

G 补缀 FHA 域血管生成因子 1 在糖尿病视网膜新生血管形成中的作用

李 蓉¹, 姚国敏¹, 闫红林², 王 莉³, 蔡天志³, 袁博博⁴, 巨 伟⁴, 王丽娜⁴

引用:李蓉,姚国敏,闫红林,等. G 补缀 FHA 域血管生成因子 1 在糖尿病视网膜新生血管形成中的作用. 国际眼科杂志 2020; 20(9):1487-1492

基金项目:国家自然科学基金项目(No.81500726);陕西省卫生健康科研基金项目(No.2018D074);西安市科技局医学研究项目[No.201805097YX5SF31(4)];科技厅自然科学基金配套基金(No.XYFYPT-2020-07)

作者单位:(710077)中国陕西省西安市,西安医学院第一附属医院¹眼科;²药物临床试验机构;³科研科;⁴(710054)中国陕西省西安市,西安交大医学院附属市九院转化医学中心

作者简介:李蓉,女,毕业于第四军医大学,博士,副主任医师,副教授,眼科主任,五官科教研室主任,研究方向:视网膜疾病。

通讯作者:李蓉. rechelong198222@163.com

收稿日期:2019-12-12 修回日期:2020-08-04

摘要

目的:观察 G 补缀 FHA 域血管生成因子 1 (AGGF1) 在糖尿病视网膜组织及高糖条件下视网膜血管内皮细胞中的表达,以及 AGGF1 对视网膜血管内皮细胞增殖、迁移和管腔形成的影响。

方法:将 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组和糖尿病视网膜病变 (DR) 模型组,采用免疫组化法检测视网膜组织中 AGGF1 的蛋白表达。将体外培养的恒河猴脉络膜视网膜血管内皮细胞 (RF/6A 细胞) 随机分为对照组 (低糖环境培养) 和高糖组 (培养基中加入 25mmol/L D-葡萄糖),采用免疫荧光法检测细胞中 AGGF1 的蛋白表达。然后将 RF/6A 细胞分为对照组和 AGGF1 处理组,分别采用 CCK-8 法、Transwell 法和 Matrigel 检测细胞增殖、迁移及管腔形成。

结果:AGGF1 蛋白在视网膜各层均有表达,在血管内皮细胞中也有明显表达,AGGF1 在 DR 组视网膜中的表达 (0.17 ± 0.05) 明显强于对照组 (0.07 ± 0.02) ($P < 0.05$)。AGGF1 蛋白在高糖组和对照组 RF/6A 细胞中均有表达,AGGF1 在高糖下 RF/6A 细胞中的表达 (0.63 ± 0.10) 明显强于对照组 (0.40 ± 0.03) ($P < 0.05$)。处理 12h, AGGF1 组细胞增殖率 ($114.88\% \pm 0.84\%$) 明显高于对照组 ($100.00\% \pm 2.17\%$) ($P < 0.05$); 处理 24h, AGGF1 组细胞增殖率 ($157.35\% \pm 1.89\%$) 明显高于对照组 ($142.77\% \pm 0.50\%$) ($P < 0.05$); 处理 48h, AGGF1 组细胞增殖率 ($185.39\% \pm 1.90\%$) 明显高于对照组 ($160.17\% \pm 1.33\%$) ($P < 0.05$)。处理 12h, AGGF1 组细胞迁移数 (127.00 ± 7.00 个) 明显多于对照组 (90.33 ± 6.66 个) ($P < 0.05$)。处理 12h, AGGF1 组细胞管腔数 (33.67 ± 1.15 个) 明显多于对照组 (15.33 ± 3.51 个) ($P < 0.05$); AGGF1 组细胞分支总长度 ($8226.33 \pm 288.55 \mu\text{m}$) 明显多于对照组 ($6463.33 \pm$

$938.01 \mu\text{m}$) ($P < 0.05$)。

结论:糖尿病视网膜组织和高糖诱导的视网膜血管内皮细胞表达 AGGF1 蛋白明显增多,AGGF1 可促进视网膜血管内皮细胞增殖、迁移和管腔形成,提示 AGGF1 可能参与了 DR 的视网膜新生血管形成。

关键词:G 补缀 FHA 域血管生成因子 1; 糖尿病视网膜病变; 高糖; 视网膜血管内皮细胞; 血管生成

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.9.04

Study on the role of angiogenic factor with G patch and FHA domains 1 in diabetic retinal neovascularization

Rong Li¹, Guo-Min Yao¹, Hong-Lin Yan², Li-Wang³, Tian-Zhi Cai³, Bo-Bo Yuan⁴, Wei Ju⁴, Li-Na Wang⁴

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.81500726); Health Research Foundation of Shaanxi Province (No. 2018D074); Medical Research Project of Xi'an Science Technology Bureau [No. 201805097YX5SF31(4)]; Matching Foundation of Shaanxi Provincial Science and Technology Department (No.XYFYPT-2020-07)

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Drug Clinical Trial Institution; ³Department of Scientific Research, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China; ⁴Translational Medicine Center, Xi'an Ninth Hospital Affiliated to Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Rong Li. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China. rechelong198222@163.com

Received:2019-12-12 Accepted:2020-08-04

Abstract

• AIM: To observe the effect of AGGF1 on the proliferation, migration and tube formation of retinal endothelial cells in diabetic retinal tissue and high glucose conditions.

