

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001719

YKL-40 在激光诱导的小鼠脉络膜新生血管模型中的表达及意义

宾 玥, 刘彦尧, 丁 琳, 彭 惠

(重庆医科大学附属第一医院眼科、眼科学重庆市重点实验室、重庆市眼科研究所, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨在激光诱导的小鼠脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)模型中几丁质酶-3 样蛋白-1(chitinase-3-like-1, YKL-40)的表达及意义。**方法:**将 40 只成年雄性 C57BL/6J 小鼠以随机数字表法按照造模后取材时间的不同随机分为光凝后 7 d 组和 14 d 组, 各 20 只。设定每组小鼠左眼为正常对照眼, 右眼通过 532 nm 激光光凝视网膜诱导小鼠脉络膜新生血管模型, 分别于光凝后 7 d 和 14 d 心脏灌注 2×10^6 FITC-dextran 荧光素, 行视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)/脉络膜复合体铺片以及苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)鉴定 CNV 模型。采用实时荧光定量 PCR 法检测各组小鼠视网膜神经层(简称神经视网膜)和 RPE/脉络膜复合体中 YKL-40 与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的 mRNA 水平变化。免疫荧光染色法观察 YKL-40 在各组小鼠眼组织中的表达及定位。**结果:**脉络膜铺片及 HE 染色均证实激光造模成功, 光凝后 7 d 和 14 d 均有 CNV 形成。在光凝后 7 d 组中, 神经视网膜中 YKL-40 和 VEGF 的 mRNA 相对表达量明显升高[(1.939 ± 0.209), (4.017 ± 1.312)], 与正常组[(1.002 ± 0.076), (1.017 ± 0.219)]相比差异均有统计学意义($t=13.320, P=0.006$; $t=5.457, P=0.012$), 而 RPE/脉络膜复合体中 YKL-40 和 VEGF 表达[(0.968 ± 0.381), (1.192 ± 0.354)]较正常组[(1.004 ± 0.101), (1.021 ± 0.240)]无明显改变($t=-4.519, P=0.053$; $t=2.450, P=0.134$); 在光凝后 14d 组, 神经视网膜和 RPE/脉络膜复合体中 YKL-40 和 VEGF 的 mRNA 表达水平[(3.174 ± 1.583), (3.045 ± 1.430), (12.669 ± 4.512), (8.254 ± 2.968)]与正常组[(1.013 ± 0.173), (1.043 ± 0.371), (1.037 ± 0.347), (1.078 ± 0.462)]相比均明显升高, 且差异具有统计学意义($t=4.777, P=0.041$; $t=3.508, P=0.039$; $t=4.827, P=0.040$; $t=12.800, P=0.006$)。Pearson 相关性分析提示在激光造模后 YKL-40 的表达与 VEGF 具有正相关性。免疫荧光发现 YKL-40 主要表达于光凝后小鼠视神经节细胞层、内丛状层和内核层, 且光凝后 7 d 和 14 d YKL-40 表达[(0.141 ± 0.004), (0.105 ± 0.018)]与正常组(0.008 ± 0.001)相比明显升高($F=106.388, P=0.000$)。**结论:**YKL-40 在 CNV 形成过程中表达上调, 且与 VEGF 的表达具有正相关性, 因此我们推断 YKL-40 可能在 CNV 形成这一病理过程中起着重要作用。

【关键词】YKL-40; 血管内皮生长因子; 脉络膜新生血管; 年龄相关性黄斑变性

【中图分类号】R774

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-10-25

Expression and clinical significance of YKL-40 in choroidal neovascularization model in mice induced by laser

Bin Yue, Liu Yanyao, Ding Lin, Peng Hui

(Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;
Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology; Chongqing Eye Institute)

【Abstract】Objective: To explore the expression and significance of chitinase-3-like-1 (YKL-40) in choroidal neovascularization (CNV) models in mice. **Methods:** Forty adult male C57BL/6J mice were divided into day 7 group and day 14 group post laser coagulation randomly according to the sampling time, with twenty mice in each group. The left eyes of mice were set as normal control and the right eyes were established CNV models by 532 nm laser photocoagulation. Retinal pigment epithelium(RPE)/choroidal flatmounts after cardiac perfusion with FITC-dextran and HE staining on the 7th and 14th day post laser were used to identify the CNV models. The mRNA levels of YKL-40 and vascular endothelial growth factor(VEGF) in neuroretina and RPE/choroidal complex were detected

