

糖尿病视网膜病变大鼠骨髓内皮祖细胞数量和功能变化

张惟 韩琪 陈松 颜华

【摘要】 目的 观察在大鼠糖尿病视网膜病变(DR)模型中骨髓内皮祖细胞(EPCs)功能变化,探讨EPCs在DR发病机制中的作用。方法 实验研究。雄性成年Wistar大鼠50只,以随机数字表法,随机分为正常对照(CON)组(14只鼠)和糖尿病(DM)组(36只鼠)。根据病程,将DM组大鼠再分为糖尿病1个月(DM1)组、糖尿病3个月(DM3)组、糖尿病6个月(DM6)组,每组各12只。采用密度梯度离心法从各组大鼠骨髓获取单核细胞,将其接种于纤维连接蛋白包被的培养板;培养7d后,利用Dil-acLDL和FITC-UEA-I细胞荧光染色法及流式细胞仪CD34和CD133抗体标记法鉴定EPCs。在倒置相差显微镜下对EPCs计数克隆形成单位(CFU),以评估骨髓EPCs的数量水平;采用MTT比色法、Transwell小室和黏附能力测定实验观察EPCs的增殖、迁移和黏附能力。同时于各相应时间点摘除大鼠眼球行苏木精-伊红(HE)染色,采用免疫组织化学法分析血管内皮生长因子(VEGF)在大鼠视网膜中的表达。对比分析EPCs的数量和功能变化及其与DR形态学变化的相互关系。组间骨髓EPCs数量、功能及视网膜VEGF表达阳性率比较,采用单因素方差分析和LSD-*t*检验法。结果 DM1、DM3、DM6组大鼠骨髓来源EPCs-CFU为(9.6±1.8, 11.5±2.5, 14.0±2.4个/×200倍视野)较CON组(16.6±2.7个/×200倍视野)减少,差异有统计学意义($F=13.311, P<0.01$);DM1、DM3、DM6组EPCs增殖能力(0.133±0.027, 0.106±0.016, 0.072±0.011 OD)较CON组(0.203±0.068 OD)降低,差异有统计学意义($F=16.091, P<0.01$);DM1、DM3、DM6组EPCs迁移能力(11.9±2.2, 10.1±1.8, 8.9±1.2个/×200倍视野)较CON组(14.8±2.6个/×200倍视野)降低,差异有统计学意义($F=12.506, P<0.01$);DM1、DM3、DM6组EPCs黏附能力(14.8±3.2, 10.5±2.0, 7.5±1.2个/×200倍视野)较CON组(17.9±4.8个/×200倍视野)降低,差异有统计学意义($F=17.087, P<0.01$)。光学显微镜下,与CON组比较,DM1、DM3组视网膜厚度变薄,细胞排列紊乱,细胞核肿胀、体积增大,DM6组视网膜厚度更薄,细胞排列紊乱更加明显,部分血管扩张。VEGF在CON组大鼠视网膜中表达为阴性,DM1组阳性率为(18.6±2.74)%,DM3组阳性率约为(34.3±2.21)%,DM6组阳性率为(58.73±2.48)%。结论 糖尿病大鼠骨髓EPCs数量较正常大鼠降低,生物学功能减退。随着DR的进展,EPCs数量逐渐回升。

【关键词】 糖尿病视网膜病变; 内皮祖细胞; 细胞培养

Change in the number and function of endothelial progenitor cells from the bone marrow of rats with diabetic retinopathy ZHANG Wei, HAN Qi, CHEN Song, YAN Hua. Department of Ophthalmology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China
Corresponding author: YAN Hua, Email: phuyan2000@yahoo.com

【Abstract】 Objective To observe the change in the number and function of endothelial progenitor cells (EPCs) from bone marrow in rats with diabetic retinopathy (DR); to discuss the role of EPCs in the pathogenesis of DR. **Methods** In an experimental study, 50 male Wistar rats were divided into a control (CON) group (14 rats) and diabetes (DM) group (36 rats). The rats in the DM were further divided into 3 groups of 12 rats each based on the time periods when analysis was performed: 1 month (DM1), 3 months (DM3) and 6 months (DM6). Mononuclear cells were collected by density gradient centrifugation from the bone marrow of the rats. The isolated cells were cultivated in dishes coated with fibronectin. Immunofluorescence staining and flow cytometry were used to identify EPCs. The number of EPCs in the colony was assayed by CFU counting; proliferation,

