

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.01.007

新生血管特异性结合肽 GX1 二聚体抑制大鼠视网膜微血管 内皮细胞血管生成的实验研究 *

罗莹莹¹ 刘惊涛² 张海萍¹ 雷志杰³ 崔巍¹ 吴开春^{3Δ} 惠晓丽^{1Δ}

(1 西安交通大学第一附属医院老年内分泌科 陕西 西安 710061;

2 空军军医大学西京医院附属 986 医院核医学科 陕西 西安 710054;

3 空军军医大学西京消化病医院 肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨新生血管特异性结合肽 GX1 二聚体对视网膜新生血管生成的影响。**方法:**化学合成 GX1 二聚体、GX1 单体、对照肽二聚体,通过 CCK-8 实验、管状结构形成实验、迁移实验研究 GX1 二聚体对大鼠视网膜内皮细胞(RMEC)增殖、微管形成、迁移能力的影响,流式细胞学技术分析其对细胞周期分布和凋亡的影响。**结果:**CCK-8 结果显示,与对照肽二聚体及阴性对照组相比,100-200 μM GX1 二聚体及单体均可抑制 RMEC 增殖($P<0.05$),且随着 GX1 二聚体及单体浓度升高,抑制作用逐渐增强,呈剂量依赖性;各浓度 GX1 二聚体均较单体抑制作用增强,并有统计学差异($P<0.05$)。管状结构形成实验、细胞损伤迁移实验结果显示与对照肽二聚体及 PBS 组相比,GX1 二聚体及 GX1 单体均可明显抑制视网膜内皮细胞管状结构的形成及迁移,且二聚体抑制作用强于单体;对照肽二聚体仅有轻微的抑制视网膜内皮细胞管状结构形成的作用,对细胞迁移无明显抑制作用。流式细胞术分析显示与对照肽及阴性对照组相比,GX1 二聚体及 GX1 单体均可诱导细胞凋亡($P<0.05$),且 GX1 二聚体的诱导作用强于 GX1 单体($P<0.05$),而对细胞周期分布则无明显影响。**结论:**GX1 二聚体和 GX1 单体均可抑制视网膜新生血管内皮细胞增殖、微管形成、迁移能力及诱导凋亡,且 GX1 二聚体较 GX1 单体作用增强。GX1 二聚体有望代替单体成为糖尿病视网膜病变新生血管靶向治疗小肽类药物。

关键词:糖尿病视网膜病变;抗血管生成;GX1 二聚体;GX1 单体

中图分类号:R-33;R774.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)01-35-06

A study on the Inhibitory Effect of Neovasculture Homing Peptide Dimeric GX1 on the Angiogenesis of the Rat Retinal Microvasculature Endothelial Cells*

LUO Ying-ying¹, LIU Jing-tao², ZHANG Hai-ping¹, LEI Zhi-jie³, CUI Wei¹, WU Kai-chun^{3Δ}, HUI Xiao-li^{1Δ}

(1 Department of Geriatric endocrinology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China;

2 Affiliated No.986 Hospital of Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710054, China; 3 Xijing Hospital of Digestive Diseases & State Key Laboratory of Cancer Biology, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the antiangiogenesis ability of dimeric GX1 to retinal angiogenesis. **Methods:** Dimeric GX1, GX1 monomer and dimeric control peptides were synthesized. Antiangiogenesis of dimeric GX1 on rat retinal microvasculature endothelial cells (RMEC) was analyzed by CCK-8 assay, migration assay, and tube formation assay. Flow cytometry assay was performed to evaluate the effects of dimeric GX1 to RMEC cycle and apoptosis. **Results:** CCK-8 assay showed that both dimeric GX1 and GX1 monomer compared to dimeric control peptides and PBS group had significant inhibitory effect on the proliferation of RMEC ($P<0.05$) from 100 to 200 μM in dose-dependent manner. Dimeric GX1 showed more significant inhibitory effect than GX1 monomer ($P<0.05$). Tube formation assay and cell migration assay showed that both dimeric GX1 and GX1 monomer could inhibit tube formation assay and cell migration of RMEC compared to dimeric control peptides and PBS group. Dimeric control peptides only showed slightly inhibitory effect on tube formation of RMEC as well as no effect on cell migration. Flow cytometry assay also showed that both dimeric

* 基金项目:国家自然科学基金创新研究群体项目(81421003);国家自然科学基金项目(30900704);

陕西省重点研发计划一般项目(2017SF-104, 2018SF-161);陕西省科技攻关项目(2013K12-09-03);

陕西省卫生计生科研基金项目(2016D066);西安市科技计划项目(201805095YX3SF296)

作者简介:罗莹莹(1981-),硕士研究生,主要研究方向:糖尿病视网膜病变及胃癌新生血管靶向治疗研究, E-mail: 30983182@qq.com

 Δ 通讯作者:惠晓丽(1976-),博士,助理研究员,主要从事糖尿病视网膜病变及胃癌新生血管靶向治疗研究,

E-mail: hxljt@126.com, 电话: 86-29-85324043;