作者介绍: 宾 玥, Email: 799359981@qq.com,

研究方向: 眼底病、眼外伤。

通信作者: 彭 惠, Email: peng9@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81670881)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180601.1658.002.html>
(2018-06-04)

by real-time PCR. The localizations and expressions of YKL-40 in eyes of each group were determined by immunofluorescence staining. **Results:** Both RPE/choroidal flatmount and HE staining confirmed the success of model and the CNV formation on day 7 and day 14 after laser coagulation. Real-time PCR showed that in neuroretina the expressions of YKL-40 and

VEGF $[(1.939 \pm 0.209), (4.017 \pm 1.312)]$ were higher in day 7 group than control group $[(1.002 \pm 0.076), (1.017 \pm 0.219)]$, and the differences were significant($t=13.320, P=0.006; t=5.457, P=0.012$). However, in RPE/choroidal complex, no significant differences($t=-4.519, P=0.053; t=2.450, P=0.134$) were observed between control group $[(1.004 \pm 0.101), (1.021 \pm 0.240)]$ and day 7 group $[(0.968 \pm 0.381), (1.192 \pm 0.354)]$. Furthermore, the mRNA levels of YKL-40 and VEGF in day 14 group $[(3.174 \pm 1.583), (3.045 \pm 1.430), (12.669 \pm 4.512), (8.254 \pm 2.968)]$ were higher than those in control group $[(1.013 \pm 0.173), (1.043 \pm 0.371), (1.037 \pm 0.347), (1.078 \pm 0.462)]$ both in neuroretina and in RPE/choroidal complex tissues, and the differences were significant($t=4.777, P=0.041; t=3.508, P=0.039; t=4.827, P=0.040; t=12.800, P=0.006$). Pearson correlation analysis showed that the expression of YKL-40 was positively correlated with VEGF in CNV models. The immunofluorescence staining showed that YKL-40 were mainly expressed in the retinal ganglion cell layer, inner plexiform layer and inner nuclear layer of mice after laser. Both in day 7 group and day 14 group, the expressions of YKL-40 $[(0.141 \pm 0.004), (0.105 \pm 0.018)]$ were higher than control group (0.008 ± 0.001) , and the differences were significant($F=106.388, P=0.000$). **Conclusion:** The expression of YKL-40 is up-regulated during the process of CNV formation and is positively correlated with VEGF. Therefore, we infer that YKL-40 may play a critical role in the pathological process of CNV formation. **【Key words】**YKL-40; vascular endothelial growth factor; choroidal neovascularization; age-related macular degeneration

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是世界范围内导致中老年人视力不可逆性损害和致盲的主要眼病,其发病率随年龄增加而升高^[1-3]。根据 2016 眼科临床指南可将 AMD 分为早期、进展期和晚期,晚期 AMD 根据其病理特点分为干性和湿性两类,而脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)的形成是湿性 AMD 的特征性改变,是引起视力下降的主要原因。然而 CNV 的形成机制十分复杂,是一个集炎症反应和新生血管生成为一体的复杂病理过程,多种因素可介导 CNV 的形成。

几丁质酶-3 样蛋白-1(chitinase-3-like-1, YKL-40)也叫人类软骨糖蛋白 39(human cartilage glycoprotein-39, HC-gp39),是一种在种族进化上高度保守的糖蛋白,属于“18-糖基水解酶”家族,由于此酶的催化活性部位谷氨酰胺被亮氨酸替代从而丧失了糖基水解酶活性^[4-5]。YKL-40 是一种分泌蛋白,可由巨噬细胞、中性粒细胞和血管平滑肌细胞等多种细胞分泌^[6]。Rakic 等^[7]曾报道 YKL-40 表达于正常人的视网膜且高表达于患者的 CNV 组织中,并且雌激素可以降低小鼠 YKL-40 的表达水平。多篇文献报道 YKL-40 在多种类型的肿瘤中高表达,并可通过刺激血管内皮细胞的迁移和重组从而在血管形成过程中发挥作用^[8-9],同时抗 YKL-40 中和性抗体对肿瘤的生长及新生血管的形成有抑制作用^[10-12]。

本研究拟通过激光诱导小鼠 CNV 模型观察在 CNV 形成过程中 YKL-40 的表达水平及定位,以期从新的视角探讨 CNV 的发生机制,并为湿性 AMD 的治疗寻找更特异的靶点和更安全有效的干预措

施提供理论依据和方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本研究所用 40 只 C57BL/6J 小鼠均为 6~8 周雄性鼠,体质量 18~22 g,购于重庆医科大学实验动物中心并由其代养于 IVC 级。实验前经裂隙灯检查小鼠双眼角膜、晶状体、眼底,排除有眼部疾患的小鼠。

