

· 实验研究 ·

PRMT1 及其抑制剂在小鼠角膜新生血管发生和发展中的作用及机制

高月兰 邓谦 毛介文 张瑞 石晓硕 万珊珊 杨燕宁

武汉大学人民医院眼科中心, 武汉 430060

通信作者: 杨燕宁, Email: yangyaning@whu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨蛋白质精氨酸甲基转移酶 1 (PRMT1) 及其抑制剂在碱烧伤诱导的角膜新生血管 (CNV) 中的作用及机制。 **方法** 选取 SPF 级 C57BL/6 小鼠 72 只, 采用随机数字表法将其随机分为正常组、造模后 1 d 组、造模后 4 d 组和造模后 7 d 组, 构建碱烧伤诱导的 CNV 模型, 以确定最佳时间点。另取 90 只小鼠随机分为碱烧伤组、二甲亚砜 (DMSO) 组、PRMT1 抑制剂组、成纤维细胞生长因子 2 (FGF2) 抑制剂组和 PRMT1 抑制剂+FGF2 组, 评估 PRMT1 在 CNV 中的作用。选取人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 和小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (RAW264.7) 构建缺氧/复氧 (H/R) 诱导的细胞模型, 分为对照组、H/R 组、H/R+DMSO 组、H/R+si-NC 组、H/R+si-PRMT1 组、H/R+si-FGF2 组、H/R+PRMT1 抑制剂组和 H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组。采用裂隙灯显微镜检测各组角膜混浊度和 CNV 程度; 采用苏木精-伊红染色检测各组角膜形态及炎性细胞数量; 采用免疫组织化学染色检测各组 PRMT1 阳性细胞数目; 采用免疫荧光染色检测各组 PRMT1、血小板-内皮细胞黏附分子 (CD31)、血管内皮生长因子 (VEGF)、F4/80、CD206、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的阳性细胞数目; 采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 法检测各组巨噬细胞标志物 F4/80、iNOS、CD206、白细胞介素 10 (IL-10) 和精氨酸酶 1 (Arg-1) 等相关分子的表达变化; 采用 CCK8 法、细胞划痕法、细胞 Transwell 迁移实验、细胞管形成实验比较各组细胞增殖、迁移和管形成能力。 **结果** 与正常组相比, 造模后 7 d 组小鼠角膜混浊度评分和 CNV 面积增加, VEGF 表达上调, 炎性细胞数量增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。碱烧伤组 PRMT1 阳性细胞计数为 (39.67 ± 3.51) 个/视野, 明显高于正常组的 (3.33 ± 0.58) 个/视野, 差异有统计学意义 ($t = 17.68, P < 0.01$)。碱烧伤组 PRMT1 和 FGF2 mRNA 和蛋白相对表达量明显高于正常组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。与碱烧伤组相比, PRMT1 抑制剂组角膜混浊度评分降低, CNV 面积减小, 角膜炎性细胞计数减少, PRMT1、FGF2、VEGF、Arg-1、IL-10 蛋白及 CD206 mRNA 相对表达量降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。H/R 组各时间点细胞活力值、细胞迁移距离、细胞迁移数量、管形成数量较对照组增加, H/R+si-PRMT1 组和 H/R+PRMT1 抑制剂组较 H/R 组减少, H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组较 H/R+PRMT1 抑制剂组增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与 H/R 组相比, H/R+PRMT1 抑制剂组 FGF2、VEGFA、p-PI3K、p-Akt 相对表达量下调, H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组 FGF2、VEGFA、p-PI3K、p-Akt 相对表达量较 H/R+PRMT1 抑制剂组上调, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。H/R 组、H/R+DMSO 组、H/R+PRMT1 抑制剂组和 H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组 CD206 阳性细胞比均高于对照组, H/R 组、H/R+DMSO 组、H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组 CD206 阳性细胞比均高于 H/R+PRMT1 抑制剂组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与碱烧伤组相比, FGF2 抑制剂组、PRMT1 抑制剂组和 PRMT1 抑制剂+FGF2 组角膜混浊度评分, CNV 面积, VEGFA、CD206 和 F4/80 阳性细胞计数均降低, PRMT1 抑制剂组各指标均低于 FGF2 抑制剂组和 PRMT1 抑制剂+FGF2 组, PRMT1 抑制剂+FGF2 组各指标均高于 FGF2 抑制剂组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与碱烧伤组相比, PRMT1 抑制剂组 FGF2、p-PI3K、p-Akt、CD31、VEGFA 和 Arg-1 蛋白相对表达量降低, PRMT1 抑制剂+FGF2 组各蛋白相对表达量较 PRMT1 抑制剂组升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。 **结论** PRMT1 可能通过 FGF2/PI3K/Akt 通路调控巨噬细胞激活和抗炎型极化, 进而促进 CNV 发生和发展, 靶向抑制 PRMT1 可能是一种有效治疗 CNV 的方法。

【关键词】 角膜新生血管; 成纤维细胞生长因子 2; 炎症; 巨噬细胞; 精氨酸甲基转移酶 1**基金项目:** 国家自然科学基金 (82101081)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20240311-00070

Role and mechanism of PRMT1 and its inhibitors in the occurrence and development of corneal neovascularization in mice

Gao Yuelan, Deng Qian, Mao Jiewen, Zhang Rui, Shi Xiaoshuo, Wan Shanshan, Yang Yanning

Department of Ophthalmology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Yang Yanning, Email: yangyaning@whu.edu.cn



[Abstract] Objective To investigate the role and underlying mechanism of protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) and its inhibitor in alkali burn-induced corneal neovascularization (CNV). **Methods** Seventy-two SPF-grade C57BL/6 mice were randomly divided into a normal group and 1 day post-modeling, 4 days post-modeling, and 7 days post-modeling groups to establish an alkali burn-induced CNV model and determine the optimal time point for analysis. Another 90 mice were randomly assigned to five groups: alkali burn group, dimethyl sulfoxide (DMSO) group, PRMT1 inhibitor group, fibroblast growth factor 2 (FGF2) inhibitor group, and PRMT1 inhibitor combined with FGF2 group to evaluate the role of PRMT1 in CNV. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and murine macrophage-like RAW264.7 cells were used to establish a hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced *in vitro* model to mimic the ischemic microenvironment. Cells were assigned to the following groups: control group, H/R group, H/R+DMSO group, H/R+si-NC group, H/R+si-PRMT1 group, H/R+si-FGF2 group, H/R+PRMT1 inhibitor group, and H/R+PRMT1 inhibitor+FGF2 group. Corneal opacity and CNV areas were assessed by slit-lamp microscopy. Corneal structural changes and inflammatory cell count were determined by hematoxylin and eosin staining. PRMT1-positive cell count was determined by immunohistochemistry and the expression of PRMT1, CD31, vascular endothelial growth factor (VEGF), F4/80, CD206, and inducible nitric oxide synthase (iNOS) was assessed by immunofluorescence staining. The expression levels of macrophage markers, including F4/80, iNOS, CD206, interleukin-10 (IL-10), and arginase-1 (Arg-1), were quantified by real-time quantitative PCR and Western blot. Cell proliferation, migration, and angiogenic capacity were evaluated by functional assays including the CCK-8 assay, wound healing assay, Transwell migration assay, and tube formation assay. The research process followed the relevant regulations of the Visual and Ophthalmology Association, and the research plan was approved by the Laboratory Animal Committee of Wuhan University (No. 20220504A). **Results** Compared with the normal group, the 7 days post-modeling group showed significantly increased corneal opacity scores and CNV area, upregulated VEGF expression, and increased inflammatory cells (all $P < 0.05$). The number of PRMT1-positive cells in the alkali burn group was (39.67 ± 3.51) cells/visual field, which was significantly higher than (3.33 ± 0.58) cells/visual field in the normal group ($t = 17.68$, $P < 0.01$). Both mRNA and protein expression levels of PRMT1 and FGF2 were significantly elevated in the alkali burn group compared with the normal group (all $P < 0.01$). Compared with the alkali burn group, the PRMT1 inhibitor group showed reduced corneal opacity scores, decreased CNV area, fewer inflammatory cells, and lower expression levels of PRMT1, FGF2, VEGF, Arg-1, IL-10 proteins, as well as CD206 mRNA (all $P < 0.05$). Cell viability, migration distance, migration number, and tubes formed were significantly increased in the H/R group compared with the control group, significantly reduced in the H/R+si-PRMT1 and H/R+PRMT1 inhibitor groups compared with the H/R group and significantly increased in H/R+PRMT1 inhibitor+FGF2 group than in H/R+PRMT1 inhibitor group (all $P < 0.05$). Compared with the H/R group, the H/R+PRMT1 inhibitor group exhibited reduced expression of FGF2, VEGFA, p-PI3K, and p-Akt, while those were upregulated in the H/R+PRMT1 inhibitor+FGF2 group compared with the H/R+PRMT1 inhibitor group (all $P < 0.05$). The proportions of CD206-positive cells in the H/R, H/R+DMSO, H/R+PRMT1 inhibitor, and H/R+PRMT1 inhibitor+FGF2 groups were all significantly higher than those in the control group, and significantly higher in the H/R, H/R+DMSO, and H/R+PRMT1 inhibitor+FGF2 groups compared with the H/R+PRMT1 inhibitor group (all $P < 0.05$). Compared with the alkali burn group, the FGF2 inhibitor group, PRMT1 inhibitor group, and PRMT1 inhibitor+FGF2 group all showed reduced corneal opacity scores, CNV area, and decreased number of VEGFA-, CD206-, and F4/80-positive cells, with the above indicators being lower in the PRMT1 inhibitor group compared with the FGF2 inhibitor and PRMT1 inhibitor+FGF2 groups and higher in PRMT1 inhibitor+FGF2 group than in the FGF2 inhibitor group (all $P < 0.05$). Compared with the alkali burn group, the PRMT1 inhibitor group had decreased protein expression levels of FGF2, p-PI3K, p-Akt, CD31, VEGFA and Arg-1, with higher protein expression levels in the PRMT1 inhibitor+FGF2 group than in the PRMT1 inhibitor group (all $P < 0.05$). **Conclusions** PRMT1 may regulate macrophage activation and anti-inflammatory polarization via the FGF2/PI3K/Akt signaling pathway, thereby promoting the occurrence and development of CNV. Targeted inhibition of PRMT1 may serve as an effective therapeutic strategy for CNV.

[Key words] Corneal neovascularization; Fibroblast growth factor 2; Inflammation; Macrophages; Protein arginine methyltransferase 1

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82101081)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20240311-00070

多种角膜损伤可诱导形成角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV), 导致角膜水肿、瘢痕形成、视力损害, 甚至盲^[1]。全球每年约 140 万人被诊断为

CNV, 其中 12% 的患者发生视力下降^[2]。目前, CNV 的治疗方式主要包括手术和药物干预^[3], 但其存在免疫排斥反应或长期使用局部糖皮质激素造成的不良反

应等局限^[4-5]。炎症是 CNV 形成的关键病理过程^[6]。免疫细胞的过度浸润和细胞因子的上调打破促血管生成因子和抗血管生成因子的平衡,最终导致病理性血管生成^[5]。巨噬细胞具有分化为促炎和抗炎表型的能力^[7]。研究报道抗炎型巨噬细胞参与促进角膜血管生成^[8]。另有研究者发现,表观遗传学在 CNV 中发挥重要作用^[9]。蛋白质精氨酸甲基转移酶 1 (protein arginine methyltransferase 1, PRMT1) 通过氧化应激和炎症反应参与肿瘤细胞的增殖、迁移和血管生成^[10-11]。目前多种 PRMT1 抑制剂已被报道并进入肿瘤治疗的临床试验阶段^[12]。PRMT1 在巨噬细胞抗炎型极化中起着重要作用,可能通过调节 c-Myc 转录活性来影响巨噬细胞的表型^[13]。成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2) 是除血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 外与 CNV 有关的关键分子,并可能是抗 VEGF 药物产生耐药性的原因之一^[14-15]。FGF2 在肿瘤相关巨噬细胞向抗炎型极化中起着关键作用^[16]。鉴于 PRMT1 和 FGF2 对抗炎巨噬细胞极化的显著调控作用,PRMT1 和 FGF2 之间可能存在潜在的调控关系。缺氧是血管生成的经典刺激因子,缺氧引起的炎症可能是血管生成重要的相关因素^[17]。缺氧在 CNV 形成中发挥关键作用,因此本研究采用体外缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 诱导模型,模拟 CNV 在体内形成的微环境。本研究旨在评估 PRMT1 对碱烧伤诱导 CNV 的影响,并阐明其潜在机制,以期 CNV 的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与细胞 6~8 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠 162 只,体质量 18~25 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司。小鼠单核细胞巨噬细胞 (RAW264.7) 及人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 由武汉大学人民医院再生医学中心惠赠。研究流程遵循视觉与眼科协会相关规定,研究方案经武汉大学实验动物委员会批准 (批文号: 20220504A)。

