

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

汤明芳, 于 健, 白 浪, 刘 琼

基金项目: 国家自然科学基金青年资助项目(No. 30901650); 中国广东省自然科学基金资助项目(No. 10451051501005773)

作者单位: (510515) 中国广东省广州市, 南方医科大学南方医院眼科

作者简介: 汤明芳, 女, 博士, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 眼表疾病、屈光手术。

通讯作者: 汤明芳. tmf1901@163. com

收稿日期: 2011-07-19 修回日期: 2011-08-29

Experimental study of inhibition of corneal neovascularization by adeno-associated virus mediated encoding endostatin gene transfection

Ming-Fang Tang, Jian Yu, Lang Bai, Qiong Liu

Foundation items: Youth Project of National Natural Science Foundation(No. 30901650); Guangdong Natural Foundation, China (No. 10451051501005773)

Department of Ophthalmology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Correspondence to: Ming-Fang Tang, Department of Ophthalmology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. tmf1901@163. com

Received: 2011-07-19 Accepted: 2011-08-29

Abstract

• **AIM:** To evaluate the effect of adeno-associated virus (rAAV) mediated encoding endostatin (ES) gene transfection for inhibiting experimental corneal neovascularization (CNV) .

• **METHODS:** Sixty healthy SD rats were sutured on the superior cornea. Animals were randomly divided into 4 groups (A, B, C, D). 50 μ L of rAAV-ES solution was injected into subconjunctiva immediately after sutured in the group A. After scraping off epithelium, the cornea was soaked in the rAAV-ES solution for 10 minutes in the group B. After scraping off epithelium, the cornea was soaked in the rAAV-ES solution for 10 minutes and 50 μ L of rAAV-ES solution was injected into subconjunctiva in the group C. 50 μ L of saline was injected into subconjunctiva in the group D. Eyes were examined by a slit-lamp biomicroscope and a surgical microscope was used to monitor angiogenesis in response to rAAV-ES transduction. The size of CNV area was measured and calculated. The ES gene expression in inflammatory cornea of rats was

detected by immunohistochemistry after transduction with rAAV-ES. The sections were stained with hematoxylin and eosin to measure the CNV density.

• **RESULTS:** The occurrence and development of CNV were observed by slit-lamp microscope after transduction with rAAV-ES. After suturing, CNV increased gradually, peaked on day 14, and decreased gradually, degenerated on day 21 after suture induction. Analysis of variance of repeated data showed that there was crossover effect of time and treatment factors ($F = 175.810, P < 0.01$). At each transduced group, there was a significant difference between any two groups ($F = 2243.816, P < 0.01$). The size of CNV areas of group C was significantly smaller than that of the group A, B and D at each time point. Accordingly, the size of CNV areas of group D was the largest, but the size of CNV areas of group C was the smallest after transduction with rAAV-ES. At each time point, there was a significant difference between any two groups ($F = 1060.854, P < 0.01$). Inhibition ratio of CNV was increased gradually after transduction, and the highest inhibition ratio of CNV was detected in group C on day 28 after suture induction. CNV density was lower in transduced group than in control group. The ES gene expression in inflammatory cornea of rats was detected by immunohistochemistry after transduction with rAAV-ES. Only corneal epithelium was stained brown in group A, some of corneal epithelium and NV endothelial cells in superficial stroma of cornea were stained brown in group B, and most of corneal epithelium and NV endothelial cells in superficial stroma of cornea were stained brown in group C, but corneal cells were not stained at all in group D. The sections were stained with hematoxylin and eosin to measure the CNV density. CNV density was lower in transduced group than in control group.

• **CONCLUSION:** There was a significant inhibitory effect on neovascularization in rat inflammatory CNV model after rAAV-ES transduction. The inhibitory effect on CNV was higher by use of combined delivery approaches than by use of either one, i. e. the cornea was soaked in the rAAV-ES solution after scraping off epithelia or the rAAV-ES viral particles were injected into subconjunctiva.

