doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.03.007

# MEF2C 在湿性年龄相关性黄斑变性中的表达及其对脉络膜新生血管 和巨噬细胞极化的影响\*

刘 旭 万鹏飞 杨维佳 贾 俊 何 媛 赵靖康<sup>4</sup> (西安医学院第二附属医院眼科 陕西西安 710038)

关键词:年龄相关性黄斑变性;脉络膜新生血管;肌细胞增强因子 2C;血管生成;巨噬细胞极化 中图分类号:R-33;R774.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2023)03-433-06

## Expression of MEF2C in Wet Age-related Macular Degeneration and its Effect on Choroidal Neovascularization and Macrophage Polarization\*

LIU Xu, WAN Peng-fei, YANG Wei-jia, JIA Jun, HE Yuan, ZHAO Jing-kang

(Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

**ABSTRACT Objective:** To reveal the expression of myocyte enhancer factor 2C (MEF2C) in wet age-related macular degeneration (AMD) and its effect on choroidal neovascularization (CNV) and macrophage polarization. **Methods:** The serum MEF2C levels of 30 wet AMD patients (AMD group) and 30 healthy subjects (Healthy group) were detected by qRT-PCR. The MEF2C overexpressing lentivirus (MEF2C-LV group) and negative control overexpressing lentivirus (NC-LV group) were transfected into rhesus monkey choroidal endothelial cell line (RF/6A). After transfection, RF/6A cells were divided into normoxia group (Normoxia), hypoxia group (Hypoxia), hypoxia+NC-LV group (Hypoxia+NC-LV), and hypoxia+MEF2C-LV group (Hypoxia+ MEF2C-LV). After transfection and hypoxia treatment, Matrigel tubule formation assay was performed on cells in each group. By laser-induced CNV C57BL/6J mouse model, the successfully modeled C57BL/6J mice were randomly divided into model group (Model), NC-LV group and MEF2C-LV group, 10 mice in each group. Unmodeled mice served as the Control group. Then, NC-LV or MEF2C-LV were injected into the vitreous cavity of mice in NC-LV group and MEF2C-LV group, and mice in Control group and Model group were not treated. Fundus fluorescein angiography (FFA) and ocular hematoxylin and eosin (HE) staining were performed 7 days after treatment. The mRNA and protein expressions of MEF2C, VEGFA, VEGFR2, IL-12p35, IL-12p40 and IL-10 were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results:** Compared with Healthy group, the serum MEF2C levels in AMD group were significantly lower ( $1.00\pm 0.23$  vs  $0.48\pm 0.29$ , t=7.689, *P*<0.001). Compared with Normoxia group, the number of closed tubes was increased in Hypoxia group (*P*<0.05). Compared with Model group, the degree of retinal and number of closed tubes in Hypoxia+MEF2C-LV group was decreased (*P*<0.05). Compared with Model group, the degree of retinal and

<sup>\*</sup>基金项目:陕西省教育厅专项科学研究计划项目(No.19JK0758);西安医学院第二附属医院一般项目(23KY0108)

作者简介:刘旭(1991-),女,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:眼底病,E-mail: XuLiu91eye@163.com

<sup>△</sup> 通讯作者:赵靖康(1991-),男,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:眼底病,E-mail: 269649554@qq.com

<sup>(</sup>收稿日期:2022-06-28 接受日期:2022-07-23)

choroidal lesions in MEF2C-LV group was alleviated, the structure basically returned to normal, the thickness of the choroidal tissue was reduced, and angiogenesis was reduced. Compared with Model group, the relative fluorescence intensity of CNV in MEF2C-LV group was decreased, and the mRNA and protein expression levels of MEF2C, VEGFA and VEGFR2 in the choroidal tissue were decreased (P<0.05). Compared with Model group, the mRNA and protein expression levels of IL-12p35 and IL-12p40 in the choroidal tissue of MEF2C-LV group were increased, and IL-10 was decreased (P<0.05). Conclusion: This study shows that MEF2C is lowly expressed in the serum of wet AMD patients, and up-regulation of MEF2C can inhibit choroidal angiogenesis and promote the transition of macrophages from M2 to M1 type.

