

引文格式:常鲁,许丽,韩新红,王慧凤,李艳.色素上皮衍生因子基因修饰的人脐带间充质干细胞对大鼠视网膜缺血-再灌注损伤的保护作用[J].眼科新进展,2018,38(4):324-328. doi:10.13389/j.cnki.rao.2018.0076

【实验研究】

色素上皮衍生因子基因修饰的人脐带间充质干细胞对大鼠视网膜缺血-再灌注损伤的保护作用[△]

常鲁 许丽 韩新红 王慧凤 李艳

作者简介:常鲁,男,1991年1月出生,山东人,硕士。研究方向:眼底病。联系电话:15163695868; E-mail: changlu151@163.com; ORCID: 0000-0001-8925-7598

About CHANG Lu: Male, born in January, 1991. Tel: 15163695868; E-mail: changlu151@163.com; ORCID: 0000-0001-8925-7598

收稿日期:2017-08-24

修回日期:2017-12-21

本文编辑:申蓝

△基金项目:山东省高等学校科技计划项目(编号:J15LL08E)

作者单位:261000 山东省潍坊市,潍坊医学院(常鲁,许丽,韩新红,王慧凤);261000 山东省潍坊市,潍坊医学院附属医院眼科(李艳)

通讯作者:李艳, E-mail: liyan@mails@126.com; ORCID: 0000-0003-4268-8942

Received date: Aug 24, 2017

Accepted date: Dec 21, 2017

Foundation item: Shandong Province Science and Technology Project of Higher Education (No: J15LL08E)

From the Weifang Medical University (CHANG Lu, XU Li, HAN Xin-Hong, WANG Hui-Feng), Weifang 261000, Shandong Province, China; Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital, Weifang Medical University (LI Yan), Weifang 261000, Shandong Province, China

Responsible author: LI Yan, E-mail: liyan@mails@126.com; ORCID: 0000-0003-4268-8942

but VEGF mRNA expression was significantly down-regulated, and the differences were statistically significant when compared with PBS and M group (both $P < 0.05$). **Conclusion** Intravitreal injection of PEDF-MSCs can up-regulate the expression of PEDF but down-regulate the expression of VEGF in the retina of RIRI rats, which can protect the retinal ganglion cells against RIRI.

【Key words】 PEDF; VEGF; gene transfection; RIRI

Protective effects of PEDF gene modified human umbilical cord mesenchymal stem cells in rat with retinal ischemia-reperfusion injury

CHANG Lu, XU Li, HAN Xin-Hong, WANG Hui-Feng, LI Yan

[Abstract] Objective To observe the effects of pigment epithelial-derived factor gene-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells (PEDF-MSCs) on the expression of pigment epithelial-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in a rat model of retinal ischemia-reperfusion injury (RIRI) and its protection on retinal ganglion cells. **Methods** Lentivirus (LV) labeled with green fluorescent protein (GFP) was used as a vector to transfect the PEDF gene into human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) at a multiplicity of infection (MOI) of 1, 10, 20, and 50 *in vitro*, and then the expression of PEDF gene and protein in cells transfected with the best MOI value was detected by RT-PCR and ELISA. The healthy male SD rats were randomly divided into normal group (N group) and experimental group. The RIRI model was made by high intraocular pressure in the experimental group, and the RIRI rats with PBS treatment were allocated as the PBS group, with hUCMSCs treatment as M group and LV-PEDF-MSCs treatment as P group, and the N group was left untreated. All rats were sacrificed on day 5, and the number of retinal ganglion cells were counted by Nissl staining, the thickness of the retina was calculated, as well as the expression of PEDF and VEGF mRNA in rat retina was detected by RT-PCR. **Results** The transfection efficiency was as high as 75.8% under fluorescence microscope. The results of RT-PCR showed that the relative expression of PEDF mRNA in PEDF-MSCs supernatant (4.34 ± 0.29) was significantly higher than that in hUCMSCs (1.08 ± 0.15), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$); moreover, the results of ELISA showed that PEDF protein expression in PEDF-MSCs supernatant [$(83.09 \pm 7.58) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$] was significantly higher than that in hUCMSCs [$(12.30 \pm 1.24) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$], and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Nissl staining results showed that the number of ganglion cells in group PBS decreased after model establishment. After 5 days of treatment, the number of ganglion cells in P group and M group was higher than that in PBS group, and the difference was statistically significant (both $P < 0.05$); and P group was higher than M group, with the significant difference ($P < 0.05$). And this was true of the thickness of the retina. RT-PCR showed that the expression of PEDF mRNA in P group was significantly up-regulated,

