

视网膜血管内皮细胞高糖模型糖浓度及培养时间的筛选

张凤久,张丽敏,林安岭,彭向东,刘兵,杨建玲,于玲燕,王海明

基金项目:国家自然科学基金(No. 61465001)

作者单位:(024000)中国内蒙古自治区赤峰市,赤峰学院附属医院眼科

作者简介:张凤久,男,主治医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:张丽敏,女,硕士,主任医师,研究方向:眼底病。
zlj1237@126.com

收稿日期:2016-08-07 修回日期:2016-12-01

Filtering glucose concentration and culture time of Wistar rat retinal vascular endothelial cells in high glucose model

Feng - Jiu Zhang, Li - Min Zhang, An - Ling Lin, Xiang - Dong Peng, Bing Liu, Jian - Ling Yang, Ling - Yan Yu, Hai - Ming Wang

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 61465001)

Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Chifeng College, Chifeng 024000, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Correspondence to: Li - Min Zhang. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Chifeng College, Chifeng 024000, Inner Mongolia Autonomous Region, China. zlj1237@126.com

Received:2016-08-07 Accepted:2016-12-01

Abstract

• **AIM:** To filter glucose concentration and culture time of Wistar rat retinal vascular endothelial cells (RVEC) in high glucose model.

• **METHODS:** Primary culture of RVEC of Wistar rats with 1-3d of birth, VIII factor antibody immunohistochemistry to identify the cells; Establishment 0mmol/L glucose as a control group (group C), at different concentrations of glucose intervention in turn divided into 10mmol/L (group A), 15mmol/L (group B), 25mmol/L (group D), 35mmol/L (group F), MTT assay was used to detect cell OD values of each group and each group was detected by flow cytometry apoptosis rate were at three time points: 24, 48, 72h.

• **RESULTS:** RVEC purity was 94%. Effect of different concentrations of glucose in Wistar rat RVEC by MTT assay: after 24h culture, OD value of experimental group decreased, but the difference was not statistically significant ($F = 0.42, P = 0.7411$); after 48h culture, OD value of the difference between the groups was statistically significant ($F = 45.2, P = 0.000$), pairwise comparison between the five groups, except among groups A, B, C group no difference was not statistically significant external ($Q_{48AB} = 44.0427, Q_{48AC} = 36.4701, Q_{48BC} =$

27.7953, all $P > 0.05$), the remaining pairwise comparisons were statistically significant difference between groups ($Q_{48CD} = 11.0715, Q_{48AD} = 14.0794, Q_{48AF} = 12.2964, Q_{48BD} = 23.4698, Q_{48BF} = 12.7016, Q_{48DF} = 10.2013$, all $P < 0.05$; $Q_{48CF} = 6.4701, P < 0.01$). After 72h culture, OD value of each group compared to the difference was statistically significant ($F = 37.46, P = 0.000$), pairwise comparisons among five groups, the same A, B, C no difference among the three groups was not statistically significant ($Q_{72AB} = 27.7338, Q_{72AC} = 25.0054, Q_{72BC} = 33.3797$, all $P > 0.05$), the rest of the group differences were statistically significant ($Q_{72AD} = 13.4793, Q_{72BD} = 12.7546$, both $P < 0.05$; $Q_{72CD} = 7.3743, Q_{72CF} = 8.3465, Q_{72AF} = 4.7455, Q_{72BF} = 3.9471, Q_{72DF} = 3.2649$, all $P < 0.01$). Effect of different concentrations of glucose on RVEC apoptosis rate: after 24h culture, Differences between groups was not statistically significant ($P > 0.05$). After 48h culture, pairwise comparison among five groups, $Q_{48AB} = 31.1704, Q_{48AC} = 33.5947, Q_{48BC} = 29.3968, Q_{48AD} = 30.4097, Q_{48BD} = 28.8164$, both $P > 0.05$; $Q_{48CD} = 12.5032, Q_{48AF} = 11.7531, Q_{48BF} = 14.1076, Q_{48DF} = 13.9372$, both $P < 0.05$; $Q_{48CF} = 7.0953, P < 0.01$. After 72h culture, pairwise comparison among five groups, $Q_{72AB} = 26.3392, Q_{72AC} = 24.9142, Q_{72BC} = 30.2976$, both $P > 0.05$, the rest of the group differences were statistically significant (where $Q_{72AD} = 14.1983, Q_{72BD} = 12.9356$, both $P < 0.05$; $Q_{72CD} = 6.8752, Q_{72CF} = 7.6745, Q_{72AF} = 5.0545, Q_{72BF} = 4.0741, Q_{72DF} = 3.8876$, both $P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** Best glucose concentration and the time is 25 mmol/L and 48h, for RVEC high sugar model.