Key words: Age-related macular degeneration; Choroidal neovascularization; Myocyte enhancer factor 2C; Angiogenesis; Macrophage polarization

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R774.5 Document code: A Article ID: 1673-6273(2023)03-433-06

## 前言

年龄相关性黄斑变性(Age-related macular degeneration, AMD)是老年人失明的主要原因<sup>[1,2]</sup>。临床上将 AMD 分为两种 类型,即干性 AMD 和湿性 AMD。脉络膜新生血管(Choroidal neovascularization, CNV)是湿性 AMD 的主要特征,也是引起 大多数 AMD 患者视力障碍的主要原因<sup>[3]</sup>。CNV 会导致视网膜 下出血、视网膜水肿、视网膜色素上皮(Retinal pigment epithelium, RPE)脱离、光感受器退化、血管硬化,最终导致永久性视力损 伤<sup>[4]</sup>。因此,抑制 CNV 是治疗 AMD 的重要途径。研究表明,血 管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)促 进了 CNV 的形成<sup>[5]</sup>。因此,玻璃体内注射 VEGF 抑制剂是目前 湿性 AMD 的标准治疗方式<sup>[6]</sup>。然而,一些 AMD 患者对抗 VEGF 治疗有抵抗<sup>[7]</sup>。因此,仍需要开发新型 AMD 治疗靶点。

炎症在 CNV 的发生发展中起着至关重要的作用<sup>18</sup>。大量实验表明巨噬细胞是 CNV 的主要炎症细胞,巨噬细胞极化与CNV 的发病密切相关<sup>[9]</sup>。巨噬细胞可分为两种表型,即经典激活型(M1)和选择性激活型(M2),前者抗血管生成,后者促血管生成<sup>10]</sup>。AMD 病变过程中,M2 巨噬细胞占主导地位,在CNV 的发展中发挥重要作用<sup>19]</sup>。IL-12 是 M1 型巨噬细胞标记物,IL-10 是 M2 型巨噬细胞标记物<sup>[11]</sup>,IL-12/IL-10 的相对表达量可作为巨噬细胞表型极化的标志<sup>[12]</sup>。

肌细胞增强因子 2C(Myocyte enhancer factor-2C,MEF2C) 是一种重要的转录因子,参与调节血管发育,属于一种新生血 管的抑制因子<sup>[13,14]</sup>。研究表明,MEF2C 通过调控 IL-12/IL-10 的 表达从而调控巨噬细胞的极化,MEF2C 的上调可促进巨噬细 胞向 M1 型转换<sup>[15]</sup>。并且,MEF2C 在 CNV 小鼠视网膜中表达 下调<sup>[16]</sup>。基于上述研究背景,本研究推测 MEF2C 可能参与湿性 AMD 及 CNV 的发生发展,因此,本研究旨在考察 MEF2C 在 湿性 AMD 患者血清中的表达及其对脉络膜血管生成和巨噬 细胞极化的影响。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 **实验试剂** 胎牛血清和 RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司; Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司; Matrigel 购自美国 BD Biosciences 公司;托吡卡胺购自山东博 士伦福瑞达制药有限公司;苯巴比妥钠购自南京罗迈美生物科 技有限公司; 左氧氟沙星滴眼液购自江苏汉晨药业有限公司; 荧光素钠购自美国 Alcon Laboratories 公司; 苏木精伊红(HE) 染色试剂盒、TRIzol、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒 和 BeyoECL Plus 购自碧云天生物技术研究所)、PrimeScripµII 逆转录酶试剂盒购自日本 Takara 公司;SYBR Green Master Mix 购自瑞士 Roche 公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; 所有抗体均购自英国 Abcam 公司。

