

引文格式: 张敏, 储三军, 曾繁星, 徐海峰. Bevacizumab 对视网膜色素上皮细胞纤维化相关因子表达的影响[J]. 眼科新进展, 2014, 34 (4): 318-321. doi: 10.13389/j.cnki.rao.2014.0086

【实验研究】

Bevacizumab 对视网膜色素上皮细胞纤维化相关因子表达的影响[△]

张敏 储三军 曾繁星 徐海峰

作者简介: 张敏, 女, 1987 年 4 月出生, 山东德州人, 硕士。研究方向: 眼底病。联系电话: 18765979700; E-mail: zm4126067@163.com

About ZHANG Min: Female, born in April, 1987. Master degree. Tel: 18765979700; E-mail: zm4126067@163.com

收稿日期: 2013-11-25

修回日期: 2013-12-13

本文编辑: 董建军

△基金项目: 青岛市科技计划项目 (编号: 13-1-3-69-nsh)

作者单位: 250022 山东省济南市, 济南大学, 山东省医学科学院医学与生命科学学院, 山东省眼科研究所 (张敏); 266071 山东省青岛市, 山东省眼科研究所青岛眼科医院 (张敏, 储三军, 曾繁星, 徐海峰)

通讯作者: 徐海峰, E-mail: chxhf@126.com

Received date: Nov 25, 2013

Accepted date: Dec 13, 2013

Foundation item: Science and Technology Project of Qingdao (No: 13-1-3-69-nsh)

From the School of Medicine and Life Science, University of Jinan, Shandong Academy of Medical Sciences, Shandong Eye Institute (ZHANG Min), Jinan 250022, Shandong Province, China; Qingdao Eye Hospital, Shandong Eye Institute (ZHANG Min, CHU San-Jun, ZENG Fan-Xing, XU Hai-Feng) Qingdao 266071, Shandong Province, China

Responsible author: XU Hai-Feng, E-mail: chxhf@126.com

Effects of Bevacizumab on fibrosis associated cytokines expression in human retinal pigment epithelial cells

ZHANG Min, CHU San-Jun, ZENG Fan-Xing, XU Hai-Feng

【Key words】 Bevacizumab; retinal pigment epithelial cells; fibrosis; cytokines

【Abstract】 **Objective** To evaluate the effects of Bevacizumab on expressions of cytokines associated with fibrosis in gene and protein levels in human retinal pigment epithelial cells, and further investigate the possible role of Bevacizumab in the process of new vascular fibrosis. **Methods** Human retinal pigment epithelial cells were incubated in DMEM/F12 medium containing 0.25 g · L⁻¹ Bevacizumab. Cells were divided into 5 groups according to incubation period: 0 hour, 6 hours, 12 hours, 24 hours and 48 hours, 0 hour served as control. The cells and supernatant were collected at different time points. The mRNA and protein levels of connective tissue growth factor (CTGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor-β2 (TGF-β2) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) were evaluated by RT-PCR and ELISA or Western blotting, respectively. **Results** The mRNA levels at 6 hours, 12 hours, 24 hours and 48 hours were as following, CTGF: 1.694 ± 0.160, 1.994 ± 0.221, 1.733 ± 0.057, 1.397 ± 0.075; bFGF: 1.720 ± 0.068, 2.144 ± 0.080, 1.893 ± 0.068, 1.372 ± 0.076; TGF-β2: 1.356 ± 0.070, 1.737 ± 0.515, 1.576 ± 0.098, 1.439 ± 0.050; MMP-2: 1.414 ± 0.115, 1.644 ± 0.094, 1.435 ± 0.075, 1.285 ± 0.024. Compared with control group, the mRNA levels were increased at all time points after incubation with Bevacizumab (all *P* < 0.05). ELISA and Western blotting analysis showed that the protein levels of CTGF, bFGF, TGF-β2 and MMP-2 increased after treatment with Bevacizumab and the differences were statistically significant (all *P* < 0.05). The protein concentrations of each group were as following, CTGF: (31.949 ± 0.388) μg · L⁻¹, (48.697 ± 0.863) μg · L⁻¹, (56.847 ± 0.499) μg · L⁻¹, (51.753 ± 1.395) μg · L⁻¹, (43.085 ± 1.240) μg · L⁻¹; bFGF: (26.66 ± 1.36) μg · L⁻¹, (46.529 ± 3.297) μg · L⁻¹, (55.883 ± 1.705) μg · L⁻¹, (47.937 ± 1.303) μg · L⁻¹, (36.894 ± 2.532) μg · L⁻¹; TGF-β2: (26.982 ± 2.404) μg · L⁻¹, (35.452 ± 1.360) μg · L⁻¹, (46.787 ± 0.896) μg · L⁻¹, (43.683 ± 1.630) μg · L⁻¹, (38.008 ± 1.110) μg · L⁻¹. MMP-2 protein levels at 6 hours, 12 hours, 24 hours and 48 hours after incubation with Bevacizumab were all increased, the differences were statistically significant among different groups (*F* = 2620.429, *P* = 0.000). **Conclusion** Bevacizumab can up-regulate both mRNA and protein expression of CTGF, bFGF, TGF-β2 and MMP-2 in human retinal pigment epithelial cells,

