

· 实验研究 ·

高糖环境下 ARPE-19 细胞中不同 VEGFA 剪接体表达变化

程蕾¹ 程珊² 朱冉¹ 徐国旭³¹徐州市第一人民医院 徐州医科大学附属徐州市立医院 徐州市眼病防治研究所, 徐州 221000; ²上海生物人培训中心, 上海 200020; ³苏州大学附属第二医院眼科, 苏州 215000

通信作者: 徐国旭, Email: doctorphacoxu@163.com

【摘要】 目的 探讨高糖环境下人视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19 细胞中不同血管内皮生长因子 A (VEGFA) 剪接体的表达变化。**方法** 将 ARPE-19 细胞分为空白对照组、对照组 1、对照组 2、HG1 组、HG2 组, 分别用 5.5 mmol/L 葡萄糖、5.5 mmol/L 葡萄糖+19.5 mmol/L 甘露醇、5.5 mmol/L 葡萄糖+44.5 mmol/L 甘露醇、25.0 mmol/L 葡萄糖和 50.0 mmol/L 葡萄糖处理, 其中空白对照组、对照组 1 和对照组 2 处理细胞 72 h, HG1 组和 HG2 组分别处理 24、48 和 72 h。采用荧光定量 PCR 检测 VEGFA 不同剪接体 mRNA 相对表达量; 采用 Western blot 法检测总 VEGFA、VEGF 信号的负调控因子 SERPINF1 [色素上皮衍生因子 (PEDF)] 和 VEGF165 (V4,5,10) 蛋白相对表达量。**结果** 25 和 50 mmol/L 葡萄糖浓度下各时间点 ARPE-19 细胞中总 VEGFA mRNA 和蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 (mRNA: $F=114.60, 143.60$, 均 $P<0.05$; 蛋白: $F=10.00, 8.04$, 均 $P<0.05$), 其中与各自对照组比较, 处理 24、48 和 72 h 后总 VEGFA mRNA 和蛋白相对表达量均明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。25 和 50 mmol/L 葡萄糖浓度下各时间点 ARPE-19 细胞中 SERPINF1 (PEDF) mRNA 和蛋白相对表达量总体比较差异均无统计学意义 (mRNA: $F=0.86, 0.32$, 均 $P>0.05$; 蛋白: $F=1.25, 0.08$, 均 $P>0.05$)。ARPE-19 细胞中各剪接体 mRNA 表达水平由高到低依次为 VEGF165 (V4,5,10)、VEGF121 (V6)、VEGF189 (V2)、VEGF111 (V8) 和 VEGF165b (V7)。HG1-24 h 组 VEGF111 (V8) mRNA 相对表达量低于对照组 1, HG1-48 h 组 VEGF189 (V2) 和 VEGF121 (V6) mRNA 相对表达量高于对照组 1, HG1-72 h 组 VEGF121 (V6) 和 VEGF165b (V7) mRNA 相对表达量高于对照组 1, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。HG2-24 h 组 VEGF111 (V8) 和 VEGF165 (V4,5,10) mRNA 相对表达量均高于对照组 2, HG2-48 h 组 VEGF165 (V4,5,10) 和 VEGF165b (V7) mRNA 相对表达量均高于对照组 2, HG2-72 h 组 VEGF189 (V2)、VEGF111 (V8)、VEGF165 (V4,5,10) 和 VEGF165b (V7) mRNA 相对表达量均高于对照组 2, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。空白对照组、对照组 1、HG1-24 h 组、HG1-48 h 组和 HG1-72 h 组 VEGF165 (V4,5,10) 蛋白相对表达量分别为 1.01 ± 0.07 、 1.05 ± 0.07 、 1.16 ± 0.06 、 1.37 ± 0.08 和 1.28 ± 0.05 , 总体比较差异有统计学意义 ($F=10.36, P<0.05$), 其中 HG1-48 h 组 VEGF165 (V4,5,10) 蛋白相对表达量高于对照组 1, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。空白对照组、对照组 2、HG2-24 h 组、HG2-48 h 组和 HG2-72 h 组 VEGF165 (V4,5,10) 蛋白相对表达量分别为 1.02 ± 0.05 、 1.12 ± 0.00 、 1.22 ± 0.05 、 1.53 ± 0.21 和 1.77 ± 0.04 , 总体比较差异有统计学意义 ($F=16.55, P<0.001$), 其中 HG2-48 h 组和 HG2-72 h 组 VEGF165 (V4,5,10) 蛋白相对表达量均高于对照组 2, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。**结论** ARPE-19 细胞中 VEGFA 各剪接体 mRNA 丰度从高到低依次为 VEGF165 (V4,5,10)、VEGF121 (V6)、VEGF189 (V2)、VEGF111 (V8) 和 VEGF165b (V7)。VEGF121 (V6) mRNA 表达水平在 25 mmol/L 的高糖浓度下显著升高, 而 VEGF165 (V4,5,10) mRNA 在 50 mmol/L 高糖浓度下才显著升高。2 种高糖浓度下, mRNA 表达水平均明显升高的剪接体是 VEGF189 (V2) 和 VEGF165b (V7), SERPINF1 (PEDF) 表达无显著变化。

【关键词】 血管内皮生长因子 A; 剪接体; 糖尿病视网膜病变; 视网膜色素上皮细胞; 血管内皮生长因子 xxxb

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20240806-00224

Expression variations of different VEGFA isoforms in ARPE-19 cells under high glucose conditions

Cheng Lei¹, Cheng Shan², Zhu Ran¹, Xu Guoxu³¹Xuzhou First People's Hospital, Affiliated Xuzhou Municipal Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou Institute of Ophthalmic Disease Prevention and Treatment, Xuzhou 221000, China; ²Shanghai Shengwuren Training Center,

Shanghai 200020, China;³Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, China

Corresponding author: Xu Guoxu, Email: doctorphacoxu@163.com

[Abstract] Objective To explore expression changes of different vascular endothelial growth factor A (VEGFA) isoforms in human retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 cells under high glucose conditions. **Methods** ARPE-19 cells were divided into blank control group, control group 1, control group 2, HG1 group, and HG2 group treated with 5.5 mmol/L glucose, 5.5 mmol/L glucose+19.5 mmol/L mannitol, 5.5 mmol/L glucose+44.5 mmol/L mannitol, 25.0 mmol/L glucose, and 50.0 mmol/L glucose, respectively. The blank control group, control group 1, and control group 2 were treated for 72 hours, while HG1 and HG2 groups were treated for 24, 48, and 72 hours. The relative expression of VEGFA isoforms was detected by fluorescent quantitative PCR. Total VEGFA, SERPINF1 (pigment epithelium-derived factor, PEDF), a negative regulator of VEGF signaling, and VEGF165 (V4, 5, 10) protein expression was measured by Western blot. **Results** Total VEGFA mRNA and protein expression in ARPE-19 cells showed statistically significant differences at both 25 mmol/L and 50 mmol/L glucose concentrations across different culture periods (mRNA: $F = 114.60, 143.60$; both $P < 0.05$. protein: $F = 10.00, 8.04$; both $P < 0.05$). Compared to the respective controls, the relative expression of total VEGFA mRNA and protein increased significantly at 24, 48, and 72 hours after treatment (all $P < 0.05$). There was no significant difference in SERPINF1 (PEDF) mRNA or protein expression in ARPE-19 cells across different time points at 25 mmol/L or 50 mmol/L glucose concentrations (mRNA: $F = 0.86, 0.32$; both $P > 0.05$. protein: $F = 1.25, 0.08$; both $P > 0.05$). The mRNA expression levels of VEGFA isoforms in ARPE-19 cells from highest to lowest were VEGF165 (V4, 5, 10), VEGF121 (V6), VEGF189 (V2), VEGF111 (V8) and VEGF165b (V7). The relative VEGF111 (V8) mRNA expression level was significantly lower in HG1-24 hour group than in control group 1, the relative VEGF189 (V2) and VEGF121 (V6) mRNA expression levels were significantly higher in HG1-48 hour group than in control group 1, the relative VEGF121 (V6) and VEGF165b (V7) mRNA expression levels were significantly higher in HG1-72 hour group than in control group 1, with statistically significant differences (all $P < 0.05$). The relative VEGF111 (V8) and VEGF165 (V4, 5, 10) mRNA expression levels were significantly higher in the HG2-24 hour group than in control group 2, the relative VEGF165 (V4, 5, 10) and VEGF165b (V7) mRNA expression levels were significantly higher in HG2-48 hour group than control group 2, and the relative VEGF189 (V2), VEGF111 (V8), VEGF165 (V4, 5, 10), and VEGF165b (V7) mRNA expression levels were significantly higher in HG2-72 hour group than in control group 2, with statistically significant differences (all $P < 0.05$). The relative VEGF165 (V4, 5, 10) protein expression levels in blank control group, control group 1, HG1-24 hour group, HG1-48 hour group, and HG1-72 hour group were $1.01 \pm 0.07, 1.05 \pm 0.07, 1.16 \pm 0.06, 1.37 \pm 0.08$, and 1.28 ± 0.05 , respectively, with a statistically significant overall difference ($F = 10.36, P < 0.05$). The relative VEGF165 (V4, 5, 10) protein expression level was significantly higher in HG1-48 hour group than in control group 1 ($P < 0.05$). The relative protein expression levels of VEGF165 (V4, 5, 10) in blank control group, control group 2, HG2-24 hour group, HG2-48 hour group, and HG2-72 hour group were $1.02 \pm 0.05, 1.12 \pm 0.00, 1.22 \pm 0.05, 1.53 \pm 0.21$, and 1.77 ± 0.04 , respectively, with a statistically significant overall difference ($F = 16.55, P < 0.001$). The relative VEGF165 (V4, 5, 10) protein levels were significantly higher in HG2-48 hour group and HG2-72 hour group than in control group 2 (both $P < 0.05$). **Conclusions** In ARPE-19 cells, mRNA abundance of VEGFA isoforms from highest to lowest were VEGF165 (V4, 5, 10), VEGF121 (V6), VEGF189 (V2), VEGF111 (V8), VEGF165b (V7). VEGF121 (V6) mRNA expression level is significantly increased at 25 mmol/L high glucose concentration, whereas VEGF165 (V4, 5, 10) mRNA expression level shows significant elevation only at 50 mmol/L high glucose. Under both high glucose conditions, isoforms with significantly elevated mRNA expression levels are VEGF189 (V2) and VEGF165b (V7), while SERPINF1 (PEDF) expression level does not change significantly.

