

色素上皮衍生因子对视网膜X射线损伤的保护作用

朱冉^{1,2} 丁伯洋^{1,2} 李文艳^{1,2} 李捷^{1,2} 刘芬菊^{1,2} 陈新建^{2,3} 俞家华^{1,2}

¹(苏州大学苏州医学院放射医学与防护学院 苏州 215123)

²(放射医学与辐射防护国家重点实验室 苏州 215123)

³(苏州大学电子信息学院 苏州 215006)

摘要 本文通过体内外实验研究了色素上皮衍生因子(Pigment epithelium-derived factor, PEDF)对X射线引起视网膜损伤的保护作用。通过PEDF受体抑制剂处理和siRNA转染人视网膜色素上皮细胞系ARPE-19来抑制PEDF功能,逆转录荧光定量PCR与ELISA测定siRNA降低PEDF表达的效果,CCK-8实验测定X射线照射后细胞活力的变化,采用小动物放射治疗模拟定位机设左右两野对穿照射小鼠眼部,每野照射10 Gy X射线,总剂量为20 Gy,配制含2 nmol/L PEDF-34(PEDF第44~77位的34个氨基酸片段)的生理盐水溶液,照射后每天滴眼处理小鼠,连续4周,照射8周后取眼球进行苏木素伊红(HE)染色与TUNEL染色,观察视网膜病变和细胞凋亡情况。体外实验表明,预处理PEDF受体抑制剂和降低PEDF表达可增强X射线对ARPE-19细胞的损伤作用,PEDF-34对X射线引起的ARPE-19细胞损伤具有保护作用。小鼠实验表明,20 Gy X射线照射后8周视网膜色素上皮细胞层出现结构异常,外核层含有凋亡细胞,PEDF-34处理组保持了视网膜的正常结构且并无凋亡细胞。本研究提示:PEDF在X射线引起的视网膜辐射损伤中具有保护效果,PEDF-34滴眼可缓解视网膜X射线损伤,为研究防治放射性视网膜病变的新方法提供了实验依据。

关键词 色素上皮衍生因子,视网膜辐射损伤,色素上皮细胞,凋亡

中图分类号 R811

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2022-0020

Protective effects of pigment epithelium-derived factor against X-ray-induced retinopathy

ZHU Ran^{1,2} DING Boyang^{1,2} LI Wenyan^{1,2} LI Jie^{1,2} LIU Fenju^{1,2} CHEN Xinjian^{2,3} YU Jiahua^{1,2}

¹(School of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

²(State Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Suzhou 215123, China)

³(School of Electronic and Information Engineering, Soochow University, Suzhou 215006, China)

ABSTRACT The protective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) against X-ray-induced retinopathy were investigated *in vitro* and *in vivo*. The function of PEDF was suppressed using PEDF receptor inhibitors and transfection of siRNA in human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19. The decreased expression of PEDF was measured using quantitative fluorescent reverse transcription PCR and ELISA. Cell

基金资助: 放射医学与辐射防护国家重点实验室协作课题(GZN1201801)资助

第一作者: 朱冉,女,1996年11月出生,2019年于山东第一医科大学获学士学位

通信作者: 俞家华,副教授, E-mail: yujiahua@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2022-02-21; 修回 2022-05-10

Supported by Collaborative Project of State Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection (GZN1201801)

First author: ZHU Ran (female) was born in November 1996, and obtained her bachelor's degree from Shandong First Medical University in 2019

Corresponding author: YU Jiahua, associate professor, E-mail: yujiahua@suda.edu.cn

Received 21 February 2022; accepted 10 May 2022

viability after X-ray exposure was monitored using the CCK-8 method. Both left and right irradiation fields were set up to deliver X-rays to the eyes of mice using a small animal radiotherapy simulation machine. Each field was irradiated with 10 Gy. The total dose was 20 Gy. The saline containing 2 nmol/L PEDF-34, a 34-amino acid fragment at positions 44~77 of the PEDF, was prepared. After irradiation, the mice were treated with eye drops every day for 4 weeks. After 8 weeks, the eyeballs were harvested for HE and TUNEL staining and checked for retinopathy and apoptosis. The results showed that pretreatment via PEDF receptor inhibitors and the reduction of PEDF expression aggravated X-ray-induced cell damage in ARPE-19 cells, while PEDF-34 exerted protective effects against X-ray-induced cell damage. Eight weeks after irradiation with a dose of 20 Gy, the experimental mice demonstrated aberrant morphology in the retinal pigment epithelial cell layer and apoptotic cells in the outer nuclear layer. The PEDF-34-treated group maintained a structurally normal retina and had no apoptotic cells. The current study indicates that PEDF has a protective effect against radiation-induced retinopathy, and the PEDF-34-containing eye drops could alleviate the injury. Our findings may provide an experimental basis for a new treatment approach for radiation retinopathy.