【摘要】目的 观察色素上皮衍生因子色素上皮衍生因子(pigment epithelial-derived factor, PEDF)基因修饰的人脐带间充质干细胞(pigment epithelial-derived factor gene-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells, PEDF-MSCs)对大鼠视网膜缺血-再灌注损伤(retinal ischemia-reperfusion injury, RIRI)模型中 PEDF、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响及对视网膜神经节细胞的保护作用。方法 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的慢病毒(lentivirus, LV)为载体,将 PEDF 基因以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 1、10、20、50 体外转染至人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)中,应用 RT-PCR 及 ELISA 法分别检测以最佳 MOI 值转染细胞中 PEDF 的表达情况。选取健康 SD 雄性大鼠,采用高眼压的方法制成 RIRI 模型,随机分为正常对照组(N 组)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered

saline, PBS) 治疗组 (PBS 组)、hUCMSCs 治疗组 (M 组) 及 PEDF 基因转染的 hUCMSLs 治疗组 (P 组); N 组不予特殊处理, 其余三组大鼠造模成功后立即进行干预治疗, PBS 组给予 PBS 治疗, P 组与 M 组分别给予 PEDF-MSCs、hUCMSCs 治疗。5 d 后处死大鼠, 尼氏染色计数视网膜神经节细胞数目, 计算视网膜内层厚度, RT-PCR 检测大鼠视网膜 PEDF 和 VEGF 的 mRNA 表达情况。结果 荧光显微镜下观察到转染率高达 75.8%。RT-PCR 结果显示, 转染后 PEDF-MSCs 的上清液中 PEDF mRNA 相对表达量 (4.34 ± 0.29) 明显高于 hUCMSCs (1.08 ± 0.15), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。ELISA 检测结果显示, 转染后 PEDF-MSCs 上清液中 PEDF 蛋白表达量 [$(83.09 \pm 7.58) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$] 明显高于 hUCMSCs [$(12.30 \pm 1.24) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。尼氏染色结果显示造模后 PBS 组大鼠神经节细胞数量变少, 治疗 5 d 后, P 组、M 组大鼠神经节细胞数量均高于 PBS 组, 差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$); P 组高于 M 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 治疗 5 d 后, P 组、M 组大鼠视网膜厚度均厚于 PBS 组, 差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$); P 组厚于 M 组。RT-PCR 检测结果显示, P 组 PEDF mRNA 表达水平显著升高, VEGF mRNA 表达水平下降, 与 PBS 组、M 组相比差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$)。结论 玻璃体内注射 PEDF-MSCs 能上调 RIRI 模型大鼠视网膜 PEDF 表达, 并下调 VEGF 表达, 对 RIRI 大鼠视网膜神经节细胞有保护作用。【关键词】色素上皮衍生因子; 血管内皮生长因子; 基因转染; 视网膜缺血-再灌注损伤【中图分类号】R774.1

目前, 视网膜缺血再灌注损伤 (retinal ischemia-reperfusion injury, RIRI) 成为损伤人类视力的重要原因, 病情严重或者处置不当将导致患者失明。各种原因导致的 RIRI 比较多见, 这类疾病主要累及视网膜神经节细胞。众所周知, 神经细胞是不可逆性细胞, 损伤后不可再生, 因此患者视力也会受到不可逆性降低。研究表明色素上皮衍生因子 (pigment epithelial-derived factor, PEDF) 是血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 非特异性抑制剂, 不仅具有抑制血管新生的作用, 而且具有保护神经的重要作用^[1-5], 在 RIRI 研究中具有十分广泛的应用前景和重要的研究价值。