1.1.2 主要试剂及仪器 PRMT1 抑制剂 (TC-E 5003)、FGF2 抑制剂 (NSC12)、FGF2 重组蛋白 (美国 MedChemExpress 生物科技公司); si-RNAs、PCR 引物 (上海生工生物工程股份有限公司); 兔抗 PRMT1 抗体 (EPR18344, 英国 Abcam 公司); 鼠抗 VEGF 抗体 (MA1-16629)、大鼠抗小鼠血小板-内皮细胞黏附分子

(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31) (RM5201) 抗体 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 兔抗小鼠 VEGFA 抗体 (GB11034B-100)、兔抗小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (GB11002-100)、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔二抗 (GB23204) (武汉赛维尔生物科技有限公司); 兔抗人蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 抗体 (ET1609-51)、兔抗人磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphoinositide 3-kinases, PI3K) 抗体 (ET1607-74) (杭州华安生物技术有限公司); 兔抗人 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (81115-1-RR)、兔抗小鼠白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 抗体 (82191-3-RR)、兔抗人精氨酸酶 1 (arginase-1, Arg-1) 抗体 (16001-1-AP)、兔抗小鼠 F4/80 抗体 (29414-1-AP)、兔抗小鼠 CD206 抗体 (83485-1-RR) 和兔抗人诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 抗体 (22226-1-AP) (武汉三鹰生物技术有限公司); 兔抗人 FGF2 抗体 (bs-0217R) (北京博奥森生物技术有限公司); 兔抗磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-Akt) 抗体 (AP0637) (武汉爱博泰克生物技术有限公司); 兔抗小鼠磷酸化 PI3K (phosphorylated PI3K, p-PI3K) 抗体 (4228) (美国 Cell Signaling Technology 公司)。实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 化学发光凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司); 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 CNV 模型建立及分组处理 通过碱烧伤法诱导 CNV 模型,将直径为 2.5 mm 的滤纸片浸泡在 1 mol/L 无菌氢氧化钠中,腹腔内注射 50 mg/kg 戊巴比妥麻醉小鼠,将滤纸片置于角膜中央 25 s,立即用 0.9% 生理盐水冲洗角膜 1 min。实验分组: (1) 为评估氢氧化钠对 CNV 的诱导作用以确定模型的成功构建和后续实验的最佳时间点,采用随机数字表法将 72 只小鼠平均分为正常组、造模后 1 d 组、造模后 4 d 组和造模后 7 d 组。 (2) 为评估 PRMT1 在 CNV 中的作用,选取 90 只小鼠构建碱烧伤诱导的 CNV 模型,采用随机数字表法平均分为碱烧伤组、DMSO 组、PRMT1 抑制剂组、FGF2 抑制剂组、PRMT1 抑制剂+FGF2 组,各组小鼠碱烧伤后每日经结膜下分别注射 10 μ l 的 0.9% 生理盐水、DMSO、5 mg/kg TC-E 5003、5 mg/kg NSC12、5 mg/kg TC-E 5003+FGF2,碱烧伤后第 7 天,所有小鼠安乐死并取出眼球进行后续实验。

1.2.2 缺氧/复氧细胞模型建立及分组处理 将细胞置于缺氧环境 (94% N₂、5% CO₂ 和 1% O₂) 中培养

12 h, 更换至正常环境中继续培养。实验分组: (1) 为确定 PRMT1 对细胞的作用浓度, 将细胞分为对照组、H/R 组、H/R+DMSO 组、H/R+1 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 抑制剂组和 H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 抑制剂组, 其中对照组不做处理, 其他各组均构建 H/R 模型, H/R+DMSO 组、H/R+1 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 抑制剂组和 H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 抑制剂组分别添加 DMSO、1 $\mu\text{mol/L}$ TC-E 5003 和 10 $\mu\text{mol/L}$ TC-E 5003。(2) 在确定 TC-E 5003 的作用浓度后, 进一步将细胞分为对照组、H/R 组、H/R+DMSO 组、H/R+si-NC 组、H/R+si-PRMT1 组、H/R+si-FGF2 组、H/R+PRMT1 抑制剂组和 H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组, 其中对照组不做处理, 其他各组均构建 H/R 模型, H/R+DMSO 组、H/R+si-NC 组、H/R+si-PRMT1 组、H/R+si-FGF2 组、H/R+PRMT1 抑制剂组和 H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组分别添加 DMSO、转染 si-NC、转染 si-PRMT1、转染 si-FGF2、添加 10 $\mu\text{mol/L}$ TC-E 5003、添加 10 $\mu\text{mol/L}$ TC-E 5003 和 10 $\mu\text{mol/L}$ FGF2 重组蛋白。

1.2.3 裂隙灯显微镜观察小鼠角膜的混浊度和新生血管形成情况 采用随机数字表法每组随机选取 3 只小鼠, 于造模前和造模后 1、4、7 d 采用裂隙灯显微镜拍摄眼前节照片, 计算 CNV 面积和角膜混浊度评分。(1) CNV 面积为 $C/12 \times 3.14 \times [r^2 - (r-1)^2]$, C 为涉及角膜的外周小时数, 1 为血管长度, r 为小鼠角膜半径。(2) 采用角膜混浊评分系统反映炎症指数, 0 分为基质透明; 1 分为基质轻度混浊; 2 分为基质中度混浊; 3 分为基质严重混浊, 但虹膜可见; 4 分为基质完全混浊, 虹膜不可见。

1.2.4 苏木精-伊红染色法观察角膜结构及炎性细胞数目 采用随机数字表法每组随机选取 3 只小鼠, 50 mg/kg 戊巴比妥腹腔内注射麻醉小鼠后迅速摘取眼球并用 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 固定, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋。沿鼻-颞轴将蜡块 5 μm 厚切片, 梯度乙醇脱蜡, 苏木素和伊红染色, 75% 乙醇脱水封片。通过正置显微镜采集图像以观察角膜形态的变化, 采用 ImageJ 软件进行炎性细胞计数。

1.2.5 免疫组织化学染色法检测角膜 PRMT1 的分布 采用随机数字表法每组随机选取 3 只小鼠, 麻醉后摘取眼球并用 4% PFA 固定眼球组织, 石蜡包埋, 沿鼻-

颞轴 5 μm 厚切片。石蜡切片脱蜡后, 3% 过氧化氢封闭内源性酶, 微波修复抗原, 血清封闭, 与 PRMT1 一抗 (1:500) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育过夜。次日切片与二抗 (1:200 稀释) 在室温下孵育 1 h 后, 使用 3,3'-二氨基联苯胺染色, 脱水透明后封片。使用正置显微镜采集图像, 采用 ImageJ 软件进行 PRMT1 阳性细胞计数。

1.2.6 免疫荧光染色法评估角膜中 F4/80、VEGFA、iNOS、CD31 和 CD206 的表达 采用以下巨噬细胞标志物: (1) F4/80 (巨噬细胞); (2) iNOS (M1 型巨噬细胞标志物); (3) CD206、IL-10 和 Arg-1 (M2 型巨噬细胞标志物)。每组选取 3 只小鼠, 麻醉后摘除眼球并在 4% PFA 中固定, 石蜡包埋, 切片脱蜡, 微波修复抗原, 透膜封闭, 与一抗在以下稀释倍数中 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光湿房过夜: F4/80 (1:200)、VEGFA (1:200)、iNOS (1:200)、CD31 (1:200) 和 CD206 (1:500)。次日在室温下与二抗 (1:200) 孵育 2 h, 滴加含 DAPI 抗荧光淬灭封片液, 封片后荧光显微镜下检查切片, ImageJ 软件进行阳性细胞计数。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 法检测角膜或细胞中 PRMT1、FGF2、VEGFA、CD206 和 IL-10 的表达 每组选取 3 只小鼠, 麻醉后摘除眼球, 在冰上的 DEPC 水中快速修剪出角膜组织。采用 Trizol 从角膜或细胞中提取 RNA, 测定其浓度和纯度, 逆转录获得 cDNA。以 β -actin 作为内参, 引物序列见表 1, PCR 反应程序: (1) 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 s; (2) 循环反应 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 s, 重复 40 次; (3) 熔解曲线 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法检测各目标分子 mRNA 相对表达量。

1.2.8 Western blot 法检测角膜或细胞中相关分子蛋白表达水平 采用随机数字表法每组随机选取 3 只小鼠, 麻醉后摘取眼球, 在冰上的无菌磷酸盐缓冲液中快速修剪出角膜。从角膜组织或细胞中提取总蛋白, 使

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列		
Table 1 Primer sequences for real time fluorescence quantitative PCR		
基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
β -actin	GAAATCGTGCGTGACATCAAA	TGTAGTTTCATGGATGCCACAG
PRMT1	GCAGCACGGTGTGAGCAT	CCCACAAGGTTATTGGGATT
FGF2	GAGCGACCCACACGTCAAACACTAC	CAGCCGTCCATCTTCCTTCATAGC
VEGFA	TCCGTAGTAGCCGTGCTCTGC	CCCTCTCCTCTTCCTTCTCTTCCTC
CD206	CGGGACTCTGGATTGGACTCAAC	CTGATGATGGACTTCCTGGTAGCC
IL-10	AGGCAGTGGAGCAGGTGAAGAG	GGCAGAGGAGGTACACACATTGT
注: β -actin: β -肌动蛋白; PRMT1: 蛋白质精氨酸甲基转移酶 1; FGF2: 成纤维细胞生长因子 2; VEGFA: 血管内皮生长因子 A; IL-10: 白细胞介素 10		
Note: PRMT1: protein arginine methyltransferase 1; FGF2: fibroblast growth factor 2; VEGFA: vascular endothelial growth factor A; IL-10: interleukin-10		

用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。SDS-PAGE 分离蛋白质并转移到 PVDF 膜,5% 牛血清白蛋白封闭 1 h,在 4℃ 下与一抗孵育过夜,PRMT1、GAPDH、VEGF、FGF2、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、Arg-1、IL-10、VEGFA 均 1:1 000 稀释,β-actin 1:8 000 稀释。次日与 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1:3 000)室温下孵育 2 h,通过化学发光凝胶成像仪采集图像,ImageJ 软件测量条带灰度以确定蛋白相对表达量。

1.2.9 细胞转染法转染 si-RNA 至 HUVECs 根据细胞生长速率对细胞进行铺板,保证转染当天细胞密度达 80%~90%。用 lipofectamine 3000 试剂转染 si-RNA 至细胞。将细胞置于培养箱中培养 6 h 后用完全培养基替换。转染后 48 h,将细胞暴露于 H/R 条件下。

1.2.10 CCK-8 法检测 HUVECs 的细胞增殖活力 将 H/R 处理后的细胞消化重悬,稀释后每孔加入含 2×10^3 个细胞的细胞悬液。放入细胞培养箱中继续培养 6 h 至细胞贴壁良好,吸出原培养基,各组加入相应药物继续培养。在 12、24 和 48 h 使用试剂盒检测细胞活力,采用酶标仪测定 450 nm 处吸光度(absorbance, A)值以评估各组细胞增殖活力。

1.2.11 细胞划痕法检测 HUVECs 的细胞迁移距离 H/R 处理后在 6 孔板中培养细胞达 100% 汇合,使用 200 μl 枪头尖端垂直于孔板背面进行水平划痕,弃去培养基,各组分别加入加药培养基。0、12 和 24 h 后显微镜下拍摄图像,采用 ImageJ 软件分析细胞迁移距离。

1.2.12 Transwell 迁移法观察 HUVECs 的细胞迁移能力 H/R 处理后将 HUVECs 重悬并计数,按组别将 500 μl 加药培养基分别加入 24 孔板下室,用镊子将 Transwell 小室置于 24 孔板内,按 3×10^4 个/孔将细胞悬液加入上室,放入培养箱继续培养。24 h 后取出小室,4% PFA 室温固定 15 min,结晶紫染色 10 min,棉签擦去小室多余染料,倒置显微镜下任意选择 3 个视野观察并拍照,统计每个视野滤膜下侧迁移细胞的数量,并进行归一化处理。

1.2.13 细胞管形成实验比较 HUVECs 的细胞成管能力 实验前 1 d,将 Matrigel 基质胶置于 4℃ 环境中过夜融化,次日在冰上将冰冷的基质胶和 DMEM 按等体积比在预冷的 1.5 ml 离心管中稀释,按 50 μl/孔均匀平铺,在 37℃ 培养箱中放置 20 min。每孔接种 1×10^4 个 HUVECs 细胞,37℃ 培养箱中孵育 6 h。使用倒置显微镜观察细

胞成管情况,记录管状结构的数量等指标,并进行归一化处理。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计学软件和 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 个组各指标比较采用独立样本 *t* 检验;3 个组及以上各指标总体比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠角膜炎症反应及新生血管表现比较

造模后 1 d 组小鼠角膜出现急性炎症反应和基质水肿;造模后 4 d 组小鼠角膜缘血管逐渐充血和扩张,出现新生血管芽;造模后 7 d 组小鼠角膜透明度明显降低,CNV 延伸至角膜中心。正常组、造模后 1 d 组、造模后 4 d 组和造模后 7 d 组角膜混浊度评分、CNV 面积、VEGF mRNA 和蛋白相对表达量、炎性细胞数量总体比较差异均有统计学意义($F = 35.89、79.56、153.50、164.90、25.45$,均 $P < 0.01$),其中与正常组相比,造模后 7 d 组小鼠角膜混浊度评分和 CNV 面积增加,VEGF 表达上调,炎性细胞数量增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),提示碱烧伤诱导 CNV 模型的成功构建,因此选择新生血管更明显的第 7 天作为后续碱烧伤的时间点(图 1,表 2)。

