

胎盘生长因子在新生血管性眼病中的研究进展

周 骏¹, 刘 涛²

作者单位:¹(710000) 中国陕西省西安市, 西安医学院;

²(723000) 中国陕西省汉中市, 三二〇一医院眼科

作者简介:周骏, 在读硕士研究生, 研究方向:眼底病。

通讯作者:刘涛, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 三二〇一医院副院长, 研究方向:眼底病. taoliustone@163.com

收稿日期:2016-06-22 修回日期:2016-09-23

Progress in placental growth factor in ocular neovascular disease

Jun Zhou¹, Tao Liu²

¹Xi'an Medical University, Xi'an 710000, Shaanxi Province, China; ²Department of Ophthalmology, San Er Ling Yi Hospital, Hanzhong 723000, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Tao Liu. Department of Ophthalmology, San Er Ling Yi Hospital, Hanzhong 723000, Shaanxi Province, China. taoliustone@163.com

Received:2016-06-22 Accepted:2016-09-23

Abstract

• Neovascularization is the main cause of blindness, such as diabetic retinopathy, retinopathy of prematurity and age - related macular degeneration. Vascular endothelial growth factor(VEGF) plays an important role in the formation of angiogenesis, and is considered to be the most potent angiogenic growth factor. Placental Growth Factor(PIGF) is one of the VEGF family, which play a crucial role in endothelial cell proliferation and migration, angiogenesis, and immune - mediated inflammation. Meanwhile, PIGF is specifically expressed in pathological angiogenesis, but not in normal blood vessels. In recent years, there has been increasing attention to PIGF, therefore this article reviews the role of PIGF in neovascular ocular diseases.

• KEYWORDS: placental growth factor; vascular endothelial growth factor receptor; anti - VEGF drugs; ocular neovascularization

Citation: Zhou J, Liu T. Progress in placental growth factor in ocular neovascular disease. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2016; 16(11):2053-2058

摘要

新生血管是许多致盲性眼病的主要原因,例如糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变、年龄相关性黄斑变性等。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在新生血管的形成中起着重要的作用,被认为是

作用最强的血管生长因子。胎盘生长因子(placental growth factor, PIGF)是 VEGF 家族中的一员,可促进新生血管生成,刺激内皮细胞迁移增殖,介导免疫炎症反应,且特异性表达于病理性新生血管,但在正常血管中不表达。因此近年来 PIGF 逐渐受到人们关注。本文对 PIGF 在新生血管性眼病中的作用机制进行探讨。

关键词: 胎盘生长因子; 血管内皮生长因子受体; 抗 VEGF 药物; 眼部新生血管

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.11.17

引用: 周骏, 刘涛. 胎盘生长因子在新生血管性眼病中的研究进展. *国际眼科杂志* 2016; 16(11):2053-2058

0 引言

病理性新生血管是多种眼部疾病的共同病理改变,是致盲的重要原因之一。新生血管的形成是一个极其复杂的过程,受多种细胞因子的调控,VEGF 是一种同型二聚体糖蛋白,在新生血管的形成中起着重要的作用,被认为是作用最强的血管生长因子^[1]。其家族包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 和 PIGF,其中 VEGF-A 是最常见、最主要的一种,其生物活性主要表现为:选择性增强血管内皮细胞有丝分裂,刺激血管内皮细胞增殖并促进血管形成;增强血管尤其是小血管的渗透性,使血浆蛋白等大分子外渗沉积在血管外的基质中,为新生毛细血管网的建立提供营养^[2]。因此,VEGF 是治疗新生血管性眼病的重要靶点,抗 VEGF 药物成为眼部新生血管疾病的一线治疗手段。同为 VEGF 家族成员之一的胎盘生长因子(placental growth factor, PIGF)的促血管生成作用曾一度被人们所忽视,近年来研究发现,PIGF 与眼部病理性新生血管亦有密不可分的关系。本文就 PIGF 在新生血管性眼病病理进程中的作用及抗 PIGF 药物的研究进展做一综述。

1 PIGF 概述

1.1 PIGF 的分子结构 PIGF 是 VEGF 家族中的一员,于 1991 年由 Maglione 等^[3]从人体胎盘 cDNA 文库分离纯化而来,是一种分泌型二聚体糖蛋白,分子量 46000 ~ 50000kDa,其蛋白氨基酸序列与 VEGF 有 42% 的同源性。主要表达于人体胎盘、心、肺、甲状腺、骨骼肌中。人类的 PIGF 基因位于第 14 号染色体,含有七个外显子。根据 PIGF 基因的选择性拼接,可以产生 4 种不同的异构体:PIGF-1(PIGF₁₃₁),PIGF-2(PIGF₁₅₂),PIGF-3(PIGF₂₀₃),PIGF-4(PIGF₂₂₄),它们大小不同,分泌特性和受体亲和力也不一。PIGF-1 和 PIGF-3 不与肝素结合,而 PIGF-2 和 PIGF-4 具有较强的与肝素结合的能力,主要与细胞膜、基底膜或细胞外基质肝素结合。PIGF-1 由 1~5、7 号外显子编码,PIGF-2 由 1~7 号外显子编码较