1 材料与方法

1.1 材料 脐带间充质干细胞来源于潍坊医学院中心实验室; 健康成年雄性 SD 大鼠 48 只, 体质量 180~200 g, 购自青岛大任富城畜牧有限公司; PEDF 慢病毒载体购自吉凯公司; RT-PCR 试剂盒购自日本 TOYOBO 公司; ELISA 试剂盒购自美国 Biolegend 公司; CD34、CD45、CD43、CD105、HLA-ABC、HLA-DR 购自美国 CD 公司; 二氧化碳细胞培养箱购自中国跃进医疗器械公司; RT-PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司; 酶标仪购自德国 Carl Zeiss 公司。

1.2 方法

1.2.1 LV-PEDF-GFP 基因重组慢病毒载体转染人脐带间充质干细胞 转染预实验: 取 P3 代人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs), $50 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ 接种到 96 孔板中, 培养 24 h 后, 按照吉凯基因慢病毒使用操作手册用感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 值分别为 1、10、20、50 的 PEDF 基因重组 LV 载体的病毒液转染 hUCMSCs, 荧光显微镜观察绿色荧光表达情况, 随机选取 5 个视野, 根据以下公式: 转染效率 = GFP 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$, 计算平均值。正式感染实验: 取 P3 代 hUCMSCs ($50 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$) 接种到 6 孔板中, 并分成 A、B 两组, 24 h 后, A 组和 B 组分别加入最适 MOI 值的 LV-GFP、LV-PEDF-GFP, 保持细胞活性。

1.2.2 RT-PCR 检测 PEDF-MSCs 中 PEDF mRNA 的表达 设计特异性引物, PEDF 上游引物: 5'-TTCACCCGGAGCAGTGAT-3', 下游引物: 5'-GCCTC-CAGAATTGTGTTTGTAG-3'; 内参基因: 上游引物: 5'-AACTCCTGTGCGGCTCTGAC-3'; 下游引物: 5'-TTC-CACAATGGCACGCTTCT-3'。然后通过 RT-PCR 检测 A 组和 B 组细胞中 PEDF、内参基因的相对表达量, 每组设置 3 个复孔, 根据 RT-PCR 反应曲线得到目的基因和内参基因的 Ct 值, 采用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法进行定量计算, 比较两组基因的表达效果, RT-PCR 反应条件: 95 °C 2 min, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 70 °C 45 s; 共 30 个循环。

1.2.3 ELISA 检测 PEDF 基因的表达 转染培养 3 d 后, 收集 A 组与 B 组 hUCMSC 细胞培养液, 按照 PEDF 人 ELISA 试剂盒说明书, 稀释样品, 然后测定各孔吸光度 (A) 值, 并绘制标准曲线, 计算各组 PEDF 浓度。

1.2.4 大鼠分组 将雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组 (N 组)、PBS 治疗组 (PBS 组)、人脐带间充质干细胞 (hUCMSCs) 治疗组 (M 组) 及 PEDF 基因转染的人脐带间充质干细胞治疗组 (P 组), 每组各 12 只, N 组不予特殊处理, 其余三组大鼠造模成功后立即进行干预治疗, PBS 组给予 PBS 治疗, P 组与 M 组分别给予 PEDF-MSCs、hUCMSCs 治疗。治疗 5 d 后处死大鼠, 右眼为实验眼。

1.2.5 大鼠 RIRI 模型的建立 SD 大鼠常规可必妥眼液滴右眼 3 d, 每天 4 次, 麻醉、散瞳后, 将注射器针头自角膜缘刺入前房, 避免损伤晶状体和虹膜, 瓶高 150 cm, 可见球结膜苍白, 角膜雾浊水肿, 视网膜苍白, 前房加压灌注过程中确保穿刺针头无松懈脱出, 60 min 后缓慢拔出针头, 角膜逐渐恢复透明, 若无感染则为造模成功。