• **KEYWORDS:** endostatin; adeno-associated virus; gene therapy; cornea; neovascularization

Tang MF, Yu J, Bai L, *et al.* Experimental study of inhibition of corneal neovascularization by adeno-associated virus mediated encoding endostatin gene transfection. *Guji Yanke Zazhi*(*Int J Ophthalmol*) 2011;11(10):1695-1699

摘要

目的:探讨以重组腺相关病毒(rAAV)介导内皮抑素(ES)基因转移对大鼠角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)的抑制作用。

方法:选取 SPF 级 SD 大鼠 60 只,角膜缝线法制作 CNV 模型,随机分为 A、B、C 和 D 共 4 组。A 组:缝线后立即于上方近角膜缘处结膜下注射 50 μ L 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 10min;C 组:缝线后用 rAAV-ES 转染液浸泡去上皮角膜 10min 后,同样部位结膜下注射 50 μ L rAAV-ES 转染液;D 组:对照组,同样部位结膜下注射 50 μ L 生理盐水。在裂隙灯显微镜下观察各组 CNV 的生长情况,并计算其面积;免疫组织化学法观察 ES 基因表达情况;病理切片检测 CNV 密度;观察 ES 基因转移对 CNV 的抑制作用。

结果:裂隙灯显微镜下观察各组大鼠缝线后 CNV 逐渐生长,14d 达高峰,其后逐渐减少;21d 后变性。定量数据重复测量的方差分析显示:时间因素与治疗因素之间存在交互效应($F = 175.810, P < 0.01$)。缝线诱导后不同转染组间 CNV 面积亦有显著性差异($F = 2243.816, P < 0.01$);其中以 D 组 CNV 面积最大;C 组 CNV 面积最小。不同时间段 CNV 生长面积之间差异显著($F = 1060.854, P < 0.01$);对 CNV 增生的抑制率随着转染时间的延长而增加,C 组在缝线后 28d,对 CNV 增殖的抑制率高达 58.25%。免疫组织化学检测显示:A 组于上方角膜缘结膜和角膜上皮中可见 ES 染色阳性;B 组在浅基质 CNV 的内皮细胞中发现少量 ES 染色阳性;C 组角膜上皮及浅基质 CNV 的内皮细胞中可见较为明显的 ES 染色阳性;D 组角膜细胞均为 ES 染色阴性。角膜切片结果显示:CNV 密度在各转染组均比对照组稀疏。

结论:rAAV-ES 转基因可明显抑制缝线诱导的大鼠 CNV 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 CNV 增生,联合转染途径对缝线诱导 CNV 增生的抑制效果更好。

关键词:内皮抑素;重组腺相关病毒;基因治疗;角膜;新生血管

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.10.003

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.国际眼科杂志 2011;11(10):1695-1699

0 引言

角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)与感染、外伤、角膜移植以及配戴角膜接触镜等因素有关,因其出血、渗出、继发纤维化等改变可致角膜丧失透明性,引起视力下降甚至失明;同时破坏了角膜的相对免疫赦免状态,增加了角膜移植排斥反应的发生率。因此,如何有效地抑制 CNV 的形成和生长,一直是角膜病研究的热点。内皮抑素(endostatin, ES)是作用最强的血管抑制因子之一,对多种起源的新生血管内皮细胞增生有抑制作用,而不影响静止的血管内皮细胞或非内皮细胞起源的

细胞^[1]。本研究将采用重组腺相关病毒(rAAV)介导 ES 基因转移,观察其对 CNV 增生的影响,探讨转 ES 基因抑制 CNV 增生的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料 rAAV-ES 病毒颗粒滴度为 2×10^{15} vg (vector genomes)/L (由北京五加和分子医学研究所包装、纯化);免疫组织化学超敏试剂盒(福建迈新生物技术开发有限公司);小鼠抗人内皮抑素单克隆抗体(ES 抗体,美国 R&D 公司)。SD 大鼠(南方医科大学动物实验中心)。

1.2 方法

1.2.1 缝线诱导大鼠 CNV 模型的建立 选取 SPF 级 SD 大鼠 60 只,任选一眼制作模型。100mL/L 水合氯醛 ip 麻醉(3mL/kg)后,5mL/L 托吡卡胺散瞳,10mL/L 地卡因滴眼液表面麻醉后,冲洗结膜囊,消毒眼周,在手术显微镜下刮去角膜上皮层,用 10-0 尼龙缝线,铲针穿过角膜基质层间断缝合 3 针(分别在 11:00,12:00,1:00 位置),从距离角膜缘 1.5mm(圆规定位)处向瞳孔中心方向进针。采用缝线法建立大鼠 CNV 动物模型。