吴开春(1961-),博士,教授,博士生导师,主要从事胃癌和炎症性肠病研究工作,

E-mail: kaicwu@fmmu.edu.cn, 电话: 86-29-84771502

(收稿日期:2019-06-18 接受日期:2019-07-13)

GX1 and GX1 monomer could induce RMEC apoptosis compared to dimeric control peptides and PBS group ($P<0.05$), but dimeric GX1 had stronger induction effect than GX1 monomer ($P<0.05$). In addition, there is no significant effect on cell cycle distribution was observed. **Conclusions:** Dimeric GX1 owned more significant antiangiogenesis ability on RMEC than GX1 monomer. Dimeric GX1 was more promising to be explored for effective antiangiogenesis targeting drug to diabetic retinopathy.

Key words: Diabetic retinopathy; Antiangiogenesis; Dimeric GX1; GX1 monomer

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R774.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)01-35-06

前言

糖尿病增殖性视网膜病变已成为成人首位致盲原因,其病理改变以视网膜新生血管生成为主,传统治疗方案包括全视网膜光凝和冷冻疗法,治疗后易复发,并有一定的视功能损害。血管新生靶向治疗已成为防治糖尿病视网膜病变的重要策略^[1-3],而寻找视网膜新生血管所特异性表达的分子成为其中的关键环节^[4]。研究显示肿瘤血管与视网膜新生血管具有某些共同表达的分子,而这些共同表达的分子可成为糖尿病视网膜病变抗新生血管生成的新靶点^[5]。空军军医大学西京消化病医院2004年利用噬菌体肽库展示技术(乔治P史密斯因该技术获2018年诺贝尔化学奖)在荷胃癌移植瘤免疫抑制小鼠体内筛选出能与胃癌血管内皮细胞特异性结合的环状小肽GX1(已获国家专利)^[6],具有视网膜及肿瘤新生血管双重靶向^[6-8],并抑制二者血管生成^[6,9],后经化学修饰合成GX1二聚体,并证实其较单体具有更优越的受体结合特异性、亲和力和活体内靶向性^[10]。本研究通过观察GX1二聚体对大鼠视网膜微血管内皮细胞增殖、迁移、微管形成、周期、凋亡等生物学功能方面的影响,探讨了GX1二聚体对体外大鼠视网膜新生血管生成的作用,以期对糖尿病视网膜病变的治疗提供新型靶向药物。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

大鼠视网膜微血管内皮细胞(RMEC)由空军军医大学西京消化病医院肿瘤生物学国家重点实验室保存自武汉原生代生物医药科技有限公司。磷酸缓冲盐溶液(PBS)、0.25%胰酶和胎牛血清均购自美国HyClone公司,ECM培养基、内皮细胞生长添加物(EGS)购自美国ScienCell生物制剂公司,GX1二聚体、GX1单体、对照肽二聚体由上海吉尔生化生物公司合成,Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒购自日本株式会社同仁化学研究所,Matrigel™基底膜基质购自美国BD公司,光学显微镜、流式细胞仪及全自动酶标仪(BIO-RAD550)购自美国bio-rad公司。

1.2 方法

1.2.1 GX1二聚体及对照肽二聚体的合成 GX1二聚体(CGNSNPCKSCKEKCGNSNPCKSC)由依照GX1的氨基酸序列,通过C1-C9、C13-C21二硫键环化形成环肽。对照肽二聚体(URP)₂是将GX1氨基酸序列随机重排,同时保留二硫键后合成的(CNKSPSGNCKEKCNCSPSGNC)。GX1单体(CGNSNPCKSC)通过C1-C9二硫键环化形成环肽,均由上海吉尔生化生物公司合成,肽纯度均>95%。合成肽经MS分析,确认其氨基酸序列正确,纯度达标。将上述合成肽分别用无菌PBS溶

解,配成4 mmol/L溶液,分装,-20℃保存。

1.2.2 CCK-8法检测GX1二聚体对RMEC增殖的影响 将对数生长期的RMEC接种于96孔板,调整细胞浓度为 1.25×10^4 mL,每孔200 μL,即 2.5×10^3 细胞/孔,培养过夜。分别加入50 μM、75 μM、100 μM、125 μM、150 μM、175 μM、200 μM的GX1二聚体、GX1单体、对照肽二聚体(URP)₂和同体积的PBS作为对照,于孵箱中继续培养48 h。加入CCK-8每孔20 μL,继续培养4 h后用酶标仪检测450 nm处OD值。

