

论著·实验研究

骨髓间充质干细胞移植对氧诱导视网膜病变 新生大鼠视网膜新生血管的影响

牟青杰¹ 赵月华⁴ 程丹丹² 王海宇² 陈岚芬² 赵岩松³ 王晓莉²

(潍坊医学院 1. 临床医学院; 2. 医学影像学系, 山东 潍坊 261053;
潍坊医学院附属医院 3. 眼科; 4. 儿科, 山东 潍坊 261031)

【摘要】 **目的** 探讨大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)移植对氧诱导视网膜病变(OIR)新生大鼠视网膜新生血管的影响,并观察视网膜缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)表达的变化,为BMSC临床治疗OIR提供可靠的理论依据。**方法** 将72只7日龄Sprague-Dawley新生大鼠随机分为正常对照组、模型组(OIR组)与BMSC移植组(BMSC组)。体外培养BMSC,采用氧诱导法制成OIR模型,持续高氧5d后,BMSC组行玻璃体内注射大鼠BMSC。移植后7d,采用视网膜铺片法、苏木精-伊红染色(HE)法检测BMSC移植对OIR新生大鼠视网膜新生血管的影响;免疫组化结合Western blot法观察BMSC对OIR新生大鼠视网膜HIF-1 α 及VEGF蛋白表达的影响。**结果** 视网膜铺片结果示正常对照组视网膜血管排列整齐,而OIR组血管排列紊乱,可见大片无灌注区,BMSC组仅可见大血管稍迂曲,血管排列较规整,无灌注区明显减少;HE染色发现OIR组视网膜内界膜可见大量新生血管及视网膜前新生血管细胞(Pre-RNC),BMSC组视网膜内界膜新生血管明显减少,且pre-RNC数显著少于OIR组($P<0.01$);免疫组织化学结果示OIR组HIF-1 α 阳性与VEGF阳性细胞数显著多于正常对照组,而BMSC组HIF-1 α 阳性与VEGF阳性细胞数均显著少于OIR组($P<0.05$)。Western blot结果示OIR组HIF-1 α 与VEGF蛋白表达显著高于正常对照组,而BMSC组HIF-1 α 与VEGF蛋白表达显著低于OIR组($P<0.01$)。**结论** BMSC玻璃体内移植可减轻OIR新生大鼠视网膜新生血管的形成,其机制可能与其抑制HIF-1 α 及VEGF蛋白的表达有关。 [中国当代儿科杂志, 2017, 19(11): 1202-1207]

【关键词】 氧诱导视网膜病变; 骨髓间充质干细胞; 新生血管; 缺氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子; 新生大鼠

Effects of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on retinal neovascularization in neonatal rats with oxygen-induced retinopathy

MU Qing-Jie, ZHAO Yue-Hua, CHENG Dan-Dan, WANG Hai-Yu, CHEN Lan-Fen, ZHAO Yan-Song, WANG Xiao-Li. Clinical Institute, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China (Zhao Y-S, Email: zhaoyansong74@163.com)

Abstract: Objective To explore the effects of rat bone mesenchymal stem cell (BMSC) transplantation on retinal neovascularization, and to observe the changes of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factors (VEGF) in rats with oxygen-induced retinopathy (OIR). **Methods** Seventy-two seven-day-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: normal control (CON), model (OIR) and BMSC transplantation. In the BMSC transplantation group, BMSCs were transplanted 5 days after oxygen conditioning. The phosphate buffered saline of the same volume was injected in the CON and OIR groups. The OIR model was prepared according to the classic hyperoxygen method. At seven days after transplantation, retinal neovascularization was examined by retinal flat-mount staining and hematoxylin eosin (HE) staining. The expression of HIF-1 α and VEGF proteins was examined by immunohistochemistry staining and Western blot analysis. **Results** The retinal flat-mount staining results showed that