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2013.02.008

基金项目:天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(10JCZDJC20300)

作者单位:300052 天津医科大学总医院眼科

通信作者:颜华,Email:phuyan2000@yahoo.com

migration and adhesion function of EPCs were assayed by MTT chromatometry, modified Boyden chamber assay and adhesion activity assay. All eyeballs were examined by hematoxylin and eosin (HE) staining and vascular endothelial growth factor (VEGF) by immunity set expression. The correlation between changes in EPCs and DR morphological changes was analyzed. The changes in the number and function of EPCs from bone marrow and expression of VEGF in the retina were analyzed by single factor analysis of variance and LSD-*t* test. **Results** The number of cell clusters in bone marrow-derived EPCs was significantly reduced in the DM1, DM3, DM6 groups (9.6 ± 1.8 , 11.5 ± 2.5 , 14.0 ± 2.4 n/ $\times 200$ fields) compared to the CON group (16.6 ± 2.7 n/ $\times 200$ fields). The ability of EPCs to proliferate was reduced in the DM1, DM3, DM6 groups (0.133 ± 0.027 , 0.106 ± 0.016 , 0.072 ± 0.011 OD) compared to the CON group (0.203 ± 0.068 OD). The ability of EPCs to migrate was reduced in the DM1, DM3, DM6 groups (11.9 ± 2.2 , 10.1 ± 1.8 , 8.9 ± 1.2 n/ $\times 200$ fields) compared to the CON group (17.9 ± 4.8 n/ $\times 200$ fields). The adhesion ability of EPCs was reduced in the DM1, DM3, DM6 groups (14.8 ± 3.2 , 10.5 ± 2.0 , 7.5 ± 1.2 n/ $\times 200$ fields) compared to the CON group (17.9 ± 4.8 n/ $\times 200$ fields). Accompanied by responsive pathological changes of retinal structure and vessels, the thickness of the retina was reduced and retinal cells became disorganized in the DM1 and DM3 groups. Endothelial cells expressed edema in the DM6 group. The expression of VEGF in the retina of rats was 0, 18.6% \pm 2.74%, 34.3% \pm 2.21%, 58.73% \pm 2.48%, in CON, DM1, DM3, DM6 groups respectively. **Conclusion** The number and biological dysfunction of EPCs from bone marrow were reduced in diabetic rats. With the development of DR, the number of EPCs increased gradually.

[Key words] Diabetic retinopathy; Endothelial progenitor cells; Cell culture

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最为常见的微血管并发症之一,以视网膜组织缺血、缺氧引起的病理性新生血管形成为主要特点。探讨 DR 新生血管形成机制以阻止其发生发展已成为目前眼科研究的前沿与焦点^[1]。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs) 又称血管母细胞,是一种成年个体骨髓中的血管内皮前体细胞;它能迁移至外周血并分化为成熟血管内皮细胞,具有良好的增生潜能^[2]。研究表明, EPCs 参与了生理及病理条件下视网膜新生血管的形成过程^[3]。但目前针对 EPCs 的数量及功能变化与 DR 发生发展过程的相关研究较为少见。为了深入了解 EPCs 与 DR 之间的相关性,我们观察了 Wistar 大鼠 DR 模型骨髓 EPCs 数量及功能的变化情况。

1 对象与方法

1.1 实验动物及模型建立

2个月龄雄性 Wistar 大鼠 50 只,体重 200~250 g。全部大鼠由天津医科大学动物中心提供,均饲养于标准化动物中心且无特定病原体动物(SPF)级动物房,自由饮水摄食。采用随机数字表法,将 50 只大鼠随机分为正常对照(CON)组(14 只大鼠)和糖尿病(DM)组(36 只大鼠)。随机选择 8 只大鼠,做 EPC 的培养,余下做视网膜病理切片。采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ)溶液的方法建立 DM 模型^[4]。建模成功 1 周后开始计算糖尿病病程,根据病程将糖尿病

组大鼠再分为糖尿病 1 个月(DM1)组、糖尿病 3 个月(DM3)组、糖尿病 6 个月(DM6)组,每组各 12 只,分别于造模成功后 1、3、6 个月时取材。

