

角膜新生血管中细胞与分子的研究进展

高月兰, 潘玉苗, 杨燕宁

引用: 高月兰, 潘玉苗, 杨燕宁. 角膜新生血管中细胞与分子的研究进展. 国际眼科杂志 2021;21(11):1875-1880

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81770899)

作者单位: (430061) 中国湖北省武汉市, 武汉大学人民医院眼科中心

作者简介: 高月兰, 女, 在读本科, 研究方向: 角膜病、白内障、眼表疾病。

通讯作者: 杨燕宁, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 角膜病、白内障、眼表疾病. ophyyn@163.com

收稿日期: 2021-02-20 修回日期: 2021-09-18

摘要

多种眼部损伤可诱导角膜新生血管形成, 促进疾病发展, 造成角膜水肿、视力受损, 甚至失明, 因此抑制角膜新生血管有助于延缓疾病进程并降低角膜损伤, 具有十分重要的临床意义。本文将对参与角膜新生血管形成的细胞及分子作最新的系统论述, 并分析可能的抑制靶点, 以期为科研及临床提供参考。

关键词: 角膜新生血管; 细胞; 血管因子; RNA; 细胞外基质
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.11.08

Research progress of cells and molecules in corneal neovascularization

Yue-Lan Gao, Yu-Miao Pan, Yan-Ning Yang

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No.81770899)

Eye Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430061, Hubei Province, China

Correspondence to: Yan-Ning Yang. Eye Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430061, Hubei Province, China. ophyyn@163.com

Received: 2021-02-20 Accepted: 2021-09-18

Abstract

• Various ocular injuries can induce corneal neovascularization, which promote the development of diseases, causing corneal edema, impaired vision and even blindness. Therefore, with very important clinical significance, inhibiting corneal neovascularization can help to delay the progression of diseases and reduce corneal damage. This article will make the latest systematic discussion on the cells and molecules involved in corneal neovascularization, and analyze the possible inhibitory targets, hoping to provide references for scientific research and clinical practice.

• KEYWORDS: corneal neovascularization; cell; vascular factor; RNA; extracellular matrix

Citation: Gao YL, Pan YM, Yang YN. Research progress of cells and molecules in corneal neovascularization. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(11):1875-1880

0 引言

多种角膜损伤如感染、角膜移植排斥、创伤、炎症、自身免疫病、先天无虹膜、肿瘤和缺血等可诱导形成角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV), CNV 通过辅助清除感染因子和提供营养来加速伤口愈合, 但因渗出等可致角膜水肿、视力受损, 甚至失明, 据估计每年有 140 万人出现 CNV, 其中 12% 因此视力丧失, 此外角膜移植术前存在 CNV 使排斥风险增加 1 倍以上、移植失败可能性增加 30%^[1]。因此研究 CNV 发病机制有助于寻找抑制靶点, 延缓疾病进展并降低角膜损伤。炎症是 CNV 形成的关键病理过程, 迁移至角膜的炎性细胞与角膜细胞均可产生血管因子, 打破促血管生成因子与抗血管生成因子的平衡而促使 CNV 发生, 最终造成角膜水肿及视力下降。本文就 CNV 形成过程中细胞与分子的作用及可能的治疗靶点进行论述。

1 炎性细胞

大量研究表明, 多种炎性细胞如巨噬细胞和中性粒细胞等主要通过产生血管因子调节 CNV, 不同炎性细胞的致病机制不同 (表 1), 同种炎性细胞在不同原因所致 CNV 中的作用也不完全一致^[2-4]。

巨噬细胞通过吞噬碎片、降解结缔组织并作为血管因子主要来源等在碱烧伤 CNV 中发挥重要作用, 已有研究表明多种凋亡调节因子可通过调节巨噬细胞而影响 CNV。Liu 等比较凋亡调节基因 BCL-10 敲除和野生型碱烧伤小鼠, 发现 BCL-10 敲除小鼠通过抑制角膜巨噬细胞浸润来下调碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 而降低碱烧伤后 CNV, 表明 BCL-10 可能是 CNV 的潜在临床干预靶标^[5]。Tian 等发现另一凋亡调节因子 caspase-8 促进 F4/80+ 巨噬细胞募集, 且 caspase-8 抑制剂可减少巨噬细胞募集而治疗 CNV^[6]。然而近年研究指出巨噬细胞的整体耗竭对碱烧伤后 CNV 形成可能无明显影响, 选择性抑制某种巨噬细胞也许是抑制炎性 CNV 的有效治疗方案, Lu 等^[7]通过免疫染色等观察缺乏巨噬细胞趋化因子受体 CCR2 和缺乏 CX3CR1 的碱烧伤小鼠, 发现 CCR2 缺陷小鼠 CNV 形成减少, 而 CX3CR1 缺陷小鼠 CNV 形成增加, 说明表达 CCR2 与 CX3CR1 的巨噬细胞在血管生成中作用相反, 选择性抑制表达 CCR2 的巨噬细胞有望抑制炎性 CNV。