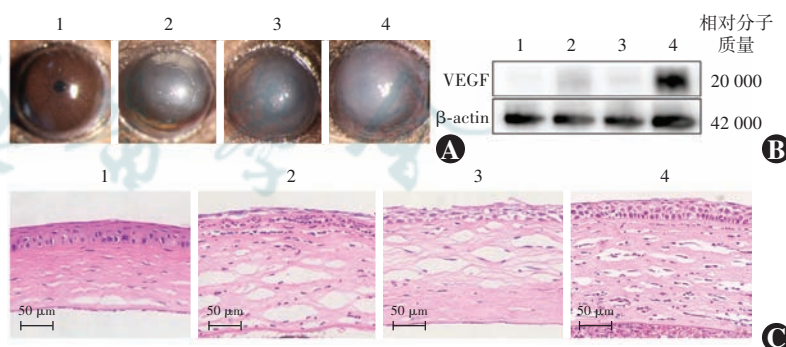


图 1 各组小鼠角膜炎症反应及新生血管表现 A:各组眼前节照相 造模后 7 d 组小鼠 CNV 逐渐延伸至角膜中央 B:各组 VEGF 电泳图 造模后 7 d 组较正常组的 VEGF 表达量显著增加 C:各组苏木精-伊红染色表现($\times 200$,标尺=50 μm) 造模后 7 d 组较正常组的角膜炎性细胞数量显著增加 1:正常组;2:造模后 1 d 组;3:造模后 4 d 组;4:造模后 7 d 组 VEGF:血管内皮生长因子;β-actin:β-肌动蛋白

Figure 1 Corneal inflammation and neovascularization in mice of different groups

A: Cornea photos Seven days post-modeling, CNV extended gradually towards the central cornea B: Electrophoretogram of VEGF The expression of VEGF was significantly higher in the 7 days post-modeling group than in the normal group C: Hematoxylin and eosin staining images ($\times 200$, scale bar=50 μm) The number of corneal inflammatory cells was significantly higher in the 7 days post-modeling group than in the normal group 1: normal group; 2: 1 day post-modeling group; 3: 4 days post-modeling group; 4: 7 days post-modeling group VEGF: vascular endothelial growth factor

表 2 各组小鼠 CNV 及炎症反应指标比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Comparison of CNV and inflammatory response of mice among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	角膜混浊度评分(分)	CNV 面积(mm ²)	VEGF mRNA 相对表达量	VEGF 蛋白 相对表达量	角膜炎症 细胞计数(个/视野)
正常组	3	0.00±0.00	0.00±0.00	1.00±0.00	0.03±0.01	0.00±0.00
造模后 1 d 组	3	3.67±0.58 ^a	0.00±0.00	1.93±0.22 ^a	0.14±0.03 ^a	82.33±4.51 ^a
造模后 4 d 组	3	2.33±0.58 ^{ab}	0.65±0.30 ^{ab}	10.78±1.13 ^{ab}	0.14±0.03 ^a	54.33±5.03 ^{ab}
造模后 7 d 组	3	3.67±0.58 ^{ac}	3.16±0.37 ^{abc}	37.01±4.56 ^{abc}	1.34±0.03 ^{abc}	87.67±5.51 ^{ac}
F 值		35.89	79.56	153.50	164.90	25.45
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与正常组相比,^a $P<0.05$;与造模后 1 d 组相比,^b $P<0.05$;与造模后 4 d 组相比,^c $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) CNV:角膜新生血管; VEGF:血管内皮生长因子
Note:Compared with normal group,^a $P<0.05$;compared with 1 day post-modeling group,^b $P<0.05$;compared with 4 days post-modeling group,^c $P<0.05$ (One-way ANOVA,LSD- t test) CNV:corneal neovascularization;VEGF:vascular endothelial growth factor

2.2 各组小鼠角膜组织中 PRMT1、FGF2 相对表达量及 F4/80 阳性细胞数目比较

PRMT1 主要分布于角膜上皮,碱烧伤后小鼠角膜组织中 PRMT1 阳性细胞数量明显增加,PRMT1 和 FGF2 mRNA 和蛋白相对表达量显著上调,与正常组相比差异均有统计学意义(t_{PRMT1} 阳性细胞数量 = 17.68、 t_{PRMT1} 蛋白 = 20.80、 t_{PRMT1} mRNA = 14.29、 t_{FGF2} 蛋白 = 14.78、 t_{FGF2} mRNA = 18.85,均 $P<0.01$)。免疫荧光染色结果显示,造模后小鼠角膜 F4/80 阳性细胞数量显著增加,与正常组相比差异有统计学意义($t = 19.49$, $P<0.01$)(图 2,表 3)。

2.3 各组小鼠角膜炎症反应、新生血管及相关分子相对表达量比较

眼前节照相显示,与碱烧伤组相比,PRMT1 抑制剂组的角膜混浊度降低,CNV 缓解。苏木精-伊红染色显示 PRMT1 抑制剂组角膜炎症细胞浸润减少。正常组、碱烧伤组、DMSO

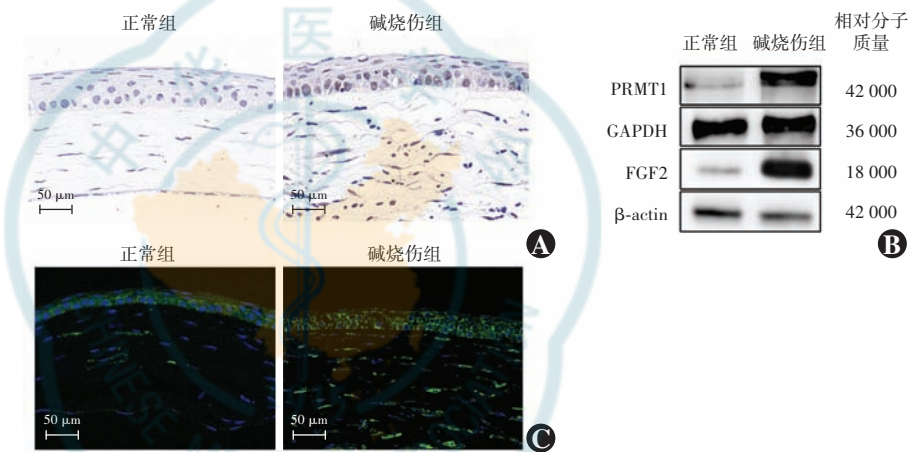


图 2 各组小鼠角膜 PRMT1、FGF2 相对表达量及 F4/80 阳性细胞数目比较 A:各组小鼠角膜 PRMT1 免疫组织化学染色(DAB ×200,标尺 = 50 μ m) PRMT1 分布于角膜上皮细胞,碱烧伤后 PRMT1 阳性细胞数量增加 B:各组小鼠角膜 PRMT1 及 FGF2 电泳图 与正常组相比,碱烧伤后角膜 PRMT1、FGF2 蛋白相对表达量增加 C:各组角膜 F4/80 免疫荧光染色图(Alexa Fluor 488 ×200,标尺 = 50 μ m) 与正常组相比,角膜碱烧伤后 F4/80 阳性细胞数量增加 PRMT1:蛋白质精氨酸甲基转移酶 1;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;FGF2:成纤维细胞生长因子 2; β -actin; β -肌动蛋白
Figure 2 Comparison of relative expression levels of PRMT1 and FGF2 and F4/80-positive cell count in mouse corneas among different groups A:Immunohistochemical staining of PRMT1 (DAB ×200,scale bar = 50 μ m) PRMT1 was distributed in corneal epithelial cells,and the number of PRMT1-positive cells increased after alkali burn B:Electrophoretogram of PRMT1 and FGF2 Compared with the normal group,the relative expression of PRMT1 and FGF2 proteins in the cornea increased after alkali burn C:F4/80 immunofluorescence staining (Alexa Fluor 488 ×200,scale bar = 50 μ m) Compared with the normal group,the number of F4/80-positive cells increased after corneal alkali burn PRMT1:protein arginine methyltransferase 1;GAPDH:glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;FGF2:fibroblast growth factor 2

表 3 各组小鼠角膜 PRMT1、FGF2 相对表达量及 F4/80 阳性细胞数目比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Comparison of relative expression levels of PRMT1 and FGF2 and F4/80-positive cell count in mouse corneas among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	PRMT1 阳性细胞 计数(个/视野)	PRMT1 蛋白 相对表达量	PRMT1 mRNA 相对表达量	FGF2 蛋白 相对表达量	FGF2 mRNA 相对表达量	F4/80 阳性细胞 计数(个/视野)
正常组	3	3.33±0.58	0.30±0.09	1.00±0.00	0.53±0.16	1.00±0.00	15.33±3.06
碱烧伤组	3	39.67±3.51	0.91±0.16	6.92±0.59	2.12±0.21	5.64±0.35	78.67±4.73
t 值		17.68	20.80	14.29	14.78	18.85	19.49
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:(独立样本 t 检验) PRMT1:蛋白质精氨酸甲基转移酶 1;FGF2:成纤维细胞生长因子 2;F4/80:小鼠巨噬细胞标志物
Note:(Independent samples t -test) PRMT1:protein arginine methyltransferase 1;FGF2:fibroblast growth factor 2;F4/80:murine macrophage marker

组、PRMT1 抑制剂组角膜混浊度评分、CNV 面积、角膜炎性细胞计数和 PRMT1、FGF2、VEGF、Arg-1、IL-10 蛋白及 CD206 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 37.67、78.36、46.39、171.10、46.39、84.21、64.42、89.53、46.98$, 均 $P < 0.01$), 其中与碱烧伤组相比, PRMT1 抑制剂组角膜混浊度评分降低, CNV 面积和角膜炎性细胞计数减少, PRMT1、FGF2、VEGF、Arg-1、IL-10 蛋白及 CD206 mRNA 相对表达量降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3, 表 4)。

2.4 各组 HUVECs 中

PRMT1、VEGF 及 CD31 相对表达量比较

与对照组相比, H/R 组 PRMT1 和 VEGF 表达上调, 使用 TC-E 5003 后, PRMT1 和 VEGF 的表达被下

调, 其中浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时下调更明显 (图 4)。对照组、H/R 组、H/R+DMSO 组、H/R+ $1 \mu\text{mol/L}$ PRMT1 抑制剂组和 H/R+ $10 \mu\text{mol/L}$ PRMT1 抑制剂组 PRMT1

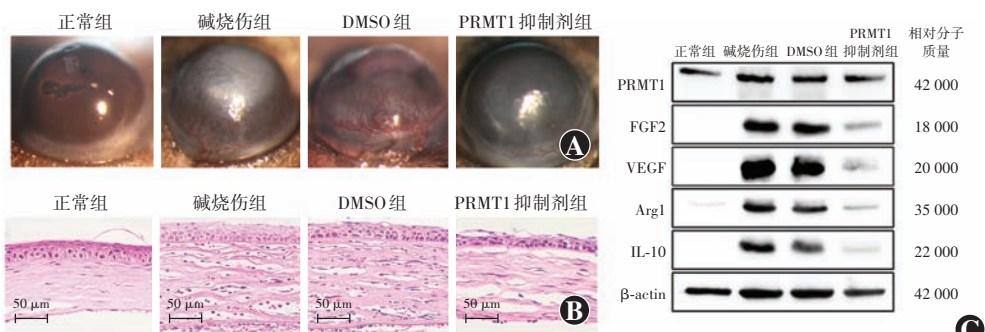


图 3 各组小鼠角膜炎症反应、新生血管及相关分子相对表达量比较 A: 各组小鼠角膜照相 TC-E 500 组较碱烧伤组 CNV 面积减少, 角膜混浊度减轻 B: 各组小鼠角膜炎症性细胞数目比较 (HE $\times 200$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) TC-E 500 组较碱烧伤组角膜炎症性细胞数目减少 C: 各组小鼠角膜各蛋白电泳图 TC-E 500 组 FGF2、VEGF 和抗炎巨噬细胞标志物蛋白相对表达量较碱烧伤组下降 DMSO: 二甲基亚砜; PRMT1: 蛋白质精氨酸甲基转移酶 1; FGF2: 成纤维细胞生长因子 2; VEGF: 血管内皮生长因子; Arg-1: 精氨酸酶 1; IL-10: 白细胞介素 10; β -actin: β -肌动蛋白