which indicates that Bevacizumab may have pro-fibrotic effects.

[Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34 (4): 318-321]

- Li Y, Jia Y, Zhou J, Huang K. Effect of methionine sulfoxide reductase B1 silencing on high-glucose-induced apoptosis of human lens epithelial cells [J]. *Life Sci*, 2013, 92 (3): 193-201.
- Kumari SS, Eswaramoorthy S, Mathias RT, Varadaraj K. Unique and analogous functions of aquaporin 0 for fiber cell architecture and ocular lens transparency. *Biochimica et biophysica acta* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812 (9): 1089-1097.
- Wang Z, Wang Z. Effects of rapamycin on expression of Bcl-2 and Bax in human lens epithelial cells and cell cycle in rats [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2011, 31 (4): 555-559.
- Korkmaz D, Bastu E, Dural O, Yasa C, Yavuz E, Buyru F. Apoptosis through regulation of Bcl-2, Bax and Mcl-1 expressions in endometriotic cyst lesions and the endometrium of women with moderate to severe endometriosis [J]. *J Obstet Gynaecol*, 2013, 33 (7): 725-728.
- Ou Y, Yuan Z, Li K, Yang X. Phycocyanin may suppress D-galactose-induced human lens epithelial cell apoptosis through mitochondrial and unfolded protein response pathways [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 215 (1): 25-30.

【关键词】 Bevacizumab; 视网膜色素上皮细胞; 纤维化; 细胞因子

【摘要】 目的 观察 Bevacizumab 对人视网膜色素上皮细胞纤维化相关因子基因及蛋白表达的影响, 探讨 Bevacizumab 在新生血管纤维化中的作用。**方法** 用含终浓度 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Bevacizumab 的 DMED/F12 培养液培养 ARPE-19 细胞, 按 Bevacizumab 处理的时间分为 0 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 共 5 组, 0 h 为对照组。不同时间点收集细胞及上清。用逆转录聚合酶链反应检测 ARPE-19 细胞中结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、转化生长因子- β_2 (transforming growth factor β_2 , TGF- β_2) 和基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase 2, MMP-2) 的 mRNA 相对表达量。采用 ELISA 检测上清中 CTGF、bFGF 和 TGF- β_2 的蛋白浓度, 应用免疫蛋白印迹法 (Western blotting) 检测 MMP-2 蛋白的表达。**结果** Bevacizumab 作用后 6 h、12 h、24 h 和 48 h, CTGF、bFGF、TGF- β_2 及 MMP-2 的 mRNA 相对表达量分别为 CTGF: 1.694 ± 0.160 、 1.994 ± 0.221 、 1.733 ± 0.057 、 1.397 ± 0.075 , bFGF: 1.720 ± 0.068 、 2.144 ± 0.080 、 1.893 ± 0.068 、 1.372 ± 0.076 , TGF- β_2 : 1.356 ± 0.070 、 1.737 ± 0.515 、 1.576 ± 0.098 、 1.439 ± 0.050 , MMP-2: 1.414 ± 0.115 、 1.644 ± 0.094 、 1.435 ± 0.075 、 1.285 ± 0.024 , 与对照组相比均升高, 差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$)。ELISA 结果显示 Bevacizumab 作用后 6 h、12 h、24 h 和 48 h, CTGF、bFGF、TGF- β_2 蛋白的表达量与对照组相比均升高, 差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$); 对照组及各时间组蛋白浓度分别为 CTGF: $(31.949 \pm 0.388) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(48.697 \pm 0.863) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(56.847 \pm 0.499) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(51.753 \pm 1.395) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(43.085 \pm 1.240) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, bFGF: $(26.660 \pm 1.360) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(46.529 \pm 3.297) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(55.883 \pm 1.705) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(47.937 \pm 1.303) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(36.894 \pm 2.532) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, TGF- β_2 : $(26.982 \pm 2.404) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(35.452 \pm 1.360) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(46.787 \pm 0.896) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(43.683 \pm 1.630) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(38.008 \pm 1.110) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Western blotting 结果显示, Bevacizumab 处理后 6 h、12 h、24 h、48 h MMP-2 蛋白含量升高, 组间比较差异有统计学意义 ($F = 2620.429$, $P = 0.000$)。**结论** Bevacizumab 能够上调人 RPE 细胞中 CTGF、bFGF、TGF- β_2 及 MMP-2 的表达, 可能有促纤维化形成的作用。

