

· 实验研究 ·

缺氧诱导 ANGPTL4 表达对实验性脉络膜新生血管生成的促进作用

陈佳 杨滢 苏舒 张晟来 杨晓伟 桑爱民

南通大学附属医院眼科, 南通 226001

通信作者: 桑爱民, Email: sangam@ntu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨缺氧诱导血管生成素样蛋白 4 (ANGPTL4) 表达在实验性脉络膜新生血管 (CNV) 中的作用。**方法** 选取 6~8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 27 只, 其中 18 只构建激光诱导 CNV 模型, 激光光凝后第 7 天分别采用光学相干断层扫描血流成像 (OCTA) 和荧光素眼底血管造影 (FFA) 验证造模是否成功, 分别于造模前和造模后第 3、7 天取视网膜色素上皮 (RPE)-脉络膜-巩膜复合体提取蛋白。采用 Western blot 法检测各时间点 ANGPTL4 及血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白相对表达量。同时取第 7 天小鼠眼球制备冰冻切片, 免疫荧光染色法观察 ANGPTL4 的表达及细胞定位。用 200 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴 (CoCl_2) 分别处理猕猴脉络膜视网膜内皮细胞 RF/6A 0、3、6、12 h; 另将 RF/6A 细胞分为正常对照组、缺氧组和缺氧+si-ANGPTL4 组, 缺氧+si-ANGPTL4 组采用含 si-ANGPTL4 序列的质粒转染细胞。采用 Western blot 法检测各组细胞中 ANGPTL4 和 VEGF 蛋白相对表达量; 成管实验观察各组之间成管数量的差异。另选取 27 只雄性 C57BL/6J 小鼠, 采用随机数字表法分为 CNV 组、CNV+si-NC 组和 CNV+si-ANGPTL4 组, 每组 9 只, 其中 CNV+si-NC 组和 CNV+si-ANGPTL4 组建立 CNV 模型后分别在玻璃体腔注射胆固醇修饰的 si-NC 和 si-ANGPTL4。采用 FFA 观察各组荧光素渗漏情况, 采用 OCTA 及脉络膜铺片免疫荧光法观察各组 CNV 的长度、厚度及面积; 采用 Western blot 法检测各组 ANGPTL4 和 VEGF 蛋白相对表达量。**结果** 造模前及造模后第 3、7 天, ANGPTL4 蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 1.58 ± 0.05 和 1.90 ± 0.04 , VEGF 蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 1.31 ± 0.05 和 1.84 ± 0.04 , 总体比较差异均有统计学意义 ($F = 528.934, 390.424$, 均 $P < 0.05$), 其中造模后第 3、7 天, ANGPTL4 和 VEGF 蛋白相对表达量均明显高于对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。对照组视网膜各层组织清晰, CNV 组视网膜神经上皮层下可见新生血管长入。相比于对照组, CNV 组 ANGPTL4 表达明显增多, 并与血管内皮细胞共定位。 CoCl_2 作用于 RF/6A 细胞后 3、6、12 h, ANGPTL4 和 VEGF 蛋白相对表达量均高于 0 h, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。与对照组比较, 低氧组 ANGPTL4 蛋白相对表达量升高, 低氧+si-ANGPTL4 组 ANGPTL4 蛋白相对表达量明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。对照组、低氧组、低氧+si-ANGPTL4 组成管数量分别为 (12.67 ± 1.53) 、 (19.64 ± 1.56) 和 (17.01 ± 1.04) 个, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 33.091, P < 0.01$), 其中低氧组、低氧+si-ANGPTL4 组成管数量均较对照组增多, 低氧+si-ANGPTL4 组成管数量较低氧组减少, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。CNV+si-ANGPTL4 组 ANGPTL4 和 VEGF 蛋白相对表达量均明显低于 CNV 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。CNV+si-ANGPTL4 组 CNV 面积明显小于 CNV 组和 CNV+si-NC 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。**结论** 缺氧诱导 ANGPTL4 表达促进体内及体外实验性 CNV 生成, 抑制 ANGPTL4 可以减少 CNV 的形成及渗漏。

【关键词】 脉络膜新生血管; 缺氧; 血管生成素样蛋白 4; 脉络膜内皮细胞; 小干扰 RNA**基金项目:** 江苏省研究型医院项目 (YJXY202204); 江苏省卫生健康委员会面上项目 (M2024045)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20240207-00042

Promotive effect of hypoxia-induced ANGPTL4 expression on experimental choroidal neovascularization

Chen Jia, Yang Ying, Su Shu, Zhang Shenglai, Yang Xiaowei, Sang Aimin

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China

Corresponding author: Sang Aimin, Email: sangam@ntu.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the role of hypoxia-induced angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) expression in experimental choroidal neovascularization (CNV). **Methods** Twenty-seven SPF male C57BL/6J mice aged 6~8 weeks were selected. Eighteen of the mice were used to establish a laser-induced CNV model. On the 7th day after laser photocoagulation, success of the modeling was verified using optical coherence tomography



angiography (OCTA) and fundus fluorescein angiography (FFA). The retinal pigment epithelium (RPE)-choroid-sclera complex was extracted for protein analysis before modeling and on the 3rd and 7th days after modeling. The relative expression levels of ANGPTL4 and vascular endothelial growth factor (VEGF) at different time points were detected by Western blot. Additionally, frozen sections of mouse eyeballs on day 7 after modeling were prepared and the expression and cellular localization of ANGPTL4 were observed by immunofluorescence. RF/6A cells, derived from monkey choroidal retinal endothelial cells, were treated with 200 $\mu\text{mol/L}$ cobalt chloride (CoCl_2) in the culture medium for 0, 3, 6, and 12 hours. RF/6A cells were also divided into a normal control group, a hypoxia group, and a hypoxia+si-ANGPTL4 group, and cells were transfected with a plasmid containing si-ANGPTL4 sequence. The relative expression levels of ANGPTL4 and VEGF proteins in each group were detected by Western blot, and the differences in tube formation among the groups were observed by tube formation assay. A total of 27 male C57BL/6J mice were randomly divided into CNV group, CNV+si-NC group, and CNV+si-ANGPTL4 group, with 9 mice in each group. In the CNV+si-NC and CNV+si-ANGPTL4 groups, si-NC and si-ANGPTL4 were respectively injected into the vitreous cavity after the CNV model was established. Fluorescence leakage in mice was observed by FFA, and the length, thickness and area of CNV was observed using OCTA and immunofluorescence staining of choroidal flat mounts. The relative expression levels of ANGPTL4 and VEGF proteins in each group were detected by Western blot. All animal experiments were conducted in accordance with ARVO Statement on the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The experimental protocol was approved by the Affiliated Hospital of Nantong University (No. S20220822-902).

