

### 【实验研究】

储三军 王敏 徐海峰

迄今为止,抗 VEGF 治疗后新生血管纤维化的机制尚不十分明确。早有研究报道,炎症因子,如白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 以及肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等在血管纤维化过程中起重要作用<sup>[9-14]</sup>。抗 VEGF 制剂应用后新生血管纤维化过程中是否有炎症因子的参

与,其作用机制如何尚不清楚。本研究通过检测正常氧含量及缺氧两种条件下贝伐单抗(bevacizumab,商品名 Avastin,抗 VEGF 制剂之一)对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVEC)纤维化相关炎症因子的影响,以进一步明确贝伐单抗治疗后新生血管纤维化的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 HUVEC 为本实验室保存,DMEM/F-12 培养基(美国 Invitrogen 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),注射用青霉素钠(哈尔滨哈药集团制药总厂),注射用硫酸链霉素(山东鲁抗医药股份有限公司),贝伐单抗(美国 Genentech 公司),六水合氯化钴(美国 Sigma 公司),总 RNA 提取试剂盒(德国 Macherey Nagel 公司),反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司),RealMasterMix (SYBR Green)试剂盒(北京天根生化科技有限公司),ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与实验分组 在 37℃、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的孵育箱中进行细胞培养,选用含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基,其中加入 100 × 10<sup>3</sup> U · L<sup>-1</sup> 青霉素和 0.1 g · L<sup>-1</sup> 链霉素培养 HUVEC。将细胞接种于 6 孔板,待细胞达 80% 融合时进行实验。分别在正常氧含量及缺氧条件下培养 HUVEC,采用 CoCl<sub>2</sub> (终浓度 200 μmol · L<sup>-1</sup>) 化学诱导法建立缺氧环境。两种条件下,均向含体积分数 2% 胎牛血清 DMEM/F-12 培养基中加入终浓度为 0.25 g · L<sup>-1</sup> 贝伐单抗,根据贝伐单抗处理时间的不同分为 0 h 组、6 h 组、12 h 组、24 h 组、48 h 组,0 h 为对照组,其他为实验组。

1.2.2 IL-1β、IL-6、IL-8 及 TNF-α 的 mRNA 表达检测 总 RNA 提取试剂盒提取各组 HUVEC 的 RNA,并在紫外分光光度计上测量样品在 260 nm 和 280 nm 的吸收值,确定 RNA 的浓度及纯度。然后按照反转录试剂盒说明进行反转录反应,尽快将 RNA 反转录为 cDNA。采用 ABI 7500 Real-Time PCR 系统,按 RealMasterMix (SYBR Green) 试剂盒说明书加入试剂进行 PCR 反应。反应条件:95℃ 预变性 10 s,95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 60 s,共 45 个循环。以 2<sup>-ΔΔCt</sup> (Ct 代表循环阈值) 表示基因的表达量。结果计算公式如下:(1) 相对量 = 2<sup>-ΔΔCt</sup>, ΔCt = 目的基因 Ct - 内参基因 Ct; (2) 实验组:对照组的相对量: 2<sup>-ΔΔCt</sup>, ΔΔCt = 实验组 ΔCt - 对照组 ΔCt。以 GAPDH 为内参,目的基因及内参基因引物序列见表 1。

1.2.3 IL-1β、IL-6、IL-8 及 TNF-α 的蛋白表达检测 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测各组纤维化相关炎症因子 IL-1β、IL-6、IL-8 及 TNF-α 的蛋白表达。将细胞接种于 6 孔板,按上述方法处理细胞。收集

各组细胞培养基,离心取上清液,然后按 ELISA 试剂盒说明操作。用酶标仪在 450 nm 波长下测量吸光度值,通过绘制标准曲线运算出个各炎症因子的测量值。

表 1 Real-time PCR SYBR Green 法引物序列  
Table 1 Sequence of primers used for real-time PCR

Target	Sequence of primer
GAPDH	Forward:5'-ATGCTGGCGCTGAGTACCT-3'
	Reverse:5'-AGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'
IL-1β	Forward:5'-CCTGTCTGCGTGTGAAAGA-3'
	Reverse:5'-GGGAAGTGGCAGACTCAA-3'
IL-6	Forward:5'-TGGCTGAAAAAGATGGATGCT-3'
	Reverse:5'-TCTGCACAGCTCTGGCTTGT-3'
IL-8	Forward:5'-TTGGCAGCCTTCCTGATTTC-3'
	Reverse:5'-TGGTCCACTCTCAATCACTCTCA-3'
TNF-α	Forward:5'-TGTAGCCCATGTTGTAGCAAACC-3'
	Reverse:5'-GAGGACCTGGGAGTAGATGAGCTA-3'

