

## 研究论文

# 表没食子儿茶素没食子酸酯抑制脂多糖诱导人视网膜内皮细胞中调节活化正常T细胞表达与分泌趋化因子的表达

张惠燕<sup>1</sup>, 王剑勇<sup>2,\*</sup>, 姚航平<sup>3</sup>

<sup>1</sup>杭州职业技术学院, 杭州 310018; <sup>2</sup>浙江大学医学院附属第一医院<sup>2</sup>眼科; <sup>3</sup>感染病诊治国家重点实验室, 杭州 310003

**摘要:** 本研究旨在探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导人视网膜内皮细胞(human retinal endothelial cells, HRECs)炎症反应通路中调节活化正常T细胞表达与分泌趋化因子(regulated upon activation normal T cell expressed and secreted, RANTES)表达的影响及可能机制。将HRECs作为研究对象, 分别用实时细胞计数法和非同位素细胞增殖法检测LPS (50~250 ng/mL)和EGCG (0~200  $\mu$ mol/L)对HRECs的毒性作用, 确定合适的实验药物浓度。再将细胞随机分为正常对照组、LPS组和LPS+不同浓度EGCG (100、50、25、12.5、6.25  $\mu$ mol/L)共7组, 用不同浓度EGCG预处理2 h, 再加入LPS刺激24 h后, 酶联免疫吸附法测定各组培养上清液中RANTES的表达水平, Western免疫印迹法检测蛋白激酶Akt及其磷酸化水平。结果显示, LPS可显著刺激诱导HRECs产生RANTES, EGCG抑制LPS诱导的RANTES表达, 作用呈剂量依赖性。免疫印迹结果也显示, LPS对HRECs炎症过程中的Akt通路起重要作用, EGCG可显著抑制LPS诱导HRECs中Akt信号分子的蛋白磷酸化水平。以上结果提示, EGCG能有效抑制LPS诱导HRECs中RANTES的表达, 其机制可能与抑制Akt信号通路有关。

**关键词:** 表没食子儿茶素没食子酸酯; 调节活化正常T细胞表达与分泌趋化因子; 人视网膜内皮细胞; Akt蛋白磷酸化

**中图分类号:** R774.1

## Epigallocatechin gallate attenuates the expression of regulated upon activation normal T cell expressed and secreted induced by lipopolysaccharide in human retinal endothelial cells

ZHANG Hui-Yan<sup>1</sup>, WANG Jian-Yong<sup>2,\*</sup>, YAO Hang-Ping<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Hangzhou Vocational & Technical College, Hangzhou 310018, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology; <sup>3</sup>State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China

**Abstract:** The present study was undertaken to determine the effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on lipopolysaccharide (LPS)-induced production of inflammatory chemokine regulated upon activation normal T cell expressed and secreted (RANTES) in human retinal endothelial cells (HRECs) and to explore the underlying regulatory mechanism. HRECs were stimulated with LPS in the presence or absence of EGCG at various concentrations (100, 50, 25, 12.5, 6.25  $\mu$ mol/L). The optimum concentration of drug was determined by a real-time cell-electronic sensing (RT-CES) system, and MTS chromatometry was used to detect the toxicity of LPS and EGCG on HRECs. RANTES production in the culture supernatant was measured by ELISA. The expression levels of Akt and phosphorylated Akt were examined by Western blot assay. The result showed that LPS markedly stimulated RANTES secretion from HRECs. EGCG treatment significantly suppressed LPS-induced RANTES secretion in a dose-dependent manner. Furthermore, EGCG

Received 2013-08-03 Accepted 2013-12-24

This work was supported by the Public Technology Application Research Grant of Zhejiang Province, China (No. 2011C33029) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (No. LY13B020002).

\*Corresponding author. Tel: +86-571-86083639; E-mail: wangjy4@zju.edu.cn

exhibited a dose-dependent inhibitory effect on LPS-induced phosphorylation of Akt. Taken together, our data suggest that EGCG suppresses LPS-induced RANTES secretion, possibly via inhibiting Akt phosphorylation in HRECs.