KEYWORDS Pigment epithelium-derived factor, Radiation-induced retinal injury, Pigment epithelium cell, Apoptosis

CLC R811

色素上皮衍生因子(Pigment epithelium-derived factor, PEDF)是由418个氨基酸组成的分泌型糖蛋白,分子量为50 kDa,属于丝氨酸蛋白酶抑制蛋白超家族成员,因首次在视网膜色素上皮(Retinal pigment epithelium, RPE)细胞中被发现而得名,其在心、脑、肝、肾、肺、骨等组织广泛表达,具有多种活性功能,如营养神经、抗血管生成、抗氧化、抗炎症与抗肿瘤功能^[1-4]。在动物模型中发现敲除PEDF可加重诱导性和遗传性的视网膜变性^[5],体内外实验也表明外源性给予PEDF可以有效保护RPE细胞和感光细胞^[6-7],说明眼部的PEDF对于维持视网膜的正常功能、抵御外界损伤因素具有重要作用。

放射性视网膜病变常见于葡萄膜黑色素瘤与鼻咽癌放疗后,是导致患者视力损伤和眼球萎缩的重要原因,主要的病理学改变是血管内皮细胞损伤、黄斑水肿、视网膜变性坏死,目前尚无特异性疗法,临床主要治疗手段是采用糖皮质激素抗炎与抗血管生成因子,但对于视力损伤的疗效并不理想^[8-9]。本研究旨在研究PEDF对视网膜辐射损伤的作用,我们选用了人RPE细胞ARPE-19,在抑制PEDF功能后检测了X射线对ARPE-19细胞的损伤作用,接着分析了PEDF上第44~77位的34个氨基酸片段(PEDF-34)对视网膜X射线损伤的保护作用。本实验结果能为临床防治放射性视网膜病变提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

杜氏改良Eagle:F12培养基(DMEM:F12)(美国Hyclone);胎牛血清(FBS)(以色列BI);Atglistatin(ATG)(美国Selleck);溴烯醇内酯(Bromoenol lactone, BEL)(美国Sigma);CCK-8试剂盒与苏木素伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);Lipofectamine RNAiMAX Reagent(美国Invitrogen);PEDF siRNA(siRNA1:正义链5'-GCGAACAGAAUCCAUCAUUTT-3',反义链5'-AAUGAUGGAUUCUGUUCGCTT-3'; siRNA2: 正义链5'-GCAGUGGGUAAACAAAGUUUTT-3',反义链5'-AAACUUUGUUACCCACUGCTT-3'; siRNA3:正义链5'-CCGGAAGCAUGAGUAUCAUTT-3',反义链5'-AUGAUACUCAUGCUUCCGGTT-3';阴性对照siRNA: 正义链5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',反义链5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3')由上海吉玛制药技术有限公司合成;RNA小量抽提试剂盒与逆转录试剂盒(日本Takara);Talent荧光定量检测试剂盒(北京天根生化科技有限公司);PCR引物(PEDF:正向5'-TTCAAAGTCCCCGTGAACAAG-3',反向5'-GAGAGCCCGGTGAATGATGG-3'; GAPDH:正向5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3',反向5'-

AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3')由上海生工生物工程有限公司合成; PEDF ELISA 试剂盒(武汉菲恩生物科技有限公司); PEDF-34 由南京晨胎生物科技有限公司合成; 眼球固定液(武汉塞维尔生物科技有限公司); TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术有限公司)。

1.2 细胞培养与照射

ARPE-19 细胞购自北京中生奥邦生物技术有限公司, 采用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素与 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM:F12 培养基于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养, 每 2~3 d 传代一次。细胞照射采用 RS-2000 Pro 型 X 射线辐照仪(美国 Rad Source), 管电压为 160 kV, 管电流为 25 mA、剂量率为 1.1 Gy/min, 剂量率采用指型电离室标定。

1.3 CCK-8 细胞活力测定

取对数生长期的 ARPE-19 细胞, 以 4 000 个细胞/孔接种于 96 孔板中, 待 X 射线处理 48 h 后每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液并孵育 2 h, 采用 Synergy 2 酶标仪(美国 BioTek)测定 450 nm 的吸光度, 以空白对照组的吸光度定为 100% 细胞活力。

1.4 siRNA 转染

取对数生长期的 ARPE-19 细胞, 以 20 000 个细胞/孔接种于 6 孔板中, 过夜培养贴壁, 采用 Lipofectamine RNAiMAX Reagent 转染 siRNA (25 pmol/每孔), 继续培养 2 d 后进行后续实验。

