

色素上皮衍生因子对晶状体上皮细胞生长的促进作用及其机制

刘恬 刘奕志 钟惟德 项道满

【摘要】 背景 晶状体上皮细胞(LECs)是研究晶状体生理病理的基础,色素上皮衍生因子(PEDF)是存在于房水和晶状体中的多效能因子,但 PEDF 对 LECs 的生物学效应及其机制尚需深入探讨。目的 探讨 PEDF 在体内及体外对人 LECs 生长的调节作用及其机制。方法 在体内研究部分,纳入年龄相关性白内障患者 181 例 181 眼,在白内障手术过程中取患眼晶状体中央区 5.0~5.5 mm 直径的前囊膜标本,检测 LECs 密度并依此选择其中 60 份分为低密度组和高密度组各 30 例。采用逆转录 PCR(RT-PCR)法检测并比较 2 个组 LECs 中 PEDF mRNA 相对表达量的差异。在体外研究部分,PEDF 培养组在培养液中加入 50 ng/ml PEDF 培养人 LECs 株(HLE-B₃)72 h,正常培养的细胞作为对照组,采用流式细胞仪通过 AnnexinV-FITC/7-AAD 双染法检测并比较各组细胞周期的细胞比例和细胞凋亡率,采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测细胞中 VEGF mRNA 的相对表达量。结果 低密度组晶状体中央区前囊下 LECs 密度为(3 672±326)/mm²,PEDF mRNA 相对表达量为 0.43±0.05,明显低于高密度组的(4 857±350)/mm²和 0.55±0.04,差异均有统计学意义($t=4.16, P<0.05$; $t=3.82, P<0.05$)。PEDF 培养组 G₂+S 期细胞比例为(54.05±4.98)%,明显高于对照组的(28.54±4.27)%,差异有统计学意义($t=-6.32, P<0.01$);PEDF 培养组细胞凋亡率为(2.08±0.48)%,明显低于对照组的(13.50±0.72)%,差异有统计学意义($t=7.90, P<0.01$)。PEDF 培养组细胞内 VEGF mRNA 相对表达量为 6.1±2.2,明显低于对照组的 27.4±4.8,差异有统计学意义($t=5.48, P<0.01$)。结论 人眼内 PEDF 可通过抗凋亡及抑制 VEGF 表达等机制发挥促 LECs 增生的作用,LECs 中 PEDF 的变化可能与晶状体的老化及白内障的发生和发展有关。

【关键词】 人;晶状体/细胞学;上皮细胞/细胞学;眼蛋白/代谢;细胞培养;血管内皮生长因子;色素上皮衍生因子

Promotion effect of pigment epithelium-derived factor on the growth of lens epithelial cells Liu Tian, Liu Yizhi, Zhong Weide, Xiang Daoman. Department of Ophthalmology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510623, China

Corresponding author: Liu Tian, Email: 19437716@qq.com

【Abstract】 **Background** Lens epithelial cells (LECs) is the key of lens pathophysiological study. Pigment epithelium derived factor (PEDF) is a multifaceted factor and exists in aqueous humor and lens tissue, but its biological effect on LECs needs further study. **Objective** To investigate the regulation effect of PEDF on the growth of human LECs and related mechanisms *in vivo* and *in vitro*. **Methods** In the part of *in vivo* study, 181 eyes of 181 patients with age-related cataract were included to collect the central lens anterior capsule during the surgery under the approval of Ethic Committee of Sun Yat-sen University and informed consent of patients. The selected specimens were divided into the LECs low density group and high density group based on hematoxylin and eosin staining results and 30 specimens for each. The relative expressing levels of PEDF mRNA in the LECs were detected by reverse transcription PCR. In the part of *in vitro* study, human lens epithelial cell line (HLE-B₃) was cultured, and 50 ng/ml PEDF was added in media for 72 hours in the PEDF culture group, while normal cultured cells were used as the control group. The percentage of LECs in G₀ and S phases and apoptotic rate of the cells were assayed using flow

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.011

基金项目:国家自然科学基金项目(81270981);广州市医药卫生科技项目(201102A213124)

作者单位:510623 广州市妇女儿童医疗中心眼科(刘恬、项道满);510060 广州,中山大学中山眼科中心 白内障科暨国家眼科重点实验室(刘奕志);510180 广州医科大学附属广州市第一人民医院 广东省临床分子医学及分子诊断重点实验室(钟惟德)