在小鼠角膜移植后 CNV 中, Di Zazzo 等^[4]发现同种异体移植宿主 T 细胞可能通过 VEGE-A、VEGF-C 等促进血管内皮细胞生长, 表明 T 细胞是角膜移植后血管形成的关键介质; 而 Li 等^[8]研究表明小鼠自体角膜移植后消耗巨噬细胞可抑制 CNV, 因此抑制 T 细胞和巨噬细胞均有助于角膜移植后 CNV 的治疗。

表1 CNV 中炎性细胞及调节机制

名称	机制
巨噬细胞	吞噬碎片、降解结缔组织、募集巨噬细胞、作为血管因子主要来源
中性粒细胞	分泌 VEGF-A 及 MMP 并抑制 sVEGFR-1
T 细胞	分泌 VEGF-A、VEGF-C 等
NK 细胞	分泌趋化因子募集巨噬细胞并促进后者上调 VEGF
Th17 细胞	分泌 IL-17 等 (IL-17 促进巨噬细胞分泌 IL-1 β 及 TNF- α , 促进成纤维细胞上调 IL-6、IL-8、VEGF、NO 和前列腺素 E2 而促进 CNV)

注: VEGF: 血管内皮生长因子; MMP: 基质金属蛋白酶; sVEGFR-1: 可溶性 VEGF 受体-1; NK 细胞: 自然杀伤细胞; Th17 细胞: 辅助性 T17 细胞; IL: 白介素; TNF- α : 肿瘤坏死因子- α 。

表2 调节 VEGF 的分子及调节机制

名称	机制或种类
HIF-1	缺氧时 VEGF 的主要调节因子
MMPs	催化 ECM 中 VEGF-A 水解释放
RNA	包括 miRNA (如 miR-21、132、184、204)、LncRNA 及 circRNA
caspace-8	炎性 CNV 的关键调节因子, 激活后介导巨噬细胞产生 VEGF-A 和趋化因子
转录因子 Foxc1	增加 MMP 介导的 VEGF 生物利用度并上调 sVEGFR-1, 整体上抑制 CNV
BCL-10	刺激 VEGF-A/MAPK 途径, 促进 M1 型巨噬细胞迁移活化及分泌血管因子
信号通路	包括 NF- κ B、Wnt/ β -catenin 和 Notch 等通路
其他	bFGF、IL-6、IL-17、CXCL12 等可激活 VEGF

注: HIF-1: 缺氧诱导因子-1; ECM: 细胞外基质; NF- κ B: 核转录因子 κ B。

2 角膜细胞

早前研究已证明角膜细胞通过分泌血管因子显著影响 CNV 形成, 其中上皮细胞分泌 VEGF-A 和上皮膜蛋白 2 等, 基质细胞分泌 VEGF-A、转化生长因子- β (TGF- β) 和基质金属蛋白酶-13 (MMP-13) 等, 且损伤后角膜细胞分化为成纤维细胞, IL-1 β 等刺激后者分泌多种基质金属蛋白酶家族 (MMPs) 而调节 CNV, 但并未确定其中的关键调节因子^[5-6]。近年 Yu 等^[6]通过免疫印迹和 ELISA 等方法筛选人体 CNV 形成的关键调节因子, 发现角膜上皮细胞产生的 MMP-9、基质细胞产生的 MMP-2 和 α -晶状蛋白 A 链、内皮细胞产生的 MMP-2 和半乳糖凝集素 8, 可能是炎性 CNV 形成的关键潜在蛋白, 为靶向治疗炎性 CNV 提供理论依据。

3 血管因子

血管因子失衡是 CNV 形成的关键机制, 其中促血管因子包括 VEGF、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、MMPs、TGF- β 、IL、血小板衍生因子、血管生成素 (Ang)、NO 和肝细胞生长因子等, 抑血管因子包括色素上皮衍生因子、可溶性 VEGF 受体-1 (sVEGFR-1)、血管抑素、血小板反应蛋白 1 等^[2,9-10]。

3.1 VEGF 血管内皮生长因子家族 (VEGFs) 包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 等。既往认为 VEGF-A 是血管形成的关键调节剂, VEGF-B 血管生成活性有限甚至抗血管生成, VEGF-C 和 VEGF-D 调节淋巴管生成, 而近年研究表明 VEGF-A、VEGF-C 和 VEGF-D 均参与血管及淋巴管形成, VEGF-A 可刺激淋巴内皮增殖、促进巨噬细胞募集并释放 VEGF-C 等促淋巴管生成因子, VEGF-C 则可能通过 RhoA 诱导 CNV^[11-13]。VEGF 是 CNV 形成的关键血管因子, 正常眼存在大量 VEGF, 但由于与 sVEGFR-1 结合故活性受抑, 病理情况下 VEGF-A 结合 VEGFR 而激活下游通路 [如丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK), NO 和

