

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.051

内皮抑素对眼部新生血管抑制的研究进展

李彩云¹ 张奕霞^{2△} 陈宁宁¹ 李燕利¹ 张 晖¹

(1 石河子大学医学院 新疆 石河子 832000; 2 石河子大学医学院第一附属医院眼科 新疆 石河子 832000)

摘要:眼部新生血管存在于多种常见的眼病的发展过程中,对视功能危害大,是致盲的主要原因之一。包括糖尿病视网膜病变,视网膜栓塞,早产儿视网膜病变,老年性黄斑变性等眼病。由于其发病机制尚未完全清楚,因此目前仍无确切有效的药物治疗方法。内皮抑素(Endostatin, ES)是1997年首先从小鼠血管内皮瘤 EOMA 细胞培养上清中发现的,是胶原 XVIII 的蛋白降解产物,分子量约为 20KD,为胶原 XVIII C 端非胶原区(NC1)内的 184 个氨基酸片段。ES 是目前发现的最强的血管生成抑制因子,可抑制 VEGF, bFGF, EGF 等刺激的血管内皮细胞的增殖和迁移,诱导其凋亡,进而抑制新生血管的形成。通过抑制眼部新生血管的实验研究表明,ES 是当前抗新生血管疗法中最有潜力的一种新药。本文就内皮抑素的结构特点及其对眼部新生血管的治疗研究进展作一综述。

关键词:内皮抑素;眼部新生血管;治疗

中图分类号:R774 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)04-798-03

Recent Advances of Endostatin in the Inhibition of Ocular Neovascularization for the Triple Negative Breast Cancer

LI Cai-yun¹, ZHANG Yi-xia^{2△}, CHEN Ning-ning¹, LI Yan-li¹, ZHANG Hui¹

(1 Graduate School of Medical College, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang, 832000, China;

2 Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang, 832000, China)

ABSTRACT: Ocular neovascularization is a phenomenon observed in various kinds of eye diseases, which is harm to visual function and it is one of the main causes of blindness. The diseases include diabetic retinopathy, retinal embolism, retinopathy of prematurity age-related macular degeneration, etc. There is still no effective drug treatment as its mechanism is not completely clear. Endostatin (Endostatin, ES) a 20 kDa with 184 amino fragment of the NCI domain of collagen XVIII, was first discovered from hemangioendothelioma EOMA in cell culture supernatant of mouse in 1997. ES inhibits the formation of new blood vessels by induction of apoptosis and inhibiting VEGF, bFGF, EGF which stimulated the proliferation and migration of vascular endothelial cells, and it is the strongest angiogenesis inhibitor. Experiments have shown that ES is the most potential new drug in the anti-neovascular therapy. This article reviewed the advances in the treatment of ocular neovascularization and structure of ES.

Key words: Endostatin; Ocular neovascularization; Treatment

Chinese Library Classification(CLC): R774 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)04-798-03

引言

眼部新生血管的形成可见于多种眼病疾病中,出血、渗出及增生等为其特点,导致眼的正常结构破坏,视功能减退,最终至盲。寻找有效治疗新生血管的药物,是近年来眼科医师比较关注的反向。新生血管的生长是一个复杂的过程,如血管内皮生长因子(VEGF),转化生长因子(TGF),成纤维细胞生长因子(FGF),色素上皮衍生因子(PEDF)等,其中 VEGF 在血管形成中起着重要的作用。刺激因子和抑制因子间的失衡,导致新生血管的生长。近年来,虽然激光光凝,手术,药物等方法可在一定程度上延缓病变的进展,但均不可避免会损伤健康组织的危

险,并且治疗后容易复发。而应用 VEGF 等细胞因子拮抗剂治疗^[1],观察到有极少数患者有眼部不良反应发生,如视网膜脱离、急性视力下降、视网膜中央动脉阻塞、视网膜下出血、急性缺血性心脏病发作、脑血管意外等^[2]。ES 是一种内源性新生血管抑制因子,可显著抑制血管内皮细胞的移行和修复及血管形成^[3],是理想的抗新生血管形成的生物制剂。相关动物实验研究表明 ES 能抑制眼部新生血管,有望为新生血管性眼病患者带来希望。