通信作者:刘恬, Email: 19437716@qq.com

cytometry with AnnexinV-FITC/7-AAD double staining method. Intracellular expression of VEGF mRNA was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The central anterior subcapsular LECs density and relative expression level of PEDF mRNA were $(3\ 672 \pm 326)/\text{mm}^2$ and 0.43 ± 0.05 in the low density group, which were lower than $(4\ 857 \pm 350)/\text{mm}^2$ and 0.55 ± 0.04 in the high density group, showing significant differences between the two groups ($t=4.16, 3.82$, both at $P<0.05$). The percentage of the cells in G_2+S phase was $(54.05 \pm 4.98)\%$ in the PEDF culture group, and that in the control group was $(28.54 \pm 4.27)\%$, with a significant difference between them ($t=-6.32, P<0.01$). The apoptotic rate in the PEDF culture group was significantly reduced in comparison with the control group ($[2.08 \pm 0.48]\%$ versus $[13.50 \pm 0.72]\%$) ($t=7.90, P<0.01$). In addition, the expressing level of VEGF mRNA was lower in the PEDF culture group compared with the control group (6.1 ± 2.2 versus 27.4 ± 4.8) ($t=5.48, P<0.01$). **Conclusions** In human eyes, PEDF may function as cytotrophic factor to promote survival of LECs through anti-apoptosis and reducing-expression of VEGF. Decrease of PEDF content in LECs probably modulate the pathophysiological process of lens cells and further cataractogenesis.

[Key words] Human; Lens, crystalline/cytology; Epithelial cells/cytology; Eye protein/metabolism; Cells, cultured; Vascular endothelial growth factor; Pigment epithelium-derived factor

晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)的生物学行为受细胞内外多种信号分子的调控,这是调节晶状体细胞生长和老化及白内障发生和发展的关键机制之一。色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)是在胚胎和成体内广泛分布的多效能因子,其在组织细胞中的营养保护功能及其与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的拮抗关系已有深入研究。我们的前期研究也发现,人眼房水和 LECs 中的 PEDF 水平随机体的衰老及白内障程度的加重而明显下调^[1-2],但关于 PEDF 对 LECs 生长的调节作用及其相关的分子机制研究目前鲜见报道。本研究拟通过体内外研究探讨 PEDF 对人 LECs 生长的调节作用及其机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 研究对象 (1)体内研究 纳入 2006 年 1—6 月于中山大学中山眼科中心就诊的拟行手术治疗的年龄相关性白内障者 181 例 181 眼,其中男 102 例 102 眼,女 79 例 79 眼;年龄 60~90 岁。排除标准:①存在晶状体前囊膜混浊或年龄相关性白内障以外的其他特殊晶状体混浊形态。②先天性、代谢性、继发性白内障。③合并糖尿病、青光眼、葡萄膜炎、眼底病变、眼外伤或内眼手术史者。按 LOCS II 分类标准将晶状体皮质混浊分为 C_{2-5} 级,核混浊分为 N_{2-3} 级,后囊下混浊有或无。本研究经中山大学医学伦理委员会批准,患者术前均签署知情同意书。(2)体外研究 人 LECs 系 HLE-B₃ 由广东省临床分子医学及分子诊断重点实验室提供, HLE-B₃ 细胞株培养于体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中,将光学显微镜下细胞生长良好、密度达 70%~90% 并经胰酶消化的细胞保存备用。

1.1.2 主要试剂及仪器 PEDF (20 μg) (美国 Peprotech 公司); 磷脂酰丝氨酸试剂盒 (美国 BD 公司); 逆转录试剂盒 (PrimeScript™ RT-Reagent Kit)、荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Premix Ex Ta™ (日本 Takara 公司); Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司)。通过查询 Primerbank 获取 PEDF、VEGF 和内参 β -actin 的引物并由美国 Invitrogen 公司合成。IQ5 型 real-time PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); 流式细胞仪 (美国 BD FACS Calibur 公司); Thermo Scientific NanoDrop 2000 紫外分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 方法

1.2.1 逆转录 PCR 法检测患眼 LECs 中 PEDF mRNA 的表达 常规超声乳化白内障摘出术中经环形撕囊获取晶状体中央区 5.0~5.5 mm 直径的前囊膜 (含囊下上皮细胞)。将前囊膜标本等分为 2 份,一份立即浸于质量分数 4% 多聚甲醛液进行固定以备细胞密度检测,另一份立即投入 EP 管 Trizol 中振荡后保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用以进行 PEDF mRNA 表达的检测。