Results Before modeling and on the 3rd and 7th days after modeling, the relative expression levels of ANGPTL4 protein were 1.00 ± 0.00 , 1.58 ± 0.05 , and 1.90 ± 0.04 , respectively, and the relative expression levels of VEGF protein were 1.00 ± 0.00 , 1.31 ± 0.05 , and 1.84 ± 0.04 , respectively, with statistically significant overall differences ($F = 528.934, 390.424$, both $P < 0.05$). Among them, on the 3rd and 7th days after modeling, the relative expression levels of ANGPTL4 and VEGF proteins were significantly higher in CNV group than in the control group (all $P < 0.05$). The tissues of each layer of the retina were clear in the control group, while neovascularization could be seen growing under the retinal neuroepithelial layer in the CNV group. Compared with the control group, ANGPTL4 expression was significantly increased and colocalized with vascular endothelial cells in the CNV group. After CoCl_2 treatment of RF/6A cells for 3, 6, and 12 hours, the relative expression levels of ANGPTL4 and VEGF proteins were higher than at 0 hour, with statistically significant differences (all $P < 0.05$). Compared with the control group, the relative ANGPTL4 protein expression was increased in the hypoxia group and significantly decreased in the hypoxia+si-ANGPTL4 group, showing statistically significant differences (both $P < 0.05$). The number of tube formations in the control group, hypoxia group, and hypoxia+si-ANGPTL4 group were 12.67 ± 1.53 , 19.64 ± 1.56 , and 17.01 ± 1.04 , respectively, with a statistically significant overall difference ($F = 33.091, P < 0.01$). The number of tube formations increased in the hypoxia group and hypoxia+si-ANGPTL4 group compared with the control group, and the number of tube formations decreased in the hypoxia+si-ANGPTL4 group compared with the hypoxia group, with statistically significant differences (all $P < 0.05$). Relative expression levels of ANGPTL4 and VEGF proteins were significantly lower in the CNV + si-ANGPTL4 group than those in the CNV group (both $P < 0.05$). The CNV area was significantly lower in the CNV + si-ANGPTL4 group than in the CNV group and CNV + si-NC group (both $P < 0.05$).

Conclusions Hypoxia-induced ANGPTL4 promotes experimental CNV formation *in vivo* and *in vitro*. Inhibiting ANGPTL4 can reduce CNV formation and leakage.

[Key words] Choroidal neovascularization; Hypoxia; Angiopoietin-like protein 4; Choroidal endothelial cells; Small interfering RNA

Fund program: Jiangsu Provincial Research Hospital (YJXYY202204); General Project of Jiangsu Provincial Health Commission (M2024045)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20240207-00042

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是新生血管性年龄相关性黄斑变性 (neovascular age-related macular degeneration, nAMD) 的主要特征, 其形成受到多种调控因素的影响^[1]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及其受

体在 CNV 的病理生理过程中起着重要作用^[2]。目前, 玻璃体腔注射抗 VEGF 药物已成为 nAMD 的一线治疗方案^[3]。尽管抗 VEGF 治疗可以稳定并改善 nAMD 患者的视功能, 但仍有近一半的患者结局不良。长期的抗 VEGF 治疗可能无法阻止疾病的进展, 并对视网膜

功能产生不利影响^[4]。因此,寻找新的分子靶点对 nAMD 的治疗至关重要。既往研究显示,nAMD 患者房水中血管生成素样蛋白 4(angiotensin-like protein 4, ANGPTL4)表达水平升高,其高水平与 nAMD 患者的病变面积、抗 VEGF 治疗频次及黄斑水肿有关,提示其可能成为 nAMD 患者治疗的新靶点^[5-6]。ANGPTL4 已被证实参与血管生成、血管通透性、肿瘤发生、炎症、能量稳态以及细胞分化^[7],其在缺血性视网膜疾病中的作用和功能已有报道^[8-10],然而 ANGPTL4 在 CNV 形成过程中的具体机制尚未阐明。本研究拟探讨缺氧诱导的 ANGPTL4 在 CNV 形成中的作用以及玻璃体腔注射 si-ANGPTL4 是否可以减轻 CNV 的形成,为 CNV 的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞来源 6~8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 54 只,购自南通大学实验动物中心。小鼠在 12 h 光/暗循环中饲养,可自由获取水和食物。所有动物实验均遵循视觉与眼科研究协会关于在眼科和视力研究中使用动物的声明,实验方案经南通大学附属医院伦理委员会审核批准(批文号:S20220822-902)。猕猴脉络膜视网膜内皮细胞系(RF/6A)购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂及仪器 RPMI-1460 培养基、10% 胎牛血清、青霉素/链霉素双抗、0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);Lipofectamine 3000 转染试剂盒(美国 Invitrogen 公司);siRNA(南通百奥迈科生物公司);戊巴比妥钠(英国 Tocris Bioscience 公司);复方托吡卡胺滴眼液(日本参天制药株式会社);荧光素钠(美国 Akorn 公司);兔抗 ANGPTL4 抗体(#18374-1-AP,美国 Proteintech 公司);兔抗 VEGF 抗体(#ab52917,美国 Abcam 公司);IB4 抗体(荧光直标 #FL-1201,美国 Vector Labs 公司);鼠抗 CD31 抗体(AF3628-SP,美国 Biotechne 公司);FITC 标记山羊抗兔/小鼠 IgG(H+L)(美国 ABclonal Biotech 公司);胆固醇修饰的 si-Angptl4 及 si-NC(滁州 Generalbio 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液、SDS-PAGE 凝胶试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);增强型化学发光试剂盒(美国 eBioscience 公司)。多波长眼底治疗激光机(Vision One,美国 Lumenis 公司);眼底前置镜(美国 Ocular Instruments 公司);生物显微镜(Leica DM2000,德国 Leica 公司);扫频源光学相干断层扫描血管成像(swept-source optical coherence tomography angiography,

SS-OCTA)仪(VG200D,洛阳 SVision Imaging 公司)。

1.2 方法

1.2.1 激光诱导 CNV 模型的建立 采用随机数字表法选取 18 只小鼠,用 0.5% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳。采用波长 532 nm 激光进行激光光凝,光斑直径为 100 μm ,曝光时间为 100 ms,功率为 200 mW^[11]。用眼底前置镜在每眼距视盘 1.0~1.5 PD 距离的 3:00、6:00、9:00 和 12:00 位制造 4 个激光斑点。如产生气泡,表明 Bruch 膜破裂,则模型构建成功,排除出血或不能形成气泡的激光点。

1.2.2 荧光素眼底血管造影及 OCTA 观察 CNV 大小及渗漏面积 激光光凝后第 7 天采用荧光素眼底血管造影(fundus fluorescein angiography, FFA)及 OCTA 观察新生血管大小及渗漏面积。分别于注射荧光素后 5 和 10 min 获得眼底图像,判断病灶分级。分级标准:无强荧光为 0 级;有强荧光但渗漏可忽略为 1 级;在病灶内有低水平的渗漏为 2a 级;病灶区域有高水平的渗漏为 2b 级。采用 ImageJ 软件对 OCTA 图像中 CNV 的总面积进行量化。

1.2.3 免疫荧光染色法观察 ANGPTL4 的表达及细胞定位 激光诱导后第 7 天,选取 3 只小鼠;同时选取无任何干预的对照组 3 只小鼠,腹腔注射 0.5% 戊巴比妥钠后处死小鼠并摘除小鼠双眼眼球,置于 4% 多聚甲醛中固定 2~3 h,制备 8 μm 厚冰冻切片。将切片用 5% 牛血清白蛋白封闭液在室温下孵育 30 min 后,与兔抗 ANGPTL4 抗体(1:1 000)和 IB4 直标抗体(1:200)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。用 FITC 标记山羊抗兔二抗室温孵育 2 h,用含 DAPI 的封闭液封片。荧光显微镜下观察并拍照。蓝色荧光显示 DAPI 核染,红色荧光标记 ANGPTL4 蛋白,绿色荧光标记 IB4 蛋白。实验独立重复 3 次。

