

引文格式:林凤彬,谭少健,梁皓,陈迎迎.去整合素 echistatin 对糖尿病兔后发性白内障形成中信号通路 PI3-K/Akt 和 ERK1/2 的影响[J].眼科新进展,2016,36(5):406-409. doi:10.13389/j.cnki.rao.2016.0109

【实验研究】

去整合素 echistatin 对糖尿病兔后发性白内障形成中信号通路 PI3-K/Akt 和 ERK1/2 的影响[△]

林凤彬 谭少健 梁皓 陈迎迎

作者简介:林凤彬,男,1988年10月出生,福建泉州人,在读硕士研究生。联系电话:15807810110; E-mail:595289493@qq.com

About LIN Feng-Bin: Male, born in October, 1988. Postgraduate student. Tel:15807810110; E-mail:595289493@qq.com

收稿日期:2015-12-15

修回日期:2016-02-03

本文编辑:盛丽娜

△基金项目:国家自然科学基金资助(编号:81160120)

作者单位:530021 广西壮族自治区南宁市,广西医科大学第一附属医院眼科

通讯作者:谭少健, E-mail: shaojiantan@163.com

Received date: Dec 15, 2015

Accepted date: Feb 3, 2016

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81160120)

From the Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Responsible author: TAN Shao-Jian, E-mail: shaojiantan@163.com

Effects of disintegrin echistatin on PI3-K/Akt and ERK1/2 signaling pathways in posterior capsular opacification model of diabetic rabbit

LIN Feng-Bin, TAN Shao-Jian, LIANG Hao, CHEN Ying-Ying

【Key words】 disintegrin; Akt; ERK1/2; posterior capsular opacification; diabetes; rabbit

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of disintegrin echistatin on PI3-K/Akt and ERK1/2 signaling pathways in the posterior capsular opacification (PCO) model of diabetic rabbit. **Methods** Rabbits were induced diabetic model ($n = 24$), then accepted extracapsular lens extraction, and injected 0.2 mL distilled water (control group; $n = 12$) or 0.2 mL 10.0 mg · L⁻¹ echistatin (echistatin-treated group; $n = 12$) into the anterior chamber randomly and intraoperatively. At postoperative 10 days and 6 weeks, PCO severity of two groups was evaluated with slit lamp microscope, and the posterior capsules ($n = 6$ for each time point) were extracted to analyze the level of Akt and ERK1/2 mRNA. **Results** At 10 days postoperatively, the number of grade 1 of PCO in echistatin-treated group was lower than the control group, though there was no significant difference in PCO grades in the two groups ($P = 0.093$); At 6 weeks postoperatively, PCO grades of the echistatin-treated group were significantly lower than those of the control group ($P = 0.006$). Akt mRNA expression in control group and echistatin-treated group were 0.981 7 ± 0.380 4 and 0.481 7 ± 0.166 5 at postoperative 10 days, respectively, 0.651 7 ± 0.204 7 and 0.401 7 ± 0.151 3 at postoperative 6 weeks, respectively, the echistatin-treated group were lower than the control group ($P = 0.015, 0.037$). ERK1/2 mRNA expression in control group and echistatin-treated group were 0.948 3 ± 0.227 5 and 0.610 0 ± 0.280 6 at postoperative 10 days, respectively, 0.921 7 ± 0.299 4 and 0.465 0 ± 0.180 0 at postoperative 6 weeks, respectively, the echistatin-treated group were lower than the control group ($P = 0.045, 0.009$). **Conclusion** Echistatin can inhibit diabetic rabbit PCO occurrence and development after extracapsular lens extraction, which may be related to down-regulate the expression of Akt and ERK1/2, then inhibit the PI3-K/Akt and ERK1/2 signaling pathways.