标本平铺后行苏木素-伊红染色,用接目镜测微尺附件测定任意 3 个视野细胞数,取平均值,计算 LECs 密度。选择其中低于 $4\ 000/\text{mm}^2$ 和高于 $4\ 500/\text{mm}^2$ 的前囊膜标本各 30 份分别作为低密度组和高密度组。

用于检测 PEDF mRNA 表达的标本按相近原则将 5 份囊膜合并为 1 个样本,每组共 6 个样本。采用组织样品冷冻匀浆一步法提取晶状体囊膜组织中总 RNA,按逆转录试剂盒步骤合成 cDNA。PEDF 上游引物序列为 5'-TGTGCAGGCTTAGAGGGACT-3',下游为 5'-GTTACACGGGACTTTGAAGA-3'; 内参照 β -actin 上游引物序列为 5'-GGTGGCTTTTAGGATGGCAAG-3',下游为 5'-ACTGGAACGGTGAAGGTGACAG-3'。常规半

定量逆转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 扩增 mRNA、电泳、成像。用 Bio-Rad 软件分析扩增片段, 计算每个样本目的基因和内参的吸光度(A) 比值, 即 PEDF mRNA 的相对表达量。实验重复 6 次。

1.2.2 AnnexinV 法检测 LECs 的生长和凋亡 培养液中加入 50 ng/ml PEDF 培养 HLE-B₃ 细胞 72 h 作为 PEDF 培养组, 同期正常培养的细胞株为对照组。用流式细胞仪通过磷脂酰丝氨酸试剂盒 (AnnexinV-FITC/7-AAD 双染法) 检测各组细胞周期和凋亡情况。2 个组分别取悬浮细胞 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ 个, 加入结合缓冲液 100 μ l 和 AnnexinV-FITC 10 μ l, 避光孵育后再先后加入 7-AAD 溶液 5 μ l 和结合缓冲液 400 μ l, 立即用流式细胞仪定量测定细胞周期的分布和凋亡率。以不加 AnnexinV-FITC 及 7-AAD 的 1 管作为阴性对照进行参数值的设定。实验重复 6 次。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测 LECs 中 VEGF mRNA 的相对表达量 分别取 PEDF 培养组和对照组的细胞悬液, 用 Trizol 提取细胞总 RNA 后, 逆转录按照 Takara 试剂盒的说明进行操作。VEGF 上游引物序列为 5'-TTCAGAGCGGAGAAAGCATT-3', 下游为 5'-GAGGAGGCTCCTTCCTGC-3', 扩增产物片段大小为 166 bp; β -actin 作为内参照, 扩增产物为 161 bp。引物在荧光定量 PCR 仪上进行反应, 反应参数为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共 40 次循环。反应完成后用 IQ5 软件输出, 用比较 Ct 值法分析表达差异。实验重复 6 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。计量资料数据经 W 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数经 Bartlett 检验方差齐。单因素干预两水平实验设计, 低密度组与高密度组间患者年龄、LECs 密度和 PEDF mRNA 相对表达量的比较以及 PEDF 培养组与对照组间 LECs 在 G₀+S 期的分布比例、细胞凋亡率和细胞中 VEGF mRNA 相对表达量的比较均采用独立样本 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 个组年龄、LECs 密度及 PEDF 相对表达量比较

患眼晶状体中央区前囊下 LECs 密度为 3 346 ~ 5 207/mm², 其中低密度组平均值明显低于高密度组, 差异有统计学意义 ($t=4.16, P<0.05$); 2 个组患者的平均年龄差异无统计学意义 ($t=-1.57, P>0.05$); 低密度组 LECs 中 PEDF mRNA 的相对表达量明显低于高密度组, 差异有统计学意义 ($t=3.82, P<0.05$) (表 1)。

表 1 低密度组与高密度组间患者年龄、LECs 密度及 PEDF mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	年龄 (岁, n=30)	LECs 密度 (/mm ² , n=30)	PEDF 相对表达量 (n=6)
低密度组	76.8±6.2	3 672±326	0.43±0.05
高密度组	74.5±6.9	4 857±350	0.55±0.04
t	-1.57	4.16	3.82
P	>0.05	<0.05	<0.05

注: LECs: 晶状体上皮细胞; PEDF: 色素上皮衍生因子 (独立样本 t 检验)

