

【实验研究】

高氧对小鼠视网膜新生血管模型中根蛋白的影响[△]

王龙梅 闫琳 杨侠 董晓光 徐海峰

常对照组 Radixin mRNA 和蛋白的表达总体稳定在较低水平。两组生后 30 d 时 Radixin 蛋白表达均显著升高, 且与生后 14 d 相比差异有统计学意义 ($P=0.058, 0.082$)。伴随着视网膜新生血管的增生和消退, Radixin mRNA 和蛋白

【摘要】 目的 探讨高氧诱导 C57BL/6J 小鼠视网膜新生血管形成过程中根蛋白(Radixin)的表达变化,为进一步研究视网膜新生血管性疾病的防治方法提供理论基础。**方法** 将 72 只健康 7 d 龄小鼠随机分为 2 组,分别为:高氧诱导组:小鼠置于含氧体积分数为 75%±2% 的氧箱内饲养 5 d 构建高氧诱导视网膜新生血管动物模型;正常对照组:小鼠置于正常氧环境中饲养。待生后 12 d、13 d、17 d、21 d、30 d 分别处死小鼠。应异硫氰酸荧光素标记的右旋糖酐(FD-2000S)血管灌注造影视网膜铺片和 HE 染色观察视网膜新生血管的形态变化;应用免疫组织化学染色检测视网膜中 Radixin 的表达定位;应用 RT-PCR 和 Western-blot 检测不同时间点视网膜 Radixin mRNA 和蛋白表达情况。**结果** 免疫组织化学染色结果显示两组 Radixin 均有表达,但高氧诱导组小鼠视网膜新生血管管壁、血管芽、内皮细胞和神经节细胞层 Radixin 大量表达。Real-time-PCR 及 Western-blot 结果显示,不同组别和不同时间点 Radixin mRNA 和蛋白表达水平差异均有统计学意义(mRNA: $F_{\text{group}} = 59.273, P = 0.000, F_{\text{time}} = 538.071, P = 0.000, F_{\text{interaction}} = 297.126, P = 0.000$;蛋白: $F_{\text{group}} = 419.307, P = 0.000, F_{\text{time}} = 663.946, P = 0.000, F_{\text{interaction}} = 354.538, P = 0.000$)。高氧诱导组小鼠生后 12 d、生后 13 d Radixin mRNA 和蛋白表达水平均较正常对照组同龄小鼠低,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$),生后 17 d、生后 21 d Radixin mRNA 和蛋白表达水平均较正常对照组同龄小鼠明显增高,差异均有统计学意义(均为 $P = 0.000$)。正常对照组 Radixin mRNA 和蛋白的表达总体稳定在较低水平。两组生后 30 d 时 Radixin mRNA 和蛋白表达水平差异均无统计学意义($P = 0.058, 0.082$)。伴随着视网膜新生血管的增生和消退, Radixin mRNA 和蛋白

的表达水平均呈先升高后降低的趋势。结论 Radixin 参与了视网膜新生血管的形成,可能会成为预防和治疗视网膜新生血管性疾病的新靶点。

[眼科新进展,2014,34(3):217-221,225]

病理性新生血管的形成是早产儿视网膜病变、视网膜血管阻塞性眼病、糖尿病视网膜病变等一系列视网膜血管性疾病的主要特征^[1],这些异常新生血管主要在视网膜表面生长,引起视功能损伤和视力严重下降^[2]。视网膜新生血管的形成过程极为复杂,参与的因子众多^[3-5]。但从细胞增生的角度来讲,血管内皮细胞增生是新生血管形成的细胞学基础,这一点与肿瘤的发生十分类似,均与细胞异常增生有关。研究发现,根蛋白(Radixin)是细胞膜骨架连接蛋白,它参与了肿瘤细胞的增生、迁移、浸润过程^[6-7],同时它还参与了血管内皮屏障功能改变过程^[8-10]。由此推测,Radixin 有可能参与视网膜新生血管的发生,然而目前相关研究甚少。因此本实验中我们对小鼠视网膜新生血管形成过程中 Radixin 的表达情况进行研究,以期为临床治疗新生血管性视网膜疾病提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物 将健康性成熟 SPF 级 C57BL/6J 小鼠(维通利华,北京)按雌雄比例 3:1 合笼饲养于山东省眼科研究所实验动物中心,待母鼠怀孕后分出单独一笼饲养,取其所生幼鼠制作动物模型。