1.1.2 试剂 兔抗 YKL-40 多克隆抗体(1:200 Proteintech);山羊抗兔多克隆抗体(1:100 Proteintech);DAPI(Genview, 中国上海); 2×10^6 FITC-dextran 荧光素(Sigma);Trizol Reagent (Invitrogen, 美国);逆转录和 PCR 试剂盒(Takara Biotechnology, 中国大连);FAS 眼球固定液(谷歌生物, 中国武汉);OCT 包埋剂(Sakura, 美国)。

1.1.3 仪器 眼底激光器(Lumenis, 德国);解剖显微镜、冰冻切片机、正置荧光显微镜(Leica, 德国);低温高速离心机(Sigma);荧光定量 PCR 仪(ABI, 美国);激光扫描共聚焦显微镜(Nicon, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将 40 只 C57BL/6J 小鼠(80 只眼)随机分为 2 组,即光凝后 7 d 组和 14 d 组,各 20 只,所有实验动物均以右眼造模,左眼为正常对照。

1.2.2 CNV 模型的诱导 采用每 100 g 体质量小鼠腹腔注射 1 mL 1%戊巴比妥钠的方法深度麻醉小鼠,每只约需注射 1%戊巴比妥钠 0.2 mL 左右。待小鼠麻醉且瞳孔散开后,立即进行激光光凝,以避免由于麻醉引起的一过性白内障干扰激光造模。在干净的盖玻片上涂少量黏弹剂,并将其置于实验眼前,经裂隙灯用 532 nm 眼底激光(参数:功率 200 mW,光斑直径 75 μ m,曝光时间 100 ms)以视盘为中心在距视乳头周围 1.5~2 个 PD 处避开血管进行光凝,每只眼光凝 5 个点,激光时产生汽化泡沫并伴有轻响提示 Bruch's 膜破裂。若光

凝后出现眼底出血表示血管受损,该眼应另作标记,不纳入实验。研究者已参加实验动物资质培训,并获得了实验动物资格证书,实验操作亦经重庆医科大学附属第一医院动物伦理委员会批准[许可证:SCXK(渝) 2012-0001]。

1.2.3 脉络膜铺片 从各组小鼠中分别随机选取 4 只,经腹腔注射 1%戊巴比妥钠(10 μ L/g)成功麻醉小鼠后,仰卧位固定小鼠四肢,剪开胸部皮肤,打开胸腔,分离心包膜,暴露心脏。蝴蝶针头刺入左心室尖,缓慢灌注 1 mL 含 30 mg 2×10^6 FITC-dextran 荧光素的 PBS,灌注成功后勿立刻拔出针头,待循环 3~5 min 后再将针头拔出。

用 1%戊巴比妥钠过量麻醉处死小鼠后,迅速用镊子摘除眼球,将眼球放置在眼球固定液中固定 1 h,冲洗后放入盛有少量 PBS 溶液的玻璃皿中,在解剖显微镜下剪去眼外肌肉筋膜及视神经,围绕角巩膜缘剪去眼前节,小心剥离神经视网膜层,尤其在激光光凝处和视乳头周围,神经视网膜层与脉络膜粘连十分紧密,更应谨慎操作,避免机械性损伤。将剥离后的 RPE/脉络膜复合体平铺于载玻片上,以视乳头为中心对称在光凝点之间行 4、5 条放射状切口,滴少量 50%甘油封片。

1.2.4 石蜡切片及 HE 染色 从各组小鼠中分别随机选取 3 只,称量体质量,腹腔注射 1%戊巴比妥钠(10 μ L/g),麻醉成功后经心脏灌注 4%多聚甲醛,按同样方法过量麻醉处死小鼠后,收集完整眼球置于 FAS 眼球固定液中过夜。梯度酒精脱水,将眼球进行石蜡包埋切片,按角膜-视神经轴方向切片,切片厚度为 4 μ m。切片经脱蜡及酒精水化后,用苏木精染色 5 min,再水洗 10 min,经盐酸酒精分化 5 s 后水洗 10 min,再用伊红染色 2 min,酒精脱水和二甲苯透明后中性树脂封片。

1.2.5 qRT-PCR 检测 YKL-40 和 VEGF 在神经视网膜和 RPE/脉络膜复合体中的表达水平 从各组小鼠中分别随机选取 9 只过量麻醉处死,如前所述分离神经视网膜和 RPE/脉络膜复合体,分别放入灭菌 EP 管中,每管加入 1 mL Trizol 于冰上经超声粉碎组织后提取总 RNA。采用 Nanodrop 分光光度计测定总 RNA 的浓度。测得 A260/280 比值均在 1.80~2.0,证明所提供的 RNA 样本无 DNA 和蛋白质污染。按 Takara 逆转录试剂盒说明书操作步骤将 RNA 逆转录 cDNA 并进行实时荧光定量 PCR 反应。PCR 的反应条件,预变性:95 $^{\circ}$ C,10 min,循环 1 次;变性:95 $^{\circ}$ C,15 s;退火:60 $^{\circ}$ C,20 s;延伸:72 $^{\circ}$ C,15 s,共循环 40 次。GAPDH 作为内参基因。按照 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法进行数据分析。本实验所使用的引物序列均由上海生工生物公司合成并检测验证过,序列见表 1。