• METHODS: C57BL/6J mice were randomly divided into the control group and diabetic retinopathy (DR) model group. The cultured rhesus monkey choroido-retinal endothelial cells (RF/6A cells) were randomly divided into the control group (cultured in low-glucose environment) and the high-glucose group (cultured in medium with 25mmol/L D-glucose), and the AGGF1 protein expression in the cells was detected by

immunofluorescence assay. RF/6A cells were then divided into the control group and AGGF1 treatment group, and cell proliferation, migration and tube formation was detected by CCK-8, Transwell and Matrigel, respectively.

• **RESULTS:** AGGF1 protein was expressed in all layers of the retinas and in vascular endothelial cells. The expression of AGGF1 in the retinas of DR group (0.17 ± 0.05) was significantly higher than that of the control group (0.07 ± 0.02) ($P < 0.05$). AGGF1 protein was expressed in RF/6A cells in both the high glucose group and the control group, and the expression of AGGF1 in RF/6A cells under high glucose was significantly higher (0.63 ± 0.10) than that in the control group (0.40 ± 0.03) ($P < 0.05$). After 12h of treatment, the cell proliferation rate ($114.88\% \pm 0.84\%$) in the AGGF1 group was significantly higher than that in the control group ($100.00\% \pm 2.17\%$) ($P < 0.05$). After 24h of treatment, the cell proliferation rate of the AGGF1 group ($157.35\% \pm 1.89\%$) was significantly higher than that of the control group ($142.77\% \pm 0.50\%$) ($P < 0.05$). After 48h of treatment, the cell proliferation rate of the AGGF1 group ($185.39\% \pm 1.90\%$) was significantly higher than that of the control group ($160.17\% \pm 1.33\%$) ($P < 0.05$). After 12h of treatment, the number of migrated cells (127.00 ± 7.00) in the AGGF1 group was significantly higher than that in the control group (90.33 ± 6.66) ($P < 0.05$). After 12h of treatment, the number of tube formation (33.67 ± 1.15) in the AGGF1 group was significantly higher than that in the control group (15.33 ± 3.51) ($P < 0.05$). The total tube length in AGGF1 group (8226.33 ± 288.55) μm was significantly higher than that in the control group (6463.33 ± 938.01) μm ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The expression of AGGF1 protein was significantly increased in diabetic retinal tissues and retinal vascular endothelial cells induced by high glucose. AGGF1 can promote the proliferation, migration and tube formation of retinal vascular endothelial cells, suggesting that AGGF1 may be involved in retinal neovascularization of DR.

• **KEYWORDS:** AGGF1; diabetic retinopathy; high glucose; retinal endothelial cells; angiogenesis

Citation: Li R, Yao GM, Yan HL, *et al.* Study on the role of angiogenic factor with G patch and FHA domains 1 in diabetic retinal neovascularization. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(9): 1487-1492

0 引言

糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病患者最常见的眼部微血管并发症,也是成年人视力损害的主要原因,常导致视力下降、视野缺损、玻璃体积血,严重者甚至出现牵拉性视网膜脱离,最终失明^[1-2]。DR的主要病理改变包括晚期病理性视网膜新生血管生成,其机制受体内多种血管生成相关因子的影响,继发视网膜脱离和玻璃体积血等是患者视力丧失的主要因素^[3]。随着人们生活质量的提高,DR的患病率不断升高,作为眼科常见的致盲性眼病,目前仍是眼科医师的一个治疗难题。

近年来,临床发现抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)药物治疗视网膜新生血管显示出一定程度的有效性,但抗VEGF药物半衰期短,需频繁眼内玻璃体腔注射,故存在一定的风险^[4]。因此,研究其他参与DR视网膜血管生成的因素对于阐明其病理机制和疾病治疗具有重要意义。G补缀FHA域血管生成因子1(angiogenic factor with G patch and FHA domains 1, AGGF1)是Tian等^[5]在对先天性静脉畸形骨肥大综合征(Klippel-Trenaunay syndrome, KTS)者的研究中新发现的一个具有多个特殊结构域的新基因。AGGF1基因在人体组织器官(脑、眼、心脏等)和细胞中广泛表达。近年来不少研究发现,AGGF1蛋白具有较强的促血管生成作用^[5-8]。然而,目前尚无报道探究AGGF1与DR之间的关系。基于现有的研究我们推测,AGGF1促进血管生成可能在DR的病理机制中发挥着不可忽视的作用。为了证实这一设想,本研究以DR动物模型及视网膜血管内皮细胞为研究对象,观察AGGF1在DR相关病理条件下的表达情况及其对血管生成过程的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 C57BL/6J小鼠购自西安医学院实验动物中心;链尿佐菌素(STZ)购自美国Sigma公司;Dako REAL EnVision Detection System购自丹麦Dako公司;AGGF1抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;恒河猴脉络膜/视网膜内皮细胞(RF/6A细胞)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;1640培养基、胎牛血清、0.25%胰酶均购自美国Gibco公司;DAPI、Triton X-100购自碧云天生物技术有限公司;浓缩型正常山羊血清、荧光(Cy3)标记羊抗兔IgG均购自武汉博士德生物工程有限公司;人AGGF1重组蛋白购自美国Abnova公司;CCK-8细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;Transwell小室、Matrigel基质胶均购自美国BD公司。