1.2 大鼠骨髓来源 EPCs 的分离、培养及鉴定

采用大鼠骨髓经过密度梯度离心的方法分离单核细胞^[5]。各组中随机选择 8 只大鼠在各观察期末吸入乙醚麻醉后断头处死,75%乙醇浸泡 15 min,剪取股骨和胫骨,使用预冷至 4℃的 0.9%氯化钠注射液 5~10 ml 反复冲洗骨髓腔,至冲洗液清亮。将冲洗液充分吹打混匀,缓慢加入装有淋巴细胞分离液的离心管,冲洗液与分离液的体积比为 2:1。20℃下 2000 r/min 离心 20 min。轻轻吸取离心管中间单核细胞层到新的离心管中,加入 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)洗细胞沉淀 2 次。EGM-2 完全培养液重悬细胞,反复轻柔吹打制成单细胞悬液后成浓度为 $1\times 10^6/L$ 。加于提前包被有人纤维连接蛋白的 12 孔板上,在 37℃,5%CO₂ 的细胞培养箱中培养。2 d 后首次全量换液,弃去悬浮细胞,继续培养。此后每隔 3 d 更换培养液。第 7 天于倒置相差显微镜下,随机选择 5 个 200 倍显微镜视野计数,以评估骨髓 EPCs 的数量水平。

取培养第 1 代细胞进行鉴定,培养 7 d 时,以 FITC-UEA-1 和 Dil-Ac-LDL 双标鉴定^[1]。细胞与 10 μg/ml 的 Dil-acLDL 37℃培养 4 h,以检测 EPCs 对 Dil-acLDL 的摄取;然后加入 2%多聚甲醛 4℃固定细胞 10 min,再与 FITC-UEA-1 37℃培养 1 h,洗

去多余染料后,中性甘油封片。在激光共聚焦显微镜下观察,Dil-Ac-LDL和FITC-UEA-I双染色阳性细胞,鉴定为正在分化的EPCs。收集培养瓶中第7天贴壁细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^{10}/L$,分别加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的CD34和CD133抗体 $5 \mu l$,室温避光孵育30 min, $1600 r/min$ 离心5 min,PBS洗涤2次,进行流式细胞术鉴定。以CD34、CD133双阳性为EPCs。

1.3 EPCs的功能测定

收集第7天贴壁细胞,调整细胞浓度为 $2 \times 10^6/L$,将细胞接种到包被有纤维连接蛋白(fibronectin, FN)的96孔培养板,每孔 $100 \mu l$ 。每孔加 $10 \mu l$ MTT ($5 g/L$),培养4 h后加入二甲基亚砜($150 \mu l/孔$),微量震荡器震荡10 min,置于酶标仪上于波长490 nm处测光密度(OD)值,以测定EPCs的增殖能力。收集第7天贴壁细胞,将 $1200 \mu l$ 培养液和血管内皮生长因子(VEGF)($50 \mu g/L$)加入迁移小室的下室,将 $200 \mu l$ 含 $2 \times 10^4/L$ EPCs的培养液注入上室,培养24 h后,去除滤膜上面的未移动细胞,用 $40 g/L$ 多聚甲醛固定,DAPI荧光染色,置于倒置显微镜下随机选择3个显微镜视野($\times 200$)计数迁移到底层的细胞,以测定EPCs的迁移能力。收集第7天贴壁细胞,将 $2 \times 10^4/L$ EPCs悬浮于 $500 \mu l$ 培养液,然后接种在包被有FN培养板上,在 $37^\circ C$ 、 $5\% CO_2$ 饱和湿度培养箱中培养30 min,洗掉非贴壁细胞后随机选择3个显微镜视野($\times 200$)下计算贴壁细胞,以测定EPCs的黏附能力。

1.4 视网膜组织病理分析

到设定的观察时间点, 4% 多聚甲醛心脏灌注,摘除眼球固定,石蜡包埋,切片厚度 $4 \mu m$ 。常规苏木精-伊红(HE)染色,光学显微镜观察视网膜形态。应用血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)多克隆兔抗人抗体两步法免疫组织化学染色。实验操作步骤严格按照说明书进行。每个眼球标本随机取3张切片,计数指标均由2名病理医师采用双盲法检测,计数5个高倍视野的细胞,取其平均值。计算VEGF表达阳性率(同一检测视野中细胞染色阳性率)。

1.5 统计学方法

实验研究。计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 10.0软件进行统计学分析。组间骨髓EPCs数量、增殖、迁移、黏附能力及VEGF表达阳性率比较,采用单因素方差分析和LSD- t 检验法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPCs培养情况