表 1 YKL-40、VEGF 及 GAPDH 的引物序列
Tab.1 Sequences of primers for real-time PCR

引物名称	引物序列(5'-3')
YKL-40-F	ACCAACCTGAAGACCCTCCT
YKL-40-R	GCCCATCAAAGCCATAAGAA
VEGF-F	TCACCACCACGCCATCATC
VEGF-R	AATGGCGAATCCAGTCCCA
GAPDH-F	GTATGACTCCACTCACGGCAAA
GAPDH-R	GGTCTCGCTCTGGAAGATG

1.2.6 免疫荧光染色法检测 YKL-40 在小鼠眼中的定位 从各组中分别随机选取 4 只小鼠腹腔注射过量 1%戊巴比妥钠,麻醉处死小鼠后,充分暴露小鼠眼球,谨慎摘除眼球,保持眼球形状完整并保留视神经,在解剖显微镜下去除眼外筋膜和肌肉组织,将眼球放入眼球固定液中过夜,再分别用 10%、20%、30%蔗糖进行梯度脱水。将脱水后的眼球放入盛有 OCT 包埋剂的塑料小容器内,再倒入部分包埋剂淹没眼球,整个过程中需避免产生气泡,然后放入冰冻切片机内,待包埋剂凝固后(约 30 min)切片。切片过程中保证冰冻切片机冷冻箱温度稳定在-22~-20 $^{\circ}$ C,切片厚度为 10 μ m。切片完成以后将其置于-80 $^{\circ}$ C冰箱中备用。

从-80 $^{\circ}$ C冰箱中取出各组小鼠眼球冰冻切片,经 PBS 清洗后擦干,滴入 0.5% Triton X-100 室温穿膜 30 min,于封闭液(1.5%山羊血清+1%BSA)中室温封闭 2 h,甩干后加入兔抗鼠 YKL-40 一抗(1:200)4 $^{\circ}$ C孵育过夜。PBS 清洗后,在避光条件下加入山羊抗兔二抗(1:100)37 $^{\circ}$ C孵育 2 h,加入 DAPI 染核 5~8 min,最后用 50%甘油封片。通过激光扫描共聚焦显微镜观察并采集图片,并采用 Image Pro-Plus 图像分析软件测量 YKL-40 表达的面积和荧光强度。

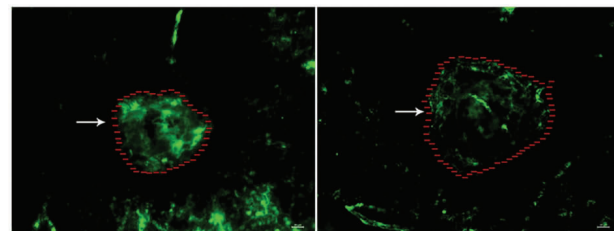
1.3 统计学分析

本研究所有数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 21.0 统计软件对实验数据进行整理分析,数据比较采用配对 *t* 检验和单因素方差分析。采用 Pearson 相关性分析 YKL-40 与 VEGF 表达的相关性。部分数据使用 Graph Pad Prism 5.0 软件分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 CNV 模型鉴定

心脏灌注 FITC-dextran 荧光素后行 RPE/脉络膜铺片。正置荧光显微镜下观察光凝后第 7 天和第 14 天小鼠脉络膜铺片,可见呈烟花爆破样高荧光的脉络膜新生血管形成,且 CNV 来源于激光光凝斑中心(图 1A、B)。图 2 为正常小鼠和光凝后第 7 天、第 14 天视网膜 HE 染色,可见经激光诱导后 Bruch's 膜被破坏,CNV 突破 Bruch's 膜,位于视网膜下,呈梭形,视网膜结构紊乱,细胞异常增生,激光损伤处外核层缺失。小鼠脉络膜铺片和 HE 染色均提示激光光凝部位有来源于脉络膜的新生血管形成,表示 CNV 模型诱导成功。