PIGF-1 多第 6 号外显子,编码肝素结合区,含有 63bp。因此,PIGF-2 与 PIGF-1 的不同在于前者由于第 6 号外显子的存在而具有肝素结合活性,PIGF-3 除有 PIGF-1 的 6 个外显子外,在 4 和 5 号外显子之间还插有 216bp 的编码序列,PIGF-4 除了含有与 PIGF-3 同样序列外,还增加有 PIGF-2 所具有的第 6 号外显子,编码肝素结合区^[4]。

1.2 PIGF 的受体 PIGF 的受体有血管内皮生长因子受体-1(vascular endothelial growth factor receptor-1, VEGFR-1/Flt-1)、硫酸类肝素蛋白多糖(heparin sulfate proteoglycan, HSPG)、neuropilin-1(NRP-1)受体和 neuropilin-2(NRP-2)受体。其中,VEGFR-1 与 PIGF-1 和 PIGF-3 结合,PIGF-4 可与 VEGFR-1 及 HSPG 结合,PIGF-2 可分别与四种受体结合,从而产生不同的生物学效应。VEGFR-1 可与四种亚型结合,是 PIGF 的特异性受体,除此之外,VEGFR-1 还可与 VEGF-A、VEGF-B、TfsvVEGF 结合,其分子量约为 180kDa,由 7 个胞外免疫球蛋白样结构域、一个跨膜区、一个近膜结构和一个胞内酪氨酸激酶结构域组成。主要在内皮细胞和胚胎滋养层细胞中表达,在成骨细胞、单核细胞/巨噬细胞、及造血干细胞中也能检测到它的存在^[5]。VEGFR-1 在胚胎发育阶段对于内皮细胞分化、血管形成及适当维持血管稳定有重要作用。通过自分泌和旁分泌作用调节血管内皮细胞和滋养细胞的功能,影响内皮细胞的分化成熟,在新生血管形成及胎盘的发育中起关键作用。研究表明在生物体的不同生长发育阶段 VEGFR-1 起着完全相反的作用。VEGFR-1 基因缺陷小鼠在胚胎发生早期内皮细胞增生,但不能形成正常的血管系统,所以不能存活,但敲除 VEGFR-1 酪氨酸激酶结构域基因的小鼠能健康存活且血管基本正常,说明在胚胎发生早期,VEGFR-1 在血管形成过程中起负调控作用,且与 VEGFR-1 酪氨酸激酶结构域密切相关。VEGFR-1 介导的促新生血管生成的作用在缺血、肿瘤等病理环境下发挥更大作用,VEGFR-1 依靠其酪氨酸激酶的活性介导下游的信号转导通路,刺激诱导新生血管的形成^[6]。由于 VEGFR-1 被激活后可诱导新生血管的形成,因此有研究尝试通过抑制 VEGFR-1 表达来调控眼部新生血管的生成。Luttun 等^[7]应用抗 VEGFR-1 的单克隆抗体抑制了肿瘤和缺血性视网膜病变新血管的形成,抗 VEGFR-1 治疗 2wk 后,肿瘤微血管的密度降低 45%,血管大小降低 30%。抗 VEGFR-1 治疗也使患自身免疫性关节炎的患者的炎症性关节毁损和血管新生减轻。还有研究发现一针对 VEGFR-1 的 siRNA 片段序列:Sirna-027,它对于体外培养的内皮细胞系、小鼠体内的视网膜及脉络膜新生血管的抑制率高达 40% 以上^[8]。

1.3 PIGF 的生物学功能

1.3.1 PIGF 与血管形成 PIGF 是多效的细胞因子,能促进血管内皮细胞尤其是微血管内皮细胞增殖,并可作为 VEGF 的趋化因子来调节内皮细胞的生长,促进血管生成。PIGF 还能促进单核细胞和内皮细胞的迁移,增加内皮细胞的通透性。PIGF 在胎盘绒毛膜的血管形成中起重要作用,在胎儿和成体发育中具有很强的血管形成特性。实验显示在兔角膜和鸡胚绒毛尿囊膜中最早发现的 PIGF-1 具有促血管生成作用,呈现剂量与时间依赖性的