新分离的外周血单核细胞呈圆形,透亮,悬浮于培养基,台盼蓝染色死细胞 $< 0.5\%$;培养24 h后,可见少数细胞贴壁,大多为圆形或椭圆形,约占 90% ,混有少量纺锤形细胞;培养第3天可见贴壁细胞体积增大,梭形细胞增加;第7天可见梭形细胞较前增多,形成细胞团,部分呈集落样生长(见图1)。

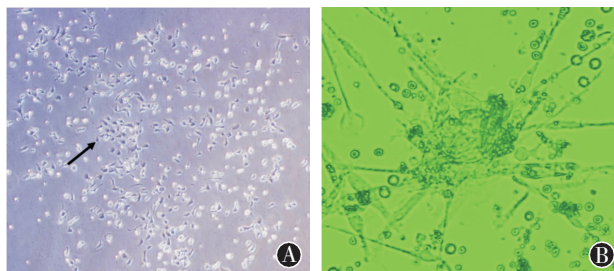


图1 培养第7天时显微镜下观察EPCs
A示梭形细胞较前增多,形成细胞团,部分呈集落样生长(黑箭) $\times 200$;
B示典型的细胞集落形成 $\times 400$

图1 培养第7天时显微镜下观察EPCs

2.2 EPCs鉴定结果

培养第7天的贴壁细胞吞噬Dil-acLDL后,在荧光显微镜下观察呈红色荧光,结合FITC-UEA-I后呈绿色荧光,双染色阳性细胞为黄色荧光(见图2),双染色细胞为正在分化的EPCs。经流式细胞仪鉴定培养的EPCs可以结合CD133和CD34抗体,CD133表明其具有祖细胞的特性,CD34表明其具有内皮细胞的特性(见图3)。

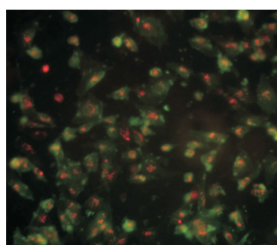


图2 培养第7天时EPCs表面

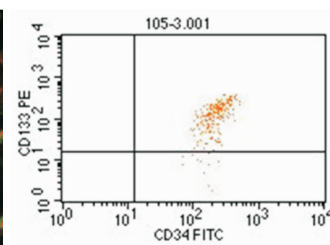


图3 培养第7天时EPCs流式细胞检测图

2.3 EPCs集落数量和增殖、迁移及黏附实验结果

大鼠骨髓EPCs-CFU数量、增殖、迁移及黏附实验结果详见表1。DM1, DM3, DM6组骨髓EPCs-CFU较CON组明显减少,差异有统计学意义($F=13.311$, $P < 0.01$);并且随着观察时间的延长,DM组骨髓EPCs集落数而逐渐回升,DM组间两两比较差异均有统计学意义(DM1与DM3组比较 $t=-1.729$, DM1与DM6组比较 $t=-4.096$, DM3与DM6组比较 $t=-2.066$; $P < 0.05$)。DM1, DM3, DM6组骨髓EPCs增殖能力较CON组明显减少,差异有统计学意义($F=16.091$,

$P < 0.01$); DM 组间两两比较, 差异均有统计学意义 (DM1 与 DM3 组比较 $t = 2.278$, DM1 与 DM6 组比较 $t = 5.513$, DM3 与 DM6 组比较 $t = 4.753$; $P < 0.05$)。DM1, DM3, DM6 组骨髓 EPCs 迁移能力为较 CON 组明显减少, 差异有统计学意义 ($F = 12.506$, $P < 0.01$); DM 组间两两比较, 差异均有统计学意义 (DM1 与 DM1 组比较 $t = 1.723$, DM1 与 DM6 组比较 $t = 3.319$, DM3 与 DM6 组比较 $t = 1.610$; $P < 0.05$)。DM1、DM3、DM6 组骨髓 EPCs 黏附能力较 CON 组明显减少, 差异有统计学意义 ($F = 17.087$, $P < 0.01$); DM 组间两两比较, 差异均有统计学意义 (DM1 与 DM3 组比较 $t = 3.126$, DM1 与 DM6 组比较 $t = 5.937$, DM3 与 DM6 组比较 $t = 3.550$; $P < 0.05$)。随着观察时间的延长, DM 组骨髓 EPCs 增殖、迁移及黏附能力逐渐下降。