1.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验对所得的实验数据进行统计学分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测各组 IL-1β、IL-6、IL-8 及 TNF-α 的 mRNA 表达 正常氧含量条件下,与对照组比较各实验组纤维化相关炎症因子 IL-6 及 IL-8 的表达明显增加,差异均有统计学意义(均为 *P* < 0.05);与对照组比较 12 h 组、24 h 组、48 h 组纤维化相关炎症因子 IL-1β 及 TNF-α 的 mRNA 表达明显增加,差异均有统计学意义(均为 *P* < 0.05),6 h 组 IL-1β 及 TNF-α 的 mRNA 表达与对照组比较差异无统计学意义(见表 2)。缺氧条件下,与对照组比较各实验组纤维化相关炎症因子 IL-1β、IL-6、IL-8 及 TNF-α 的 mRNA 表达明显增加,差异均有统计学意义(均为 *P* < 0.05,见表 3)。

表 2 正常氧含量条件下贝伐单抗对 HUVEC 炎症因子 mRNA 表达的影响  
Table 2 Effects of bevacizumab on mRNA expressions of inflammatory mediators in HUVEC under normoxic conditions

( $\bar{x} \pm s$ )				
Group	IL-1β	IL-6	IL-8	TNF-α
0 h	1.001 ± 0.066	1.002 ± 0.067	1.003 ± 0.087	1.001 ± 0.034
6 h	1.138 ± 0.089	1.724 ± 0.067 *	1.705 ± 0.041 *	1.102 ± 0.069
12 h	1.453 ± 0.115 *	1.997 ± 0.057 *	2.496 ± 0.110 *	1.429 ± 0.049 *
24 h	1.696 ± 0.066 *	1.831 ± 0.060 *	2.860 ± 0.060 *	1.746 ± 0.071 *
48 h	1.507 ± 0.060 *	1.652 ± 0.031 *	2.263 ± 0.089 *	2.032 ± 0.061 *
<i>F</i>	35.978	129.541	240.909	163.989
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with 0 h group, \* *P* < 0.05

2.2 ELISA 法检测各组 IL-1β、IL-6、IL-8 及 TNF-α 的蛋白表达 正常氧含量条件下,与对照组比较各实验组纤维化相关炎症因子的蛋白表达增加,IL-1β 及 TNF-α 蛋白仅在 12 h 组、24 h 组、48 h 组差异有统计学意义(均为 *P* < 0.05),IL-6 及 IL-8 蛋白在 6 h

组、12 h 组、24 h 组、48 h 组与对照组相比差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ ; 见表 4)。缺氧条件下, 与对照组比较, 各实验组纤维化相关炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 及 TNF- $\alpha$  的蛋白表达明显增加, 差异均有统计学意义(均为  $P < 0.05$ ; 见表 5), 与 mRNA 表达结果相一致。

表 3 缺氧条件下贝伐单抗对 HUVEC 炎症因子 mRNA 表达的影响

Table 3 Effects of bevacizumab on mRNA expressions of inflammatory mediators in HUVEC under hypoxic conditions				
( $\bar{x} \pm s$ )				
Group	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$
0 h	1.001 $\pm$ 0.052	1.003 $\pm$ 0.076	1.002 $\pm$ 0.071	1.001 $\pm$ 0.048
6 h	1.505 $\pm$ 0.067 *	2.248 $\pm$ 0.077 *	2.029 $\pm$ 0.115 *	1.317 $\pm$ 0.066 *
12 h	2.027 $\pm$ 0.085 *	2.040 $\pm$ 0.083 *	3.453 $\pm$ 0.164 *	1.817 $\pm$ 0.072 *
24 h	1.841 $\pm$ 0.057 *	1.765 $\pm$ 0.078 *	2.948 $\pm$ 0.057 *	1.983 $\pm$ 0.047 *
48 h	1.599 $\pm$ 0.034 *	1.442 $\pm$ 0.070 *	2.617 $\pm$ 0.106 *	2.336 $\pm$ 0.043 *
F	121.071	123.376	221.861	268.753
P	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with 0 h group, \* $P < 0.05$