**Key words:** epigallocatechin gallate; RANTES; human retinal endothelial cells; Akt phosphorylation

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病的严重并发症, 也是糖尿病患者致盲的首位原因<sup>[1, 2]</sup>。DR 的发生是一个复杂的病理过程, 近年来炎症细胞因子在糖尿病及其并发症的发生、发展中的作用得到了国内外学者的广泛认可, 越来越多的学者认为, DR 是一种慢性的轻型炎症反应。在糖尿病患者、动物模型以及高糖培养的视网膜细胞中, 可以检测观察到炎症相关因子以及炎症反应特征, 高血糖引起血管内皮细胞表达细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 异常增加, 能和中性粒细胞和单核细胞表面的 CD<sub>18</sub> 相结合, 促进白细胞停滞聚集, 引起内皮细胞的凋亡, 加重血管内皮损伤<sup>[3]</sup>。在 DR 周细胞和血管内皮细胞中发现有核转录因子 (NF- $\kappa$ B) 表达增加, 细胞内诱生型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的上调, 从而引起细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的增多, 使细胞内的环氧化酶 (cyclooxygenase, COX) 水平增加, 特别是 COX<sub>2</sub> 可以引起前列腺素、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 水平增高, 从而改变血管通透性, 引起内皮细胞凋亡<sup>[4]</sup>。现研究证明单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)、白细胞介素 (interleukin, IL)-1、IL-6、ICAM-1、iNOS、TNF- $\alpha$  等炎症相关细胞因子的表达异常与 DR 的启动、发生及发展密切相关, 这些研究结果提供的证据也支持炎症在 DR 发病机制中的作用<sup>[5-7]</sup>。目前有证据表明, 包括调节活化正常 T 细胞表达与分泌的趋化因子 (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted, RANTES) 在内的炎性分子及其信号通路的激活在 DR 发病机制中起重要作用<sup>[8]</sup>, 阻抑相关炎性因子及其通路的表达或许有助于糖尿病及其并发症的防治<sup>[9]</sup>。

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是引起炎症反应的关键性介质之一, 能诱导血管内皮细胞炎性细胞因子 MCP-1、ICAM-1、IL-8 和血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) 等的表达增强, 研究表明 LPS 通常通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 等

信号转导通路途径起作用<sup>[10, 11]</sup>。表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 是从绿茶中提取的一种儿茶素单体, 它具有广泛的抗炎、抗氧化作用, 能改善糖尿病及肾脏、心脏相关并发症, 对胰岛素抵抗等多种代谢紊乱有一定的调节作用<sup>[12]</sup>, 最近也有对糖尿病视网膜疾病及角膜新生血管影响方面的报道<sup>[13]</sup>。本研究选用人视网膜内皮细胞 (human retinal endothelial cells, HRECs) 为研究对象, 观察不同浓度 EGCG 对 LPS 诱导 HRECs 中 RANTES 表达的影响, 初步探讨其可能作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 主要试剂和材料** HRECs 购自美国 ScienCell 公司, LPS 购自美国 Sigma 公司。EGCG 由浙江大学生命科学学院茶叶研究所提供, 纯度 98%, 溶于无水乙醇中, 储存液浓度为 500 mmol/L。CellTiter 96® AQ<sub>ueous</sub> 单溶液细胞增殖检测试剂盒 (MTS) 为美国 Promega 公司产品。细胞因子 RANTES ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司。兔抗人磷酸化及非磷酸化 Akt 抗体和细胞裂解液为美国 Cell Signaling Technology 公司产品。兔抗  $\beta$ -actin 抗体及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗为美国 Santa Cruz 公司产品。DMEM 细胞培养基及胎牛血清等购自 Invitrogen 公司。实时细胞分析系统 (real-time cell-electronic sensing, RT-CES)<sup>TM</sup> 及相关检测试剂盒购自杭州艾森生物公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和药物浓度选择** 采用 RT-CES 实时细胞计数确定 LPS 对细胞的毒性作用, 由此确定合适的药物作用浓度。使用 DMEM 培养液和 10% 优等胎牛血清, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 HRECs。细胞实验前先彻底去除血清, 培养瓶内加入含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶溶液, 细胞消化后转移至 15 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心, 再重悬, 细胞计数仪中计数后将细胞悬液稀释到  $2.5 \times 10^4$  /mL, 确定检测基线, 并对不同浓度 LPS 组 (50、100、150、200、250 ng/mL) 样本进行实时细胞计数测定, 确定后续实验中 LPS 的合适浓度。