2.4 视网膜组织病理变化

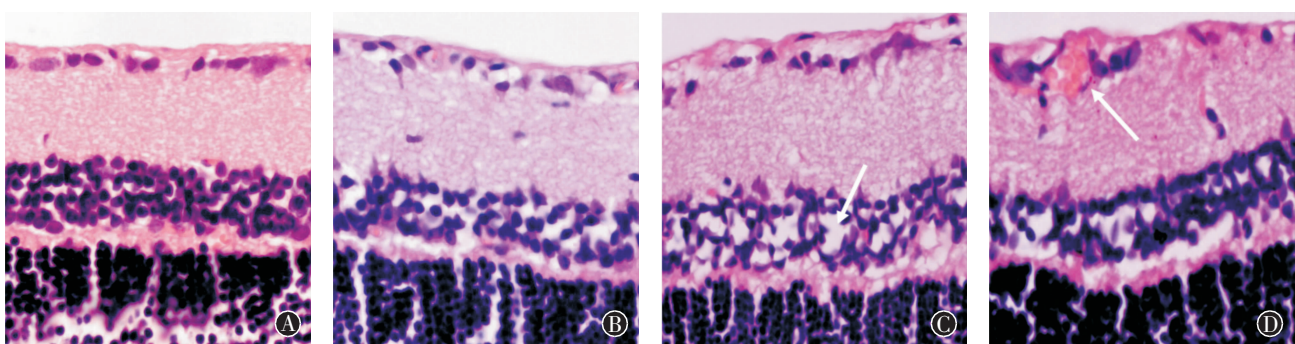
光学显微镜检查结果显示, CON 组视网膜各层结构清晰、排列整齐、形态正常 (见图 4A); 与 CON

组相比, DM1 组视网膜各层开始变薄, 排列紊乱, 视网膜组织水肿, 未见出血 (见图 4B); DM3 组大鼠视网膜内界膜略肿胀, 表面不平, 神经节细胞层及内核层细胞数量减少, 神经节细胞排列不整齐 (见图 4C); DM6 组可见视网膜各层变薄更加明显, 视网膜细胞排列更加紊乱, 部分血管明显扩张 (见图 4D)。

免疫组织化学染色结果显示, CON 组 VEGF 表达为阴性, 视网膜各层组织和细胞排列整齐, 未见明显异常 (见图 5A); DM1 和 DM3 组在视网膜血管壁、内核层、外丛层及内外界膜均可见 VEGF 染色阳性, 主要集中于神经节细胞层 (见图 5B, 5C), 阳性细胞的胞质染色呈深棕色; DM6 组大鼠视网膜神经节细胞层及内核层组织水肿、细胞数减少、排列紊乱, VEGF 表达阳性细胞数最多, 主要集中于神经节细胞层和血管 (见图 5D)。VEGF 在 DM1 组中表达阳性率为 $(18.6\% \pm 2.74)\%$, DM3 组阳性率约为 $(34.3\% \pm 2.21)\%$, DM6 组阳性率为 $(58.73\% \pm 2.48)\%$ 。组间 VEGF

表 1 各组大鼠骨髓 EPCs-CFU 数量和增殖、迁移及黏附功能的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	EPCs 集落数 (个/ $\times 200$ 倍视野)	EPCs 增殖能力 (OD)	EPCs 迁移能力 (个/ $\times 200$ 倍视野)	EPCs 黏附能力 (个/ $\times 200$ 倍视野)
CON 组	14	16.6 \pm 2.7	0.203 \pm 0.068	14.8 \pm 2.6	17.9 \pm 4.8
DM1 组	12	9.6 \pm 1.8	0.133 \pm 0.027	11.9 \pm 2.2	14.8 \pm 3.2
DM3 组	12	11.5 \pm 2.5	0.106 \pm 0.016	10.1 \pm 1.8	10.5 \pm 2.0
DM6 组	12	14.0 \pm 2.4	0.072 \pm 0.011	8.9 \pm 1.2	7.5 \pm 1.2
F 值		13.311	16.091	12.506	17.087
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01