1.2.3 RMEC管状结构形成检测 参照Shtivelband^[11]等人方法,将-20℃保存的Matrigel置于4℃冰箱过夜使其缓慢溶解,并将实验中将要用到的96孔板、EP管、枪头等放置于4℃冰箱过夜预冷。次日,准备冰盒,用无血清ECM培养液将Matrigel稀释至2.5 mg/mL,50 μL/孔包被96孔板(整个过程在冰上操作以防止铺胶过早凝固而不均匀),37℃静置30 min,自然凝固。消化、离心、收集对数生长期的RMEC,调整密度为 2.5×10^4 细胞/mL。将细胞接种于已经包被好的96孔板,每孔100 μL(约 2.5×10^3 细胞),待细胞贴壁后,分别加入175 μM GX1二聚体、GX1单体、(URP)₂和PBS。于孵箱中继续培养48 h,倒置相差显微镜下观察并拍照。

1.2.4 RMEC损伤修复试验 将对数期RMEC细胞(2500细胞/孔)接种于24孔板。贴壁后用无菌枪头在孔内快速均匀划划细胞,PBS清洗3次后,换无血清ECM培养基,同时加入175 μM GX1二聚体、GX1单体、(URP)₂和PBS。用无菌枪头在孔内快速均匀划划细胞,继续培养24 h、48 h。倒置显微镜下观察划痕处细胞生长情况并拍照。

1.2.5 RMEC周期分布检测 RMEC培养至对数生长期后,分别加浓度175 μM GX1二聚体、GX1单体、对照肽二聚体(URP)₂和PBS,继续培养48 h。消化、离心细胞后,小心吸弃上清,加入72%冷乙醇2 mL后重悬细胞,4℃冰箱过夜。离心,小心吸弃上清,PBS洗涤,用RNA酶37℃处理30 min。加入5 pg/mL的PI染液,避光4℃放置30 min。300目滤网过滤,用流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.2.6 RMEC凋亡检测 RMEC培养至对数生长期后,分别加浓度175 μM GX1二聚体、GX1单体、对照肽二聚体(URP)₂和PBS,继续培养48 h。消化、离心细胞后,小心吸弃上清,将细胞重悬于含AnnexinV-FITC和0.5 μg PI的100 μL结合缓冲液(10 μM HEPES, pH7.4, 0.15 M NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂)于暗室中继续室温孵育约15 min。最后加入400 μL结合缓冲液,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3 统计学分析

以上实验均重复三次以上,用SPSS13.0统计学软件分析实验数据,结果用平均值±标准差表示,多组间均数比较采用

单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GX1 二聚体抑制 RMEC 的增殖

如图 1 所示,与对照肽及阴性对照组相比,100-200 μM GX1 二聚体、GX1 单体均表现出明显的抑制 RMEC 增殖的作用 ($P<0.05$) (图 1A、B),且随着 GX1 二聚体及单体浓度升高抑

制作用逐渐增强,呈剂量依赖性(图 1C)。各个肽浓度 GX1 二聚体较单体均更显著抑制 RMEC 的增殖(图 1B) ($P<0.05$)。

2.2 GX1 二聚体抑制 RMEC 的管状结构形成

如图 2A、2B 所示,与 PBS 组、对照肽二聚体组相比,GX1 二聚体及 GX1 单体均可抑制 RMEC 管状结构形成的趋势,具有统计学差异 ($P<0.05$)。且二聚体的抑制作用强于单体,并有统计学差异 ($P<0.05$)。