**1.2.2 细胞处理和细胞增殖检测** 取对数生长期

HRECs, 分别用不同浓度的 EGCG (终浓度为 6.25、12.5、25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理细胞 2 h 后, 加入 LPS (其浓度根据 1.2.1 结果确定) 刺激 24 h, 同时设正常细胞和单独 LPS 处理细胞作为对照组。采用 CellTiter 96<sup>®</sup> AQ<sub>ueous</sub> 单溶液细胞增殖检测试剂盒 (MTS), 将细胞  $1 \times 10^4$  孔接种于 96 孔培养板中, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的 EGCG 和 LPS。培养 24~48 h 后每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTS 反应液, 继续培养 2 h, 于全自动酶标仪在 490 nm 处读取吸光值 ( $A_{490}$ ), 以  $A_{490}$  值大小代表细胞增殖活性的高低。根据药物毒性作用选择后续实验中 EGCG 浓度。

**1.2.3 RANTES 检测** 将细胞以  $3 \times 10^5$  孔接种于 24 孔板中, 待细胞贴壁后, 用不同浓度 (6.25~100  $\mu\text{mol/L}$ ) 的 EGCG 预处理 2 h, 然后加入终浓度为 200 ng/mL 的 LPS 继续培养 24 h, 收集培养上清液用 ELISA 法检测 RANTES 水平。检测程序严格按照试剂盒说明书进行, 最后根据标准反应曲线求得各检测样本中 RANTES 表达水平。

**1.2.4 Western blot 分析** 细胞培养于 10 cm 培养皿中, 处理方法同上。弃培养上清液, 细胞用 PBS 洗涤 1 次后加细胞裂解液, 冰浴裂解细胞, BCA 蛋白定量试剂 (美国 BioRad 公司) 检测裂解液中总蛋白浓度。取 40  $\mu\text{g}$  蛋白样本加入  $2 \times$  SDS 上样缓冲液, 以 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至硝酸纤维素膜 (美国 BioRad 公司), 封闭液作用 2 h 后, 加入一抗 (兔抗人磷酸化及非磷酸化 Akt 抗体、兔抗  $\beta$ -actin 抗体) 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。以洗涤缓冲液洗膜 4 次后, 再加

入辣根过氧化物酶结合的羊抗兔 IgG (美国 Pierce 公司, 用封闭液 1:10 000 稀释) 室温下作用 1 h, 洗膜 4 次后, 使用 ECL 化学发光底物显影并在 Versal Doc 5000 (美国 BioRad 公司) 全自动成像系统中曝光成像, 根据目标条带的灰度扫描值计算磷酸化 Akt 蛋白的相对表达量, 用  $\beta$ -actin 作为内参校正后的 p-Akt 与 Akt 的比值表示。

**1.3 统计学分析** 细胞实验在前期预实验基础上进行 3 次独立重复实验, 每次 3 个复孔完成相关的数据采集。实验数据用  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件, 组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Dunnett  $t$  检验,  $P < 0.05$  时认为差别具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LPS对HRECs细胞活力的影响

不同 LPS 浓度对 HRECs 的作用有一定差异。在细胞培养中加入 250 ng/mL LPS, 实时细胞检测显示其明显抑制细胞的生长, 200 ng/mL LPS 对细胞生长有一定的抑制作用, 但与正常生长细胞对照比较, 未见明显统计学差异 ( $P > 0.05$ ), 50~150 ng/mL LPS 对细胞的生长未见明显影响 (见图 1), 故后续实验选择用 200 ng/mL LPS 诱导建立 HREC 炎症相关细胞模型。

### 2.2 EGCG对LPS诱导HRECs增殖活力的影响

将 HRECs 在含不同浓度的 EGCG (0~200  $\mu\text{mol/L}$ ) 的 DMEM 培养液中培养 2 h, 加入 LPS (200 ng/mL)