[收稿日期] 2017-08-01; [接受日期] 2017-09-11

[基金项目] 山东省自然科学基金(ZR2014HQ077; ZR2013HL067); 国家自然科学基金(81000268)。

[作者简介] 牟青杰,男,博士,讲师。

[通信作者] 赵岩松,男,副教授。

the vessels were well organized in the CON group, but the vessels were irregularly organized, and lots of nonperfusion areas were observed in the OIR group. The large vessels were a bit circuitous, the retinal vessels were relatively organized, and less nonperfusion areas were noted in the BMSC transplantation group. The HE staining results showed that many neovessels and preretinal neovascular (pre-RNC) cells were observed on the internal limiting membrane in the OIR group. There were less pre-RNC cells in the BMSC transplantation group compared with the OIR group ($P < 0.01$). The immunohistochemistry analysis showed that more HIF-1 α^+ and VEGF $^+$ cells were observed in the OIR group compared with the CON group, and less HIF-1 α^+ and VEGF $^+$ cells were observed in the BMSC transplantation group compared with OIR group ($P < 0.05$). The Western blot analysis showed the expression of HIF-1 α and VEGF proteins in the OIR group was significantly higher than that in the CON group. The expression of HIF-1 α and VEGF proteins in the BMSC transplantation group was lower than that in the OIR group ($P < 0.01$). **Conclusions** BMSC transplantation therapy could alleviate retinal neovascularization in OIR rats, and its mechanisms might be associated with the inhibition of the expression of HIF-1 α and VEGF proteins. [Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(11): 1202-1207]

Key words: Oxygen-induced retinopathy; Bone marrow mesenchymal stem cell; Neovascularization; Hypoxia-inducible factor-1 alpha; Vascular endothelial growth factor; Neonatal rats

早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 是一种增殖性视网膜病变, 是目前儿童致盲的主要原因^[1-2], 因此, 防治 ROP 对减少儿童失明有重要意义。由于 ROP 是视网膜血管发育异常所致的疾病, 表现为视网膜新生血管增生, 且形态和功能异常, 因此, 减轻异常增生的新生血管是 ROP 治疗的重点。研究发现骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC) 眼内移植可减轻氧诱导视网膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 及眼高压大鼠等模型视网膜细胞的凋亡^[3-4]。然而, BMSC 对 OIR 大鼠新生血管的影响目前尚不清楚。研究发现 BMSC 可减轻非感染性眼角膜新生血管的形成, 并能促进脉络膜新生血管的成熟^[5-6], HIF-1 α 和 VEGF 是与新生血管生成密切相关的两种蛋白, HIF-1 α 激活 VEGF 蛋白的表达, 而 VEGF 表达增加诱导新生血管的生成。故本研究探讨 BMSC 移植对 OIR 大鼠视网膜新生血管的影响; HIF-1 α /VEGF 信号通路 with ROP 患儿新生血管的形成密切相关^[7-8], 故本研究将探讨 BMSC 移植对 HIF-1 α /VEGF 信号通路重要信号分子 HIF-1 α 、VEGF 蛋白的影响, 以期对 BMSC 临床上治疗 ROP 提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及其分组

健康 7 日龄 Sprague-Dawley (SD) 新生大鼠 72 只, 雌雄不限, 体重为 12.1~15.5 g, 随机分为正常对照组、OIR 模型组和 BMSC 移植组 ($n=24$)。

1.2 主要仪器与试剂

全自动常压动物氧舱 (DYC- II 型, 中国船舶重工集团公司七〇一研究所), 正置荧光显微镜 (BX-51, 日本 OLYMPUS 公司), 化学发光成像分析系统 (FluorChem HD2, 美国 Protein Simple 公司); 兔抗大鼠 HIF-1 α 一抗购自美国 Sigma 公司, 兔抗大鼠 VEGF 一抗购自美国 Chemicon 公司, 山羊抗兔二抗试剂盒购自北京中杉金桥生物试剂公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自美国 Jackson ImmunoResearch 公司, GAPDH 购自美国 Proteintech Group 公司, ECL 化学发光试剂盒购自美国 KPL 公司。