1.2 方法

1.2.1 DR动物模型建立 本研究中的动物实验获得了西安医学院伦理委员会的批准,并根据眼科和视力研究动物使用声明(ARVO)进行。取SPF级8周龄的健康雄性C57BL/6J小鼠,适应性饲养1wk。动物房12h/12h昼夜交替,温度23℃~25℃,保持小鼠自由饮水、进食。将12只小鼠随机分成对照组和DR组,各6只。正常组小鼠常规饲养,糖尿病组小鼠造模方法为禁食24h后,精确称量体重,按照100mg/kg的剂量予一次性腹腔注射1% STZ溶液(模型组)或0.1mol/L柠檬酸缓冲液(对照组)。普通饮食,勤加水,勤换垫料。注射72h后,剪掉尾部尖端少许,用血糖仪测量血糖,血糖高于16.7mmol/L视为造模成功。

1.2.2 免疫组化法检测视网膜AGGF1的表达 取小鼠眼球依次经过脱水,透明,浸蜡,包埋,切片,烤片,脱蜡,抗原修复等步骤制作石蜡切片,经过阻断内源性过氧化物酶,血清封闭,AGGF1一抗(1:100)孵育,然后根据显色试剂盒Dako REAL™ En Vision Detection™ System(Peroxidase/DAB+, K5007)说明书进行后续免疫组化染色,最后进行HE复染,脱水,封片。显微镜下拍照,观察AGGF1在视网膜中的表达和分布,使用IPP6.0软件对免疫荧光照片进行光密度分析。

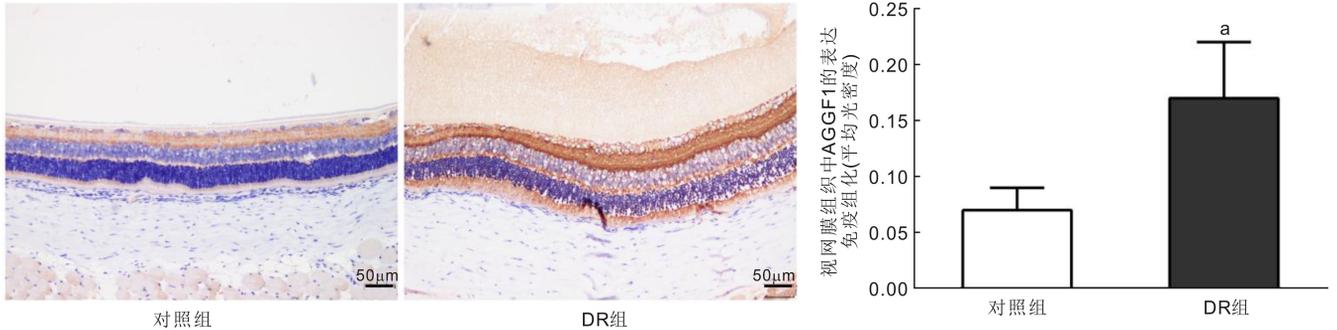


图1 免疫组化染色观察各组视网膜中 AGGF1 的分布与表达 ($\times 200$) 两组视网膜各层均可见 AGGF1 表达 (棕色),与对照组相比,DR 组中表达更强。 $^*P < 0.05$ vs 对照组。

1.2.3 细胞培养及分组 解冻、离心 RF/6A 细胞,用 1640 培养基 (含有 10% 胎牛血清、100U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素) 悬浮细胞,接种到培养皿中吹打混匀,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养。细胞的密度达到 80% 时,对细胞按 1:3 进行传代。将处于对数生长期的细胞用 0.25% 胰酶消化后,用培养基制备单细胞悬液,按照每孔 5×10^5 个将细胞均匀的接种到 6 孔板中,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度条件过夜培养。首先,将 RF/6A 细胞分为对照组、高糖组 (培养基中加入 25mmol/L D-葡萄糖溶液),培养 24h,免疫荧光法观察细胞中 AGGF1 的蛋白表达。其次,将 RF/6A 细胞分为对照组、AGGF1 处理组 (培养基中加入 0.5 μ g/mL AGGF1),分别采用 CCK-8、Transwell 和 Matrigel 检测细胞增殖、迁移及管腔形成。