1.1.2 **实验细胞与动物** 恒河猴脉络膜血管内皮细胞系 (RF/6A)购自美国 ATCC。SPF 级 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 (18~23 g)购自西安交通大学实验动物中心[许可证号:SCXK (陕)2020-001],所有小鼠均在 SPF 级动物饲养室内饲养,不限 制饮食。

1.2 方法

1.2.1 湿性 AMD 患者及健康体检者血清样本收集 2020 年 1月至 2021 年 1月,选取 30 例本院确诊的湿性 AMD 患者作 为 AMD 组,排除其他原因引起的 CNV 及其他视网膜炎症性 疾病的患者、接受过治疗的患者、伴有其他严重疾病的患者。另 外,选取同期健康体检者作为健康对照组,收集两组受试者的 清晨空腹静脉血样本,通过 qRT-PCR 法检测患者血清中 MEF2C 水平。

1.2.2 细胞培养 恒河猴脉络膜血管内皮细胞系(RF/6A)购自 美国 ATCC,在含有 10%胎牛血清、1% L- 谷氨酰胺和 1%青霉 素/链霉素的 RPMI 1640 培养基中于 37℃和 5% CO<sub>2</sub> 环境下 培养。然后用含有 200 mmol/L 氯化钴的 RPMI 1640 培养基培 养 RF/6A 细胞来模拟低氧条件,以未加氯化钴的 RPMI 1640 培养基培养的 RF/6A 细胞作为对照。

**1.2.3 细胞转染及分组处理** MEF2C 过表达慢病毒 (MEF2C-LV组)、阴性对照过表达慢病毒(NC-LV组)均由吉 玛基因合成。将 RF/6A 细胞接种于 6 孔板并培养至 80%融合, 然后使用 Lipofectamine2000 对 RF/6A 细胞进行转染。未转染 的 RF/6A 细胞作为对照组。通过 qRT-PCR 和 Western blot 检 测转染效率。每组 6 个重复。

1.2.4 小管形成测定 将 RF/6A 细胞分为常氧组(Normoxia 组)、低氧组(Hypoxia 组)、低氧 +NC-LV 组(Hypoxia+NC-LV 组)、低氧 +MEF2C-LV 组(Hypoxia+MEF2C-LV 组)。细胞转染后,将 Matrigel 添加到 96 孔板中(每孔 80 μL),并在 37℃下孵育 30 min。Matrigel 凝固后,将每组的 RF/6A 细胞(5× 10<sup>4</sup> 个细胞/孔) 连同 30 μL 相应的培养基接种在 96 孔板上并孵育 6 h。

然后使用 Olympus 倒置相差显微镜观察小管形成并拍摄图像。 通过 Image-Pro Plus 6.0 软件对每个孔中的小管形成数量进行 计算。每组 6 个重复。

1.2.5 激光诱导构建 CNV 小鼠模型 应用托吡卡胺对 C57BL/6J 小鼠进行扩瞳,然后腹腔注射 1%苯巴比妥钠(0.1 mL/10 g)麻醉小鼠。在每只眼睛的视神经乳头周围用氩激光制 作四个激光点(50 μm,50 ms,200 mW)。激光光凝后产生白色气泡 证实 Brunch 膜破裂,表明成功建立了激光诱导的 CNV 模型。

1.2.6 动物分组及处理 将建模成功的 C57BL/6J 小鼠随机 分为模型组、NC-LV 组和 MEF2C-LV 组,每组 10 只,未建模的 小鼠作为对照组。使用 33G 微量注射器向 NC-LV 组和 MEF2C-LV 组小鼠玻璃体腔分别注射 1 μL 滴度为 1× 10<sup>11</sup> TU/mL 的 NC-LV 或 MEF2C-LV,注射后给予左氧氟沙星滴眼 液抗感染。对照组和模型组小鼠不进行治疗处理。