1.3 OIR 模型的制作

采用氧诱导法制成 OIR 模型^[9-10]: 新生大鼠出生后 4 h 内和母鼠一起放入全自动常压动物氧舱内, 设定氧气浓度 50% \pm 0.1% 与 10% \pm 0.1%, 每 24 h 交替 1 次, 连续 7 个循环后, 即生后 14 d, 放回空气常氧中饲养 4 d, 动物房内, 明暗各 12 h 进行交替照明。

1.4 大鼠 BMSC 的体外培养与标记

4 周龄健康 SD 大鼠, 颈椎脱臼处死, 75% 无水乙醇浸泡 5 min, 无菌条件下分离大鼠股骨、胫骨并冲出其骨髓, 离心 10 min, 弃上清, 制成骨髓细胞悬液, 200 目滤网过滤, 反复吹打, 调整细胞浓度为 1×10^6 个 / mL, 接种于培养瓶, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱, 24~48 h 后半换液, 以后每 2~3 d 全量换液 1 次。收集传 3~5 代的 BMSC 行 Hoechst33324 标记, 24 h 后移植^[5,10]。

1.5 细胞移植及眼内检测

BMSC 移植组新生大鼠生后 12 d, 腹腔麻醉后, 玻璃体腔内注入 3×10^6 个活细胞 / $2 \mu\text{L}$ ^[5], 注射方法参考文献^[3], 余各组注入等量的磷酸盐缓冲液 (PBS), 红霉素眼膏防感染。移植后 7 d, 各组大鼠腹腔麻醉后常规灌注, 并取眼球, 制成视神经矢状轴冰冻切片 (厚度为 $16 \mu\text{m}$), 正置荧光显微镜下观察^[5,11]。

1.6 组织包埋及切片的制作

各组于移植后 7 d (即生后 19 d) 分别取 8 只大鼠, 腹腔麻醉, 心脏灌注后取眼球, 去角膜及晶状体, 置于 4% 多聚甲醛中固定过夜, 常规石蜡包埋, 平行于视神经矢状轴且以其为平面的视网膜进行切片, 厚度为 $4 \mu\text{m}$ 。

1.7 苏木精-伊红染色

石蜡切片脱蜡至水, Harris 苏木素液染核, 去离子水冲洗, 10% 盐酸乙醇分化, 梯度乙醇复水, 1% 伊红染胞浆, 95% 乙醇分色, 无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 观察各组视网膜前新生血管细胞 (preretinal neovascular cells, pre-RNC), 每只大鼠取 8 张非连续切片 (每隔 5 张切片取 1 张切片), 正置荧光显微镜下观察并拍片, 计数 pre-RNC 数^[12-13]。

1.8 免疫组化法检测 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白表达

石蜡切片脱蜡至水, 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液中热修复抗原 2 次, 3% H_2O_2 去除内源性过氧化物酶, 正常山羊血清 37℃ 封闭 1 h, 分别加入兔抗大鼠 HIF-1 α (1:200) 或 VEGF (1:200) 一抗, 37℃ 孵育 30 min, 4℃ 冰箱过夜后, 0.01 mol/L PBS 冲洗, 依次加入山羊抗兔二抗试剂盒试剂, 0.01 mol/L PBS 冲洗后 DAB 显色, 至镜下可见细胞核或细胞浆染为棕黄色, 中性树胶封片。正置荧光显微镜下观察, 每只大鼠取 4~5 张非连续视网膜切片 (每隔 5 张切片取 1 张切片), 分别计数 HIF-1 α^+ 细胞数与 VEGF $^+$ 细胞数, 并计算其平均值。

1.9 视网膜铺片法观察 BMSC 对 OIR 大鼠视网膜新生血管的影响

各组于移植后 7 d (即生后 19 d) 分别取 8 只大鼠, 腹腔麻醉后暴露心脏, 左心室注入墨汁, 直至大鼠四肢及口周变黑。取大鼠双眼, 置于 4% 多聚甲醛的培养皿中, 去掉角膜和晶状体, 分离视网膜, 沿鼻上、鼻下、颞上、颞下四个方向剪开视网膜并逐渐展平, 中性树胶封片, 正置荧光