PI3K-Akt/PKB 通路] 以促进 CNV^[10]。

VEGF-A 受体包括 VEGFR1 及 VEGFR2 等。多数研究认为 VEGFR1 抗血管生成, 因为 VEGFR2 酪氨酸激酶活性虽比 VEGFR1 高, 但 VEGFR1 与 VEGF-A 更亲和, 因此 VEGFR1 可能通过与 VEGFR2 竞争 VEGF-A 来防止下游启动, 而 VEGF/VEGFR2 已被证明是 CNV 形成的关键通路, 其可上调信号转导和活化转录因子 3 (STAT3) 核定位和蛋白磷酸化等途径激活 PI3K/Akt 通路, 是 VEGF 调节 CNV 的主要通路^[14-15]。然而近年越来越多研究发现 VEGFR1 在眼部病理血管形成中也起重要作用。Huang 等通过对激光诱导的脉络膜新生血管和缺氧诱导的视网膜新生血管小鼠分别或联合使用 VEGFR1 和 VEGFR2 的特异性中和抗体来阻断 VEGFR1 和/或 VEGFR2 信号转导, 发现新生血管形成过程中 VEGFR1 和 VEGFR2 表达上调, 而阻断 VEGFR1 和/或 VEGFR2 均可抑制多种眼部病理血管的形成及血管渗漏, 且联合使用 VEGFR1 和 VEGFR2 抗体的抑制效果优于单独使用一种抗体, 表明单独或同时抑制 VEGFR1 和 VEGFR2 可抑制眼部病理性血管的形成, 且联合抑制效果更佳^[16]。

VEGF 作为 CNV 形成的关键血管因子, 是抑制各种原因所致 CNV 的重要靶点, 目前多种抗 VEGF 药物疗效已得到细胞、动物和临床水平的证实, Papanthassiou 等^[17]经系统回顾和 Meta 分析发现临床贝伐单抗治疗后 CNV 明显减少, CNV 面积总体抑制 36%, 其中结膜下注射抑制 32%, 局部应用抑制 48%, 因此寻找抑制 VEGF 的靶点具有重要临床意义, VEGF 可被多种因子调控而影响 CNV (表 2)^[2-3,9-10,18-24]。近年研究发现 VEGF 和 sVEGFR-1 平衡的破坏是多种临床背景所致 CNV 的关键致病机制, 包括单纯疱疹病毒性角膜基质炎 (HSK) 和角膜移植等。Suryawanshi 等^[25]发现感染 1 型单纯疱疹病毒 (HSV) 后 VEGF-A 表达上调且 sVEGFR-1 下调, 使用抑制

sVEGFR-1分解的 MMP 抑制剂或提供外源 sVEGFR-1 后 CNV 均减少,表明临床上促进 sVEGFR-1 的形成和活性将显著抑制 HSK 患者 CNV^[26]。另有研究发现角膜移植中调节 VEGF 及 VEGFR 和补充 sVEGFR 均可抑制 CNV,推测 VEGF 与 sVEGFR 平衡破坏可能影响角膜移植后 CNV,但尚需研究验证^[27]。

3.2 MMPs MMPs 是广泛表达于人体的锌依赖性蛋白水解酶,先前研究已表明 MMP 通过双重作用调节 CNV:(1)发挥蛋白水解酶活性水解细胞外基质(ECM)而为 CNV 生长提供空间;(2)产生血管抑素和内皮抑素等抗血管生成^[28]。MMP-2 及 MMP-9 已被证明在 HSK 患者 CNV 形成中作用显著,二者是控制 HSK 相关 CNV 的重要靶点。Lee 等^[29]观察到 MMP-9 活性与 HSK 病变严重程度高度相关,MMP-9 基因敲除小鼠 CNV 生成减少、HSK 严重程度降低,且使用 MMP-9 抑制剂基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)可抑制 MMP-9 活性从而抑制 VEGF 诱导的 CNV 生成。

近年研究着力于 MMP-14,有学者发现 MMP-2 突变小鼠中 bFGF 仍可诱导 CNV,而 MMP-14 缺失小鼠 bFGF 完全抑制 CNV,表明 MMP-14 而非 MMP-2 在 CNV 的过程中起着关键作用^[1]。MMP-14 在 CNV 中的作用机制包括:(1)裂解 ECM;(2)上调血管因子如 VEGF、bFGF;(3)与细胞黏附分子如 CD44 作用;(4)降解抗血管因子如 Decorin;(5)激活 MMP-2 并结合其抑制剂;(6)结合并裂解 VEGFR1 但不结合 VEGFR2,从而促进 VEGF/VEGFR2 轴^[10]。然而最后一种作用有争议,少数学者认为裂解 VEGFR1 产生的片段可结合 VEGF 并抑制其诱导的内皮细胞有丝分裂而抑制 CNV,MMP-14 与 VEGFR1 结合对 CNV 的影响机制有待进一步研究^[9,14]。