1.2.6 大鼠玻璃体内注射 PBS 组、M 组、P 组大鼠制备 RIRI 模型成功后立即进行玻璃体内注射, 于大鼠鼻上方角膜缘后约 2 mm 处, 45°角进针, PBS 组大鼠注射灭菌 2 μL PBS, P 组注入 2 μL ($20 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) LV-PEDF-GFP 转染的 hUCMSCs 悬液, M 组注入 2 μL ($20 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) hUCMSCs 悬液, 红霉素眼膏

涂眼。

1.2.7 尼氏染色分析 将石蜡切片脱蜡后,放入预热 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲苯胺蓝中染色 40 min ,蒸馏水洗3次,体积分数95%乙醇分化,脱色,中性树胶对样本进行封片,镜下观察,距视盘中心 1.0 mm 范围内测量各组大鼠视网膜厚度,视网膜周边 $100\text{ }\mu\text{m}$ 范围内进行视网膜视神经节细胞计数。

1.2.8 RT-PCR 检测大鼠视网膜中 PEDF 和 VEGF 的表达 设计特异性引物,VEGF 上游引物: $5' \text{-CTATGCAGATCATGCCGATCA-3'}$,下游引物: $5' \text{-TATGCTGCAGGAAGCTCATCTC-3'}$; PEDF 上游引物: $5' \text{-TTCACCCGGAGCAGTGAT-3'}$,下游引物: $5' \text{-GCCTCCAGAATTGTGTTTGAG-3'}$;内参基因上游引物: $5' \text{-AACTCCTGTGCGGCTCTGAC-3'}$;下游引物: $5' \text{-TTCCACAATGGCAGCTTCT-3'}$ 。

玻璃体内注射5 d后麻醉大鼠,摘取眼球,分离视网膜组织,将 $600\text{ }\mu\text{L}$ Trizol 裂解液加入匀浆器中,

将视网膜充分研磨。以 $\beta\text{-actin}$ 为内参,每份模板的基因重复3次检测,得出溶解曲线和循环阈值(threshold cycles, CT)值,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算各目的基因的相对表达量。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,计量数据均采用均数 \pm 标准差表示,所有数据进行方差齐性检验,采用单因素方差分析和两样本均数比较的 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PEDF-GFP 基因重组慢病毒载体在 hUCMSCs 中的表达 MOI = 1 组视野中,几乎未见绿色荧光显示(图 1A),MOI = 10 组视野中能观察到少许绿色荧光(图 1B),MOI = 20 组绿色荧光有所增加,与细胞分布相吻合(图 1C),MOI = 50 组绿色荧光最多,视野下可见到大量的绿色荧光,成片状分布(图 1D),MOI = 50 组的转染效率为 75.8%。

图1 MOI值分别为1、10、20、50的GFP表达情况。A:MOI=1;B:MOI=10;C:MOI=20;D:MOI=50

2.2 RT-PCR 检测转染后 hUCMSCs 中 PEDF 基因的表达 选取 MOI = 50 时的 PEDF 转染组和空转染组的细胞,RT-PCR 检测结果如下,B 组的 PEDF mRNA 相对表达量为 4.34 ± 0.29 ,A 组为 1.08 ± 0.15 ,差异有统计学意义($F = 1.60, P < 0.05$)。