1.2.4 RF/6A 细胞培养 将细胞复苏后培养在 RPMI1640+10% 胎牛血清+1% 青霉素/链霉素的混合培养基中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中,每天更换培养液。倒置显微镜下观察细胞生长情况,待细胞融合达 80% 时弃去培养液,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗 3 遍,加入 0.25% 胰蛋白酶消化 2 min,待细胞变圆、漂浮后,加入完全培养基终止消化,均匀吹打细胞,使细胞全部单个脱落。将细胞悬液转移至 15 ml 离心管中,离心半径 15 cm,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,向离心管中加入完全培养基 4 ml,吹打、重悬细胞,进行 1:2 传代培养,用于后续实验。

1.2.5 氯化钴诱导 RF/6A 细胞缺氧模型的建立 将 200 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴 (CoCl_2) 加入培养基,构建体外细胞化学缺氧模型,分别培养 RF/6A 细胞 0、3、6、12 h,以不加 CoCl_2 的细胞作为对照组。采用 Western blot 法检测各组细胞中 ANGPTL4、VEGF 蛋白表达量。

1.2.6 细胞分组及处理 将 RF/6A 细胞分为正常对照组、缺氧组和缺氧+si-ANGPTL4 组。正常对照组不给予药物处理,缺氧组和缺氧+si-ANGPTL4 组予以 CoCl_2 处理,同时缺氧+si-ANGPTL4 组进行细胞转染,将细胞接种于 6 孔板中并用完全培养基培养,细胞密度为 2×10^6 个/孔,过夜生长。按照 Lipofectamine 3000 说明书,将转染复合物加入细胞中孵育 4~6 h。用 RPMI1640 洗涤细胞,在含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 中继续孵育 48 h,收集细胞进行后续实验。si-ANGPTL4-1 序列:正向引物为 5'-CAGAUGGAG GCUGGACAGUdTdT-3',反向引物为 5'-ACUGUCCAG CCUCCAUCUGdTdT-3';si-ANGPTL4-2 序列:正向引物为 5'-CCUGGAAGCCUACAAGGAdTdT-3',反向引物为 5'-UCCUUGUAGGCUUCCCAGGdTdT-3';阴性转染 si-NC 序列:正向引物为 5'-UUCUCCGAACGU GUCACGUdTdT-3',反向引物为 5'-ACGUGACACGU UCGGAGAAdTdT-3'。转染后 6 h,倒置荧光显微镜下观察转染效率。采用 Western blot 法检测 RF/6A 细胞中 ANGPTL4 蛋白表达水平,以检测转染效果。选择转染效果最佳的 si-ANGPTL4-2 进行后续实验。

1.2.7 Western blot 法检测各目的蛋白相对表达量 造模前及造模后第 3、7 天,各组分别取 6 只小鼠,腹腔注射 0.5% 戊巴比妥钠后处死小鼠并收集其 RPE-脉络膜-巩膜复合体; CoCl_2 作用于 RF/6A 细胞后 0、3、6、12 h,收集各组细胞;将小鼠 RPE-脉络膜-巩膜复合体和细胞匀浆于含酶抑制剂的 RIPA 缓冲液中。离心半径 8.5 cm,12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,用 BCA 法检测蛋白浓度。蛋白样品在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 10 min,将等量的蛋白样品用 10% SDS-PAGE 分离,转移到 PVDF 膜。封闭后,将膜与一抗 ANGPTL4 (1:1 000)、VEGF (1:500)、GAPDH (1:2 000) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。次日,用 TBST 冲洗后,将膜与辣根过氧化物酶偶联的二抗孵育 2 h,凝胶成像系统照相。以 GAPDH 为内参,采用 Image J 软件测定蛋白条带灰度值,计算目的蛋白相对表达量。实验独立重复 3 次。

1.2.8 成管实验 观察每孔中管状结构网络 将 200 μl Matrigel 加入 24 孔培养皿中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min,使其凝固。将细胞分为对照组、低氧组和低氧+si-ANGPTL4 组,预先培养 48 h 后,将细胞按每孔

2×10^4 个细胞接种于含 0.5% 胎牛血清的 RPMI1640 培养板上,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h,倒置显微镜下观察每孔中管状结构网络。任意选取 5 个视野,计数腔室数量,取平均值。实验重复 3 次。

1.2.9 药物玻璃体腔注射 光凝后第 1 天,选取 27 只小鼠,采用随机数字表法将其随机分为 CNV 组、CNV+si-NC 组和 CNV+si-ANGPTL4 组,每组 9 只,CNV 组不给予任何药物干预;CNV+si-ANGPTL4 组和 CNV+si-NC 组分别将 2 μl 含 0.1 nmol 胆固醇修饰的 ANGPTL4 siRNA 或阴性对照 siRNA 注射到小鼠玻璃体腔中。胆固醇结合的 siRNA 具有较长期的稳定性 (超过 25 d) 和较好的细胞穿透性。麻醉并固定小鼠后进行眼部消毒、扩瞳、滴表面麻醉剂。于角膜缘后 1 mm 处垂直进针后倾斜避开晶状体,完成注射后停留约 10 s,眼膏封闭孔道。激光光凝后第 7 天处死小鼠。

1.2.10 脉络膜铺片观察 CNV 面积 光凝后第 7 天,选取 3 只小鼠,小鼠腹腔注射 0.5% 戊巴比妥钠后处死。摘出小鼠眼球立即置于 4% 多聚甲醛中固定 1 h。活检显微镜下去除眼周结缔组织,摘除眼前段,分离神经视网膜,将 RPE-脉络膜-巩膜复合体以视盘为中心放射状对称剪为 4 片铺片。用 1% 牛血清白蛋白进行封闭,在 0.5% Triton-X 100 溶液中通透 30 min。PBS 洗涤 3 次,用 ANGPTL4 (1:1 000)、CD31 (1:20) 一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。PBS 洗涤,加入山羊抗兔/小鼠 IgG (H+L) 在室温下孵育 2 h。在 PBS 中洗涤后,将复合体平铺于载玻片上,用含 DAPI 的封闭液封片。荧光显微镜下观察脉络膜铺片并分析。蓝色荧光显示 DAPI 核染,绿色荧光标记 ANGPTL4 蛋白,红色荧光标记 CD31 蛋白。实验独立重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析和作图。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数经 Levene 检验证实方差齐。各组各检测指标总体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 激光诱导 CNV 模型的建立及各组 ANGPTL4 和 VEGF 蛋白相对表达量比较

造模后 7 d,FFA 显示 CNV 渗漏面积明显增大;OCTA 显示视网膜无血管层出现 CNV 血流成像,造模成功 (图 1A,B)。造模前及造模后第 3、7 天,ANGPTL4

蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 1.58 ± 0.05 和 1.90 ± 0.04 , VEGF 蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 1.31 ± 0.05 和 1.84 ± 0.04 , 总体比较差异均有统计学意义 ($F = 528.934, 390.424$, 均 $P < 0.05$), 其中造模后第 3、7 天, ANGPTL4 和 VEGF 蛋白相对表达量均明显高于造模前, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 1C, D)。