1.2.7 眼底荧光血管造影(FFA) 治疗 7 d 后,通过 FFA 分析 脉络膜血管渗漏的严重程度。用 0.25 mL 2%荧光素钠对小鼠 进行腹膜内注射。在注射 4 min 后拍摄 FFA 图像。使用 ImageJ 软件计算 CNV 的平均荧光强度。

1.2.8 组织病理学检查 治疗7d后,将小鼠眼球在4%多聚
甲醛中固定3h,制成石蜡切片,然后进行苏木精伊红(HE)染
色,染色步骤按照说明书进行,在光学显微镜下拍摄 HE 染色
图像。

1.2.9 qRT-PCR 检测相关基因表达水平 用 TRIzol 试剂从血 清或脉络膜组织中提取总 RNA。使用 PrimeScripµII 逆转录酶 试剂盒将1g RNA 逆转录为 cDNA。随后, 使用 SYBR Green Master Mix 在 ABI 7900HT 荧光定量 PCR 仪上进行 qRT-PCR 扩增。β-actin 为内参基因。通过 2<sup>-Δα</sup>法计算基因相对表达量。 引物序列如下: MEF2C: 正向 5'-AGAAGGCTTATGAGCT-GAGCG-3'和反向 5'-ACTCGGTGTACTTGAGCAACAC-3';血 管内皮生长因子 A(VEGFA): 正向 5'-TGCGGATCAAACCT-CACCAA-3' 和反向 5'-TGTCACATACGCTCCAGGACTT-3'; VEGF 受体 2 (VEGFR2): 正向 5'-GTGTCAGAATCCCTGC-GAAGTA-3'和反向 5'-GAAATGGGATTGGTAAGGATGA-3'; 白细胞介素(IL-12 p35):正向 5'-CTGTGCCTTGGTAGCATC-TA-3'和反向 5'-TTTCACTCTGTAAGGGTCTG-3';IL-12 p40: 正向 5'-AGGTGCGTTCCTCGTAGAGA-3' 和反向 5'-AAAGC-CAACCAAGCAGAAGA-3';IL-10:正向 5'-GCTGCGGACTGC-CTTCA-3' 和反向 5'-TGCATTAAGGAGTCGGTTAGCA-3'; β-actin: 正向 5'-AGTGTGACGTTGACATCCGT-3' 和反向 5'-GCAGCTCAGTAACAGTCCGC-3'。

1.2.10 Western blot 检测相关蛋白表达水平 使用 RIPA 裂解 液从脉络膜组织中提取蛋白,然后使用 BCA 蛋白浓度检测试 剂盒对蛋白进行定量。随后,通过 10%的 SDS-PAGE 凝胶分离 20 μg 蛋白质提取物并转移到 PVDF 膜上。将膜在室温下用 5%脱脂牛奶封闭 30 min。然后在 4℃下与均为 1:2000 比例稀释的 MEF2C、VEGFA、VEGFR2、IL-12 p35、IL-12 p40、IL-10 和 β-actin 一抗孵育过夜。第二天将膜与 1:2000 比例稀释的 HRP 标记的 IgG 二抗在室温下孵育 2 h。使用 BeyoECL Plus 显影。 β-actin 为内参蛋白。

#### 1.3 统计分析

所有数据均表示为平均值±标准差。通过独立样本t检验 或单向方差分析及LSD检验评估组间差异性。P<0.05表示差 异具有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 湿性 AMD 患者及健康体检者的血清 MEF2C 水平

qRT-PCR 检测结果显示,与健康对照组相比,AMD 组患者的血清中 MEF2C 水平显著降低(1.00±0.23 vs 0.48±0.29, t=7.689, P<0.001)。见图 1。



图 1 qRT-PCR 法检测湿性 AMD 患者及健康体检者的血清 MEF2C 水 平

Fig. 1 Detection of serum MEF2C levels in wet AMD patients and healthy individuals by qRT-PCR

Note: Compared with Healthy group, \*\*\*P<0.001.