[眼科新进展, 2014, 34 (4): 318-321]

Bevacizumab 是人源化抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的 IgG 单克隆抗体, 被美国食品药品监督管理局批准用于治疗结肠癌, 现在被广泛用于脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 性疾病的治疗^[1], 其疗效及安全性均得到确认。然而, 研究发现湿性年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 患者接受抗 VEGF 治疗后可发生严重的黄斑部视网膜下纤维膜增殖, 这些患者均无明显的黄斑部视网膜下出血, 因而排除了局部出血导致纤维化的可能^[2]。视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞能够分泌多种细胞因子, 参与多种病理改变的过程, 在 CNV 的发生发展中发挥着重要作用。其分泌的结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、转化生长因子- β_2 (transforming growth factor β_2 , TGF- β_2) 和基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase 2, MMP-2) 能够促进纤维化发生^[3]。Bevacizumab 治疗后黄斑下纤维膜的发生机制不清, 是否与 RPE 细胞功能改变有关尚不得而知。因此, 本研究将在体外观察 Bevacizumab 是否影响 RPE 细胞表达上述与纤维化相关的细胞因子, 从而探究 Bevacizumab 促纤维化的发生机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人 RPE 细胞系 ARPE-19 (美国 ATCC 公司, CRL-2302), DMEM/F12 培养基 (美国 Invitrogen 公司), 胎牛血清 (美国 Invitrogen 公司), 胰蛋白酶 (美国 Invitrogen 公司), 总 RNA 提取试剂盒 (美国 Macherey-nagel 公司), 反转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司), Real Master Mix (SYBR Green) 试剂盒 (北京天根生化科技有限公司), 人 CTGF、bFGF、TGF- β_2

ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司)。MMP-2 抗体 (兔抗人抗体, 美国 Abcam 公司), 羊抗兔荧光二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 ARPE-19 细胞按说明复苏、培养 (DMEM/F12 培养液含体积分数 10% 胎牛血清、 $100 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素、 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素, 于 37°C 、含体积分数 5% CO_2 培养箱内培养)、传代。细胞达足够数量后以每孔 400×10^3 接种于 6 孔板。按 Bevacizumab 处理的时间分为 0 h、6 h、12 h、24 h 和 48 h 5 组, 0 h 为对照组。Bevacizumab 终浓度为 $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.2 RT-PCR 检测 CTGF、bFGF、TGF- β_2 及 MMP-2 的 mRNA 表达水平 在不同时间点收集细胞, 按照试剂盒说明提取各组细胞 mRNA。根据反转录试剂盒说明书对提取的 VEGF、CTGF、bFGF、TGF- β_2 及 MMP-2 的 mRNA 进行反转录。引物由大连宝生物有限公司设计并合成, 引物序列见表 1。PCR 反应条件: 95°C 预变性 10 s, 95°C 变性 15 s, 60°C 退火 60 s, 共 50 个循环。获取各组样品的标准曲线, 以 GAPDH 为内参分析其 C_t 值。根据公式 $2^{-(\Delta C_t \text{ GAPDH} - \Delta C_t \text{ 样品})}$ 算出待测样品相对值。实验重复 3 次。

1.2.3 ELISA 法检测 CTGF、bFGF、TGF- β_2 蛋白表达 不同时间点收集细胞培养的上清。高速冷冻离心机 (温度设定为 4°C) $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 小心留取上清液, 于 4°C 保存, 按照 R&D 公司提供的试剂盒说明书进行操作。