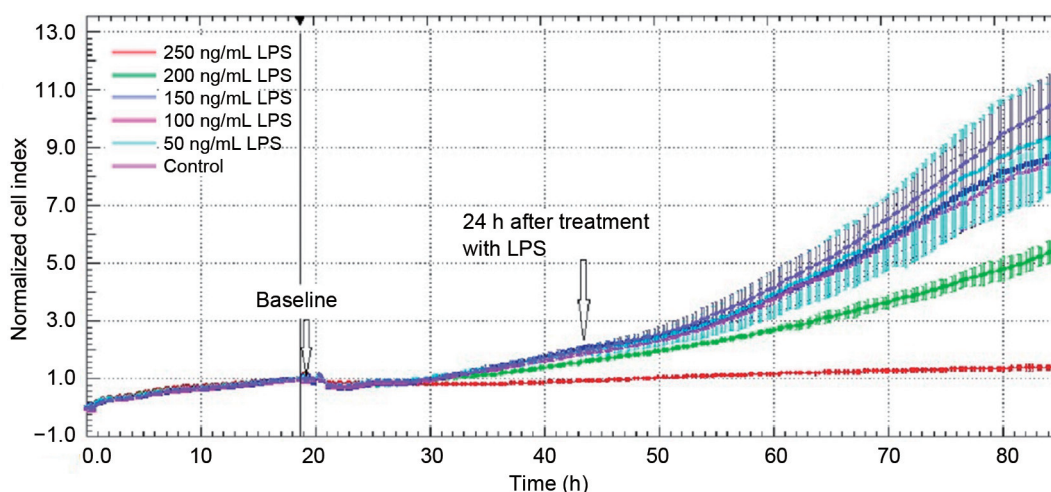


图 1. 人视网膜内皮细胞在不同浓度LPS作用下的生长曲线

Fig. 1. Effect of LPS on growth of human retinal endothelial cells (HRECs). HRECs were treated with indicated concentrations of LPS, and cell growth was determined by a real-time cell-electronic sensing (RT-CES) system. 250 ng/mL LPS significantly decreased cell proliferation, but 50~200 ng/mL LPS showed no significant influence on cell growth as compared to untreated control group.

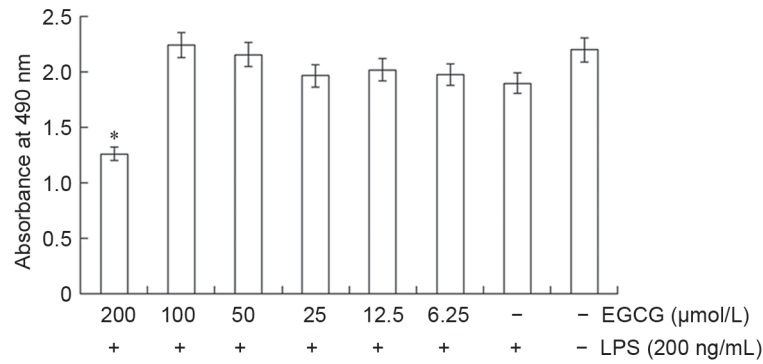


图 2. EGCG对LPS诱导HRECs增殖的影响

Fig. 2. Effect of EGCG on the proliferation of HRECs stimulated with 200 ng/mL LPS. 200 µmol/L EGCG significantly reduced proliferation activity in HRECs ( $*P < 0.01$ ), but EGCG at concentrations of 0–100 µmol/L did not show a significant reduction in proliferation of HRECs ( $P > 0.05$ ), as compared to untreated control group. Mean ± SD,  $n = 3$ .

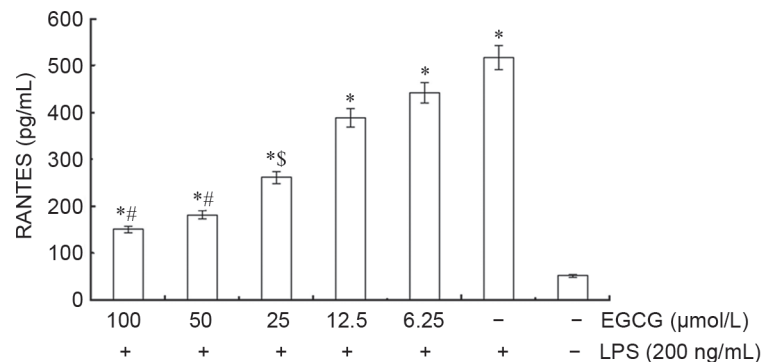


图 3. EGCG对LPS诱导HRECs中RANTES表达的抑制作用

Fig. 3. Inhibitory effect of EGCG on LPS-induced RANTES expression in HRECs. HRECs stimulated with 200 ng/mL LPS were pre-treated with indicated concentrations of EGCG. The production of RANTES secreted from treated cells was measured by ELISA.  $*P < 0.01$  vs EGCG-/LPS- group;  $#P < 0.01$ ,  $§P < 0.05$  vs EGCG-/LPS+ group. Mean ± SD,  $n = 3$ .