1.2.4 免疫荧光法检测细胞 AGGF1 的表达 PBS 浸洗已爬好细胞的玻片,4% 的多聚甲醛固定爬片 15min, PBS 浸洗玻片 3 次,0.5% Triton X-100 室温通透 20min, PBS 浸洗玻片 3 次,吸水纸吸干 PBS,在玻片上滴加正常山羊血清,室温封闭 30min;吸水纸吸掉封闭液,每张玻片滴加足够量的稀释的 AGGF1 一抗 (1:100) 并放入湿盒,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBST 浸洗爬片 3 次,吸水纸吸干爬片上多余液体后滴加稀释好的二抗荧光 (Cy3) 标记羊抗兔 IgG (1:100),湿盒中 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, PBST 浸洗切片 3 次,滴加 DAPI 避光孵育 5min,对标本进行染核, PBST 5min \times 4 次洗去多余的 DAPI,吸水纸吸干爬片上的液体,封片后在荧光显微镜下观察采集图像,IPP6.0 软件对照片进行光密度分析。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞增殖 取对数生长期细胞,常规消化离心后,配制成 5×10^4 个/mL 的单细胞悬液,按每孔 100 μ L 接种于 96 孔板,同时设置空白孔,周围孔加入 100 μ L PBS,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度条件过夜培养。根据实验分组处理 12、24、48h,按 CCK-8 试剂盒操作说明进行细胞增殖检测,用自动酶标仪 (德国 eppendorf 公司) 检测 450nm 波长吸光度值 (A)。细胞增殖率 (%) = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{空白对照组}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

1.2.6 Transwell 小室检测细胞迁移 用 1640 培养基重悬细胞,将不同处理组培养 12h 的 RF/6A 细胞密度调整为 2×10^5 /mL,取 200 μ L 细胞悬液置于 Transwell 上室,使其朝着下室迁移。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下孵育 48h,Transwell 膜底部的细胞在 37 $^{\circ}$ C 条件下用 70% 冰乙醇溶液固定 1h,0.5% 结晶紫染液染色 20min。PBS 漂洗膜 3 次后在显微镜下拍照,在 3 个标准视野下计数迁移细胞。

1.2.7 Matrigel 检测细胞管腔形成 按 Matrigel 说明书进行操作。4 $^{\circ}$ C 融化 Matrigel 过夜,取 24 孔板,每孔内缓慢加

入 200 μ L 液态 Matrigel,此操作在冰上进行。消化细胞后,用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基稀释不同处理组培养 12h 的细胞,计数后按照每孔 2×10^5 个将各组细胞接种至预铺有基质胶的 24 孔板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。显微镜拍照,随机取 3 个放大 100 倍的视野 ($\times 100$) 照相,采用 Image J 软件计算管腔数和分支长度,取平均值。

统计学分析:本研究采用 SPSS17.0 软件进行分析,数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间的比较采用独立样本 t 检验,多个时间点的组间差异采用重复测量数据的方差分析,若存在组间差异,进一步采用独立样本 t 检验进行各时间点的组间差异比较,若存在时间差异,进一步采用 LSD- t 检验进行各组的时间差异比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DR 的视网膜中 AGGF1 表达增强 免疫组化结果显示,AGGF1 蛋白在视网膜各层均有表达,在血管内皮细胞中也有明显表达。AGGF1 在 DR 组视网膜中的表达明显强于对照组,两组的平均光密度分别为 (0.17 ± 0.05) 和 (0.07 ± 0.02) ,组间差异具有统计学意义 ($t = -2.89, P < 0.05$,图 1)。

2.2 高糖条件下的 RF/6A 细胞表达 AGGF1 增强 免疫荧光结果显示,AGGF1 蛋白在高糖组和对照组 RF/6A 细胞中均有表达。AGGF1 在高糖下 RF/6A 细胞中的表达明显强于对照组,两组的平均光密度分别为 0.63 ± 0.10 、 0.40 ± 0.03 ,组间差异具有统计学意义 ($t = -3.87, P < 0.05$,图 2)。

2.3 AGGF1 促进 RF/6A 细胞增殖 CCK-8 实验结果显示,对照组处理 12、24、48h 的细胞增殖率分别为 $100.00\% \pm 2.17\%$ 、 $142.77\% \pm 0.50\%$ 、 $160.17\% \pm 1.33\%$; AGGF1 组处理 12、24、48h 的细胞增殖率分别为 $114.88\% \pm 0.84\%$ 、 $157.35\% \pm 1.89\%$ 、 $185.39\% \pm 1.90\%$ 。重复测量数据的方差分析结果显示,各时间点的组间存在差异,各组团间的时间点存在差异 ($F_{\text{时间}} = 7799.16, P_{\text{时间}} < 0.01$; $F_{\text{组间}} = 1033.00, P_{\text{组间}} = 0.001$; $F_{\text{时间} \times \text{组间}} = 83.65, P_{\text{时间} \times \text{组间}} = 0.001$)。进一步采用独立样本 t 检验比较各时间点的组间差异,结果显示各时间点 AGGF1 组的细胞增殖率均明显大于对照组 (12h: $t = -30.72, P < 0.01$; 24h: $t = -12.92, P < 0.01$; 48h: $t = -18.85, P < 0.01$)。进一步 LSD- t 检验进行各组的时间差异比较,结果显示各组不同时间点的差异均具有统计学意义,对照组 24h 的细胞增殖率大于 12h 的增殖率 ($P < 0.01$),48h 细胞增殖率大于 12、24h 的增殖率 (均 $P < 0.01$); AGGF1 组 24h 的细胞增殖率大于 12h 的增殖率 ($P < 0.01$),48h 细胞增殖率大于 12、24h 的增殖率 (均 $P <$

