

色素上皮衍生因子抑制碱烧伤角膜新生血管的机制研究

付月, 陆晓和, 朱丹, 符敏, 吴伟

基金项目: 广东省科技计划基金(No. 2008B080703037); 广州市海珠区科技计划基金(No. 2010-T-26)
作者单位: (510000) 中国广东省广州市, 南方医科大学珠江医院眼科
作者简介: 付月, 在读硕士研究生, 研究方向: 角膜及眼表疾病。
通讯作者: 陆晓和, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 眼表疾病。
luxh63@163.com
收稿日期: 2012-12-03 修回日期: 2013-03-04

Research of pigment epithelium - derived factor in inhibition of corneal neovascularization induced by alkali burn

Yue Fu, Xiao-He Lu, Dan Zhu, Min Fu, Wei Wu

Foundation items: Guangdong Provincial Science and Technology Fund, China (No. 2008B080703037); Haizhu District Science and Technology Fund of Guangzhou, China (No. 2010-T-26)
Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China
Correspondence to: Xiao-He Lu. Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China. luxh63@163.com
Received: 2012-12-03 Accepted: 2013-03-04

Abstract

• **AIM:** To explore the mechanism of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in the development of experimental rat corneal neovascularization (CNV).

• **METHODS:** Rat corneal alkaline burn model was established in both eyes by routine method in 40 anesthetized female Sprague-Dawley rats. The rats were randomly assigned to 2 groups with 20 rats each for topical administration of recombinant PEDF combined with chloramphenicol or normal saline combined with chloramphenicol (as control). At different intervals (4, 7, 10, and 14 days) of the treatment, rats were euthanized and the corneas removed for immunohistochemistry analyses to measure expression levels of PEDF, vascular endothelial growth factor (VEGF), Fas and FasL. The eyes of ten healthy rats were used as normal control. Meanwhile, the apoptosis of neovascular endothelial cells was detected by TUNEL method on the 4th, 7th, 10th and 14th day respectively after the burn.

• **RESULTS:** There were high levels of PEDF expression and low levels of VEGF, Fas and FasL in the normal cornea. VEGF levels were significantly induced by chemical cauterization in the groups treated with chloramphenicol combined with normal saline, demonstrating CNV. In contrast, the PEDF treatment

prevented the over expression of VEGF induced by the cauterization and unregulated the expression of Fas and FasL. In CNV tissues, the positive immune reaction of VEGF was most apparent during the 7th day and then declined thereafter. However, the most positive expression of PEDF, Fas, FasL was on the 10th day and then declined slowly after thereafter. The ratio of PEDF/VEGF raised from <1 to >1 in the course and the hinge was on the 10th day. Certain time correlation existed between the dynamic expressions of VEGF and PEDF and the development of CNV. The expression of Fas and FasL correlated to PEDF closely in the whole procession which may underlie a simulative relationship between them. The apoptosis of CNV endothelial cells expressed most positively on the 10th day and it was always much more intense in the PEDF group than in the normal saline group.

• **CONCLUSION:** The expressions of VEGF and PEDF are remarkably expressed in experimental rat CNV tissues, and the fluctuation of which is consistent with the development of CNV. The breakdown of the balance between the two factors may play a role in CNV occurrence and development. That the PEDF downregulates VEGF expression and upregulates Fas and FasL expression which induces the apoptosis of CNV endothelial cells results in the inhibition of corneal NV induced by chemical cauterization. The results suggested the possible mechanism of PEDF in the therapeutic function for CNV diseases.

• **KEYWORDS:** corneal neovascularization; pigment epithelium-derived factor; apoptosis; mechanism

Citation: Fu Y, Lu XH, Zhu D, *et al.* Research of pigment epithelium-derived factor in inhibition of corneal neovascularization induced by alkali burn. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013; 13(3):446-451

摘要

目的: 探讨外源性色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)抑制大鼠角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)形成的作用机制,检测外源性PEDF对CNV模型中内源性血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及PEDF、细胞凋亡受体/配体(Fas/FasL)表达的影响,以及对CNV内皮细胞凋亡的影响(脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法——TUNEL法测定)。

方法: 大鼠随机分为3组: PEDF治疗组(A组)、生理盐水对照组(B组)、正常组(C组)。建立碱烧伤诱导的大鼠CNV模型, A组和B组分别给予PEDF+氯霉素滴眼液和生理盐水+氯霉素滴眼液点眼,采用裂隙灯观察CNV的生长情况,用免疫组化方法检测并半定量分析VEGF, PEDF, Fas及FasL在正常角膜组织和碱烧伤后4, 7, 10,