刺激 24 h 后进行 MTS 检测。结果显示，与正常对照组相比，0~100 µmol/L 的 EGCG 没有改变 HRECs 的增殖活力，对细胞无明显的毒性作用，而 200 µmol/L EGCG 显著影响 HRECs 的增殖活力 ( $P < 0.01$ )，因此本研究选择 0~100 µmol/L 的 EGCG 进行后续实验。比较单独 LPS 组和正常对照组的细胞增殖活力，结果与 2.1 结果一致，200 ng/mL LPS 对细胞增殖活力有一定的抑制作用，但差异未达到统计学显著性 ( $P > 0.05$ ) (见图 2)。

### 2.3 EGCG对LPS诱导HRECs中RANTES表达的抑制作用

使用 ELISA 法检测 HRECs 培养上清液中 RANTES 的表达水平。结果显示，LPS 刺激可显著诱导 HRECs 中 RANTES 的产生，而 EGCG 可呈剂量依赖性地抑制 LPS 诱导 HRECs 中 RANTES 的表达 (图 3)。

### 2.4 EGCG对HRECs中信号分子Akt表达及磷酸化的影响

Western blot 检测结果显示，与对照组相比，LPS 刺激明显增加 HRECs 中 Akt 蛋白分子的磷酸化活性，差异呈显著性 ( $P < 0.01$ )。EGCG 预处理能抑制 LPS 诱导的 Akt 蛋白分子的磷酸化活性 ( $P < 0.01$ )，其抑制作用呈剂量依赖性 (图 4)。

## 3 讨论

DR 是糖尿病常见的严重并发症，也是主要的致盲疾病之一，其发病机制尚不清楚，但炎症在 DR 的发生发展中起重要作用。现研究结果显示早期糖尿病视网膜膜中白细胞粘附增加，同时视网膜膜细胞内 ICAM-1 等炎症相关基因的表达上调，与 DR 微血管损伤在时间和空间上一致，抗 ICAM-1 抗体和 CD<sub>18</sub> 抗体等可抑制糖尿病引起的白细胞粘附和

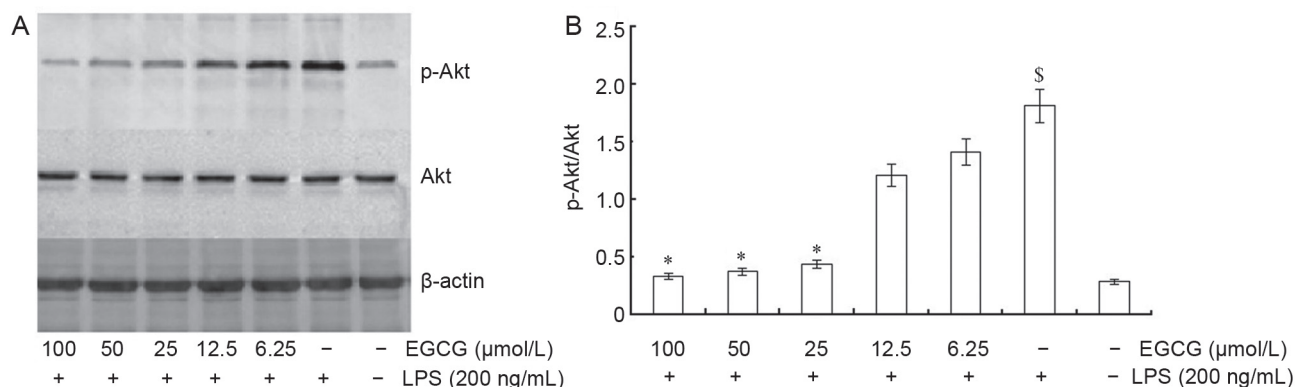


图 4. EGCG对LPS诱导HRECs中Akt蛋白磷酸化的抑制作用

Fig. 4. EGCG reverses LPS-induced Akt phosphorylation in HRECs. *A*: Effect of EGCG on LPS-induced early intracellular signaling events was evaluated by Western blot. Data were from one experiment representative of three independent experiments with similar results. *B*: Densitometric analysis of Western blots. Data were expressed as the relative ratio of p-Akt/Akt in each group with the correction of  $\beta$ -actin. <sup>§</sup> $P < 0.01$  vs EGCG<sup>-</sup>/LPS<sup>-</sup> group; \* $P < 0.01$  vs EGCG<sup>-</sup>/LPS<sup>+</sup> group. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