C 图白色箭头显示内核层细胞排列不齐; D 图白色箭头显示血管扩张明显

图 4 各组大鼠视网膜 HE 染色结果 $\times 200$

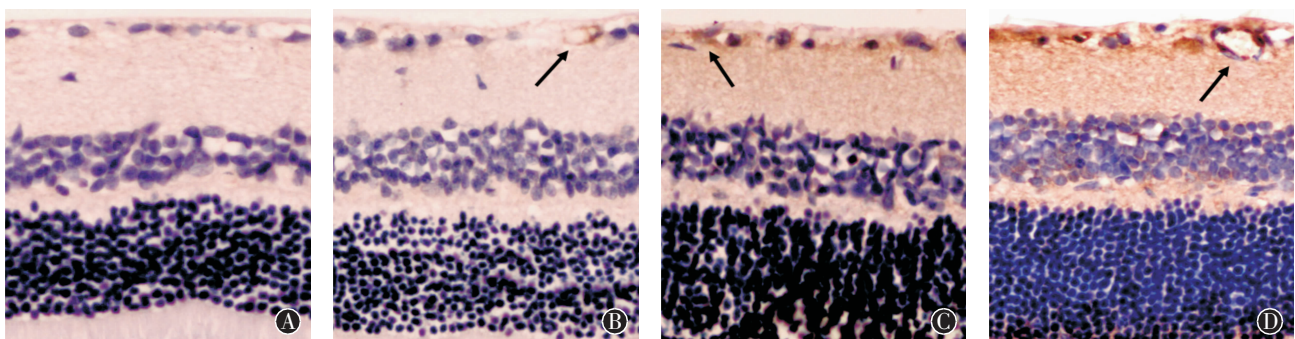


图 5 大鼠视网膜 VEGF 免疫组织化学染色像 (黄色箭头, $\times 200$)

表达阳性率比较,采用方差分析,差异有统计学意义($F=56.314, P<0.05$);组间两两比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

动物实验和临床研究证实,EPCs参与血管内膜损伤后的内皮修复过程,且EPCs尚能分泌生长因子激活血管局部的成熟内皮细胞,维持血管内皮的正常功能^[5]。外周血中的EPCs数量极少,而骨髓中的EPCs含量是外周血中含量的15倍左右^[6]。目前很多实验研究选择大鼠做动物模型,大鼠骨髓容易获得,且无需特殊处理,操作简单,在处死动物后酒精浸泡消毒后即可进行,因而我们选择骨髓作为EPCs的来源。骨髓EPCs分离方法包括免疫磁珠法,贴壁换液纯化培养,生物素-抗生物素亲和吸附等^[7]。本研究采用贴壁换液培养法,利用适于EPCs生长的EGM-2培养基和FN针对EPCs黏附的特性,基本去除了骨髓中的间充质干细胞,纯化骨髓中的EPCs。经流式细胞仪鉴定,最终所得EPCs为CD34和CD133双阳性细胞,满足了实验的要求。该方法简单、经济,具有较高的实用价值^[8]。

本研究采用腹腔注射STZ建立DR模型,绝大部分大鼠的血糖都达到了建模要求,多饮、多食、多尿和体重减轻的症状明显。VEGF在DR早期即有表达,是目前所知的最强的参与DR病变形成的细胞因子^[9]。我们发现经过1个月或更长时间的糖尿病病程,DM组大鼠已有视网膜组织水肿,细胞排列紊乱,毛细血管扩张等;随着病程的延长,血-视网膜屏障破坏引起视网膜VEGF表达阳性率逐渐增高,视网膜各层神经细胞损害加重,说明已经出现DR表现,类似于人类非增殖性DR。这期间,大鼠骨髓EPCs的数量和功能也发生着改变:糖尿病组骨髓EPCs集落数和增殖,迁移,黏附能力较对照组明显下降。这与既往相关研究结果类似:焦明菲等发现DR大鼠外周血EPCs的数量明显低于正常鼠,随着病程延长,DR大鼠外周血EPCs呈增多趋势^[10]。临床研究表明DM患者循环血中EPCs的数量较正常人减少约40%,而且EPCs增殖、迁移、黏附能力均明显降低^[11]。其原因可能是糖尿病大鼠由于长期高血糖增加氧化应激,直接影响骨髓EPCs的动员或生存时间所致^[12]。另一方面,由于EPCs参与糖尿病致内皮损伤后的修复过程,持续的内皮损伤和内皮功能障碍可导致骨髓EPCs过量消耗^[13]。