血管生成,且此效应可被抗 PIGF 抗体所阻断^[9]。虽然 PIGF 在胎盘中高度表达,但有 PIGF 基因缺陷的小鼠仍可以健康的生存,而在人类生理性血管代偿性增生,如运动引起心脏及肌肉新生血管的形成也并不依赖 PIGF^[10],表明 PIGF 不影响正常的发育。在细胞激活或病理状态下,如缺氧、伤口愈合、组织缺血、炎症反应、恶性肿瘤等,可引起 PIGF 高表达,说明 PIGF 对生理性血管的生成影响不大,而对病理性新生血管具有关键作用^[11]。Luttun 等^[12]应用 PIGF 基因敲除小鼠的研究表明 PIGF 减少病理性新生血管,缺乏 PIGF 使皮肤伤口处变应原和神经性炎症诱导的血管渗漏减少。目前认为,PIGF 促进病理性血管形成与其直接刺激血管内皮细胞生长、迁移、存活有关。其机制可能是由于大量 PIGF 竞争性结合 VEGFR-1 受体位点,使更多 VEGF 活化 VEGFR-2,并与其结合;通过 VEGFR-1 传递信号,作用于 VEGFR-2,增强低浓度水平 VEGF 的敏感性;PIGF 活化 VEGFR-1,通过分子间的转磷酸作用,增加 VEGFR-2 受体酪氨酸的磷酸化水平,促进新生血管的形成;PIGF 与 VEGF 形成 VEGF/PIGF 复合物,从而激活和传递血管生长信号给 VEGFR-2/VEGFR-1 受体复合物;PIGF 与 VEGF 竞争性结合 VEGFR-1,刺激 VEGFR-2/VEGFR-1 受体复合物,发挥调控血管生成作用^[13]。此外,还可通过促进平滑肌细胞和纤维母细胞的增殖和募集、单核-巨噬细胞系的分化、骨髓祖细胞的成熟来影响血管的生成^[4]。

1.3.2 PIGF 与炎症反应 炎症反应的特征之一就是血管新生,如类风湿关节炎、银屑病、皮肤的迟发型变态反应等,在这些疾病的病理性血管新生中 PIGF 的表达是上调的。PIGF 通过调节血管内皮细胞的功能来参与炎症反应。PIGF 可以通过上调肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的表达,提高 IL-8 及单核细胞趋化蛋白-1 β (Monocyte chemoattractant protein 1 β , MCP-1 β)等炎症介质的水平,进而诱导炎症反应,同时 PIGF 通过与 VEGFR-1 结合,促进 MCP-1 活化、迁移,从而促进单核细胞与巨噬细胞趋化、聚集,以促进炎症反应^[14]。Yoo 等^[15]在关节炎患者滑膜及滑液中检测出 PIGF 和 VEGFR-1,并且证实与外周血单核细胞升高相关,且能被 TNF- α 、IL-8、IL-1 β 、MCP-1 诱导而呈高表达,趋化巨噬细胞聚集,并诱导产生组织因子,促进炎症反应。Oura 等^[16]应用 PIGF 基因缺陷小鼠对比观察了迟发型变态反应在 PIGF 基因缺陷小鼠和野生型小鼠中的差异,发现缺乏 PIGF 可导致炎症血管增生减少,基因缺陷小鼠的炎症反应范围往往比野生型要小,时间缩短,尤其是炎症性新生血管和水肿形成明显减少,说明 PIGF 在控制皮肤炎症方面具有重要的作用。这些提示了抑制 PIGF 的活性有可能成为抗炎治疗的一种新的方法。多项研究表明 PIGF 在缺血、炎症、伤口愈合及癌症等疾病中直接或间接促进血管新生,包括肿瘤生长、心肌缺血、缺血性眼病、关节炎、动脉粥样硬化、迟发型皮肤过敏等^[17-20]。

2 PIGF 在眼部新生血管疾病中的作用

病理性新生血管与多数眼部致盲疾病有关,例如:糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)以及早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP),年龄相关性

黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)等。无论是生理性还是病理性血管的形成,其调节过程都十分复杂,包括血管扩张及通透性的增加、血管周围基质的降解、内皮细胞的激活增殖、迁移、存活以及新的毛细血管样管腔的形成,最后新生血管成熟、重塑构成血管网。多种细胞因子参与新生血管生成的调控,诸如碱性成纤维细胞生长因子、血小板衍生生长因子、表皮生长因子、肝细胞生长因子、TNF、VEGF等,血管生长因子和抑制因子之间平衡的破坏是血管生成的关键因素之一,其中VEGF被认为是作用最强的血管生长因子^[1]。然而,同为VEGF家族成员之一的PIGF,促血管生成作用曾一度被人们所忽视,近年来研究发现PIGF能刺激内皮细胞的增生、迁移,促进新生血管形成,介导炎性细胞浸润,并与VEGF-A协同作用,提高血管活性,与眼部病理性新生血管有密不可分的关系。

