 Dll4 mRNA 及蛋白的表达量均低于未注药组,且 PDR 患眼纤维血管膜组织中 Jagged1 mRNA 与 Dll4 mRNA 表达呈正相关; Jagged1 与 Dll4 蛋白阳性表达部位大体一致,均主要表达于血管内皮组织,推测 Jagged1 与 Dll4 相互调节、相互制约,共同调节 PDR 新生血管的形成。同时,本研究结果显示,对照组黄斑前膜组织中无新生血管形成, Jagged1 和 Dll4 蛋白及 mRNA 表达量也明显降低,推测二者在促进病理性新生血管的发生和成熟过程中发挥一定作用。

本课题组前期研究发现,糖尿病模型大鼠视网膜中 VEGF 与 Dll4 和 Notch1 表达量均呈显著正相关^[22];结合本研究中 Jagged1 与 Dll4 和 Notch1 的相关性,推测 VEGF 与 Jagged1 的表达同样呈正相关。后续我们将继续探索其他相邻组织中 VEGF 等相关因子的表达,进一步评估其与 Jagged1 表达的相关性。

综上所述,本研究结果表明 Jagged1 可能参与 PDR 病理性新生血管的形成与发育过程,并可能与 Dll4/Notch1 信号通路相互制约与调控。本研究入组标本较少,免疫组织化学染色过程中发现部分阳性表达蛋白位于血管内皮细胞之外,且在血管新生过程中, Jagged1 与 Dll4 的表达并非完全同步。因此,未来我们将进一步行大样本临床试验,采用免疫荧光双标法确定细胞性质,并分析不同阶段 Jagged1 与 Dll4 表达的相关性,以更准确地评估 Jagged1 在 PDR 病变组织中的表达及作用,为临床预防和治疗 PDR 提供新的思路和靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development [J]. *Science*, 1999, 284(5415): 770-776. DOI: 10.1126/science.284.5415.770.
- [2] Peng J, Zhao S, Li Y, et al. DLL4 and Jagged1 are angiogenic targets of orphan nuclear receptor TR3/Nur77 [J]. *Microvasc Res*, 2019, 124: 67-75. DOI: 10.1016/j.mvr.2019.03.006.
- [3] Benedito R, Roca C, Sørensen I, et al. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1124-1135. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.025.
- [4] Benedito R, Rocha SF, Woeste M, et al. Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling [J]. *Nature*, 2012, 484(7392): 110-114. DOI: 10.1038/nature10908.
- [5] Siekmann AF, Affolter M, Belting HG. The tip cell concept 10 years after: new players tune in for a common theme [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(9): 1255-1263. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.01.019.
- [6] Zhang J, Ye J, Ma D, et al. Cross-talk between leukemic and endothelial cells promotes angiogenesis by VEGF activation of the Notch/Dll4 pathway [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(3): 667-677. DOI: 10.1093/carcin/bgs386.
- [7] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2010 [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33 Suppl 1: S11-61. DOI: 10.2337/dc10-S011.
- [8] 中华医学会眼科学会眼底病学组. 我国糖尿病视网膜病变临床诊疗指南(2014年) [J]. *中华眼科杂志*, 2014, 50(11): 851-865. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2014.11.014.
- [9] Sommerville DN. Vitrectomy for vitreous floaters: analysis of the benefits and risks [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2015, 26(3): 173-176. DOI: 10.1097/ICU.0000000000000150.
- [10] Madgula IM, Anand N. Long-term follow-up of zonulo-hyaloido-vitrectomy for pseudophakic malignant glaucoma [J]. *Indian J Ophthalmol*, 2014, 62(12): 1115-1120. DOI: 10.4103/0301-4738.149128.
- [11] Tai ELM, Goh Y, Wan-Hazabbah WH, et al. Factors predicting visual improvement post pars plana vitrectomy for proliferative diabetic retinopathy [J]. *Int Eye Sci*, 2017, 17(8): 1404-1409. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.8.04.
- [12] Vajro P, Ferrante L, Paoella G. Alagille syndrome: an overview [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2012, 36(3): 275-277. DOI: 10.1016/j.clinre.2012.03.019.
- [13] Feng Z, Xu W, Zhang C, et al. Inhibition of gamma-secretase in Notch1 signaling pathway as a novel treatment for ovarian cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(5): 8215-8225. DOI: 10.18632/oncotarget.14152.
- [14] Gopinathan G, Milagre C, Pearce OM, et al. Interleukin-6 stimulates defective angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(15): 3098-3107. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1227.
- [15] Xue S, He L, Zhang X, et al. Expression of Jagged1/Notch3 signaling pathway and their relationship with the tumor angiogenesis in TNBC [J]. *Arch Med Res*, 2017, 48(2): 169-179. DOI: 10.1016/j.arcmed.2017.03.014.
- [16] Guo Z, Jia J, Tu Y, et al. Altered Jagged1-Notch1 signaling in enhanced dysfunctional neovascularization and delayed angiogenesis after ischemic stroke in HFD/STZ induced type 2 diabetes rats [J/OL]. *Front Physiol*, 2021, 12: 687947 [2021-11-25]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34305641>. DOI: 10.3389/fphys.2021.687947.
- [17] Zhao Q, Huang J, Wang D, et al. Endothelium-specific CYP2J2 overexpression improves cardiac dysfunction by promoting angiogenesis via Jagged1/Notch1 signaling [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 123: 118-127. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.08.027.
- [18] Basu S, Barbur I, Calderon A, et al. Notch signaling regulates arterial vasoreactivity through opposing functions of Jagged1 and Dll4 in the vessel wall [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315(6): H1835-H1850. DOI: 10.1152/ajpheart.00293.2018.
- [19] Pedrosa AR, Trindade A, Fernandes AC, et al. Endothelial Jagged1 antagonizes Dll4 regulation of endothelial branching and promotes vascular maturation downstream of Dll4/Notch1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(5): 1134-1146. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.304741.
- [20] High FA, Lu MM, Pear WS, et al. Endothelial expression of the Notch ligand Jagged1 is required for vascular smooth muscle development [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(6): 1955-1959. DOI: 10.1073/pnas.0709663105.
- [21] 史少阳, 李迅, 裴存文, 等. Delta 样配体 4 单克隆抗体对视网膜新生血管形成和血管内皮生长因子表达的影响 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31(8): 723-728. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.08.004.
Shi SY, Li X, Pei CW, et al. The effect of Delta-like ligand 4 monoclonal antibody on retinal neovascularization and vascular endothelial growth factor expression [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2013, 31(8): 723-728. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.08.004.
- [22] 胡迭, 孟旭霞, 付浴东, 等. Notch-1 及 Delta 样配体 4 在糖尿病大鼠早期视网膜中的表达 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2016, 24(9): 840-844. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6187.2016.09.016.
Hu D, Meng XX, Fu YD, et al. Expression of Notch-1 and Dll-4 in retina of diabetic rats at early stage [J]. *Chin J Diabetes*, 2016, 24(9): 840-844. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6187.2016.09.016.

(收稿日期: 2021-06-16 修回日期: 2021-11-27)

(本文编辑: 张宇)