血管内皮损伤。DR患者玻璃体及房水中炎症细胞因子的代谢紊乱较为明显, VEGF和糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)可引起DR的炎症性改变, 视网膜内VEGF及AGEs可明显增加白细胞粘附和血-视网膜屏障的破坏, 也有研究证实非甾体类抗炎药物可延缓DR炎症的发生<sup>[14, 15]</sup>。

RANTES可由炎症细胞、视网膜内皮细胞、视网膜色素上皮细胞产生, 在视网膜局部引起炎症反应、血管损伤, 参与早期的视网膜病变<sup>[16]</sup>。现研究认为低浓度RANTES表现为典型的趋化性细胞因子, RANTES与G蛋白偶联受体结合, 引起短暂的钙离子流, 导致受体极化和细胞迁移, 增强T细胞表面ICAM-1、CD<sub>43</sub>、CD<sub>44</sub>、CD<sub>50</sub>等细胞黏附分子的表达; 而高浓度的RANTES则可激活酪氨酸蛋白激酶介导的通路, 引起延长的钙离子流, 导致过磷酸化作用和广泛的炎症细胞因子激活。另外RANTES可通过聚集提高局部浓度, 吸引细胞所经路径形成一定的浓度梯度, 从而增强其趋化作用, 这些性质也促使RANTES在DR的免疫功能调节、自身免疫紊乱和炎症过程中起重要作用<sup>[7, 17]</sup>。本研究结果显示, 与对照组相比, LPS能明显诱导视网膜内皮细胞RANTES的表达增加, 而在EGCG预处理各组中, EGCG能抑制LPS诱导的RANTES分泌, 并显示有明显的量效效应, 由此表明EGCG可能对眼部视网膜细胞的炎症反应有一定的保护作用。

目前体内外的实验研究显示, 作为机体维持反馈调控和自身平衡生理机制中重要组成部分的

RANTES, 其炎症相关信号转导的上下游调控通路复杂, 而由LPS诱导的炎症反应中Akt通路具有重要调控作用, 在调节糖代谢, 介导细胞生长与增殖, 促进蛋白质合成, 抑制细胞凋亡等方面起重要作用, 是参与相关反应的重点环节之一<sup>[18, 19]</sup>。本实验还显示, 在LPS诱导的HRECs中p-Akt表达明显增加, 证实LPS刺激视网膜内皮细胞后的信号通路调节中Akt发挥重要作用, 也证实视网膜内皮细胞的体外培养体系中LPS能促进Akt蛋白磷酸化水平的增加。本研究主要观察EGCG对LPS诱导HRECs表达炎症趋化因子RANTES的影响, 初步探讨EGCG对RANTES炎症因子表达密切相关的细胞信号分子Akt磷酸化活性的影响。根据上述初步研究, 我们推测EGCG抑制RANTES表达, 其机制可能与抑制Akt信号通路有关。今后尚需在这一初步研究结果基础上进行深入的机制研究, 包括用Akt、MAPKs、NF- $\kappa$ B等信号分子抑制剂分析EGCG的作用, EGCG对这些信号分子核转位影响, EGCG对RANTES启动子活性的影响等方面的研究, 以深入诠释EGCG对LPS诱导HRECs表达RANTES的抑制作用及其机制。

## 参考文献

- Zhang HY, Wang JY, Ying GS, Shen LP, Zhang Z. Serum lipids and other risk factors for diabetic retinopathy in Chinese type 2 diabetic patients. *J Zhejiang Univ Sci B* 2013; 14(5): 392-399.
- Trento M, Tomellini M, Lattanzio R, Brancato R, Coggiola A, Benecchi R, Scoccianti L, Insacco C, Bandello F, Montanaro