Figure 3 Comparison of corneal inflammatory response, CNV, and relative expression of related molecules in mice among different groups A: Cornea photos There was smaller CNV area and milder corneal opacity in TC-E 500 group than in alkali burn group B: Comparison of inflammatory cells in mice among different groups (HE $\times 200$, scale bar = $50 \mu\text{m}$) There were fewer corneal inflammatory cells in TC-E 500 group than in alkali burn group C: Electrophoretogram of proteins The relative protein expression levels of FGF2, VEGF and M2 macrophage markers were lower in TC-E 500 group than in alkali burn group DMSO: dimethyl sulfoxide; PRMT1: protein arginine methyltransferase 1; FGF2: fibroblast growth factor 2; VEGF: vascular endothelial growth factor; Arg-1: arginase 1; IL-10: interleukin-10

表 4 各组小鼠角膜炎症反应、CNV 及相关分子相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of corneal inflammatory response, CNV, and relative expression of related molecules in mice among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	角膜混浊度评分 (分)	CNV 面积 (mm^2)	角膜炎性细胞计数 (个/视野)	PRMT1 蛋白相对表达量	FGF2 蛋白相对表达量
正常组	3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.33 ± 0.58	0.18 ± 0.01	0.08 ± 0.01
碱烧伤组	3	3.67 ± 0.58^a	2.05 ± 0.09^a	117.67 ± 5.03^a	0.85 ± 0.01^a	1.04 ± 0.01^a
DMSO 组	3	3.67 ± 0.58^a	2.02 ± 0.11^a	123.67 ± 7.02^a	0.76 ± 0.02^a	1.02 ± 0.07^a
PRMT1 抑制剂组	3	1.67 ± 0.58^{abc}	0.12 ± 0.02^{abc}	27.67 ± 5.03^{abc}	0.03 ± 0.01^{abc}	0.41 ± 0.02^{abc}
F 值		37.67	78.36	46.39	171.10	46.39
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

组别	样本量	VEGF 蛋白相对表达量	Arg-1 蛋白相对表达量	IL-10 蛋白相对表达量	CD206 mRNA 相对表达量
正常组	3	0.09 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.10 ± 0.01	1.00 ± 0.00
碱烧伤组	3	1.69 ± 0.07^a	0.92 ± 0.03^a	0.92 ± 0.03^a	23.08 ± 2.07^a
DMSO 组	3	1.66 ± 0.05^a	0.91 ± 0.03^a	0.86 ± 0.02^a	23.74 ± 3.71^a
PRMT1 抑制剂组	3	0.33 ± 0.05^{abc}	0.34 ± 0.03^{abc}	0.34 ± 0.02^{abc}	6.73 ± 3.99^{abc}
F 值		84.21	64.42	89.53	46.98
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: 与正常组相比, $^a P < 0.05$; 与碱烧伤组相比, $^b P < 0.05$; 与 DMSO 组相比, $^c P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) CNV: 角膜新生血管; DMSO: 二甲基亚砜; PRMT1: 蛋白质精氨酸甲基转移酶 1; FGF2: 成纤维细胞生长因子; VEGF: 血管内皮生长因子; Arg-1: 精氨酸酶 1; IL-10: 白细胞介素 10

Note: Compared with normal group, $^a P < 0.05$; compared with alkali burn group, $^b P < 0.05$; compared with DMSO group, $^c P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) CNV: corneal neovascularization; DMSO: dimethyl sulfoxide; PRMT1: protein arginine methyltransferase 1; FGF2: fibroblast growth factor 2; VEGF: vascular endothelial growth factor; Arg-1: arginase 1; IL-10: interleukin-10

和 VEGF 的 mRNA 和蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F_{PRMT1\ mRNA} = 65.09$ 、 $F_{PRMT1\ 蛋白} = 41.50$ 、 $F_{VEGF\ mRNA} = 35.78$ 、 $F_{VEGF\ 蛋白} = 243.20$, 均 $P < 0.01$), 其中 H/R + 10 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 抑制剂组 PRMT1 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白相对表达量较其他各组均明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 5)。因此, 选择 10 $\mu\text{mol/L}$ 进行后续实验。

双重免疫荧光共定位结果显示, H/R+PRMT1 抑制剂组 HUVECs 中 CD31 和 VEGF 荧光强度较 H/R 组明显减弱, H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组 CD31 和 VEGF 荧光强度较 H/R+PRMT1 抑制剂组增强 (图 5)。

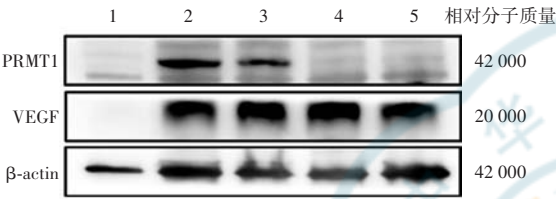


图 4 各组 HUVECs 中 PRMT1 及 VEGF 表达电泳图 H/R + 1 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 抑制剂组和 H/R + 10 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 抑制剂组 PRMT1 和 VEGF 蛋白相对表达量均较 H/R 组下降, 且 H/R + 10 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 抑制剂组更显著 1: 对照组; 2: H/R 组; 3: H/R + DMSO 组; 4: H/R + 1 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 抑制剂组; 5: H/R + 10 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 抑制剂组 PRMT1: 蛋白质精氨酸甲基转移酶 1; VEGF: 血管内皮生长因子; β -actin: β -肌动蛋白

Figure 4 Electrophoretogram of PRMT1 and VEGF in HUVECs in different groups The relative expression levels of PRMT1 and VEGF proteins were lower in H/R + 1 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 inhibitor group and H/R + 10 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 inhibitor group than in H/R group, with more obvious increase in 10 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 inhibitor group 1: control group; 2: H/R group; 3: H/R + DMSO group; 4: H/R + 1 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 inhibitor group; 5: H/R + 10 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 inhibitor group PRMT1: protein arginine methyltransferase 1; VEGF: vascular endothelial growth factor

2.5 各组 HUVECs 细胞增殖、迁移和管形成能力比较

对照组、H/R 组、H/R+si-NC 组、H/R+si-PRMT1 组、H/R+si-FGF2 组、H/R+PRMT1 抑制剂组、H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组 12、24 和 48 h 细胞活力值、12 和 24 h 细胞迁移距离、细胞迁移数量、管形成数量总体比较差异均有统计学意义 ($F = 52.17$ 、 47.90 、 23.14 、 90.51 、 187.00 、 32.77 、 166.60 , 均 $P < 0.05$), 其中 H/R 组各时间点细胞活力值、细胞迁移距离、细胞迁移数量、管形成数量较对照组增加, H/R + si-PRMT1 组和 H/R+PRMT1 抑制剂组较 H/R 组减少, H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组较 H/R+PRMT1 抑制剂组增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 6, 表 6)。

2.6 各组 HUVECs 中 FGF2、VEGFA、p-PI3K、p-Akt 和 CD31 蛋白相对表达量比较

H/R 组、H/R+si-NC 组、H/R+si-PRMT1 组、H/R+si-FGF2 组、H/R+PRMT1 抑制剂组、H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组 HUVECs 中 FGF2、VEGFA、p-PI3K、p-Akt 和 CD31 蛋白相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 222.80$ 、 114.80 、 88.04 、 32.62 、 125.22 , 均 $P < 0.01$), 其中 H/R+PRMT1 抑制剂组 FGF2、VEGFA、p-PI3K、p-Akt 相对表达量较 H/R 组下调, H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组 FGF2、VEGFA、p-PI3K、p-Akt 相对表达量较 H/R+PRMT1 抑制剂组上调, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 7, 表 7)。

表 5 各组 HUVECs 中 PRMT1、VEGF mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of mRNA and protein expressions of PRMT1, VEGF in HUVECs among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	PRMT1 蛋白 相对表达量	VEGF 蛋白 相对表达量	PRMT1 mRNA 相对表达量	VEGF mRNA 相对表达量
对照组	3	0.02±0.01	0.10±0.09	1.00±0.00	1.00±0.00
H/R 组	3	1.09±0.07 ^a	1.01±0.05 ^a	8.18±1.55 ^a	6.30±0.66 ^a
H/R+DMSO 组	3	1.04±0.07 ^a	1.17±0.05 ^a	8.58±0.95 ^a	5.55±0.77 ^a
H/R+1 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 抑制剂组	3	0.17±0.02 ^{abc}	0.96±0.02 ^{abc}	1.35±0.05 ^{abc}	2.82±1.12 ^{abc}
H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 抑制剂组	3	0.03±0.01 ^{abcd}	0.42±0.02 ^{abcd}	0.24±0.15 ^{bcd}	0.45±0.26 ^{bcd}
F 值		41.50	243.20	65.09	35.78
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与 H/R 组相比, ^b $P < 0.05$; 与 H/R+DMSO 组相比, ^c $P < 0.05$; 与 H/R+1 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 抑制剂组相比, ^d $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) HUVECs: 人脐静脉内皮细胞; PRMT1: 蛋白质精氨酸甲基转移酶 1; VEGF: 血管内皮生长因子; H/R: 缺氧/复氧; DMSO: 二甲基亚砜

Note: Compared with control group, ^a $P < 0.05$; compared with H/R group, ^b $P < 0.05$; compared with H/R+DMSO group, ^c $P < 0.05$; compared with H/R + 1 $\mu\text{mol/L}$ PRMT1 inhibitor group, ^d $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) HUVECs: human umbilical vein endothelial cells; PRMT1: protein arginine methyltransferase 1; VEGF: vascular endothelial growth factor; H/R: hypoxia/reoxygen; DMSO: dimethyl sulfoxide

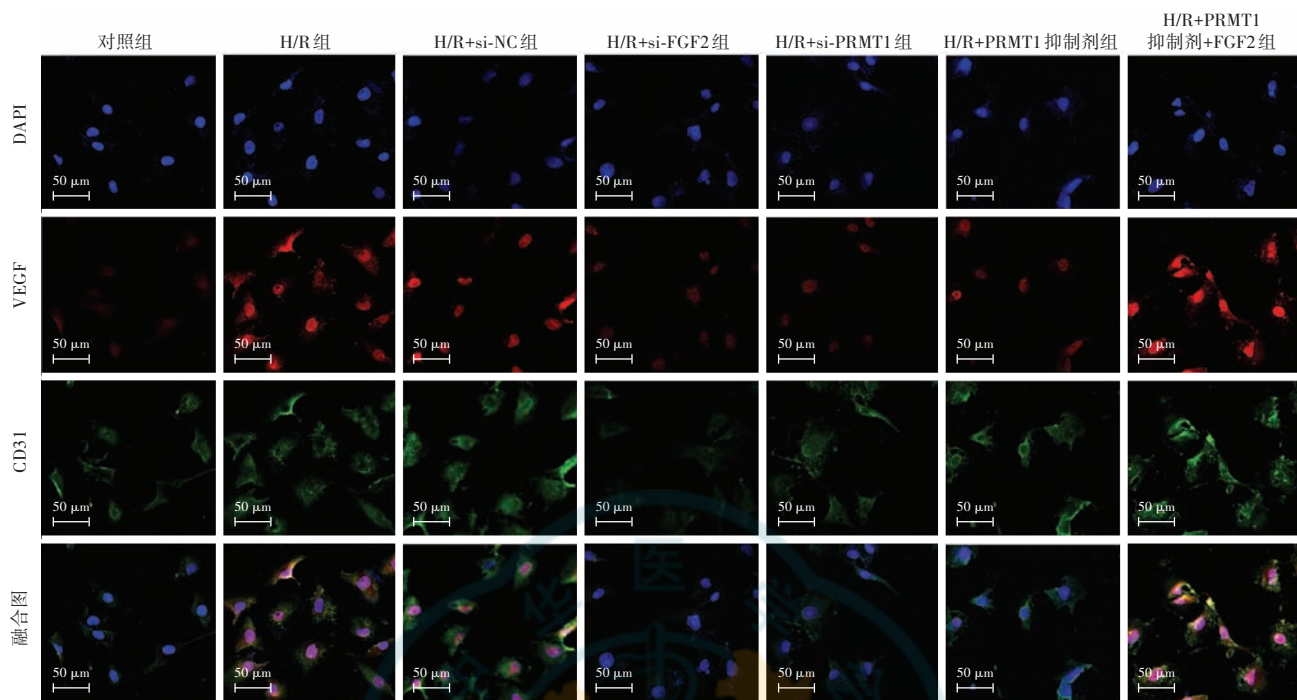


图 5 各组 HUVECs 细胞双重免疫荧光共定位染色图 ($\times 400$, 标尺 = $50\ \mu\text{m}$) H/R 组、H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组 VEGF 和 CD31 荧光强度较 H/R+PRMT1 抑制剂组增强 H/R: 缺氧/复氧; FGF2: 成纤维细胞生长因子 2; PRMT1: 蛋白质精氨酸甲基转移酶 1; DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基喹啉; VEGF: 血管内皮生长因子; CD31: 血小板-内皮细胞黏附分子

Figure 5 Double immunofluorescence co-localization staining of HUVECs in different groups ($\times 400$, scale bar = $50\ \mu\text{m}$) The fluorescence intensities of VEGF and CD31 in the H/R group and H/R+PRMT1 inhibitor+FGF2 group were increased compared with the H/R+PRMT1 inhibitor group H/R: hypoxia/reoxygenation; FGF2: fibroblast growth factor 2; PRMT1: protein arginine methyltransferase 1; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole; VEGF: vascular endothelial growth factor; CD31: platelet endothelial cell adhesion molecule