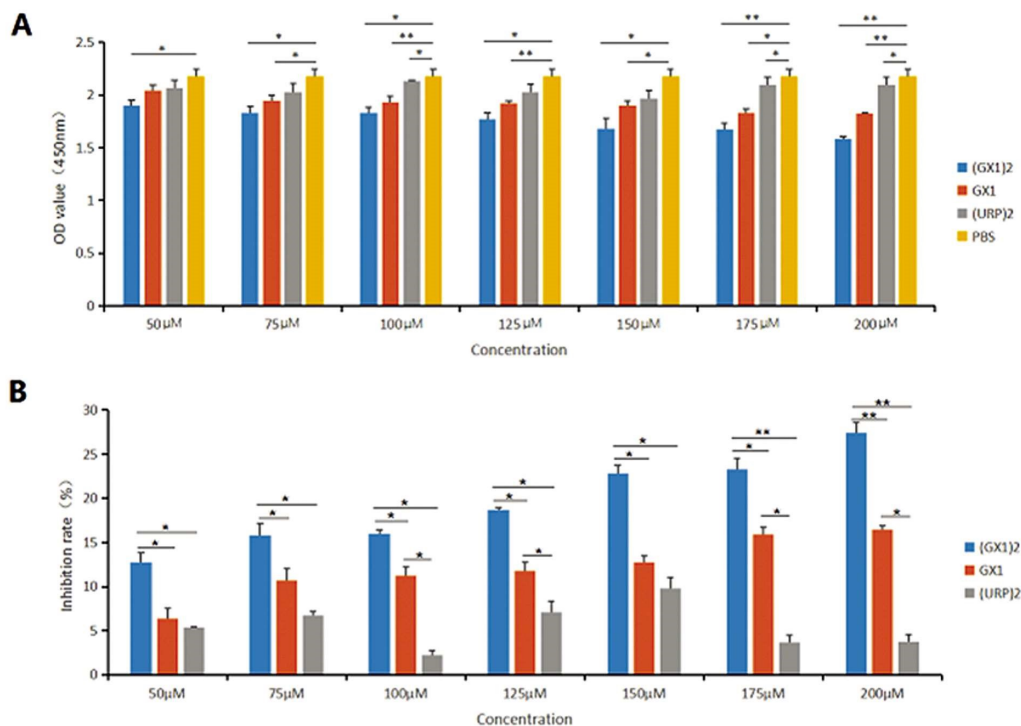


图 1 CCK-8 法检测 GX1 二聚体对 RMEC 增殖的影响

Fig.1 Detection the effect of dimeric GX1 on RMEC proliferation by CCK-8 test

2.3 GX1 二聚体抑制 RMEC 的迁移

如图 3 所示,与对照肽二聚体与对照组 PBS 相比,GX1 二聚体、GX1 单体均能抑制 RMEC 的迁移,且 GX1 二聚体的抑

制作用较 GX1 显著。对照肽二聚体与对照组 PBS 相比,在细胞损伤后的迁移作用上无明显差别。

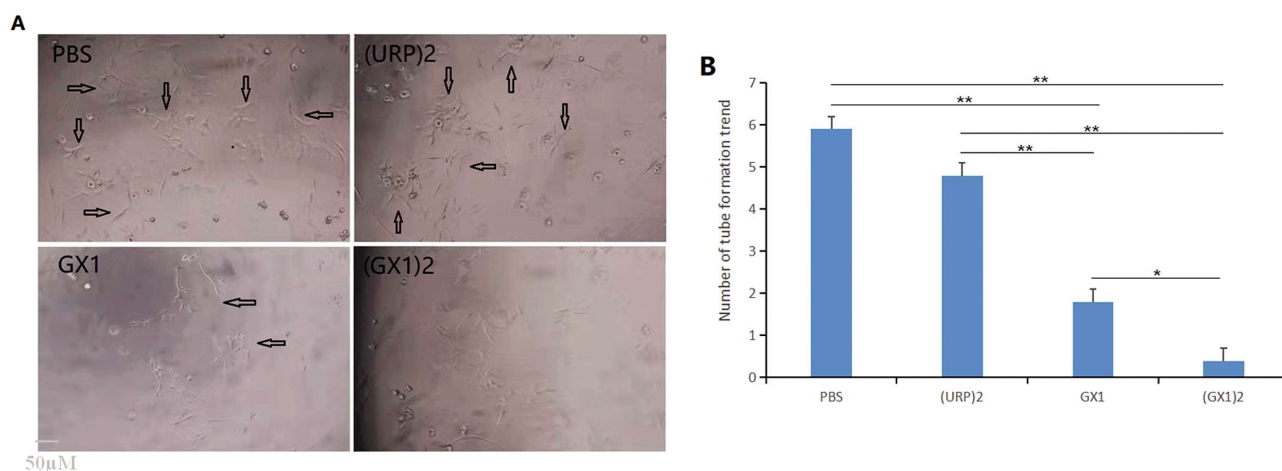


图 2 GX1 二聚体对 RMEC 管状结构形成的影响(200 $\times$)

Fig.2 Detection the effect of dimeric GX1 on rRMEC tube formation(200 $\times$)

2.4 GX1 二聚体对 RMEC 凋亡的影响

如图 4A、4B 所示,对照组 PBS、对照肽二聚体、GX1 单体及 GX1 二聚体,作用细胞后凋亡率呈显著升高,%B4 分别为:

3.9%、4.9%、6.6%、11.1%。图 4B 示 GX1 二聚体、GX1 单体凋亡率与对照肽二聚体及 PBS 对照组相比,均具有统计学差异 ($P<0.05$),且 GX1 二聚体、GX1 单体凋亡率相比仍有统计学差

异($P<0.05$),提示 GX1 二聚体及 GX1 单体可能通过诱导凋亡发挥抑制作用,且 GX1 二聚体的诱导作用强于 GX1 单体。

2.5 GX1 二聚体对 RMEC 周期分布的影响

如图 5 及表 1 所示,GX1 二聚体、GX1 单体作用 RMEC 细

胞后,各期细胞所占比例与对照肽二聚体、PBS 组比较均无显著差异,提示 GX1 二聚体及 GX1 单体对内皮细胞的抑制作用,并非通过,或并非主要通过诱导细胞周期阻滞而发挥抑制作用的。