显微镜下观察并拍照。

1.10 Western blot 法检测 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白表达

各组于移植后 7 d (即生后 19 d) 分别取 8 只大鼠, 麻醉后取眼球, 去角膜取视网膜, 液氮研磨并加入组织裂解液裂解提取总蛋白, 考马斯亮蓝 G-250 染色法定量。10% 聚丙烯酰胺分离胶分离蛋白并转膜至 PDVF 膜上, 5% 牛血清封闭后, 分别加入 HIF-1 α (1:1000)、VEGF (1:1000) 或 GAPDH (1:10000) 一抗, 4℃ 冰箱过夜, 0.1% TBS (0.1% Tween 20+0.01 mol/L PBS) 冲洗, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (1:2000), 室温下孵育 1 h; 弃二抗, 0.1% TBS 冲洗 3 次, ECL 化学发光试剂盒显色, 化学发光成像分析系统分析条带的光密度值, 结果以目的条带相对于内参 GAPDH 的相对表达量表示。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSC 移植后的眼内检测

生后 19 d (即 BMSC 移植后 7 d), 正置荧光显微镜下可见: BMSC 组大鼠移植侧视网膜神经节细胞层、内核层均可见 Hoechst33324 $^+$ 细胞, 细胞核染成蓝色, 余各组均未见 Hoechst33324 $^+$ 细胞。

2.2 BMSC 移植对 OIR 大鼠视网膜新生血管形成的影响

视网膜铺片法示正常对照组大鼠视网膜可见血管分布呈均匀的网状结构, 血管呈放射状规则地向周边部走行; OIR 组视盘周围毛细血管闭塞, 可见大片无灌注区, 视网膜大血管走行迂曲, 不规则扩张, 周边部正常毛细血管网消失; BMSC 组无灌注区明显减少, 视网膜大血管走行稍迂曲, 视网膜血管可见网状结构 (图 1)。苏木精-伊红染色法示正常对照组极少见 pre-RNC, 而 OIR 组可见大量 pre-RNC (73 ± 8.2 个), BMSC 组 pre-RNC (56 ± 6.9 个) 明显减少, 显著少于 OIR 组 ($n=8$, $t=4.4867$, $P < 0.01$), 见图 1。