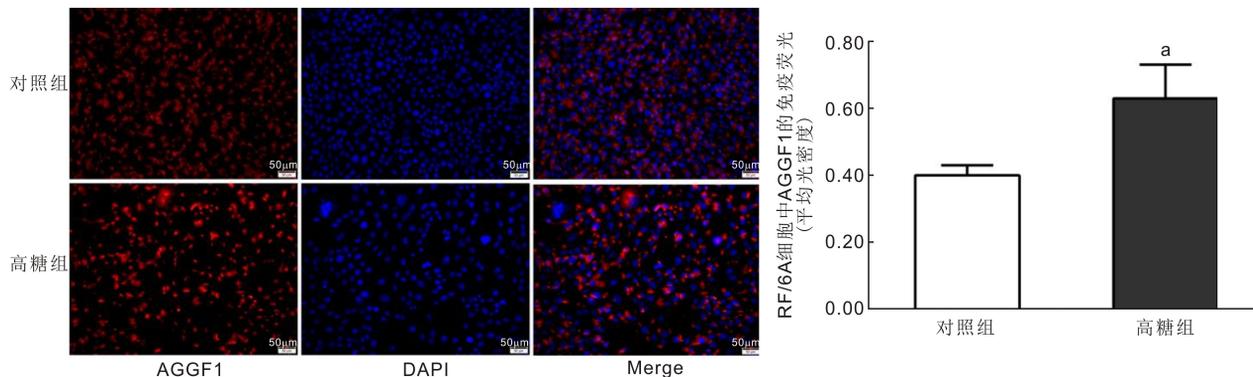


图2 免疫荧光法观察各组 RF/6A 细胞中 AGGF1 的表达($\times 200$) 两组 RF/6A 细胞中均可见 AGGF1 表达(红色),与对照组相比,高糖组中表达更强。^a $P < 0.05$ vs 对照组。

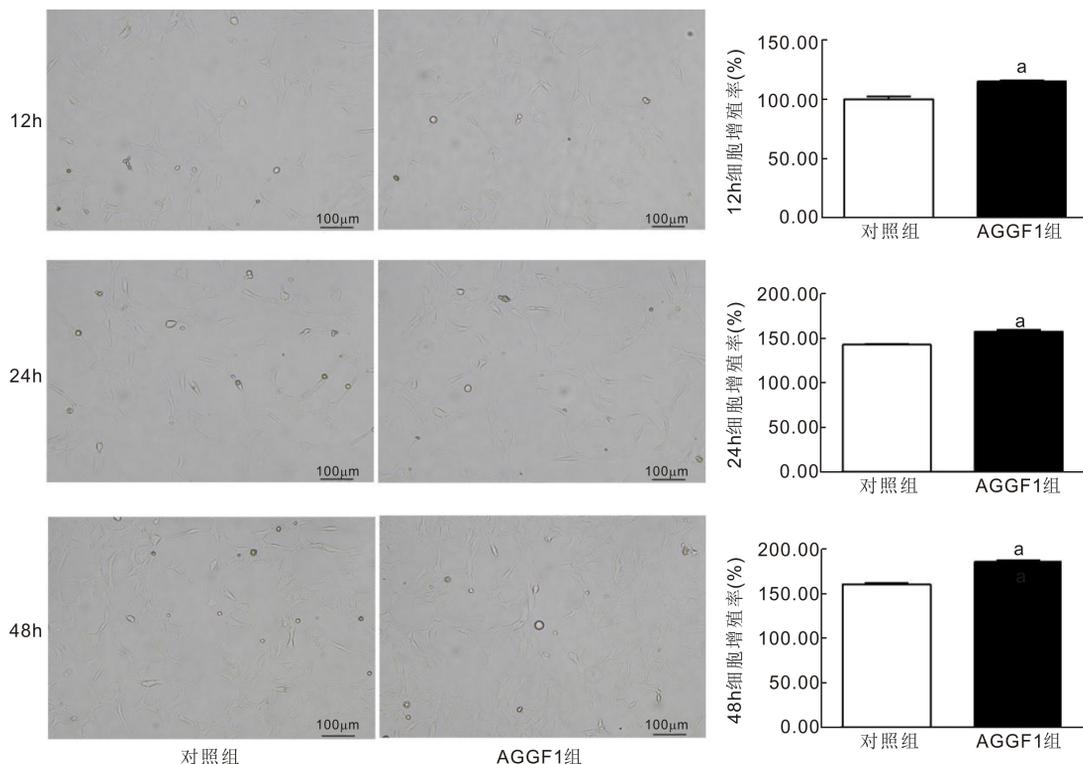


图3 CCK-8 法检测各组 RF/6A 细胞的增殖($\times 100$) 与对照组相比,AGGF1 组 RF/6A 细胞增殖更强。^a $P < 0.05$ vs 对照组。