2.3 ELISA 检测 PEDF 蛋白的相对表达量 A 组细胞上清液中 PEDF 蛋白水平为 $(12.30 \pm 1.24)\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,B 组培养基中为 $(83.09 \pm 7.58)\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,说明 LV-PEDF 转染 72 h 后,PEDF 分泌明显增加,两组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 各组大鼠视网膜内层厚度 N 组大鼠尼氏染色显示视网膜神经节细胞层、内核层(inner nuclear layer, INL)、外核层(outer nuclear layer, ONL)呈蓝色,视网膜内层厚度为 $(108.35 \pm 4.22)\text{ }\mu\text{m}$,PBS 组大鼠经 RIRI 5 d 后,视网膜神经节细胞萎缩凋亡,厚度变为 $(73.26 \pm 3.58)\text{ }\mu\text{m}$,与 N 组大鼠相比,差异有统计学意义($P < 0.05$;图 2A)。P 组大鼠经 RIRI 5 d 后,视网膜厚度为 $(90.35 \pm 4.19)\text{ }\mu\text{m}$,厚于 PBS 组大鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$;图 2B)。M 组在造模 5 d 时,视网膜内层厚度为 $(82.43 \pm 4.29)\text{ }\mu\text{m}$,厚于 PBS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但薄于 P 组,差异有统计学意义($P < 0.05$;图 3)。

2.5 各组大鼠视网膜神经节细胞数 N 组视网膜视神经节细胞数为 (8.64 ± 0.27) 个。PBS 组大鼠经 RIRI 5 d 后视网膜神经节细胞数减少为 (4.12 ± 0.21) 个,与 N 组大鼠相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。P 组大鼠经 RIRI 5 d 后,视网膜神经节细胞数减少为 (5.98 ± 0.23) 个,但多于 PBS 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。造模 5 d 后,M 组视网膜神经节细胞数多于 PBS 组,但少于 P 组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$;图 4)。

图2 PBS组与P组大鼠造模5 d后尼氏染色图。A:PBS组大鼠造模后5 d视网膜神经节细胞大片缺失(内层萎缩, $\times 400$);B:P组大鼠造模后5 d视网膜神经节细胞少量缺失(内核层细胞轻微稀疏, $\times 400$)

2.6 各组大鼠视网膜 PEDF 及 VEGF mRNA 的表达 RT-PCR 结果显示,P 组、M 组大鼠的视网膜

PEDF mRNA 表达均增加,与 PBS 组相比,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),P 组与 M 组相比,P 组升高更为明显,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 5)。M 组和 P 组中 VEGF mRNA 的表达水平均降低,与 PBS 组相比,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。P 组 VEGF 表达水平下降更显著,与 M 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$,图 6)。

图3 各组大鼠视网膜内层厚度比较

图4 各组大鼠视网膜神经节细胞数比较

图5 三组大鼠视网膜 PEDF 相对表达量

3 讨论

RIRI 是一种累及视网膜神经细胞的病理生理过程,主要发生在视网膜缺血性疾病中,如视网膜中央动脉阻塞、糖尿病视网膜病变、高眼压等。众所周知,神经细胞损伤后不可再生,所以,RIRI 严重影响患者视力,甚至引起视力永久丧失。目前,RIRI 的发

图6 三组大鼠视网膜 VEGF 相对表达量

生发展机制尚不完全明确,可能和多种因素密切相关。Agardh 等^[6]在研究 RIRI 的早期发展过程中,发现大量的炎症因子(TNF- α 、白细胞介素-1 等)通过各种途径黏附聚集于组织细胞表面,炎症细胞在炎症因子的作用下释放大量的氧自由基分子和酶性物质^[7],导致视网膜组织损伤,说明 RIRI 与炎症反应和氧化应激有关。有研究表明,刚出生的大鼠视网膜缺血再灌注后释放大量的兴奋性谷氨酸,而降低兴奋性谷氨酸释放后可明显减轻视网膜神经节细胞的凋亡,提示谷氨酸可能对视网膜神经节细胞有毒性作用^[8-9]。

hUCMSCs 是一种具有自我更新、增殖和多向分化潜能的干细胞^[10],并且具有来源广泛,取材方便,不受伦理限制等诸多优点^[11]。研究发现,hUCMSCs 具有分化为少突胶质细胞、神经元样细胞等神经细胞的能力,使其具有作为种子细胞应用于修复受伤或病变的神经组织的能力^[12-13],这些研究为 hUCMSCs 眼内移植治疗 RIRI 提供了理论基础。