14d 角膜组织中的表达,用 TUNEL 法检测 CNV 内皮细胞的凋亡情况。

结果:正常角膜组织中可以检测到高 PEDF 表达和低 VEGF 表达,也可以检测到一定的低 Fas 和 FasL 表达。各时间点角膜新生血管的面积,A 组均低于 B 组($P<0.05$)。免疫组化显示,碱烧伤后 4,7,10,14d A 组 VEGF 的表达均低于 B 组($P<0.05$),PEDF 的表达均高于 B 组($P<0.05$),A 组 Fas/FasL 的表达明显高于 B 组($P<0.05$),A 组 TUNEL 法测到的角膜新生血管内皮细胞凋亡计数和凋亡指数 AI 明显高于对照组($P<0.05$)。两组检测到的 VEGF 均在第 7d 达到峰值,随后下降;而 PEDF 和 Fas 及 FasL 在第 10d 达到峰值,随后下降。碱烧伤后第 4~10d,VEGF/PEDF >1 ,CNV 逐渐生长并达到峰值;第 10d 后,VEGF/PEDF <1 ,CNV 开始逐渐退化。

结论:PEDF 抑制碱烧伤后 CNV 的作用机制可以归结为两点:(1)下调 VEGF 的表达,控制 PEDF/VEGF 的动态比值,抑制 CNV 生长;(2)上调 Fas/FasL 等凋亡受体的表达,诱导角膜新生血管内皮细胞的凋亡,促进 CNV 的退化。

关键词:角膜新生血管;色素上皮衍生因子;凋亡;机制

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.03.07

引用:付月,陆晓和,朱丹,等.色素上皮衍生因子抑制碱烧伤角膜新生血管的机制研究.国际眼科杂志 2013;13(3):446-451

0 引言

角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)是与角膜化学性烧伤、角膜炎症及角膜移植排斥反应密切相关的常见病理现象,是致盲的主要原因之一,其发病机制尚不十分清楚。抑制血管生成因子和促血管生成因子表达的失衡在 CNV 的形成过程中发挥重要作用。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前所知最强的促血管生成因子,色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)目前被认为是最有效、最高效的血管增生抑制因子。PEDF 抑制新生血管的机制目前尚未明确,可能是通过抑制血管内皮细胞的移行和增殖、促进血管内皮细胞凋亡等途径起作用,也可能是 VEGF 的生理拮抗剂。经查阅,有关 PEDF 促进血管内皮细胞凋亡方面研究尚未见报道。因此,我们探讨外源性 PEDF 对 CNV 模型中内源性 PEDF 和 VEGF 与凋亡受体 Fas/FasL^[1]表达的影响及对血管内皮细胞凋亡的影响(TUNEL 法^[2,3]测定),旨在探讨 PEDF 抑制碱烧伤 CNV 的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年雌性 SD 大鼠 60 只,由南方医科大学实验动物中心提供,体质量 180~220g,2~3 月龄,并经眼部检查排除外眼和眼底疾患。重组人色素上皮衍生因子 PEDF 40 μ g(美国 PeproTech 公司);兔抗大鼠 VEGF 抗体(北京博奥森公司 BS-0279),兔抗大鼠 PEDF 抗体(北京博奥森公司 BS-0731),兔抗大鼠 Fas 抗体(北京博奥森公司 BS-0215R),兔抗大鼠 FasL 抗体(北京博奥森公司 BS-0216R);即用型 SP 系列检测试剂盒 SP-9001 和二氨基联苯胺(DAB)显色剂(北京中杉生物技术有限公司),眼科显微手术器械,光学显微镜(Olympus BX51T-PHD-J11,日本),多功能真彩色细胞图象分析管理系统 Image-Pro Plus 6.0(美国 Media Cybernetics 公司),其他相关试剂

由南方医科大学附属珠江医院药剂科实验室提供。PEDF 以注射用生理盐水溶解至浓度为 10 μ mol/L PEDF 滴眼液,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作 将 60 只 SD 大鼠随机分为 PEDF 治疗组(A 组,20 只)、生理盐水对照组(B 组,20 只)、正常组(C 组,20 只),所有大鼠皆以双眼为实验眼。治疗组和对照组大鼠予 10% 水合氯醛(0.3mL/100g)腹腔注射麻醉,5g/L 盐酸丙美卡因滴眼液滴结膜囊表面麻醉,将直径为 3mm 圆形滤纸在 1mol/L NaOH 中充分浸透(30s),取出滤纸吸去多余滤液,贴于双眼角膜中央烧灼 40s,移去滤纸后立即用 50mL 无菌生理盐水冲洗结膜囊,以氯霉素滴眼。A 组给予 10 μ g/L PEDF 滴眼液+氯霉素滴眼,4 次/d(10 μ L/次),用药 2wk;B 组给予生理盐水+氯霉素滴眼,4 次/d(10 μ L/次),用药 2wk。C 组不予任何处理。