• **KEYWORDS:** rat; retinal vascular endothelial cells; high glucose model; glucose concentration; incubation time

Citation: Zhang FJ, Zhang LM, Lin AL, et al. Filtering glucose concentration and culture time of Wistar rat retinal vascular endothelial cells in high glucose model. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(1):30-33

摘要

目的: 筛选 Wistar 大鼠视网膜血管内皮细胞 (retinal vascular endothelial cells, RVEC) 高糖模型糖浓度及培养时间。

方法: 取出生 1~3d 的 Wistar 大鼠, 分离 RVEC 进行原代培养, VIII 因子抗体免疫组化鉴定细胞; 设立葡萄糖浓度 0mmol/L 为正常对照组 (C 组), 按不同葡萄糖浓度依次分为 10mmol/L (A 组)、15mmol/L (B 组)、25mmol/L (D 组)、35mmol/L (F 组), 分别在 24、48、72h 的 3 个时间点用 MTT 法检测各组细胞 OD 值, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

结果: RVEC 纯度达 94%; MTT 法检测不同浓度葡萄糖对 Wistar 大鼠 RVEC 的影响: 培养 24h, 各组的 OD 值比较差

异无统计学意义 ($F = 0.42, P = 0.7411$); 培养 48h, 五组 OD 值比较差异有统计学意义 ($F = 45.2, P = 0.000$), 五组间两两比较, 除 A 组、B 组、C 组间差异无统计学意义外 ($Q_{48AB} = 44.0427, Q_{48AC} = 36.4701, Q_{48BC} = 27.7953$, 均 $P > 0.05$), 其余各组两两比较差异均有统计学意义 (其中 $Q_{48CD} = 11.0715, Q_{48AD} = 14.0794, Q_{48AF} = 12.2964, Q_{48BD} = 23.4698, Q_{48BF} = 12.7016, Q_{48DF} = 10.2013$, 均 $P < 0.05$; $Q_{48CF} = 6.4701, P < 0.01$)。培养 72h 后, 五组 OD 值比较差异有统计学意义 ($F = 37.46, P = 0.000$), 五组间两两比较, 同样 A、B、C 三组间差异无统计学意义 ($Q_{72AB} = 27.7338, Q_{72AC} = 25.0054, Q_{72BC} = 33.3797$, 均 $P > 0.05$), 其余各组差异均有统计学意义 (其中 $Q_{72AD} = 13.4793, Q_{72BD} = 12.7546$, 均 $P < 0.05$; $Q_{72CD} = 7.3743, Q_{72CF} = 8.3465, Q_{72AF} = 4.7455, Q_{72BF} = 3.9471, Q_{72DF} = 3.2649$, 均 $P < 0.01$)。不同浓度葡萄糖在不同时间点对 RVEC 凋亡率的影响: 培养 24h 后各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。培养 48h 后, 五组间两两比较, $Q_{48AB} = 31.1704, Q_{48AC} = 33.5947, Q_{48BC} = 29.3968, Q_{48AD} = 30.4097, Q_{48BD} = 28.8164$, 均 $P > 0.05$; $Q_{48CD} = 12.5032, Q_{48AF} = 11.7531, Q_{48BF} = 14.1076, Q_{48DF} = 13.9372$, 均 $P < 0.05$; $Q_{48CF} = 7.0953, P < 0.01$ 。培养 72h 后, 五组间两两比较, $Q_{72AB} = 26.3392, Q_{72AC} = 24.9142, Q_{72BC} = 30.2976$, 均 $P > 0.05$, 其余各组差异均有统计学意义 (其中 $Q_{72AD} = 14.1983, Q_{72BD} = 12.9356$, 均 $P < 0.05$; $Q_{72CD} = 6.8752, Q_{72CF} = 7.6745, Q_{72AF} = 5.0545, Q_{72BF} = 4.0741, Q_{72DF} = 3.8876$, 均 $P < 0.01$)。