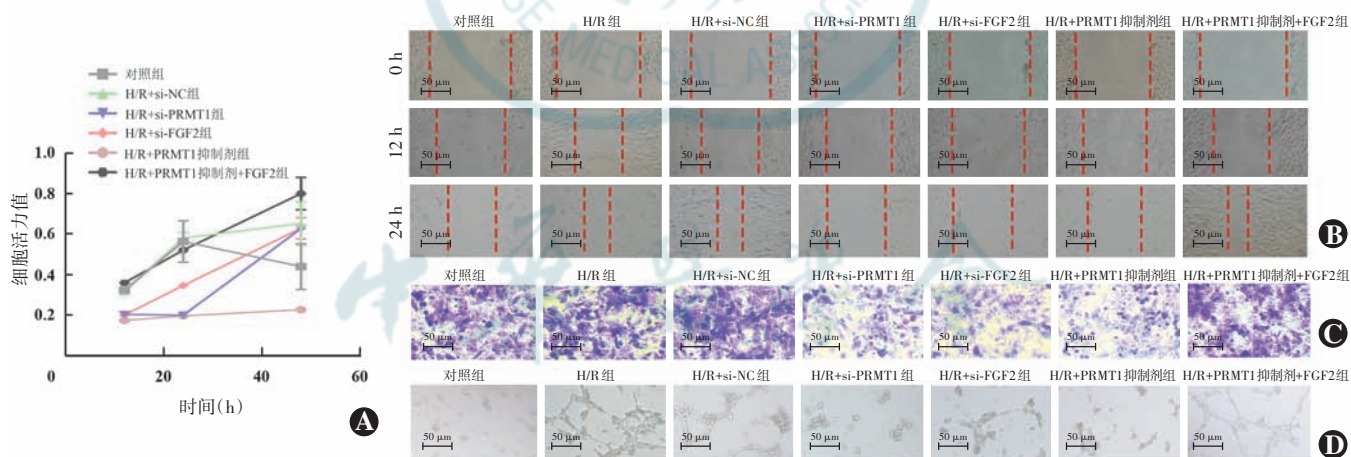


图 6 各组 HUVECs 细胞增殖、迁移和管形成能力比较 A: 各组细胞增殖活力比较 B: 各组细胞划痕图 ($\times 400$, 标尺 = $50\ \mu\text{m}$) C: 各组细胞 Transwell 迁移图 (结晶紫 $\times 400$, 标尺 = $50\ \mu\text{m}$) D: 各组细胞管形成图 ($\times 400$, 标尺 = $50\ \mu\text{m}$) H/R 组 HUVECs 细胞增殖、迁移及管形成能力较对照组增强, H/R+PRMT1 抑制剂组较 H/R 组和 H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组减弱 H/R: 缺氧/复氧; PRMT1: 蛋白质精氨酸甲基转移酶 1; FGF2: 成纤维细胞生长因子 2

Figure 6 Comparison of proliferation, migration and tube formation ability of HUVECs among different groups A: Proliferation activity B: Scratch test ($\times 400$, scale bar = $50\ \mu\text{m}$) C: Transwell migration diagram (crystal violet $\times 400$, scale bar = $50\ \mu\text{m}$) D: Tube formation diagram ($\times 400$, scale bar = $50\ \mu\text{m}$) In the H/R group, the proliferation, migration, and tube formation abilities of HUVECs were enhanced compared with the control group. In the H/R+PRMT1 inhibitor group, these abilities were weakened compared with the H/R group and H/R+PRMT1 inhibitor+FGF2 group H/R: hypoxia/reoxygenation; PRMT1: protein arginine methyltransferase 1; FGF2: fibroblast growth factor 2

2.7 各组巨噬细胞 CD206 及 iNOS 阳性细胞数量比较

对照组、H/R 组、H/R+DMSO 组、H/R+PRMT1 抑制剂组和 H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组 CD206 阳性

细胞比总体比较差异有统计学意义 ($F = 71.29$, $P < 0.01$), 其中 H/R 组、H/R+DMSO 组、H/R+PRMT1 抑制剂组和 H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组 CD206 阳性

表 6 各组 HUVECs 细胞迁移和成管能力比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Comparison of migration and tube formation ability of HUVECs among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	12 h 细胞 迁移距离 (mm)	24 h 细胞 迁移距离 (mm)	细胞迁移数量	管形成数量
对照组	3	0.19±0.03	0.51±0.01	1.00±0.00	1.00±0.00
H/R 组	3	0.43±0.02 ^a	0.70±0.01 ^a	1.71±0.05 ^a	1.88±0.07 ^a
H/R+si-NC 组	3	0.46±0.03 ^a	0.70±0.02 ^a	1.66±0.06 ^a	1.91±0.05 ^{ab}
H/R+si-PRMT1 组	3	0.24±0.02 ^{abc}	0.45±0.01 ^{abc}	0.84±0.04 ^{abc}	1.12±0.08 ^{bc}
H/R+si-FGF2 组	3	0.24±0.02 ^{abc}	0.49±0.02 ^{abc}	0.82±0.03 ^{abc}	1.20±0.04 ^{abc}
H/R+PRMT1 抑制剂组	3	0.17±0.01 ^{abcde}	0.39±0.02 ^{abcde}	0.71±0.04 ^{abcde}	1.06±0.05 ^{bc}
H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组	3	0.40±0.01 ^{acdef}	0.63±0.01 ^{acdef}	1.51±0.04 ^{acdef}	1.66±0.05 ^{acdef}
F 值		90.51	187.00	32.77	166.60
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 H/R 组相比,^b $P<0.05$;与 H/R+si-NC 组相比,^c $P<0.05$;与 H/R+si-PRMT1 组相比,^d $P<0.05$;与 H/R+si-FGF2 组相比,^e $P<0.05$;与 H/R+PRMT1 抑制剂组相比,^f $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) HUVEC:人脐静脉内皮细胞;H/R:缺氧/复氧;PRMT1:蛋白质精氨酸甲基转移酶 1;FGF2:成纤维细胞生长因子 2

Note:Compared with control group,^a $P<0.05$;compared with H/R group,^b $P<0.05$;compared with H/R+si-NC group,^c $P<0.05$;compared with H/R+si-PRMT1 group,^d $P<0.05$;compared with H/R+si-FGF2 group,^e $P<0.05$;compared with H/R+PRMT1 inhibitor group,^f $P<0.05$ (One-way ANOVA,LSD- t test) HUVEC:human umbilical vein endothelial cells;H/R: hypoxia/reoxygenation;PRMT1:protein arginine methyltransferase 1;FGF2: fibroblast growth factor 2

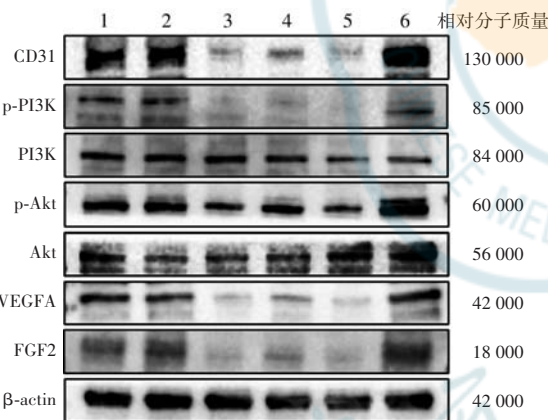


图 7 各组 HUVECs 中 CD31、p-PI3K、p-Akt、VEGFA 和 FGF2 电泳图 H/R+PRMT1 抑制剂组 CD31、p-PI3K、p-Akt、VEGFA 和 FGF2 蛋白条带灰度较 H/R 组和 H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组降低 1:H/R 组;2:H/R+si-NC 组;3:H/R+si-PRMT1 组;4:H/R+si-FGF2 组;5:H/R+PRMT1 抑制剂组;6:H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组 CD31:血小板-内皮细胞黏附分子;p-PI3K:磷酸化磷酸肌醇-3-激酶;PI3K:磷脂酰肌醇-3-激酶;p-Akt:磷酸化蛋白激酶 B;Akt:蛋白激酶 B;VEGFA:血管内皮生长因子 A;FGF2:成纤维细胞生长因子 2;β-actin:β-肌动蛋白

Figure 7 Electrophoretogram of CD31, p-PI3K, p-Akt, VEGFA and FGF2 in HUVECs in different groups In the H/R+PRMT1 inhibitor group, the grayscale intensity of CD31, p-PI3K, p-Akt, VEGFA and FGF2 protein bands decreased compared with the H/R group and H/R+PRMT1 inhibitor group 1:H/R group;2:HR+si-NC group;3:H/R+si-PRMT1 group;4:H/R+si-FGF2 group;5:H/R+PRMT1 inhibitor group;6:H/R + PRMT1 inhibitor + FGF2 group CD31: platelet endothelial cell adhesion molecule; p-PI3K: phosphorylated phosphoinositide 3-kinases; PI3K: phosphoinositide 3-kinases; p-Akt: phosphorylated protein kinase B;Akt:protein kinase B;VEGFA:vascular endothelial growth factor A;FGF2: fibroblast growth factor 2

细胞比均高于对照组,H/R 组、H/R+DMSO 组、H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组 CD206 阳性细胞比均高于 H/R+PRMT1 抑制剂组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。各组 iNOS 阳性细胞数比较差异有统计学意义($F=6.05,P=0.01$)(图 8,表 8)。

2.8 各组小鼠 CNV、炎症反应及巨噬细胞标志物表达比较

与碱烧伤组相比,碱烧伤后小鼠结膜下注射 NSC12 和 TC-E 5003 可减轻角膜混浊度和 CNV,且 TC-E 5003 的抑制作用比 NSC12 更明显。免疫荧光染色显示,PRMT1 抑制剂组和 FGF2 抑制剂组碱烧伤后小鼠角膜 VEGFA、CD206 和 F4/80 阳性细胞数目较碱烧伤组下调,PRMT1 抑制剂+FGF2 组 VEGFA、CD206 和 F4/80 阳性细胞数目较 PRMT1 抑制剂组上调(图 9)。正常组、碱烧伤组、FGF2 抑制剂组、PRMT1 抑制剂组和 PRMT1 抑制剂+FGF2 组角膜混浊度评分,CNV 面积,VEGFA、CD206 和 F4/80 阳性细胞计数总体比较差异均有统计学意义($F=25.38、76.90、58.40、53.05、225.50$,均 $P<0.01$),其中与碱烧伤组相比,FGF2 抑制剂组、PRMT1 抑制剂组和 PRMT1 抑制剂+FGF2 组角膜混浊度评分,CNV 面积,VEGFA、CD206 和 F4/80 阳性细胞计数均降低,PRMT1 抑制剂组各指标均低于 FGF2 抑制剂组和 PRMT1 抑制剂+FGF2 组,PRMT1 抑制剂+FGF2 组各指标均高于 FGF2 抑制剂组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(表 9)。

表 7 各组 HUVECs 中 FGF2、VEGFA、p-PI3K、p-Akt 和 CD31 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 7 Comparison of the relative expression levels of FGF2, VEGFA, p-PI3K, p-Akt and CD31 proteins in HUVECs cells among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	FGF2 蛋白 相对表达量	VEGFA 蛋白 相对表达量	p-PI3K 蛋白 相对表达量	p-Akt 蛋白 相对表达量	CD31 蛋白 相对表达量
H/R 组	3	0.37±0.02	0.43±0.01	0.69±0.01	1.29±0.03	1.42±0.01
H/R+si-NC 组	3	0.41±0.02	0.40±0.01	0.68±0.02	1.27±0.04	1.44±0.01
H/R+si-PRMT1 组	3	0.16±0.01 ^{ab}	0.12±0.01 ^{ab}	0.21±0.01 ^{ab}	0.90±0.01 ^{ab}	0.24±0.01 ^a
H/R+si-FGF2 组	3	0.26±0.01 ^{abc}	0.23±0.01 ^{abc}	0.37±0.01 ^{abc}	1.11±0.02 ^{abc}	0.33±0.01 ^{abc}
H/R+PRMT1 抑制剂组	3	0.17±0.01 ^{ab}	0.13±0.01 ^{ab}	0.22±0.01 ^{ab}	0.76±0.02 ^{ab}	0.23±0.01 ^{ab}
H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组	3	0.61±0.04 ^{abcd}	0.49±0.01 ^{abcd}	0.67±0.02 ^{cd}	1.63±0.05 ^{abcd}	1.47±0.01 ^{cd}
F 值		222.80	114.80	88.04	32.62	125.22
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与 H/R 组相比,^a $P<0.05$;与 H/R+si-NC 组相比,^b $P<0.05$;与 H/R+si-PRMT1 组相比,^c $P<0.05$;与 H/R+si-FGF2 组相比,^d $P<0.05$;与 H/R+PRMT1 抑制剂组相比,^e $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) HUVECs: 人脐静脉内皮细胞; FGF2: 成纤维细胞生长因子; VEGFA: 血管内皮生长因子 A; p-PI3K: 磷酸化磷酸肌醇-3-激酶; p-Akt: 磷酸化蛋白激酶 B; CD31: 血小板-内皮细胞黏附分子; H/R: 缺氧/复氧; PRMT1: 蛋白质精氨酸甲基转移酶 1