1.2 主要仪器与试剂 异硫氰酸荧光素标记的右旋糖酐(FD-2000S)(Sigma,美国),山羊抗小鼠 Radixin 一抗(Santa Cruz,美国),免疫组织化学试剂盒(福州迈新),RNA 提取试剂盒(Macherey-nagel,德国),反转录试剂盒(Takara,大连),Real time-PCR 试剂盒(天根,北京),探针引物(金斯瑞,南京),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天,上海),ECL 显影试剂盒(Thermo scientific,美国),辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗(Santa Cruz,美国)。LB-CY12C 数字测氧仪(路博伟业,青岛),荧光显微镜(Nikon,日本),7500 型荧光定量 PCR 仪(ABI,美国)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组 将生后 7 d 的小鼠随机分为 2 组,每组 72 只,分别为:(1)高氧诱导组:小鼠在生后 7 d 进入高氧环境,饲养 5 d 后回到正常氧环境中饲养;(2)正常对照组:小鼠一直置于正常氧环境中饲养。两组小鼠分别于生后 12 d、13 d、17 d、21 d、30 d 即氧诱导视网膜新生血管动物模型造模成功后的 0 d、1 d、5 d、9 d、18 d 处死小鼠。

1.3.2 动物模型的构建 将生后 7 d 的小鼠与母鼠同笼放入氧箱中,调整氧箱内氧气体积分数为 75% ± 2%,温度为(23 ± 2)℃。LB-CY12C 数字测氧仪每日监测 3 ~ 4 次,保证氧箱内含氧体积分数稳定。饲养 5 d 后返回正常氧环境中继续与母鼠共同

饲养。待小鼠出氧箱时行血管灌注造影视网膜铺片,以视网膜后极部形成大片无灌注区作为造模成功的标准。

1.3.3 FD-2000S 血管灌注造影视网膜铺片 两组分别于生后 12 d、13 d、17 d、21 d、30 d 各取 2 只小鼠,腹腔注射麻醉后于手术显微镜下自上腔静脉灌注适量 FD-2000S,保持正常血液循环 5 min。颈部脱臼处死小鼠,摘取眼球,40 g · L⁻¹多聚甲醛溶液固定 15 min,手术显微镜下沿角巩膜缘剪开,去除角膜、虹膜、晶状体,完整分离视网膜。将视网膜放射状剪开,玻璃体面向上平铺于载玻片上,甘油封片后置于荧光显微镜下,应用 488 nm 波长蓝光激发,行形态学观察并照相。

1.3.4 视网膜组织病理学检查 两组分别于生后 12 d、13 d、17 d、21 d、30 d 各取 2 只小鼠,颈部脱臼处死,摘取眼球,40 g · L⁻¹多聚甲醛溶液固定 24 h,乙醇梯度脱水,石蜡包埋。全眼球矢状位连续切片(厚度 4 μm)至环环呈现不完整圆环时,每隔 15 张切片取 2 张贴片于一张载玻片上,HE 染色光镜下观察形态并照相。

1.3.5 免疫组织化学染色检测 Radixin 的表达 两组分别于生后 17 d 各取 2 只小鼠,同 1.3.4 方法制作石蜡切片。将石蜡切片置于 60 ℃温箱烤片过夜,二甲苯 I、II、III 脱蜡各 10 min。梯度酒精复水、高压修复抗原。体积分数 3% H₂O₂ 封闭过氧化物酶,山羊血清封闭抗原后加入羊抗小鼠 Radixin 一抗(1:200),阴性对照以 PBS 代替一抗,37 ℃水浴锅孵育 60 min;PBS 洗后滴加增强剂及二抗,37 ℃水浴锅孵育 30 min,PBS 洗后 DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片,显微镜下观察并照相。

1.3.6 Taqman 法 Real time-PCR 检测 Radixin mRNA 的表达 两组分别于生后 12 d、13 d、17 d、21 d、30 d 各取 5 只小鼠,取出视网膜(方法同 1.3.3),提取视网膜总 RNA,逆转录得 cDNA,进行 Real time-PCR 扩增。Radixin 引物和探针序列:上游:5'-GAAGAATGAACGCGTGAAG-3',下游:5'-CT-CAGCGTGAAGAACATCGT-3',探针:5'-TCTGAACTCAATGCCTGGAGCTGC-3',引物间跨度 103 bp;GAPDH 引物和探针序列:上游:5'-ACAACCTTTGGCATTGTGGA-3',下游:5'-GATGCAGGGATGATGTTCTG-3',探针:5'-CATGCCATCACTGCCACCCA-3',引物间跨度 133 bp。反应条件:预变性 95 ℃ 10 s;PCR 反应:95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,40 个循环。