结论: 葡萄糖浓度为 25mmol/L 培养 48h 是 RVEC 高糖模型最佳葡萄糖浓度及干预时间。

关键词: 大鼠; 视网膜血管内皮细胞; 高糖模型; 葡萄糖浓度; 培养时间

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.1.07

引用: 张凤久, 张丽敏, 林安岭, 等. 视网膜血管内皮细胞高糖模型糖浓度及培养时间的筛选. 国际眼科杂志 2017;17(1):30-33

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是世界范围内主要的致盲眼病, 视网膜血管内皮细胞 (retinal vascular endothelial cells, RVEC) 的病理变化是视网膜功能变化的基础, 不同器官内的血管内皮细胞有其一些特性^[1], 因此不能用大血管内皮细胞来代替。在体外建立 RVEC 高糖模型, 模拟体内糖尿病微环境, 排除体内其它因素的干扰, 更直接地观察细胞的变化, 是体内动物实验所不能替代的^[2]。因此本实验筛选适宜的葡萄糖浓度及培养时间, 为后续的改善高糖状态下 RVEC 生理功能的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 出生 1~3d Wistar 大鼠 20 只 (赤峰学院医学院实验动物学部, SPF 级动物实验室, 所有动物相关的实验过程均在赤峰学院实验动物伦理委员会的监督和指导下完成, 符合实验动物的伦理学要求), D-Hanks 液 (美国 Gibco 公司), 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司), DMEM 培养液 (美国 Gibco 公司), 新生牛血清 (美国 Gibco 公司), 磁珠 (美国 Dynabeads 公司), 胰酶 (Gibco, US), 葡萄糖 (美国 Sigma 公司), 细胞凋亡试剂盒 (美国 Sigma 公司)。兔抗大鼠 Factor VIII 多克隆抗体 (美国 Gibco 公司), FITC 标记