1.2.2 rAAV-ES 体内转染 角膜基质层缝线法制作大鼠炎症性 CNV 模型后,随机分为 A、B、C、和 D 共 4 组。A 组:缝线后立即于上方近角膜缘处结膜下注射 50 μ L rAAV-ES 转染液(病毒颗粒滴度为 2×10^{15} vg/mL);B 组:缝线后刮除角膜上皮,用 3.5mm 的角膜环钻固定在角膜上,将 rAAV-ES 转染液(病毒颗粒滴度为 2×10^{15} vg/L)滴入其中,使角膜完全浸没 10min;C 组:同 B 组滴入转染液使去上皮的角膜完全浸没 10min 后,同样部位结膜下注射 50 μ L rAAV-ES 转染液;D 组:对照组,同样部位结膜下注射 50 μ L 生理盐水。

1.2.3 角膜新生血管的定量分析 分别在缝线后第 4,7,14,21,28d,在裂隙灯显微镜下观察,记录各组大鼠 CNV 长出的时间、检测从角巩膜缘长出的新生血管的长度和数量,并照相。测量时,以连续弯曲度小、临近缝线朝向角膜中央生长的最长血管为准,依据计算面积公式: $S = C/12 \times 3.1416 \times [r^2 - (r-l)^2]$ 其中 C 代表新生血管累及角膜的圆周钟点数,l 代表新生血管从角巩膜缘伸入角膜的长度,r 代表角膜半径。大鼠角膜半径约 3mm。以裂隙灯显微镜观察并计算 CNV 面积。

1.2.4 大鼠眼表组织中 ES 表达的检测 分别在缝线后 4,7,14,21 和 28d 在裂隙灯显微镜下观察各组 CNV 的生长情况;过量麻醉处死大鼠摘取眼球,固定后石蜡包埋切片;其中一半用于免疫组织化学,另一半行 HE 染色。免疫组织化学按照试剂盒说明书操作。石蜡切片常规脱蜡、水化,微波修复,30mL/L H₂O₂ 液室温孵育 10min 以阻断内源性过氧化氢酶活性,PBS 冲洗,加入 ES 抗体(工作浓度为 1:400),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 冲洗,加入聚合物增强剂,室温孵育 20min,PBS 冲洗,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠聚合物(二抗),室温孵育 30min,PBS 冲洗后,DAB 显色,苏木精复染,1mL/L 盐酸分化,PBS 冲洗返蓝,常规脱水透明,中性树脂封固。免疫组织化学检测角膜缘及角膜组织中 ES 基因的表达;HE 染色角膜切片来观察 rAAV-ES 对 CNV 增生密度的影响。

统计学分析:实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计分析。缝线诱导后不同时间及不同治疗后 CNV 生长面积的比较采用定量数据重复测量的方差分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 缝线后 CNV 的生长过程 裂隙灯显微镜及外科手术显微镜下观察:角膜缝线后 4d 可见从角膜缘伸入角膜的毛刷状小血管、垂直角膜缘切线方向,角膜缝线处水肿;随后角膜水肿继续加重,7d 新生血管延伸接近或到达缝线位置;14d 后新生血管延伸到达或超过缝线位置;分支较密集并互相吻合形成网状血管网,新生血管增生达高峰;21d 后生长速度变慢,血管渐稀疏,逐渐退化;28d 时部分闭锁。治疗 A 组(图 1A)缝线后 CNV 分支均较对照组(图 1B)稀疏,并且生长范围多数不超过 50% 圆周。