3.3 TNF- α 生理情况下肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 在血浆中无法测出,当机体发生炎症反应或免疫应答时由炎症细胞分泌,其在 CNV 中的作用存在争议,可能取决于浓度、时间及靶细胞类型等^[30]。先前观点认为 TNF- α 抑制 CNV,有学者发现巨噬细胞表达的 TNF- α 是预防 CNV 所必需的,其可抵消血管内皮细胞 TGF- β 和 VEGF 的活性,且碱烧伤角膜 TNF- α 基因缺乏可加重眼部血管^[31]。而近年研究表明 TNF- α 通过诱导巨噬细胞募集并产生 VEGF 等促进角膜移植后 CNV 形成,Cade 等^[32]进一步对比 TNF- α 抑制剂和 IgG 同型抗体处理的碱烧伤小鼠,发现 TNF- α 抑制剂组 CNV 形成减少,因此抑制 TNF- α 有助于减轻多种临床背景 CNV。

3.4 血管生成素 血管生成素(Ang)是受体酪氨酸激酶的配体,Tie 是血管内皮细胞上的酪氨酸激酶受体,Ang/Tie 通路对正常血管分化及人体新生血管形成起关键作用,Ang-1 促进内皮增殖迁移并阻断 VEGF 诱导的内皮通透性增加,激活 Ang-1/Tie2 通路可促进 PI3K/Akt 通路而促进 CNV,而 Ang-2 通过促进血管退化参与血管重塑并拮抗 Ang-1,阻断 Ang-2/Tie2 通路可促进炎症 CNV^[33]。近年研究发现 Ang 可通过抑制角膜成纤维细胞的免疫应答来减少 CNV,但 Ang 种类有待进一步确定^[34]。

血管生成素样蛋白(angiotensin-like proteins, ANGPTLs)是与 Ang 高度同源的分泌性糖蛋白,参与调节人体脂质代谢、血管生成及炎症反应等,其中 Angptl2 通过

促进巨噬细胞浸润和 IL-1 β 的过表达驱动 CNV,而 Angptl7 通过刺激 I 型胶原蛋白合成来阻止血管发芽进入角膜而抑制 CNV^[35-36]。

4 血管因子调控通路

核转录因子 κ B(NF- κ B)、Wnt/ β -catenin 和 Notch 通路通过调节 VEGF 和 MMP 等血管因子介导 CNV 形成。

4.1 NF- κ B 通路 NF- κ B 是广泛分布于人体细胞内的核转录因子,通过调节各种靶基因参与细胞增殖、凋亡、炎症等过程,研究表明其作为 VEGF/MAPK 及 PI3K/Akt 途径的下游,可上调 VEGF 和 MMP 而促进 CNV,是 CNV 形成的关键转录因子途径,Lennikov 等发现使用 I κ B 激酶 2 选择性抑制 NF- κ B 可致缝线大鼠 CNV 形成显著减少^[37]。近年研究发现 NF- κ B 激活还导致其他促 CNV 靶基因如 IL-8、趋化因子 CXCL5、CCL2 及 HIF-1 α 等表达,而内源性配体 SLURP1 可阻断 NF- κ B 核易位以抑制其激活而抗血管生成^[18,38]。此外,Tang 等^[39]发现四甲基吡嗪处理后的碱烧伤小鼠 CXCR4、NF κ B 和核呼吸因子-1(NRF-1)表达下调,CNV 生成减少,提出 NF- κ B 促进 CNV 的新机制即刺激 NRF-1/CXCR4 通路。

4.2 Wnt/ β -catenin 通路 Wnt 是一类富含半胱氨酸的分泌性糖脂蛋白,经典 Wnt/ β -catenin 通路结合细胞表面受体和低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6(LRP5/6),激活并上调非磷酸化 β -连环蛋白(β -catenin),入核后促进下游血管因子靶基因表达,近年研究发现 Wnt/ β -catenin 通路调节靶基因包括 VEGF 和 TNF- α 等,并可调节多种 MMPs 而影响 CNV^[23]。低密度脂蛋白受体相关蛋白 6(LRP6)是 Wnt 通路的重要调控因子,Zhou 等^[40]连续 7d 每天 3 次局部施用丝氨酸蛋白酶抑制剂 SERPINA3K 后发现缝线大鼠 CNV 形成及角膜炎症显著受抑,进一步分析发现其主要是通过结合 LRP6 来阻断 Wnt/ β -catenin 通路而抑制 CNV。