1 ES 的结构

ES 是 1997 年由哈佛大学的 O'Reilly 等从小鼠血管内皮细胞瘤培养液中分离出的一种新型蛋白质,可以抑制内皮细胞的增生。相对分子质量约为 20kD,是胶原 XVIII 的蛋白降解产物,共 184 个氨基酸片段^[4]。它是由弹性蛋白酶,基质金属蛋白酶、组织蛋白酶 L 等参与降解的。Hohenester 等通过进一步晶体结构分析发现,在内皮抑素表明有一区域,为肝素结合位点^[5]。

作者简介:李彩云(1984-),女,硕士研究生,主要研究方向:玻璃体与视网膜疾病, E-mail: caiyun777@163.com

△通讯作者:张奕霞,女,副主任医师,主要研究方向:玻璃体与视网膜疾病, E-mail: xyz991128@163.com

(收稿日期:2013-03-07 接受日期:2013-03-31)

ES 对肝素的高亲和力特性,可能是通过该区域与血管生成因子竞争结合肝素,从而起到抑制血管生成的作用。此外,ES 晶体结构中还有锌离子结合位点,关于结合位点的作用,目前存在很多争议,以前认为锌离子与 ES 的生物活性相关。Yarnapchi 等的研究认为,ES 的抗血管生成作用并不依赖于锌离子结合位点^[6]。

2 ES 作用机制

ES 是最有潜力的抗新生血管形成的物质^[7],可抑制内皮细胞的增殖和迁移,促进细胞凋亡,诱导细胞在内皮细胞周期阻滞^[8],但其确切的机制尚未完全阐明。其可能的作用机制主要有:2.1 干扰 VEGF 受体 KDR/Flk-1 的酪氨酸磷酸化、细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular signal regulation protein kinase, ERK) 的激活,抑制 VEGF 与内皮细胞的结合,阻断 VEGF 介导的信号传导^[9]。2.2 ES 可防止细胞外基质蛋白的降解,从而抑制内皮细胞的迁移^[10]。2.3 ES 可抑制内皮细胞增殖,使内皮细胞停滞在 G1 期,从而抑制内皮细胞的增生^[11]。2.4 ES 通过下调抗凋亡蛋白 Bcl2 和 BclXL 的表达,促进血管内皮细胞凋亡^[12]。2.5 ES 通过与原肌球蛋白发生作用,破坏微丝结构的完整性,使内皮细胞运动功能消失,进而诱导内皮细胞凋亡。2.6 ES 可以通过与内皮细胞表面的接头蛋白 shb 受体的 sH2 区域结合,细胞内发生酪氨酸磷酸化,诱导内皮细胞凋亡^[13]。2.7 ES 与整联素 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha 5 \beta 3$ 直接结合可阻断整联素与细胞外基质的黏附,导致内皮细胞黏附和迁移发生改变^[14]。Shi 等发现 ES 以高亲和力与细胞表面核仁素 (nucleolin, NL) 特异性结合。NL 将 ES 运输到内皮细胞核内,能抑制 NL 的磷酸化,而 NL 的磷酸化对细胞增殖非常重要^[15]。2.8 抑制 VEGF mRNA 基因的表达,从而抑制新生血管的形成^[16]。

3 ES 在眼部的分布

ES 在人体内分布比较广泛,眼部的组织中也有大量的表达。Maatta 等发现 ES 在结膜和角膜上皮、角膜后弹力层、虹膜前表面层和后色素上皮层、睫状上皮的无色素上皮层和色素上皮层、Schlemm 管内壁和小梁、睫状体和虹膜的肌细胞、视网膜色素上皮层的基底膜和内界膜都有表达,并且通过基因探针检测到内皮抑素及其碎片在泪液、房水及玻璃体液中有表达^[17]。局部存在高浓度的 ES 使一些眼组织能保持无血管状态。