1.2.2 角膜新生血管的观察 用裂隙灯显微镜于 3,7,10,14d 测量大鼠新生血管,测量从角膜缘向心性生长的新生血管长度,每个角膜在不同象限测量 5 个值,取其平均值得出不同组不同时期 CNV 的长度,按 Robert 电脑数学模型公式: $A=C/12\times 3.1416[r^2-(r-l)^2]$,计算 CNV 面积。C 为 CNV 宽度的圆周钟点数,r 为角膜半径,l 为 CNV 长度。

1.2.3 角膜 HE 染色 烧伤后于 3,7,10,14d 观察结束后,采用麻醉过量法处死 5 只大鼠,沿角膜缘剪下整个角膜组织置于 40g/L 多聚甲醛溶液中固定 12~24h,常规脱水,石蜡包埋,做 5 μ m 连续切片,行苏木精-伊红染色,光镜下观察。

1.2.4 VEGF 和 PEDF 与 Fas 及 FasL 蛋白表达的测定 取石蜡切片脱蜡,30mL/L H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶,0.01mmol/L 枸橼酸盐缓冲液高压抗原修复,滴加封闭用正常山羊血清工作液,血清封闭。一抗湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗室温下孵育 15min。DAB 显色,苏木素复染,脱水、透明、封片,光镜下观察。细胞质内或核膜上呈棕黄色者为阳性,仅细胞核着蓝色者为阴性,光学显微镜下观察并照相。将 VEGF, PEDF, Fas, FasL 的染色结果输入计算机,采用多媒体医用彩色图像病理分析系统(HMIAS 2000 型全自动彩色图像分析系统),每张切片随机选取 5 个高倍($\times 400$)视野,测量 VEGF, PEDF, Fas, FasL 免疫组化染色的平均光密度值(average optic density, AOD),半定量分析 4 种蛋白的表达。

1.2.5 TUNEL 法染色观察角膜新生血管内皮细胞 石蜡切片 5 μ m,常规脱蜡脱水,室温孵育 15min。PBS 冲洗,加入 50 μ L 的 TUNEL 反应混合溶液(美国 ROCHE 公司出品),在湿盒中 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min。PBS 冲洗 3 次,擦干样品周围的水分,加入 50 μ L 转化剂-POD,在湿盒中 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。PBS 冲洗 3 次,加入 50~100 μ L DAB 底物溶液,室温孵育 10min, PBS 冲洗 3 次。苏木素复染细胞核,封片,在光镜下图象分析,光镜观察细胞棕黄色或者棕褐色为阳性。每组取 6 个样本,每个样本计数 5 个不同视野凋亡血管内皮细胞的总数。

1.2.6 细胞凋亡指数分析 凋亡细胞 TUNEL 法染色片,每张切片在显微镜高倍镜下随意选取 5 个视野,计算阳性率平均值,并分为 5 级(0 级 $<2\%$, 1 级 $<3\% \sim 9\%$, 2 级 $<10\% \sim 19\%$, 3 级 $<20\% \sim 39\%$, 4 级 $>40\%$)。观察各组内皮凋亡细胞比例以确定凋亡指数(apoptosis index, AI)。