4.3 Notch/Dll4 通路 Notch 通路与细胞增殖、分化、凋亡等密切相关,Dll4 是其唯一在血管内皮细胞表面表达的配体,大量研究证明 Notch/Dll4 通路在肿瘤新生血管形成中发挥重要作用,近年有学者提出 Notch/Dll4 通路可能影响 CNV,但具体机制仍待确定。Xie 等^[24]表明 VEGF 可诱导 Notch/Dll4 通路,抑制后者会负反馈增加 VEGF-A 并促进 bFGF 诱导更多 CNV。另有研究表明 Notch 通路可上调 MMP-9 和 MMP-14 并激活 MMP-2 以调节内皮细胞形态从而参与角膜细胞增殖和分化,还可调节 MMP-14 对血小板衍生因子的下调作用,推测 Notch 通路可能通过影响 MMPs 调节 CNV^[9-10]。

5 非编码 RNA

近年 CNV 发病机制中非编码 RNA 为 VEGF 外的一大研究热点,其中 MicroRNA(miRNA)及长链非编码 RNA(LncRNA)备受关注,为治疗 CNV 提供新思路。

5.1 miRNAs miRNAs 是长约 22 个核苷酸的非编码小 RNA,可在后转录水平通过抑制配对 mRNA 的翻译来调控基因表达而参与许多疾病的发生,研究发现 miRNA 通过多种机制参与 CNV 形成,据其对 CNV 的影响可分 3 类(表 3)^[19,41-44]。靶向作用于某些 miRNA 可有效缓解 CNV,其中 miR-132 及 miR-155 促进 HSK 后 CNV 已在动物模型中得到证实。Mulik 等^[45]发现眼部感染 HSV 后

表3 CNV中miRNAs及调节机制

分类	名称	机制
抑制 CNV	miR-31	靶向 PDGF-β 和 HIF-1α
	miR-150	下调 CXCR4、DLL4 和 FZD-4 而干扰 CXCL12、Notch 和 Wnt 通路
	miR-184	调节 VEGF、Wnt/β-catenin 和 Akt 通路
	miR-204	通过 Sirtuin 1 抑制角膜上皮细胞增殖迁移,并下调 VEGF/VEGF-R2
	miR-211	靶向 Prox1
	miR-342	抑制 VEGF 诱导的 Akt 信号传导
促进 CNV	其他	miR-24、miR-29、miR-329 等
	miR-21	靶向 SPRY2 而调节 HIF-1α 和 VEGF
	miR-23、miR-27	靶向 MAPK 和 VEGF-R2 途径的负调控因子 Sprouty2、Sema6A 和 Sema6D
	miR-132	促进血管内皮细胞对 VEGF/VEGFR2 的反应
	miR-155	靶向 PI3K/Akt 的负调控因子 SHIP-1
有争议	其他	miR-206 等
	其他	miR-222 等

注:PDGF-β:血小板衍生生长因子-β;Sirtuin 1:组蛋白去乙酰化酶;SPRY2:快速发育生长因子同源蛋白 2;MAPK:丝裂原活化蛋白激酶;SHIP-1:含 SH2 结构域的肌醇 5-磷酸酶 1。

表4 CNV中LncRNA及调节机制

分类	名称	机制
促进 CNV	LncRNA H19	负调节角膜上皮增殖并抑制负调节 VEGF-A 的 miR-29c
	LncRNA NEAT1	靶向 miR-1246 并诱导 NF-κB 介导的炎症因子分泌
	LncRNA NR_033585	CNV 中上调,可能充当促血管因子
抑制 CNV	LncRNA MIAT	内皮功能障碍的调节剂,其抑制可调节 miR-1246/血管紧张素转化酶
	LncRNA chr8:129102060-129 109035	CNV 中下调,可能充当抗血管因子

miR-132 上调 10~20 倍,sVEGFR-1 阻断 VEGF-A 可明显降低 HSV 感染后 miR-132 的水平,体内沉默 miR-132 的 HSV 感染小鼠 CNV 和 HSK 病变减轻。Bhela 等^[37]发现 HSV 感染可提高巨噬细胞和 CD4⁺T 细胞中 miR-155 的水平,且沉默 miR-155 的 HSK 小鼠模型 CNV 形成受抑。

5.2 LncRNA LncRNA 是生物体内长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA,主要调节细胞周期和分化等病理生理过程,近年 LncRNA 对 CNV 的作用备受关注,不同 LncRNA 在 CNV 中的作用各异(表 4)^[20,46-48]。早前研究已确定 H19 在肿瘤血管生成中的重要作用,并且其可通过结合 miR-199a 和上调 VEGFA 来促进间充质干细胞的血管生成能力^[24]。近年 Sun 等通过聚合酶链式反应(PCR)等发现 LncRNA H19 在缝合诱导的 CNV 和 bFGF 处理的脐静脉内皮细胞中过表达,其可促进人脐静脉内皮细胞的增殖、迁移和管腔形成,并且沉默或过表达 H19 可导致 CNV 中 VEGF-A 相应地减少或增加,表明 H19 与 CNV 中 VEGF-A 的表达呈正相关,提示 H19 可能通过作用于 VEGF-A 而促进 CNV^[24]。miR-29c 已被证明可通过调节 VEGF-A 抑制肿瘤血液供应,该研究小组通过生物信息学分析发现 H19 可结合 miR-29c,进一步 PCR 等实验显示人脐静脉内皮细胞中 H19 与 miR-29c 的表达呈负相关,miR-29c 在缝合诱导的 CNV 和 bFGF 处理的脐静脉内皮细胞中表达下调,且其与 VEGF-A 在 bFGF 处理的脐静脉内皮细胞中表达呈负相关,因此 H19 可能通过抑制 miR-29c 来上调 VEGF-A,从而促进 CNV,LncRNA H19/miR-29c/VEGFA 途径的调控可能是 CNV 的潜在治疗靶标。Bai 等^[47]通过酶联免疫吸附测定(ELISA)等发