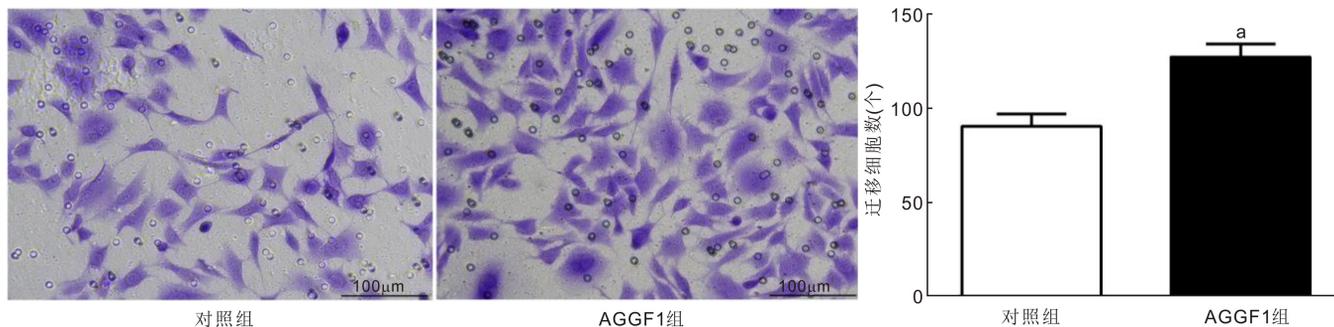


图4 Transwell 法观察各组 RF/6A 细胞的迁移($\times 200$) 与对照组相比,AGGF1 组 RF/6A 细胞迁移数更多。^a $P < 0.05$ vs 对照组。

0.01),见图3。结果提示,随着处理时间的延长,两组细胞增殖率均逐渐增加,在各时间点,AGGF1 处理组的细胞增殖均强于对照组。

2.4 AGGF1 促进 RF/6A 细胞迁移 本部分实验观察了 AGGF1 处理 12h 的 RF/6A 细胞迁移情况。Transwell 实验结果显示,AGGF1 组细胞迁移数(127.00 ± 7.00 个)明显多于对照组(90.33 ± 6.66 个),组间差异具有统计学意义($t = -6.57, P < 0.05$,图4)。结果提示,AGGF1 对 RF/6A 细胞迁移具有明显的促进作用。

2.5 AGGF1 促进 RF/6A 细胞管腔形成 本部分实验观察了 AGGF1 处理 12h 的 RF/6A 细胞管腔形成情况。Matrigel 实验结果显示,AGGF1 组细胞管腔数(33.67 ± 1.15 个)明显多于对照组(15.33 ± 3.51 个),组间差异具有统计学意义($t = -8.59, P < 0.05$);AGGF1 组细胞分支总长度($8226.33 \pm 288.55 \mu\text{m}$)明显多于对照组($6463.33 \pm 938.01 \mu\text{m}$),组间差异具有统计学意义($t = -3.11, P < 0.05$),见图5。结果提示,AGGF1 对 RF/6A 细胞的管腔形成具有明显的促进作用。

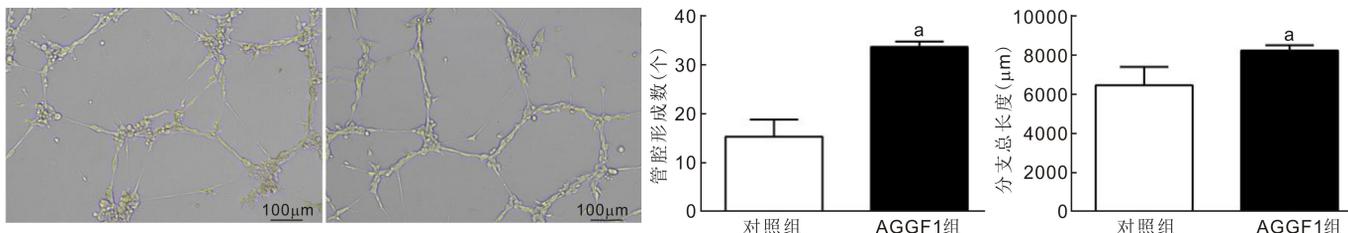


图5 Matrigel法观察各组RF/6A细胞的管腔形成($\times 100$) 与对照组相比,AGGF1组RF/6A细胞管腔形成数更多,^a $P < 0.05$ vs 对照组。

3 讨论

新生血管是由既存的成熟血管的内皮细胞发生增殖、迁移,逐渐重构形成新的小血管的一个多步骤的复杂过程^[9]。血管生成是维持机体需要的基本生理过程,生理条件下促进血管生成和抑制血管生成的因子处于动态平衡,病理条件下,当促新生血管因子增加和/或抑新生血管因子减少时,出现异常的新生血管则会导致一些疾病的发生,如创伤、肿瘤、糖尿病、风湿系统疾病、骨关节炎以及其他缺血性疾病等,而抑制血管生成可延缓和抑制疾病的进展^[10]。糖尿病血管生成是糖尿病基本的病理过程,多种因子参与其中。血管生成受体促血管生成因子和血管生成抑制剂两者的双重调节,其调节过程较为复杂。促血管生成因子主要有VEGF家族、血管生成素家族、碱性成纤维细胞生长因子家族。血管生成抑制剂主要有血管抑素、内皮抑素、转化生长因子 β 、组织金属蛋白酶抑制剂等^[11]。葡萄糖利用多种多样的代谢途径进行加工,慢性高血糖可引起多种细胞变化,导致并发症的发生,因此糖尿病的持续时间和高血糖的严重程度是视网膜病变发生的主要危险因素^[12]。小鼠STZ糖尿病模型^[13]及高糖处理的内皮细胞RF/6A^[14]分别是用于研究DR病理机制及防治策略的常用动物和细胞模型,参照文献方法,本研究利用DR小鼠视网膜和高糖条件下的RF/6A细胞作为观察对象,较好地模拟了DR的病理环境,实验结果为在体内研究DR的治疗靶点提供了可靠的依据。