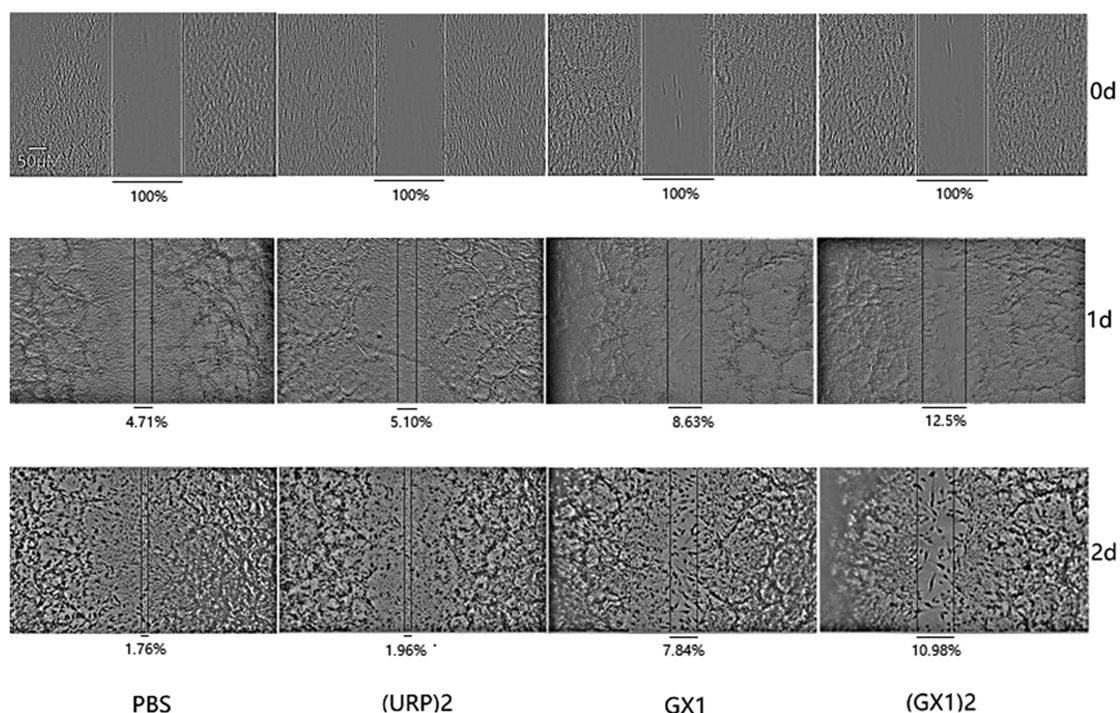


图 3 GX1 二聚体对 RMEC 迁移能力的影响(0d:40× ;1d 和 2d:200×)

Fig.3 Detection the effect of dimeric GX1 on RMEC migration(0d:40× ;1d and 2d:200×)

3 讨论

糖尿病视网膜病变是成人致盲的主要原因之一,其基本病理改变是视网膜新生血管生成为主^[12]。传统治疗方法如激光光凝和冷冻疗法,均不能从根本上解决问题,甚至加重病情,若术前已有严重的纤维血管增殖,术后可能发生收缩导致视网膜玻璃体出血和视网膜脱离。基于以上现状,如何防止或阻止视网膜新生血管生成,阻断增殖性病变发生或发展是亟待解决的问题^[12,13]。

近年来大量研究发现,多种细胞因子特别是缺氧刺激产生的各种新生血管生长因子、粘附分子、转录调节因子等参与视网膜新生血管的发生发展^[14,15]。以这些视网膜新生血管所特异性表达的分子为靶点的新生血管靶向治疗,既可提高血管抑制治疗的疗效,又可降低血管抑制剂的全身性毒副作用,为糖尿病视网膜病变治疗提供了新手段^[4,16,17],其中特异靶向到新生血管的小肽类药物或单抗成为研究的热点^[3,18],而寻找视网膜新生血管所特异性表达的分子成为研发此类药物的关键环节^[4]。研究发现,肿瘤血管所表达的某些特异性分子如整合素受体及 aminopeptidases 在糖尿病视网膜病变中亦有表达,靶向 $\alpha v \beta 3 / \alpha v \beta 5$ 的小肽 RGD-4C 可通过选择性激活视网膜内皮细胞凋亡而抑制氧诱导的视网膜新生血管生成。而在肿瘤血管生成中广泛研究的 VEGF 及 VEGFR1 可诱导视网膜新生血管生成(RNV)^[19]。靶向 VEGFR1 mRNA、siRNA、ACEI 类药培哚普利(通过下调 VEGF/PEDF 比率),均可抑制视网膜新生血管生

成^[20]。贝伐单抗及雷珠单抗现均被美国 FDA 批准用于增殖性糖尿病视网膜病变治疗^[21-23],这说明视网膜新生血管与肿瘤血管具有某些共同表达的分子,而这些共同表达的分子可成为糖尿病视网膜病变抗新生血管生成的新靶点。