【关键词】 去整合素; Akt; ERK1/2; 后发性白内障; 糖尿病; 兔

【摘要】 **目的** 观察去整合素 echistatin 对糖尿病兔后发性白内障形成中信号通路 PI3-K/Akt 和 ERK1/2 的影响,从分子水平上探讨 echistatin 的作用。 **方法** 建立糖尿病兔模型($n = 24$),随机分组并行透明晶状体囊外摘出术,术毕前房分别注入 0.2 mL 灭菌蒸馏水(对照组, $n = 12$)或 0.2 mL 10.0 mg · L⁻¹ echistatin 溶液(echistatin 干预组, $n = 12$)。术后 10 d 及 6 周(每个时间点 6 眼),裂隙灯显微镜观察两组术眼 PCO 分级情况,同时摘取术眼应用 RT-PCR 法检测后囊膜上信号因子 Akt 和 ERK1/2 mRNA 表达情况。 **结果** 术后 10 d 对照组和 echistatin 干预组 PCO 分级比较差异无统计学意义($P = 0.093$),但 echistatin 干预组 PCO 1 级眼数少于对照组;术后 6 周 echistatin 干预组 PCO 级别明显低于对照组($P = 0.006$)。对照组和 echistatin 干预组 Akt mRNA 相对表达量术后 10 d 分别为 0.981 7 ± 0.380 4、0.481 7 ± 0.166 5,术后 6 周分别为 0.651 7 ± 0.204 7、0.401 7 ± 0.151 3, echistatin 干预组均明显低于对照组($P = 0.015, 0.037$)。对照组和 echistatin 干预组 ERK1/2 mRNA 相对表达量术后 10 d 分别为 0.948 3 ± 0.227 5、0.610 0 ± 0.280 6,术后 6 周分别为 0.921 7 ± 0.299 4、0.465 0 ± 0.180 0, echistatin 干预组均明显低于对照组($P = 0.045, 0.009$)。 **结论** 去整合素 echistatin 对糖尿病兔后发性白内障的发生和发展有一定的抑制作用,其发生的机制可能与抑制信号因子 Akt 和 ERK1/2 表达,进而阻断信号通路 PI3-K/Akt 和 ERK1/2 的转导有关。

后发性白内障 (posterior capsular opacification, PCO) 是白内障术后最常见的并发症^[1]。有研究显

示,糖尿病患者较血糖正常者白内障术后有更高的 PCO 发病率^[2,4]。前期研究亦证实,糖尿病兔晶状体

摘出术后 10 d 为 PCO 形成最早期,术后 6 周为 PCO 形成最显著期^[5],明显早于正常血糖兔的 14 d 及 3 个月^[6]。同时发现 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 去整合素 echistatin 能够抑制糖尿病兔术后晶状体上皮细胞 (lens epithelial cell, LECs) 的增殖、迁移和上皮-间质转分化 (epithelial mesenchymal transdifferent, EMT) 过程^[7-9]。PI3-K/Akt 和 ERK1/2 通路是整合素的下游信号通路,有研究发现,活化的 Akt 和 ERK1/2 可促进 LECs 的增殖、迁移和 EMT^[10]。本实验采用 RT-PCR 法观察去整合素 echistatin 对糖尿病兔 PCO 形成过程中信号因子 Akt 和 ERK1/2 表达的影响,进而从信号转导通路上探讨 echistatin 的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康新西兰大白兔 24 只,雌雄不限,12 周龄,体质量 $2.4 \sim 2.8 \text{ kg}$,眼部检查未见异常;由广西医科大学实验动物中心提供。实验动物的饲养与使用均遵循视觉与眼科学研究学会 (ARVO) 关于动物使用原则的规定,并且经广西医科大学动物伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂与仪器 四氧嘧啶、去整合素 echistatin (美国 Sigma-Aldrich 公司),稳豪型血糖仪、稳豪型血糖试纸 (美国强生公司),甘精胰岛素注射液 (法国 Sanofi-Aventis 公司),TRIzol (美国 Invitrogen 公司),PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR® Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus)、PCR 引物 (大连 Takara 公司),荧光定量 PCR 仪 (Light Cycler 480II,瑞士 Roche 公司)。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病兔模型的建立 禁食禁饮 8 h 后,将新西兰大白兔用四氧嘧啶按 $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 耳缘静脉注射建立糖尿病兔模型 ($n=24$),当血糖浓度持续 2 周大于 $12 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时为建模成功。对于血糖浓度高于 $16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 者,根据血糖值给予皮下注射甘精胰岛素,使其血糖控制在 $12 \sim 16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[11]。