1.5 RNA 提取与逆转录

细胞总 RNA 采用 RNA 小量抽提试剂盒提取, 用逆转录试剂盒合成 cDNA, 反应体系: 5 倍的反应缓冲液 2 μ L (含 dNTP、Mg²⁺)、逆转录酶混合物 0.5 μ L (含 RNA 酶抑制剂)、Oligo dT 引物 25 pmol、总 RNA 500 ng、用纯水补足体积到 10 μ L。反应条件: 先 37 °C、15 min, 后 85 °C、5 s。

1.6 荧光定量 PCR

荧光定量 PCR 反应体系: 上述逆转录反应体系 2 μ L、2 倍的 Talent qPCR PreMix 10 μ L、正向引物 6 pmol、反向引物 6 pmol、50 倍 ROX 参考染色 0.4 μ L、用纯水补足体积到 20 μ L。采用 ViiA7 荧光定量 PCR 仪(美国 Life Technologies)进行扩增分析,

反应条件: 预变性 95 °C 3 min、PCR 40 个循环, 每循环 95 °C 5 s、60 °C 15 s。相对定量分析采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法, 以 GAPDH 为内参对照, 阴性对照 siRNA 转染组表达为 1。

1.7 ELISA 测定 PEDF 浓度

ARPE-19 细胞 siRNA 转染 2 d 后换液, 继续培养 4 h 取上层培养基, 4 °C 1 000 $\times$ g 离心 20 min, 采用 PEDF ELISA 试剂盒进行浓度测定, PEDF 标准品倍稀释后与样本分别加入 ELISA 微孔板, 37 °C 孵育 90 min, 用洗涤液洗板 2 次, 每孔加入生物素标记抗体工作液, 37 °C 孵育 60 min, 洗板 3 次, 加入辣根过氧化物酶-链霉亲和素偶联物工作液, 37 °C 孵育 30 min, 洗板 5 次, 加入显色液, 37 °C 孵育 15 min, 加入终止液后采用酶标仪测定 450 nm 的吸光度。将标准浓度与相应吸光度绘制标准曲线并计算样本 PEDF 浓度。

1.8 PEDF 蛋白结构可视化

PEDF 蛋白结构文件下载于 Molecular Modeling Database (PDB ID: 1IMV), 采用 PyMol 2.3.5 软件进行蛋白三维结构的可视化。

1.9 小鼠视网膜辐射损伤模型

6~8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司, 将 PEDF-34 溶于医用生理盐水, 终浓度为 2 nmol/L。小鼠随机分为三组: 空白对照组、20 Gy 照射组和 20 Gy 照射与 PEDF-34 处理组。照射前使用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠, 采用小动物放射治疗模拟定位机 X-RAD SmART (美国 Precision) 设左右两野对穿照射小鼠眼部, 圆形准直器直径 5 mm, 管电压 225 kV, 管电流 13 mA, 每野各照射 10 Gy X 射线, 采用仪器内置平板探测器进行剂量测定。照射结束后于 SPF 动物房饲养, PEDF-34 处理组每天在小鼠眼球滴加 PEDF-34 溶液 2 μ L, 其余两组滴加生理盐水, 滴加处理 4 周后继续饲养, 于照射 8 周后取眼球固定, 石蜡包埋切片, 进行 HE 染色与 TUNEL 染色。本动物实验经苏州大学实验动物伦理委员会批准。

1.10 统计学分析

使用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示, 样本均数比较采用

单因素方差分析, $p < 0.05$ 表示组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制 PEDF 功能对 APRE-19 细胞辐射损伤的作用

作为一种分泌型糖蛋白, PEDF 通过与相应的受体结合发挥生物学作用, PEDF 受体抑制剂 ATG 或 BEL 可阻断其受体的信号传导, 从而发挥抑制 PEDF 的功能^[10-11]。图 1 显示 4 Gy X 射线轻微降低了 ARPE-19 细胞的活力, 但没有统计学差异, 预处理 10 $\mu\text{mol/L}$ ATG 或 1 $\mu\text{mol/L}$ BEL 2 h, 再处理 X 射线可显著降低细胞活力, 与各自单纯药物处理组相比有统计学差异, 提示抑制 PEDF 功能可以增强 X 射线对 ARPE-19 细胞的损伤作用。