4 ES 在眼部疾病的应用

眼部新生血管的形成是导致多种致盲性眼部疾病的原因,治疗的关键在于抑制新生血管的生长。目前主要用于基因治疗的内皮抑素基因载体包括质粒、脂质体、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒等。通过各种不同的给药途径行内皮抑素及内皮抑素基因治疗,结果证明,眼部新生血管的形成能有效的被内皮抑素及内皮抑素基因抑制。于安星等通过制备碱烧伤诱导兔角膜新生血管 (CNV) 模型,给予球结膜下注射人重组内皮抑素,结果证明其可有效抑制 CNV 生长,为临床防治 CNV 提供了一种新的方法^[18]。李维义等给予 100 mg/mL 重组人内皮抑素 (rHES) 治疗碱烧伤诱导的大鼠角膜新生血管,对照组不予处理,通过免疫组织化学、PCR 检测血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白

量和 mRNA 在角膜组织的表达,透射电镜下检查碱烧伤后角膜组织的超微结构变化。结果表明 rHES 组角膜在碱烧伤后各时间点新生血管面积均小于阳性对照组,角膜碱烧伤后第 16 天各组 VEGF 蛋白表达量的差异有统计学意义,各组 VEGF mRNA 表达量的差异有统计学意义,透射电镜检查显示正常组结构正常, rHES 组较阳性对照组角膜结构变化小,表明 rHES 用于眼表可有效抑制碱烧伤诱导的角膜新生血管^[19]。李华等制备碱烧伤诱导的兔角膜新生血管模型后,给予重复 RGD 序列的改良内皮抑素 (endostatin, ES) (poly RGD-ES) $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 球结膜下注射,结果显示 poly RGD-ES 可有效抑制碱烧伤诱导的 CNV 的生长,活性强于 ES。为临床提供了一种具有应用前景的治疗方法^[20]。汤明芳等用角膜缝线法制作大鼠 CNV 模型, A 组缝线后立即于上方近角膜缘处结膜下注射 $50 \mu\text{L}$ 重组腺相关病毒介导内皮抑素 (rAAV-ES) 转染液; B 组缝线后刮除角膜上皮,用 rAAV-ES 转染液浸泡角膜; C 组缝线后用 rAAV-ES 转染液浸泡去上皮角膜后,相同部位结膜下注射 $50 \mu\text{L}$ rAAV-ES 转染液; D 组相同部位结膜下注射 $50 \mu\text{L}$ 生理盐水。通过免疫组化,病理切片等观察,结果显示 rAAV-ES 转基因可明显抑制缝线诱导的大鼠角膜新生血管的增生。采用单独结膜下注射 rAAV-ES 转染液或转染液局部浸泡去上皮角膜的转染途径均能抑制缝线诱导的角膜新生血管增生,联合转染途径对缝线诱导角膜新生血管增生的抑制效果更好,其差异具有统计学意义^[21]。钟敏等给予重组人血管内皮抑制素 0.1 mL 球结膜下注射于缝线诱导兔角膜新生血管,进一步证实其可有效的抑制角膜新生血管的生长^[22]。尹嘉等证实腺病毒携带的内皮抑素基因可以抑制人血管内皮细胞系的增殖,为进一步研究内皮抑素基因治疗新生血管提供实验基础^[23]。Mori 等将可表达内皮抑素的腺病毒载体注射到小鼠体内,结果表明,可使视网膜血管异常增生减少 50%,同时可以减轻视网膜、脉络膜的新血管生成^[24]。陈丽娟等通过半导体激光诱导大鼠脉络膜新生血管模型,给予重组人内皮抑素 $20 \mu\text{L}$ ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 玻璃体腔注射,通过荧光检测渗漏情况及免疫组化法测 CD105,结果表明重组人内皮抑素能抑制大鼠脉络膜新生血管的形成^[25]。Takahashi 等在视网膜下注射重组内皮抑素,观察到其通过与血管壁的结合,可明显抑制 VEGF 所引起的视网膜血管的渗漏、新生血管形成和视网膜脱离^[26]。