1.2.4 Western blotting 测定 MMP-2 蛋白的表达 不同时间点收集细胞, 提取各组细胞总蛋白。BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 按每个样本 $50 \mu\text{g}$ 总蛋白上样, $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 4°C , 100 mA 电转膜 3 h, $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉室

温封闭 1 h, 滴加 MMP-2 一抗 (浓度为 1 : 800) 4 °C 过夜。第 2 天滴加辣根过氧化物酶标记的二抗 (山羊抗兔 IgG, 浓度为 1 : 3000) 室温孵育 1 h。免疫反应结束后用 Western blotting 荧光剂发光、显影。Gel-
Del 凝胶成像系统照相, 应用 Image J 图像分析软件, 通过目的基因与内参条带的吸光度值比值进行目的蛋白的相对含量分析。

表 1 RT-PCR SYBR Green 法引物序列

Table 1 Primer sequence of SYBR Green RT-PCR

Gene name	Primer (5' -3')
CTGF	F: CTTCGCAACTGACCTGGAA R: AAAGCTCAAACCTGATAGG CTTCGA
bFGF	F: CTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATG R: CCAGTTCGTTTCACTGCCACA
TGF-β ₂	F: CCGACTCGCCACAGCTGCT TA R: GTTGATGTCCACTTGCAGTG TGTTA
MMP-2	F: GCTCCACCACCTACAACCTTTGAGAA R: TGTATAGGATGTGCCCTGG AA
GAPDH	F: ATGCTGCCGCTGAGTACCT R: AGCCCGAGCCTTCTCAT

1.3 统计学方法 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Bonferroni 检验对 RT-PCR、ELISA 和 Western blotting 检测所得的 CTGF、bFGF、TGF-β₂、MMP-2 的 mRNA 和蛋白相对表达量进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测不同时间点 CTGF、bFGF、TGF-β₂ 和 MMP-2 的 mRNA 表达 CTGF、bFGF、TGF-β₂ 和 MMP-2 的 mRNA 表达量在对照组、6 h 组、12 h 组、24 h 组和 48 h 组五组间总体比较差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.01$)。6 h 组、12 h 组、24 h 组和 48 h 组的 CTGF、bFGF、TGF-β₂ 和 MMP-2 的 mRNA 表达量高于对照组, 差异均有统计学意义 (均为 $P = 0.000$, 见表 2)。

表 2 Bevacizumab 对 ARPE-19 细胞 CTGF、bFGF、TGF-β₂ 和 MMP-2 的 mRNA 表达的影响

Table 2 Effects of Bevacizumab on expressions of CTGF, bFGF, TGF-β₂ and MMP-2 mRNA in ARPE-19 cells

Group	CTGF	bFGF	TGF-β ₂	MMP-2
Control	1.064 ± 0.050	1.057 ± 0.029	1.055 ± 0.040	1.001 ± 0.089
6 hours	1.694 ± 0.160 **	1.720 ± 0.068 **	1.356 ± 0.070 *	1.414 ± 0.115 **
12 hours	1.994 ± 0.221 **	2.144 ± 0.080 **	1.737 ± 0.515 **	1.644 ± 0.094 **
24 hours	1.733 ± 0.057 **	1.893 ± 0.068 **	1.576 ± 0.098 **	1.435 ± 0.075 **
48 hours	1.397 ± 0.075 *	1.372 ± 0.076 **	1.439 ± 0.050 **	1.285 ± 0.024 *
F	22.144	123.584	23.616	23.048
P	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 ELISA 检测 Bevacizumab 对 ARPE-19 细胞 CTGF、bFGF、TGF-β₂ 蛋白表达的影响 CTGF、bFGF、TGF-β₂ 蛋白表达量在对照组、6 h 组、12 h 组、24

h 组和 48 h 组 5 组间总体比较差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.01$)。6 h 组、12 h 组、24 h 组和 48 h 组的 CTGF、bFGF、TGF-β₂ 的蛋白表达量高于对照组, 差异均有统计学意义 (表 3)。