1.2.2 糖尿病兔 PCO 模型的建立与分组 根据前期研究结果^[5,7],24 只建模成功的糖尿病兔 24 眼 (右眼) 按随机数字表法分为对照组 ($n=12$) 和 echistatin 干预组 ($n=12$),每组又随机分为 10 d ($n=6$) 和 6 周 ($n=6$) 2 个时间点。术前禁食禁饮 8 h,24 只建模成功的糖尿病兔右眼为手术眼,均行晶状体囊外摘出术。术毕对照组前房内注入 0.2 mL 灭菌蒸馏水,echistatin 干预组前房内注入 0.2 mL $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ echistatin 溶液。所有手术均由同一术者完成。术后 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 阿托品眼液、 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 妥布霉素眼液及 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 典必殊眼液滴术眼,每天 4 次;夜晚涂四环素可的松眼膏,直至角膜水肿、前房渗出消失。

1.2.3 术后观察 术后 1 d、3 d、7 d、10 d 及 6 周分别用裂隙灯显微镜观察角膜、前房及 PCO 发生情况。

对 PCO 按 ODRICH 等^[12] 的标准分级:0 级:透明;1 级:轻度混浊,能看清眼底或混浊面积不足 $1/2$ 后囊膜面积;2 级:中度混浊,能模糊看见眼底或混浊面积大于 $1/2$ 后囊膜面积;3 级:完全混浊,不能看见眼底。

1.2.4 实时荧光定量 PCR

1.2.4.1 组织收集 术后 10 d 及 6 周分别处死各组糖尿病兔,摘取术眼后立即采用连续撕囊法将晶状体后囊膜迅速取下,并速冻于 -80°C 冰箱,用于 RT-PCR 检测。

1.2.4.2 引物序列 引物序列由大连 Takara 公司设计并合成,PI3-K/Akt 上游引物: $5' \text{-CTTCATTGGGTACAAGGAGAGGT-3'}$,下游引物: $5' \text{-GCGGATGACGAAGTGTTG-3'}$; ERK1/2 上游引物: $5' \text{-AACTCCCCAGCGCAGTCTT-3'}$,下游引物: $5' \text{-AAC-CAGCAAAATCCACCTCCT-3'}$; GAPDH 上游引物: $5' \text{-CCACTTTGTGAAGCTCATTTCT-3'}$,下游引物: $5' \text{-TCGTCCTCCTCTGGTGCTCT-3'}$ 。

1.2.4.3 总 RNA 提取、逆转录及 RT-PCR 检测

采用 TRIzol 法提取晶状体后囊膜总 RNA,测定总 RNA 浓度。根据总 RNA 浓度应用 Takara 逆转录试剂盒进行逆转录,方法见说明书 (RR047A)。荧光定量 PCR 仪上扩增,反应条件: 95°C 30 s 预变性,1 个循环; 95°C 5 s, 60°C 30 s 扩增,40 个循环; 95°C 5 s, 60°C 1 min,连续升温至 95°C ,1 个循环; 50°C 30 s 冷却,1 个循环。

1.2.4.4 计算 Ct 值 采用相对定量法测定目的基因 PCR 产物和内参 GAPDH PCR 产物的 Ct 值。相对定量公式: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{处理组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{未处理组}}$ 。

1.3 统计学分析 所有数据均采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。各组 PCO 分级眼数数据资料以频数表示,差异比较采用秩和检验。各组基因相对表达量数据资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,经方差齐性检验后,采用 t 检验比较总体差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后术眼观察 术后前 3 d 对照组及 echistatin 干预组糖尿病兔术眼均出现不同程度的角膜水肿及前房闪辉,但两组术后炎症没有明显差异;术后 7 ~ 10 d 两组炎症均基本恢复正常。

2.2 糖尿病兔 PCO 分级情况 两组糖尿病兔术后 10 d 及 6 周 PCO 分级情况见表 1。术后 10 d echistatin 干预组和对照组 PCO 分级比较差异无统计学意义 ($P=0.093$),但 echistatin 干预组 PCO 1 级眼数 ($1/6$) 少于对照组 ($4/6$);术后 6 周 echistatin 干预组 PCO 级别明显低于对照组 ($P=0.006$)。