[Key words] Vascular endothelial growth factor A; Isoform; Diabetic retinopathy; Retinal pigment epithelial cells; VEGFxxx

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20240806-00224

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病常见的微血管并发症, 其进展期可先后表现为糖尿病性黄斑水肿 (diabetic macular edema, DME) 和增生型

糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR), 二者均为成年人重度视力损伤和致盲的主要原因。随着对血管内皮生长因子 (vascular endothelial



growth factor, VEGF) 在 DR 发病机制中研究的深入,玻璃体腔注射抗 VEGF 药物逐渐成为 DR 的一线治疗方法^[1-2]。VEGF 包括 VEGFA、VEGFB、VEGFC、VEGFD 和胎盘生长因子等亚型,其中 VEGFA 在组织和细胞中含量丰富,在血管生成和原始内皮细胞分化过程中起到关键作用,是 DR 重要的致病因子之一。VEGFB 在各种动物模型中抑制细胞凋亡,是血管存活的关键因素,可抑制病理性血管生成,同时在不同类型的血管和神经退行性疾病方面具有治疗潜力^[3]。VEGFC 参与血管和淋巴发育,在成人组织中可能作为旁分泌因子参与淋巴管生成和维持^[4]。VEGFD 是与 VEGFC 密切相关的细胞因子,同样参与淋巴管和血管生成^[4]。胎盘生长因子在血管生成、胎盘发育和免疫调节等多种生理过程中发挥作用^[5]。目前,抗 VEGF 治疗主要通过中和 VEGFA,阻断其与受体 VEGFR1 和 VEGFR2 的结合,从而抑制异常血管的生成和渗漏^[1]。

抗 VEGF 药物玻璃体腔注射从根本上改变了 DR 的病程和患者的预后,已成为 DME 的一线治疗方法^[6]。目前抗 VEGF 疗法针对总 VEGFA,部分患者需要多次反复注射。人类 VEGFA 基因有不同的剪接体,对于不同剪接体在高糖环境下表达变化的研究目前较少,不同剪接体对 DR 病程是否会产生不同影响,未来能否针对具体剪接体进行治疗以达到更理想的预后效果尚不清楚。本研究拟探讨高糖环境下 ARPE-19 细胞中不同 VEGFA 剪接体的表达变化,以期了解 DR 发展过程中 VEGFA 剪接体的动态调节,为临床 DR 的诊断和治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞系 ARPE-19 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM/F12 培养基 (杭州吉诺生物有限公司);胎牛血清 (美国 Gibco 公司);实时荧光定量 PCR 试剂盒、逆转录试剂盒 (日本 Takara 公司);D-葡萄糖、甘露醇 (上海生工生物工程股份有限公司);PCR 割胶纯化试剂盒 (北京天根生化科技有限公司);小鼠抗人 VEGFA 单克隆抗体 (ab105219)、小鼠抗人 VEGF165 单克隆抗体 (ab69479) (英国 Abcam 公司);小鼠抗人 SERPINF1 [色素上皮衍生因子 (pigment epithelium derived factor, PEDF)] 单克隆抗体 (sc-390172, 美国 Santa 公司);兔抗人 α -tubulin 单克隆抗体 (11224-1-AP, 美国 Proteintech 公司);BCA

蛋白浓度测定试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司);琼脂糖 (上海基因科技股份有限公司);50 X TAE 电泳缓冲液 (BS-P-22, 上海水源生物科技有限公司)。荧光定量 PCR 仪 (SLAN-96P, 上海宏石医疗有限公司);PCR 仪 (621BR31414, 上海伯乐生命医学产品有限公司);电子天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司);三恒电泳仪 (DYY-10 型 ECP3000, 北京市六一仪器厂);高速冷冻离心机 (TG20KR, 长沙东旺实验仪器有限公司);化学发光成像仪 (GeneGnome XRQ, 美国 GeneGnome 公司)。

1.2 方法

1.2.1 高糖模型处理 将处于对数生长期的 ARPE-19 细胞以 2×10^5 个/孔接种在 6 孔板上,次日细胞贴壁后将其分为空白对照组、对照组 1、对照组 2、HG1 组和 HG2 组,参照文献^[7-9]的方法,分别用 5.5 mmol/L 葡萄糖、5.5 mmol/L 葡萄糖 + 19.5 mmol/L 甘露醇、5.5 mmol/L 葡萄糖 + 44.5 mmol/L 甘露醇、25.0 mmol/L 葡萄糖和 50.0 mmol/L 葡萄糖处理,其中空白对照组、对照组 1、对照组 2 处理细胞 72 h, HG1 组、HG2 组分别处理 24、48 和 72 h。

1.2.2 引物设计和合成 截至 2024 年 11 月 NCBI 数据库一共收录了 20 种 VEGFA 的不同剪接体,查询该数据库中人类 VEGFA 基因的所有剪接体,可知 NM_003376.6 为 VEGF189 (V2), NM_001171622.2 为 VEGF111 (V8), NM_001025370.3 为 VEGF121 (V6), NM_001033756.3 为 VEGF165b (V7)。NM_001025368.3 (V4)、NM_001025369.3 (V5) 和 NM_001287044.2 (V10) 剪接体的蛋白产物为 VEGF165。利用 DNASTAR 序列分析工具对所有剪接体的序列进行比对,参考所有序列相同的位置设计 VEGFA (V1-V10) 总的 PCR 检测引物 (表 1),引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测 VEGFA 基因不同剪接体相对表达量 各组处理结束后,去除每孔的培养液上清液。每孔加入 1 ml Trizol,室温下放置 5 min。使用枪头刮擦培养板底部,彻底将底部的细胞刮下后,将 Trizol 细胞裂解液转移至 1.5 ml 无酶 EP 管内。加入氯仿混匀后 $12\ 000 \times g$ 离心 15 min,转移上清液至新的 EP 管内,加入等体积的异丙醇混匀后 $12\ 000 \times g$ 离心 15 min,弃去上清液。用 70% 乙醇清洗总 RNA 沉淀 2 遍,60 °C 干浴器烘干后溶于水进行质控。合格的总 RNA 1 μ g 在 37 °C 下逆转录 15 min 制备 cDNA。对于低丰度的 VEGFA165b 检测,在 cDNA 制备时除添加 olig dT 和随机引物外,还添加该基因特异的逆转录引