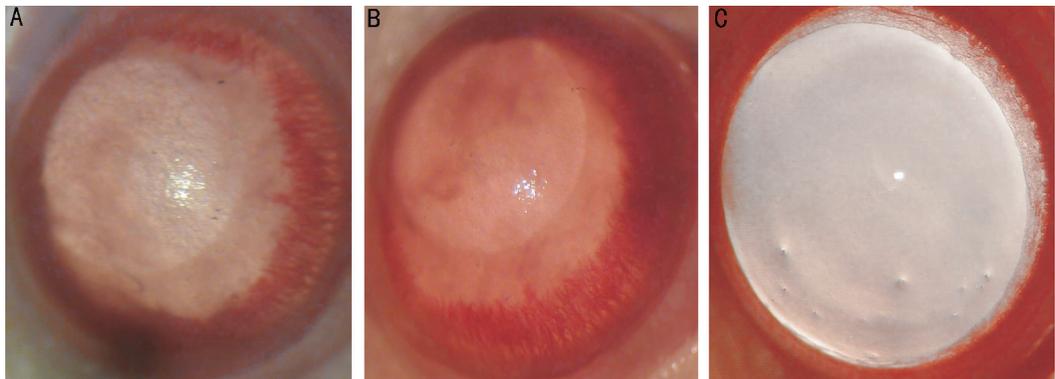


图1 各组大鼠碱烧伤后第7d的角膜照相 A:A组;B:B组;C:C组。

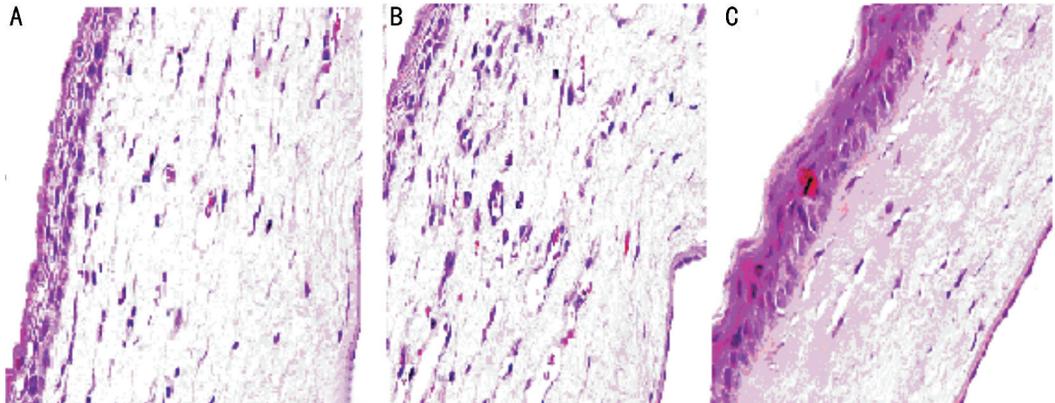


图2 各组大鼠碱烧伤后第7d的角膜 HE 染色($\times 400$) A:A组;B:B组;C:C组。

统计学分析:所有数据均采用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,多个样本均数间两两比较 SNK- q 检验,计数资料用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜新生血管生长情况及面积比较 碱烧伤后第 1d A 组和 B 两组角膜上皮不同程度水肿,角膜缘血管扩张充血;4d 可见新生血管从角膜缘开始生长,逐渐向角膜中心发展,血管密度较为稀疏;伤后 7d 新生血管生长旺盛,血管密集(图 1);伤后 10d CNV 明显变长变粗,形成大量吻合支,几乎布满整个角膜,快到达角膜中央;伤后 14d,全周角膜均有新生血管生长,交错排列,完全覆盖角膜中央,有些细小血管开始退化。在各个时间点 A 组 CNV 面积均小于 B 组($P < 0.05$, 表 1)。

2.2 不同时期三组大鼠角膜切片 HE 染色 A 组 4d 角膜可见炎症细胞浸润少量新生血管;7d 在角膜可见新生毛细血管(图 2A);10d 角膜基质层内可见较多新生血管;14d 角膜基质层内可见少量新生血管,管腔细小分布稀疏。B 组 4d 角膜可见大量炎症细胞及少量新生血管;7d 角膜基质层内可见较多新生血管(图 2B);10d 角膜基质层内可见大量成熟新生血管,管腔粗大,内有成熟的红细胞;14d 角膜基质层内新生血管密度减少,可见较多成熟新生血管,内有红细胞。C 组未见炎症细胞和新生血管(图 2C)。

2.3 不同时期两组大鼠角膜 VEGF 和 PEDF 与 Fas 及 FasL 免疫组化的结果分析 四种蛋白在角膜上皮、内皮、新生血管内皮细胞中染色阳性均呈棕黄色,四者均为胞浆着色,深浅表示阳性程度大小。四种蛋白在 C 组角膜均有表达,表达阳性程度 PEDF > FAS > FASL > VEGF, VEGF 只有弱阳性表达于周边角膜缘, PEDF 和 Fas 与 FasL 在角膜上皮和内皮层均有少量表达。角膜碱烧伤后,四种蛋白

表1 碱烧伤后不同时期两组 CNV 面积比较 ($\bar{x} \pm s, A/\text{mm}^2, n=10$)

时间	A 组	B 组	P
4d	2.60 \pm 0.15	5.31 \pm 0.46	<0.05
7d	10.17 \pm 0.25	16.90 \pm 0.06	<0.05
10d	20.92 \pm 0.05	23.45 \pm 0.09	<0.05
14d	25.97 \pm 0.04	28.26 \pm 0.02	<0.05