2.2 PEDF 培养后 LECs 增生及凋亡情况

PEDF 培养组培养 HLE-B₃ 细胞 24、48 和 72 h 后, 光学显微镜下观察可见细胞形态与正常培养的细胞株无明显变化, 未发现纤维分化细胞。PEDF 培养组培养 HLE-B₃ 细胞 72 h 后, G₂+S 期细胞比例为 (54.05±4.98)%, 对照组为 (28.54±4.27)%, 差异有统计学意义 ($t=6.32, P<0.01$), 即 PEDF 培养的 HLE-B₃ 细胞增生活性明显增强。对照组细胞凋亡率明显高于 PEDF 培养组, 差异有统计学意义 ($t=7.90, P<0.01$), 即 PEDF 培养的 HLE-B₃ 细胞凋亡被显著抑制 (图 1, 表 2)。

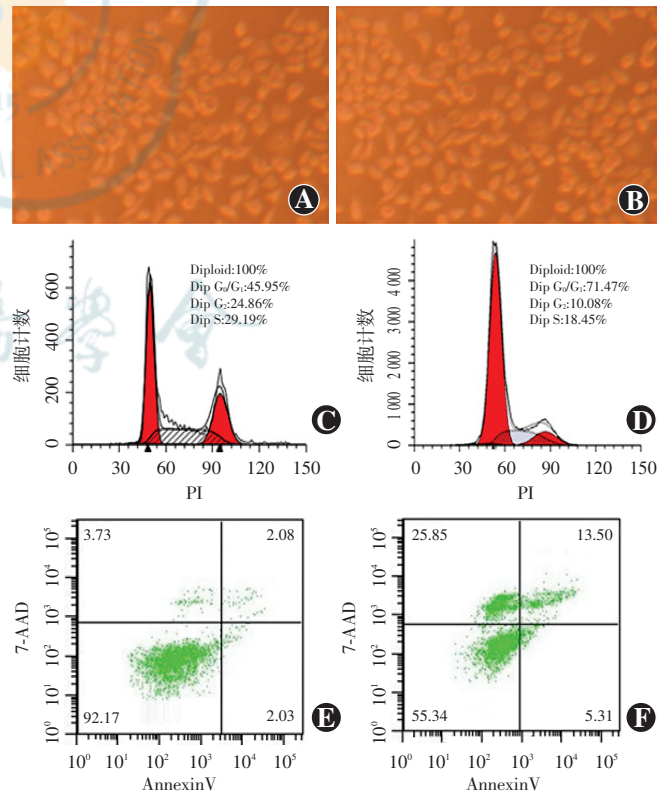


图 1 PEDF 培养组与对照组培养 HLE-B₃ 72 h 的细胞形态、细胞周期分布和凋亡率的比较 ($\times 100$) A: PEDF 培养组培养的细胞形态与对照组接近 B: 对照组细胞形态 C: PEDF 培养组 G₂ 期和 S 期细胞比例高于对照组 D: 对照组 G₂ 期和 S 期细胞比例 E: PEDF 培养组 HLE-B₃ 细胞凋亡率 (第 4 象限) 明显低于对照组 F: 对照组细胞凋亡率 (第 4 象限) 明显高于 PEDF 培养组

表 2 PEDF 培养组与对照组 G₂+S 期
细胞比例及凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	G ₂ +S 期细胞比例	凋亡率
PEDF 培养组	30	54.05±4.98	2.08±0.48
对照组	30	28.54±4.27	13.50±0.72
<i>t</i>		-6.32	7.90
<i>P</i>		<0.01	<0.01

注: PEDF: 色素上皮衍生因子(独立样本 *t* 检验)

2.3 LECs 中 VEGF mRNA 的相对表达量

PEDF 培养组和对照组 HLE-B₃ 细胞株中 VEGF mRNA 的相对表达值分别为 6.1±2.2 和 27.4±4.8, PEDF 培养后 72 h 细胞中 VEGF mRNA 的表达水平较对照组下调了 77.8%, 差异有统计学意义 ($t = 5.48, P < 0.011$)。