羊抗兔二抗 (武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 Wistar 大鼠 RVEC 提取及纯化培养 取出生 1~3d 的 Wistar 乳鼠引颈处死, 头部常规消毒, 于超净工作台上迅速摘除眼球, 去除晶状体和玻璃体, 钝性分离出完整视网膜组织, 在冰 D-Hank 液中展平视网膜, 剪除肉眼可见的视网膜大血管分支及部分色素组织, 将剩余视网膜组织充分剪碎, 200 目筛网过滤, 收集网上组织置入 15mL 离心管中, 加含 0.1% EDTA 的胰蛋白酶 3mL, 37℃ 水浴 3~5min, 800r/min 离心 5min, 弃胰蛋白酶再加入 0.5% II 型胶原酶 5mL, 37℃ 水浴 30min, 300 目筛网过滤, 磁珠免疫法分离 RVEC 细胞^[3], 然后加入 DMEM 完全培养基 8mL (含 10% FBS, 1% ECGs, 1% 青链双抗, 50μg/mL 肝素), 反复吹打均匀后, 接种于 0.5% 明胶包被的 T25 培养瓶中, 置入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。24h 后观察细胞贴壁情况, 换液去除部分不贴壁细胞, 重新悬浮细胞并计数, 调整细胞密度至 5×10^5 , 48h 再次换液, 倒置相差显微镜下观察并记录细胞生长情况。将传代培养 7d 的 RVEC 接种于放有载玻片的培养皿中, 至细胞爬满载玻片 80% 时弃培养液, PBS 液清洗 2 遍, 4% 多聚甲醛室温固定 1h, PBS 清洗 3 遍, 加封闭液 (含 0.1% Triton X-100、0.05% 吐温-20 和 1% BSA) 孵育 2h, 滴加 50:1 兔抗大鼠因子 VIII 多克隆抗体 (1:50 稀释), 阴性对照以 PBS 代替一抗, 4℃ 过夜, PBS 清洗 3 遍, 滴加 FITC 标记羊抗兔二抗 (1:50 稀释), 37℃ 孵育 1h, PBS 甘油封片后荧光显微镜下观察^[4]。纯度检测方法在光学显微镜下观察并记录, 每张盖玻片随机连续观察 5 个高倍视野, 每处视野计数各细胞中染色阳性细胞数, 计算各视野中阳性细胞率, 计算公式为 RVEC 比例 = RVEC 数/细胞总数。重复 3 次, 求平均值。

1.2.2 RVEC 高糖浓度分组及检验方法 同期原代培养 RVEC 24 孔培养板 5 板, 细胞密度均为 5×10^5 。分别设立 A 组, 培养液葡萄糖浓度为 10mmol/L, B 组培养液葡萄糖浓度为 15mmol/L, C 组培养液葡萄糖浓度为 0mmol/L (正常对照组), D 组培养液葡萄糖浓度为 25mmol/L, E 组培养液葡萄糖浓度为 35mmol/L。分别在 24、48、72h 的 3 个时间点, 向各孔加入 MTT 溶液 (0.5mg/mL) 20μL 后继续培养 4h, 然后小心吸弃孔内上清, 加入 DMSO 100μL, 室温振荡使结晶完全溶解, 在酶标仪上检测 570nm 处的光密度值 (OD 值)。实验重复 3 次, 取其均值。同样在相应的时间点在培养孔内加入胰酶 2.5g/L 胰酶 200μL, 倒置显微镜下见细胞收缩后 10% 胎牛血清终止反应。轻轻吹打使细胞脱壁, 取出培养基后 1000r/min 离心收集, 弃上清, PBS 洗涤。再离心, 反复 3 次后, 细胞沉淀以少量 PBS 反复吹散成单细胞悬液。用 250μL 结合缓冲液重新悬浮细胞, 调节其浓度为 1×10^6 个/mL, 取 100μL 细胞悬液于 5μL 流式管中, 加入 1μL Annexin/PI 和 5μL 20μg/mL 的碘化丙锭溶液, 混匀后室温避光孵育 15min, 在反应管中加入 400μL PBS, 流式细胞仪分析细胞凋亡^[5]。

统计学分析: 采用 SPSS 16.0 统计软件包对实验数据进行统计分析, 计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。所有数据在完成方差齐性检验后进行重复测量方差分析, 多个样本均数间采用两两比较的 SNK-q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Wistar 大鼠 RVEC 原代培养形态学观察 倒置显微镜观察分离培养细胞,大部分细胞于接种 24h 后贴壁,早期 RVEC 多为平棱形,细胞散在分布,呈单层排列,48h 后细胞多为梭形、三角形或多角形,边界清楚,少量呈铺路石样螺旋向外生长,3~5d 细胞生长融合,多呈簇状单层分布(图1)。经 VIII 因子抗体免疫组织化学染色为阳性(图2)。RVEC 比例达 94%。