5 结语

综上所述,ES 是高效的抗新生血管生成的物质,其蛋白或基因在治疗眼内新生血管方面具有广阔的前景,在抑制眼部新生血管形成中有着重要的作用,但目前研究仅限于动物模型中,将其应用于人眼部治疗还需要更多的研究。此外,如何选择合适的给药方式,确定用药浓度,作用机制,毒副作用以及选择合理的基因表达系统等尚需进一步研究,以达到眼部新生血管的彻底根除,给新生血管性眼病患者带来希望。

参考文献 (References)

- [1] 马萍,樊映川. 血管内皮抑素对眼内新生血管抑制的展望 [J]. 国际眼科杂志, 2009, 9(5): 929-931
- Ma Ping, Fan Ying-chuan. The outlook of endostatin to the inhibition of intraocular neovascularization [J]. International Journal of Ophthalmol-

- mology, 2009, 9(5): 929-931
- [2] Fung AE, Rosenfeld P J, Reichel E. The international intravitreal Bevacizumab, Safety Survey: using the internet to assess drug safety worldwide[J]. Br J Ophthalmol, 2006, 90(11): 1344-1349
 - [3] SKovse th DK, Veuger MJ, Sorensen DR, et al. dramatically inhibits endothelial Cell migration, vascular morphogenesis and perivascular cell recruitment in vivo[J]. Blood, 2005, 105(7): 1044-1051
 - [4] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell, 1997, 88(2): 277-285
 - [5] Hohenester E, Sasaki T, Mannk, et al. Variable Zinc coordination in endostatin [J]. Mol Biol, 2000, 297(1): 1-6
 - [6] Yamaguchi N, Anand-Apte B, Lee M, et al. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding[J]. EMBO J, 1999, 18(16): 4414-4423
 - [7] Wang Kai, Wang Ke-zheng, Shen Bao-zhong, et al. MR Reporter Gene Imaging of Endostatin Expression and Therapy [J]. Mol Imaging Biol, 2010, 12(5): 520-529
 - [8] Li J, Dong X, Xu Z, et al. Endostatin gene therapy enhances the efficacy of paclitaxel to suppress breast cancers and metastases in mice [J]. Biomed Sci, 2008, 15(1): 99-109
 - [9] Kim YM, Hwang S, Kim Y, et al. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1[J]. Biol Chem, 2002, 277(31): 2787-2789
 - [10] Kim YM, Jang JW, Lee OH, et al. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase[J]. Cancer Res, 2000, 60(19): 5410-5413
 - [11] Hallai J, Dhanabal M, Karumanchi SA, et al. Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1[J]. Biol Chem, 2002, 277(19): 16464-16469
 - [12] Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis[J]. Biol Chem, 1999, 274(17): 11721-11726
 - [13] Richard-Blum S, Feraud O, Lortat-Jacob H, et al. Characterization of endostatin binding to heparin and heparin sulfate by surface plasmon resonance and molecular modeling: role of divalent cations [J]. Biol Chem, 2004, 279(4): 2927-2936
 - [14] Wickstrom SA, Aitalo K, Keski-Oja J. An endostatin-derived peptide interacts with integrins and regulates act in cytoskeleton and migration of endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(19): 20178-20185
 - [15] Shi H, Huang Y, Zhou H, et al. Nucleolin is a receptor that mediates an angiogenic and antitumor activity of endostatin[J]. Blood, 2007, 110(8): 2899-2906