3 讨论

人胚胎 7 周龄起眼内多种细胞即可合成 PEDF, 在成体眼内 PEDF 的基因和蛋白广泛分布于视网膜、脉络膜、睫状体和角膜, 在眼内液中也有较高浓度^[3], 一般认为眼内 PEDF 的作用主要是保护视网膜并促进其分化以及抑制组织中异常血管的生成^[4]。Ogata 等^[5]在鼠眼 LECs 中发现了 PEDF 的表达, Segev 等^[6]用 cDNA 微序列技术研究人眼 LECs 的分子特征发现, PEDF 基因存在于 LECs 中并与白内障有关。我们前期的研究进一步证实, 人眼房水中及前囊下 LECs 中的 PEDF 水平均与年龄和白内障的病情呈负相关^[1-2], 但 PEDF 与人眼 LECs 代谢的关系却一直未得到关注。除了维持晶状体的无血管化状态外, 细胞内外的 PEDF 是如何对 LECs 的生存或衰老、增生或分化等细胞性状产生影响的, 其究竟是通过哪些机制来发挥调控作用的, 且其在晶状体生理及病理过程中究竟起怎样的作用等问题均值得深入探讨, 目前鲜见相关报道。

本研究发年龄相关性白内障患者晶状体中央区前囊下 LECs 密度的减少伴随着细胞内 PEDF 表达水平的下调, 推测与 LECs 的增生活性下降及细胞凋亡有关, 体外实验发现 PEDF 可促进 LECs 的增生, 抑制 LECs 的凋亡, 并可下调细胞内 VEGF 的表达。

PEDF 是一种多效能细胞因子, 其作用包括抗血管生成、抗肿瘤、抗氧化、营养和保护细胞等, 可发挥抑制细胞分裂或诱导凋亡和促进细胞存活增生或抵抗凋亡早衰的双重作用, 其生物学效应受细胞类型、环境差异、转录或翻译后修饰形成的异构体、不同受体或功能表位介导的信号途径等因素影响^[7-9]。根据本研究的结果推测, PEDF 可通过自分泌和/或旁分泌的方式参

与晶状体的生长发育和细胞保护, 在维持晶状体囊膜中央区 LECs 的存活和生物活性、抑制 LECs 的氧化损伤和凋亡、与其他细胞因子共同调节 LECs 的增生和分化等方面发挥一定的作用, PEDF 在 LECs 中的相对表达水平下调可能是白内障发生和发展的重要因素。

机体衰老的主要特征是多种基因表达水平的改变。LECs 作为晶状体结构维持、功能发挥和代谢进行的载体, 其衰老程度是致病的决定性因素之一。PEDF 又称为早期群体倍增 cDNA-1, 是某些类型细胞的寿命相关因子, 是反映 G₀ 期细胞增生潜能的特异性基因, 在老化的组织和细胞中表达量显著下调, 用 PEDF 对某些类型细胞进行培养可明显延长原代细胞的生存时间, 增加传代次数, 延缓细胞株的复制和衰老进程, 研究也证实体内 PEDF 水平和某些年龄相关性病变的进展有关^[10-11]。正常情况下晶状体中央区前囊下 LECs 多分布于 G₀ 期并保持着增生活性, 我们先前的研究发现, LECs 中 PEDF 的表达随年龄的增长而下调, 本研究也发现白内障眼 LECs 密度减小也与 PEDF 表达水平的降低有关, 提示 PEDF 基因可能也是 LECs 寿命相关基因, 细胞内 PEDF 表达衰减是 LECs 衰老的标志, 又是中央区 LECs 增生潜能下降的指标之一。

晶状体处于紫外线、钙超载、氧化剂等引起的应激中, 作为第一道防线 LECs 内外存在诸多保护因子和酶形成的抗氧化抗凋亡的强大防御系统, 但随着机体衰老许多关键基因和蛋白含量逐渐下调或活性降低, 环境危险因素诱导的 LECs 氧化损伤和凋亡是晶状体老化、白内障发生和发展的重要机制^[12]。PEDF 是许多类型细胞的保护因子, 可抑制细胞内活性氧簇的生成, 或激活核因子- κ B 介导的信号转导通路, 上调 bcl-2、bcl-x、Mn-SOD 多种抗凋亡蛋白表达, 或下调 p53/p16 表达, 或维持细胞内钙平衡等机制促进细胞生存, 发挥抗氧化、抗凋亡的细胞保护效应^[13-14]。Yang 等^[15]在原代培养的人 LECs 中发现, 下调 PEDF 基因表达可导致与白内障发生和发展直接相关的波形蛋白表达下降和 α B-晶状体蛋白表达上升, 提示 PEDF 在晶状体内表达下调可引起多种氧化应激反应。本研究中发现, 房水及 LECs 中 PEDF 水平降低与白内障程度和前囊下 LECs 数量减少相关, 体外实验证实 PEDF 抑制 LECs 凋亡, 推测 PEDF 可介导某些信号系统起抗氧化、抗凋亡作用, 从而保护中央区 LECs, 其合成分泌减少可降低 LECs 的抗应激能力, 导致损伤和凋亡增加, 从而参与白内障发生和发展的病理过程。