PEDF 是目前最重要的血管生成抑制因子,具有营养作用和多种生物活性,如抗血管生成、抗增殖、促分化、抗炎和抗肿瘤等,PEDF 是由 418 个氨基酸构成的糖蛋白,相对分子质量约为 50 000,属于丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族成员之一,首先由 Tombran-Tink 等^[14]在 RPE 细胞培养基中发现,PEDF 在人体的绝大多数组织中都有所表达,如肝组织、睾丸、卵巢、胎盘和胰腺等部位,眼内的 PEDF 主要由视网膜色素上皮细胞分泌,广泛存在于房水、玻璃体、睫状体、角膜组织中^[15-17]。Dawson 等^[18]率先发现角膜、玻璃体无血管组织和 PEDF 的作用息息相关,对维持眼部透明的屈光系统有重要作用,VEGF 是促血管生成因子,临床上许多增殖性疾病都与 PEDF 和 VEGF 比例失衡有关^[19-21]。研究发现,玻璃体内注射 PEDF 后,可降低 ICAM-1、TNF- α 、VEGF 等炎症因子的释放^[22],说明 PEDF 具有一定的抗炎作用。Yoshida 等^[23]对大鼠糖尿病模型的研究发现,静脉注射 PEDF 后,视网膜 8-OHdG、p22phox 和 VEGF 水平以及 NADPH 氧化酶活性减弱。由上述可知,RIRI 发

病机制可能和炎症作用、氧化应激有关。Takita等^[24]在对 RIRI 的研究中发现,玻璃体内注射 PEDF 有助于防止视网膜神经节细胞层的变性和凋亡。这些研究结果为 PEDF 预防和治疗 RIRI 提供了理论基础。本研究结果显示 PEDF 基因转染的 hUCMSCs 能减少早期 RIRI 引起的视网膜神经节细胞的萎缩凋亡,对视网膜有一定的保护作用。本研究设计尚未涉及 PEDF-MSCs 在不同剂量下对视网膜神经的不同程度的保护作用,另外,免疫排斥反应的检测等都需要在以后的研究中进一步的探索与讨论,在实现临床转化与应用前仍然需要进一步探索。