Note: Compared with H/R group, ^a $P<0.05$; compared with H/R+si-NC group, ^b $P<0.05$; compared with H/R+si-PRMT1 group, ^c $P<0.05$; compared with H/R+si-FGF2 group, ^d $P<0.05$; compared with H/R+PRMT1 inhibitor group, ^e $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) HUVECs: human umbilical vein endothelial cells; FGF2: fibroblast growth factor 2; VEGFA: vascular endothelial growth factor A; p-PI3K: phosphorylated phosphoinositide 3-kinases; p-Akt: phosphorylated protein kinase B; CD31: platelet endothelial cell adhesion molecule; H/R: hypoxia/reoxygenation; PRMT1: protein arginine methyltransferase 1

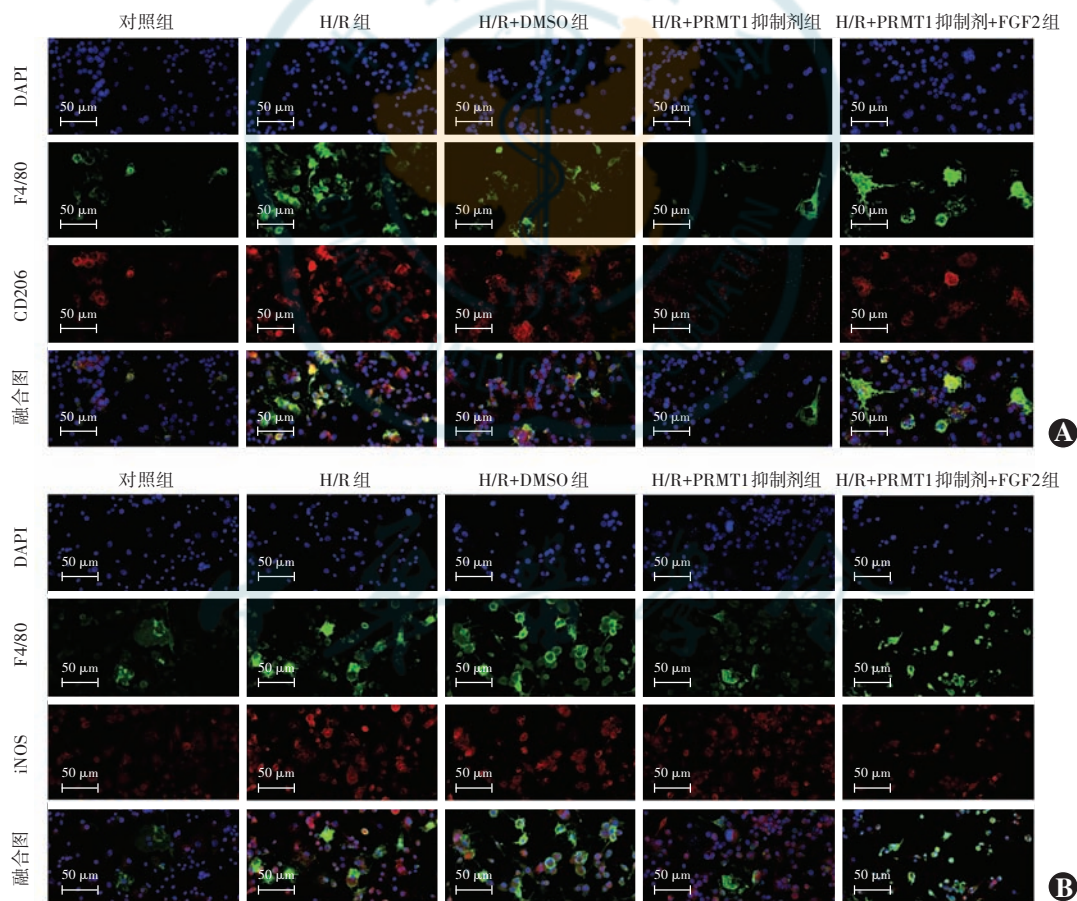


图 8 各组巨噬细胞 CD206 及 iNOS 阳性细胞数量比较 A: 各组巨噬细胞 CD206 和 F4/80 免疫荧光染色图 ($\times 400$, 标尺 = 50 μm) H/R+PRMT1 抑制剂组较 H/R 组和 H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组 CD206 阳性细胞数下降 B: 各组巨噬细胞 iNOS 和 F4/80 免疫荧光染色图 ($\times 400$, 标尺 = 50 μm) H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组与 H/R+PRMT1 抑制剂组 iNOS+细胞数无明显差别 H/R: 缺氧/复氧; DMSO: 二甲基亚砜; PRMT1: 蛋白质精氨酸甲基转移酶 1; FGF2: 成纤维细胞生长因子 2; DAPI: 4',6-二脒基-2-苯基吲哚; F4/80: 小鼠巨噬细胞标志物; CD206: 甘露糖受体 C 型 1; iNOS: 诱导型一氧化氮合酶

Figure 8 Comparison of the number of CD206- and iNOS- positive cells in macrophages of different groups A: Immunofluorescence staining images of CD206 and F4/80 ($\times 400$, scale bar = 50 μm) The number of CD206-positive cells decreased in the H/R+PRMT1 inhibitor group compared with the H/R group and H/R+PRMT1 inhibitor+FGF2 group B: Immunofluorescence staining images of iNOS and F4/80 ($\times 400$, scale bar = 50 μm) There was no statistically significant difference in the number of iNOS+ cells between the H/R+PRMT1 inhibitor+FGF2 group and the H/R+PRMT1 inhibitor group H/R: hypoxia/reoxygenation; DMSO: dimethyl sulfoxide; PRMT1: protein arginine methyltransferase 1; FGF2: fibroblast growth factor 2; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; F4/80: murine macrophage marker; CD206: C-type mannose receptor 1; iNOS: inducible nitric oxide synthase

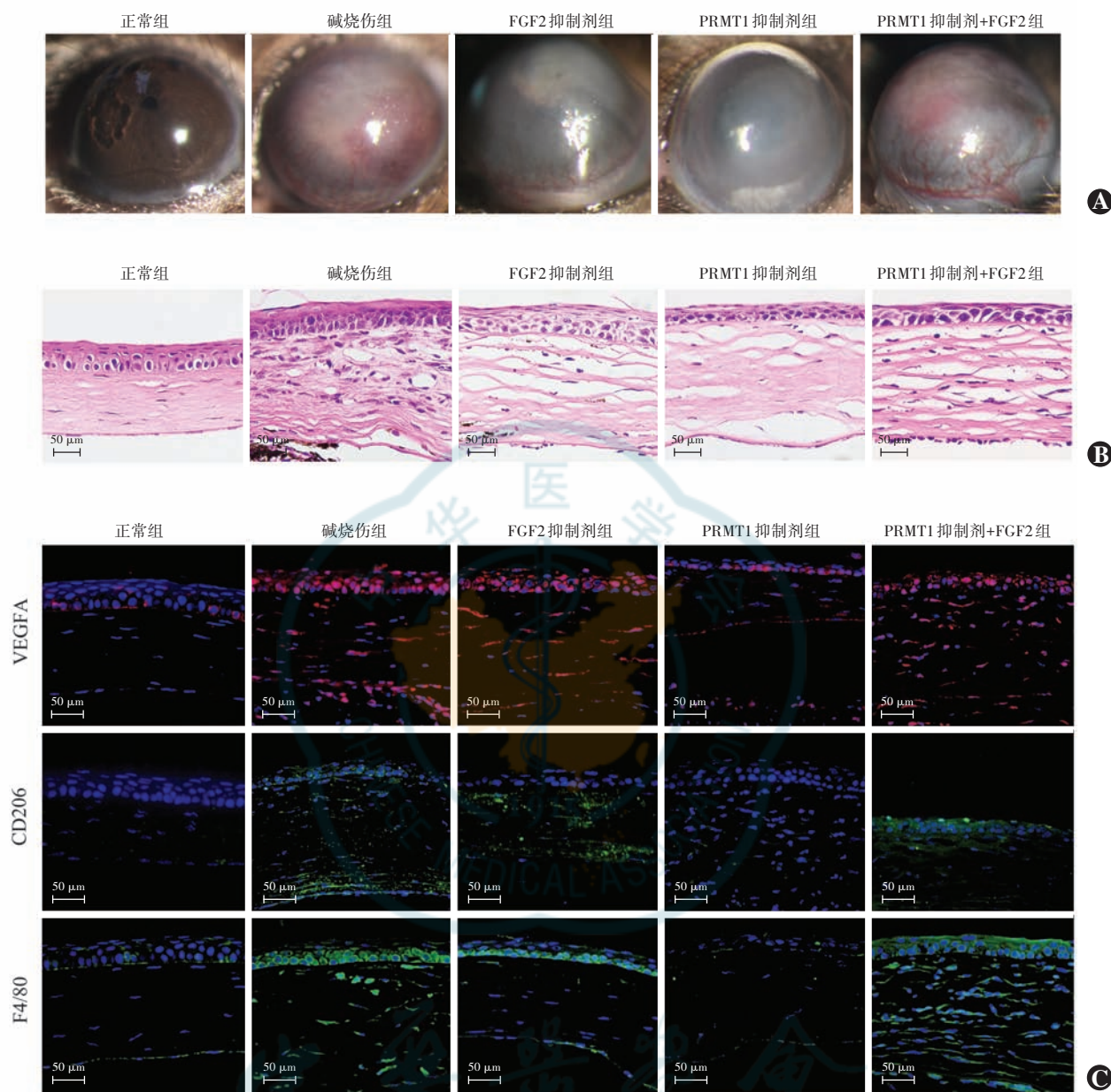


图 9 各组小鼠 CNV、炎症反应及巨噬细胞标志物表达比较 A: 各组小鼠角膜照相 与碱烧伤组相比, FGF2 抑制剂组和 PRMT1 抑制剂组角膜混浊度和 CNV 减轻, PRMT1 抑制剂+FGF2 组较 PRMT1 抑制剂组增强 B: 各组小鼠角膜炎症细胞数目比较 (HE $\times 200$, 标尺 = 50 μm) PRMT1 抑制剂+FGF2 组炎症细胞数目较 PRMT1 抑制剂组增加 C: 各组小鼠角膜免疫荧光染色图 ($\times 200$, 标尺 = 50 μm) PRMT1 抑制剂+FGF2 组 VEGFA、CD206 和 F4/80 阳性细胞数目较 PRMT1 抑制剂组增加 FGF2: 成纤维细胞生长因子 2; PRMT1: 蛋白质精氨酸甲基转移酶 1; VEGFA: 血管内皮生长因子 A; CD206: 甘露糖受体 C 型 1; F4/80: 小鼠巨噬细胞标志物

Figure 9 Comparison of CNV, inflammatory response and macrophage marker expression in mice of different groups A: Cornea photos Compared with the alkali burn group, the corneal opacity and corneal neovascularization were alleviated in FGF2 inhibitor and PRMT1 inhibitor groups and worsened in the PRMT1 inhibitor+FGF2 group than in the PRMT1 inhibitor group B: Comparison of inflammatory cell count in mice among different groups (HE $\times 200$, scale bar = 50 μm) Compared with the PRMT1 inhibitor group, the number of inflammatory cells was enhanced in the PRMT1 inhibitor+FGF2 group C: Immunofluorescence staining images of mice cornea ($\times 200$, scale bar = 50 μm) Compared with the PRMT1 inhibitor group, the number of VEGFA, CD206, and F4/80-positive cells was enhanced in the PRMT1 inhibitor+FGF2 group FGF2: fibroblast growth factor 2; PRMT1: protein arginine methyltransferase 1; VEGFA: vascular endothelial growth factor A; CD206: C-type mannose receptor 1; F4/80: murine macrophage marker

2.9 各组小鼠角膜中 FGF2、p-PI3K、p-Akt、CD31、VEGFA 和 Arg-1 表达比较

Western blot 检测结果显示, 与碱烧伤组相比, PRMT1 抑制剂组 FGF2、p-PI3K、p-Akt、CD31、VEGFA

和 Arg-1 蛋白表达条带减弱, PRMT1 抑制剂+FGF2 组各蛋白表达条带较 PRMT1 抑制剂组增强(图 10)。正常组、碱烧伤组、FGF2 抑制剂组、PRMT1 抑制剂组和 PRMT1 抑制剂+FGF2 组 FGF2、p-PI3K、p-Akt、

表 8 各组巨噬细胞 CD206 和 iNOS 阳性细胞比比较($\bar{x}\pm s$, %)
Table 8 Comparison of the percentage of CD206- and iNOS-positive cells in macrophages among different groups ($\bar{x}\pm s$, %)