2.2 ANGPTL4 的组织定位情况

对照组视网膜各层组织清晰, CNV 组视网膜神经上皮层下可见新生血管长入。免疫荧光染色结果显示, 相比于对照组, CNV 组 ANGPTL4 表达明显增多, 并与血管内皮细胞共定位 (图 2)。

2.3 缺氧诱导后 RF/6A 细胞中 VEGF 和 ANGPTL4 表达比较

CoCl₂ 作用于 RF/6A 细胞后, VEGF 和 ANGPTL4 蛋白表达以相似的时间依赖方式上调, 在 12 h 达高峰。CoCl₂ 作用于 RF/6A 细胞后 0、3、6、12 h, VEGF 蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 1.76 ± 0.10 、 2.41 ± 0.09 和 2.81 ± 0.11 , ANGPTL4 蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 1.98 ± 0.05 、 2.67 ± 0.10 和 2.93 ± 0.10 , 总体比较差异均有统计学意义 ($F = 250.101, 395.223$, 均 $P < 0.05$), 其中 CoCl₂ 作用于 RF/6A 细胞后 3、6、12 h, VEGF 和 ANGPTL4 蛋白相对表达量均高于 0 h, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3)。

2.4 ANGPTL4 敲低后各组细胞 ANGPTL4 蛋白相对表达量和腔室数量比较

对照组、低氧组和低氧 + si-ANGPTL4 组 ANGPTL4 蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 1.20 ± 0.03 和 0.51 ± 0.02 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 824.789, P < 0.01$), 其中与对照组比较, 低

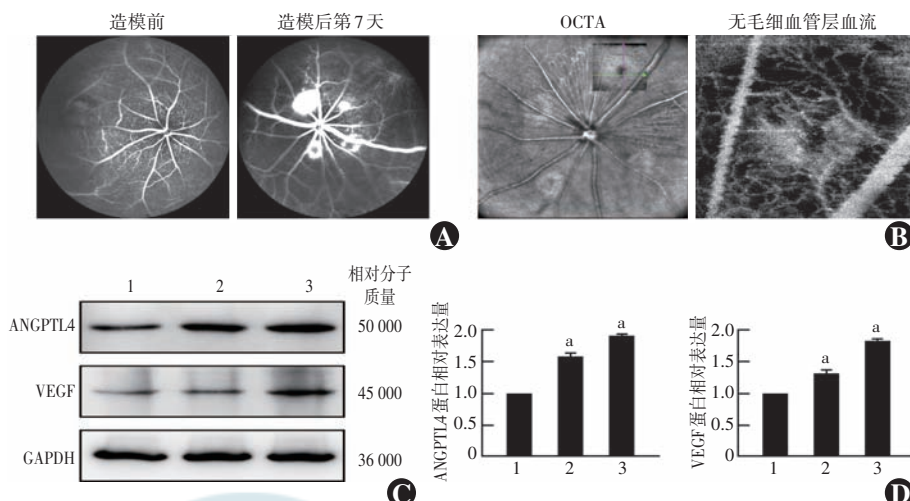


图 1 激光诱导的 CNV 模型建立情况及各组 ANGPTL4 和 VEGF 蛋白相对表达量比较 A: FFA 检测 CNV 渗漏面积 造模后第 7 天, CNV 渗漏面积明显增大 B: OCTA 检测 CNV 的形成 造模后第 7 天, 视网膜无血管层出现血流成像 C: Western blot 检测 ANGPTL4 和 VEGF 蛋白表达电泳图 D: ANGPTL4 和 VEGF 蛋白相对表达量比较 $F = 528.934, 390.424$, 均 $P < 0.05$. 与造模前相比, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验; $n = 6$) 1: 造模前; 2: 造模后第 3 天; 3: 造模后第 7 天 OCTA: 光学相干断层扫描血管成像; ANGPTL4: 血管生成素样蛋白 4; VEGF: 血管内皮生长因子; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 1 Establishment of laser-induced CNV model and comparison of the relative expression levels of ANGPTL4 and VEGF proteins A: FFA showed that the leakage area of CNV increased significantly on the 7th day after model establishment B: OCTA showed that blood flow imaging in the avascular layer of the retina was observed on the 7th day after model establishment C: Electrophoretogram of ANGPTL4 and VEGF protein expressions by Western blot D: Comparison of the relative expression levels of ANGPTL4 and VEGF proteins $F = 528.934, 390.424$, both $P < 0.05$. Compared with before modeling, $^a P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test; $n = 6$) 1: before modeling; 2: 3rd day after modeling; 3: 7th day after modeling OCTA: optical coherence tomography angiography; ANGPTL4: angiopoietin-like protein 4; VEGF: vascular endothelial growth factor; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

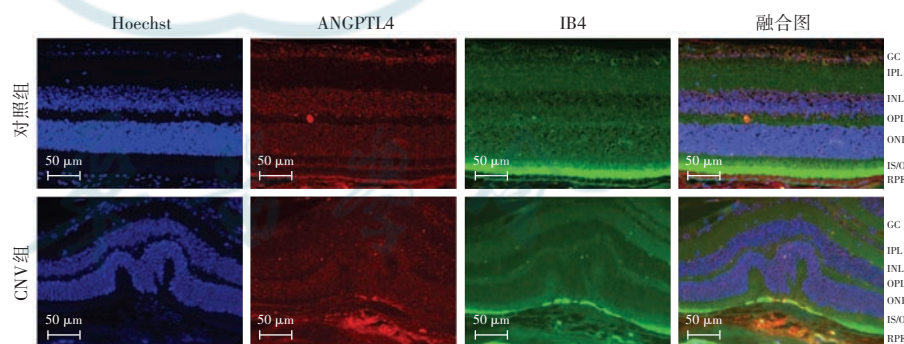


图 2 ANGPTL4 的组织定位情况 ($\times 50$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) 相比于对照组, CNV 组 ANGPTL4 表达明显增多, 并与血管内皮细胞共定位 ANGPTL4: 血管生成素样蛋白 4; CNV: 脉络膜新生血管; GCL: 神经节细胞层; IPL: 内丛状层; INL: 内核层; OPL: 外丛状层; ONL: 外核层; IS/OS: 内外节段交界处; RPE: 视网膜色素上皮

Figure 2 Tissue localization of ANGPTL4 ($\times 50$, scale bar = $50 \mu\text{m}$) Compared with the control group, the expression of ANGPTL4 was significantly increased in the CNV group and was co-localized with vascular endothelial cells ANGPTL4: angiopoietin-like protein 4; CNV: choroidal neovascularization; GCL: ganglion cell layer; IPL: inner plexiform layer; INL: inner nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; ONL: outer nuclear layer; IS/OS: interface between inner and outer segments; RPE: retinal pigment epithelium

氧组 ANGPTL4 蛋白相对表达量升高, 低氧 + si-ANGPTL4 组 ANGPTL4 蛋白相对表达量明显降低, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4A, B)。对照组、