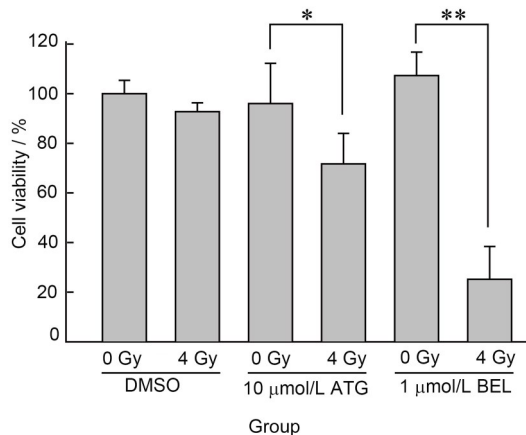


图1 PEDF 受体抑制剂联合 X 射线处理对 ARPE-19 细胞活力的作用; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Fig.1 Effects of PEDF receptor inhibitors and X-ray on the cell viability of ARPE-19 cells; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

2.2 降低 PEDF 表达对 APRE-19 细胞辐射损伤的作用

为降低 ARPE-19 细胞中 PEDF 的表达, 我们针对 PEDF 基因序列设计了三对 siRNA, 转染 2 d 后提取细胞总 RNA 进行逆转录荧光定量 PCR 分析。图 2 (a) 显示三对 siRNA 均可降低 PEDF 的 mRNA 表达水平, 其中 siRNA-1 效果最佳, 用于后续实验。ELISA 证实转染 siRNA-1 能够显著降低细胞培养基中的 PEDF 浓度 (图 2 (b)), 说明 ARPE-19 细胞分泌 PEDF 受到了抑制。siRNA-1 转染 ARPE-19 细胞 2 d 后处理 4 Gy X 射线, 结果表明, siRNA-1 转染组的细胞活力显著低于阴性对照 siRNA 转染组 (图 2 (c))。

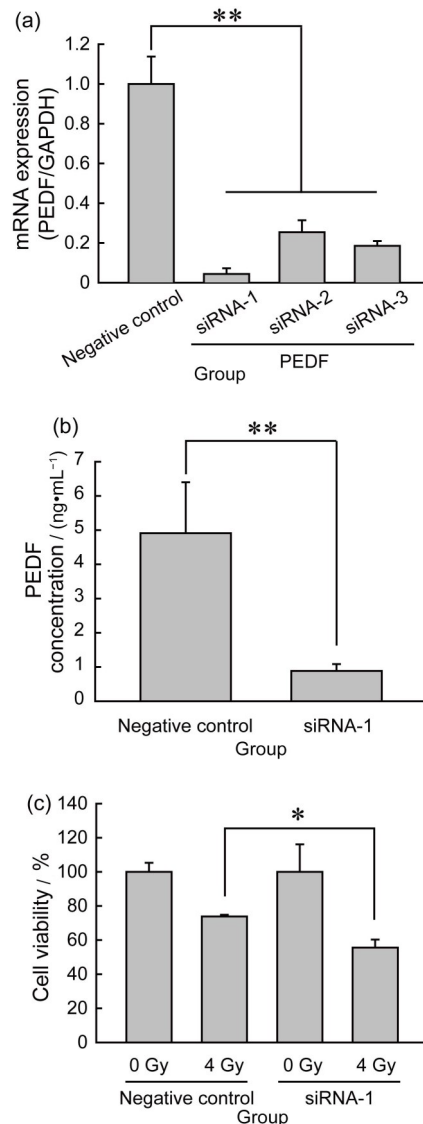


图2 降低 PEDF 表达对 ARPE-19 细胞辐射损伤的作用: (a) 三对 siRNA 转染对 PEDF mRNA 水平的作用; (b) ELISA 检测 siRNA-1 转染后培养基中 PEDF 的浓度; (c) siRNA-1 转染联合 X 射线对 ARPE-19 细胞活力的作用; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Fig.2 Effects of PEDF downregulation on the radiation-induced damage of ARPE-19 cells: (a) effects of three siRNA duplexes transfection on the PEDF mRNA levels; (b) PEDF concentration in the medium measured by ELISA after transfection of siRNA-1; (c) effects of siRNA-1 transfection and X-ray on the cell viability of ARPE-19 cells; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

2.3 PEDF-34 对 APRE-19 细胞辐射损伤的作用

PEDF 中保守的丝氨酸蛋白酶抑制蛋白结构域中包括 10 个 α 螺旋和 3 个 β 折叠, PEDF-34 是 PEDF 上从第 44 位天冬氨酸 (Aspartic acid, D) 到第 77 位的天冬氨酰 (Asparagine, N) 的含 34 个氨基酸的多肽, 覆盖了 1 个 α 螺旋。图 3 (a) 用红色显示了其在 PEDF 蛋白结构中的位置和氨基酸序列。PEDF-34