2.3 Western blotting 检测各组 MMP-2 蛋白表达

Bevacizumab 处理 6 h、12 h、24 h 和 48 h 后, MMP-2 蛋白相对表达量分别为 2.18 ± 0.03 、 2.81 ± 0.01 、 2.20 ± 0.01 和 1.80 ± 0.01 , 均较对照组 (1.46 ± 0.03) 升高, 差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.01$; 见图 1)。

表 3 Bevacizumab 对 ARPE-19 细胞 CTGF、bFGF、TGF-β₂ 蛋白表达的影响

Table 3 Effects of Bevacizumab on expressions of CTGF, bFGF and TGF-β₂ protein in ARPE-19 cells

Group	CTGF	bFGF	TGF-β ₂
Control	31.949 ± 0.388	26.660 ± 1.360	26.982 ± 2.404
6 hours	48.697 ± 0.863 **	46.529 ± 3.297 **	35.452 ± 1.360 **
12 hours	56.847 ± 0.499 **	55.883 ± 1.705 **	46.787 ± 0.896 **
24 hours	51.753 ± 1.395 **	47.937 ± 1.303 **	43.683 ± 1.630 **
48 hours	43.085 ± 1.240 **	36.894 ± 2.532 **	38.008 ± 1.110 **
F	293.964	80.099	72.194
P	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Figure 1 Changes of MMP-2 protein expression in ARPE-19 cells detected by Western blot at different time points after incubation with Bevacizumab 免疫印迹法检测 Bevacizumab 处理不同时间后 ARPE-19 细胞中 MMP-2 蛋白表达的变化

3 讨论

玻璃体腔注射 VEGF 单克隆抗体被越来越多地用于眼部新生血管性疾病的治疗^[4-7]。Bevacizumab 可以与 VEGF-A 所有亚型结合, 使内源性的 VEGF 失去活性, 有效减少血管渗漏、使新生血管萎缩。然而随着抗 VEGF 制剂的广泛应用及随访时间延长, 人们发现抗 VEGF 治疗后无论是 CNV 还是视网膜新生血管均可发生严重的纤维化, 接受玻璃体腔注射 Bevacizumab 后, AMD 的患者可发生纤维膜增殖, 增生性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 患者可发生新生血管纤维化而导致牵拉性视网膜脱离^[8-9]。虽然纤维化是新生血管的必然结局, 但抗 VEGF 治疗与纤维化的因果关系尚不清楚。在糖尿病患者的纤维血管膜中 CTGF、bFGF、TGF-β₂ 以及 MMP-2 的表达量是明显升高的^[10-13]。我们推测这些因子可能也参与 AMD 中 CNV 纤维化

的形成,因此本研究监测了 Bavacizumab 对 RPE 细胞的影响,结果表明 Bevacizumab 可改变 RPE 细胞纤维化相关细胞因子的表达,上调 CTGF、bFGF、TGF- β_2 、MMP-2 的表达水平,从而促进纤维化形成。

CTGF 是目前有关纤维化研究最多的因子之一,研究发现多种组织细胞都可表达 CTGF,而且在组织过度纤维化、创伤修复、血管形成、肿瘤生长、发育分化等方面有着重要的作用^[4],Van Geest 等^[8]发现 PDR 患者玻璃体腔注射 Bevacizumab 后 CTGF/VEGF 的比值升高,认为 CTGF 是促纤维化形成的重要因子,将来有可能成为新生血管治疗的新的靶点。我们的研究结果也显示了 Bevacizumab 可以上调 CTGF 的表达,这一结果进一步说明了抗 VEGF 治疗同时采取抗纤维化治疗的必要性。TGF- β_2 是转化 TGF- β 中一员,是 CTGF 的上游信号,对单核细胞和成纤维细胞有趋化作用,促进炎症反应和纤维形成,并可以刺激成纤维细胞分泌纤连蛋白参与细胞外基质的形成,Forooghian 等^[15]发现糖尿病视网膜病变的患者在玻璃体内注射抗 VEGF 药物后玻璃体腔中 TGF- β_2 的含量会增加。我们的体外实验研究也证实了 Bevacizumab 可以促进 RPE 细胞分泌 TGF- β_2 ,与上述结果相符。