表 4 正常氧含量条件下贝伐单抗对 HUVEC 炎症因子蛋白表达的影响

Table 4 Effects of bevacizumab on protein expressions of inflammatory mediators in HUVEC under normoxic conditions				
( $\bar{x} \pm s, \rho/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )				
Group	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$
0 h	35.119 $\pm$ 2.006	38.077 $\pm$ 1.709	53.575 $\pm$ 2.591	18.361 $\pm$ 1.509
6 h	39.286 $\pm$ 2.689	46.132 $\pm$ 1.928 *	75.222 $\pm$ 1.843 *	20.934 $\pm$ 1.842
12 h	49.857 $\pm$ 2.562 *	67.444 $\pm$ 2.042 *	85.709 $\pm$ 2.713 *	26.489 $\pm$ 0.769 *
24 h	66.693 $\pm$ 1.455 *	55.351 $\pm$ 1.997 *	107.788 $\pm$ 2.908 *	35.039 $\pm$ 1.623 *
48 h	54.867 $\pm$ 2.785 *	43.354 $\pm$ 1.982 *	76.791 $\pm$ 3.804 *	47.992 $\pm$ 1.784 *
F	86.009	106.990	142.588	179.703
P	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with 0 h group, \* $P < 0.05$

表 5 缺氧条件下贝伐单抗对 HUVEC 炎症因子蛋白表达的影响

Table 5 Effects of bevacizumab on protein expressions of inflammatory mediators in HUVEC under hypoxic conditions				
( $\bar{x} \pm s, \rho/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )				
Group	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$
0 h	51.057 $\pm$ 1.377	53.061 $\pm$ 1.198	69.738 $\pm$ 3.964	22.025 $\pm$ 2.503
6 h	61.350 $\pm$ 2.039 *	90.307 $\pm$ 3.143 *	104.621 $\pm$ 1.956 *	29.090 $\pm$ 1.797 *
12 h	83.864 $\pm$ 3.395 *	79.854 $\pm$ 1.414 *	123.822 $\pm$ 3.635 *	35.255 $\pm$ 1.505 *
24 h	71.745 $\pm$ 1.518 *	65.875 $\pm$ 1.417 *	139.473 $\pm$ 2.861 *	45.077 $\pm$ 1.504 *
48 h	66.087 $\pm$ 1.373 *	59.406 $\pm$ 1.729 *	108.867 $\pm$ 3.538 *	61.916 $\pm$ 2.080 *
F	102.266	189.430	189.998	196.521
P	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with 0 h group, \* $P < 0.05$

3 讨论

新生血管性疾病对视力的影响既可因活动性新生血管产生的出血渗出而引起, 也可因新生血管萎缩后产生的纤维组织牵拉而引起, 以往的研究多集中在如何防止新生血管的生成, 而纤维化则被忽视。随着抗 VEGF 制剂的广泛应用, 如何在抑制新生血

管的同时减轻纤维化、取得新生血管性疾病更好的治疗效果显得日趋重要。有研究报道, 玻璃体内注射贝伐单抗后不仅可以阻滞 VEGF 的产生, 还可以改变细胞因子的水平<sup>[15-16]</sup>。Van Geest 等<sup>[17]</sup>发现糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)患者玻璃体内注射抗 VEGF 制剂后玻璃体内结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)与 VEGF 水平比值升高, 推测这种改变与纤维化发生有关。之前我们对促纤维化细胞因子 CTGF、转化生长因子- $\beta_2$ (transforming growth factor  $\beta_2$ , TGF- $\beta_2$ )、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases 2, MMP-2)等进行了检测, 结果表明缺氧条件下贝伐单抗可上调这些因子的表达, 玻璃体内注射贝伐单抗后纤维化的发生可能与上述因子的改变有关<sup>[18-19]</sup>。同时, 我们考虑到许多眼底疾病, 如增殖性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)、DR 及渗出性年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)等的发生与缺血、缺氧有关, 且均属于慢性炎症性疾病。因此, 本实验中我们分别在正常氧含量及缺氧两种条件下检测了贝伐单抗对 HUVEC 纤维化相关炎症因子的影响, 以明确抗 VEGF 治疗后纤维化过程是否有炎症因子的参与。结果表明无论在正常氧含量还是缺氧条件下贝伐单抗均能上调纤维化相关炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  的表达, 但不同条件下对炎症因子的影响略有不同, 贝伐单抗处理后上调的炎症因子可能参与了新生血管纤维化过程。