表 1 定量 PCR 检测引物序列
Table 1 Primer sequences for quantitative PCR detection

引物	引物序列(5'-3')	预期大小(bp)	退火温度(℃)
VEGFA(V1-V10)	正向:CATTGTGGAGGCAGAGAAAAG	198	60.4
	反向:ACAAAAACCGGTACAAATAAGAGA		
VEGF111(V8)	正向:CCTGGTGGACATCTTCCAGGAGTA	237	54.6
	反向:CTCGGCTTGTACATCTGCATTCA		
VEGF189(V2)	正向:GTGCCCCTGAGGAGTCCAACATC	227	60.0
	反向:CAAGGCCACAGGGAACGCT		
VEGF121(V6)	正向:GGATCAAACCTCACCAAGGC	113	65.1
	反向:CGGCTTGTACATTTTCTTGTGTC		
VEGF165(V4,5,10)	正向:GAGTACATCTTCAAGCCATCC	232	65.1
	反向:AGCAAGGCCACAGGGATT		
VEGF165b(V7)	正向:TCAGTCTTTCCTGGTGAGAGATCTGCA	116	50.0
	反向:TTGTACAAGATCCGCAGACG		
SERPINF1(PEDF)	正向:ACCGGGCTGGCTTTGAGTGG	144	65.0
	反向:GGGCCCCTGTCTGTGTGTC		
18S	正向:AGTCGCCGTGCCTACCAT	129	55.0
	反向:CGGCTCGGGAGTGGGTAAT		

注:PCR:聚合酶链式反应;VEGFA:血管内皮生长因子 A;PEDF:色素上皮衍生因子
Note: PCR: polymerase chain reaction; VEGFA: vascular endothelial growth factor A; PEDF: pigment epithelium-derived factor

物 VEGF165b(V7) R, 并且将逆转录时间延长至 30 min。2 套 cDNA 均稀释 10 倍后进行定量 PCR 检测。PCR 产物纯化后进行 10 倍梯度稀释, 制备标准曲线。荧光定量 PCR 最适退火温度由不同梯度退火的普通 PCR 结合琼脂糖凝胶电泳确认, 条带特异单一且扩增效率良好的退火温度选为最后荧光定量 PCR 的退火温度, 反应条件: 95℃ 预变性 3 min, 94℃ 反应 10 s, 不同退火温度退火 20 s, 72℃ 延伸 20 s, 35~40 个循环, 72℃ 下进行荧光信号采集, 各剪接体的退火温度见表 1。反应结束后行熔解曲线分析程序, 熔解曲线峰特异单一的结果被认为有效并进行后续结果分析。以 18S 作为内参, 采用双曲线外标法进行定量分析, 将已知浓度的标准品和样品一起进行定量 PCR 检测, 通过标准品计算公式 $\log X_0 = -\log(1 + E_x) \times Ct + \log M$ 中的斜率和截距后, 再由样品的 Ct 值代入公式计算出样品初始基因的拷贝数浓度 X_0 。该结果由荧光定量 PCR 仪自带软件计算得出。为了直观评估不同剪接体在样品 cDNA 中的相对丰度, 用每种剪接体的 Ct 值减去内参 Ct 值得到的相对 Ct 值进行不同剪接体丰度的比较。相对 Ct 值越大, 说明相应的序列丰度越小。不同分组样品设置 3 个重复孔, 实验结束后的 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳并拍照。实验重复 3 次。

1.2.4 Western blot 检测总 VEGFA、VEGF165(V4,5,10) 和 SERPINF1(PEDF) 蛋白表达量 各组处理结束

后, 去除培养液上清, 预冷磷酸盐缓冲液洗 3 遍, 每孔加入 400 μ l 含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上裂解 15 min 后将裂解物转移至 1.5 ml 离心管中, 12 000 $\times g$ 离心 10 min 后转移上清至新的 1.5 ml 离心管内, BCA 法测定蛋白浓度, 加入蛋白上样缓冲液, 100℃ 处理 10 min 后冷却至室温进行蛋白上样, 行 SDS-PAGE 电泳后湿转法将蛋白转印至 PVDF 膜, 5% BSA 室温封闭 20 min, 用封闭液配制相应的一抗溶液, VEGFA、VEGF165 和 SERPINF1(PEDF) 稀释比例分别为 1:800、1:2 000 和 1:100, 转印好的膜在各自一抗溶液中 4℃ 孵育过夜。次日用 TBST 洗膜 3 次后在室温下进行二抗孵育 2 h。TBST 洗膜 2 次, 不含 Tween20 的 TBS 洗

1 次。采用化学发光成像仪拍照, 用 ImageJ 软件分析条带灰度值。以 α -tubulin 为内参, 计算目的蛋白相对表达量, 目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值 / 内参蛋白条带灰度值。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 软件对数据进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组 ARPE-19 细胞中不同基因 mRNA 和蛋白相对表达水平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 NCBI 数据库中 VEGFA 剪接体序列分析

VEGFA 基因包含 8 个外显子和 7 个内含子, 通过选择性地剪接拼接形成多种不同的剪接体, 截至 2024 年 11 月 9 日, NCBI 数据库收录了人类 VEGFA 基因 20 种不同的转录本。选取数据库中 10 个相对常用的剪接体, 利用 DNASTAR 中的 Megalign 工具进行序列比对, 差异部分见图 1。不同的 VEGFA 基因剪接体, 其差异序列集中在外显子 6 和 7 区域。总 VEGFA 检测引物的检测区域设计在所有剪接体序列相同的保守位置。该引物能检测到目前 NCBI 数据库所有 VEGFA 的剪接体。



图 1 NCBI 数据库中 *VEGFA* 基因剪接体序列分析 图中为 *VEGFA* 基因剪接体序列有差异的部分

Figure 1 Sequence analysis of *VEGFA* gene isoforms from the NCBI database Only the divergent regions among *VEGFA* gene isoforms were shown

2.2 不同浓度葡萄糖处理细胞不同时间后总 VEGFA mRNA 和蛋白相对表达量比较

琼脂糖凝胶电泳结果显示,总 *VEGFA* 和 VEGF 信号的负调控因子 *SERPINF1* (*PEDF*) 基因的扩增产物单一(图 2),扩增产物大小符合表 1 的预期。25 和 50 mmol/L 葡萄糖浓度下各时间点 ARPE-19 细胞中总 *VEGFA* mRNA 和蛋白相对表达量总体比较差异均有统计学意义 (mRNA: $F = 114.60, 143.60$, 均 $P < 0.05$; 蛋白: $F = 10.00, 8.04$, 均 $P < 0.05$), 其中与各自对照组比较,处理 24、48 和 72 h 后总 *VEGFA* mRNA 和蛋白相对表达量均明显升高,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3, 表 2, 3)。25 和 50 mmol/L 葡萄糖浓度下各时间点 ARPE-19 细胞中 *SERPINF1* (*PEDF*) 的 mRNA 和蛋白相对表达量总体比较,差异均无统计学意义 (mRNA: $F = 0.86, 0.32$, 均 $P > 0.05$; 蛋白: $F = 1.25, 0.08$, 均 $P > 0.05$) (图 3, 表 4, 5)。

2.3 不同浓度葡萄糖处理细胞不同时间后不同剪接体 mRNA 表达比较

VEGF165 (V4, 5, 10) 与总 *VEGFA* 的 mRNA 相对表达量最接近,其相对 Ct 值最小(表 6),说明在 ARPE-19 细胞中 VEGF165 (V4, 5, 10) 是相对主要的一种转录表达形式。VEGF111 (V8) 在本次检测中相对 Ct 值最大,其次为 *SERPINF1* (*PEDF*),均大于 16,属于相对低的表达水平。ARPE-19 细胞中各剪接体