2.2 不同时间 CNV 增生面积的情况 缝线后 7, 14, 21, 28d, 各治疗组缝线诱导后不同时间对 CNV 增生面积的影响见图 2。各组大鼠缝线诱导后 CNV 面积逐渐增加,14d 达高峰,其后逐渐减少。定量数据重复测量的方差分析显示:时间因素与治疗因素之间存在交互效应($F = 175.810, P < 0.01$)。缝线诱导后不同转染组间 CNV 增生面积有显著性差异($F = 2243.816, P < 0.01$);缝线诱导后不同时间点各组 CNV 增生面积之间有显著性差异($F = 1060.854, P < 0.01$)。在各时间点不同治疗组间两两比较有显著性差异($F_A = 231.684, F_B = 314.577, F_C = 357.866, F_D = 796.322$, 均 $P < 0.01$)。在各时间点不同治疗组内两两比较也均有显著性差异($P < 0.05$)。其中以 D 组(对照组)缝线后 CNV 增生面积最大, C 组缝线后 CNV 增生面积最小。不同时间点各组间比较有显著性差异($F_{7d} = 123.364, F_{14d} = 579.691, F_{21d} = 1242.931, F_{28d} = 934.065$, 均 $P < 0.01$);另外,7, 14, 21 和 28d 各时间段各组内两两比较也均有显著性差异($P < 0.05$)。各组缝线后 7d, CNV 增生面积抑制率分别为: A 组 27.56%, B 组 22.76%, C 组 48.25%。缝线后 14d, CNV 增生面积抑制率分别为: A 组 34.64%, B 组 28.03%, C 组 50.36%。缝线后 21d, CNV 增生面积抑制率分别为: A 组 38.53%, B 组 35.28%, C 组 53.66%。缝线后 28d, CNV 生长面积抑制率分别为: A 组 45.93%, B 组 39.59%, C 组 58.25%。结果显示:各治疗组 CNV 增生面积抑制率随着时间的延长而增加;各时间段 C 组 CNV 增生面积抑制率最高, B 组 CNV 增生面积抑制率最低;其中 C 组在缝线后 28d, 对 CNV 增殖的抑制率高达 58.25%。CNV 密度在转染组比对照组稀疏。这些结果提示, rAAV-ES 转染对 CNV 增生的抑制率随着转染时间的延长而增加, 可明显抑制炎症大鼠 CNV 的增生。采用单独结膜下注射转染液或转染液局部浸泡去上皮角膜的转染途径转染能抑制缝线诱导的 CNV 增生, 联合转染途径对缝线诱导 CNV 增生的抑制效果更好。