现 LncRNA NEAT1 在碱烧伤大鼠 CNV 中表达上调,并通过 RNA 免疫沉淀及 PCR 等方法发现 LncRNA NEAT1 靶向 miR-1246 诱导 NF-κB 介导的炎症因子的分泌从而促进 CNV,为 CNV 的治疗提供新见解。

5.3 circRNA circRNA 是近年发现的含闭合环状结构的非编码 RNA,其可通过结合 miRNAs 来抑制后者结合 mRNA。近年发现 circRNA 可能是 CNV 的治疗新靶点,但相关研究仍匮乏,具有很大的研究潜力。既往研究表明抑制 cZNF609 可减少视网膜血管的丢失并抑制体内病理性血管生成,Wu 等^[19]通过 PCR 等发现角膜缝合大鼠术后角膜上皮 cZNF609 显著稳定上调和 miR-184 显著持续下调,而后以环状 RNA 相互作用数据库分析确定 cZNF609 可能作为 miR-184 的海绵而抑制后者的功能,进而通过 RNA 免疫沉淀分析确定 miR-184 特异性结合 cZNF609-wt 序列而非 cZNF609-mut 序列。该研究小组进一步通过蛋白质印迹分析等实验显示敲除 miR-184 后 p-Akt、β-连环蛋白和 VEGF 表达增加,过表达 miR-184 可降低 p-Akt、β-catenin 和 VEGF,并且上调 cZNF609 可逆转缝合诱导的大鼠 CNV 模型中 miR-184 介导的抑制作用,从而证明 cZNF609 结合 miR-184 上调 Akt/β-catenin/VEGF 而促进 CNV,干预此通路可作为病理性角膜新生血管治疗的潜在策略。此外 Zhou 等^[49]通过微阵列分析确定小鼠无血管角膜和血管化角膜中 229 个差异表达的 circRNA,并推测 cKifap3 可能通过影响内皮血管生成而抑制 CNV。

6 细胞外基质蛋白

ECM 在 CNV 发病机制中的研究相对较少,先前研究揭示 ECM 通过调节血管因子活性、被 MMP 降解并释放可

表 5 CNV 中 ECM 蛋白及致病机制

CNV 中表达	蛋白	机制
上调	Tenascin-C	促进细胞扩散并降低角膜刚度
	fibronectin-1	介导细胞黏附迁移、生长和分化
	Tenascin-X	上调成纤维细胞 TGF- β 1 和巨噬细胞 VEGF-A, 抑制 VEGF-B
下调	lumican	促进胶原蛋白沉积、增加角膜刚度并下调 MMPs
	collagen-VI	改变角膜生物力学
	Decorin	维持胶原组织并增加角膜刚度, 抑制内皮迁移和 FGF 与 VEGF 诱导的血管生成

注: Tenascin-C: 肌腱蛋白 C; fibronectin-1: 纤连蛋白-1; Tenascin-X: 腱生蛋白-X; lumican: 基膜聚糖; collagen-VI: 胶原蛋白-VI; Decorin: 核心蛋白多糖。

溶因子调节 CNV^[50]。近来研究发现 ECM 中蛋白通过多种机制影响 CNV 形成(表 5), 可能成为治疗的新靶点^[12,50]。

7 小结

随着研究不断发展, CNV 相关发病机制已得到一定证明, 但目前 CNV 的临床治疗包括抗 VEGF 药物等疗效仍不理想, 进一步挖掘潜在发病机制具有重要意义。近年 CNV 发病过程中细胞及因子的相关研究取得一定进展, 尤其非编码 RNA 是近年研究热点, 为 CNV 的临床治疗及科学研究提供新的思路。由于不同疾病所致 CNV 的发病机制不完全相同, 未来探索不同疾病所致 CNV 的主要致病机制是研究 CNV 发病机制的重要方向, 有助于针对不同眼部损伤形成的 CNV 采取对应的靶向治疗手段以提高治疗效果。