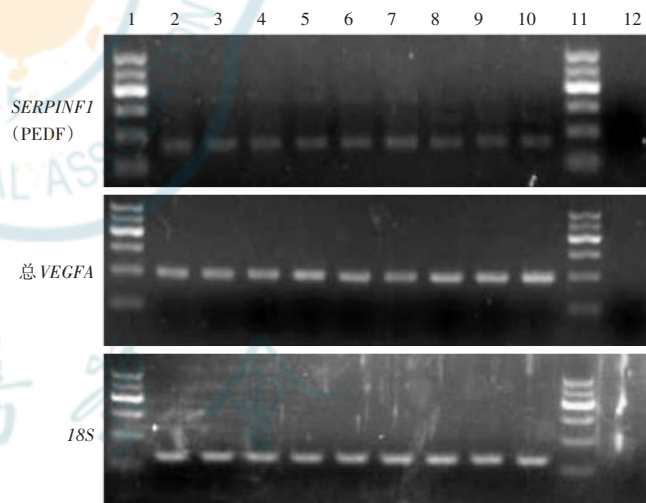


图 2 总 *VEGFA* 和 *SERPINF1* (*PEDF*) 定量 PCR 扩增产物电泳图 泳道 1 和 11 为 DNA 相对分子质量参考标准,从上到下依次为 600、500、400、300、200、100 bp。泳道 2 为空白对照,3 为对照组 1, 4~6 依次为 25 mmol/L 葡萄糖处理 24、48 和 72 h。泳道 7 为对照组 2, 8~10 依次为 50 mmol/L 葡萄糖处理 24、48 和 72 h。泳道 12 为扩增体系的阴性对照 PEDF:色素上皮衍生因子;VEGFA:血管内皮生长因子 A

Figure 2 Electrophoretogram of quantitative PCR products for total *VEGFA* and *SERPINF1* (*PEDF*) Lanes 1 and 11 DNA molecular weight markers, which were 600, 500, 400, 300, 200, and 100 bp from top to bottom. Lane 2 was blank control. Lane 3 was control group 1. Lanes 4, 5, 6 were 25 mmol/L glucose treated for 24, 48, and 72 hours in turn, respectively. Lane 7 was the control group 2. Lanes 8, 9, 10 were the 50 mmol/L glucose treated for 24, 48, and 72 hours, respectively. Lane 12 was the amplification negative control PEDF: pigment epithelium-derived factor; VEGFA: vascular endothelial growth factor A

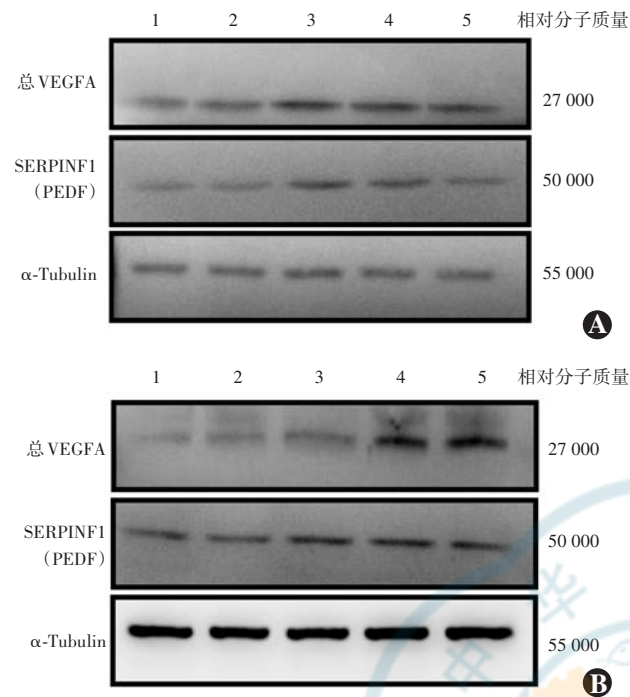


图3 不同浓度葡萄糖处理细胞不同时间后总 VEGFA 和 SERPINF1 (PEDF) 蛋白表达电泳图 A:25 mmol/L 葡萄糖 1:空白对照;2:对照 1;3~5:高糖处理 24、48 和 72 h B:50 mmol/L 葡萄糖 1:空白对照;2:对照 2;3~5:高糖处理 24、48 和 72 h VEGFA:血管内皮生长因子 A;PEDF:色素上皮衍生因子;Tubulin:微管蛋白

Figure 3 Electrophoretogram of total VEGFA and SERPINF1 (PEDF) protein expression levels after treatments with various concentrations of glucose for different time periods A: 25 mmol/L glucose 1: blank control; 2: control 1; 3, 4, 5: high glucose treatments for 24, 48, and 72 hours, respectively B: 50 mmol/L glucose 1: blank control; 2: control 2; 3, 4, 5: high glucose treatments for 24, 48, and 72 hours, respectively VEGFA: vascular endothelial growth factor A; PEDF: pigment epithelium-derived factor

表 2 25 mmol/L 葡萄糖处理细胞不同时间后总 VEGFA mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of total VEGFA mRNA and protein expression levels after treatments with 25 mmol/L glucose for different time periods ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	总 VEGFA mRNA 相对表达量	总 VEGFA 蛋白相对表达量
对照组 1	3	1.00±0.03	1.01±0.01
HG1-24 h 组	3	2.22±0.23 ^a	1.19±0.01 ^a
HG1-48 h 组	3	4.58±0.37 ^a	1.22±0.01 ^a
HG1-72 h 组	3	2.27±0.12 ^a	1.27±0.05 ^a
F 值		114.60	10.00
P 值		<0.001	<0.001

注:与对照组 1 相比,^a $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验)
VEGFA:血管内皮生长因子 A
Note: Compared with the control group 1, ^a $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) VEGFA: vascular endothelial growth factor A

表 3 50 mmol/L 葡萄糖处理细胞不同时间后总 VEGFA mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of total VEGFA mRNA and protein expression levels after treatments with 50 mmol/L glucose for different time periods ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	总 VEGFA mRNA 相对表达量	总 VEGFA 蛋白相对表达量
对照组 2	3	1.07±0.05	1.00±0.10
HG2-24 h 组	3	1.87±0.22 ^a	1.21±0.16 ^a
HG2-48 h 组	3	1.83±0.16 ^a	1.24±0.11 ^a
HG2-72 h 组	3	5.35±0.45 ^a	1.59±0.02 ^a
F 值		143.60	8.04
P 值		<0.001	<0.001

注:与对照组 2 比较,^a $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验)
VEGFA:血管内皮生长因子 A
Note: Compared with the control group 2, ^a $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) VEGFA: vascular endothelial growth factor A

表 4 25 mmol/L 葡萄糖处理细胞不同时间后 SERPINF1 (PEDF) mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of SERPINF1 (PEDF) mRNA and protein expression levels after treatments with 25 mmol/L glucose for different time periods ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	SERPINF1 (PEDF) mRNA 相对表达量	SERPINF1 (PEDF) 蛋白相对表达量
对照组 1	3	0.99±0.21	1.07±0.01
HG1-24 h 组	3	0.65±0.17	1.12±0.09
HG1-48 h 组	3	1.05±0.09	1.14±0.09
HG1-72 h 组	3	1.01±0.42	1.12±0.07
F 值		0.86	1.25
P 值		0.50	0.38

注:与对照组 1 相比,^a $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验)
PEDF:色素上皮衍生因子
Note: Compared with the control group 1, ^a $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) PEDF: pigment epithelium-derived factor

表 5 50 mmol/L 葡萄糖处理细胞不同时间后 SERPINF1 (PEDF) mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 5 Comparison of SERPINF1 (PEDF) mRNA and protein expression levels after treatments with 50 mmol/L glucose for different time periods ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	SERPINF1 (PEDF) mRNA 相对表达量	SERPINF1 (PEDF) 蛋白相对表达量
对照组 2	3	1.04±0.09	1.02±0.21
HG2-24 h 组	3	1.15±0.22	1.07±0.22
HG2-48 h 组	3	1.16±0.24	0.98±0.22
HG2-72 h 组	3	1.26±0.41	0.94±0.21
F 值		0.32	0.08
P 值		0.81	0.99