组别	样本量	CD206 阳性 细胞比	iNOS 阳性 细胞比
对照组	3	32.03±1.28	36.24±1.75
H/R 组	3	54.65±2.86 ^a	41.16±2.01
H/R+DMSO 组	3	52.24±2.27 ^a	42.29±1.29
H/R+PRMT1 抑制剂组	3	39.78±2.29 ^{abc}	42.57±2.24
H/R+PRMT1 抑制剂+FGF2 组	3	52.97±0.77 ^{ad}	40.45±1.54
F 值		71.29	6.05
P 值		<0.01	0.01

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 H/R 组相比,^b $P<0.05$;与 H/R+DMSO 组相比,^c $P<0.05$;与 H/R+PRMT1 抑制剂组相比,^d $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) CD206:甘露糖受体 C 型 1;iNOS:诱导型一氧化氮合酶;H/R:缺氧/复氧;DMSO:二甲基亚砜;PRMT1:蛋白质精氨酸甲基转移酶 1;FGF2:成纤维细胞生长因子 2

Note: Compared with control group, ^a $P<0.05$; compared with H/R group, ^b $P<0.05$; compared with H/R+DMSO group, ^c $P<0.05$; compared with H/R+PRMT1 inhibitor group, ^d $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) CD206: C-type mannose receptor 1; iNOS: inducible nitric oxide synthase; H/R: hypoxia/reoxygen; DMSO: dimethyl sulfoxide; PRMT1: protein arginine methyltransferase 1; FGF2: fibroblast growth factor 2

CD31、VEGFA 和 Arg-1 蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F=83.22、247.30、62.19、265.70、160.70、67.80、59.08$, 均 $P<0.01$), 其中与碱烧伤组相比, PRMT1 抑制剂组 FGF2、p-PI3K、p-Akt、CD31、VEGFA 和 Arg-1 蛋白相对表达量降低, PRMT1 抑制剂+FGF2 组各蛋白相对表达量较 PRMT1 抑制剂组升高, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(表 10)。

3 讨论

CNV 是角膜移植排斥反应和进行性视力丧失的重要危险因素,但目前临床疗效有限,需要探索替代治疗策略^[3]。考虑到炎症和抗炎巨噬细胞极化在 CNV 中的关键作用,探讨其具体机制可能提供新颖而有效的治疗方法。PRMT1 已被发现与炎症损伤和巨噬细胞抗炎型极化密切相关^[13]。本研究发现,抑制 PRMT1 可有效降低碱烧伤引起的角膜水肿和炎性细胞浸润,缓解 CNV 程度,其具体机制可能是通过 FGF2/PI3K/Akt 通路影响巨噬细胞的激活和抗炎型极化实现的。因此,靶向 PRMT1 可能是治疗 CNV 一种新颖而有效的治疗方法。

精氨酸甲基化在表观遗传调控中起着至关重要的作用^[18-19]。甲基转移酶通过调控氧化应激促进新生血管形成,因此抑制甲基转移酶可作为抑制 CNV 的潜在策略^[9,20-21]。PRMT1 作为一种 I 型 PRMT,是哺乳动物细胞中主要的精氨酸甲基转移酶,负责 85% 以上的精氨酸甲基化^[22]。PRMT1 通过参与迁移、侵袭和新生血管形成等调控多种肿瘤的进展^[10]。PRMT1 可能通过调控氧化应激参与糖尿病视网膜病变等眼病的发生和发展^[23]。本研究发现,碱烧伤刺激可上调角膜 PRMT1 和 FGF2,从而破坏角膜中促血管生成因子和抗血管生成因子的平衡,而抑制 PRMT1 可显著减轻碱烧伤诱导的角膜损伤和 CNV 程度。

识别靶向调控抗炎巨噬细胞极化的关键分子是干扰血管生成的主要挑战,调节巨噬细胞极化是治疗

表 9 各组小鼠 CNV、炎症反应及巨噬细胞标志物表达比较($\bar{x}\pm s$)

Table 9 Comparison of CNV, inflammatory response and macrophage marker expression in mice among different groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	角膜混浊度 评分(分)	CNV 面积 (mm ²)	VEGFA 阳性 细胞计数(个/视野)	CD206 阳性 细胞计数(个/视野)	F4/80 阳性 细胞计数(个/视野)
正常组	3	0.00±0.00	0.00±0.00	3.67±1.53	3.33±1.15	29.67±2.08
碱烧伤组	3	3.67±0.58 ^a	3.57±0.37 ^a	33.67±1.53 ^a	54.33±1.53 ^a	193.00±7.00 ^a
FGF2 抑制剂组	3	2.33±0.58 ^{ab}	2.00±0.55 ^{ab}	13.00±1.00 ^{ab}	20.67±2.08 ^{ab}	91.00±6.24 ^{ab}
PRMT1 抑制剂组	3	1.33±0.58 ^{abc}	0.03±0.06 ^{abc}	12.33±1.53 ^{ab}	13.67±1.53 ^{abc}	56.33±2.52 ^{abc}
PRMT1 抑制剂+FGF2 组	3	3.33±0.58 ^{abcd}	2.62±0.22 ^{abcd}	28.67±1.52 ^{abcd}	43.33±1.53 ^{abcd}	176.67±6.03 ^{abcd}
F 值		25.38	76.90	58.40	53.05	225.50
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与正常组相比,^a $P<0.05$;与碱烧伤组相比,^b $P<0.05$;与 FGF2 抑制剂组相比,^c $P<0.05$;与 PRMT1 抑制剂组相比,^d $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) CNV:角膜新生血管;FGF2:成纤维细胞生长因子 2;PRMT1:蛋白质精氨酸甲基转移酶 1;VEGFA:血管内皮生长因子 A;CD206:甘露糖受体 C 型 1;F4/80:小鼠巨噬细胞标志物

Note: Compared with normal group, ^a $P<0.05$; compared with alkali burn group, ^b $P<0.05$; compared with FGF2 inhibitor group, ^c $P<0.05$; compared with PRMT1 inhibitor group, ^d $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) CNV: corneal neovascularization; FGF2: fibroblast growth factor 2; PRMT1: protein arginine methyltransferase 1; VEGFA: vascular endothelial growth factor A; CD206: C-type mannose receptor 1; F4/80: murine macrophage marker



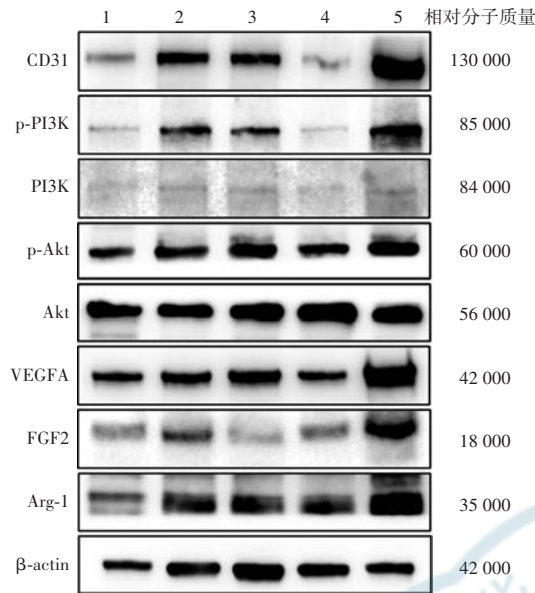


图 10 各组小鼠角膜中 CD31、p-PI3K、p-Akt、VEGFA、FGF2 和 Arg-1 电泳图 PRMT1 抑制剂组 FGF2、p-PI3K、p-Akt、VEGFA、CD31、Arg-1 和 LC3B 蛋白表达条带减弱,PRMT1 抑制剂+FGF2 组各蛋白表达条带较 PRMT1 抑制剂组增强 1:正常组;2:碱烧伤组;3:FGF2 抑制剂组;4:PRMT1 抑制剂组;5:PRMT1 抑制剂+FGF2 组 CD31:血小板-内皮细胞黏附分子;p-PI3K:磷酸化磷酸肌醇-3-激酶;PI3K:磷脂酰肌醇-3-激酶;p-Akt:磷酸化蛋白激酶 B;Akt:蛋白激酶 B;VEGFA:血管内皮生长因子 A;FGF2:成纤维细胞生长因子 2;Arg-1:精氨酸酶 1;β-actin:β-肌动蛋白

Figure 10 Electrophoretogram of CD31, p-PI3K, p-Akt, VEGFA, FGF2, and Arg-1 in mouse corneas among different groups The band intensities of FGF2, p-PI3K, p-Akt, VEGFA, CD31, and Arg-1 proteins were weakened in the PRMT1 inhibitor group and enhanced in the PRMT1 inhibitor + FGF2 group 1: normal group; 2: alkali burn group; 3: FGF2 inhibitor group; 4: PRMT1 inhibitor group; 5: PRMT1 inhibitor + FGF2 group CD31: platelet endothelial cell adhesion molecule-1; p-PI3K: phosphorylated phosphoinositide 3-kinase; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; p-Akt: phosphorylated protein kinase B; Akt: protein kinase B; VEGFA: vascular endothelial growth factor A; FGF2: fibroblast growth factor 2; Arg-1: arginase 1

眼部新生血管潜在而有前景的方法^[24]。巨噬细胞抗炎型极化是 CNV 发生和发展的关键因素,促进抗炎巨噬细胞浸润和活化可增加 CNV^[25]。PRMT1 对巨噬细胞抗炎极化至关重要,研究表明 PRMT1 可刺激多种恶性肿瘤中巨噬细胞的浸润和抗炎极化,从而促进肿瘤进展^[26-27]。本研究发现,碱烧伤后巨噬细胞浸润和抗炎极化显著增加,抑制 PRMT1 可有效缓解角膜炎症损伤和 CNV,减轻巨噬细胞激活和抗炎型极化。体外实验同样表明,抑制 PRMT1 可减少 HUVECs 中的血管生成和巨噬细胞中的抗炎型极化。因此,PRMT1 可能通过调节巨噬细胞浸润和抗炎极化参与 CNV 的发生和发展。

FGF2、重组人表皮生长因子 (recombinant human epidermal growth factor, rhEGF) 是除 VEGF 外的关键促血管生成因子。rhEGF 和 FGF2 均对角膜上皮伤口愈合有促进作用,但 rhEGF 对 CNV 的促进作用弱于 FGF2^[28]。FGF2/PI3K/Akt 通路及各种病理条件下的巨噬细胞浸润有关^[15]。既往研究表明,FGF2/PI3K/Akt 通路在促进抗炎巨噬细胞极化中发挥重要作用^[29]。本研究在碱烧伤诱导的 CNV 和 H/R 诱导的 HUVECs 模型中均观察到 FGF2 的表达升高,FGF2 抑制剂可有效抑制 CNV 中的 PI3K/Akt 通路,表明 FGF2/PI3K/Akt 通路在 CNV 中的重要调控作用。PRMT1 参与调控 PI3K/Akt 通路,但其具体机制可能在不同的疾病中有所不同^[30]。本研究中 TC-E 5003 联合 FGF2 重组蛋白可逆转 PRMT1 抑制剂对 HUVECs 细胞增殖、迁移和管形成能力的抑制作用,恢复 p-PI3K 和 p-Akt 的表达,表明 PRMT1 可能促进 HUVECs 中的 FGF2/PI3K/Akt 通路。因此,PRMT1 可

表 10 各组小鼠角膜中 FGF2、p-PI3K、p-Akt、CD31、VEGFA 和 Arg-1 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 10 Comparison of the expression of FGF2, p-PI3K, p-Akt, CD31, VEGFA and Arg-1 in mouse corneas among different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	FGF2	p-PI3K	p-Akt	CD31	VEGFA	Arg-1
正常组	0.20±0.04	1.27±0.01	0.23±0.03	0.23±0.03	0.31±0.05	0.35±0.03
碱烧伤组	0.84±0.12 ^a	2.67±0.02 ^a	0.85±0.03 ^a	1.01±0.03 ^a	0.89±0.02 ^a	1.10±0.05 ^a
FGF2 抑制剂组	0.23±0.02 ^b	2.33±0.03 ^{ab}	0.56±0.06 ^{ab}	0.37±0.04 ^{ab}	0.67±0.02 ^{ab}	0.65±0.07 ^{ab}
PRMT1 抑制剂组	0.41±0.05 ^{abc}	1.51±0.02 ^{abc}	0.27±0.01 ^{bc}	0.23±0.03 ^{bc}	0.33±0.03 ^{bc}	0.35±0.13 ^{bc}
PRMT1 抑制剂+FGF2 组	1.23±0.12 ^{abcd}	2.67±0.02 ^{acd}	1.06±0.16 ^{abcd}	0.81±0.05 ^{abcd}	0.95±0.06 ^{acd}	1.27±0.12 ^{abcd}
F 值	83.22	247.30	62.19	265.70	160.70	67.80
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与正常组相比,^a $P<0.05$;与碱烧伤组相比,^b $P<0.05$;与 FGF2 抑制剂组相比,^c $P<0.05$;与 PRMT1 抑制剂组相比,^d $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) FGF2:成纤维细胞生长因子 2;p-PI3K:磷酸化磷酸肌醇-3-激酶;p-Akt:磷酸化蛋白激酶 B;CD31:血小板-内皮细胞黏附分子;VEGFA:血管内皮生长因子 A;Arg-1:精氨酸酶 1;PRMT1:蛋白质精氨酸甲基转移酶 1