#### 2.2 上调 MEF2C 对缺氧诱导的 RF/6A 细胞小管形成的影响

转染 NC-LV 和 MEF2C-LV 慢病毒后,与对照组相比, MEF2C-LV 组细胞中 MEF2C 的 mRNA 和蛋白表达水平均显 著降低 (P<0.05)。小管形成测定结果显示,转染 NC-LV 和 MEF2C-LV 慢病毒以及缺氧处理后,与 Normoxia 组相比,Hypoxia 组 RF/6A 细胞的闭合管腔数量增加(P<0.05);与 Hypoxia 组相 比,Hypoxia+MEF2C-LV 组 RF/6A 细胞的闭合管腔数量减少 (P<0.05)。见图 2。

2.3 上调 MEF2C 对 CNV 小鼠脉络膜血管生成的影响

各组小鼠的眼球组织 HE 染色显示,对照组小鼠视网膜组 织和脉络膜组织形态正常。模型组和 NC-LV 组小鼠视网膜组 织结构紊乱,脉络膜组织增生,血管生成增加。MEF2C-LV 组小 鼠视网膜和脉络膜病变程度减轻,结构基本恢复正常,脉络膜 组织厚度降低,血管生成减少。FFA 检查结果显示,与对照组相 比,模型组小鼠的 CNV 相对荧光强度升高(P<0.05);与模型组 相比,MEF2C-LV 组小鼠的 CNV 相对荧光强度降低(P<0.05)。 见图 3。

与对照组相比,模型组小鼠脉络膜组织中 MEF2C、VEG-FA 和 VEGFR2 的 mRNA 和蛋白表达水平均升高(P<0.05);与

图 4。

模型组相比, MEF2C-LV 组小鼠脉络膜组织中 MEF2C、VEG-FA 和 VEGFR2 的 mRNA 和蛋白表达水平均降低(P<0.05)。见



图 2 上调 MEF2C 对缺氧诱导的 RF/6A 细胞小管形成的影响

Fig. 2 The effect of up-regulation of MEF2C on hypoxia-induced tubule formation in RF/6A cells

Note: A and B: Transfection of MEF2C overexpressing lentivirus up-regulated the mRNA and protein levels of MEF2C in RF/6A cells (mRNA: F=1740. 279, *P*<0.001; Protein: F=489.035, *P*<0.001). Compared with the control group, \**P*<0.05; C: Image of tubule formation of RF/6A cells in each group, magnification: × 200; D: The number of closed tubes of RF/6A cells in each group (F=123.028, *P*<0.001). Compared with Normoxia group, \**P*<0.05; compared with Hypoxia group, \**P*<0.05.

### 2.4 上调 MEF2C 对 CNV 小鼠脉络膜组织巨噬细胞极化的影响

与对照组相比,模型组小鼠脉络膜组织中 IL-12 p35 和 IL-12 p40 的 mRNA 和蛋白表达水平均降低,IL-10 均升高 (P<0.05)。与模型组相比,MEF2C-LV 组小鼠脉络膜组织中 IL-12 p35 和 IL-12 p40 的 mRNA 和蛋白表达水平均升高, IL-10 均降低(P<0.05)。见图 5。

## 3 讨论

MEF2C 是 MADS-Box 转录因子家族中的一员,具有调节 神经系统发育、心脏发育、肌细胞发育、骨骼发育、血管生成等 多种功能<sup>[17,18]</sup>。MEF2C 属于一种参与调节血管生成的重要转录 因子,具有抑制血管生成的作用<sup>[13]</sup>。并且,MEF2C 在 CNV 小鼠 视网膜中表达下调<sup>[16]</sup>。前沿研究结果提示 MEF2C 可能参与湿 性 AMD 及 CNV 的发生发展。本研究检测了 30 例湿性 AMD 患者及 30 例健康体检者的血清 MEF2C 水平,表明湿性 AMD 患者的血清 MEF2C 水平明显降低,提示 MEF2C 可能参与了 湿性 AMD 及 CNV 的发生发展,其有望成为湿性 AMD 的治 疗靶标。