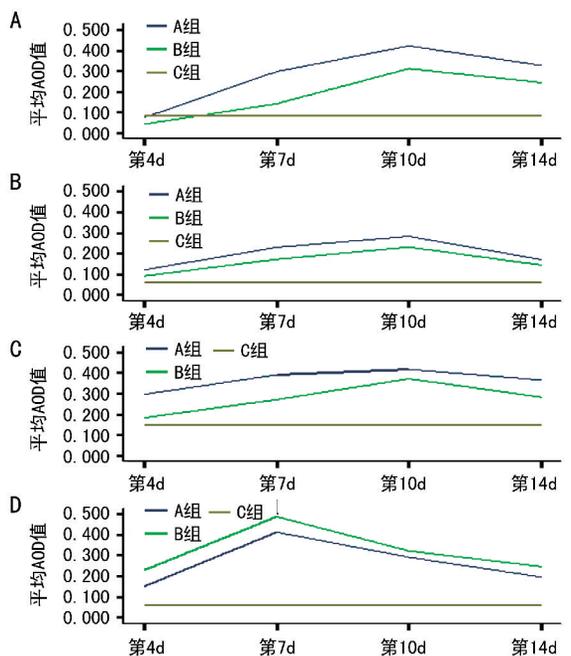


图3 三组中四种检测因子随时间表达量变化的趋势图 A: FasL;B:Fas;C:PEDF;D:VEGF。

均表达于角膜全层,表达量均随时间先上升后有所下降(图 3)。A 组和 B 两组四种蛋白表达均高于 C 组($P < 0.05$),

表2 不同时期各组大鼠 VEGF 和 PEDF 与 Fas 及 FasL 免疫组化染色 AOD 值比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

名称	分组	4d	7d	10d	14d
VEGF	A 组	0.152±0.011	0.415±0.023	0.293±0.012	0.196±0.014
	B 组	0.230±0.012	0.489±0.013	0.323±0.011	0.247±0.011
	C 组	0.060±0.011	0.060±0.011	0.060±0.011	0.060±0.011
PEDF	A 组	0.298±0.012	0.392±0.015	0.419±0.016	0.367±0.017
	B 组	0.184±0.013	0.272±0.013	0.373±0.015	0.284±0.016
	C 组	0.151±0.013	0.151±0.013	0.151±0.013	0.151±0.013
Fas	A 组	0.123±0.015	0.230±0.016	0.286±0.014	0.171±0.024
	B 组	0.092±0.011	0.173±0.022	0.232±0.021	0.145±0.021
	C 组	0.058±0.013	0.058±0.013	0.058±0.013	0.058±0.023
FasL	A 组	0.078±0.013	0.298±0.026	0.423±0.035	0.328±0.022
	B 组	0.043±0.012	0.143±0.024	0.312±0.036	0.245±0.026
	C 组	0.083±0.016	0.083±0.016	0.083±0.016	0.083±0.016