AGGF1又名VG5Q,是2004年发现的参与血管生成的新基因。在KTS患者的基因组发现,5号染色体和11号染色体之间发生了一个断点异位(5;11)(q13.3;p15.1),这个变化和疾病相关。进一步研究在5号染色体13区3带(5q13.3)断点中发现了新基因AGGF1^[5]。该基因全长34kb,有14个外显子,编码714个氨基酸,所表达蛋白相对分子量81kD。AGGF1的C端含有两个功能保守结构域:FHA(forkhead-associated)和G-patched结构域;其N端含有coiled-coil结构域。在原核生物和真核生物中的200多种蛋白质中都存在FHA结构域,参与包括细胞核内信号转导、转录、蛋白转运、DNA修复和蛋白降解等过程^[15]。在一些RNA结合蛋白或具有RNA结合功能的蛋白中都存在G-patched区域^[16]。AGGF1基因在人体组织中呈现广泛表达模式,其基因和蛋白在人脐静脉内皮细胞和人微血管内皮细胞中都有表达,提示AGGF1与血管形成存在关联^[5]。不过,AGGF1是否也表达于视网膜及视网膜血管内皮细胞、是否与视网膜血管生成有关尚未见报道。鉴于此,本研究同时观察了小鼠视网膜和RF/6A细胞中的AGGF1蛋白表达情况,证实AGGF1视网膜和视网膜内皮细胞中均有表达。在高糖的刺激下,小鼠视网膜及RF/6A细胞表达AGGF1蛋白明显增多,提示其可

能参与了DR的病理过程。

Tian等^[5]将纯化的AGGF1蛋白注射到鸡胚中,发现AGGF1蛋白可与内皮细胞结合,激发内皮细胞的增殖并促进血管生成,且增加的血管数量远高于VEGF带来的效果。Chen等^[6]发现,敲除AGGF1基因可导致斑马鱼胚胎血管发育出现缺陷,且一系列内皮细胞特异表达基因的表达到明显降低;而过量表达AGGF1则导致体节间血管过度出芽,并促进丝状伪足形成,体内AGGF1表达量升高也使内皮细胞特异基因表达上调。AGGF1敲除阻碍斑马鱼静脉血管形成,而过量表达可增加静脉血管直径。近年来肿瘤方面的研究提示AGGF1在恶性肿瘤中呈现过表达,发挥促进癌细胞浸润、迁移以及肿瘤血管生成的作用,AGGF1高表达可以预测癌症的不良预后^[17-18]。以上研究结果均直接证明AGGF1具有强烈的促血管新生功能,但AGGF1在视网膜中是否也具有类似功能还缺乏报道。本研究在证实视网膜内皮细胞可以表达AGGF1蛋白的基础上,进一步观察了AGGF1对RF/6A细胞的增殖、迁移和管腔形成的影响,发现AGGF1可明显促进这些血管生成过程。目前关于AGGF1促血管生成的机制研究较少,认为虽然其效应类似于VEGF,但与VEGF信号通路无关^[5,8]。Tian等^[5]以AGGF1为诱饵进行酵母双杂交实验,发现AGGF1可直接与肿瘤坏死因子家族成员之一TWEAK因子直接相互作用,使TWEAK与其受体fibroblast-growth-factor-inducible 14(Fn14)结合形成三聚体介导血管生成。Chen等^[6]发现,AGGF1可正调控体内AKT的活性,在体内过量表达持续性活性AKT可挽救AGGF1表达下降引起的血管发育缺陷。另外一些研究认为,AGGF1的促血管生成功能与其调控AKT,PI3K,ERK1/2信号通路以及抑制血管炎症有关^[5-6,19-20]。然而,AGGF1以何种机制参与了DR的视网膜血管生成还需要进一步研究。

有关AGGF1的应用方面,Lu等^[7]发现注射到单侧下肢缺血小鼠腓肠肌的真核表达质粒能够成功转录生成AGGF1 mRNA并翻译成AGGF1蛋白,AGGF1的高表达可增加缺血后肢的血流流速,抑制缺血引起的组织坏死,加速缺血的腓肠肌的血管新生。在心血管疾病方面,缺氧后小鼠心脏内皮细胞和人脐静脉血管内皮细胞的AGGF1 mRNA和蛋白表达增加。急性心肌梗死后,小鼠心肌组织AGGF1的mRNA和蛋白表达增加。AGGF1可促进血管生成,抑制心肌细胞凋亡。静脉注射纯化的重组AGGF1蛋白治疗急性心肌梗死可以明显降低小鼠死亡率,并显著提高其心脏功能^[8]。上述这些研究结果提示,AGGF1在针对缺血性疾病的治疗方面具有很好的应用前景。持续性高血糖是DR发展的主要刺激因素^[21],而局部缺血、缺氧是形成视网膜新生血管形成的先决条件^[22]。虽然本研究