1.3.7 Western-blot 检测 Radixin 蛋白的表达 两组分别于生后 12 d、13 d、17 d、21 d、30 d 各取 5 只小鼠,提取视网膜总蛋白质,BCA 蛋白浓度测定试剂

盒测蛋白浓度并定量至 30 μg , 100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、100 mA 电转膜 3 h 将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。50 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入羊抗小鼠 Radixin 一抗 (1 : 500) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 磷酸盐缓冲液洗膜后将硝酸纤维素膜与辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗 (1 : 3000), 室温孵育 1 h, ECL 显影试剂盒显影并成像。Gel-Del 凝胶成像系统照相, Image J2x 软件测量目的蛋白条带的灰度值, 与内参 GAPDH 灰度值比较。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 高氧诱导组和正常对照组小鼠不同时间点 Radixin mRNA 及蛋白的表达水平以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用两因素析因设计资料方差分析进行比较。高氧诱导组和正常对照组相同时间点及组内各时间点间 Radixin mRNA 及蛋白的表达水平的多重比较应用单因素方差分析 (LSD-*t* 检验), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜铺片血管形态观察 高氧诱导组小鼠在生后 12 d 视网膜动脉高度收缩, 大面积无血管区形成, 仅在周边部形成小面积的血管网 (图 1A); 生后 13 d 视网膜可见大片无灌注区, 中周部血管密度较生后 12 d 增高, 小血管走行紊乱, 少量新生血管芽及微血管瘤形成 (图 1B); 生后 17 d 视网膜大分支血管迂曲扩张、渗漏明显, 无灌注区面积减小, 中周部血管进入无灌注区边缘, 血管密度增加, 但血管走行更为紊乱, 可见渗出斑, 大量新生血管芽及微血管瘤形成, 达到血管增生反应高峰 (图 1C); 生后 21 d 视网膜血管仍可见迂曲、渗漏, 无灌注区几乎消失, 血管走行仍紊乱, 但新生血管芽较生后 17 d 减少 (图 1D); 生后 30 d 增生反应基本消退, 血管走行大致正常, 分布也较均匀, 仅残留部分大分支血管扭曲渗漏改变 (图 1E)。正常对照组小鼠生后 12 d 视网膜血管已分布完全, 密度均匀, 走形自然, 纹路清晰 (图 1F)。

Figure 1 Stretched preparation of retinas after FD-2000S intravascular injection ($\times 40$). A: OIR group at 12 days; B: OIR group at 13 days; C: OIR group at 17 days; D: OIR group at 21 days; E: OIR group at 30 days; F: Normal control group at 12 days FD-2000S 血管灌注视网膜铺片 ($\times 40$). A: 高氧诱导组生后 12 d 视网膜; B: 高氧诱导组生后 13 d 视网膜; C: 高氧诱导组生后 17 d 视网膜; D: 高氧诱导组生后 21 d 视网膜; E: 高氧诱导组生后 30 d 视网膜; F: 正常对照组生后 12 d 视网膜

2.2 视网膜组织病理学检测 高氧诱导组小鼠生后 12 d 视网膜较薄, 未见突破内界膜的血管内皮细胞核 (图 2A); 生后 13 d 视网膜内界膜变粗糙, 偶见突破内界膜的血管内皮细胞核和血管管腔 (图 2B); 生后 17 d 视网膜可见大量突破内界膜的血管内皮细

胞核, 内界膜粗糙 (图 2C); 生后 21 d 视网膜仍可见大量突破内界膜的血管内皮细胞核, 内界膜仍粗糙 (图 2D); 生后 30 d 视网膜内界膜较平滑, 未见突破内界膜的血管内皮细胞核 (图 2E)。正常对照组小鼠生后 17 d 视网膜内界膜较平整光滑, 偶见穿过内