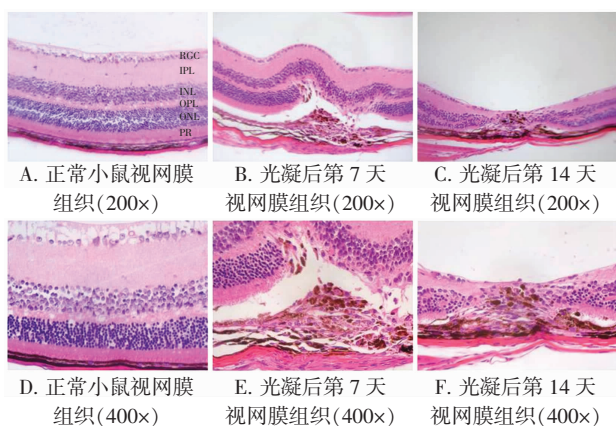
A. 光凝后第 7 天

B. 光凝后第 14 天

注:箭头所指出红色区域内的高荧光即为光凝后第 7 天和第 14 天脉络膜新生血管

图 1 小鼠光凝后第 7 天、第 14 天 FITC-dextran 血管造影脉络膜铺片(200 $\times$)

Fig.1 RPE/choroidal flatmount of mice on day 7 and day 14 after photocoagulation(200 $\times$)



RGC: 视神经节细胞层; IPL: 内丛状层; INL: 内核层;
OPL: 外丛状层; ONL: 外核层; PR: 光感受器层

图 2 正常小鼠和光凝后第 7 天、第 14 天视网膜 HE 染色

Fig.2 The structures of retina in normal and post photocoagulation mice by HE staining

2.2 YKL-40 和 VEGF 在激光光凝后第 7 天、第 14 天视网膜和脉络膜组织中的 mRNA 表达水平

2- $\Delta\Delta C_t$ 相对定量法结果显示,在光凝后 7 d 组的神经视网膜中 YKL-40 和 VEGF 的 mRNA 表达水平 $[(1.939 \pm 0.209), (4.017 \pm 1.312)]$ 较正常组 $[(1.002 \pm 0.076), (1.017 \pm 0.219)]$ 明显升高($t=13.320, P=0.006; t=5.457, P=0.012$),在光凝后 14 d 组的神经视网膜中 YKL-40 和 VEGF 的 mRNA 表达水平 $[(3.174 \pm 1.583), (3.045 \pm 1.430)]$ 亦较正常组 $[(1.013 \pm 0.173), (1.043 \pm 0.371)]$ 明显升高($t=4.777, P=0.041; t=3.508, P=0.039$) (图 3)。而在 RPE/脉络膜复合体中,光凝后 7 d 组的 YKL-40 和 VEGF 的 mRNA 表达 $[(0.968 \pm 0.381), (1.192 \pm 0.354)]$ 较正常组 $[(1.004 \pm 0.101), (1.021 \pm 0.240)]$ 无明显变化($t=-4.519, P=0.053; t=2.450, P=0.134$),但光凝后 14 d 组中 YKL-40 和 VEGF 的 mRNA 表达 $[(12.669 \pm 4.512), (8.254 \pm 2.967)]$ 均较正常组 $[(1.037 \pm 0.347), (1.078 \pm 0.462)]$ 明显增高($t=4.827, P=0.040; t=12.800, P=0.006$)。

2.3 YKL-40 与 VEGF 的相关性分析

对光凝后第 7 天、第 14 天的小鼠神经视网膜和脉络膜复合体中 YKL-40 和 VEGF 的 mRNA 表达水平采用 Pearson 相关性分析法进行相关性分析。统计分析得出在光凝后第 7 天脉络膜复合体中 YKL-40 与 VEGF 无相关性外,在光凝后第 7 天、第 14 天神经视网膜和光凝后第 14 天脉络膜复合体中, YKL-40 与 VEGF 的表达成正相关,且差异具有统计学意义($P<0.01$)。结果见表 2。

2.4 免疫荧光染色法检测 YKL-40 在小鼠眼中表达及定位

眼球冰冻切片免疫荧光结果显示在激光光凝后 7 d 组和光凝后 14 d 组的小鼠眼组织中有大量 YKL-40 表达 $[(0.141 \pm 0.004), (0.105 \pm 0.018)]$,且较正常组 (0.008 ± 0.000) 相比表达升高并有统计学意义($F=106.388, P=0.000$) (图 4)。但与光凝后 7 d 组相比,光凝后 14 d 组 YKL-40 的表达降低($t=4.786, P<0.01$)。同时,发现 YKL-40 主要表达于光凝后

视神经节细胞层、内丛状层和内核层,在正常的眼组织中仅少量表达,此外,通过免疫荧光可以发现细胞核内并不表达 YKL-40。

表 2 各组中 YKL-40 与 VEGF 的相关性分析

Tab.2 Pearson correlation analysis between YKL-40 and VEGF in each group

分组	光凝后第 7 天 神经视网膜	光凝后第 7 天 脉络膜复合体	光凝后第 14 天 神经视网膜	光凝后第 14 天 脉络膜复合体
r 值	0.942	-0.267	0.966	0.911
P 值	0.002	0.563	0.000	0.012