可通过滴眼直接进入眼球后方,在视网膜处达到足够的浓度,无需损伤性玻璃体注射,无需特殊溶剂载体,具有神经保护和抗血管生成作用^[12-13]。图3(b)

显示 10 pmol/L PEDF-34 预处理 2 h 的细胞活力显著高于单纯照射组,说明 PEDF-34 预处理对 X 射线引起的 ARPE-19 细胞损伤具有一定的保护作用。

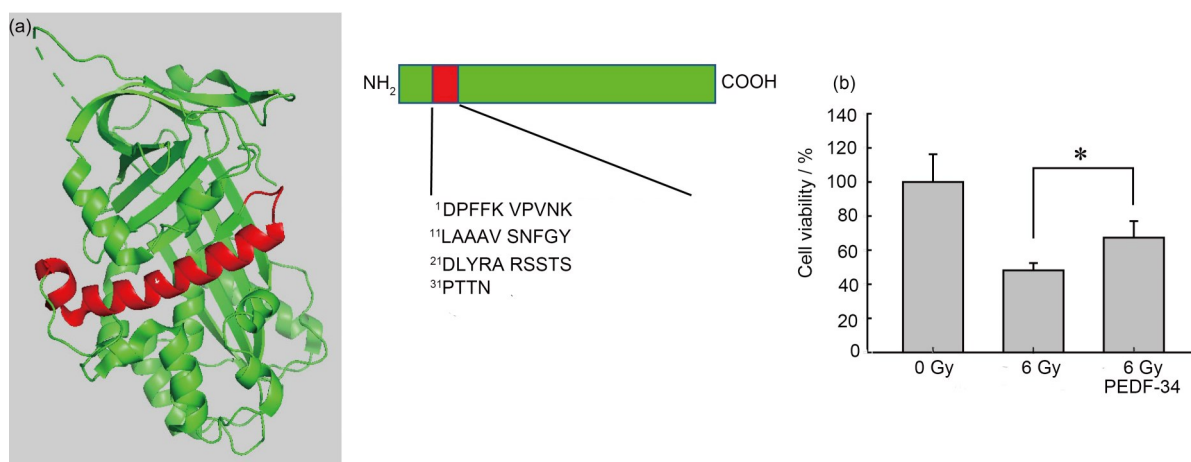


图3 PEDF-34对ARPE-19细胞辐射损伤的保护作用:(a) PEDF的蛋白结构及PEDF-34的氨基酸序列;(b) PEDF-34预处理后X射线照射引起的ARPE-19细胞活力变化; * $p < 0.05$ (彩色见网络版)

Fig.3 Protective effects of PEDF-34 on ARPE-19 cells: (a) the protein structure of PEDF and the amino acid sequence of PEDF-34; (b) pretreatment of PEDF-34 altered the cell viability of ARPE-19 cells damaged by X-ray; * $p < 0.05$ (color online)

2.4 小鼠视网膜辐射损伤模型的构建与组织学观察

为了研究 PEDF-34 在体内对视网膜辐射损伤的作用,采用小动物放射治疗模拟定位机对 C57BL/6J 小鼠眼部设置左右照射野,分别照射 10 Gy。图 4(a)显示了两个照射野在矢状面、水平面、冠状面 CT 图像上的投影,可见两眼均在照射野范围内。照射

后每天用含 2 nmol/L PEDF-34 的生理盐水滴眼处理 4 周,继续饲养 4 周后取眼球进行 HE 染色;图 4(b)显示 20 Gy 处理组的 RPE 细胞层增厚和结构异常与感光层的分界略有不清,内核层与外核层结构略有异常,而 PEDF-34 处理组保持了正常的视网膜结构,提示 PEDF-34 对 X 射线诱导的视网膜损伤具有一定的保护作用。