2.2 MTT 法检测不同浓度葡萄糖对 Wistar 大鼠 RVEC 的影响 对各时间点的五组 OD 值进行方差齐性检验,符合方差齐性。结果发现,培养 24h,各组的 OD 值比较差异无统计学意义($F=0.42, P=0.7411$),培养 48h,五组 OD 值比较差异有统计学意义($F=45.2, P=0.000$),五组间两两比较,除 A 组、B 组、C 组间差异无统计学意义外($Q_{48AB}=44.0427, Q_{48AC}=36.4701, Q_{48BC}=27.7953$,均 $P>0.05$),其余各组两两比较差异均有统计学意义(其中 $Q_{48CD}=11.0715, Q_{48AD}=14.0794, Q_{48AF}=12.2964, Q_{48BD}=23.4698, Q_{48BF}=12.7016, Q_{48DF}=10.2013$,均 $P<0.05$; $Q_{48CF}=6.4701, P<0.01$)。培养 72h 后,五组 OD 值比较差异有统计学意义($F=37.46, P=0.000$),五组间两两比较,同样 A、B、C 三组间差异无统计学意义($Q_{72AB}=27.7338, Q_{72AC}=25.0054, Q_{72BC}=33.3797$,均 $P>0.05$),其余各组差异均有统计学意义(其中 $Q_{72AD}=13.4793, Q_{72BD}=12.7546$,均 $P<0.05$; $Q_{72CD}=7.3743, Q_{72CF}=8.3465, Q_{72AF}=4.7455, Q_{72BF}=3.9471, Q_{72DF}=3.2649$,均 $P<0.01$,表1)。

2.3 不同浓度葡萄糖在不同时间点对 RVEC 凋亡率的影响 利用 Annexin/PI 荧光双染、流式细胞分析结果表明,在各个时间点对五组进行方差齐性检验,结果均符合方差齐性,然后进行方差分析发现,在各个时间点,各组总体均数均不相等($F_{24}=8.34, F_{48}=14.56, F_{72}=22.03, P<0.05$)。再对组间进行样本均数的两两比较,结果发现培养 24h 后各组间差异无统计学意义($P>0.05$)。培养 48h 后,五组间两两比较, $Q_{48AB}=31.1704, Q_{48AC}=33.5947, Q_{48BC}=29.3968, Q_{48AD}=30.4097, Q_{48BD}=28.8164$,均 $P>0.05$; $Q_{48CD}=12.5032, Q_{48AF}=11.7531, Q_{48BF}=14.1076, Q_{48DF}=13.9372$,均 $P<0.05$; $Q_{48CF}=7.0953, P<0.01$ 。培养 72h 后,五组间两两比较, $Q_{72AB}=26.3392, Q_{72AC}=24.9142, Q_{72BC}=30.2976$,均 $P>0.05$,其余各组差异均有统计学意义(其中 $Q_{72AD}=14.1983, Q_{72BD}=12.9356$,均 $P<0.05$; $Q_{72CD}=6.8752, Q_{72CF}=7.6745, Q_{72AF}=5.0545, Q_{72BF}=4.0741, Q_{72DF}=3.8876$,均 $P<0.01$,表2)。

3 讨论

体内高糖是 DR 的发病过程中一个最重要的因素。RVEC 在调节血管生理状态、释放血管活性物质以及新生血管的形成中发挥着重要作用^[6],高血糖导致 RVEC 数量减少及功能紊乱的主要原因,其分子机制可能涉及多条细胞内信号通路如 PI3K/AKT 通路、P53 依赖性通路和 p38MAPK 等信号转导途径的异常改变,导致 NADPH 氧化酶的活性增强, eNOS 生成减少及 NO 生物利用度的降低等,这些过程影响 RVEC 对过氧化应激的敏感性增高,进而导致细胞存活能力的下降,并可以导致 RVEC 衰老及内分泌功能下降等功能障碍^[7]。因此体外分离培养 RVEC 对研究视网膜血管性疾病发生发展的病理生理机制以及疾病的早期防治具有重要的临床意义。