 - [16] 吴静, 张美霞, 张军军, 等. 内皮抑素对视网膜新生血管中血管内皮细胞生长因子表达的影响[J]. 国际眼科杂志, 2009, 9(1): 25-27
Wu Jing, Zhang Mei-xia, Zhang Jun-jun, et al. Endostatin on vascular endothelial growth factor expression in retinal neovascularization[J]. International Journal of Ophthalmology, 2009, 9(1): 25-27
 - [17] Maatta M, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T, et al. Collagen XVIII/endostatin shows a ubiquitous distribution in human ocular tissues and endostatin-containing fragments accumulate in ocular fluid samples[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2007, 245(1): 74-81
 - [18] 于安星, 周东风. 重组内皮抑素对碱烧伤诱导角膜新生血管抑制作用[J]. 青岛大学医学院学报, 2009, 45(4): 379-383
Yu An-xing, Zhou Dong-feng. Recombinant endostatin on corneal neovascularization induced by alkali burn[J]. Qingdao Medical College, 2009, 45(4): 379-383
 - [19] 李维义, 高晓唯, 任兵. 重组人内皮抑素抑制角膜新生血管的实验研究[J]. 国际眼科杂志, 2009, 27(8): 688-693
Li Wei-yi, Gao Xiao-wei, Ren Bing. Experimental study of recombinant human endostatin inhibit corneal neovascularization[J]. International Journal of Ophthalmology, 2009, 27(8): 688-693
 - [20] 李华, 刘平, 葛红岩, 等. 改良内皮抑素基因转移对碱烧伤角膜新生血管的抑制作用[J]. 眼科新进展, 2009, 29(4): 259-262
Li Hua, Liu Ping, Ge Hong-yan, et al. Improved endostatin gene transfer inhibition of corneal neovascularization alkali burns [J]. Recent Advances in Ophthalmology, 2009, 29(4): 259-262
 - [21] 汤明芳, 于健, 白浪, 等. 腺相关病毒转内皮抑素基因抑制大鼠角膜新生血管的研究[J]. 国际眼科杂志, 2011, 11(10): 1695-1699
Tang Ming-fang, Yu Jian, Bai-lang, et al. Adeno-associated viral the endostatin gene suppression of rat corneal neovascularization[J]. Ophthalmology, 2011, 11(10): 1695-1699
 - [22] 钟敏, 何建中, 李荣, 等. 重组人血管内皮抑素抑制角膜新生血管的实验研究[J]. 南昌大学学报(医学版), 2012, 52(5): 28-30
Zhong Min, He Jian-zhong, Li Rong, et al. Experimental study of recombinant human endostatin inhibit corneal neovascularization[J]. Nanchang University (Medical Sciences), 2012, 52(5): 28-30
 - [23] 尹嘉, 袁绍纪, 张荣伟, 等. 转染内皮抑素基因对血管内皮细胞增殖的影响[J]. 医学综述, 2007, 13(23): 1839-1840
Yin Jia, Yuan Shao-Ji, Zhang Rong-wei, et al. Endostatin gene transfection of vascular endothelial cell proliferation[J]. Medical Recapitulate, 2007, 13(23): 1839-1840
 - [24] Mori K, Ando A, Gehlbach P, et al. Inhibition of choroidal neovascularization intravenous injection of adenoviral vectors expressing secreted endostatin[J]. Am J Pathol, 2001, 159(1): 313-320
 - [25] 陈丽娟, 苗林. 重组人血管内皮抑素对脉络膜新生血管的抑制作用[J]. 眼科新进展, 2012, 32(10): 922-925
Chen Li-juan, Miao Lin. Recombinant human endostatin on choroidal neovascularization inhibition [J]. Recent Advances in Ophthalmology, 2012, 32(10): 922-925
 - [26] Takahashi K, Saishin Y, Saishin Y, et al. Intraocular expression of endostatin reduce VEGF-induced retinal vascular permeability, neovascularization, and retinal detachment[J]. FASEB J, 2003, 17(8): 896-898