注:与对照组 2 比较,^a $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验)
PEDF:色素上皮衍生因子
Note: Compared with the control group 2, ^a $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test) PEDF: pigment epithelium-derived factor

mRNA 表达水平由高到低依次为 VEGF165 (V4, 5, 10)、VEGF121 (V6)、VEGF189 (V2)、SERPINF1 (PEDF)、VEGF111 (V8)、VEGF165b (V7) (表 6)。

对照组 1、HG1-24 h 组、HG1-48 h 组和 HG1-72 h 组 VEGF189 (V2)、VEGF121 (V6)、VEGF111 (V8)、VEGF165b mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F=7.88, 23.63, 6.13, 47.90$, 均 $P<0.05$), 其中 HG1-24 h 组 VEGF111 (V8) mRNA 相对表达量低于对照组 1, HG1-48 h 组 VEGF189 (V2)、VEGF121 (V6) mRNA 相对表达量高于对照组 1, HG1-72 h 组 VEGF121 (V6)、VEGF165b mRNA 相对表达量高于对照组 1, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。对照组 1、HG1-24 h 组、HG1-48 h 组和 HG1-72 h 组 VEGF165 mRNA 相对表达量总体比较差异无统计学意义 ($F=1.89, P=0.21$) (表 7)。

对照组 2、HG2-24 h 组、HG2-48 h 组和 HG2-72 h 组 VEGF189 (V2)、VEGF111 (V8)、VEGF165、VEGF165b mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ($F=12.24, 5.72, 17.36, 192.00$, 均 $P<0.05$), 其中 HG2-24 h 组 VEGF111 (V8)、VEGF165 mRNA 相

对表达量均高于对照组 2, HG2-48 h 组 VEGF165、VEGF165b mRNA 相对表达量均高于对照组 2, HG2-72 h 组 VEGF189 (V2)、VEGF111 (V8)、VEGF165、VEGF165b mRNA 相对表达量均高于对照组 2, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。对照组 2、HG2-24 h 组、HG2-48 h 组和 HG2-72 h 组 VEGF121 (V6) mRNA 相对表达量总体比较差异无统计学意义 ($F=2.11, P=0.20$) (表 8)。

琼脂糖凝胶电泳结果显示, 各转录本扩增产物单一 (图 4), 扩增产物大小符合表 1 的预期。

2.4 不同浓度葡萄糖处理细胞不同时间后 VEGF165 (V4, 5, 10) 蛋白相对表达量比较

空白对照组、对照组 1、HG1-24 h 组、HG1-48 h 组和 HG1-72 h 组 VEGF165 (V4, 5, 10) 蛋白相对表达量分别为 1.01 ± 0.07 、 1.05 ± 0.07 、 1.16 ± 0.06 、 1.37 ± 0.08 和 1.28 ± 0.05 , 总体比较差异有统计学意义 ($F=10.36, P<0.05$), 其中 HG1-48 h 组 VEGF165 (V4, 5, 10) 蛋白相对表达量高于对照组 1, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。空白对照组、对照组 2、HG2-24 h 组、HG2-48 h 组和 HG2-72 h 组 VEGF165 (V4, 5, 10) 蛋白

表 6 各组样品各基因定量 PCR 检测时相对于内参的平均 Ct 值 ($\bar{x}\pm s$)
Table 6 Average relative Ct values during quantitative PCR detection of each group of samples ($\bar{x}\pm s$)

样品	样本量	总 VEGFA	VEGF189 (V2)	VEGF121 (V6)	VEGF111 (V8)	VEGF165 (V4, 5, 10)	SERPINF1 (PEDF)
对照组 1	3	8.28±0.11	12.91±0.23	10.20±0.07	21.05±0.34	8.78±0.44	16.58±0.30
对照组 2	3	8.12±0.14	13.15±0.56	9.06±0.04	21.42±0.64	9.20±0.40	16.48±0.19
HG1-24 h	3	7.13±0.06	12.89±0.17	9.24±0.28	22.33±0.24	9.92±0.68	17.28±0.74
HG2-24 h	3	7.16±0.05	12.85±1.12	8.86±0.27	19.89±1.01	7.69±0.18	16.42±0.38
HG1-48 h	3	6.02±0.18	12.26±0.13	8.15±0.17	21.38±0.09	9.10±0.55	16.56±0.22
HG2-48 h	3	7.30±0.09	12.49±0.72	8.72±0.04	20.89±0.59	7.68±0.09	16.41±0.35
HG1-72 h	3	7.11±0.09	12.75±0.54	8.79±0.14	22.35±0.44	9.45±0.47	16.77±0.81
HG2-72 h	3	6.89±0.09	11.93±0.39	7.70±0.23	21.05±0.17	8.18±0.87	16.41±0.54

注: PCR: 聚合酶链式反应; VEGFA: 血管内皮生长因子 A; PEDF: 色素上皮衍生因子

Note: PCR: polymerase chain reaction; VEGFA: vascular endothelial growth factor A; PEDF: pigment epithelium-derived factor

表 7 25 mmol/L 葡萄糖处理细胞不同时间后 VEGFA 基因不同剪接体 mRNA 相对表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 7 Comparison of relative expression levels of different isoforms of VEGFA gene after treatments with 25 mmol/L glucose for different time periods ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	VEGF189 (V2)	VEGF121 (V6)	VEGF111 (V8)	VEGF165 (V4, 5, 10)	VEGF165b (V7)
对照组 1	3	0.99±0.14	1.01±0.053	0.96±0.26	0.98±0.16	1.00±0.06
HG1-24 h 组	3	1.02±0.08	2.20±0.62	0.47±0.07 ^a	0.54±0.23	1.65±0.17
HG1-48 h 组	3	1.60±0.06 ^a	4.62±0.61 ^a	0.91±0.10	0.95±0.30	0.49±0.11
HG1-72 h 组	3	1.21±0.15	2.85±0.34 ^a	0.58±0.14	0.76±0.19	4.49±0.73 ^a
F 值		7.88	23.63	6.13	1.89	47.90
P 值		<0.01	<0.001	0.04	0.21	<0.001

注: 与对照组 1 相比, ^a $P<0.05$ (单因素方差分析, LSD-t 检验) VEGFA: 血管内皮生长因子 A

Note: Compared with the control group 1, ^a $P<0.05$ (One-way ANOVA, LSD-t test) VEGFA: vascular endothelial growth factor A



表 8 50 mmol/L 葡萄糖处理细胞不同时间后 VEGFA 基因不同剪接体 mRNA 相对表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 8 Comparison of relative expression levels of different isoforms of VEGFA gene after treatments with 50 mmol/L glucose for different time periods ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	VEGF189(V2)	VEGF121(V6)	VEGF111(V8)	VEGF165(V4,5,10)	VEGF165b(V7)
对照组 2	3	1.01±0.17	1.00±0.03	1.03±0.06	1.02±0.16	1.01±0.06
HG2-24 h 组	3	1.72±0.07	1.22±0.24	3.01±0.28 ^a	2.68±0.34 ^a	1.17±0.14
HG2-48 h 组	3	1.65±0.32	1.28±0.04	2.47±0.81	2.75±0.14 ^a	4.35±0.27 ^a
HG2-72 h 组	3	2.56±0.28 ^a	2.54±0.45	2.63±0.12 ^a	1.91±0.39 ^a	2.43±0.13 ^a
F 值		12.24	2.11	5.72	17.36	192.00
P 值		<0.01	0.20	0.02	<0.001	<0.001

注:与对照组 2 相比,^a $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验) VEGFA:血管内皮生长因子 A
Note:Compared with the control group 2,^a $P<0.05$ (One-way ANOVA,LSD- t test) VEGFA:vascular endothelial growth factor A