2.3 ES 基因表达的检测结果 免疫组织化学检测: A 组于各观察时相均可在上方角膜缘结膜组织和角膜上皮中发现 ES 阳性表达(图 3A, B); B 组于各观察时相均可在中央角膜上皮及浅基质 CNV 的内皮细胞中发现 ES 阳性

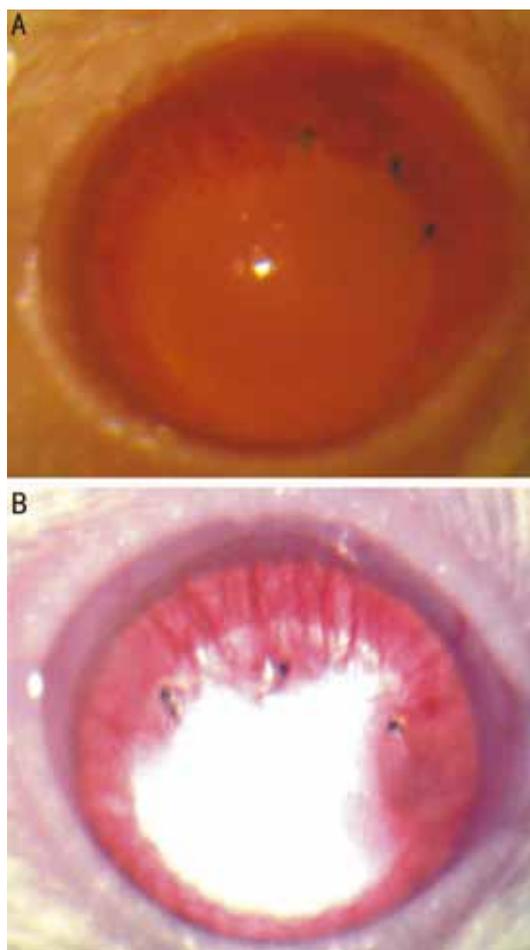


图 1 缝线后 7d CNV 增生情况 A: 治疗 A 组; B: 对照组。

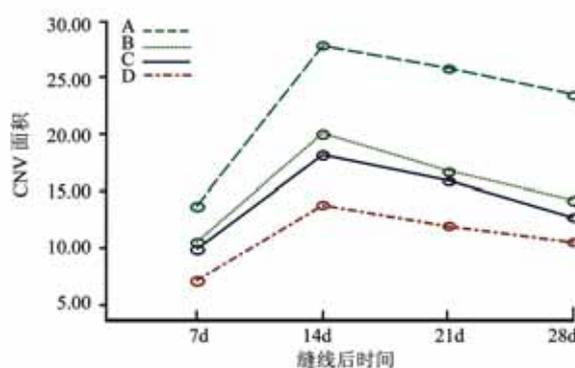


图 2 时间因素与治疗因素对 CNV 面积的交互效应轮廓图。

表达(图 3C); C 组在角膜上皮及浅基质新生血管的内皮细胞中也发现 ES 阳性表达(图 3D); 其中以 C 组在角膜上皮及浅基质中 ES 阳性表达最为明显, 范围较广; 各组均于转染 7d 时 ES 阳性表达最为明显, 14d 时阳性细胞开始减少, 28d 时只偶见阳性表达; D 组各时相角膜及角膜缘组织均未发现 ES 阳性表达。

2.4 CNV 增生密度的检测 角膜切片 HE 染色结果显示: 在治疗组(A, B, C 组)角膜切片可见角膜上皮层水肿增厚、浅层基质内少量新生血管、管腔较小, 新生血管周围有少量炎性细胞浸润(图 4A, B, C)。在对照组可见角膜上皮层水肿增厚、浅层基质内密集大量新生血管、管腔大小不等, 新生血管周围有大量分叶核等炎性细胞浸润(图 4D)。结果显示: CNV 增生密度在各转染组均比对照组稀疏。

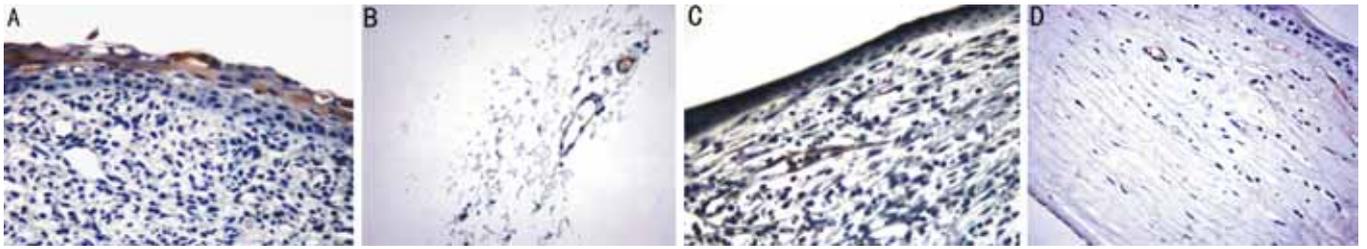


图3 角膜缘及角膜组织中 ES 基因的表达 A:A 组角膜上皮(×400);B:A 组结膜组织(×200);C:B 组角膜上皮细胞及浅基质(×400);D:C 组角膜上皮细胞及浅基质(×400)。