2.3 Akt mRNA 表达变化 术后 10 d,对照组和 echistatin 干预组 Akt mRNA 相对表达量分别为 0.9817 ± 0.3804 、 0.4817 ± 0.1665 ,差异有统计学

表 1 术后 10 d 及 6 周两组 PCO 分级比较

PCO 分级	10 d		6 周	
	对照组	echistatin 干预组	对照组	echistatin 干预组
0 级	2	5	0	1
1 级	4	1	0	4
2 级	0	0	3	1
3 级	0	0	3	0

意义($P=0.015$);术后 6 周,对照组和 echistatin 干预组 Akt mRNA 相对表达量分别为 $0.651\ 7\pm0.204\ 7$ 、 $0.401\ 7\pm0.151\ 3$,差异有统计学意义($P=0.037$)。提示 echistatin 对糖尿病兔术后 Akt mRNA 表达的抑制作用持久且稳定。

2.4 ERK1/2 mRNA 表达变化 术后 10 d,对照组和 echistatin 干预组 ERK1/2 mRNA 相对表达量分别为 $0.948\ 3\pm0.227\ 5$ 、 $0.610\ 0\pm0.280\ 6$,差异有统计学意义($P=0.045$);术后 6 周,对照组和 echistatin 干预组 ERK1/2 mRNA 相对表达量分别为 $0.921\ 7\pm0.299\ 4$ 、 $0.465\ 0\pm0.180\ 0$,差异有统计学意义($P=0.009$)。提示 echistatin 在糖尿病兔术后能持久有效地抑制 ERK1/2 mRNA 的表达。

3 讨论

对于糖尿病患者而言,白内障术后保持后囊膜的透明,不仅是维持一个较好视力的保证,同是也是眼底检查、玻璃体手术及视网膜光凝治疗(如伴发糖尿病视网膜病变和黄斑变性时)的重要保证。因此尤其对糖尿病患者而言,积极干预 PCO 的形成有着重要的现实价值。

整合素作为细胞表面重要的黏附分子,主要表达在 LECs 与纤维细胞上^[13],不仅具有黏附作用,而且具有跨膜连接作用,通过激活下游转导蛋白的活性,介导细胞内信号通路转导,进而调控细胞的增殖、迁移、黏附、分化等活动^[14-15]。PI3-K/Akt 和 ERK1/2 通路是整合素的下游信号通路,IYENGAR 等^[16]报道,ERK1/2 和 PI3-K/Akt 信号通路可促进 LECs 的增殖;JIANG 等^[17]研究发现,PI3-K/Akt 和 ERK1/2 通路可促进人 LECs 的迁移;CHEN 等^[18]及 YAO 等^[19]的研究则显示,ERK1/2 和 PI3-K/Akt 信号通路可调控 LECs 的 EMT 过程。提示白内障术后,整合素可通过下游 ERK1/2 和 PI3-K/Akt 信号通路调控术后残留 LECs 的增殖、迁移和 EMT 过程,进而参与术后 PCO 的形成。抑制上游整合素的功能,阻断下游 ERK1/2 和 PI3-K/Akt 信号转导通路,是干预 PCO 发生发展的可行方法。

去整合素是一类从蛇素中分离出来的小分子多肽,通过与整合素 $\beta 1$ 和 $\beta 3$ 特异性结合从而阻止细胞外基质中整合素配体及受体与整合素的结合,进而阻断整合素的功能^[20]。echistatin 是去整合素家族的一员,有研究报道,echistatin 能有效抑制血小板的聚集^[21-22]。SHAH 等^[23]研究则发现 echistatin 通