GX1 是空军军医大学西京消化病医院发现的能与人类胃癌血管内皮细胞特异性结合的环状小肽^[9],并且 GX1 还能与缺氧诱导的小鼠视网膜新生血管特异性结合,并可抑制大鼠视网膜血管内皮细胞增殖及管状结构形成能力,使管状结构数目减少,分支减少,并导致内皮细胞凋亡^[7],但其与受体的亲和力尚有待增强。有研究报道,多价聚合、位点修饰或螯合剂偶联可明显提高受体与配体的亲和力,改善其体内药代动力学,有助于受体介导肿瘤血管靶向药物的开发^[24,25];RGD 二聚体、四聚体、八聚体由于其属多聚体,分子量增大,较单聚体具有更高的受体结合力及肿瘤滞留率,并随着其价态增高,与受体的亲和力逐渐增强^[26-28]。而我们前期研究也证实经化学修饰合成 GX1 二聚体、GEBP11 三聚体与受体亲和力、体内靶向性及抗肿瘤血管生成效应均较单体明显增强,有望代替单体成为新型抗新生血管生成靶向诊断及治疗药物^[5,29]。

为进一步探讨 GX1 二聚体成为糖尿病视网膜病变新生血管靶向治疗药物的可行性,本研究通过 GX1 二聚体对大鼠视网膜血管内皮细胞增殖、迁移、微管形成、细胞周期及凋亡等生物学功能方面的影响,来研究 GX1 二聚体对视网膜新生血管生成功能的效应。CCK-8 实验、管状结构形成实验结果显示, GX1 二聚体较 GX1 单体,在各个肽浓度均表现出抑制作用增