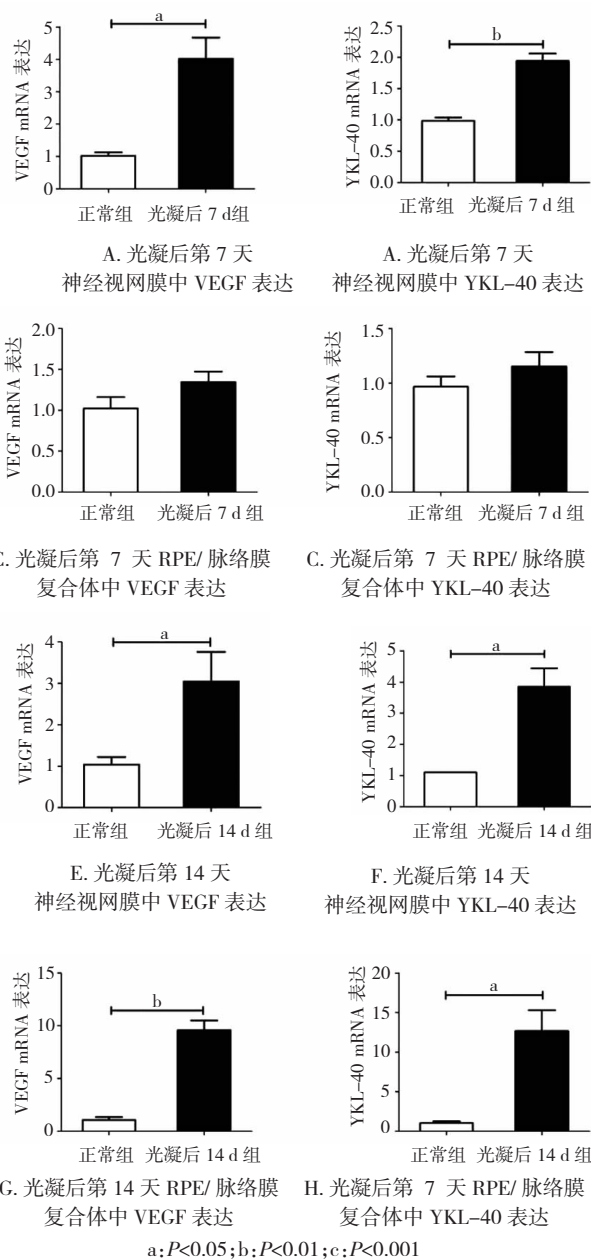
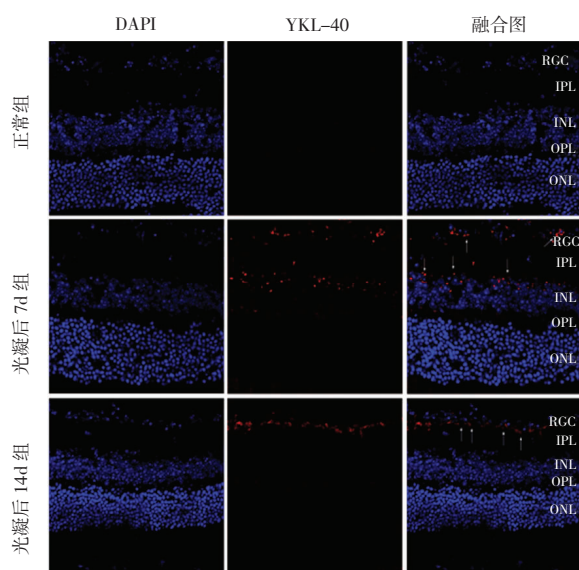
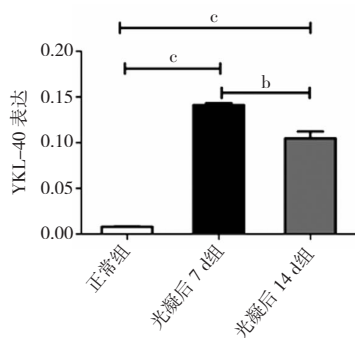


图 3 YKL-40 和 VEGF 在激光光凝后第 7 天和第 14 天神经视网膜和 RPE/ 脉络膜复合体中的 mRNA 水平

Fig.3 Expressions of YKL-40 and VEGF in neuroretina and RPE/choroid complex at the 7th and 14th day after photocoagulation