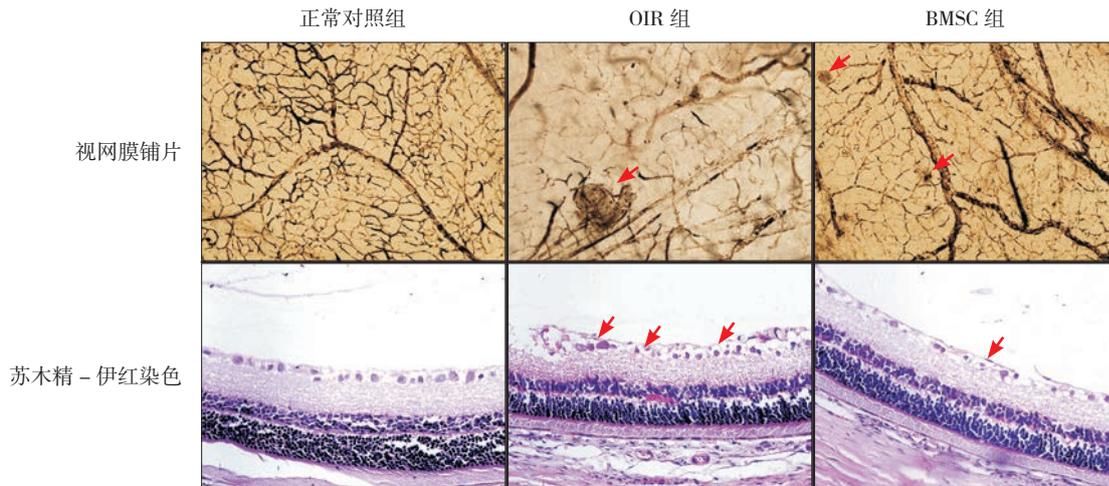


图 1 各组大鼠视网膜新生血管形成情况比较 各组视网膜铺片结果示 ($\times 200$): 正常对照组可见血管密集, 分布均匀; OIR 组可见毛细血管闭塞, 大片无灌注区, 血管较杂乱, 分布不均匀; BMSC 组血管稍迂曲, 无灌注区少于 OIR 组, 新生血管数少于 OIR 组, 血管排列较 OIR 组整齐。各组苏木精-伊红染色结果示 ($\times 400$): 正常对照组可见极少量新生血管; OIR 组可见较多杂乱的新生血管; BMSC 组亦可见新生血管, 分布较不均匀, 新生血管数较 OIR 组明显减少, 分布较 OIR 组均匀。箭头所示为新生血管。

2.3 各组大鼠视网膜 HIF-1 α 、VEGF 免疫组织化学结果

免疫组织化学结果示 HIF-1 α 阳性细胞核染为棕黄色, 正常对照组视网膜仅见少量 HIF-1 α 阳性细胞; OIR 组可见大量 HIF-1 α 阳性细胞, 且显著多于正常对照组 ($P < 0.05$); BMSC 组 HIF-1 α 阳性细胞数明显少于 OIR 组 ($P < 0.05$), 但仍多于正常对照组 ($P < 0.05$)。见表 1, 图 2。

表 1 各组大鼠视网膜 HIF-1 α 阳性与 VEGF 阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$, 个/ mm^2)

组别	<i>n</i>	HIF-1 α 阳性细胞数	VEGF 阳性细胞数
正常对照组	8	9.0 \pm 1.3	25.0 \pm 3.2
OIR 组	8	56.0 \pm 2.9 ^a	81.0 \pm 4.8 ^a
BMSC 组	8	39.0 \pm 2.4 ^{a,b}	53.0 \pm 3.9 ^{a,b}
<i>F</i> 值		858.4	388.0
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注: a 示与正常对照组比较, $P < 0.05$; b 示与 OIR 组比较, $P < 0.05$ 。

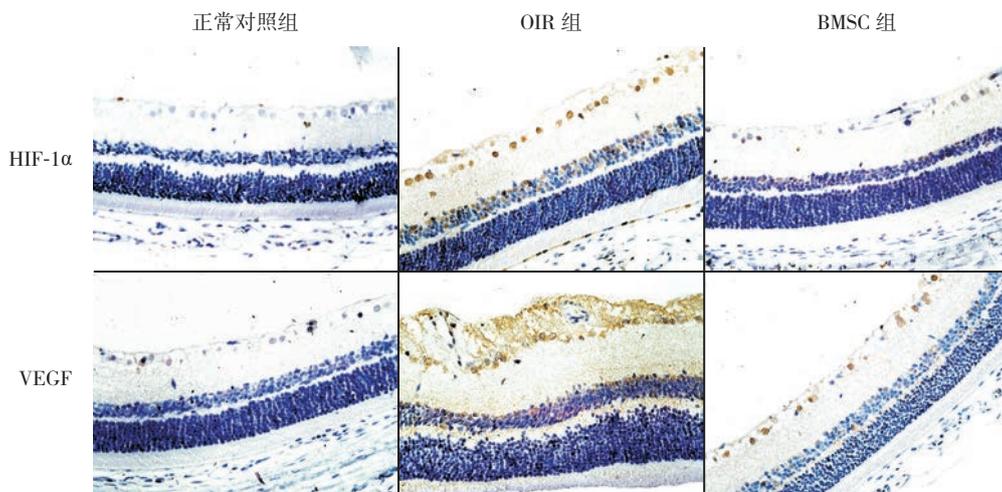


图 2 各组大鼠视网膜 HIF-1 α 及 VEGF 表达结果 (免疫组化, $\times 400$) HIF-1 α 阳性细胞核呈棕黄色, VEGF 阳性细胞呈棕黄色。正常对照组视网膜偶见极少量 HIF-1 α 阳性及 VEGF 阳性细胞, OIR 组视网膜可见较多的 HIF-1 α 阳性及 VEGF 阳性细胞, BMSC 组视网膜可见 HIF-1 α 阳性及 VEGF 阳性细胞, 但明显少于 OIR 组。