低氧组和低氧+si-ANGPTL4 组成管数量分别为 (12.67 ± 1.53)、(19.64 ± 1.56) 和 (17.01 ± 1.04) 个, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 33.091, P < 0.01$), 其中低氧组、低氧+si-ANGPTL4 组成管数量均较对照组增多, 低氧+si-ANGPTL4 组成管数量较低氧组减少, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4C, D)。

2.5 ANGPTL4 敲低后各组小鼠荧光素渗漏情况及 VEGF 和 ANGPTL4 表达比较

FFA 结果显示, 激光光凝后第 7 天, CNV + si-ANGPTL4 组 CNV 渗漏面积明显小于 CNV + si-NC 组和 CNV 组 (图 5A)。si-ANGPTL4 注射减少了染色较强的渗漏点 (分级为 2 级或以上), 增加了染色较弱的渗漏点 (分级为 0 或 1 级) (图 5B)。Western blot 检测结果显示, VEGF 蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 1.02 ± 0.07 和 0.56 ± 0.02 , CNV 组、CNV + si-NC 组和 CNV + si-ANGPTL4 组 ANGPTL4 蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 1.01 ± 0.04 和 0.47 ± 0.03 , 总体比较差异均有统计学意义 ($F = 128.639$ 、 372.634 , 均 $P < 0.05$), 其中 CNV + si-

2.6 ANGPTL4 敲低后各组小鼠 CNV 面积比较

激光光凝后第 7 天, CNV + si-ANGPTL4 组 CNV 长度及厚度显著低于 CNV 组和 CNV + si-NC 组 (图 6A)。

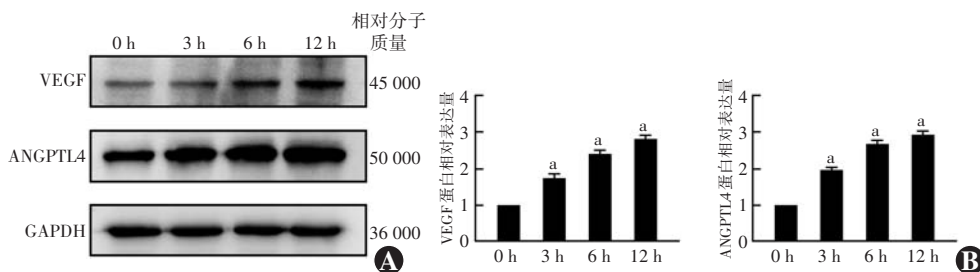


图 3 缺氧诱导后 RF/6A 细胞中 VEGF 和 ANGPTL4 表达变化 A: 不同时间点 VEGF 和 ANGPTL4 蛋白表达电泳图 B: 不同时间点 VEGF 和 ANGPTL4 蛋白相对表达量比较 $F = 250.101, 395.223$, 均 $P < 0.05$. 与 0 h 时相比, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验; $n = 3$) VEGF: 血管内皮生长因子; ANGPTL4: 血管生成素样蛋白 4; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 3 Changes in the expression of VEGF and ANGPTL4 in RF/6A cells after hypoxia induction A: Electrophoretogram of VEGF and ANGPTL4 protein expression at different time points B: Comparison of the relative expression levels of VEGF and ANGPTL4 proteins at different time points $F = 250.101, 395.223$; both $P < 0.05$. Compared with 0 h, ^a $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test; $n = 3$) VEGF: vascular endothelial growth factor; ANGPTL4: angiopoietin-like protein 4; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

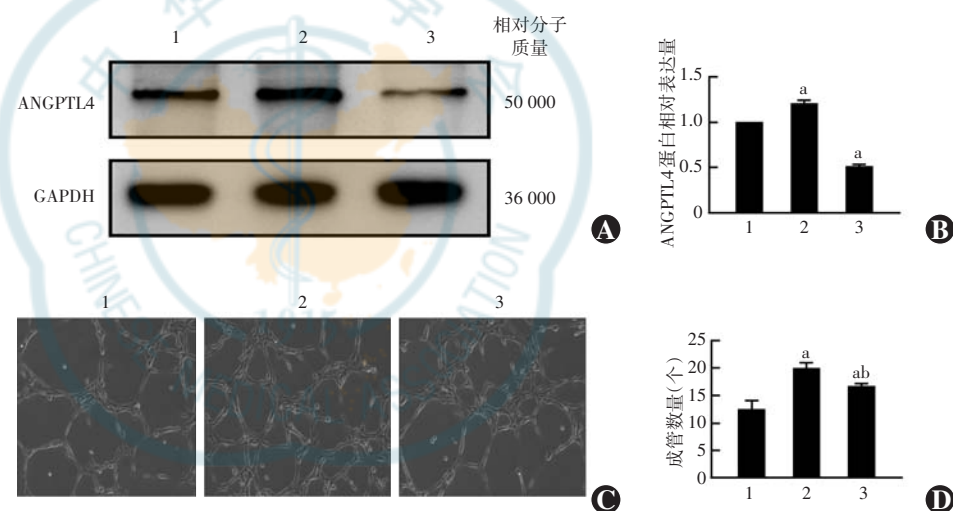


图 4 ANGPTL4 敲低后各组 ANGPTL4 蛋白相对表达量和腔室数量比较 A: 各组 ANGPTL4 蛋白电泳图 B: 各组 ANGPTL4 蛋白相对表达量比较 $F = 824.789, P < 0.01$. 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验; $n = 6$) C: 各组分状结构形成情况 D: 各组腔室数量比较 $F = 33.091, P < 0.01$. 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与低氧组比较, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验; $n = 3$) 1: 对照组; 2: 低氧组; 3: 低氧+si-ANGPTL4 组 ANGPTL4: 血管生成素样蛋白 4; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 4 Comparison of relative expression of ANGPTL4 protein and number of chambers among different groups after ANGPTL4 knockdown A: Electrophoretogram of ANGPTL4 protein in different groups B: Comparison of the relative expression of ANGPTL4 protein among different groups $F = 824.789, P < 0.01$. Compared with the control group, ^a $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test; $n = 6$) C: Tubular structure formation in different groups D: Comparison of the number of chambers in different groups $F = 33.091, P < 0.01$. Compared with the control group, ^a $P < 0.05$; compared with hypoxia group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test; $n = 3$) 1: control group; 2: hypoxia group; 3: hypoxia + si-ANGPTL4 group ANGPTL4: angiopoietin-like protein 4; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

CNV 组、CNV + si-NC 组和 CNV + si-ANGPTL4 组 CNV 面积分别为 (35452.65 ± 7234.02)、(33899.70 ± 7030.36) 和 (17122.66 ± 1952.86) μm^2 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 15.094, P < 0.05$), 其中 CNV + si-ANGPTL4 组 CNV 面积明显小于 CNV 组和 CNV + si-NC 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 6B, C)。