Note: Compared with normal group, ^a $P<0.05$; compared with alkali burn group, ^b $P<0.05$; compared with FGF2 inhibitor group, ^c $P<0.05$; compared with PRMT1 inhibitor group, ^d $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) FGF2: fibroblast growth factor 2; p-PI3K: phosphorylated phosphoinositide 3-kinase; p-Akt: phosphorylated protein kinase B; CD31: platelet endothelial cell adhesion molecule-1; VEGFA: vascular endothelial growth factor A; Arg-1: arginase 1; PRMT1: protein arginine methyltransferase 1

能主要通过 FGF2 调控 PI3K/Akt 通路从而促进血管生成。本研究结果显示,在动物模型中,PRMT1 抑制剂可降低 FGF2 的表达,PRMT1 通过 FGF2/PI3K/Akt 信号通路调控巨噬细胞浸润和抗炎极化,促进角膜损伤和新生血管的形成(图 11)。因此,抑制 PRMT1 可能是治疗 CNV 的一种新方法。有趣的是,本研究结果表明,抑制 PRMT1 可同时下调 VEGF 和 FGF2,这种双重抑制作用有助于克服抗 VEGF 药物的耐药性而改善治疗结果。

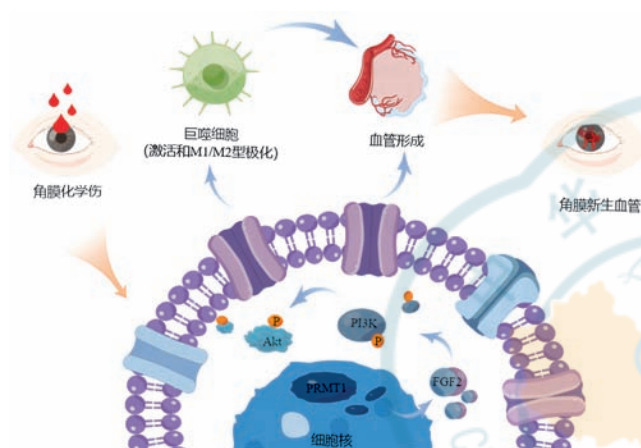


图 11 本研究机制图(本图由 Figdraw 绘制) 角膜受到碱烧伤刺激后,PRMT1 表达上调,并刺激下游的 FGF2/PI3K/Akt 通路,进而上调巨噬细胞激活和抗炎型极化,促进 CNV 的形成 Akt:蛋白激酶 B; PI3K:磷脂酰肌醇-3-激酶;FGF2:成纤维细胞生长因子 2;PRMT1:蛋白质精氨酸甲基转移酶 1

Figure 11 Schematic diagram of the mechanism (By Figdraw)

Following alkali burn injury to the cornea, PRMT1 expression was upregulated, stimulating the downstream FGF2/PI3K/Akt pathway, thereby enhancing macrophage activation and M2 polarization, thus promoting the formation of corneal neovascularization Akt:protein kinase B; PI3K: phosphoinositide 3-kinase; FGF2: fibroblast growth factor 2; PRMT1: protein arginine methyltransferase 1

综上所述,抑制 PRMT1 可通过调节 FGF2/PI3K/Akt 通路减轻巨噬细胞激活和抗炎型极化,从而有效缓解角膜损伤和 CNV 的形成。未来 PRMT1 抑制剂有望作为一种有效治疗 CNV 的药物。本研究仍存在一定局限性:(1)PRMT1 抑制剂治疗 CNV 的潜在不良反应尚不清楚;(2)本研究发现 FGF2 可能对 PRMT1 存在负反馈调节,但具体机制仍需进一步研究;(3)仍需探索 PRMT1 抑制剂的最佳剂型以促进临床转化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 高月兰:参与选题、研究设计、收集数据、资料分析和解释、论文撰写及修改;邓谦、毛介文:参与选题与研究设计、收集数据;张瑞:参与收集数据、资料分析和解释;石晓硕:参与收集数据;王珊珊:参与选题与研究设计、资料分析和解释;杨燕宁:参与选题、资料分析和解释、论文修改及定稿

参考文献

- [1] Hsu CC, Chang HM, Lin TC, et al. Corneal neovascularization and contemporary antiangiogenic therapeutics[J]. J Chin Med Assoc, 2015, 78(6): 323-330. DOI: 10. 1016/j. jcma. 2014. 10. 002.
- [2] Dong Q, Qi B, Zhang B, et al. Overactivation of norepinephrine- β 2-adrenergic receptor axis promotes corneal neovascularization [J/OL]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2023, 64(3): 20 [2025-01-10]. https://pubmed. ncbi..nlm.nih.gov/36897151/. DOI: 10. 1167/iops. 64. 3. 20.
- [3] Yu H, Sun L, Cui J, et al. Three kinds of corneal host cells contribute differently to corneal neovascularization [J]. EBioMedicine, 2019, 44: 542-553. DOI: 10. 1016/j. ebiom. 2019. 05. 026.
- [4] 王杨, 杨燕宁, 潘玉苗, 等. MiR-497 对角膜新生血管的抑制作用及其靶向 STAT3 调控机制 [J]. 中华实验眼科杂志, 2023, 41(3): 206-216. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20210201-00084. Wang Y, Yang YN, Pan YM, et al. Inhibitory effect of miR-497 on corneal neovascularization and its regulation mechanism targeting STAT3 [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2023, 41(3): 206-216. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20210201-00084.
- [5] Wang Y, Gao Y, Huang Y, et al. The potential protective effects of miR-497 on corneal neovascularization are mediated via macrophage through the IL-6/STAT3/VEGF signaling pathway [J/OL]. Int Immunopharmacol, 2021, 96: 107745 [2025-01-10]. https://pubmed. ncbi..nlm.nih.gov/33984719/. DOI: 10. 1016/j. intimp. 2021. 107745.
- [6] Gu XJ, Liu X, Chen YY, et al. Involvement of NADPH oxidases in alkali burn-induced corneal injury [J]. Int J Mol Med, 2016, 38(1): 75-82. DOI: 10. 3892/ijmm. 2016. 2594.
- [7] Bai JQ, Qin HF, Zhao SH. Research on mouse model of grade II corneal alkali burn [J]. Int J Ophthalmol, 2016, 9(4): 487-490. DOI: 10. 18240/ijo. 2016. 04. 02.
- [8] Dong M, Yang L, Qu M, et al. Autocrine IL-1 β mediates the promotion of corneal neovascularization by senescent fibroblasts [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2018, 315(5): C734-C743. DOI: 10. 1152/ajpcell. 00205. 2017.
- [9] Wan SS, Pan YM, Yang WJ, et al. Inhibition of EZH2 alleviates angiogenesis in a model of corneal neovascularization by blocking FoxO3a-mediated oxidative stress [J]. FASEB J, 2020, 34(8): 10168-10181. DOI: 10. 1096/fj. 201902814RRR.
- [10] Thiebaut C, Eve L, Poulard C, et al. Structure, activity, and function of PRMT1 [J/OL]. Life (Basel), 2021, 11(11): 1147 [2025-01-10]. https://pubmed. ncbi..nlm.nih.gov/34833023/. DOI: 10. 3390/life11111147.
- [11] Sun Y, Wang Z, Yang H, et al. The development of tetrazole derivatives as protein arginine methyltransferase I (PRMT I) inhibitors [J/OL]. Int J Mol Sci, 2019, 20(15): 3840 [2025-01-11]. https://pubmed. ncbi..nlm.nih.gov/31390828/. DOI: 10. 3390/ijms20153840.
- [12] Wang C, Dong L, Zhao Z, et al. Design and synthesis of novel PRMT1 inhibitors and investigation of their effects on the migration of cancer cell [J/OL]. Front Chem, 2022, 10: 888727 [2025-01-11]. https://pubmed. ncbi..nlm.nih.gov/35755248/. DOI: 10. 3389/fchem. 2022. 888727.
- [13] Tikhonovich I, Zhao J, Bridges B, et al. Arginine methylation regulates c-Myc-dependent transcription by altering promoter recruitment of the acetyltransferase p300 [J/OL]. J Biol Chem, 2017, 292(32): 13333-13344 [2025-01-12]. https://pubmed. ncbi..nlm.nih.gov/28652407/. DOI: 10. 1074/jbc. M117. 797928.
- [14] Gurung HR, Carr MM, Bryant K, et al. Fibroblast growth factor-2 drives and maintains progressive corneal neovascularization following HSV-1 infection [J]. Mucosal Immunol, 2018, 11(1): 172-185. DOI: 10. 1038/mi. 2017. 26.
- [15] Chen M, Bao L, Zhao M, et al. Progress in research on the role of FGF in the formation and treatment of corneal neovascularization [J/OL]. Front Pharmacol, 2020, 11: 111 [2025-01-12]. https://pubmed. ncbi..nlm.nih.gov/32158390/. DOI: 10. 3389/fphar. 2020. 00111.
- [16] Im JH, Buzzelli JN, Jones K, et al. FGF2 alters macrophage polarization, tumour immunity and growth and can be targeted during radiotherapy [J/OL]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4064 [2025-01-13]. https://pubmed. ncbi..nlm.nih.gov/32792542/. DOI: 10. 1038/s41467-020-17914-x.
- [17] Roshandel D, Eslani M, Baradaran-Rafii A, et al. Current and emerging therapies for corneal neovascularization [J]. Ocul Surf, 2018, 16(4): 398-414. DOI: 10. 1016/j. jtos. 2018. 06. 004.

- [18] Wu Q, Schapira M, Arrowsmith CH, et al. Protein arginine methylation: from enigmatic functions to therapeutic targeting [J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(7): 509–530. DOI: 10.1038/s41573-021-00159-8.
- [19] Stopa N, Krebs JE, Shechter D. The PRMT5 arginine methyltransferase: many roles in development, cancer and beyond [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(11): 2041–2059. DOI: 10.1007/s00018-015-1847-9.
- [20] Wan S, Yang W, Pan Y, et al. G9a suppression alleviates corneal neovascularization through blocking nox4-mediated oxidative stress [J/OL]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 6983268 [2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32256958/>. DOI: 10.1155/2020/6983268.
- [21] Wan S, Zhou Y, Huang Q, et al. Dot1l aggravates keratitis induced by herpes simplex virus type 1 in mice via p38 MAPK-mediated oxidative stress [J/OL]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6612689 [2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33628364/>. DOI: 10.1155/2021/6612689.
- [22] Lafleur VN, Richard S, Richard DE. Transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) by the protein arginine methyltransferase PRMT1 [J]. Mol Biol Cell, 2014, 25(6): 925–935. DOI: 10.1091/mbc.E13-07-0423.
- [23] Chen Y, Xu X, Sheng M, et al. PRMT-1 and DDAHs-induced ADMA upregulation is involved in ROS- and RAS-mediated diabetic retinopathy [J]. Exp Eye Res, 2009, 89(6): 1028–1034. DOI: 10.1016/j.exer.2009.09.004.
- [24] Ueta T, Ishihara K, Notomi S, et al. RIP1 kinase mediates angiogenesis by modulating macrophages in experimental neovascularization [J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(47): 23705–23713 [2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31685620/>. DOI: 10.1073/pnas.1908355116.
- [25] Hadrian K, Willenborg S, Bock F, et al. Macrophage-mediated tissue vascularization; similarities and differences between cornea and skin [J/OL]. Front Immunol, 2021, 12: 667830 [2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33897716/>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.667830.
- [26] Zhang Y, Wang K, Yang D, et al. Hsa_circ_0094606 promotes malignant progression of prostate cancer by inducing M2 polarization of macrophages through PRMT1-mediated arginine methylation of ILF3 [J]. Carcinogenesis, 2023, 44(1): 15–28. DOI: 10.1093/carcin/bgac091.
- [27] Zhao J, O'Neil M, Vittal A, et al. PRMT1-dependent macrophage IL-6 production is required for alcohol-induced HCC progression [J]. Gene Expr, 2019, 19(2): 137–150. DOI: 10.3727/105221618X15372014086197.
- [28] Li D, Xie K, Zhang L, et al. Dual blockade of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (FGF-2) exhibits potent anti-angiogenic effects [J]. Cancer Lett, 2016, 377(2): 164–173. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.04.036.
- [29] Li D, Xia L, Huang P, et al. Cancer-associated fibroblast-secreted IGFBP7 promotes gastric cancer by enhancing tumor associated macrophage infiltration via FGF2/FGFR1/PI3K/AKT axis [J/OL]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 17 [2025-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36681667/>. DOI: 10.1038/s41420-023-01336-x.
- [30] Choucair A, Pham TH, Omarjee S, et al. The arginine methyltransferase PRMT1 regulates IGF-1 signaling in breast cancer [J]. Oncogene, 2019, 38(21): 4015–4027. DOI: 10.1038/s41388-019-0694-9.

(收稿日期: 2025-02-10 修回日期: 2025-07-10)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

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: 方差分析 (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: 光学相干断层扫描 (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: 短发夹 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)