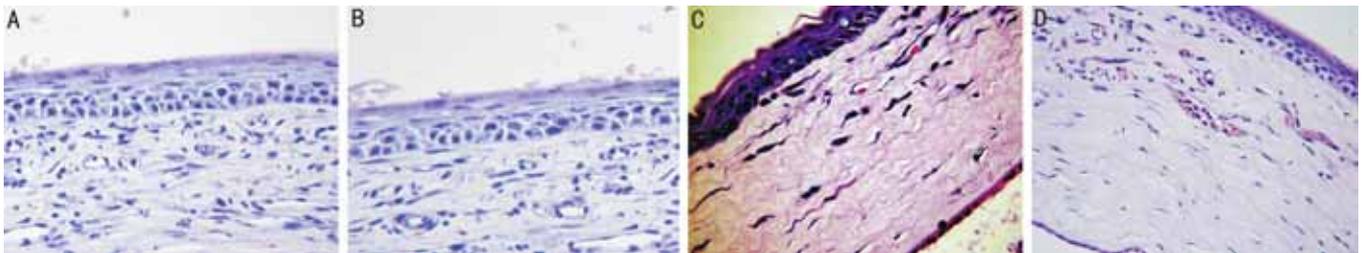


图4 大鼠 CNV 密度的变化(HE×200) A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组。

3 讨论

在眼部, Maättä 等^[2]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中均有表达,并且在泪液、房水、玻璃体液中检出 ES 片段,ES 在眼组织内的定位可能与保持眼组织的无血管状态有关。Lin 等^[3]报道 ES 在正常人角膜组织中表达,参与维持正常角膜无血管状态。角膜伤口愈合过程中可检测到 ES 的产生^[4],近年来研究证实,ES 可能主要通过以下几种机制发挥其抑制内皮细胞增生抗血管生成的生物学功能:(1)直接抑制内皮细胞增生。Reis 等^[5]证实,利用酵母细胞表达产生的小鼠 ES 可以抑制 bFGF 诱导的小牛肺动脉内皮细胞(C-PAE)增生,且抑制程度随剂量的递增而加强。(2)可直接促进内皮细胞凋亡。研究发现,用 ES 处理内皮细胞,能激活细胞内酪氨酸蛋白酶途径,使 PKB 通路受阻,这样胞内抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-XL,表达减少,而促凋亡蛋白 Bax 表达水平不变,最终通过活化 caspase-8 通路,引起凋亡的发生^[6]。(3)可发挥抑制内皮细胞及巨噬细胞迁移的作用,抑制新生血管的生成^[7]。(4)对细胞周期的影响,Hanai 的实验表明,细胞周期素 D1 (cyclinD1) 和 β -catenin 是 ES 作用的靶点,ES 在过表达

β -catenin 的内皮细胞中下调 cyclinD1 的启动子,并抑制其活性^[8];我们前期研究^[9]用重组腺相关病毒将 ES 基因转导至 ECV304 细胞,感染后 ECV304 细胞稳定表达并持续分泌 ES 蛋白,达到较高的有效浓度 96.93 μ g/L;而且表达产物 ES 蛋白使处于 S 期的细胞数量明显减少,而停滞在 G₀ 和 G₁ 期的细胞则显著增加,有效地抑制了 ECV304 增殖,抑制率达 54.54% \pm 1.37%。Dixelius 等^[10]实验显示 ES 能减少内皮细胞在 S 期的比例,并在生长被抑制的内皮细胞中促进管腔的形成,此外,还对相关基因有影响,ES 能下调处于生长的内皮细胞的许多基因或其产物,包括即早基因 (c-fos、c-myc 和 max)、细胞周期相关基因

cdc25B、调控凋亡相关基因 (Bcl-2、Bcl-XL 和 bad)、有丝分裂原激活蛋白激酶 (MAPK-1、MAPK-2)、灶性黏附激酶 (FAK)、G 蛋白耦联介导内皮生长的受体、致有丝分裂因子、黏附分子整合素-5、整合素-3 和 E-钙连接素以及细胞结构组分、微管蛋白^[11]。ES 还通过促进 β -catenin 的降解,损害 Wnt 通路信号传导,影响下游调控基因的表达^[12]。

近年来,虽然有关 ES 用于 CNV 的治疗研究尚不多,但已经取得了一些令人鼓舞的成绩。关于 ES 基因治疗 CNV,Zhang 等^[13]将脂质体包裹的质粒 pBlast-hEndostatin 30.8 μ g 结膜下注射,对照组用 pBlast-Mcs 30.8 μ g 结膜下注射,术后对 CNV 面积的抑制率达 43%;对 CNV 密度、长度和角膜炎症细胞没有明显抑制作用;CNV 面积与角膜水肿、混浊呈正相关。Murthy 等^[14]用包含 ES 与 K1-5 融合基因的质粒载体 pHR-CMV-IRES-eGFP 对动物模型进行结膜下注射,可明显抑制兔 CNV 的生长。Pan 等^[15]用重组 AdhENDO-VEG1151 结膜下注射观察,发现治疗组与对照组相比出现了明显的 CNV 抑制,在角膜切片中也发现了内皮和上皮中都有融合基因的高表达。牛晓光等^[16]研究表明,通过结膜下注射途径将阳离子脂质体介导的 ES 基因转移至角膜缘和角膜组织,能在一定程度上抑制兔 CNV 的生长。本实验免疫组织化学结果显示:结膜下注射组(A 组)转染后均可在上方角膜缘结膜和角膜上皮中发现 ES 阳性表达;局部浸润角膜组(B 组)转染后可在中央角膜上皮及浅基质的 CNV 内皮细胞中发现 ES 阳性表达;联合转染组(C 组)于角膜上皮及浅基质 CNV 内皮细胞中发现范围较广泛的 ES 阳性表达,而且以转染后 7d ES 阳性表达最为明显。rAAV-ES 转染对 CNV 增生的抑制率随着转染时间的延长而增加,可明显抑制炎症大鼠 CNV 的增生。采用单独结膜下注射转染液或转染液局部浸泡去上皮角膜的转染途径转染能抑制缝线诱导的 CNV 增生,联合转染途径对缝线诱导 CNV 增生的抑制效果更好。联合治疗组在缝线后 28d,对 CNV 生长面积的抑制率高达到 58.25%。ES 能在较大程度上抑制 CNV 的增生,表现为 CNV 面积减少,CNV 增生密度变稀疏,但不能完全