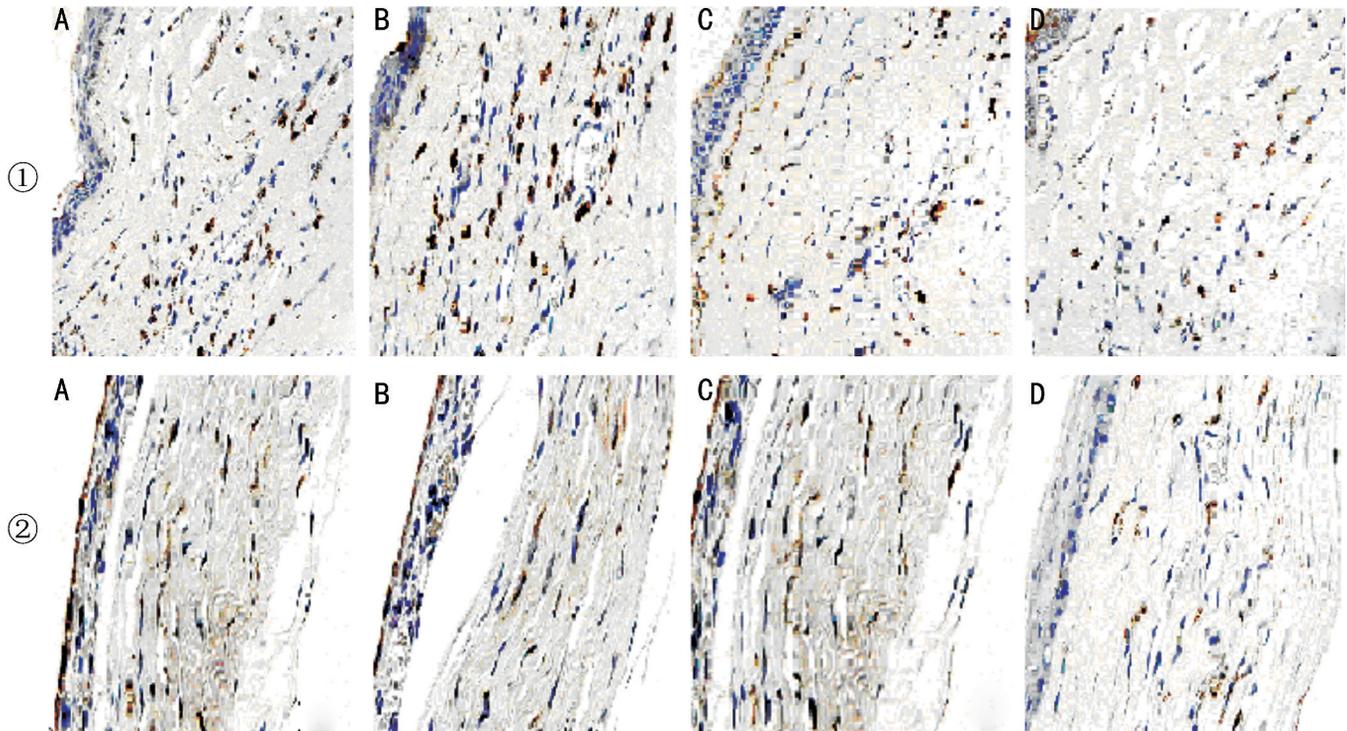


图4 A组和B组 VEGF 和 PEDF 的表达(SP×400) A:A组7d;B:B组7d;C:A组10d;D:B组10d;①:VEGF;②:PEDF。

每组内不同时间点的每种蛋白表达均有统计学差异($P < 0.05$);3组 VEGF 均在第7d 表达最高(图3),而 PEDF 和 Fas 与 FasL 均在第10d 表达最高(图3,表2)。同一时间点,A组 PEDF 和 Fas 与 FasL 表达均高于B组($P < 0.05$),而 VEGF 表达均低于B组($P < 0.05$)。角膜碱烧伤后第7d,两组内 VEGF 表达均高于 PEDF ($P < 0.05$);而第10d 两组内 VEGF 表达均低于 PEDF ($P < 0.05$,图4)。角膜碱烧伤后第10d,两组 Fas 和 FasL 表达阳性均最高,明显高于其它时间点($P < 0.05$);A组>B组>C组($P < 0.05$,图5)。

角膜碱烧伤后第0~7d,A组和B组内 VEGF 和 PEDF 表达均属上升之势,但是 VEGF 上升更快,所以期间 VEGF/PEDF 比值均上升,新生血管随之生长迅速,由于A组有外源性 PEDF 补充,于是起始时刻,A组比值仍小于1,但是B组一直是大于1,但是在第7d,比值均达到峰值,伴随 CNV 也是生长最旺盛的时刻;随后第7~14d,PEDF 表达仍保持上升之势,但是 VEGF 开始衰减,于是 VEGF/PEDF 比值开始下降,伴随 CNV 生长的速度减慢并开始消

退,新生血管内皮细胞的凋亡开始明显(图6)。

2.4 TUNEL 结果分析 TUNEL 染色后,正常角膜上皮少量凋亡细胞(非血管内皮细胞),未检测到凋亡的新生血管内皮细胞,在角膜碱烧伤后的各个时期,均能检测到凋亡的新生血管内皮细胞,A组均高于B组($P < 0.05$),两组在第10d 检测到凋亡的新生血管内皮细胞计数最多,明显高于其他时间点($P < 0.05$,表3,图7)。

3 讨论

Dawson 等^[4]首先发现 PEDF 能抑制血管生成刺激因子引起的血管内皮细胞的增殖和移动。目前了解到它的抗血管活性主要通过两条通路:Fas-FasL 凋亡途径^[5,6]和打破血管生成因子之间的平衡^[7]。已有研究表明,PEDF 抑制血管可能是通过 Fas 和 FasL^[5,6]介导的细胞凋亡起作用,它能辨别新形成的血管内皮细胞也是通过 Fas 与 FasL(简称 Fas-FasL 系统)^[5,6]介导细胞凋亡的功能在多种病理生理的过程中发挥重要作用。VEGF 和 PEDF 表达失衡^[8-10]对眼底的新生血管性病变^[11-13]和眼表翼状胬