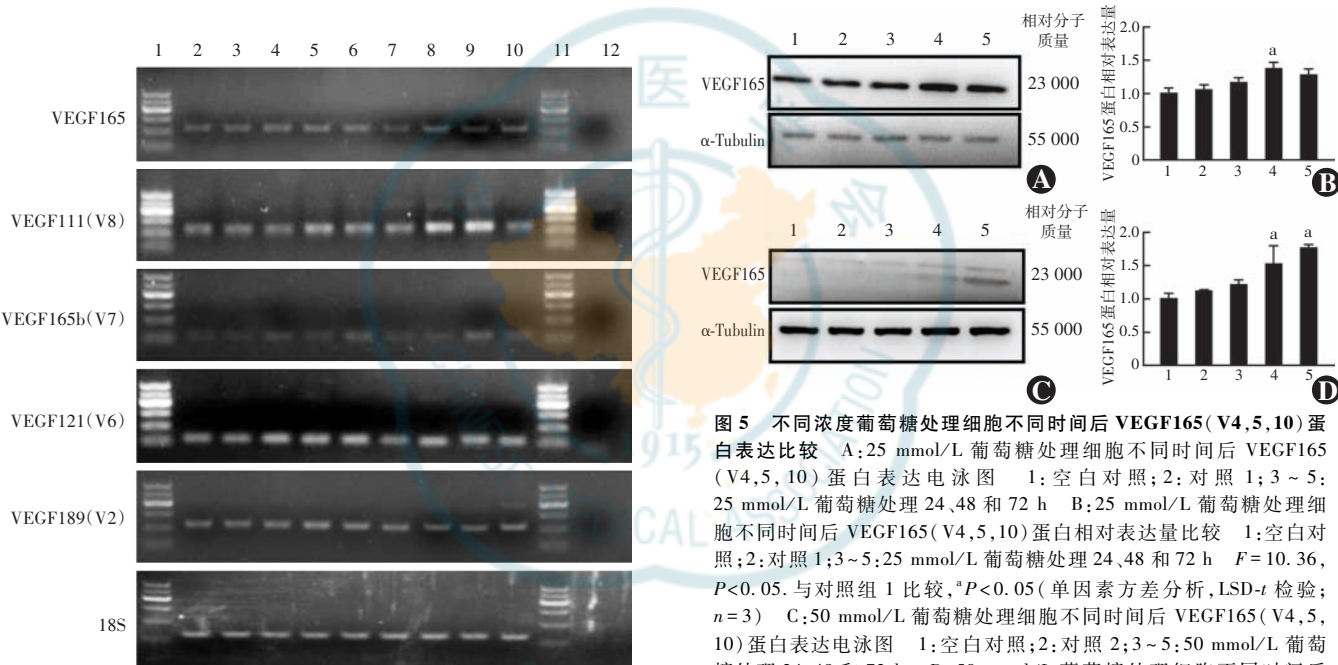


图 4 各组 VEGFA 基因不同剪接体定量 PCR 扩增产物电泳图 泳道 1 和 11 为 DNA 相对分子质量参考标准,从上到下依次为 600、500、400、300、200、100 bp。泳道 2 为空白对照,3 为对照组 1,4~6 依次为 25 mmol/L 葡萄糖处理 24、48 和 72 h。7 为对照组 2,8~10 依次为 50 mmol/L 葡萄糖处理 24、48 和 72 h。泳道 12 为扩增体系的阴性对照 VEGF:血管内皮生长因子

Figure 4 Electrophoretogram of qPCR products for different VEGFA gene isoforms Lanes 1 and 11 DNA molecular weight markers,which were 600,500,400,300,200, and 100 bp from top to bottom. Lane 2 was blank control. Lane 3 was control group 1. Lanes 4,5,6 were 25 mmol/L glucose treated for 24,48, and 72 hours in turn, respectively. Lane 7 was the control group 2. Lanes 8,9,10 were the 50 mmol/L glucose treated for 24,48, and 72 hours, respectively. Lane 12 was the amplification negative control VEGF: vascular endothelial growth factor

相对表达量分别为 1.02±0.05、1.12±0.00、1.22±0.05、1.53±0.21 和 1.77±0.04,总体比较差异有统计学意义 ($F=16.55,P<0.001$),其中 HG2-48 h 组和 HG2-72 h 组 VEGF165(V4,5,10)蛋白相对表达量均高于对照组 2,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图 5)。

图 5 不同浓度葡萄糖处理细胞不同时间后 VEGF165(V4,5,10)蛋白表达比较 A:25 mmol/L 葡萄糖处理细胞不同时间后 VEGF165(V4,5,10)蛋白表达电泳图 1:空白对照;2:对照 1;3~5:25 mmol/L 葡萄糖处理 24、48 和 72 h B:25 mmol/L 葡萄糖处理细胞不同时间后 VEGF165(V4,5,10)蛋白相对表达量比较 1:空白对照;2:对照 1;3~5:25 mmol/L 葡萄糖处理 24、48 和 72 h $F=10.36,P<0.05$.与对照组 1 比较,^a $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD- t 检验; $n=3$) C:50 mmol/L 葡萄糖处理细胞不同时间后 VEGF165(V4,5,10)蛋白表达电泳图 1:空白对照;2:对照 2;3~5:50 mmol/L 葡萄糖处理 24、48 和 72 h D:50 mmol/L 葡萄糖处理细胞不同时间后 VEGF165(V4,5,10)蛋白相对表达量比较 1:空白对照;2:对照 2;3~5:50 mmol/L 葡萄糖处理 24、48 和 72 h $F=16.55,P<0.001$.与对照组 2 比较,^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;Tubulin:微管蛋白

Figure 5 Comparison of VEGF165 (V4,5,10) protein expression levels after treatments with various concentrations of glucose for different time periods A:Electrophoretogram of VEGF165 (V4,5,10) protein expression after treatments with 25 mmol/L glucose for different time periods 1:blank control;2:control 1;3,4,5:25 mmol/L glucose treatments for 24,48, and 72 hours, respectively B:Comparison of relative VEGF165 (V4,5,10) protein expression after treatments with 25 mmol/L glucose for different time periods 1:blank control;2:control 1;3,4,5:25 mmol/L glucose treatments for 24,48, and 72 hours, respectively $F=10.36,P<0.05$. Compared with the control group 1,^a $P<0.05$ (One-way ANOVA,LSD- t test; $n=3$) C:Electrophoretogram of VEGF165 (V4,5,10) protein expression after treatments with 50 mmol/L glucose for different time periods 1:blank control;2:control 2;3,4,5:50 mmol/L glucose treatments for 24,48, and 72 hours, respectively D:Comparison of relative VEGF165 (V4,5,10) protein expression after treatments with 50 mmol/L glucose for different time periods 1:blank control;2:control 2;3,4,5:50 mmol/L glucose treatments for 24,48, and 72 hours, respectively $F=16.55,P<0.001$. Compared with the control group 2,^a $P<0.05$ (One-way ANOVA,LSD- t test; $n=3$) VEGF:vascular endothelial growth factor

3 讨论

VEGFA 由单个基因编码,通过 8 个外显子的 mRNA 选择性剪接,产生不同的剪接体^[10]。人类 VEGFA 基因的选择性剪接提供了不同的剪接体,目前 NCBI 数据库中收录了 20 种该基因的剪接体。本研究将 NCBI 数据库中收录的剪接体序列进行分析,并将既往 VEGFA 不同剪接体的命名与 NCBI 数据库的序列进行归纳。VEGFA121 和 VEGFA165 在哺乳动物中表达水平较高^[11]。在人视网膜中,VEGF 主要由 RPE 细胞、周细胞、内皮细胞、胶质细胞和神经节细胞产生,其中 RPE 细胞的产生量多于其他细胞^[12-13]。VEGFA 亚型在 DR 中表达明显上调,尤其是在 RPE 细胞、胶质细胞和玻璃体成纤维细胞中^[14]。基于对所有剪接体序列的分析,本研究在其中 10 条剪接体序列中的保守位置设计了总 VEGFA 的检测引物;而针对几种经典的剪接体,为了保持与其他研究的可比性,本研究沿用了经典的不同剪接体的检测引物^[15-17]。随着测序技术的迅速迭代和研究的深入,近年来发现了一些新的 VEGFA 亚型家族,称为 VEGFxxx^[18],是通过第 8 外显子的远端剪接位点选择形成的,导致一个包含由第 8b 外显子编码的 18 个碱基的 mRNA,取代了第 8a 外显子的 18 个碱基。VEGFxxx 中 xxx 是编码氨基酸的数量。这些新发现的 VEGFxxx,如 VEGF165b,与经典的 VEGFA 不同,具有强大的抗血管生成作用^[19]。另一个作为 VEGF 信号负调控因子的是 SERPINF1。SERPINF1 最初是从培养的 RPE 细胞中鉴定出来的。RPE 细胞表达 SERPINF1 基因,产生的是一种视网膜保护蛋白、神经营养因子和有效的血管生成抑制剂,随着细胞衰老和视网膜变性表达下调^[20]。VEGFA 这些具有完全不同生物学作用的剪接体以及 SERPINF1 等因子的表达模式及其相互作用模式鲜有研究报道。本研究重点关注 VEGF189、121、165、111 以及抗血管生成亚型的代表 VEGF165b。同样的剪接体还可以由翻译调控产生具有不同功能的 VEGFA 蛋白,这些亚型在 mRNA 序列上无法得到区分和特异识别^[17],因而无法进行定量 PCR 水平检测。加之除了总 VEGFA、VEGF165(V4,5,10)、SERPINF1 外,目前其他 VEGFA 剪接体蛋白产物的抗体不易获取,因此本研究仅进行了总 VEGFA、VEGF165(V4,5,10)以及 SERPINF1 蛋白水平的检测。