- M, Cavallo F, Porta M. Perception of, and anxiety levels induced by, laser treatment in patients with sight-threatening diabetic retinopathy. A multicentre study. *Diabet Med* 2006; 23(10): 1106–1109.
- 3 Ai H, Song HP. Different expression pattern of serum soluble intercellular adhesion molecules-1 and neutrophilic expression of CD18 in patients with diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol* 2012; 5(2): 202–207.
  - 4 Wilkinson-Berka JL. Vasoactive factors and diabetic retinopathy: vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2 and nitric oxide. *Curr Pharm Des* 2004; 10(27): 3331–3348.
  - 5 Oh IK, Kim SW, Oh J, Lee TS, Huh K. Inflammatory and angiogenic factors in the aqueous humor and the relationship to diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 2010; 35(12): 1116–1127.
  - 6 Kern TS. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2007; 2007: 95103.
  - 7 Meleth AD, Agron E, Chan CC, Reed GF, Arora K, Byrnes G, Csaky KG, Ferris FL 3rd, Chew EY. Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(11): 4295–4301.
  - 8 Chen X, Zhao Y, Zhou Z, Zhang X, Li Q, Bai L, Zhang M. Prevalence and risk factors of diabetic retinopathy in Chongqing pre-diabetes patients. *Eye (Lond)* 2012; 26(6): 816–820.
  - 9 Joo KW, Hwang YH, Kim JH, Oh KH, Kim H, Shin HD, Chung WK, Yang J, Park KS, Ahn C. MCP-1 and RANTES polymorphisms in Korean diabetic end-stage renal disease. *J Korean Med Sci* 2007; 22(4): 611–615.
  - 10 Schildberg FA, Schulz S, Dombrowski F, Minor T. Cyclic AMP alleviates endoplasmic stress and programmed cell death induced by lipopolysaccharides in human endothelial cells. *Cell Tissue Res* 2005; 320(1): 91–98.
  - 11 Tamura H, Kiryu J, Miyamoto K, Nishijima K, Katsuta H, Miyahara S, Hirose F, Honda Y, Yoshimura N. *In vivo* evaluation of ocular inflammatory responses in experimental diabetes. *Br J Ophthalmol* 2005; 89(8): 1052–1057.
  - 12 Pae M, Wu D. Immunomodulating effects of epigallocatechin-3-gallate from green tea: mechanisms and applications. *Food Funct* 2013; 4(9): 1287–1303.
  - 13 Sanchez-Huerta V, Gutierrez-Sanchez L, Flores-Estrada J. (-)-Epigallocatechin 3-gallate (EGCG) at the ocular surface inhibits corneal neovascularization. *Med Hypotheses* 2011; 76(3): 311–313.
  - 14 Cheung CM, Vania M, Ang M, Chee SP, Li J. Comparison of aqueous humor cytokine and chemokine levels in diabetic patients with and without retinopathy. *Mol Vis* 2012; 18: 830–837.
  - 15 Gologorsky D, Thanos A, Vavvas D. Therapeutic interventions against inflammatory and angiogenic mediators in proliferative diabetic retinopathy. *Mediators Inflamm* 2012; 2012: 629452.
  - 16 Hellgren G, Willett K, Engstrom E, Thorsen P, Hougaard DM, Jacobsson B, Hellstrom A, Lofqvist C. Proliferative retinopathy is associated with impaired increase in BDNF and RANTES expression levels after preterm birth. *Neonatology* 2010; 98(4): 409–418.
  - 17 Johnsen-Soriano S, Sancho-Tello M, Arnal E, Navea A, Cervera E, Bosch-Morell F, Miranda M, Javier Romero F. IL-2 and IFN-gamma in the retina of diabetic rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010; 248(7): 985–990.
  - 18 Yamagata M, Rook SL, Sassa Y, Ma RC, Gerald P, Goddard L, Clermont A, Gao B, Salti H, Gundel R, White M, Feener EP, Aiello LP, King GL. Bactericidal/permeability-increasing protein's signaling pathways and its retinal trophic and anti-angiogenic effects. *FASEB J* 2006; 20(12): 2058–2067.
  - 19 Tong XM, Wang JC, Shen Y, Xie JJ, Zhang JY, Jin J. Inhibition of inflammatory mediators and related signaling pathways by macrophage-stimulating protein in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Inflamm Res* 2011; 60(9): 823–829.