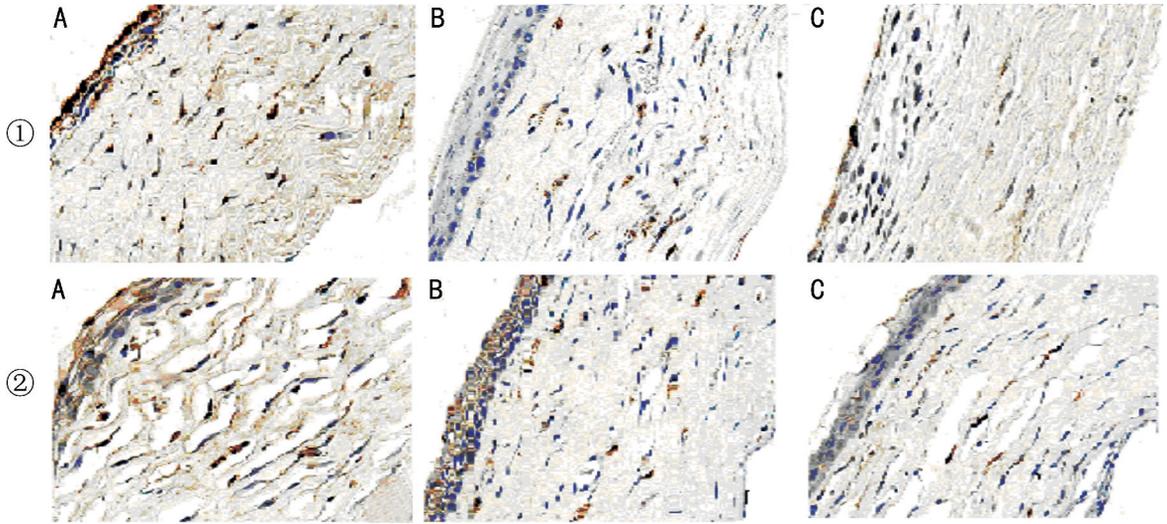


图5 各组碱烧伤后第10d FAS和FASL染色结果(SP×400) A:A组;B:B组;C:C组;①:Fas;②:FasL。

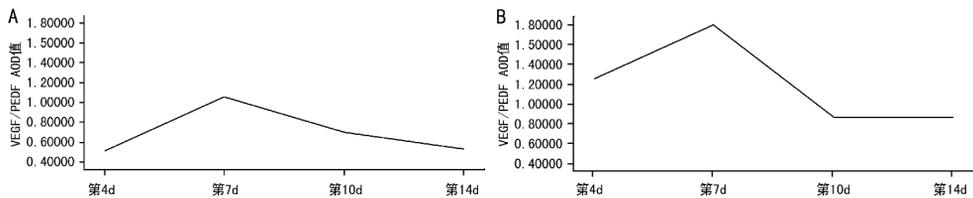


图6 A组和B组VEGF/PEDF AOD值与时间的关系 A:A组;B:B组。

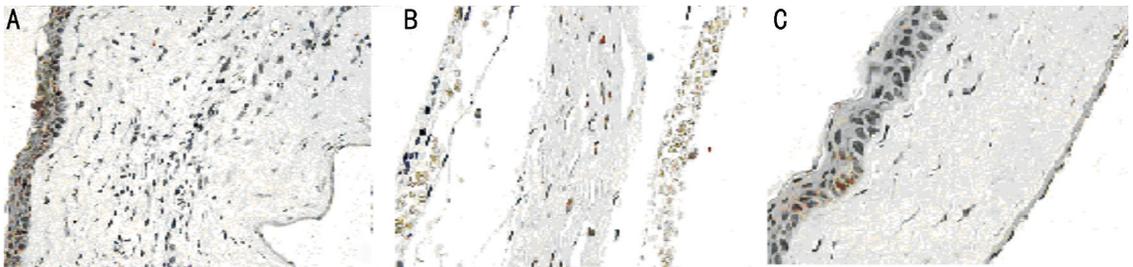


图7 各组碱烧伤后第10d TUNEL染色结果(×400) A:A组;B:B组;C:C组。

表3 各组不同时间凋亡内皮细胞计数和凋亡指数的变化

指标	4d	7d	10d	14d	$\bar{x} \pm s$
凋亡内皮细胞计数	A组	5.43±0.31	7.49±0.60	10.25±1.12	7.12±0.44
	B组	3.41±0.22	5.34±0.58	8.63±0.98	5.14±0.32
	C组	0	0	0	0
凋亡指数	A组	0.26±0.14	1.34±0.23	2.72±0.32	1.25±0.43
	B组	0.14±0.12	0.65±0.21	1.44±0.29	0.65±0.41
	C组	0	0	0	0

肉的发生及发展有重要作用。我们推测,在同样为纤维血管增生的CNV性疾病中,二者的表达与CNV组织的形成过程也可能存在一定关系。目前这方面的研究在国内外鲜见报道,本实验对这两方面的机制进行了初步论证。