参考文献

- 1 Sharif Z, Sharif W. Corneal neovascularization; updates on pathophysiology, investigations & management. *Rom J Ophthalmol* 2019; 63(1):15-22
- 2 Abdelfattah NS, Amgad M, Zayed AA. Host immune cellular reactions in corneal neovascularization. *Int J Ophthalmol* 2016;9(4):625-633
- 3 Liu G, Lu P, Chen L, et al. B-cell leukemia/lymphoma 10 promotes angiogenesis in an experimental corneal neovascularization model. *Eye (Lond)* 2018;32(7):1220-1231
- 4 Di Zazzo A, Tahvildari M, Subbarayal B, et al. Proangiogenic Function of T Cells in Corneal Transplantation. *Transplantation* 2017; 101(4):778-785
- 5 Dong MC, Yang LL, Qu ML, et al. Autocrine IL-1 β mediates the promotion of corneal neovascularization by senescent fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2018;315(5):C734-C743
- 6 Yu HY, Sun LY, Cui J, et al. Three kinds of corneal host cells contribute differently to corneal neovascularization. *EBioMedicine* 2019; 44:542-553
- 7 Lu PR, Li LB, Liu GQ, et al. Opposite roles of CCR2 and CX3CR1 macrophages in alkali-induced corneal neovascularization. *Cornea* 2009; 28(5):562-569
- 8 Li SX, Li B, Jiang HR, et al. Macrophage depletion impairs corneal wound healing after autologous transplantation in mice. *PLoS One* 2013;8(4):e61799
- 9 Chang JH, Huang YH, Cunningham CM, et al. Matrix metalloproteinase 14 modulates signal transduction and angiogenesis in the cornea. *Surv Ophthalmol* 2016;61(4):478-497
- 10 Zhang JH, Wang SR, He YX, et al. Regulation of matrix metalloproteinases 2 and 9 in corneal neovascularization. *Chem Biol Drug Des* 2020;95(5):485-492
- 11 Wang G, Li N, Lv X, et al. Triptolide suppresses alkali burn-induced corneal angiogenesis along with a downregulation of VEGFA and

VEGFC expression. *Anat Rec* 2017;300(7):1348-1355

12 Sumioka T, Iwanishi H, Okada Y, et al. Loss of tenascin X gene function impairs injury-induced stromal angiogenesis in mouse corneas. *J Cell Mol Med* 2018;22(2):948-956

13 Du HT, Liu P. Matrix metalloproteinase 14 participates in corneal lymphangiogenesis through the VEGF-C/VEGFR-3 signaling pathway. *Exp Ther Med* 2016;12(4):2120-2128

14 Han KY, Dugas-Ford J, Lee H, et al. MMP14 cleavage of VEGFR1 in the cornea leads to a VEGF-trap antiangiogenic effect. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(9):5450

15 Shen M, Zhou xue-zhi, Ye L, et al. Xanthatin inhibits corneal neovascularization by inhibiting the VEGFR2-mediated STAT3/PI3K/Akt signaling pathway. *Int J Mol Med* 2018;42(2):769-778

16 Huang H, Shen J, Vinore SA. Blockade of VEGFR1 and 2 suppresses pathological angiogenesis and vascular leakage in the eye. *PLoS One* 2011;6(6):e21411

17 Papatthanassiou M, Theodoropoulou S, Analitis A, et al. Vascular endothelial growth factor inhibitors for treatment of corneal neovascularization. *Cornea* 2013;32(4):435-444

18 Lennikov A, Mirabelli P, Mukwaya A, et al. Selective IKK₂ inhibitor IMD0354 disrupts NF- κ B signaling to suppress corneal inflammation and angiogenesis. *Angiogenesis* 2018;21(2):267-285

19 Wu PC, Zhang DY, Geng YY, et al. Circular RNA-ZNF609 regulates corneal neovascularization by acting as a sponge of miR-184. *Exp Eye Res* 2020;192:107937

20 Sun BQ, Ding YH, Jin X, et al. Long non-coding RNA H19 promotes corneal neovascularization by targeting microRNA-29c. *Biosci Rep* 2019;39(5):BSR20182394

21 Tian YZ, Li H, Liu XX, et al. Pharmacological inhibition of caspase-8 suppresses inflammation-induced angiogenesis in the cornea. *Biomolecules* 2020;10(2):210

22 Koo HY, Kume T. FoxC1-dependent regulation of vascular endothelial growth factor signaling in corneal avascularity. *Trends Cardiovasc Med* 2013;23(1):1-4

23 Qiu FF, Shin Y, Chen DY, et al. Anti-angiogenic effect of a humanized antibody blocking the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Microvasc Res* 2018;119:29-37

24 Xie F, Zhang X, Luo WT, et al. Notch signaling pathway is involved in bFGF-induced corneal lymphangiogenesis and hemangiogenesis. *J Ophthalmol* 2019;2019:1-13

25 Suryawanshi A, Mulik S, Sharma S, et al. Ocular neovascularization caused by Herpes simplex virus type 1 infection results from breakdown of binding between vascular endothelial growth factor A and its soluble receptor. *J Immunol* 2011;186(6):3653-3665