本研究深入探讨了高糖环境下 ARPE-19 细胞中 VEGFA 不同剪接体的表达模式,并全面分析了这些剪接体的组成型表达与高糖诱导的表达变化以及随时间

推移发生改变的趋势。本研究结果揭示了 VEGFA 剪接体在细胞中的组成型表达水平及其对高糖环境的响应性差异。

本研究中 2 种浓度的高糖均能使 ARPE-19 细胞的总 VEGFA 表达水平升高。其中,在 50 mmol/L 高糖环境下,ARPE-19 细胞中总 VEGFA mRNA 的表达在 72 h 的处理时间内持续升高,而在 25 mmol/L 葡萄糖环境下,总 VEGFA mRNA 的表达在 72 h 回落,蛋白表达水平呈现同样的变化趋势。总 VEGFA 表达的升高主要由 VEGF121 贡献。VEGF165(V4,5,10)和 VEGF121 是 VEGFA 的 2 种主要促血管生成亚型,在肿瘤血管生成中起着至关重要的作用。VEGFA 通过与其受体 VEGFR2 结合,促进肿瘤血管内皮细胞的增殖、迁移和存活,同时增加肿瘤新生血管的通透性^[21]。VEGF121 不能与肝素结合,可以自由扩散,因此其可能在高糖环境下对细胞的快速响应中起到关键作用。而 VEGF165(V4,5,10)有一个肝素结合结构域,能与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)结合^[11]。更大的剪接体会有更多的肝素结合结构域,这种同时存在多种对 ECM 亲和力不同的剪接体是为了保持 VEGFA 的浓度梯度,增加其在局部微环境中的浓度并增强其稳定性,方便对靶细胞进行定向驱动。

本研究发现,在 25 mmol/L 葡萄糖环境下 VEGF165(V4,5,10) mRNA 和蛋白的表达变化并不显著,但在 50 mmol/L 高糖环境下,VEGF165(V4,5,10)的表达量随时间延长而增加,这表明高糖对 VEGF165(V4,5,10)蛋白表达的促进作用可能随时间延长逐渐累积。这可能与 VEGF165(V4,5,10)在维持正常视网膜血管稳定中发挥作用有关,这种稳定性限制了 VEGF165(V4,5,10)在病理性血管生成中的作用,从而在限制 DR 的发展中起到一定的改善作用。高 VEGF165(V4,5,10)表达可能预示病情的严重程度和治疗反应,有助于预后评估和个体化治疗计划的制定。

与 VEGF165(V4,5,10)不同的是,VEGF121(V6) mRNA 在 25 mmol/L 高糖环境下表达显著上调,而 50 mmol/L 高糖环境下 VEGF121(V6) mRNA 表达水平随时间延长无明显变化。这种对高糖环境的敏感性可能使 VEGF121(V6)成为 DR 中病理性血管生成的关键驱动因素,成为 DR 治疗的重要靶点。

VEGF189(V2)和 VEGF111(V8)的表达水平较低,且在高糖环境下变化不大,表明其在 DR 的发病机制中可能不是主要的参与者。

VEGF165b 本底表达非常低,本研究设计了特定的逆转录方法,在该细胞中检测到 VEGF165b 表达。

虽然 VEGF165b 的细胞本底表达量极低,但该剪接体能在 25 mmol/L 高糖处理 72 h 或 50 mmol/L 高糖处理 48 h 后显著升高。VEGF165b 蛋白产物的受体结合域仍然存在,且能与受体结合,但不刺激血管生成信号传导。本研究中,该抑制型剪接体的上调滞后于 VEGF121,提示其可能通过饱和抑制机制维持各因子功能的平衡。25 mmol/L 高糖处理 72 h 或 50 mmol/L 高糖处理 48 h 能持续升高该剪接体的表达,提示在生理向病理转变的初始阶段,该剪接体可能起到对抗增殖型剪接体的作用。

这些 VEGFA 剪接体的表达变化反映了高糖环境下细胞对血管生成和炎症反应的调控机制。VEGF121 和 VEGF165b 的表达上调可能在 DR 的病理过程中起到关键作用,而 VEGF165 (V4, 5, 10)、VEGF189 和 VEGF111 (V8) 的相对稳定表达可能有助于维持一定的血管稳定性。这些发现不仅有助于理解 DR 的分子机制,而且可能指导未来的治疗策略开发,特别是针对特定 VEGF 剪接体的治疗。

为了深入理解 DR 中 VEGFA 剪接体的生物学意义,未来的研究需要解决以下几个关键问题:(1) 本研究仅在 ARPE-19 细胞中进行检测,无法完全模拟体内复杂的微环境和生理条件,需要在原代细胞或动物模型上进一步验证生理到病理过程中视网膜组织内各 VEGFA 剪接体的表达规律是否与 ARPE-19 细胞一致,以及 DR 中哪些视网膜细胞类型主要负责 VEGF 的过表达,并进一步分析这些细胞类型对不同 VEGFA 剪接体的表达调控机制;(2) 探索不同 VEGFA 剪接体在 DR 中的特定作用,特别是其如何影响视网膜血管的稳定性和病理性血管生成;(3) 增加诱导条件,如高糖缺氧环境,增加检测 VEGF 的调控基因(*HIF-1*、*AP-1*、*SP-1*、*STAT-3* 等),以更好地为 DR 的发病机制提供理论依据;(4) 研究 VEGF165b 等抑制型剪接体在调节血管生成和炎症反应中的潜在应用,可能为开发新的治疗策略提供新的思路;(5) 本研究未涉及药物干预对 VEGFA 剪接体表达的影响,未来通过研究药物干预对 VEGFA 剪接体表达的影响,对于开发新的治疗策略具有重要意义。

综上,ARPE-19 细胞中 VEGFA 基因各剪接体 mRNA 丰度从高到低依次为 VEGF165 (V4, 5, 10)、VEGF121 (V6)、VEGF189 (V2)、VEGF111 (V8)、VEGF165b (V7)。VEGF121 (V6) mRNA 表达水平在 25 mmol/L 的高糖浓度下显著升高,而 VEGF165 mRNA 在 50 mmol/L 高糖浓度下才显著升高。2 种高糖浓度下 mRNA 表达水平均明显升高的剪接体是

VEGF189 (V2) 和 VEGF165b,而 SERPINF1 (PEDF) 表达无显著变化。本研究不仅为理解 VEGFA 在 DR 中的作用提供了新的视角,也为未来的研究和治疗策略的开发提供了实验基础。通过深入分析 VEGFA 剪接体的表达模式和生物学功能,希望能够为 DR 的预防和治疗提供新的分子靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 程蕾:参与选题、研究设计、研究实施、数据和资料分析、文章撰写及修改;程姗:参与选题与研究设计、数据收集;朱冉:参与数据收集;徐国旭:参与选题、资料分析和解释、论文修改及定稿