本实验结果显示:碱烧伤后0~7d,两组角膜VEGF表达都明显增强并稳定在峰值,增高的VEGF通过增加微血管的通透性、刺激内皮细胞分裂、增加组织因子和某些蛋白酶的生成,从而促进新生血管的生成。同时,高表达的VEGF蛋白虽然通过一定分子机制使PEDF和Fas及FasL产物逐渐上调,但VEGF上升的速度更快,结果是VEGF/PEDF比例总体上调,导致CNV迅速生长并达到峰值,此时新生血管内皮细胞凋亡也有发生,但不明显,以CNV生长为主。A组由于使用了外源性PEDF因子,可能补充了内源

性PEDF的不足,因此CNV发生的速度和量均明显慢于B组;烧伤后7~14d,VEGF由峰值开始逐渐下降,而此时PEDF表达及Fas与FasL表达却达到了峰值,VEGF/PEDF比例明显下降,直接抑制CNV形成,新生血管内皮细胞凋亡也开始明显,两组CNV生长的速度都开始变慢,并出现CNV的消退,推测与Fas/FasL诱导的新生血管内皮细胞凋亡有关。这样,PEDF一方面通过进一步下调VEGF的表达,明显抑制CNV形成;另一方面促进Fas及FasL配体的表达,而引起新生血管内皮细胞的凋亡,从而诱导新生血管退化,外源性PEDF还补充了内源性PEDF的不足。这之前关于眼底新生血管疾病中VEGF/PEDF比值变化与新生血管发生发展过程的研究结果^[9]相一致。

本实验还检测了碱烧伤后CNV内皮细胞凋亡的数

量,发现 A 组均高于 B 组 ($P < 0.05$);第 10d 明显高于其他时间点 ($P < 0.05$),这与 PEDF 的峰值趋势一致。这间接说明在第 10d 时,CNV 基本发展到极期,PEDF 的表达量达到峰值,此时 VEGF 已经开始呈下降趋势,PEDF 进一步发挥下调 VEGF 和诱导 Fas/FasL 凋亡受体的作用,直接结果是导致了新生血管内皮细胞的凋亡,最终抑制了 CNV 的发生,使 CNV 向退化性发展。

本实验结果可以初步验证 PEDF 抑制 CNV 的两种作用机制:(1)下调 VEGF 的表达以直接抑制 CNV 的发生;(2)上调角膜 Fas 及 FasL 受体的表达,促进新生血管内皮细胞的凋亡以诱导 CNV 的退化;(3)有可能会补充内源性 PEDF 的不足。本实验还首次在产生新生血管的角膜中检测了凋亡的内皮细胞,证实了 PEDF 确实是通过诱导新生血管内皮细胞凋亡来发挥抗新生血管作用的。本实验为探明 PEDF 抑制新生血管的机制研究摸索了进一步的方向,但是本实验的设计和过程仍有许多不足之处,关于 PEDF 抑制 CNV 的确切机制仍需进一步探索。

参考文献

- 1 陈琳. Fas/FasL 与眼新生血管. 国外医学·眼科学分册 2001;6:339-342
- 2 陈文列,洪振丰,李天骄,等. 粗叶悬钩子总生物碱抑制肝细胞凋亡的超微结构与 TUNEL 染色观察. 中国中药杂志 2010;8:1060-1063
- 3 王发渭,黄泉智,许成勇,等. TUNEL 法检测抑郁模型大鼠海马细胞凋亡的改进及应用. 现代生物医学进展 2012;17:3221-3223
- 4 Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285(5425):

- 245-248
- 5 Rodrigues M, Turner O, Stolz D, et al. Production of reactive oxygen species by multipotent stromal cells/mesenchymal stem cells upon exposure to Fas Ligand. *Cell Transplant* 2012;21(10):2189-2200
- 6 Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, et al. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995;270(5239):1189-1192
- 7 向江东,周莉娜,席晓薇. PEDF 在肿瘤中的研究进展. 现代肿瘤医学 2011;4:812-815
- 8 Gao G, Li Y, Zhang D, et al. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS Lett* 2001;489(2-3):270-276
- 9 Ohno-Matsui K, Morita I, Tombran-Tink J, et al. Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF. *J Cell Physiol* 2001;189(3):323-333
- 10 Zhang SX, Wang JJ, Gao G, et al. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *J Mol Endocrinol* 2006;37(1):1-12
- 11 Lin M, Hu Y, Chen Y, et al. Impacts of hypoxia-inducible factor-1 knockout in the retinal pigment epithelium on choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(10):6197-6206
- 12 Crawford SE, Stellmach V, Ranalli M, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 24):4421-4428
- 13 Damico FM. Angiogenesis and retinal diseases. *Arq Bras Oftalmol* 2007;70(3):547-553