据报道,外层视网膜缺氧引起视网膜色素上皮细胞过量分 泌VEGF 是湿性 AMD 发生的主要原因<sup>[19]</sup>。VEGF 异常增多促 进了 CNV,并引起巨噬细胞表型转换,从而破坏 Bruch 膜<sup>[20]</sup>。因 此,缺氧是 CNV 产生的重要致病因素<sup>[21,22]</sup>。为了进一步揭示



## 图 3 上调 MEF2C 对 CNV 小鼠脉络膜血管生成的影响

Fig. 3 The effect of up-regulation of MEF2C on choroidal angiogenesis in CNV mice

Note: A: HE staining image (× 200); B: FFA image (× 100); C: CNV relative fluorescence intensity in FFA image (F=147.192, P<0.001). Compared with the Control group, \*P<0.05; Compared with the Model group, \*P<0.05.

MEF2C对 CNV 的影响,本研究通过转染 MEF2C-LV 慢病毒 上调了 RF/6A 细胞中的 MEF2C,然后考察了上调 MEF2C 对 缺氧诱导的 RF/6A 细胞小管形成的影响。结果表明,缺氧升高 了 RF/6A 细胞的小管形成能力,然而,上调 MEF2C 则抑制了 小管形成。这些结果证实了 MEF2C 的血管生成抑制作用。

为了探讨 MEF2C 作为湿性 AMD 的治疗靶点的潜力,本 研究建立了激光诱导的 CNV 小鼠模型,并对 CNV 小鼠玻璃 体腔注射 MEF2C-LV,HE 染色和 FFA 检查结果均表明,上调 MEF2C 抑制了 CNV 小鼠脉络膜血管生成。据报道,血管生成 因子 VEGFA 与 VEGFR2 结合后促进血管生成<sup>[23:25]</sup>。MEF2C 是 VEGFA 的下游转录因子,并且 MEF2C 也可反过来影响 VEG-FA 的表达 <sup>[26:28]</sup>。本研究进一步检测了 CNV 小鼠脉络膜中 VEGFA 和 VEGFR2 的表达,结果表明上调 MEF2C 抑制了 VEGFA 和 VEGFR2 的表达。这些结果充分说明上调 MEF2C 可有效抑制 CNV 小鼠的脉络膜血管生成,MEF2C 可能是湿性 AMD 的潜在治疗靶点。

作为 CNV 病变的主要炎性细胞类型,巨噬细胞的 M1 型和 M2 型表型转换参与了 CNV 的发生<sup>(9)</sup>。M1 型巨噬细胞具有

抗血管生成和抗肿瘤作用,M2型巨噬细胞具有促血管生成和 促肿瘤作用<sup>[29]</sup>。IL-12是M1型巨噬细胞标记物,IL-10是M2型 巨噬细胞标记物<sup>[12]</sup>。最近研究表明,MEF2C在炎症和淋巴细胞 发育中也具有重要作用<sup>[30]</sup>。MEF2C通过直接结合到IL-12和 IL-10的启动子上调控其基因的转录,进而调控巨噬细胞的极 化,上调MEF2C可促进巨噬细胞向M1型转换<sup>[15]</sup>。本研究也发 现上调MEF2C升高了了脉络膜组织中IL-12p35和IL-12p40 的mRNA和蛋白表达水平,但降低了IL-10的mRNA和蛋白 表达水平。这些结果说明上调MEF2C促进了CNV小鼠脉络 膜组织中巨噬细胞从M2型向M1型的转换。