界膜的血管内皮细胞核(图 2F)。

2.3 免疫组织化学染色检测 Radixin 在视网膜组织中的表达 免疫组织化学染色结果显示, Radixin 在两组中均有表达。高氧诱导组小鼠生后 17 d 在视网

膜新生血管管壁、血管芽、内皮细胞及神经节细胞层均可见大量棕黄色颗粒, Radixin 表达明显增强(图 3A)。正常对照组小鼠生后 17 d 视网膜内界膜平滑, 棕黄色颗粒较少, Radixin 表达较弱(图 3B)。

Figure 2 Histopathological examination of retina in mice(HE, ×400). The arrows pointed out the proliferated vascular endothelial cells or vessels. A: OIR group at 12 days; B: OIR group at 13 days; C: OIR group at 17 days; D: OIR group at 21 days; E: OIR group at 30 days; F: Normal control group at 17 days 小鼠视网膜组织病理学检查(箭头处为增生的血管内皮细胞核或血管管腔; HE 染色, ×400)。A: 高氧诱导组生后 12 d 视网膜; B: 高氧诱导组生后 13 d 视网膜; C: 高氧诱导组生后 17 d 视网膜; D: 高氧诱导组生后 21 d 视网膜; E: 高氧诱导组生后 30 d 视网膜; F: 正常对照组生后 17 d 视网膜

2.4 Taqman 法 Real-time PCR 检测 Radixin mRNA 的表达 对两组小鼠不同时间点 Radixin mRNA 表达水平进行析因分析结果显示, 不同组别和不同时间点间 Radixin mRNA 表达水平差异均有统计学意义($F_{\text{group}} = 59.273, P = 0.000; F_{\text{time}} = 538.071, P = 0.000; F_{\text{interaction}} = 297.126, P = 0.000$)。高氧诱导组小鼠视网膜各时间点间 Radixin mRNA 表达水平呈先升高后降低的趋势, 于生后 17 d 达到高峰, 表达变化趋势与视网膜新生血管生长趋势一致。高氧诱导组小鼠生后 12 d、13 d Radixin mRNA 表达水平较正常对照组同龄小鼠低, 生后 17 d、21 d Radixin mRNA 的表达水平较正常对照组同龄小鼠明显增高, 差异均有统计学意义($P_{12\text{ d}} = 0.000, P_{13\text{ d}} = 0.000, P_{17\text{ d}} = 0.000, P_{21\text{ d}} = 0.000$)。高氧诱导组 Radixin mRNA 表达水平生后 13 d 较同组生后 12 d 增高, 生后 17 d 较同组生后 13 d 和生后 21 d 均明显增高, 差异均有统计学意义($P_{13\text{ d vs. }12\text{ d}} = 0.000, P_{17\text{ d vs. }13\text{ d}} = 0.000, P_{17\text{ d vs. }21\text{ d}} = 0.000$)。正常对照组 Radixin mRNA 的表达总体稳定在较低水平, 生后 17 d 表达稍高。两组

Figure 3 Immunohistochemical staining(×400). The arrows pointed out the proliferated vascular endothelial cells or vessels. A: OIR group at 17 days; B: Normal control group at 17 days 免疫组织化学染色结果(箭头处为增生的血管内皮细胞或管腔; ×400)。A: 高氧诱导组生后 17 d 视网膜; B: 正常对照组生后 17 d 视网膜 生后 30 d 时 Radixin mRNA 表达水平差异无统计学意义($P_{30\text{ d}} = 0.058$; 见表 1)。

2.5 Western-blot 检测 Radixin 蛋白表达水平 Western-blot 检测结果见图 4。对两组小鼠不同时间点 Radixin 蛋白表达水平析因分析结果显示, 不同组别和不同时间点间 Radixin 蛋白表达水平差异均有

统计学意义 ($F_{\text{group}} = 419.307, P = 0.000; F_{\text{time}} = 663.946, P = 0.000; F_{\text{interaction}} = 354.538, P = 0.000$)。高氧诱导组小鼠各时间点 Radixin 蛋白表达水平也呈先升高后降低的趋势,于生后 17 d 达到高峰,之后下降,但仍可在较高水平持续至生后 21 d。高氧诱导组小鼠生后 12 d、生后 13 d Radixin 蛋白表达水平低于正常对照组同龄小鼠,生后 17 d、生后 21 d 表达水平明显高于正常对照组同龄小鼠,差异均有统计学意义 ($P_{12\text{ d}} = 0.000, P_{13\text{ d}} = 0.001, P_{17\text{ d}} = 0.000$),