晶状体细胞终生生长, 在赤道部生发区 LECs 分裂活跃并适时分化, 生理状态下细胞增生速度呈年龄

依赖性下降,白内障的病理学基础之一是赤道部细胞增生分化的紊乱,这种过程受到细胞内相关基因改变及细胞外生长调节因子失衡等影响^[16]。正常情况下体内 PEDF 和 VEGF 含量和比例处于一种动态平衡,协同调节细胞生长和内环境稳定,前者促进细胞增生和抑制新生血管,而后者促进细胞分化和诱导血管增生^[17]。已有研究证实,在胚胎和成人的 LECs 和浅层有核纤维细胞中均存在 VEGF 及其受体,其表达水平在发育期和衰老期呈双峰样^[18];我们先前的研究也证实房水和 LECs 中存在 PEDF,并且其表达水平随年龄的增长而下降,提示 VEGF 和 PEDF 的生物活性贯穿于晶状体的发育和代谢过程,一方面可能先后促进胚胎期晶状体血管膜的形成和退化^[19],另一方面共同调节晶状体细胞的生物活动,它们在不同时期的功能不同,由不同的信号转导机制所决定。Saint-Geniez 等^[20]和 Neelam 等^[21]研究发现,外源性 VEGF 可影响 HLEC-B₃ 的细胞周期,其作用呈剂量依赖性,并可介导缺氧诱导因子-1,进而促进 VEGF 的合成,前者尤其对生发区 LECs 的增生发挥抑制作用,且呈年龄相关性^[22]。本研究结果还显示,外源性 PEDF 可促进 HLE-B₃ 增生,并可下调 VEGF 表达,由此本研究认为 PEDF 和 VEGF 共同参与调控生发区 LECs 的生长和分化, PEDF 或者类似在角膜缘干细胞通过激活 p38MAPK 和 STAT3 而直接发挥丝裂原效应^[23],或者通过内在反馈抑制 VEGF 上调,间接发挥促进细胞增生的作用。随着机体的老化而出现的 LECs 生长速度减慢及 LECs 增生分化异常可能与 VEGF 水平上升和 PEDF 水平下降有关。我们今后将进一步研究在晶状体不同区域、不同发育阶段 PEDF 表达与 VEGF 表达的关系,以及它们调控 LECs 生长的信号通路。

本研究以人 LECs 为研究对象,通过体内外研究探讨 PEDF 对 LECs 的影响,揭示 PEDF 具有促 LECs 增生和抗 LECs 凋亡的功能,并与 VEGF 有拮抗关系。本研究推断, PEDF 在晶状体可能以旁分泌和自分泌的形式,通过抗氧化、抗凋亡的机制来延缓细胞衰老和维持细胞生存,通过抑制 VEGF 的表达并与其协同作用来调控细胞周期和提高细胞增殖活性,从而发挥促进细胞生长的 LECs 营养因子效应,为后续的晶状体发育、白内障致病的分子机制研究提供了新的思路。