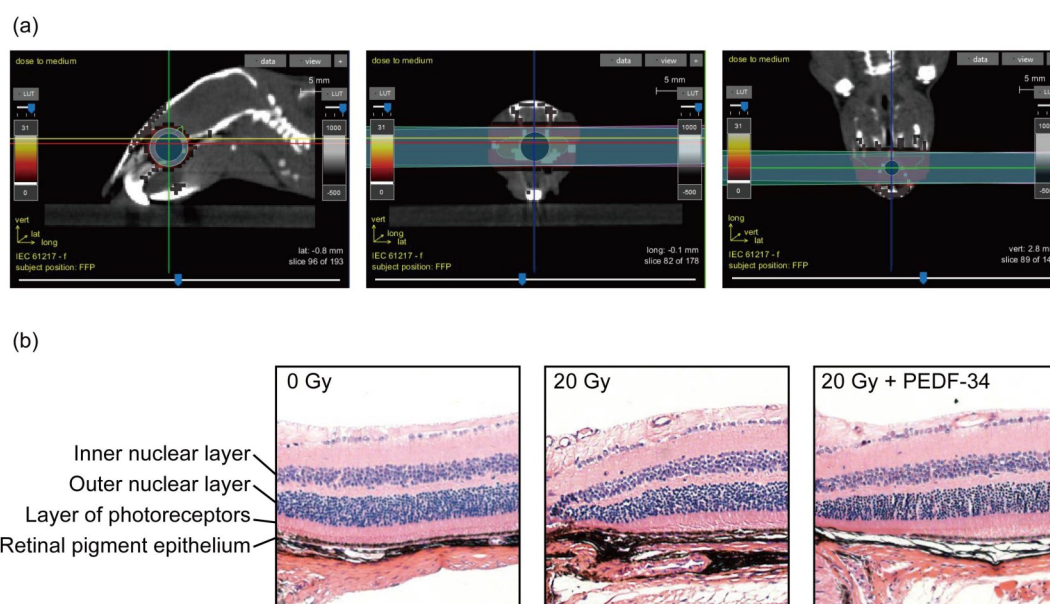


图4 PEDF-34滴眼处理对小鼠视网膜辐射损伤模型的作用:

(a) 左右照射野在矢状面、水平面、冠状面的投影;(b) 小鼠视网膜 HE 染色

Fig.4 Effects of PEDF-34 eye drops on radiation-induced retinal injury in mouse model: (a) median sagittal section, transverse section, and coronal section of the left and right irradiation fields; (b) HE staining of the mouse retina

2.5 PEDF-34处理对视网膜细胞凋亡的作用

TUNEL 染色显示 20 Gy 照射组的小鼠视网膜外核层中存在凋亡细胞,而在空白对照组与 PEDF-34 处理组中未观察到凋亡细胞(图 5)。外核层主要由感光细胞胞体组成的,说明 20 Gy 照射可以诱导感光细胞发生凋亡, PEDF-34 处理可抑制感光细胞发生凋亡。

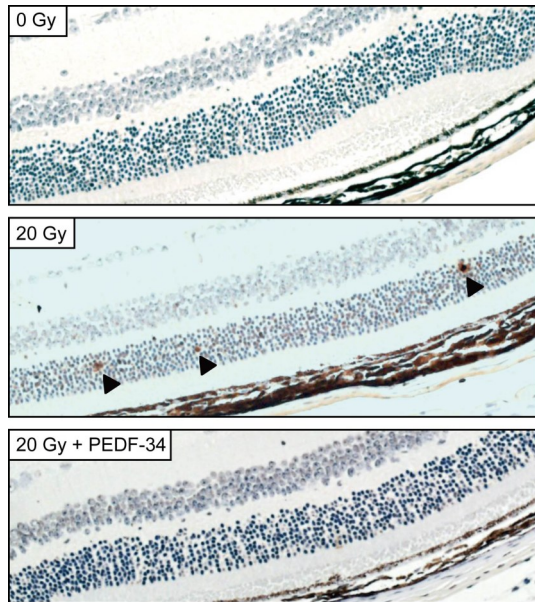


图5 TUNEL 染色检测 PEDF-34 滴眼处理对小鼠视网膜细胞凋亡的作用

Fig.5 Effects of PEDF-34 eye drops on retinal cell apoptosis detected by TUNEL staining

3 讨论

在眼部和头颈部肿瘤放射治疗中,如眼球正常组织受到过量电离辐射照射,会诱导氧化应激损伤、炎症反应、血管内皮损伤,从而导致视网膜细胞变性坏死、血供障碍,进而引发病理性血管生成,最终导致视觉障碍^[14]。在视网膜中, PEDF 主要由 RPE 细胞分泌,具有保护感光细胞、抗氧化、抗炎、抗血管生成作用,本研究在体内外实验中初步研究了 PEDF 对视网膜辐射损伤的保护作用,在 ARPE-19 细胞中发现处理 PEDF 受体抑制剂或降低 PEDF 表达可加重 X 射线诱导的细胞损伤,在小鼠模型中发现眼部局部处理含 PEDF-34 的生理盐水能缓解视网膜损伤,提示 PEDF 及其多肽片段对于放射性视网膜病变具有一定的保护作用。

研究表明, PEDF 能维持 RPE 细胞^[6]、脉络膜内皮细胞^[15]、神经节细胞^[16]、感光细胞^[17]等多种视网膜细胞的正常功能,外源性给予 PEDF 可防治糖尿