26 Koujah L, Suryawanshi RK, Shukla D. Pathological processes activated by Herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection in the cornea. *Cell Mol Life Sci* 2019;76(3):405-419

27 Zhong W, Montana M, Santosa SM, et al. Angiogenesis and

lymphangiogenesis in corneal transplantation—A review. *Surv Ophthalmol* 2018;63(4):453-479

28 Riedl JC, Wasilica - Poslednik J, Weyer - Elberich V, et al. Visualization of corneal vascularization in peripheral hypertrophic subepithelial corneal opacification with OCT angiography. *Acta Ophthalmol* 2018;96(8):e974-e978

29 Lee S, Zheng M, Kim B, et al. Role of matrix metalloproteinase-9 in angiogenesis caused by ocular infection with Herpes simplex virus. *J Clin Invest* 2002;110(8):1105-1111

30 Lu PR, Li LB, Liu GQ, et al. Critical role of TNF- α -induced macrophage VEGF and iNOS production in the experimental corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(7):3516

31 Ferrari G, Bignami F, Rama P. Tumor necrosis factor- α inhibitors as a treatment of corneal hemangiogenesis and lymphangiogenesis. *Eye Contact Lens; Sci Clin Pract* 2015;41(2):72-76

32 Cade F, Paschalis EI, Regatieri CV, et al. Alkali burn to the eye. *Cornea* 2014;33(4):382-389

33 Ha JM, Jin SY, Lee HS, et al. Vascular leakage caused by loss of Akt1 is associated with impaired mural cell coverage. *FEBS Open Bio* 2019;9(4):801-813

34 Lee SH, Kim KW, Joo K, et al. Angiogenin ameliorates corneal opacity and neovascularization via regulating immune response in corneal fibroblasts. *BMC Ophthalmol* 2016;16(1):1-13

35 Toyono T, Usui T, Yokoo S, et al. Angiopoietin-like 7 is an anti-angiogenic protein required to prevent vascularization of the cornea. *PLoS One* 2015;10(1):e0116838

36 Toyono T, Usui T, Yokoo S, et al. Angiopoietin-like protein 2 is a potent hemangiogenic and lymphangiogenic factor in corneal inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(6):4278

37 Bhela S, Mulik S, Gimenez F, et al. Role of miR-155 in the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *Am J Pathol* 2015;185(4):1073-1084

38 Swamynathan S, Loughner CL, Swamynathan SK. Inhibition of HUVEC tube formation via suppression of NF κ B suggests an anti-angiogenic role for SLURP1 in the transparent cornea. *Exp Eye Res* 2017;164:118-128

39 Tang MJ, Yang Y, Yu JZ, et al. Tetramethylpyrazine in a murine alkali-burn model blocks NF κ B/NRF-1/CXCR4-signaling-induced corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59(5):2133

40 Zhou T, Chen LL, Huang CH, et al. Serine proteinase inhibitor SERPINA3K suppresses corneal neovascularization via inhibiting wnt signaling and VEGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(8):4863

41 Giménez F, Suryawanshi A, Rouse BT. Pathogenesis of Herpes stromal keratitis—a focus on corneal neovascularization. *Prog Retin Eye Res* 2013;33:1-9

42 Zhang Y, Cai SW, Jia YR, et al. Decoding noncoding RNAs: role of MicroRNAs and long noncoding RNAs in ocular neovascularization. *Theranostics* 2017;7(12):3155-3167

43 Pan J, Wang XL, Li DQ, et al. MSCs inhibits the angiogenesis of HUVECs through the miR-211/Prox1 pathway. *J Biochem* 2019;166(1):107-113

44 Zhang Y, Yuan FK, Liu L, et al. The role of the miR-21/SPRY2 axis in modulating proangiogenic factors, epithelial phenotypes, and wound healing in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019;60(12):3854

45 Mulik S, Xu J, Reddy PBJ, et al. Role of miR-132 in angiogenesis after ocular infection with Herpes simplex virus. *Am J Pathol* 2012;181(2):525-534

46 Bai YH, Wang WQ, Zhang YM, et al. LncRNA MIAT suppression alleviates corneal angiogenesis through regulating miR-1246/ACE. *Cell Cycle* 2019;18(6-7):661-669

47 Bai YH, Lv Y, Wang WQ, et al. LncRNA NEAT1 promotes inflammatory response and induces corneal neovascularization. *J Mol Endocrinol* 2018;61(4):231-239

48 Cissé Y. LncRNAs in ocular neovascularizations. *Int J Ophthalmol* 2019;12(12):1959-1965

49 Zhou YF, Shi LJ, Yao J, et al. Microarray analysis of circRNA expression pattern in corneal neovascularization. *Cornea* 2019;38(11):1443-1449

50 Barbariga M, Vallone F, Mosca E, et al. The role of extracellular matrix in mouse and human corneal neovascularization. *Sci Rep* 2019;9(1):1-12