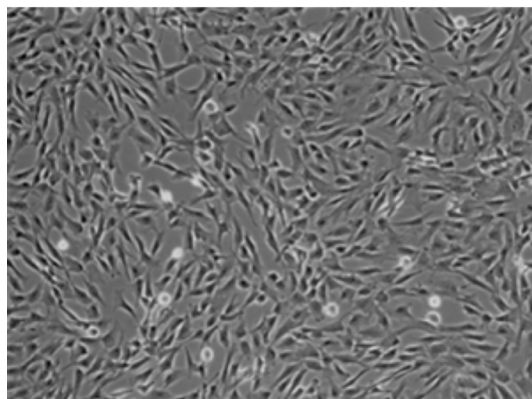


图1 倒置显微镜下观察 Wistar 大鼠 RVEC(200x)。

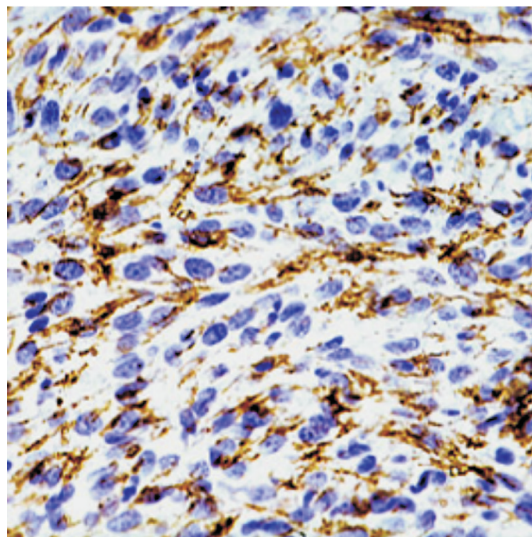


图2 Wistar 大鼠 RVEC VIII 因子抗体免疫组织化学染色(200x)。

表1 MTT 法检测不同浓度葡萄糖对 Wistar 大鼠 RVEC 的影响

组别	OD 值		
	24h	48h	72h
A 组	0.507±0.040	0.603±0.041	0.372±0.038
B 组	0.496±0.019	0.476±0.035	0.211±0.018
C 组	0.513±0.045	0.635±0.052	0.770±0.059
D 组	0.481±0.022	0.314±0.030	0.180±0.017
E 组	0.468±0.024	0.246±0.024	0.165±0.018

注:A 组:葡萄糖浓度为 10mmol/L;B 组:葡萄糖浓度为 15mmol/L;C 组:葡萄糖浓度为 0mmol/L(正常对照组);D 组:葡萄糖浓度为 25mmol/L;E 组:葡萄糖浓度为 35mmol/L。

表2 不同浓度葡萄糖在不同时间点对 RVEC 凋亡率的影响

组别	凋亡率 (%)		
	24h	48h	72h
A 组	0.457±0.054	1.484±0.152	4.364±1.518
B 组	0.494±0.059	3.467±1.213	6.322±2.138
C 组	0.392±0.047	1.081±0.097	3.258±0.945
D 组	0.553±0.057	5.964±1.915	20.587±5.619
E 组	1.372±0.123	18.432±3.597	40.674±10.547

注:A 组:葡萄糖浓度为 10mmol/L;B 组:葡萄糖浓度为 15mmol/L;C 组:葡萄糖浓度为 0mmol/L(正常对照组);D 组:葡萄糖浓度为 25mmol/L;E 组:葡萄糖浓度为 35mmol/L。