过阻断整合素 $\alpha v\beta 3$ 和 FAK 信号通路,可抑制 EMT 的过程。前期研究亦显示, $10.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 去整合素 echistatin 对糖尿病兔晶状体摘出术后后囊膜上 LECs 的增殖、EMT 及胶原合成具有抑制作用,且对眼内相邻及重要组织无明显毒性作用^[7-9]。本次实验我们在晶体囊外摘出术后将 $10.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ echistatin 溶液注入糖尿病兔眼前房,发现术后 10 d 及 6 周,echistatin 干预组 Akt 和 ERK1/2 mRNA 表达量均明显低于对照组;同时发现术后 10 d 及 6 周,echistatin 干预组 PCO 级别明显降低,糖尿病兔 PCO 的发生发展受到抑制。与我们的实验结果相似,CHANDLER 等^[24]报道,使用 AR-12 特异性抑制 Akt 的磷酸化形式 p-Akt 后,不仅 p-Akt 表达降低,PCO 模型中 LECs 增殖亦明显降低,PCO 的发展受到明显抑制。KAYASTHA 等^[25]研究则显示,穿心莲内酯 (andrographolide) 可通过阻断 MAPK (包括 ERK1/2) 信号通路,进而抑制 LECs EMT 过程,提示抑制 MAPK 信号通路可干预 PCO 的形成。TIAN 等^[26]研究亦发现,雷帕霉素 (rapamycin) 可通过抑制 AKT/mTOR、ERK 及 JAK2/STAT3 信号通路,进而促进肝细胞生长因子诱导的 LECs 的凋亡,表明抑制 AKT/mTOR、ERK 及 JAK2/STAT3 信号通路有可能可以抑制 PCO 的发展。因此我们认为本次实验中去整合素 echistatin 通过阻断整合素的功能,进而抑制下游信号通路上信号因子 Akt 和 ERK1/2 mRNA 的表达,从而抑制了糖尿病兔术后 PCO 的发生发展。但在体内,信号通路上 Akt 和 ERK1/2 的功能是由蛋白来执行的,因此,echistatin 对糖尿病兔术后 PCO 形成过程中 Akt 和 ERK1/2 蛋白表达的影响仍需要我们今后继续研究。

综上所述,本实验结果显示去整合素 echistatin 可以抑制糖尿病兔晶状体摘出术后 PCO 的发生发展。其发生机制可能与 echistatin 阻断整合素下游信号通路 PI3-K/Akt 和 ERK1/2 的传递有关。

参考文献

[1] NIBOURG LM, GELENS E, KULJER R, HOOYMANS JM, VAN KOOTEN TG, KOOPMANS SA. Prevention of posterior capsular opacification[J]. *Exp Eye Res*, 2015, 136(7):100-115.
[2] EBIHARA Y, KATO S, OSHIKA T, YOSHIZAKI M, SUGITA G. Posterior capsule opacification after cataract surgery in patients with diabetes mellitus[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2006, 32(7):1184-1187.
[3] HAYASHI K, HAYASHI H, NAKAO F, HAYASHI F. Posterior capsule opacification after cataract surgery in patients with diabetes mellitus[J]. *Am J Ophthalmol*, 2002, 134(1):10-16.
[4] PINARCI EY, BAYAR SA, SIZMAZ S, YESILIRMAK N, AKKOYUN I, YILMAZ G. Anterior segment complications after phacovitrectomy in diabetic and nondiabetic patients[J]. *Eur J Ophthalmol*, 2013, 23(2):223-229.
[5] 丁文君, 韦琦, 梁皓, 陈金卯, 李霞, 谭少健. 糖尿病兔后发性白内障发生过程中晶状体上皮细胞增殖的变化[J]. *眼科新进展*, 2012, 32(1):5-7.
[6] 陈启雷. 兔后囊膜混浊模型的建立及其分子机制研究[D]. 广西医科大学博士学位论文, 2009.
[7] 钱光霞, 谭少健, 梁皓, 陈迎迎. 去整合素 Echistatin 抑制糖尿病兔远后期后发性白内障[J]. *眼科新进展*, 2014, 34(6):506-509.
[8] 陈迎迎, 谭少健, 梁皓, 钱光霞. 去整合素 Echistatin 对糖尿病