VEGF 免疫组织化学结果示细胞浆染为棕黄色, 细胞核染为蓝色。正常对照组视网膜仅见少量 VEGF 阳性细胞, OIR 组可见大量 VEGF 阳性细胞, 且显著多于正常对照组 ($P<0.05$); BMSC 组仍可见 VEGF 阳性细胞表达, 显著少于 OIR 组, 但仍多于正常对照组 ($P<0.05$)。见表 1, 图 2。

2.4 各组大鼠视网膜 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白的表达水平

Western blot 结果显示正常对照组仅见少量 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白表达, OIR 组 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白相对表达显著高于正常对照组 ($P<0.01$); BMSC 组 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白的相对表达量较 OIR 组减少, 但仍多于正常对照组 ($P<0.01$)。见图 3。

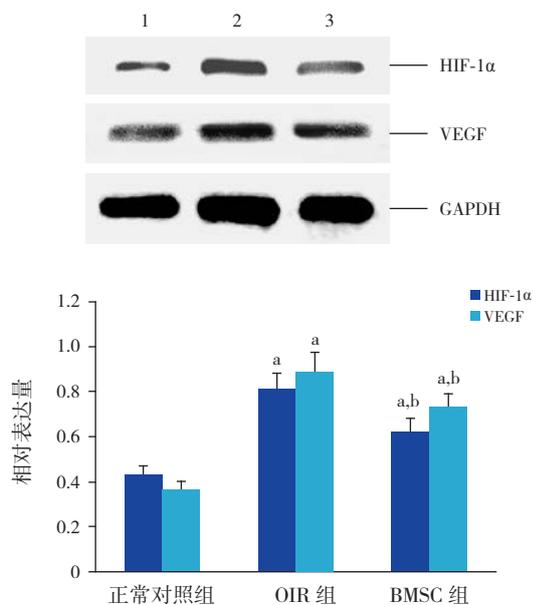


图 3 Western blot 检测各组 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白表达 上图为电泳条带图: 1 为正常对照组, 2 为 OIR 组, 3 为 BMSC 组; 下图为各组视网膜 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白表达水平比较统计图 ($n=8$): a 示与正常对照组比较, $P<0.01$, b 示与 OIR 组比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

高氧诱导的视网膜新生血管形成是导致 ROP 的主要原因, 其中新生血管形成早期, 促进视网膜早期血管正常发育将有效防止 ROP 的发生。BMSC 可抑制眼角膜新生血管的形成, BMSC 能否促进 OIR 模型大鼠血管的正常发育, 减轻新生血

管形成, 并弄清其机制是本研究的重点。

视网膜铺片可以直观显示眼底视网膜血管的发育情况, 本研究发现 OIR 新生大鼠视网膜血管紊乱, 可见大量无灌注区, 而 BMSC 移植后血管排列较规整, 无灌注区明显减少, 提示大鼠 BMSC 玻璃体内移植可减轻大鼠视网膜新生血管的形成。苏木精-伊红染色可观察突破视网膜内界膜的内皮细胞核, 反映视网膜组织切片大量突破内界膜的视网膜新生血管变化, 本研究发现 OIR 大鼠视网膜新生血管内皮细胞核数显著增加, 而 BMSC 移植后新生血管内皮细胞核数减少, 进一步证明大鼠 BMSC 玻璃体内移植可促进 OIR 大鼠视网膜血管的发育, 减少新生血管的形成。但单纯 BMSC 移植不能完全治愈 OIR 大鼠视网膜新生血管的异常增殖, 优化 BMSC 移植将可能进一步改善 OIR 的疗效。BMSC 不仅具有神经分泌功能, 发挥神经保护作用, 而且是一种基因转染的良好载体, 如能基因修饰 BMSC 将更好地发挥 BMSC 的神经保护作用, 并促进视网膜血管的发育。