国内外许多学者都关注 DR 中的 RVEC 的病理变化,做过大量的体外 RVEC 高糖环境下培养实验^[8-9],但都没有把高糖浓度的变化对 RVEC 的影响做详细的实验研究,仅有学者研究体外培养时 20~30mmol/L 的高糖浓度可近似地等同于糖尿病时体内高糖状态^[10]。本实验采用 0~35mmol/L 之间的不同浓度的葡萄糖分别培养 RVEC,选择 MTT 实验及流式细胞仪观察不同浓度葡萄糖对 RVEC 凋亡率的影响。结果显示 10mmol/L 葡萄糖组及 15mmol/L 葡萄糖组与对照组各时间点 OD 值比较无差异,其它组随葡萄糖浓度增加及时间延长 OD 值降低,RVEC 存活率下降,其中 25mmol/L 葡萄糖浓度培养 48h 的 RVEC 与正常对照组比较 OD 值差异有统计学意义($P<0.05$),此时细胞抑制不是非常明显;而 35mmol/L 葡萄糖浓度培养 48h 的 RVEC 与正常对照组比较 OD 值,差异有显著统计学意义($P<0.01$),细胞凋亡数量明显增加。通过流式细胞仪检测凋亡结果显示 10mmol/L 及 15mmol/L 葡萄糖组与对照组各时间点凋亡率比较无差异,其它组随葡萄糖浓度增加及时间延长,RVEC 凋亡率明显增加,其中 25mmol/L 葡萄糖浓度培养 48h 神经元凋亡率与正常对照组比较差异显著,但细胞凋亡率仅为 6% 左右。而 35mmol/L 组在培养 48h 时神经元凋亡率超过 18%,细胞不利于后续实验研究。

所以,从培养基葡萄糖浓度上来看,葡萄糖浓度较低(10mmol/L、15mmol/L)时对细胞影响较小,葡萄糖浓度较高(35mmol/L)时对细胞凋亡太明显亦不利于后续实验研究;在干预时间上,24h 细胞生长抑制不明显;在 72h 时,干预时间太长,细胞生长凋亡太大,亦不利于后续实验。

通过这两种方法检测分析,最后确定葡萄糖浓度为 25mmol/L 培养 48h 是 RVEC 高糖模型最佳葡萄糖浓度及干预时间。

参考文献

- 1 刘荣,李斌,胡维琨,等. 高糖环境诱导视网膜细胞衰老的实验研究. 中华实验眼科杂志 2014;32(11):970-974
- 2 李晶艳,周琦,吕红彬,等. 糖尿病早期视网膜神经元退行性病变最新研究进展. 眼科新进展 2015;35(5):493-496
- 3 毛羽翔,林少芬,曾美珍,等. 改良的人视网膜血管内皮细胞的培养与鉴定方法. 中华实验眼科杂志 2013;31(1):8-12
- 4 庄森,殷丽,秦时月,等. 组织块半悬浮培养法分离培养大鼠视网膜血管内皮细胞. 眼科新进展 2015;35(7):605-607
- 5 吴建勇,赵德璋. 流式细胞仪检测细胞凋亡的几种方法的比较. 重庆医科大学学报 2010;35(9):1386-1389
- 6 Stewart EA, Wei R, Branch MJ, et al. Expression of Toll-like receptors in human retinal and choroidal vascular endothelial cells. *Exp Eye Res* 2015;138:114-123
- 7 Han XX, Guo CM, Li Y, et al. Effects of bevacizumab on the neovascular membrane of proliferative diabetic retinopathy: reduction of endothelial cells and expressions of VEGF and HIF-1 α . *Mol Vis* 2012;18(1):1-9
- 8 邵珺,姚勇. 高糖缺氧环境下转甲状腺素蛋白对视网膜血管内皮细胞的影响. 中华眼底病杂志 2016;32(2):159-162
- 9 Ahmadreza M, Yasir JS, Mohammad AS, et al. Vascular endothelial growth factor trap-eye (Aflibercept) for the management of diabetic macular edema. *World J Diabetes* 2013;4(6):303-309
- 10 韦艳,李红,苏晓庆,等. 白藜芦醇对高糖环境下视网膜血管内皮细胞增殖及 HMGB1 乙酰化的影响. 国际眼科杂志 2015;15(12):2049-2051