A. YKL-40 在各组小鼠眼中的表达(400×, 箭头所指)



B. YKL-40 在小鼠眼组织冰冻切片免疫荧光法中的表达情况统计分析

b: $P < 0.01$; c: $P = 0.000$

图 4 免疫荧光染色中光凝后和正常小鼠眼组织中 YKL-40 的表达情况

Fig.4 The expression of YKL-40 in the mouse eyes detected by immunofluorescence

3 讨论

研究表明,年龄相关性黄斑变性已成为 50 岁以上人群致盲的重要原因。根据其病理特征,又将其分为湿性和干性两型,干性 AMD 主要表现为地图状萎缩,湿性 AMD 表现为 CNV 形成,且 CNV 是导致视力损害的主要原因。CNV 的自然发展过程主要包括三个阶段。首先,在各种因素的作用下,脉络膜毛细血管内皮细胞开始增殖分化并穿过 Bruch 膜向视网膜方向移行;然后,进入活动阶段,此期新生血管组织不断生长扩大,长到一定程度后,CNV 引起视网膜渗出、神经组织变性和出血或逐渐纤维化

并形成盘状瘢痕而进入退化期;最终,中心视力急剧下降或不可逆性丧失。

目前临床上对 AMD 这一疾病的治疗缺乏长期有效的手段,美国 FDA 批准的经玻璃体腔注射 VEGF 拮抗剂 Lucentis (ranibizumab) 能使大约 40% 的湿性 AMD 病人的视力得以改善^[13]。但仍有约 1/3 的患者经过治疗后 CNV 不能得到有效控制,视力继续下降。VEGF 作为维持细胞正常功能的重要细胞因子,对视网膜视神经节细胞、感光细胞在病理应激状态下的存活发挥着重要作用^[14]。在一些具特质的 AMD 患者中,过度减低 VEGF 可能会使视神经节细胞、感光细胞变性死亡而导致视力下降。有研究显示玻璃体内注射 VEGF 拮抗剂会增加高血压、中风、心肌梗死、肾病综合征等疾病的发病风险,且年龄越高,疾病发生风险越大^[15]。因此有必要进一步深入研究脉络膜新生血管的形成机制,以期对湿性 AMD 患者的治疗提供新的方向和靶点。

YKL-40 蛋白是一含有 383 个氨基酸的单链多肽,因其 N 端氨基酸以苏氨酸-赖氨酸-亮氨酸 (Thr-Lys-Leu, YKL) 开头并在十二烷基硫酸钠凝胶电泳实验所测得分子量为 40 kD,因此取名为 YKL-40。人类 YKL-40 的 CHI3L1 基因定位于 1 号染色体,且位于高度保守区域的 q31-q32 上,经检测有 7 948 个碱基对,跨越了 8 kb 的基因组 DNA,包含 10 个外显子。据文献报道,YKL-40 在众多实体肿瘤中表达量增高,且可能与肿瘤的增殖分化、血管生成及肿瘤附近基质重塑等作用相关,另外,研究显示 YKL-40 可以分别通过细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/ERK2) 和蛋白激酶 B (AKT) 磷酸化反应来激活丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和磷酸肌醇 3-激酶 (PI-3K),由此调节信号级联反应,而这两种信号通路在细胞有丝分裂活动中发挥重要作用。

激光诱导 C57BL/6J 小鼠 CNV 动物模型是一种经典稳定、可行性高的模型,在研究脉络膜新生血管疾病中被广泛应用。研究显示小鼠行激光光凝后 7 d 以内新生血管增生最为活跃,至第 7 天可见 CNV 形成,到第 14 天时新生血管量达到高峰且增生基本稳定,此后 CNV 组织趋向瘢痕化,新生血管量逐渐减少^[16-17],因此本实验选取激光光凝后新生血管增生最活跃的第 7 天和新生血管量达高峰的第 14 天的神经视网膜和 RPE/脉络膜进行研究。