体外模拟 PVR 视网膜增殖膜收缩的实验中, IL-1 $\beta$ 具有调节作用<sup>[20]</sup>。IL-1 $\beta$ 还可启动内皮向间质转化, 诱导眼内视网膜前膜的形成<sup>[11,21]</sup>。TNF- $\alpha$ 作为一种促炎症因子, 通常作为一种潜在的免疫调节剂, 在新生血管形成及纤维素增生过程中起重要作用<sup>[22]</sup>。TNF- $\alpha$ 也是视网膜色素上皮细胞活化反应的主要调节因子, 包括细胞附着、延伸、趋化和迁移<sup>[13]</sup>。人的 PVR 玻璃体标本可检测到 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ <sup>[23-25]</sup>, 同时二者 mRNA 亦在视网膜前膜中有表达<sup>[26]</sup>。可见 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  有一定的促纤维化作用。但玻璃体内注射抗 VEGF 制剂后新生血管纤维化过程中是否有 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的参与尚未见报道。我们的研究中, 无论在正常氧含量还是缺氧条件下临床剂量的贝伐单抗均可上调 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  的表达, 只是不同条件下上调时间略有不同。通过本实验我们推测, 贝伐单抗引起的 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  增加可能参与了抗 VEGF 治疗后的新生血管纤维化过程, 并起到一定的促进作用。

本实验结果显示 IL-6 和 IL-8 的增加均呈先升高后下降趋势, 可见贝伐单抗对某些炎症因子的影响并不持久, 抗 VEGF 治疗后纤维化的严重程度可能与注射次数有关。我们推测在控制病情的情况下

尽可能减少注射次数,可能有助于降低新生血管纤维化的发生。另一方面,之前已有研究表明 IL-6 的表达可能与 IL-8 的表达相关<sup>[27-28]</sup>。玻璃体内注射贝伐单抗后眼内 VEGF 的急剧下降可造成 IL-6 的快速增加进而导致随后 IL-8 的增加<sup>[29]</sup>。我们在正常氧含量和缺氧条件下均检测到了 IL-6 及 IL-8 水平的提高,与之前研究结果一致。因此我们推测贝伐单抗可能先引起某些因子的改变,进而导致更多的其他因子的改变,从而引起一系列并发症的发生。

本实验在正常氧含量和缺氧两种条件下检测了贝伐单抗对 HUVEC 纤维化相关炎症因子的影响,结果表明,临床剂量的贝伐单抗处理 HUVEC 后纤维化相关炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  的表达均上调,只是不同炎症因子的上调时间略有不同,可见贝伐单抗对不同炎症因子的影响并不一致。另外,无论正常氧含量还是缺氧条件下贝伐单抗均影响了炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  的表达。因此,玻璃体内注射抗 VEGF 制剂不仅对眼内缺氧细胞有影响,对非缺氧细胞也有影响。玻璃体内注射抗 VEGF 制剂后的新生血管纤维化过程除有促纤维化细胞因子 CTGF、TGF- $\beta_2$ 、bFGF、MMP-2 的参与外<sup>[18]</sup>,炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  等也参与了此过程,炎症因子在促纤维化形成方面可能起到了一定的辅助作用。

## 参考文献

- Bloch SB, Lund-Andersen H, Sander B, Larsen M. Subfoveal fibrosis in eyes with neovascular age-related macular degeneration treated with intravitreal ranibizumab [J]. *Am J Ophthalmol*, 2013, 156 (1): 116-124.
- Heier JS. Pathology beyond neovascularization: New targets in age-related macular degeneration [J]. *Retina*, 2009, 29 (6): S39-S41.
- Hwang JC, Del Priore LV, Frund 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.
- Batman C, Ozdamar Y. The relation between bevacizumab injection and the formation of subretinal fibrosis in diabetic patients with panretinal photocoagulation [J]. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*, 2010, 41 (2): 190-195.
- 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 angioblastic switch in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96 (4): 587-590.
- Jonas JB, Schmidbauer M, Rensch F. Progression of tractional retinal detachment following intravitreal bevacizumab [J]. *Acta Ophthalmol*, 2009, 87 (5): 571-572.
- Arevalo JF, Maia M, Flynn HW Jr, Saravia M, Avery RL, Wu L, et al. Tractional retinal detachment following intravitreal bevacizumab (Avastin) in patients with severe proliferative diabetic retinopathy [J]. *Br J Ophthalmol*, 2008, 92 (2): 213-216.
- Krishnan R, Goverdhan S, Lochhead J. Intravitreal pegaptanib in severe proliferative diabetic retinopathy leading to the progression of tractional retinal detachment [J]. *Eye (Lond)*, 2009, 23 (5): 1238-1239.
- Sasaki M, Kashima M, Ito T, Watanabe A, Izumiyama N, Sano M, et al. Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1beta and TNF-alpha [J]. *Mediators In-*