抑制其生长。其原因可能是由于本实验用的是人 ES, 而 Saarela 等^[17] 研究发现: 人 ES 基因与小鼠 ES 基因只有 80% 同源性。因此, 可能由于种族间的差异使得治疗效果不是很理想。

综上所述, ES 可能作为 CNV 较强的抑制剂而应用于临床。结合 CNV 的发病机制和目前已知的 ES 作用机制, 今后的研究中需要进一步探讨合适的给药方式和途径, 筛选更高效基因表达系统, 从而提高转染效率及安全性等, 为最终用于临床基因治疗打下坚实的基础。

参考文献

- 1 Gebhardt BM, Shi W. Experimental corneal allograft rejection. *Immunol Res* 2002;25(1):1-26
- 2 Määttä 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. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245(1):74-81
- 3 Lin HC, Chang JH, Jain S, et al. Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(11):2517-2524
- 4 Kato T, Chang JH, Azar DT. Expression of type XVIII collagen during healing of corneal incisions and keratectomy wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(1):78-85
- 5 Reis RC, Schuppan D, Barreto AC, et al. Endostatin competes with bFGF for binding to heparin-like glycosaminoglycans. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333(3):976-983
- 6 Skovseth DK, Venger MJT, Sorensen DR, et al. Endostatin dramatically inhibits endostatin-induced apoptosis in HUVECs. *J Biochem Mol Biol* 2006;39(1):97-104
- 7 Gazvani R, Templeton A. New considerations for the pathogenesis of

- endometriosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;76(2):117-126
- 8 Hanai 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
- 9 汤明芳, 于健, 钟彦彦, 等. 携带人内皮抑素基因的重组腺相关病毒感染对人脐静脉内皮细胞增生的影响. *眼科新进展* 2010;30(6):522-525, 550
- 10 Dixelius J, Larsson H, Sasaki T, et al. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood* 2000;95(11):3403-3411
- 11 Shichiri M, Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin. *FASEB J* 2001;15(6):1044-1053
- 12 Hanai J, Gloy J, Karumanchi SA, et al. Endostatin is a potential inhibitor of Wnt signaling. *J Cell Biol* 2002;158(3):529-539
- 13 Zhang P, Wu DZ, Ge J, et al. Experimental inhibition of corneal neovascularization by endostatin gene transfection *in vivo*. *Chin Med* 2003;116(12):1869-1874
- 14 Murthy RC, McFarland TJ, Yoken J, et al. Corneal transduction to inhibit angiogenesis and graft failure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(5):1837-1842
- 15 Pan X, Wang Y, Zhang M, et al. Effects of endostatin vascular endothelial growth inhibitor chimeric recombinant adenoviruses on antiangiogenesis. *World Gastroenterol* 2004;10(10):1409-1414
- 16 牛晓光, 王伟, 史伟云, 等. 脂质体介导内皮抑素基因转移抑制兔角膜新生血管的研究. *中华眼科杂志* 2005;41(3):260-264
- 17 Saarela J, Ylikarppa R, Rehn M. Complete primary structure of two variant forms of human type XVIII collagen and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts. *Matrix Biol* 1998;16(6):319-328