提示 AGGF1 可能与 DR 的病理机制相关,而 AGGF1 具有直接促进血管形成的效应,但 AGGF1 在 DR 疾病不同时期中的作用还不清楚。结合文献和本研究结果我们推测,一方面在视网膜缺血缺氧前给予 AGGF1 治疗,可通过促血管生成减小视网膜无灌注区,进而间接减小视网膜新生血管形成的风险;另一方面,在视网膜新生血管形成期将 AGGF1 作为重要靶点进行干预,可能直接减少病理性视网膜新生血管形成。总之,本研究揭示 AGGF1 在糖尿病视网膜血管生成方面具有重要调节作用,本结果将有助于为 DR 机制的深入研究以及血管靶向药物的进一步研发提供新思路。

参考文献

- 1 邵毅,周琼.糖尿病视网膜病变诊治规范-2018年美国眼科学会临床指南解读.眼科新进展 2019;39(6):501-506
- 2 Hendrick AM, Gibson MV, Kulshreshtha A. Diabetic Retinopathy. *Prim Care* 2015;42(3):451-464
- 3 Li YY, Yang XF, Gu H, et al. The relationship between insulin resistance/ β -cell dysfunction and diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus: the Desheng Diabetic Eye Study. *Int J Ophthalmol* 2018;11(3):493-500
- 4 Schargus M, Frings A. Issues with intravitreal administration of anti-VEGF drugs. *Clin Ophthalmol* 2020;14:897-904
- 5 Tian XL, Kadaba R, You SA, et al. Identification of an angiogenic factor that when mutated causes susceptibility to klippel-trenaunay syndrome. *Nature* 2004;427(6975):640-645
- 6 Chen D, Li L, Tu X, et al. Functional characterization of Klippel-Trenaunay syndrome gene AGGF1 identifies a novel angiogenic signaling pathway for specification of vein differentiation and angiogenesis during embryogenesis. *Hum Mol Genet* 2013;22(5):963-976
- 7 Lu Q, Yao Y, Yao Y, et al. Angiogenic factor AGGF1 promotes therapeutic angiogenesis in a mouse limb ischemia model. *PLoS One* 2012;7(10):e46998
- 8 Lu Q, Yao Y, Hu Z, et al. Angiogenic factor AGGF1 activates autophagy with an essential role in therapeutic angiogenesis for heart disease. *PLoS Biol* 2016;14(8):e1002529
- 9 Ibrahim M, Richardson MK. Beyond organoids: *In vitro* vasculogenesis and angiogenesis using cells from mammals and zebrafish. *Reprod Toxicol*

- 2017;73:292-311
- 10 Ding Y, Hu Z, Luan J, et al. Protective effect of miR-200b/c by inhibiting vasohibin-2 in human retinal microvascular endothelial cells. *Life Sci* 2017;191:245-252
- 11 王达,冯颖,张慧娟.糖尿病血管生成相关因子的研究进展.医学综述 2018;24(6):1168
- 12 Hammes HP. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. *Diabetologia* 2018;61(1):29-38
- 13 Lee SH, Yang JY, Madrahimov S, et al. Adeno-associated viral vector 2 and 9 transduction is enhanced in streptozotocin-induced diabetic mouse retina. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2018;13:55-66
- 14 Song G, Lin D, Bao L, et al. Effects of high glucose on the expression of LAMA1 and biological behavior of choroid retinal endothelial cells. *J Diabetes Res* 2018;2018:7504614
- 15 Almawi AW, Matthews LA, Guarné A. FHA domains: Phosphopeptide binding and beyond. *Prog Biophys Mol Biol* 2017;127:105-110
- 16 Aravind L, Koonin EV. G-patch: A new conserved domain in eukaryotic RNA-processing proteins and type D retroviral polyproteins. *Trends Biochem Sci* 1999;24(9):342-344
- 17 Wang W, Li GY, Zhu JY, et al. Overexpression of AGGF1 is correlated with angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* 2015;32(4):131
- 18 Yao HH, Wang BJ, Wu Y, et al. High expression of angiogenic factor with G-patch and FHA domain1 (AGGF1) predicts poor prognosis in gastric cancer. *Med Sci Monit* 2017;23:1286-1294
- 19 Zhang T, Yao Y, Wang J, et al. Haploinsufficiency of Klippel-Trenaunay syndrome gene Aggf1 inhibits developmental and pathological angiogenesis by inactivating PI3K and AKT and disrupts vascular integrity by activating VE-cadherin. *Hum Mol Genet* 2016;25(23):5094-5110
- 20 Hu FY, Wu C, Li Y, et al. AGGF1 is a novel anti-inflammatory factor associated with TNF- α -induced endothelial activation. *Cell Signal* 2013;25(8):1645-1653
- 21 Sahajpal NS, Goel RK, Chaubey A, et al. Pathological perturbations in diabetic retinopathy: hyperglycemia, AGEs, oxidative stress and inflammatory pathways. *Curr Protein Pept Sci* 2019;20(1):92-110
- 22 Aouiss A, Anka Idrissi D, Kabine M, et al. Update of inflammatory proliferative retinopathy: Ischemia, hypoxia and angiogenesis. *Curr Res Transl Med* 2019;67(2):62-71