表 1 两组不同时间点小鼠视网膜 Radixin mRNA 和 Radixin 蛋白表达水平

| Table 1 Expression levels of radixin mRNA and protein in two groups at different time points ($\bar{x} \pm s$) | | | | | | |
|--|---------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Group | 12 days | 13 days | 17 days | 21 days | 30 days |
| Radixin mRNA | OIR | 0.435 ± 0.051 | 0.824 ± 0.067 | 2.656 ± 0.126 | 1.410 ± 0.136 | 1.028 ± 0.127 |
| | Control | 1.000 ± 0.033 | 1.144 ± 0.106 | 1.333 ± 0.119 | 1.184 ± 0.104 | 0.965 ± 0.064 |
| Radixin protein | OIR | 0.625 ± 0.037 | 0.706 ± 0.018 | 1.855 ± 0.039 | 1.265 ± 0.013 | 0.826 ± 0.023 |
| | Control | 0.827 ± 0.023 | 0.848 ± 0.031 | 1.030 ± 0.038 | 0.804 ± 0.013 | 0.785 ± 0.010 |

Figure 4 Expression levels of radixin protein in OIR group and normal control group 高氧诱导组和正常对照组 Radixin 蛋白表达

3 讨论

视网膜新生血管性疾病是一类高致盲性眼病,新生血管大量增生会引起牵拉性视网膜脱离、玻璃体出血、视网膜裂孔等病变导致视力下降或丧失,严重影响患者的生活质量。目前研究该类疾病较成熟的动物模型是 Smith 等^[11]建立的高氧诱导视网膜新生血管动物模型,该模型建模成功率较高,模型鼠视网膜新生血管增生于建模成功后 5 d 即小鼠生后 17 d 左右达到高峰^[12],增生反应一直延续到小鼠生后 21 d,以后逐渐消退,30 d 时视网膜血管形态基本稳定,接近正常。在本实验中,我们成功建立了高氧诱导视网膜新生血管模型,选择小鼠造模成功后 0 d、1 d、5 d、9 d、18 d (即生后 12 d、13 d、17 d、21 d、30 d) 这 5 个视网膜血管形态变化较显著的时间点来观察视网膜组织中 Radixin 基因和蛋白的动态表达变化,研究 Radixin 与视网膜新生血管形成的关系。

Radixin 是 ERM (Ezrin/Radixin/moesin) 蛋白家族成员之一^[13],它在多种真核细胞内表达。作为膜骨架连接蛋白,它可将肌动蛋白骨架与 CD43、CD44、细胞黏附分子及多种细胞膜通道和受体相连接^[14-15],参与了多种细胞生物活动。研究已表明, Radixin 在肿瘤进展过程中起到了重要作用,参与了肿瘤细胞的增生、迁移、浸润过程^[6-7],干扰 Radixin 基因表达,会抑制前列腺癌和胰腺癌细胞的增生和迁移。同时亦有研究表明, Radixin 还参与了血管内皮间屏障功能改变过程^[8-10]。以上研究表明, Radix-

$P_{21\text{ d}} = 0.000$)。高氧诱导组小鼠视网膜 Radixin 蛋白表达水平生后 13 d 较生后 12 d 增高,生后 17 d 较生后 13 d 和生后 21 d 均明显增高,差异均有统计学意义 ($P_{13\text{ d vs. } 12\text{ d}} = 0.000, P_{17\text{ d vs. } 13\text{ d}} = 0.000, P_{17\text{ d vs. } 21\text{ d}} = 0.000$)。正常对照组各时间点 Radixin 蛋白表达总体稳定在较低水平,生后 17 d 表达稍高。两组生后 30 d 时 Radixin 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P_{30\text{ d}} = 0.082$;见表 1)。

in 至少与细胞增生、迁移有关,而血管内皮细胞的增生、迁移又是视网膜新生血管形成过程的重要环节,所以我们推测, Radixin 参与了视网膜新生血管的形成。目前虽然相关研究甚少,但我们在前期的实验研究中已发现,高氧诱导视网膜新生血管模型鼠视网膜血管增生高峰期伴随着 Radixin 的高表达^[16],本实验结果也证实,在正常小鼠视网膜内 Radixin 的表达水平较低,而在高氧诱导组小鼠视网膜新生血管生成过程中 Radixin 的表达水平明显增高,同时视网膜新生血管增生高峰期 Radixin 基因和蛋白的表达水平也达最高, Radixin 的表达变化趋势与视网膜新生血管增生和衰退趋势相一致。