综上所述,本研究表明 MEF2C 在湿性 AMD 患者血清中 低表达,上调 MEF2C 可抑制脉络膜血管生成,并促进巨噬细胞 从 M2 型向 M1 型的转换。因此,MEF2C 可能是湿性 AMD 治 疗的潜在分子靶标。

#### 参考文献(References)

- Mitchell P, Liew G, Gopinath B, et al. Age-related macular degeneration[J]. Lancet, 2018, 392(10153): 1147-1159
- [2] Stahl A. The diagnosis and treatment of age-related macular degeneration[J]. Dtsch Arztebl Int, 2020, 117(29-30): 513-520



Fig. 4 The effect of up-regulation of MEF2C on the expression of MEF2C, VEGFA and VEGFR2 in choroidal tissue of CNV mice
Note: A: mRNA relative expression of MEF2C, VEGFA and VEGFR2 (MEF2C: F=363.184, *p*<0.001; VEGFA: F=389.248, *p*<0.001; VEGFR2: F=339.</li>
886, *p*<0.001); B: Protein relative expression of MEF2C, VEGFA and VEGFR2 (MEF2C: F=446.714, *p*<0.001; VEGFA: F=351.321, *p*<0.001; VEGFR2: F=322.083, *p*<0.001); C: Image of Western blot; Compared with Control group, \**p*<0.05; Compared with Model group, \**p*<0.05.</li>



图 5 上调 MEF2C 对 CNV 小鼠脉络膜组织中 IL-12 p35、IL-12 p40 和 IL-10 表达的影响

Fig. 5 The effect of up-regulation of MEF2C on the expression of IL-12p35, IL-12p40 and IL-10 in choroidal tissue of CNV mice Note: A: mRNA relative expression levels of IL-12 p35, IL-12 p40 and IL-10 (IL-12 p35: F=480.070, *P*<0.001; IL-12 p40: F=501.806, *P*<0.001; IL-10: F=341.350, *P*<0.001); B: Protein relative expression levels of IL-12 p35, IL-12 p40 and IL-10 (IL-12 p35: F=398.925, *P*<0.001; IL-12 p40: F=392.966, *P*<0.001; IL-10: F=315.063, *P*<0.001); C: Images of Western blot; Compared with Control group, \**P*<0.05; Compared with Model group, \**P*<0.05.

[3] Ambati J, Fowler BJ. Mechanisms of age-related macular degeneration[J]. Neuron, 2012, 75(1): 26-39

[4] Jensen EG, Jakobsen TS, Thiel S, et al. Associations between the complement system and choroidal neovascularization in wet

age-related macular degeneration [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (24): 9752