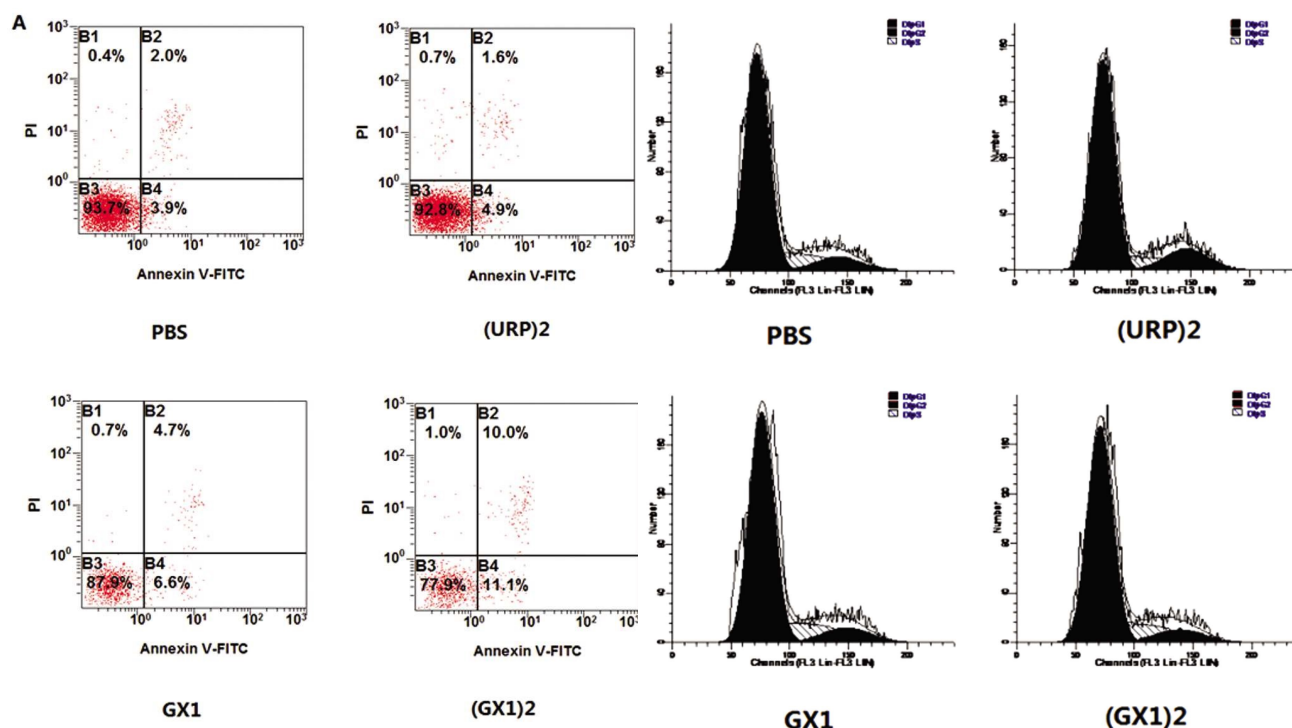


图5 GX1 二聚体对 RMEC 周期分布的影响

Fig.5 Detection the effect of dimeric GX1 on RMEC cycle distribution

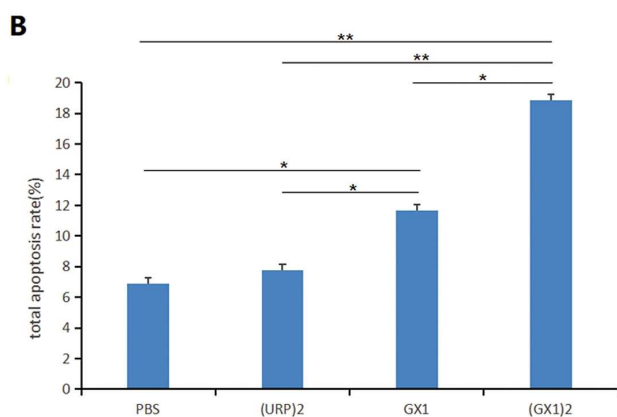


图4 GX1 二聚体对 RMEC 凋亡的影响

Fig.4 Detection the effect of dimeric GX1 on RMEC apoptosis

(B1:Dead cell rate;B2:Late apoptosis rate;B3:Living cell rate;B4:Early apoptosis rate)

强,且在一定浓度区间其抑制作用呈剂量依赖性,GX1 二聚体较GX1 单体,抑制视网膜血管内皮细胞的微管形成能力增强。流式细胞学分析显示,GX1 二聚体及 GX1 单体均可诱导视网

膜内皮细胞凋亡,且 GX1 二聚体的诱导作用强于 GX1 单体,而对细胞周期分布则无明显影响,故从而推测 GX1 二聚体可能是通过诱导视网膜血管内皮细胞的凋亡来实现其抑制增殖、管状结构形成等功能的。这与先前发现的 GX1 单体对胃癌血管内皮细胞周期分布和凋亡作用的影响特点相一致,而且二聚体作用要明显强于单体,这受益于其与受体亲和力较单体增强^[10],这为进一步研发 GX1 二聚体作为新型糖尿病视网膜病变新生血管靶向治疗药物奠定了基础。此外,本课题组已成功筛选到 GX1 的受体 - 转谷氨酰胺酶 -2(transglutaminase-2, TGM2)^[30]。下一步我们将通过芯片筛选,结合受体,深入探讨 GX1 二聚体具体作用机制,为研发其作为新型糖尿病视网膜病变新生血管靶向治疗药物提供理论依据。

综上,本部分实验证实了 GX1 二聚体可抑制视网膜血管内皮细胞的增殖、管状生成,并诱导其凋亡,并强于 GX1 单体。GX1 二聚体有望替代单体成为新型抗糖尿病视网膜病变新生血管生成靶向治疗的小肽类药物。

表 1 GX1 二聚体对 RMEC 的周期分布作用(n=12, $\bar{x} \pm SD$)Table 1 Detection the effect of dimeric GX1 on RMEC cycle distribution(n=12, $\bar{x} \pm SD$)

Groups	G1%	G2%	s%	P value
(GX1)2	74.28 $\pm$ 1.21	6.1 $\pm$ 2.23	19.61 $\pm$ 2.43	NS
GX1	72.67 $\pm$ 1.33	7.71 $\pm$ 1.5	19.62 $\pm$ 1.72	NS
(URP) ₂	72.28 $\pm$ 0.76	12.31 $\pm$ 1.89	15.4 $\pm$ 1.55	
PBS	75.33 $\pm$ 1.63	7.23 $\pm$ 1.71	17.44 $\pm$ 1.42	

参考文献(References)

[1] Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy[J]. Nat Rev Drug Discov, 2016, 15(6): 385-403

[2] Dulull N, Kwa F, Osman N, et al. Recent advances in the management of diabetic retinopathy[J]. Drug Discov Today, 2019 [Epub ahead of print]