- 兔后发性白内障模型中晶状体上皮细胞间质转分化及胶原合成的影响[J]. 眼科新进展, 2014, 34(4): 306-309.
- [9] 王炳航, 谭少健, 梁皓. 去整合素 echistatin 对糖尿病兔晶状体摘除术后晶状体上皮细胞 α -SMA 蛋白、IV 胶原表达的影响[J]. 眼科新进展, 2015, 35(7): 105-109.
- [10] TEO ZL, MCQUEEN-MISCAMBLE L, TURNER K, MARTINEZ G, MADAKASHIRA B, DEDHAR S, *et al.* Integrin linked kinase (ILK) is required for lens epithelial cell survival, proliferation and differentiation[J]. *Exp Eye Res*, 2014, 121(4): 130-142.
- [11] 韦琦, 陈金卯, 黄敏丽, 李霞, 何剑峰, 谭少健. 糖尿病兔晶状体后囊膜混浊模型的建立[J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(2): 130-134.
- [12] ODRICH MG, HALL SJ, WORGUL BV, TROKEL SL, RINI FJ. Posterior capsule opacification: experimental analyses[J]. *Ophthalmic Res*, 1985, 17(2): 75-84.
- [13] WEDERELL ED, DE IONGH RU. Extracellular matrix and integrin signaling in lens development and cataract[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2006, 17(6): 759-776.
- [14] CLARK EA, BRUGGE JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken[J]. *Science*, 1995, 268(5208): 233-239.
- [15] ZELENKA PS. Regulation of cell adhesion and migration in lens development[J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(8-9): 857-865.
- [16] IYENGAR L, PATKUNANATHAN B, LYNCH OT, MCAVOY JW, RASKO JE, LOVICU FJ. Aqueous humour and growth factor-induced lens cell proliferation is dependent on MAPK/ERK1/2 and Akt/P13-K signalling[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83(3): 667-678.
- [17] JIANG Q, ZHOU C, BI Z, WAN Y. EGF-induced cell migration is mediated by ERK and PI3K/AKT pathways in cultured human lens epithelial cells[J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2006, 22(2): 93-102.
- [18] CHEN X, YE S, XIAO W, WANG W, LUO L, LIU Y. ERK1/2 pathway mediates epithelial-mesenchymal transition by cross-interacting with TGF β /Smad and Jagged/Notch signaling pathways in lens epithelial cells[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(6): 1664-1670.
- [19] YAO K, YE PP, TAN J, TANG XJ, SHEN TU. Involvement of PI3K/Akt pathway in TGF- β 2-mediated epithelial mesenchymal transition in human lens epithelial cells[J]. *Ophthalmic Res*, 2008, 40(2): 69-76.
- [20] GOULD RJ, POLOKOFF MA, FRIEDMAN PA, HUANG TF, HOLT JC, COOK JJ, *et al.* Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1990, 195(2): 168-171.
- [21] GARSKY VM, LUMMA PK, FREIDINGER RM, PITZENBERGER SM, RANDALL WC, VEBER DF, *et al.* Chemical synthesis of echistatin, a potent inhibitor of platelet aggregation from *Echis carinatus*; synthesis and biological activity of selected analogs[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(11): 4022-4026.
- [22] GAN ZR, GOULD RJ, JACOBS JW, FRIEDMAN PA, POLOKOFF MA. Echistatin: A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(36): 19827-19832.
- [23] SHAH PP, FONG MY, KAKAR SS. PTTG induces EMT through integrin α 5 β 3-focal adhesion kinase signaling in lung cancer cells[J]. *Oncogene*, 2012, 31(26): 3124-3135.
- [24] CHANDLER HL, WEBB TR, BARDEN CA, THANGAVELU M, KULP SK, CHEN CS, *et al.* The effect of phosphorylated Akt inhibition on posterior capsule opacification in an ex vivo canine model[J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 2202-2214.
- [25] KAYASTHA F, JOHAR K, GAJJAR D, ARORA A, MADHU H, GANATRA D, *et al.* Andrographolide suppresses epithelial mesenchymal transition by inhibition of MAPK signalling pathway in lens epithelial cells[J]. *J Biosci*, 2015, 40(2): 313-324.
- [26] TIAN F, DONG L, ZHOU Y, SHAO Y, LI W, ZHANG H, *et al.* Rapamycin-induced apoptosis in HGF-stimulated lens epithelial cells by AKT/mTOR, ERK and JAK2/STAT3 pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(8): 13833-13848.