参考文献

- [1] HE X, CHENG R, BENYAJATI S, MA JX. PEDF and its roles in physiological and pathological conditions; implication in diabetic and hypoxia-induced angiogenic diseases [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 128 (11): 805-823.
- [2] CRAWORD SE, FITCHEV P, VELICEASA D, VOLPERT OV. The many facets of PEDF in drug discovery and disease; a diamond in the rough or split personality disorder [J]? *Expert Opin Drug Discov*, 2013, 8 (7): 769-792.
- [3] KOZULIN P, NATOLI R, BUMSTED OK, Madigan MC, Provis JM. The cellular expression of antiangiogenic factors in fetal primate macula [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51 (8): 4298-4306.
- [4] YOKOI M, YAMAGISHI S, SAITO A, YOSHIDA Y, MATSUI T, SAITO W, *et al*. Positive association of pigment epithelium-derived factor with total antioxidant capacity in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Br J Ophthalmol*, 2007, 91 (7): 885-887.
- [5] TAN ML, CHOONG PF, DASS CR. Anti-chondrosarcoma effects of PEDF mediated via molecules important to apoptosis, cell cycling, adhesion and invasion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398 (4): 613-618.
- [6] AGARDH CD, GUSTAVSSON C, HAGERT P, NILSSON M, AGARDH E. Expression of antioxidant enzymes in rat retinal ischemia followed by reperfusion [J]. *Metabolism*, 2006, 55 (7): 892-898.
- [7] NISHIWAKI A, UEDA T, UGAWA S, SHIMADA S, OGURA Y. Upregulation of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 after retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (11): 4931-4935.
- [8] HIROOKA K, MIYAMOTO O, JINMING P, DU Y, BABA T, TOKUDA M, *et al*. Neuroprotective effects of D-allose against retinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47 (4): 1653-1657.
- [9] PARK K, JIN J, HU Y, ZHOU K, MA JX. Overexpression of pigment epithelium-derived factor inhibits retinal inflammation and neovascularization [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178 (2): 688-698.
- [10] LI WW, YAO XY, YANG LM, ZHAO PW, ZHANG GH. Induced differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into neural stem cells *in vitro* [J]. *Chin J Tissue Engineering Res*, 2014, 18 (1): 75-80.
李伟伟, 姚星宇, 杨丽敏, 赵鹏伟, 张国华. 体外诱导人脐带间充质干细胞向神经干细胞的分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18 (1): 75-80.
- [11] DU YA P, BIAN Y, CHU X, ZHANG Y. Stem cells for reprogramming; could hUCMSCs be a better choice [J]? *Cytotechnology*, 2013, 65 (3): 335-345.
- [12] YANG H, XIE Z, WEI L, YANG H, YANG S, ZHU Z, *et al*. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived neuron-like cells rescue memory deficits and reduce amyloid-beta deposition in an AβPP/PS1 transgenic mouse model [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4 (4): 76.
- [13] ZHANG ZP, KAI-JIN MA, DENG YG, *et al*. Experimental study on effect of citicoline in inducing differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells to neuron-like cells [J]. *Pharm Today*, 2013, 23 (3): 129-131.
张紫萍, 马凯进, 邓英光, 余卫, 胡志兵. 胞磷胆碱体外诱导人脐带间充质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究 [J]. *今日药学*, 2013, 23 (3): 129-131.
- [14] TOMBRAN-TINK J, APARICIO S, XU X, TINK AR, LARA N, SAWANT S, *et al*. PEDF and the serpins: phylogeny, sequence conservation, and functional domains [J]. *J Struct Biol*, 2005, 151 (2): 130-150.
- [15] OGATA N, WADA M, OTSUJI T, JO N, TOMBRAN-TINK J, MATSUMURA M. Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43 (4): 1168-1175.
- [16] ORTEGO J, ESCRIBANO J, BECERRA SP, COCA-PRADOS M. Gene expression of the neurotrophic pigment epithelium-derived factor in the human ciliary epithelium. Synthesis and secretion into the aqueous humor [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37 (13): 2759-2767.
- [17] KOZULIN P, NATOLI R, BUMSTED O K, MADIGAN MC, PROVVIS JM. The cellular expression of antiangiogenic factors in fetal primate macula [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51 (8): 4298-4306.
- [18] DAWSON DW, VOLPERT OV, GILLIS P, CRAWFORD SE, XU H, BENEDICT W, *et al*. Pigment epithelium-derived factor; a potent inhibitor of angiogenesis [J]. *Science*, 1999, 285 (5425): 245-248.
- [19] HE SS, SHI H S, YIN T, LI YX, LUO ST, WU QJ, *et al*. Aav-mediated gene transfer of human pigment epithelium-derived factor inhibits Lewis lung carcinoma growth in mice [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27 (4): 1142-1148.
- [20] CLARA CA, MARIE SK, DE ALMEIDA JR, WAKAMATSU A, OBA-SHINJO SM, UNO M, *et al*. Angiogenesis and expression of PDGF-C, VEGF, CD105 and HIF-1α in human glioblastoma [J]. *Neuropathology*, 2014, 34 (4): 343-352.
- [21] DUH EJ, YANG HS, SUZUMA I, MIYAGI M, YOUNGMAN E, MORI K, *et al*. Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43 (3): 821-829.
- [22] ZHANG Y, HAN J, YANG X, SHAO C, XU Z, CHENG R, *et al*. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis and growth of gastric carcinoma by down-regulation of VEGF [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26 (3): 681-686.
- [23] YOSHIDA Y, YAMAGISHI S, MATSUI T, JINNOUCHI Y, FUKAMI K, IMAIZUMI T, *et al*. Protective role of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in early phase of experimental diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2009, 25 (7): 678-686.
- [24] TAKITA H, YONEYA S, GEHLBACH PL, DUH EJ, WEI LL, MORI K. Retinal neuroprotection against ischemic injury mediated by intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (10): 4497-4504.