- [3] Stitt AW, Curtis TM, Chen M, et al. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2016, 51: 156-186
- [4] Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis[J]. *Cell*, 2011, 146 (6): 873-887
- [5] Zhi M, Wu KC, Dong L, et al. Characterization of a Specific Phage-Displayed Peptide Binding to Vasculature of Human Gastric Cancer [J]. *Cancer Biology & Ther*, 2004, 3: 27-30
- [6] Hui X, Han Y, Liang S, et al. Specific targeting gastric cancer angiogenesis by a new tumor-homing peptide CGNSNPCKSC [J]. *J Control Release*, 2008, 131: 86-93
- [7] 方如塘, 惠晓丽, 殷继鹏, 等. 新生血管特异性结合肽 GX1 抑制小鼠视网膜新生血管生成的实验研究 [J]. *陕西医学杂志*, 2012, 41 (10): 1275-1277+1301
- [8] 惠晓丽, 梁树辉, 刘洋, 等. 体内示踪技术评价噬菌体展示肽 GX1 特异靶向胃癌新生血管[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(14): 1940-1943
- [9] Chen B, Cao S, Zhang Y, et al. A novel peptide (GX1) homing to gastric cancer vasculature inhibits angiogenesis and cooperates with TNF alpha in anti-tumor therapy[J]. *BMC Cell Biol*, 2009, 10: 63
- [10] Yin J, Hui X, Yao L, et al. Evaluation of Tc-99 m Labeled Dimeric GX1 Peptides for Imaging of Colorectal Cancer Vasculature [J]. *Mol Imaging Biol*, 2015, 17(5): 661-70
- [11] M. I. Shtivelband, H. S. Juneja, S. Lee, et al. Aspirin and Salicylate Inhibit Colon Cancer Medium- And Vegf-Induced Endothelial Tube Formation: Correlation with Suppression of Cyclooxygenase-2 Expression[J]. *J Thromb Haemost*, 2003, 1(10): 2225-2233
- [12] Watson EC, Grant ZL, Coultas L. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(24): 4387-4403
- [13] Villegas VM, Schwartz SG. Current and Future Pharmacologic Therapies for Diabetic Retinopathy[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(41): 4903-4910
- [14] Hammes HP, Feng Y, Pfister F, et al. Diabetic retinopathy: targeting vasoregression[J]. *Diabetes*, 2011, 60(1): 9-16
- [15] Shan K, Liu C, Liu BH, et al. Circular noncoding RNA HIPK3 mediates retinal vascular dysfunction in diabetes mellitus [J]. *Circulation*, 2017, 136(17): 1629-1642
- [16] Park DY, Lee J, Kim J, et al. Plastic roles of pericytes in the blood-retinal barrier[J]. *Nat commun*, 2017, 8: 15296
- [17] Jeong HW, Hernández-Rodríguez B, Kim J, et al. Transcriptional regulation of endothelial cell behavior during sprouting angiogenesis [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 726
- [18] Carter PJ, Lazar GA. Next generation antibody drugs: pursuit of the 'high-hanging fruit'[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(3): 197-223
- [19] Eilken HM, Diéguez-Hurtado R, Schmidt I, et al. Pericytes regulate VEGF-induced endothelial sprouting through VEGFR1 [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1574
- [20] Simó R, Sundstrom JM, Antonetti DA. Ocular Anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: the role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. *Diabetes Care*, 2014, 37(4): 893-899
- [21] Talks SJ, Bhatia D, Menon G, et al. Randomised trial of wide-field guided PRP for diabetic macular oedema treated with ranibizumab[J]. *Eye (Lond)*, 2019
- [22] Raposo Moreira Dias A, Pina A, Dal Corso A, et al. Multivalency Increases the Binding Strength of RGD Peptidomimetic-Paclitaxel Conjugates to Integrin $\alpha V \beta 3$ [J]. *Chemistry*, 2017, 23(58): 14410-14415
- [23] Lorés-Motta L, Riaz M, Grunin M, et al. Association of Genetic Variants With Response to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Age-Related Macular Degeneration [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2018, 136(8): 875-884
- [24] Wells JA, Glassman AR, Jampol LM, et al. Association of Baseline Visual Acuity and Retinal Thickness With 1-Year Efficacy of Aflibercept, Bevacizumab, and Ranibizumab for Diabetic Macular Edema[J]. *JAMA Ophthalmol*, 2016, 134(2): 127-134
- [25] Lobeek D, Franssen GM, Ma MT, et al. In Vivo Characterization of 4 68Ga-Labeled Multimeric RGD Peptides to Image $\alpha v \beta 3$ Integrin Expression in 2 Human Tumor Xenograft Mouse Models [J]. *J Nucl Med*, 2018, 1296-1301
- [26] Lucente E, Liu H, Liu Y, et al. Novel 64Cu Labeled RGD2-BBN Heterotrimers for PET Imaging of Prostate Cancer [J]. *Bioconjug Chem*, 2018, 29(5): 1595-1604
- [27] Minamimoto R, Jamali M, Barkhodari A, et al. Biodistribution of the ^{18}F -FPPRGD₂ PET radiopharmaceutical in cancer patients: an atlas of SUV measurements [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2015, 42(12): 1850-1858
- [28] Guo Z, Zhou X, Xu M, et al. Dimeric camptothecin-loaded RGD-modified targeted cationic polypeptide-based micelles with high drug loading capacity and redox-responsive drug release capability [J]. *Biomater Sci*, 2017, 5(12): 2501-2510
- [29] Zhang J, Hu H, Liang S, et al. Targeted radiotherapy with tumor vascular homing trimeric GEBP11 peptide evaluated by multimodality imaging for gastric cancer [J]. *J Control Release*, 2013, 172(1): 322-329
- [30] Lei Z, Chai N, Tian M, et al. Novel peptide GX1 inhibits angiogenesis by specifically binding to transglutaminase-2 in the tumorous endothelial cells of gastric cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 21, 9(6): 579