- [5] Ng DSC, Lai TYY, Cheung CMG, et al. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for myopic choroidal neovascularization [J]. Asia Pac J Ophthalmol (Phila), 2017, 6(6): 554-560
- [6] Russell JF, Albini TA, Berrocal AM, et al. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for choroidal rupture-associated choroidal neovascularization[J]. Ophthalmol Retina, 2020, 4(2): 226-228
- [7] Yang S, Zhao J, Sun X. Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: a comprehensive review[J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10: 1857-1867
- [8] 郑志坤,张丽珠,黎铧,等.多灶性脉络膜炎中炎症病灶与脉络膜新 生血管病灶的多模式影像特征观察[J].中华眼底病杂志,2022,38 (5):382-388
- [9] Yang Y, Liu F, Tang M, et al. Macrophage polarization in experimental and clinical choroidal neovascularization [J]. Sci Rep, 2016, 6: 30933
- [10] Xu Y, Cui K, Li J, et al. Melatonin attenuates choroidal neovascularization by regulating macrophage/microglia polarization via inhibition of RhoA/ROCK signaling pathway [J]. J Pineal Res, 2020, 69(1): e12660
- [11] Varadhachary AS, Monestier M, Salgame P. Reciprocal induction of IL-10 and IL-12 from macrophages by low-density lipoprotein and its oxidized forms[J]. Cellular Immunology, 2001, 213(1): 45-51
- [12] Mukherjee S, Mukherjee B, Mukhopadhyay R, et al. Imipramine exploits histone deacetylase 11 to increase the IL-12/IL-10 ratio in macrophages infected with antimony-resistant Leishmania donovani and clears organ parasites in experimental infection [J]. J Immunol, 2014, 193(8): 4083-4094
- [13] Lin Q, Lu J, Yanagisawa H, et al. Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development [J]. Development, 1998, 125(22): 4565-4574
- [14] Blixt N, Norton A, Zhang A, et al. Loss of myocyte enhancer factor 2 expression in osteoclasts leads to opposing skeletal phenotypes [J]. Bone, 2020, 138: 115466
- [15] 赵西宝. MEF2C 调控巨噬细胞 M1 极化及 Th1 细胞反应的研究
   [D]. 杭州: 浙江大学, 2018
- [16] 刘培源. 两种视网膜下新生血管小鼠模型基因表达谱的 RNA-Seq 研究[D]. 汕头大学, 2016
- [17] Dong C, Yang XZ, Zhang CY, et al. Myocyte enhancer factor 2C and its directly-interacting proteins: A review[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2017, 126: 22-30

- [18] Kamath SP, Chen AI. Myocyte Enhancer Factor 2c regulates dendritic complexity and connectivity of cerebellar purkinje cells[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(6): 4102-4119
- [19] Schlingemann RO. Role of growth factors and the wound healing response in age-related macular degeneration [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2004, 242(1): 91-101
- [20] Penfold PL, Madigan MC, Gillies MC, et al. Immunological and aetiological aspects of macular degeneration [J]. Prog Retin Eye Res, 2001, 20(3): 385-414
- [21] 孙嘉星, 窦国睿, 常天芳, 等. 缺氧条件下 SNAII 激活基质金属蛋白酶对脉络膜新生血管生成的促进作用 [J]. 中华实验眼科杂志, 2018, 36(1): 16-22
- [22] 陶方方, 亢泽峰, 陈水龄, 等. 加减驻景方对脉络膜新生血管动物 模型缺氧信号因子表达的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2021, 31(5): 309-315
- [23] Prasad CB, Singh D, Pandey LK, et al. VEGFa/VEGFR2 autocrine and paracrine signaling promotes cervical carcinogenesis via β-catenin and snail[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2022, 142: 106122
- [24] Toselli CM, Wilkinson BM, Paterson J, et al. Vegfa/vegfr2 signaling is necessary for zebrafish islet vessel development, but is dispensable for beta-cell and alpha-cell formation[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 3594
- [25] Zhang Q, Lu S, Li T, et al. ACE2 inhibits breast cancer angiogenesis via suppressing the VEGFa/VEGFR2/ERK pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1): 173
- [26] Bai XL, Zhang Q, Ye LY, et al. Myocyte enhancer factor 2C regulation of hepatocellular carcinoma via vascular endothelial growth factor and Wnt/β-catenin signaling [J]. Oncogene, 2015, 34 (31): 4089-4097
- [27] Maiti D, Xu Z, Duh EJ. Vascular endothelial growth factor induces MEF2C and MEF2-dependent activity in endothelial cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(8): 3640-3648
- [28] Sturtzel C, Testori J, Schweighofer B, et al. The transcription factor MEF2C negatively controls angiogenic sprouting of endothelial cells depending on oxygen[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101521
- [29] Sica A, Schioppa T, Mantovani A, et al. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy [J]. Eur J Cancer, 2006, 42(6): 717-727
- [30] Harrington AJ, Raissi A, Rajkovich K, et al. MEF2C regulates cortical inhibitory and excitatory synapses and behaviors relevant to neurodevelopmental disorders[J]. Elife, 2016, 5: e20059