虽然目前以血管内皮生长因子为靶目标治疗眼部新生血管性疾病取得了一定的效果,但是眼内新生血管的生成是多种因子相互作用的结果,如有研究表明氨基胍化合物 (aminoguanidine)、NADPH 氧化酶^[4-5]等因子也参与了眼内新生血管形成过程。由此可知单纯阻断某单一因子或受体并不能彻底抑制新生血管的生长。本研究发现, Radixin 在视网膜新生血管生成过程中高表达,在视网膜新生血管生成高峰期表达水平最高,鉴于 Radixin 的上述作用及表达情况,通过靶向干扰 Radixin 的基因表达或者抑制其活性对视网膜新生血管的形成和发展可能具有重要影响。 Radixin 有望成为临床治疗新生血管性视网膜疾病的新靶点,但其确切的作用机制尚需进一步研究证实。

浓度的增加而增强^[12-13]。因此推测 EAM 中所含的肝细胞生长因子及受体等细胞因子具有抑制 TGF β 1 mRNA 表达,减少结缔组织生长因子表达的作用^[14-15]。也有学者认为 EAM 中的生物活性因子通过单一或网络的作用促进基质金属蛋白酶的合成和分泌,从而使 MMP 降解细胞外基质的作用增强,起到抑制术后纤维化、瘢痕形成的作用。于是猜测,EAM 可能通过其中的活性成分对影响成纤维细胞表达的各种细胞因子发挥调节作用,同时通过抑制转化生长因子的活性,调节成纤维细胞的分化和表达。

综上所述,EAM 可以通过抑制大鼠碱烧伤后角膜炎症细胞浸润,抑制成纤维细胞增殖,抑制大鼠碱烧伤后角膜瘢痕形成以及新生血管形成。EAM 有可能应用于临床角膜化学烧伤患者,但是其作用机理以及临床应用的最佳浓度和作用时间有待进一步开展基础研究和临床试验研究。

参考文献

- 1 Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy [J]. *Surv Ophthalmol*, 1997, 41 (4): 275-313.
- 2 Choi JA, Jin HJ, Jung S, Yang E, Choi JS, Chung SH, *et al*. Effects of amniotic membrane suspension in human corneal wound healing *in vitro* [J]. *Mol Vis*, 2009, 15 (5): 2230-2238.
- 3 曾波,周雄,周和政. 角膜溃疡多层羊膜移植术后早期组织病理学与临床分析[J]. 眼科新进展, 2012, 32 (8): 750-752.
- 4 Baradaran-Rafii A, Aghayan HR, Arjmand B, Javadi MA. Amniotic membrane transplantation [J]. *J Ophthalmic Vis Res*, 2008, 2 (1): 58-75.

- 5 Tseng SC, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction [J]. *Am J Ophthalmol*, 1997, 124 (6): 765-774.
- 6 吴艳,杨丽萍,薛春燕,黄振平,石尧. 激光共焦显微镜对近视激光术后 haze 结构的研究[J]. 眼科新进展, 2013, 33 (3): 240-242.
- 7 Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy [J]. *Surv Ophthalmol*, 1997, 41 (4): 275-313.
- 8 陈西,晏晓明,吴海荣,荣蓓. 羊膜移植治疗大鼠角膜碱烧伤后羊膜转归的研究[J]. 中华眼科杂志, 2012, 48 (1): 27-32.
- 9 Rauf S, Saw VP. Serum eye drops, amniotic membrane and limbal epithelial stem cells-tools in the treatment of ocular surface disease [J]. *Cell Tissue Bank*, 2010, 11 (1): 13-27.
- 10 Zhang S, He H, Day AJ, Tseng SC. Constitutive expression of inter- α -inhibitor (I α I) family proteins and tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) by human amniotic membrane epithelial and stromal cells supporting formation of the heavy chain-hyaluronan (HC-HA) complex [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (15): 12433-12444.
- 11 Kim TH, Lee DY, Rho JH, Rho SH, Yoo KW, Ahn HB, *et al*. Application of newly developed amniotic membrane ointment for photorefractive keratectomy in rabbits [J]. *Ophthalmic Res*, 2006, 38 (2): 58-61.
- 12 Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane [J]. *Curr Eye Res*, 2000, 20 (3): 173-177.
- 13 Schulze U, Hampel U, Sel S, Goecke TW, Thäle V, Garreis F, *et al*. Fresh and cryopreserved amniotic membrane secrete the trefoil factor family peptide 3 that is well known to promote wound healing [J]. *Histochem Cell Biol*, 2012, 138 (2): 243-250.
- 14 Tseng SCG, Espana EM, Kawakita T, Di Pascuale MA, Li W, He H, *et al*. How does amniotic membrane work [J]? *Ocul Surf*, 2004, 2 (3): 177-187.
- 15 Tall EG, Bernstein AM, Oliver N, Gray JL, Masur SKI. TGF- β -stimulated CTGF production enhanced by collagen and associated with biogenesis of a novel 31-kDa CTGF form in human corneal fibroblasts [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51 (10): 5002-5011.