(上接第 405 页)

验结果相符^[8]。MMP-13 除了分解多种胶原及其他细胞外基质成分, 参与肿瘤转移、血管生成和骨折愈合外, 还可能激活 MMP-2 和 MMP-9, 从而共同促进血管生成^[4]。

综上所述, 本研究分别以 CoCl₂ 诱导的化学缺氧和三气培养箱模拟的物理缺氧构建小鼠 BMSCs 体外缺氧模型。两种缺氧模型均可发挥缺氧效果, 明显增加 BMSCs 中 MMP-13 表达量, 促进 RF/6A 管腔形成, 为进一步研究 BMSCs 参与 CNV 发生发展的机制奠定了基础。

参考文献

- [1] SALGADO AJ, SOUSA JC, COSTA BM, PIRES AO, MATEUS-PINHEIRO A, TEIXEIRA FG, *et al.* Mesenchymal stem cells secrete as a modulator of the neurogenic niche: basic insights and therapeutic opportunities[J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 249.
- [2] VAINSHTEIN JM, KABARRITI R, MEHTA KJ, ROY-CHOWDHURY J, GUHA C. Bone marrow-derived stromal cell therapy in cirrhosis: clinical evidence, cellular mechanisms, and implications for the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014, 89(4): 786-803.
- [3] HOU HY, LIANG HL, WANG YS, ZHANG ZX, WANG BR, SHI YY, *et al.* A therapeutic strategy for choroidal neovascularization based on recruitment of mesenchymal stem cells to the sites of lesions[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(10): 1837-1845.
- [4] CHEN Q, JIN M, YANG F, ZHU J, XIAO Q, ZHANG L. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling[J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 928315.
- [5] 杨秀梅, 王雨生. MEK/ERK 参与大鼠脉络膜新生血管基质金属蛋白酶-2 和基质金属蛋白酶-9 的表达调控[J]. 眼科新进展, 2015, 35(6): 501-506.
- [6] XU N, ZHANG LY, MEISGEN F, HARADA M, HEILBORN J, HOMEY B, *et al.* MicroRNA-125b down-regulates matrix metalloproteinase 13 and inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cell proliferation, migration, and invasion[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(35): 29899-29908.
- [7] YOU Y, SHAN Y, CHEN J, YUE H, YOU B, SHI S, *et al.* Matrix metalloproteinase 13-containing exosomes promote nasopharyngeal carcinoma metastasis[J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(12): 1669-1677.
- [8] LECOMTE J, LOUIS K, DETRY B, BLACHER S, LAMBERT V, BEKAERT S, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal cells and MMP13 contribute to experimental choroidal neovascularization[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(4): 677-686.
- [9] 吕洋, 侯慧媛, 王雨生. 脉络膜新生血管小鼠微小 RNA 对骨髓来源细胞表达基质金属蛋白酶的调控作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(1): 10-15.
- [10] ESPINOSA-HEIDMANN DG, CAICEDO A, HERNANDEZ EP, CSAKY KG, COUSINS SW. Bone marrow-derived progenitor cells contribute to experimental choroidal neovascularization[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(11): 4914-4919.
- [11] ZHANG ZX, WANG YS, SHI YY, HOU HY, ZHANG C, CAI Y, *et al.* Hypoxia specific SDF-1 expression by retinal pigment epithelium initiates bone marrow-derived cells to participate in choroidal neovascularization in a laser-induced mouse model[J]. *Curr Eye Res*, 2011, 36(9): 838-849.
- [12] JEON ES, SHIN JH, HWANG SJ, MOON GJ, BANG OY, KIM HH. Cobalt chloride induces neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells through upregulation of microRNA-124a[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 444(4): 581-587.
- [13] 朱洁, 周竹娟, 龚自力, 郑健. 低氧对人骨髓间充质干细胞趋化因子受体 CXCR4 和 CX3CR1 表达的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(23): 4485-4489.
- [14] 张莹莹, 蒋婷, 周广东, 曹宜林. 低氧培养促进小鼠骨髓间充质干细胞的增殖[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2009, 5(6): 307-309.
- [15] FAN W, CRAWFORD R, XIAO Y. The ratio of VEGF/PEDF expression in bone marrow mesenchymal stem cells regulates neovascularization[J]. *Differentiation*, 2011, 81(3): 181-191.