病视网膜病变^[3]、光诱导的视网膜损伤^[18]。本研究发现, PEDF 的功能缺失使体外培养的 RPE 细胞更易受到辐射损伤,而给予 PEDF-34 可提高辐射抵抗性。RPE 细胞具有吞噬光感受器外段、促进视网膜代谢、保持离子与电生理稳态的功能,对于保持视网膜正常功能和血-视网膜屏障完整性具有重要意义。在小鼠模型中, 20 Gy X 射线照射 8 周后, RPE 细胞层出现了结构异常,可能使视网膜支持能力受损、血-视网膜屏障破坏,是电离辐射诱导小鼠视网膜损伤的病理基础。 PEDF-34 滴眼是无损的眼部药物输送方法,可以使眼球后部达到有效的浓度^[13],组织学观察发现, PEDF-34 滴眼可以减轻 RPE 细胞层的病理改变,并减少视网膜感光细胞的凋亡。

目前对于 PEDF 保护 RPE 细胞对抗电离辐射的分子机制尚不明确,有研究证实, PEDF 具有抗凋亡功能,可降低视网膜细胞损伤时多种凋亡相关基因的表达与活化^[6]。在过氧化氢诱导的氧化应激中, PEDF 可激活 ERK1/2 与 PI3K/Akt 通路、抑制 p38/MAPK 信号、维持线粒体功能,从而降低活性氧对细胞的损伤^[19]。此外, PEDF 还可抑制视网膜病变过程中肿瘤坏死因子 α 、转化生长因子 β 与单核细胞趋化蛋白等炎症因子的表达,减轻炎症反应^[20]。 PEDF 与其多肽片段的视网膜辐射损伤保护能力可能与其抗凋亡、抗氧化、抗炎的功能有关。有研究表明,氧化应激损伤引起 RPE 细胞的死亡方式较为复杂,坏死与铁死亡可能都参与了 RPE 细胞的损伤过程^[21-22],这两种死亡方式是否参与 PEDF 对 RPE 细胞的防护作用需要进一步的研究明确。

4 结论

PEDF 受体抑制剂处理或降低 PEDF 表达可增强 X 射线对 ARPE-19 细胞的损伤作用,给予 PEDF-34 多肽片段对 X 射线引起的 ARPE-19 细胞损伤具有保护作用。小鼠实验表明, 20 Gy X 射线照射后视网膜色素上皮细胞层出现结构异常,外核层含有凋亡细胞, PEDF-34 多肽片段滴眼处理组能够保持视网膜的正常结构且无凋亡细胞。本实验结果揭示了 PEDF 对 X 射线诱导 RPE 细胞损伤的保护作用,证实了 PEDF-34 多肽片段对视网膜 X 射线损伤有一定的防治功能,为研发治疗放射性视网膜病变的方法提供了新的思路。 PEDF 其他活性多肽片段是否具有同样的效果及其内在分子机制仍需进一步的验证与研究。

作者贡献说明 朱冉是本研究工作的主要执行者,负责体外细胞实验与小鼠模型实验,并完成论文初稿写作;丁伯洋协助体外细胞实验,负责细胞活力的测定;李文艳负责蛋白与多肽的结构分析;李婕负责组织学实验;刘芬菊参与实验设计与论文撰写;陈新建指导小鼠视网膜损伤模型的构建与鉴定;俞家华负责实验设计,结果分析,论文撰写与修改。全体作者均已阅读并同意最终的文本。