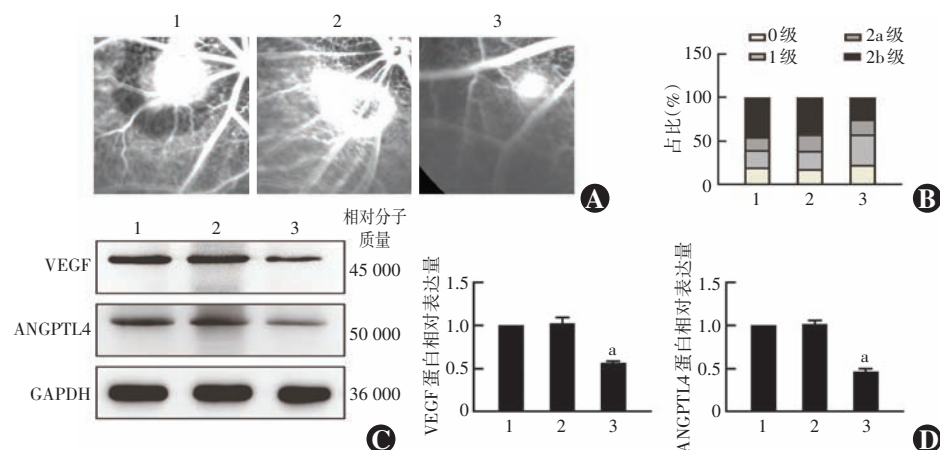


图 5 ANGPTL4 敲低后各组小鼠荧光素渗漏情况及 VEGF 和 ANGPTL4 表达比较 A: FFA 检测各组小鼠荧光素渗漏情况 B: CNV 病变区域荧光素渗漏分级分布情况 C: 各组 VEGF 和 ANGPTL4 蛋白电泳图 D: 各组 VEGF 和 ANGPTL4 蛋白相对表达量比较 $F = 128.639, 372.634$, 均 $P < 0.05$ 。与对照组相比, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验; $n = 6$) 1: CNV 组; 2: CNV+si-NC 组; 3: CNV+si-ANGPTL4 组 VEGF: 血管内皮生长因子; ANGPTL4: 血管生成素样蛋白 4; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Figure 5 Comparison of fluorescence leakage and the expression of VEGF and ANGPTL4 in mice among different groups after ANGPTL4 knockdown A: Detection of fluorescence leakage by FFA B: Grading distribution of fluorescein leakage in the CNV lesion area C: Electrophoretogram of VEGF and ANGPTL4 proteins D: Comparison of the relative expression of VEGF and ANGPTL4 proteins $F = 128.639, 372.634$; both $P < 0.05$. Compared with the control group, $^a P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test; $n = 6$) 1: CNV group; 2: CNV + si-NC group; 3: CNV + si-ANGPTL4 group VEGF: vascular endothelial growth factor; ANGPTL4: angiopoietin-like protein 4; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

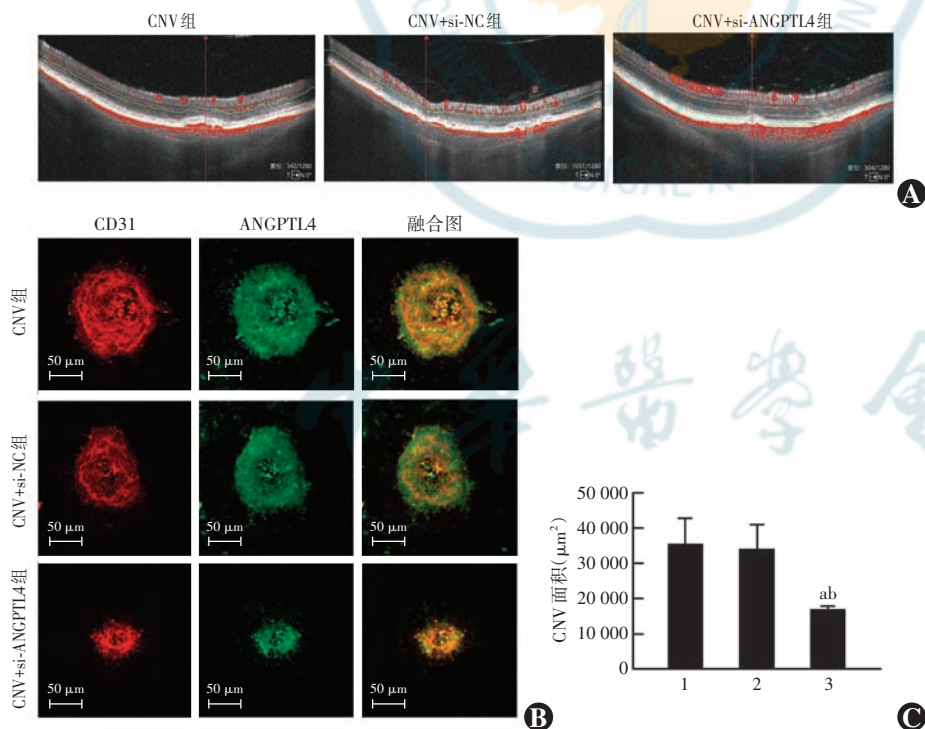


图 6 ANGPTL4 敲低后各组小鼠 CNV 面积比较 A: OCTA 检测各组小鼠 CNV 情况 B: 免疫荧光染色法检测 CNV 面积 (标尺 = 50 μm) C: 各组小鼠 CNV 面积比较 $F = 15.094$, $P < 0.05$ 。与对照组相比, $^a P < 0.05$; 与 CNV+si-NC 组相比, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验; $n = 3$) 1: CNV 组; 2: CNV+si-NC 组; 3: CNV+si-ANGPTL4 组 ANGPTL4: 血管生成素样蛋白 4; CNV: 脉络膜新生血管

Figure 6 Comparison of CNV areas in mice among different groups after ANGPTL4 knockdown A: Detection of CNV by OCTA B: Detection of CNV area by immunofluorescence staining (scale bar = 50 μm) C: Comparison of CNV areas $F = 15.094$, $P < 0.05$. Compared with the control group, $^a P < 0.05$; compared with CNV+si-NC group, $^b P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test; $n = 3$) 1: CNV group; 2: CNV + si-NC group; 3: CNV + si-ANGPTL4 group ANGPTL4: angiopoietin-like protein 4; CNV: choroidal neovascularization

3 讨论

本研究构建了激光诱导小鼠 CNV 模型,发现造模后 RPE-脉络膜-巩膜复合体中 ANGPTL4 表达明显增多,并定位于内皮细胞;低氧条件可以诱导 ANGPTL4 表达升高,促进体内及体外实验性 CNV 生成,而抑制 ANGPTL4 则可以抑制 RF/6A 细胞的成管能力,显著减少 CNV 面积及渗漏。这些结果表明,缺氧诱导的 ANGPTL4 可能是治疗 nAMD 的重要分子靶点。

AMD 是一种侵犯黄斑的进行性、退行性疾病。虽然 AMD 的发病机制尚不清楚,但炎症、氧化应激、脂代谢异常、免疫功能障碍、缺氧等均参与了这一过程^[12-13]。缺氧会上调 nAMD 患者眼内 VEGF 的表达,通过与 VEGF 受体以及 NRP1 结合,增加内皮细胞的通透性。抗 VEGF 治疗可以抑制 nAMD 患者血管通透性,从而改善其视功能,是目前 nAMD 的主要治疗方法。然而仍有许多患者对抗 VEGF 治疗无反应或产生耐药,说明其他的血管活性因子在 nAMD 发病中发挥着重要作用。

ANGPTL4 是 ANGPTL 家族成员之一,编码蛋白含 406 个氨基酸,是一种分泌型糖蛋白。ANGPTL4 最初是脂肪和葡萄糖代谢研究的焦点^[14-15],近年来研究发现其在调节血管生成、伤口愈合、慢性炎症等多种生