本研究结果显示,随着观察时间的延长,DM组骨髓EPCs集落数逐渐回升但EPCs增殖、迁移、黏

附能力却逐渐下降。曾有文献报道90例1型糖尿病患者中非PDR患者外周血EPCs数量减少,而PDR患者外周血EPCs数量升高^[14]。Asnaghi等^[15]分离培养DR患者循环血中EPCs,发现PDR患者EPCs集落数量高于DM患者并接近正常人水平。我们认为随着DR进展骨髓EPCs数量之所以升高是由于EPCs受到动员刺激,分析其原因可能是DR引起视网膜缺血缺氧增强骨髓EPCs的动员,使骨髓EPCs数量增加,有利于促进损伤血管的再内皮化、新生血管的增生及缺血组织侧支循环的形成^[16]。此外,DR病变过程中会产生VEGF、成纤维细胞生长因子(FGF)、血小板源性生长因子(PDGF)等多种细胞因子,使大量EPCs从骨髓中动员、迁移,并定植到视网膜缺血部位,形成病理性新生血管^[17]。但值得注意的是,骨髓EPCs受到动员而数量增加,但EPCs的生物学功能却没有得到改善,不仅无法完成EPCs内皮修复的作用,而且EPCs受到动员聚集于视网膜甚至可能促进新生血管的形成。由此我们推测EPCs在糖尿病不同时期发病机制中的作用可能不同,糖尿病早期EPCs数量减少和功能受损是导致视网膜血管内皮修复障碍的因素之一;糖尿病中后期功能障碍的EPCs受到动员、迁移,并定植到视网膜缺血部位,促进病理性新生血管的形成^[18]。

本研究由于实验条件所限,研究的样本量较小且大鼠DR模型的糖尿病病程较短,宜再扩大样本量延长观察时间进行下一步的研究以排除误差对实验结果的影响。另外,我们仅检测了大鼠DR模型骨髓EPCs数量和功能变化,尚不能为说明EPCs在DR发病机制中的作用提供直接证据。这有待今后进一步对DR大鼠视网膜组织以及相关分子生物学通路进行研究,以直接证实EPCs与DR的相关性。

参考文献:

- [1] Hammes HP, Feng Y, Pfister F, et al. Diabetic retinopathy: targeting vasoregression. *Diabetes*, 2011, 60:9-16.
- [2] Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287:572-579.
- [3] Bhatwadekar AD, Glenn JV, Li G, et al. Advanced glycation of fibronectin impairs vascular repair by endothelial progenitor cells: implications for vasodegeneration in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49:1232-1241.
- [4] Muranaka K, Yanagi Y, Tamaki Y, et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its ligand on blood-retinal barrier in a streptozotocin-induced diabetic model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47:4547-4552.
- [5] Li Calzi S, Neu MB, Shaw LC, et al. Endothelial progenitor dysfunction in the pathogenesis of diabetic retinopathy: treatment concept to correct diabetes-associated deficits. *EPMA J*, 2010,

- 1:88-100.
- [6] Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, et al. CD34-blood-derived human endothelial cells progenitors. *Stem Cells*, 2001, 19:304-312
- [7] Rustemeyer P, Wittkowski W, Jurk K, et al. Optimized flow cytometric analysis of endothelial progenitor cells in peripheral blood. *J Immunoassay Immunochem*, 2006, 27:77-88.
- [8] Masaaki Ii. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells: isolation and characterization for myocardial repair. *Methods Mol Biol*, 2010, 660:9-27.
- [9] 彭晓燕, 陈大年. 血管内皮生长因子和眼内新生血管. *中华眼底病杂志*, 1999, 15:62.
- [10] 焦明菲, 颜华. 糖尿病视网膜病变对大鼠循环外周血内皮祖细胞数量的影响. *中华眼底病杂志*, 2011, 27:250-254.
- [11] Menegazzo L, Albiero M, Avogaro A, et al. Endothelial progenitor cells in diabetes mellitus. *Biofactors*, 2012, 38:194-202.
- [12] El-Remessy AB, Bartoli M, Platt DH, et al. Oxidative stress inactivates VEGF survival signaling in retinal endothelial cells via PI 3-kinase tyrosine nitration. *J Cell Sci*, 2005, 118:243-252.
- [13] Hfistov M, Erl R, Weber PC. Endothelial progenitor cells mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*, 2003, 23:1185-1189.
- [14] Brunner S, Schemthaler GH, Salter M, et al. Correlation of different circulating endothelial progenitor cells to stages of diabetic retinopathy: first in vivo data. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50:392-398.
- [15] Asnaghi V, Lattanzio R, Mazzolari G, et al. Increased clonogenic potential of circulating endothelial progenitor cells in patients with type 1 diabetes and proliferative retinopathy. *Diabetologia*, 2006, 49:1109-1111.
- [16] Kramerov A, Saghizadeh M, Caballero S. Inhibition of protein kinase CK2 suppresses angiogenesis and hematopoietic stem cell recruitment to retinal neovascularization sites. *Mol Cell Biochem*, 2008, 316:177-186.
- [17] Caballero S, Sengupta N, Afzal A, et al. Ischemic vascular damage can be repaired by healthy, but not diabetic, endothelial progenitor cells. *Diabetes*, 2007, 56:960-967.
- [18] Li Calzi S, Neu MB, Shaw LC, et al. EPCs and pathological angiogenesis: when good cells go bad. *Microvasc Res*, 2010, 79:207-216.