参考文献

- [1] Liu T, Liu Y, Wu M. Pigment epithelium-derived factor in cataractous aqueous humor and lens epithelial cells[J]. Yan Ke Xue Bao, 2006, 22(1): 40-46, 53.
- [2] 刘恬, 刘奕志, 项道满. 色素上皮衍生因子在人晶状体上皮细胞表达的意义[J]. 国际眼科杂志, 2011, 11(6): 973-975. doi: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.06.011.
- [3] Karakojis PC, John SK, Behling KC, et al. Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues[J]. Mol Vis, 2001, 7: 154-163.
- [4] Barnstable CJ, Tombran-Tink J. Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential[J]. Prog Retin Eye Res, 2004, 23(5): 561-577. doi: 10.1016/j.preteyeres.2004.05.002.
- [5] Ogata N, Wada M, Otsuji T, et al. Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(4): 1168-1175.
- [6] Segev F, Mor O, Segev A, et al. Downregulation of gene expression in the ageing lens: a possible contributory factor in senile cataract[J]. Eye (Lond), 2005, 19(1): 80-85. doi: 10.1038/sj.eye.6701423.
- [7] Liu JT, Chen YL, Chen WC, et al. Role of pigment epithelium-derived factor in stem/progenitor cell-associated neovascularization[J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012: 871272 [2014-05-23]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3364713/. doi: 10.1155/2012/871272.
- [8] Becerra SP, Notario V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(4): 258-271. doi: 10.1038/nrc3484.
- [9] Subramanian P, Crawford SE, Becerra SP. Assays for the antiangiogenic and neurotrophic serpin pigment epithelium-derived factor[J]. Methods Enzymol, 2011, 499: 183-204. doi: 10.1016/B978-0-12-386471-0.00010-9.
- [10] Kolomeyer AM, Sugino IK, Zarbin MA. Characterization of conditioned media collected from cultured adult versus fetal retinal pigment epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(8): 5973-5986. doi: 10.1167/iovs.10-6965.
- [11] Elahy M, Baidur-Hudson S, Dass CR. The emerging role of PEDF in stem cell biology[J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012: 239091 [2014-06-01]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3362874/. doi: 10.1155/2012/239091.
- [12] Babizhayev MA, Vishnyakova KS, Yegorov YE. Telomere-dependent senescent phenotype of lens epithelial cells as a biological marker of aging and cataractogenesis; the role of oxidative stress intensity and specific mechanism of phospholipid hydroperoxide toxicity in lens and aqueous[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2011, 25(2): 139-162. doi: 10.1111/j.1472-8206.2010.00829.x.
- [13] Ishibashi Y, Matsui T, Ohta K, et al. PEDF inhibits AGE-induced podocyte apoptosis via PPAR-gamma activation[J]. Microvasc Res, 2013, 85: 54-58. doi: 10.1016/j.mvr.2012.10.007.
- [14] Cao Y, Yang T, Gu C, et al. Pigment epithelium-derived factor delays cellular senescence of human mesenchymal stem cells in vitro by reducing oxidative stress[J]. Cell Biol Int, 2013, 37(4): 305-313. doi: 10.1002/cbin.10041.
- [15] Yang J, Luo L, Liu X, et al. Down regulation of the PEDF gene in human lens epithelium cells changed the expression of proteins vimentin and alphaB-crystallin[J]. Mol Vis, 2010, 16: 105-112.
- [16] Martinez G, de Jongh RU. The lens epithelium in ocular health and disease[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(12): 1945-1963. doi: 10.1016/j.biocel.2010.09.012.
- [17] Matsui T, Nishino Y, Maeda S, et al. PEDF-derived peptide inhibits corneal angiogenesis by suppressing VEGF expression[J]. Microvasc Res, 2012, 84(1): 105-108. doi: 10.1016/j.mvr.2012.02.006.
- [18] Shui YB, Wang X, Hu JS, et al. Vascular endothelial growth factor expression and signaling in the lens[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(9): 3911-3919. doi: 10.1167/iovs.02-1226.
- [19] Garcia CM, Shui YB, Kamath M, et al. The function of VEGF-A in lens development; formation of the hyaloid capillary network and protection against transient nuclear cataracts[J]. Exp Eye Res, 2009, 88(2): 270-276. doi: 10.1016/j.exer.2008.07.017.
- [20] Saint-Geniez M, Kurihara T, D'Amore PA. Role of cell and matrix-bound VEGF isoforms in lens development[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(1): 311-321. doi: 10.1167/iovs.08-2461.
- [21] Neelam S, Brooks MM, Cammarata PR. Lenticular cytoprotection. Part 1: the role of hypoxia inducible factors-1 α and -2 α and vascular endothelial growth factor in lens epithelial cell survival in hypoxia[J]. Mol Vis, 2013, 19: 1-15.
- [22] Shui YB, Arbeit JM, Johnson RS, et al. HIF-1: an age-dependent regulator of lens cell proliferation[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(11): 4961-4970. doi: 10.1167/iovs.08-2118.
- [23] Ho TC, Chen SL, Wu JY. PEDF promotes self-renewal of limbal stem cell and accelerates corneal epithelial wound healing[J]. Stem Cells, 2013, 31(9): 1775-1784. doi: 10.1002/stem.1393.

(收稿日期: 2014-08-19)

(本文编辑: 刘艳)