近年来, 越来越多的研究发现, VEGF 在诱导新生血管的形成过程中受多种信号因子的调控, 其中, 缺血、缺氧组织中的转录活化主要受 HIF-1 α 调控, 可通过调节 VEGF 的稳定性, 从而调控缺血、缺氧诱导的新生血管形成^[14-15]。本研究免疫组织化学结合 Western blot 结果示 OIR 大鼠视网膜 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白表达均增加, BMSC 移植后 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白表达降低, 提示 BMSC 减轻 OIR 大鼠视网膜新生血管的形成可能与 BMSC 降低 OIR 大鼠视网膜 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白的表达有关。BMSC 如何降低 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白的表达, 以及是否可以调控 HIF-1 α /VEGF 信号通路促进眼底视网膜发育, 减轻 OIR 大鼠视网膜新生血管形成有待于进一步研究。

总之, 大鼠 BMSC 玻璃体内移植治疗 OIR 大鼠, 可减轻视网膜新生血管的形成, 其机制可能与其抑制 HIF-1 α 、VEGF 蛋白的表达有关。

[参 考 文 献]

- [1] Holmström G, Larsson E. Outcome of retinopathy of prematurity[J]. Clin Perinatol, 2013, 40(2): 311-321.
- [2] Solebo AL, Teoh L, Rahi J. Epidemiology of blindness in children[J]. Arch Dis Child, 2017, 102(9): 853-857.

- [3] 赵岩松, 赵堪兴, 王晓莉, 等. 骨髓间充质干细胞移植对视网膜病变新生大鼠视网膜细胞凋亡的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 14(12): 971-975.
- [4] Emre E, Yüksel N, Duruksu G, et al. Neuroprotective effects of intravitreally transplanted adipose tissue and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an experimental ocular hypertension model[J]. *Cytherapy*, 2015, 17(5): 543-559.
- [5] Oh JY, Roddy GW, Choi H. Anti-inflammatory protein TSG-6 reduces inflammatory damage to the cornea following chemical and mechanical injury[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(39): 16875-16880.
- [6] Dufourcq P, Descamps B, Tojais NF, et al. Secreted frizzled-related protein-1 enhances mesenchymal stem cell function in angiogenesis and contributes to neovessel maturation[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(11): 2991-3001.
- [7] Park SW, Kim JH, Kim KE, et al. Beta-lapachone inhibits pathological retinal neovascularization in oxygen-induced retinopathy via regulation of HIF-1 α [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(5): 875-884.
- [8] Ma X, Bi H, Qu Y, et al. The contrasting effect of estrogen on mRNA expression of VEGF in bovine retinal vascular endothelial cells under different oxygen conditions[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2011, 249(6): 871-877.
- [9] Hartmann JS, Thompson H, Wang H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and pigment epithelial-derived factor in a rat model of retinopathy of prematurity[J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 1577-1587.
- [10] Penn JS, Henry MM, Tolman BL. Exposure to alternating hypoxia and hyperoxia causes severe proliferative retinopathy in the newborn rat[J]. *Pediatr Res*, 1994, 36(6): 724-731.
- [11] 谢岷, 杨于嘉, 王晓莉, 等. 骨髓基质细胞移植治疗新生大鼠缺氧缺血性脑损伤时间窗探讨[J]. 中华儿科杂志, 2007, 45(5): 396-397.
- [12] Yuan LH, Chen XL, Di Y, et al. CCR7/p-ERK1/2/VEGF signaling promotes retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy[J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(6): 862-869.
- [13] Li Z, He T, Du K, et al. Overexpression of 15-lipoxygenase-1 in oxygen-induced ischemic retinopathy inhibits retinal neovascularization via downregulation of vascular endothelial growth factor-A expression[J]. *Mol Vis*, 2012, 18: 2847-2859.
- [14] Wu J, Ke X, Ma N, et al. Formononetin, an active compound of *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bunge, inhibits hypoxia-induced retinal neovascularization via the HIF-1 α /VEGF signaling pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10: 3071-3081.
- [15] Jiang J, Xia XB, Xu HZ, et al. Inhibition of retinal neovascularization by gene transfer of small interfering RNA targeting HIF-1 α and VEGF[J]. *J Cell Physiol*, 2009, 218(1): 66-74.

(本文编辑: 万静)