物过程中发挥着重要作用。ANGPTL4 包含 1 个 N 端卷曲螺旋结构域(nANGPTL4)和 1 个 C 端纤维蛋白原样结构域(cANGPTL4),两者通过连接区相连。视网膜分支静脉阻塞和糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)患者房水中 ANGPTL4 表达显著升高,与无灌注面积呈显著正相关,这些研究表明视网膜缺氧面积较大的患者较视网膜缺氧面积较小的患者 ANGPTL4 的表达水平升高^[16-18]。在氧诱导视网膜病变小鼠模型中,由于低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)1 α 的积累导致 ANGPTL4 表达水平升高;而 ANGPTL4 敲除小鼠新生血管的形成明显受到抑制,表明在低氧环境下,ANGPTL4 信号通路在新生血管生成中发挥了重要的调控作用^[8,19]。在 DR 病变中,ANGPTL4 及其相关血管活性物质表达异常升高,导致血管内皮连接破坏,增加血管通透性,最终导致黄斑水肿^[20-21]。而缺氧诱导的 ANGPTL4 在 nAMD 中的作用目前尚未见报道。脂质代谢异常也是 AMD 发病机制的重要组成部分,而 ANGPTL4 可以抑制脂蛋白脂肪酶的活性,促进循环甘油三酯水平的升高。肿瘤研究中发现,脂质依赖的代谢重新编程可导致患者对抗血管生成药物产生耐药,因此同时针对血管生成和脂类代谢的药物可以增强其抗肿瘤作用^[22]。Chaube 等^[23]研究发现内皮特异性敲除 ANGPTL4 的小鼠表现出病理性新生血管减少,周细胞覆盖率增加,血管结构稳定以及通透性降低。这是由于内皮细胞中 ANGPTL4 的敲除促进了脂蛋白降解,导致脂肪酸代谢改变,从而抑制血管生成^[23-24]。本研究通过玻璃体腔注射 si-ANGPTL4 同样抑制了小鼠病理性新生血管的生成,具有机制仍需进一步研究。

ANGPTL4 受到多种转录因子的调节,包括过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α)、PPAR β/δ 、PPAR γ 、HIF-1 α 等,均是重要的血管生成因子。研究发现,翼状胬肉患者中 HIF-1 α 的积累促进了 ANGPTL4 的表达,促进其血管生成表型。联合抗 VEGF 和抗 ANGPTL4 的药物可能是一种更有效的抗翼状胬肉血管生成方法^[25]。同时,缺氧诱导的 PPAR δ /ANGPTL4 信号通路激活会显著诱导 DR 患者视网膜新生血管的生成及破裂^[26]。ANGPTL4 既往被认为是“孤儿”配体,而近年研究发现 ANGPTL4 可通过直接与内皮细胞上的 Nrp1(一种跨膜糖蛋白,VEGF 的辅助受体)相互作用促进内皮通透性^[20,27]。可溶性 Nrp1(SNRP1)可通过与 VEGF 以及 ANGPTL4 相互作用,显著降低内皮细胞通透性,作用效果甚至优于贝伐单抗。既往研究还发

现,ANGPTL4 可与瘦素受体(LepR)直接结合调控异位骨形成,而拮抗 LepR 可以抑制眼部新生血管生成^[28-29]。与此同时,ANGPTL4 还可通过激活 JAK2/STAT3 通路并与 ESM1 相互作用促进卵巢癌肿瘤微环境中的血管生成^[30]。

综上所述,本研究显示了 ANGPTL4 的促血管生成作用,并在 RF/6A 细胞化学缺氧模型和激光诱导的小鼠 CNV 模型中得到了验证。这些结果表明,抑制 ANGPTL4 可能是治疗 CNV 的潜在策略。本研究也为将来 ANGPTL4 抑制剂在治疗 nAMD 方面的临床应用提供了实验基础^[31]。目前有关 ANGPTL4 的亚细胞定位、如何从细胞中释放出来,以及与其他细胞的相关作用尚不清楚,HIF-1 α 如何调控 ANGPTL4 以及 ANGPTL4 与其他血管生成因子的交互作用亦有待阐明,本课题组将在今后的研究中进一步探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 陈佳、杨滢:设计实验、实验操作、论文撰写;苏舒:实验实施、数据采集;张晟来、杨晓伟:数据整理、统计学分析;桑爱民:论文修改及定稿

参考文献

- [1] Patel P, Sheth V. New and innovative treatments for neovascular age-related macular degeneration (nAMD) [J]. J Clin Med, 2021, 10(11): 2436. DOI:10.3390/jcm10112436.
- [2] Toutounchian S, Ahmadbeigi N, Mansouri V. Retinal and choroidal neovascularization antivascular endothelial growth factor treatments; the role of gene therapy [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2022, 38(8): 529-548. DOI:10.1089/jop. 2022. 0022.
- [3] Moore NA, Bracha P, Hussain RM, et al. Gene therapy for age-related macular degeneration [J]. Expert Opin Biol Ther, 2017, 17(10): 1235-1244. DOI:10.1080/14712598. 2017. 1356817.
- [4] Basavarajappa HD, Sulaiman RS, Qi X, et al. Ferrochelatase is a therapeutic target for ocular neovascularization [J]. EMBO Mol Med, 2017, 9(6): 786-801. DOI:10.15252/emmm. 201606561.
- [5] Kim JH, Shin JP, Kim IT, et al. Angiopoietin-like 4 correlates with response to intravitreal ranibizumab injections in neovascular age-related macular degeneration [J]. Retina, 2018, 38(3): 523-530. DOI:10.1097/IAE. 0000000000001554.
- [6] 黄玉婷, 李晓洁, 郑香悦, 等. 湿性年龄相关性黄斑变性患者抗血管内皮生长因子治疗敏感性的影响因素: 基于房水细胞因子分析 [J]. 眼科新进展, 2021, 41(3): 240-243. DOI: 10.13389/j.cnki.rao. 2021. 0050.
- [7] Huang YT, Li XJ, Zheng XY, et al. Analysis of factors influencing the sensitivity of anti vascular endothelial growth factor therapy in patients with wet age-related macular degeneration based on aqueous humor cytokines [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2021, 41(3): 240-243. DOI: 10.13389/j.cnki.rao. 2021. 0050.
- [8] Zuo Y, He Z, Chen Y, et al. Dual role of ANGPTL4 in inflammation [J]. Inflamm Res, 2023, 72(6): 1303-1313. DOI: 10.1007/s00011-023-01753-9.
- [9] Xin X, Rodrigues M, Umapathi M, et al. Hypoxic retinal Müller cells promote vascular permeability by HIF-1-dependent up-regulation of angiopoietin-like 4 [J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(36): E3425-3434 [2025-04-10]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23959876/. DOI:10.1073/pnas.1217091110.
- [10] Babapoor-Farrokhran S, Jee K, Puchner B, et al. Angiopoietin-like 4 is a potent angiogenic factor and a novel therapeutic target for patients with proliferative diabetic retinopathy [J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(23): E3030-3039 [2025-04-10]. https://

- pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/26039997/. DOI: 10. 1073/pnas. 1423765112.
- [10] Jee K, Rodrigues M, Kashiwabuchi F, et al. Expression of the angiogenic mediator, angiopoietin-like 4, in the eyes of patients with proliferative sickle retinopathy[J/OL]. PLoS One, 2017, 12(8): e0183320[2025-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28832635/>. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0183320.
- [11] Shah RS, Soetikno BT, Yi J, et al. Visible-light optical coherence tomography angiography for monitoring laser-induced choroidal neovascularization in mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57(9): OCT86-95. DOI: 10. 1167/iov. 15-18891.
- [12] Tan Y, Huang J, Li D, et al. Single-cell RNA sequencing in dissecting microenvironment of age-related macular degeneration: challenges and perspectives[J]. Ageing Res Rev, 2023, 90: 102030. DOI: 10. 1016/j. arr. 2023. 102030.
- [13] Orozco LD, Chen HH, Cox C, et al. Integration of eQTL and a single-cell atlas in the human eye identifies causal genes for age-related macular degeneration[J]. Cell Rep, 2020, 30(4): 1246-1259. DOI: 10. 1016/j. celrep. 2019. 12. 082.
- [14] Kersten S. Role and mechanism of the action of angiopoietin-like protein ANGPTL4 in plasma lipid metabolism[J]. J Lipid Res, 2021, 62: 100150. DOI: 10. 1016/j. jlr. 2021. 100150.
- [15] Son Y, Paton CM. A review of free fatty acid-induced cell signaling, angiopoietin-like protein 4, and skeletal muscle differentiation[J]. Front Physiol, 2022, 13: 987977. DOI: 10. 3389/fphys. 2022. 987977.
- [16] Arepalli S, Wykoff CC, Abraham JR, et al. Longitudinal analysis of aqueous humour cytokine expression and OCT-based imaging biomarkers in retinal vein occlusions treated with anti-vascular endothelial growth factor therapy in the IMAGINE study[J]. Eye (Lond), 2023, 37(9): 1928-1935. DOI: 10. 1038/s41433-022-02265-2.
- [17] Kwon SH, Shin JP, Kim IT, et al. Aqueous levels of angiopoietin-like 4 and semaphorin 3E correlate with nonperfusion area and macular volume in diabetic retinopathy[J]. Ophthalmology, 2015, 122(5): 968-975. DOI: 10. 1016/j. ophtha. 2015. 01. 007.
- [18] 滕月, 曾筱婷, 罗英子, 等. 糖尿病视网膜病变房水中细胞因子的检测及其临床意义[J]. 中华实验眼科杂志, 2023, 41(1): 55-62. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20201203-00817.
- Teng Y, Zeng XT, Luo YZ, et al. Detection of cytokines in the aqueous humor of diabetic retinopathy and its clinical significance[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2023, 41(1): 55-62. DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20201203-00817.
- [19] Perdiguero EG, Galaup A, Durand M, et al. Alteration of developmental and pathological retinal angiogenesis in angptl4-deficient mice[J]. J Biol Chem, 2011, 286(42): 36841-36851. DOI: 10. 1074/jbc. M111. 220061.
- [20] Sodhi A, Ma T, Menon D, et al. Angiopoietin-like 4 binds neuropilins and cooperates with VEGF to induce diabetic macular edema[J]. J Clin Invest, 2019, 129(11): 4593-4608. DOI: 10. 1172/JCI120879.
- [21] Sodhi A, Montaner S. Angiopoietin-like 4 as an emerging therapeutic target for diabetic eye disease[J]. JAMA Ophthalmol, 2015, 133(12): 1375-1376. DOI: 10. 1001/jamaophthalmol. 2015. 3723.
- [22] Iwamoto H, Abe M, Yang Y, et al. Cancer lipid metabolism confers antiangiogenic drug resistance[J]. Cell Metab, 2018, 28(1): 104-117. DOI: 10. 1016/j. cmet. 2018. 05. 005.
- [23] Chaube B, Citrin KM, Sahraei M, et al. Suppression of angiopoietin-like 4 reprograms endothelial cell metabolism and inhibits angiogenesis[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 8251. DOI: 10. 1038/s41467-023-43900-0.
- [24] Fernández-Hernando C, Suárez Y. ANGPTL4: a multifunctional protein involved in metabolism and vascular homeostasis[J]. Curr Opin Hematol, 2020, 27(3): 206-213. DOI: 10. 1097/MOH. 0000000000000580.
- [25] Meng Q, Qin Y, Deshpande M, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent expression of angiopoietin-like 4 by conjunctival epithelial cells promotes the angiogenic phenotype of pterygia[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(11): 4514-4523. DOI: 10. 1167/iov. 17-21974.
- [26] Xu Z, Yang J, Zheng H, et al. Long noncoding RNA PPT2-EGFL8 regulates pathological retinal neovascularization in PDR by functioning as a competing endogenous RNA[J]. Diabetes, 2023, 72(7): 1012-1027. DOI: 10. 2337/db22-0342.
- [27] Huang J, Zhang S. Overexpressed neuropilin-1 in endothelial cells promotes endothelial permeability through interaction with ANGPTL4 and VEGF in Kawasaki disease[J]. Mediators Inflamm, 2021, 2021: 9914071. DOI: 10. 1155/2021/9914071.
- [28] Hu H, Luo S, Lai P, et al. ANGPTL4 binds to the leptin receptor to regulate ectopic bone formation[J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2024, 121(1): e2310685120[2025-04-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38147550/>. DOI: 10. 1073/pnas. 2310685120.
- [29] Coroniti R, Fario R, Nuno DJ, et al. Designer leptin receptor antagonist allo-aca inhibits VEGF effects in ophthalmic neoangiogenesis models[J]. Front Mol Biosci, 2016, 3: 67. DOI: 10. 3389/fmolb. 2016. 00067.
- [30] Li YK, Gao AB, Zeng T, et al. ANGPTL4 accelerates ovarian serous cystadenocarcinoma carcinogenesis and angiogenesis in the tumor microenvironment by activating the JAK2/STAT3 pathway and interacting with ESM1[J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 46. DOI: 10. 1186/s12967-023-04819-8.
- [31] Ruscica M, Zimetti F, Adorni MP, et al. Pharmacological aspects of ANGPTL3 and ANGPTL4 inhibitors: new therapeutic approaches for the treatment of atherogenic dyslipidemia[J]. Pharmacol Res, 2020, 153: 104653. DOI: 10. 1016/j. phrs. 2020. 104653.

(收稿日期: 2025-05-10 修回日期: 2025-08-22)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

读者·作者·编者

本刊对来稿中作者署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件: (1) 参与课题的选题和实验设计, 参与实验资料的收集、分析和论证。 (2) 参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改。 (3) 能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修, 能够答辩并承担责任。 (4) 对论文的诚信负责。 仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。 文中如有外籍作者, 应附外籍作者亲笔签名的在本刊发表的同意函。 集体署名的文章应于题名下列出署名单位, 于文末列出论文整理者的姓名, 并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方, 每篇论文须列出通信作者 1 名。 如无特殊约定, 则视第一作者为通信作者。 作者(包括通信作者)的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定, 在编排过程中不宜变更或增减, 尤其是通信作者和前三名作者, 若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。 有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音, 列于英文文题之下。

(本刊编辑部)