参考文献

- [1] Liu K, Wang H, He W, et al. Intravitreal conbercept for diabetic macular oedema; 2-year results from a randomised controlled trial and open-label extension study [J]. Br J Ophthalmol, 2022, 106 (10): 1436-1443. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2020-318690.
- [2] 胡可可,惠延年,杜红俊.抗 VEGF 时代激光光凝治疗糖尿病视网膜病变的应用进展[J].国际眼科杂志,2023,23(8):1285-1289. DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2023.8.09.
Hu KK, Hui YN, Du HJ. Application progress of laser photocoagulation in diabetic retinopathy treatment in the era of anti-vascular endothelial growth factor agents[J]. Int Eye Sci, 2023, 23(8): 1285-1289. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.8.09.
- [3] Li X, Lee C, Tang Z, et al. VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? [J]. Cell Adh Migr, 2009, 3(4): 322-327. DOI: 10.4161/cam.3.4.9459.
- [4] Jeltsch M, Tammela T, Saharinen P. VEGF-C and VEGF-D in the control of blood vessel and lymphatic vessel growth [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2013, 365: 65-96. DOI: 10.1007/82_2012_258.
- [5] Chau K, Hennessy A, Makris A. Placental growth factor and pre-eclampsia [J]. J Hum Hypertens, 2017, 31(12): 782-786. DOI: 10.1038/jhh.2017.61.
- [6] Arrigo A, Aragona E, Bandello F. VEGF-targeting drugs for the treatment of retinal neovascularization in diabetic retinopathy [J]. Ann Med, 2022, 54(1): 1089-1111. DOI: 10.1080/07853890.2022.2064541.
- [7] 侯定善,李睿姝,范妍,等.ROS/NLRP3/Caspase-1 信号通路在高糖诱导视网膜色素上皮细胞凋亡中的作用[J].中华实验眼科杂志,2022,40(1):6-12. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210420-00267-1.
Hou DS, Li RS, Fan Y, et al. The role of the ROS/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway in high glucose-induced apoptosis of retinal pigment epithelial cells [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2022, 40(1): 6-12. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210420-00267-1.
- [8] 贾杨雪,王志玲,魏莹莹,等.高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞中环状 RNA 差异表达分析[J].中华实验眼科杂志,2022,40(7):617-622. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200602-00390.
Jia YX, Wang ZL, Wei YY, et al. Differential expression analysis of circular RNA in human retinal vascular endothelial cells induced by high glucose [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2022, 40(7): 617-622. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200602-00390.
- [9] Du X, Wang Y, Gao F. PSAT1 is upregulated by METTL3 to attenuate high glucose-induced retinal pigment epithelial cell apoptosis and oxidative stress [J]. Diagn Pathol, 2024, 19(1): 138. DOI: 10.1186/s13000-024-01556-4.
- [10] Al Kawas H, Saaid I, Jank P, et al. How VEGF-A and its splice variants affect breast cancer development - clinical implications [J]. Cell Oncol (Dordr), 2022, 45(2): 227-239. DOI: 10.1007/s13402-022-00665-w.
- [11] Yamakuchi M, Okawa M, Takenouchi K, et al. VEGF-A165 is the predominant VEGF-A isoform in platelets, while VEGF-A121 is

- abundant in serum and plasma from healthy individuals[J/OL]. PLoS One, 2023, 18(4): e0284131 [2025-04-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37027444/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0284131.
- [12] Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, et al. Vascular endothelial growth factor is induced by long-term high glucose concentration and up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 221(1): 193-198. DOI:10.1006/bbrc.1996.0568.
- [13] Amin RH, Frank RN, Kennedy A, et al. Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997, 38(1): 36-47.
- [14] Malecaze F, Clamens S, Simorre-Pinatel V, et al. Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy[J]. Arch Ophthalmol, 1994, 112(11): 1476-1482. DOI: 10.1001/archophth.1994.01090230090028.
- [15] Danastas K, Miller EJ, Hey-Cunningham AJ, et al. Expression of vascular endothelial growth factor A isoforms is dysregulated in women with endometriosis[J]. Reprod Fertil Dev, 2018, 30(4): 651-657. DOI:10.1071/RD17184.
- [16] Mineur P, Colige AC, Deroanne CF, et al. Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents[J]. J Cell Biol, 2007, 179(6): 1261-1273. DOI: 10.1083/jcb.200703052.
- [17] Cui TG, Foster RR, Saleem M, et al. Differentiated human podocytes endogenously express an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor (VEGF165b) mRNA and protein[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 286(4): F767-773. DOI: 10.1152/ajprenal.00337.2003.
- [18] KonoPatskaya O, Churchill AJ, Harper SJ, et al. VEGF165b, an endogenous C-terminal spliceosome of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice[J]. Mol Vis, 2006, 12: 626-632.
- [19] Shen J, Li Y, Li M, et al. Vascular endothelial growth factor-165b protects the blood-retinal barrier from damage after acute high intraocular pressure in rats[J]. Int J Ophthalmol, 2022, 15(8): 1231-1239. DOI:10.18240/ijo.2022.08.02.
- [20] Rebutini IT, Crawford SE, Becerra SP. PEDF deletion induces senescence and defects in phagocytosis in the RPE[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(14): 7745. DOI:10.3390/ijms23147745.
- [21] Gao G, Li Y, Zhang D, et al. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization[J]. FEBS Lett, 2001, 489(2-3): 270-276. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)02110-X.
- (收稿日期:2025-04-20 修回日期:2025-08-18)
- (本文编辑:刘艳 施晓萌)

· 临床经验 ·

Descemet 膜前角膜营养不良临床特征分析

黎莹斯 晏晓明 吴元 李海丽 汤韵 宋文静

北京大学第一医院眼科, 北京 100034

通信作者: 宋文静, Email: swj910608@163.com

Analysis of clinical characteristics of pre-Descemet corneal dystrophy

Li Yingsi, Yan Xiaoming, Wu Yuan, Li Haili, Tang Yun, Song Wenjing

Department of Ophthalmology, Peking University First Hospital, Beijing 100034

Corresponding author: Song Wenjing, Email: swj910608@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20230825-00079

Descemet 膜前角膜营养不良 (pre-Descemet corneal dystrophy, PDCD) 是一种罕见的、双侧对称的、进行性角膜基质营养不良^[1]。PDCD 常见于 30~40 岁人群, 眼部症状通常不明显, 以 Descemet 膜(后弹力层)前深基质大量微小的多形性混浊为主要特征性表现^[2]。其患病率低于 1/1 000 000, 在我国鲜有报道^[1]。根据 2015 年国际角膜营养不良分类标准第 2 版^[2], PDCD 可分为 2 类。其中一个亚型为 X 连锁隐性遗传性鱼鳞病(X-linked ichthyosis, XLI; MIM#308100)相关的 PDCD, 因遗传位点明确, 被归为角膜营养不良的第 1 类。PDCD 的另一个亚型为孤立性 PDCD, 遗传方式尚不明确, 被归为第 4 类^[2-3]。有研究者更倾向于将散发的孤立性 PDCD 归为角膜退行性疾病^[4]。本研究对 PDCD 的临床表现和角膜成像特点进行总结, 为眼科临床医生对该病的诊断和治疗提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用系列病例观察方法, 纳入 2010—2020 年在北京大学第一医院诊治的 2 例男性和 1 例女性 PDCD 患者,

年龄 15~37 岁, 平均 28.3 岁。患者来自 3 个无血缘关系的家系, 并由经验丰富的眼科医生经过详细检查后诊断为 PDCD。纳入标准: 裂隙灯显微镜检查可见双侧 Descemet 膜前存在点状灰白色混浊, 并可获得相应的活体共聚焦显微镜 (*in vivo* confocal microscopy, IVCN) 和眼前节光学相干断层扫描 (anterior segment optical coherence tomography, AS-OCT) 检查结果。排除标准: 其他类型的角膜营养不良和退行性疾病, 青光眼、感染性角膜炎等其他相关性眼病史, 以及可影响角膜的全身性疾病史, 如痛风、酪氨酸病、胱氨酸病等。本研究遵循《赫尔辛基宣言》, 经北京大学第一医院伦理委员会审核批准 (批文号: 2023618-001)。

1.2 方法 (1) 采用数码裂隙灯显微镜 (日本 Topcon 公司) 观察患者结膜、角膜、睑缘、睑板腺腺口等结构, 进行角膜荧光素染色, 采集典型病变区域图像。利用睑板腺照相模块观察上、下睑板腺的腺体形态, 聚焦睑板结膜面, 捕捉图像。(2) 采用 IVCN (德国海德堡公司) 检查患眼角膜各层细胞情况。盐酸奥布卡因滴眼液点眼 3 次, 开睑器开睑, 卡波姆凝胶涂于角膜接