(收稿日期:2011-11-21)

(本文编辑:吴彬,郑俊海)

(上接第91页)

参考文献:

- [1] 马胜生, 梁纳, 甄兆忠, 等. 眼屈光要素对青少年近视的影响. *眼视光学杂志*, 2003, 5:104-106.
- [2] 谢红莉, 谢作措, 叶景, 等. 我国青少年近视现患率及相关因素分析. *中华医学杂志*, 2010, 90:439-442.
- [3] Saw SM, Carkeet A, Chia KS, et al. Component dependent risk factors for ocular parameters in Singapore Chinese children. *Ophthalmology*, 2002, 109:2065-2071.
- [4] Strang NC, Schmid KL, Carney LG. Hyperopia is predominantly axial in nature. *Curr Eye Res*, 1998, 17:380-383.
- [5] Cordain L, Eaton SB, Miller JB, et al. An evolutionary analysis of the aetiology and pathogenesis of juvenile-onset myopia. *Acta Ophthalmol Scand*, 2002, 80:125-135.
- [6] Wong TY, Foster PJ, Johnson GJ, et al. The relationship between ocular dimensions and refraction with adult stature: The Tanjong Pagar survey. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42:1237-1242.
- [7] Saw SM, Chua WH, Hong CY, et al. Height and its relationship to refraction and biometry parameters in Singapore Chinese children. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43:1408-1413.
- [8] Ojaimi E, Morgan IG, Robaei D, et al. Effect of stature and other anthropometric parameters on eye size and refraction in a population-based study of Australian children. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46:4424-4429.
- [9] 姚兴家. 儿童少年单纯性肥胖及预后. *中国学校卫生*, 2003, 24:97-98, 102.
- [10] 朱永新. 青少年身体素质下降问题亟待重视. *天津教育*, 2007:18-19.
- [11] Brown NP, Koretz JF, Bron AJ. The development and maintenance of emmetropia. *Eye (Lond)*, 1999, 13:83-92.
- [12] 胡诞宁, 褚仁远, 吕帆, 等. 近视眼学. 北京:人民卫生出版社, 2009:160.
- [13] Morgan I, Rose K. How genetic is school myopia? *Prog Retin Eye Res*, 2005, 24:1-38.
- [14] Cordain L, Eaton SB, Brand MJ, et al. An evolutionary analysis of the aetiology and pathogenesis of juvenile-onset myopia. *Acta Ophthalmol Scand*, 2002, 80:125-135.
- [15] Cordain L, Eades MR, Eades MD. Hyperinsulinemic diseases of civilization: more than just Syndrome X. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2003, 136:95-112.
- [16] Lim LS, Gazzard G, Low YL, et al. Dietary Factors, Myopia, and Axial Dimensions in Children. *Ophthalmology*, 2010, 117:195-199.
- [17] Sharma A, Congdon N, Gao Y, et al. Height, stunting, and refractive error among rural Chinese school children: the see well to learn well project. *Am J Ophthalmol*, 2010, 149:347-353.
- [18] Dirani M, Islam A, Baird PN. Body stature and myopia. The genes in myopia (GEM) twin study. *Ophthalmic Epidemiol*, 2008, 15:135-139.
- [19] Lin LL, Shih YF, Hsiao CK, et al. Epidemiologic study of the prevalence and severity of myopia among schoolchildren in Taiwan in 2000. *J Formos Med Assoc*, 2001, 100:684-691.
- [20] Lin LL, Shih YF, Tsai CB, et al. Epidemiologic study of ocular refraction among schoolchildren in Taiwan in 1995. *Optom Vis Sci*, 1999, 76:275-281.
- [21] Mutti DO, Zadnik K, Fusaro RE, et al. Optical and structural development of the crystalline lens in childhood. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39:120-33.

(收稿日期:2012-03-12)

(本文编辑:毛文明)