本研究结果显示,除在激光光凝后第 7 天 RPE/

脉络膜中 YKL-40 表达无明显改变外,其余组中 YKL-40 表达均明显升高,且其升高趋势与 VEGF 一致,推测由于 YKL-40 主要表达在视神经节细胞层、内丛状层和内核层,再加上巩膜的影响,导致 YKL-40 在光凝后 7 d 内 RPE/脉络膜中表达无明显改变,但随着时间延长,新生血管数量增加,光凝后 14 d 内 RPE/脉络膜中 YKL-40 表达亦明显升高。根据文献报道 YKL-40 是一种分泌糖蛋白^[18],本研究也证实 YKL-40 并非表达于细胞核。VEGF 是一种公认的在 CNV 发生发展中起重要作用的生长因子,目前临床上应用抗 VEGF 药物治疗湿性 AMD 取得了一定疗效^[9]。本研究采用 Pearson 相关性分析 YKL-40 与 VEGF 的表达情况,统计分析出除光凝后第 7 天 RPE/脉络膜中 YKL-40 与 VEGF 因 mRNA 水平无明显改变而无相关性外,光凝后第 7 天视网膜、第 14 天视网膜和 RPE/脉络膜中 YKL-40 与 VEGF 的表达均呈正相关性,这不仅从分子水平证实了激光造模的成功,更验证了该实验假设:YKL-40 可能在 CNV 的形成和发展过程中发挥着重要作用。通过研究 YKL-40 的表达及定位,为下一步进行蛋白印迹相关研究以深入探讨 YKL-40 在 CNV 形成过程中的作用机制奠定了基础。

综上所述,本研究认为在激光诱导的小鼠 CNV 模型中 YKL-40 可能与 CNV 的形成和发展密切相关,虽然目前其机制尚不十分明确,但这一发现是从新的视角探讨湿性 AMD 的发生机理,并为湿性 AMD 的治疗寻找更特异的靶点和更安全有效的干预措施提供理论依据和方向。

参 考 文 献

- [1] Yang K, Liang YB, Gao LQ, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in a rural Chinese population: the Handan Eye Study [J]. *Ophthalmology*, 2011, 118(7): 1395-1401.
- [2] Kawasaki R, Yasuda M, Song SJ, et al. The prevalence of age-related macular degeneration in Asians: a systematic review and meta-analysis [J]. *Ophthalmology*, 2010, 117(5): 921-927.
- [3] Wong WL, Su X, Li X, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Glob Health*, 2014, 2(2): e106-116.
- [4] Craig-Schapiro R, Perrin RJ, Roe CM, et al. YKL-40: a novel prognostic fluid biomarker for preclinical Alzheimer's disease [J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 68(10): 903-912.
- [5] Johansen JS, Williamson MK, Rice JS, et al. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture [J]. *J Bone Miner Res*, 1992, 7(5): 501-512.
- [6] Shao R. YKL-40 acts as an angiogenic factor to promote tumor angiogenesis [J]. *Front Physiol*, 2013, 4: 122.
- [7] Rakic JM, Lambert V, Deprez M, et al. Estrogens reduce the expression of YKL-40 in the retina: implications for eye and joint diseases [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(4): 1740-1746.
- [8] Querol-Vilaseca M, Colom-Cadena M, Pegueroles J, et al. YKL-40 (Chitinase 3-like I) is expressed in a subset of astrocytes in Alzheimer's disease and other tauopathies [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 118.
- [9] 宗同岩, 蔡九英, 宋晓坤, 等. YKL-40——一个新的心血管生物标志物 [J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(10): 1918-1920.
- [10] Francescone RA, Scully S, Faibish M, et al. Role of YKL-40 in the angiogenesis, radioresistance, and progression of glioblastoma [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(17): 15332-15343.
- [11] Shao R, Francescone R, Ngernyuang N, et al. Anti-YKL-40 antibody and ionizing irradiation synergistically inhibit tumor vascularization and malignancy in glioblastoma [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(2): 373-382.
- [12] Faibish M, Francescone R, Bentley B, et al. A YKL-40-neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers [J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(5): 742-751.
- [13] Molnárová M, Lesková V, Demský P, et al. Lucentis in treatment of the wet-form of age-related macular degeneration — two years experience [J]. *Cesk Slov Oftalmol*, 2009, 65(5): 182-185.
- [14] Liljekvist-Soltic I, Olofsson J, Johansson K. Progenitor cell-derived factors enhance photoreceptor survival in rat retinal explants [J]. *Brain Res*, 2008, 1227: 226-233.
- [15] Costagliola C, Agnifili L, Arcidiacono B, et al. Systemic thromboembolic adverse events in patients treated with intravitreal anti-VEGF drugs for neovascular age-related macular degeneration [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(10): 1299-1313.
- [16] 苏彦, 张佩佩, 刘芳. 抗骨桥蛋白抗体对激光诱导的脉络膜新生血管的抑制作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(9): 813-818.
- [17] 付鹏, 彭惠, 陈新科, 等. NSA2 在激光诱导的小鼠脉络膜新生血管模型中表达的时相性和定位研究 [J]. *世界科技研究与发展*, 2011, 33(6): 1085-1088.
- [18] Kumagai E, Mano Y, Yoshio S, et al. Serum YKL-40 as a marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35282.
- [19] Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, et al. Age-related macular degeneration [J]. *Lancet*, 2012, 379(9827): 1728-1738.

(责任编辑: 张辉洁)