(上接第 221 页)

参考文献

- 1 Gariano RF, Gardner TW. Retinal angiogenesis in development and disease [J]. *Nature*, 2005, 438 (7070): 960-966.
- 2 Zou H, Otani A, Oishi A, Yodoi Y, Kameda T, Kojima H, *et al*. Bone marrow-derived cells are differentially involved in pathological and physiological retinal angiogenesis in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391 (2): 1268-1273.
- 3 Hu J, Song X, He YQ, Freeman C, Parish CR, Yuan L, *et al*. Heparanase and vascular endothelial growth factor expression is increased in hypoxia-induced retinal neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53 (11): 6810-6817.
- 4 Fu ZJ, Li SY, Kociok N, Wong D, Chung SK, Lo AC. Effects of aminoguanidine on retinal apoptosis in mice with oxygen-induced retinopathy [J]. *Int J Ophthalmol*, 2013, 6 (4): 436-441.
- 5 Chan EC, van Wijngaarden P, Liu GS, Jiang F, Peshavariya H, Dusting GJ. Involvement of nox2 NADPH oxidase in retinal neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54 (12): 7061-7067.
- 6 Valderrama F, Thevapala S, Ridley AJ. Radixin regulates cell migration and cell-cell adhesion through Rac1 [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125 (14): 3310-3319.
- 7 Chen SD, Song MM, Zhong ZQ, Li N, Wang PL, Cheng S, *et al*. Knockdown of radixin by RNA interference suppresses the growth of human pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13 (3): 753-759.
- 8 Adyshev DM, Moldobaeva NK, Elangovan VR, Garcia JG, Dudek SM. Differential involvement of ezrin/radixin/moesin proteins in sphingosine 1-phosphate-induced human pulmonary endothelial

- cell barrier enhancement [J]. *Cell Signal*, 2011, 23 (12): 2086-2096.
- 9 Koss M, Pfeiffer GR 2nd, Wang Y, Thomas ST, Yerukhimovich M, Gaarde WA, *et al*. Ezrin/radixin/moesin proteins are phosphorylated by TNF- α and modulate permeability increases in human pulmonary microvascular endothelial cells [J]. *J Immunol*, 2006, 176 (2): 1218-1227.
- 10 Guo X, Wang L, Chen B, Li Q, Wang J, Zhao M, *et al*. ERM protein moesin is phosphorylated by advanced glycation end products and modulates endothelial permeability [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297 (1): 238-246.
- 11 Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, *et al*. Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35 (1): 101-111.
- 12 闫妍,原公强,董晓光,陈蕊,郑丽. Evans 蓝灌注血管造影对改良型高氧诱导小鼠视网膜新生血管形态观察 [J]. 眼科新进展, 2007, 27 (4): 658-661.
- 13 Diakowski W, Grzybek M, Sikorski AF. Protein 4. 1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4. 1/FERM superfamily [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2006, 44 (4): 231-248.
- 14 Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3 (8): 586-599.
- 15 Tsukita S, Yonemura S. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (49): 34507-34510.
- 16 Yang X, Dong XG, Jia CK, Wang YQ. Profiling of genes associated with the murine model of oxygen induced retinopathy [J]. *Mol Vis*, 2013, 19: 775-788.