- flamm, 2000, 9 (3-4): 155-160.
- Lho YM, Ha E, Cho CH, Song KS, Min BW, Bae KC, et al. Inflammatory cytokines are overexpressed in the subacromial bursa of frozen shoulder [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2013, 22 (5): 666-672.
- Lee JG, Ko MK, Kay EP. Endothelial mesenchymal transformation mediated by IL-1beta-induced FGF-2 in corneal endothelial cells [J]. *Exp Eye Res*, 2012, 95 (1): 35-39.
- Kauffman DJ, van Meurs JC, Mertens DA, Peperkamp E, Master C, Gerritsen ME, et al. Cytokines in vitreous humor; interleukin-6 is elevated in proliferative vitreoretinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35 (3): 900-906.
- Jin M, He S, Wörpel V, Ryan SJ, Hinton DR. Promotion of adhesion and migration of RPE cells to provisional extracellular matrices by TNF-alpha [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41 (13): 4324-4332.
- Ouyang X, Ghani A, Mehal WZ. Inflammasome biology in fibrogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832 (7): 979-988.
- 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.
- Arimura N, Otsuka H, Yamakiri K, Sonoda Y, Nakao S, Noda Y, et al. Vitreous mediators after intravitreal bevacizumab or triamcinolone acetonide in eyes with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Ophthalmology*, 2009, 116 (5): 921-926.
- 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 angioblastic switch in proliferative diabetic retinopathy [J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96 (4): 587-590.
- Zhang M, Chu S, Zeng F, Xu H. Bevacizumab modulates the process of fibrosis in vitro [J]. *Clin Experiment Ophthalmol*, 2015, 43 (2): 173-179.
- 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.
- Hunt RC, Fox A, Pakalnis V, Sigel MM, Kosnosky W, Choudhury P, et al. Cytokines cause cultured retinal pigment epithelial cells to secrete metalloproteinases and to contract collagen gels [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993, 34 (11): 3179-3186.
- Kosnosky W, Li TH, Pakalnis VA, Fox A, Hunt RC. Interleukin-1-beta changes the expression of metalloproteinases in the vitreous humor and induces membrane formation in eyes containing preexisting retinal holes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35 (13): 4260-4267.
- Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F. The molecular action of tumor necrosis factor-alpha [J]. *Eur J Biochem*, 1991, 202 (1): 3-14.
- Tang S, Scheiffarth OF, Thuran SR, Wildner G. Cells of the immune system and their cytokine in epiretinal membranes and in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Ophthalmic Res*, 1993, 25 (3): 177-185.
- Limb GA, Little BC, Meager A, Ogilvie JA, Wolstencroft RA, Franks WA, et al. Cytokines in proliferative vitreoretinopathy [J]. *Eye (Lond)*, 1991, 5 (6): 686-693.
- Abu El-Asrar AM, Maimone D, Morse PH, Gregory S, Reder AT. Cytokines in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Am J Ophthalmol*, 1992, 114 (6): 731-736.
- Limb GA, Early O, Jones SE, LeRoy F, Chignell AH, Dumonde DC. Expression of mRNA coding for TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 by cells infiltrating retinal membranes [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1994, 232 (11): 646-651.
- Yuuki T, Kanda T, Kimura Y, Kotajima N, Tamura J, Kobayashi I, et al. Inflammatory cytokines in vitreous fluid and serum of patients with diabetic vitreoretinopathy [J]. *J Diabetes Complications*, 2001, 15 (5): 257-259.
- Yoshimura T, Sonoda KH, Sugahara M, Mochizuki Y, Enaida H, Oshima Y, et al. Comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in vitreoretinal diseases [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (12): e8158.
- Jeon S, Lee WK. Intravitreal bevacizumab increases intraocular interleukin-6 levels at 1 day after injection in patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Cytokine*, 2012, 60 (2): 535-539.