参考文献

- 1 Abooshahab R, Dass C R. The biological relevance of pigment epithelium-derived factor on the path from aging to age-related disease[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2021, **196**: 111478. DOI: 10.1016/j.mad.2021.111478.
- 2 Yamagishi S I, Koga Y, Sotokawauchi A, *et al.* Therapeutic potential of pigment epithelium-derived factor in cancer[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2019, **25**(3): 313-324. DOI: 10.2174/1381612825666190319112106.
- 3 He X M, Cheng R, Benyajati S, *et al.* PEDF and its roles in physiological and pathological conditions: implication in diabetic and hypoxia-induced angiogenic diseases[J]. *Clinical Science*, 2015, **128**(11): 805-823. DOI: 10.1042/CS20130463.
- 4 Zhang S X, Wang J J, Gao G Q, *et al.* Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor[J]. *The FASEB Journal*, 2006, **20**(2): 323-325. DOI: 10.1096/fj.05-4313fje.
- 5 Dixit S, Polato F, Samardzija M, *et al.* PEDF deficiency increases the susceptibility of *rd10* mice to retinal degeneration[J]. *Experimental Eye Research*, 2020, **198**: 108121. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108121.
- 6 He Y, Leung K W, Ren Y, *et al.* PEDF improves mitochondrial function in RPE cells during oxidative stress[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2014, **55**(10): 6742-6755. DOI: 10.1167/iovs.14-14696.
- 7 Comitato A, Subramanian P, Turchiano G, *et al.* Pigment epithelium-derived factor hinders photoreceptor cell death by reducing intracellular calcium in the degenerating retina[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, **9**(5): 560. DOI: 10.1038/s41419-018-0613-y.
- 8 陈梦曦, 刘月明, 魏文斌. 葡萄膜黑色素瘤放射治疗后继发放射性视网膜病变的干预治疗研究现状[J]. *中华眼底病杂志*, 2018, **34**(5): 515-518. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2018.05.025.
- 9 CHEN Mengxi, LIU Yueming, WEI Wenbin. Treatment for radiation retinopathy of uveal melanoma undergone radiotherapy: the current situation[J]. *Chinese Journal of Ocular Fundus Diseases*, 2018, **34**(5): 515-518. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2018.05.025.
- 10 Reichstein D. Current treatments and preventive strategies for radiation retinopathy[J]. *Current Opinion in Ophthalmology*, 2015, **26**(3): 157-166. DOI: 10.1097/ICU.0000000000000141.
- 11 Lee S J, Duncan D S, Echevarria F D, *et al.* Pressure-induced alterations in PEDF and PEDF-R expression: implications for neuroprotective signaling in glaucoma [J]. *Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology*, 2015, **6**(5): 491. DOI: 10.4172/2155-9570.1000491.
- 12 Bullock J, Polato F, Abu-Asab M, *et al.* Degradation of photoreceptor outer segments by the retinal pigment epithelium requires pigment epithelium-derived factor receptor (PEDF-R) [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2021, **62**(2): 30. DOI: 10.1167/iovs.62.2.30.
- 13 Amaral J, Becerra S P. Effects of human recombinant PEDF protein and PEDF-derived peptide 34-mer on choroidal neovascularization[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2010, **51**(3): 1318-1326. DOI: 10.1167/iovs.09-4455.
- 14 Vigneswara V, Esmaeili M, Deer L, *et al.* Eye drop delivery of pigment epithelium-derived factor-34 promotes retinal ganglion cell neuroprotection and axon regeneration[J]. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2015, **68**: 212-221. DOI: 10.1016/j.mcn.2015.08.001.
- 15 Yu H J, Scheffler A C. Radiation retinopathy—a review of past and current treatment strategies[J]. *US Ophthalmic Review*, 2020, **13**(1): 34-39. DOI: 10.17925/USOR.2020.13.1.34.
- 16 Farnoodian M, Sorenson C M, Sheibani N. PEDF expression affects the oxidative and inflammatory state of choroidal endothelial cells[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2018, **314**(4): C456-C472. DOI: 10.1152/ajpcell.00259.2017.
- 17 Vigneswara V, Ahmed Z. Pigment epithelium-derived factor mediates retinal ganglion cell neuroprotection by suppression of caspase-2[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, **10**(2): 102. DOI: 10.1038/s41419-019-1379-6.
- 18 Michelis G, German O L, Villasmil R, *et al.* Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and derived peptides

- promote survival and differentiation of photoreceptors and induce neurite-outgrowth in amacrine neurons[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2021, **159**(5): 840-856. DOI: 10.1111/jnc.15454.
- 18 Imai D, Yoneya S, Gehlbach P L, *et al.* Intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor rescues photoreceptors from light-induced cell death[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2005, **202**(2): 570-578. DOI: 10.1002/jcp.20155.
- 19 Brook N, Brook E, Dharmarajan A, *et al.* The role of pigment epithelium-derived factor in protecting against cellular stress[J]. *Free Radical Research*, 2019, **53**(11/12): 1166-1180. DOI: 10.1080/10715762.2019.1697809.
- 20 Park K, Jin J, Hu Y, *et al.* Overexpression of pigment epithelium-derived factor inhibits retinal inflammation and neovascularization[J]. *The American Journal of Pathology*, 2011, **178**(2): 688-698. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.10.014.
- 21 Hanus J, Anderson C, Sarraf D, *et al.* Retinal pigment epithelial cell necroptosis in response to sodium iodate [J]. *Cell Death Discovery*, 2016, **2**: 16054. DOI: 10.1038/cddiscovery.2016.54.
- 22 Liu B H, Wang W Y, Shah A, *et al.* Sodium iodate induces ferroptosis in human retinal pigment epithelium ARPE-19 cells[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, **12**: 230. DOI: 10.1038/s41419-021-03520-2.