MMP-2 与 bFGF 也是与纤维化密切相关的细胞因子。研究证实 PDR 患者视网膜前膜中 MMP-2 大量分布于视网膜纤维血管膜的 RPE 细胞和神经胶质细胞中,说明 MMP-2 可能参与了纤维血管膜的形成^[16]。MMP-2 可以降解明胶、IV 型胶原、V 型胶原、V II 型胶原、纤维连接蛋白和弹性蛋白,使 RPE 细胞等失去了原有的生存环境,在异常环境中,RPE 细胞可以产生新的细胞外基质,进而诱导纤维血管膜的形成。bFGF 可以调节细胞生长与分化,促进细胞分裂使其大量增生并可诱导血管内皮细胞上调 CTGF 的表达。在增生性玻璃体视网膜病变中 bFGF 的表达量也明显增加^[10]。玻璃体腔注射抗 VEGF 药物后新生血管膜纤维化是否有 bFGF 和 MMP-2 的参与尚未见报道。本研究的体外实验结果表明 Bevacizumab 使得 RPE 细胞中 bFGF 和 MMP-2 的 mRNA 及蛋白表达均增加,证实了 Bevacizumab 也有可能通过上调 bFGF 和 MMP-2 的表达参与纤维化的形成。

本研究观察了 Bevacizumab 对人 RPE 细胞分泌的纤维化相关因子表达的影响,证明 Bevacizumab 有促纤维化形成的作用,而这一作用是通过调控一系

列细胞因子的表达来实现的。但这些因子之间的具体相互作用以及是否还有其他因子,如炎症因子的参与,都有待进一步深入研究。

参考文献

- 1 Group CR, Martin DF, Maguire MG, Ying GS, Grunwald JE, Fine SL, et al. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364 (20): 1897-1908.
- 2 Hwang JC, Del Priore LV, Freund KB, Chang S, Iranmanesh R. Development of subretinal fibrosis after anti-VEGF treatment in neovascular age-related macular degeneration [J]. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*, 2011, 42 (1): 6-11.
- 3 戎慧丰, 颜华. 增生型糖尿病视网膜病变纤维化相关因子的研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29 (5): 473-476.
- 4 Martin DF, Maguire MG, Fine SL, Ying GS, Jaffe GJ, Grunwald JE, et al. Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results [J]. *Ophthalmology*, 2012, 119 (7): 1388-1398.
- 5 Lynch SS, Cheng CM. Bevacizumab for neovascular ocular diseases [J]. *Ann Pharmacother*, 2007, 41 (4): 614-625.
- 6 Erdum M, Fotan Y. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2007, 245 (10): 1577-1579.
- 7 Live ME, Domig D, Wolf-Schnurrbusch U, Wolf S, Sarra GM. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of neovascular glaucoma [J]. *Am J Ophthalmol*, 2006, 142 (6): 1054-1056.
- 8 Van Geest RJ, Lesnik-Oberstein SY, Tan HS, Mura M, Goldschmeding R, Van Noorden CJ, et al. A shift in the balance of vascular endothelial growth factor and connective tissue growth factor by bevacizumab causes the angiofibrotic switch in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96 (4): 587-590.
- 9 Heier JS. Pathology beyond neovascularization: new targets in age-related macular degeneration [J]. *Retina*, 2009, 29 (6): 39-41.
- 10 Hueber A, Wiedemann P, Esser P, Heimann K. Basic fibroblast growth factor mRNA, bFGF peptide and FGF receptor in epiretinal membranes of intraocular proliferative disorders (PVR and PDR) [J]. *Int Ophthalmol*, 1996, 20 (6): 345-350.
- 11 Pattwell DM, Stappeler T, Sheridan C, Heimann H, Gibran SK, Wong D, et al. Fibrous membranes in diabetic retinopathy and bevacizumab [J]. *Retina*, 2010, 30 (7): 1012-1016.
- 12 Kubota T, Morita H, Tou N, Nitta N, Tawara A, Satoh H, et al. Histology of fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy after intravitreal injection of bevacizumab [J]. *Retina*, 2010, 30 (3): 468-472.
- 13 Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112 (12): 1776-1784.
- 14 Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy [J]. *Matrix Biol*, 2002, 21 (6): 473-482.
- 15 Forooghian F, Kertes PJ, Eng KT, Agron E, Chew EY. Alterations in the intraocular cytokine milieu after intravitreal bevacizumab [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51 (5): 2388-2392.
- 16 Noda K, Ishida S, Inoue M, Obata KI, Oguchi Y, Okada Y, et al. Production and activation of matrix metalloproteinase-2 in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (5): 2163-2170.