2.1 PIGF与AMD AMD是发达国家50岁以上人群低视力和致盲的首要原因,在美国有800万AMD患者,随着社会的老龄化,其发病率有增高趋势,截止2020年总体患病率预计将增加50%以上^[21]。AMD的病理变化主要是视网膜上皮层、玻璃膜及脉络膜毛细血管进行性萎缩,从而诱发脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)形成。在AMD的整个病程中,CNV的形成与发展都起着至关重要的作用,是导致其视力减退关键步骤^[22]。VEGF促进新生血管及血管渗漏等作用已受到广泛认可,近年来抗VEGF药物显示出对CNV明确的抑制作用^[23]。PIGF作为VEGF的一个亚型,与VEGF-A具有协同作用,同时它能够在病理性新生血管中特异性表达。Rakic等^[24]运用RT-PCR技术测定新生血管膜中PIGF mRNA,发现PIGF在小鼠CNV模型及人的CNV中均有表达,在PIGF基因敲除鼠或在特异性阻断PIGF受体的小鼠中,激光诱导的CNV的发生率显著低于正常对照组,且严重程度明显降低。研究指出给激光诱导的CNV小鼠模型玻璃体腔内注射PIGF抑制剂anti-PIGF(5D11D4)后脉络膜血管渗漏、巨噬细胞浸润均有所减少^[25]。Huo等^[26]通过ELISA测定激光诱导的CNV小鼠模型VEGF和PIGF浓度,发现VEGF-A与PIGF浓度显著升高,进一步行玻璃体腔内注射抗VEGF-A抗体及抗PIGF抗体治疗,发现抗VEGF-A可显著减少新生血管密度,而抗PIGF治疗没有显著降低新生血管的密度,但它增强了抗VEGF-A对新生血管的抑制作用,推测可能是由于VEGF-A与PIGF都可以和VEGFR-1结合,PIGF通过调节VEGFR-1介导的下游信号,形成PIGF/VEGF-A复合物,与VEGF-A具有协同作用。此外,他们还通过流式细胞术、RT-qPCR、ELISA,分析VEGF-A和PIGF在巨噬细胞、内皮细胞以及其他细胞中的浓度水平,结果显示激光诱导的CNV小鼠模型中PIGF主要是由巨核细胞产生的,清除巨噬细胞后,CNV密度显著减少。这些实验表明,PIGF在AMD中发挥着重要作用,是CNV形成的关键因素,抗PIGF治疗有望成为治疗AMD的新靶点。

2.2 PIGF与DR 糖尿病视网膜病变是糖尿病常见且严重的微血管并发症之一,是许多发达国家工作年龄人群(20~70岁)致盲的常见原因之一^[27]。DR患者可能因

为糖尿病性黄斑水肿(diabetic macular edema, DME)、增殖型糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)、玻璃体积血、牵拉性视网膜脱离、新生血管性青光眼(neovascular glaucoma, NVG)等微血管并发症,逐渐或者突然出现视力下降,最终导致失明。其中,DME和PDR对视力损害最为严重^[28]。多项DR与VEGF水平相关性研究结果显示,VEGF水平和DR病程显著相关,并且DR程度越重,VEGF水平越高^[29]。最近有研究表明VEGF家族成员之一的PIGF在DR的发病机制中发挥着重要作用^[30]。Khaliq等^[31]对PDR患者术中切除的纤维增殖膜进行免疫组化染色,发现PIGF在血管内皮和血管周围区域高度表达,而在无增殖性视网膜病变的糖尿病患者视网膜中,未见到有PIGF的表达或者表达很弱。在正常视网膜、全视网膜光凝治疗后视网膜及无新生血管的视网膜前膜上均未见到有PIGF蛋白的表达。Yamashita等^[32]采用ELISA方法测定PDR患者房水及玻璃体中PIGF的分布,结果显示仅有一例严重的PDR患者房水中PIGF浓度高达2270pg/mL,其余房水样本中未检测到PIGF,玻璃体中PIGF平均浓度为360±272pg/mL。在正常对照组房水及玻璃体中均未检测到PIGF。另一项研究同样是用ELISA测定对不同程度的DR患者(DME、PDR、NVG)房水中PIGF浓度进行检测,发现各组中PIGF浓度均升高,DME组PIGF平均浓度为24.5±4.8pg/mL,PDR组PIGF平均浓度为52.8±27.1pg/mL,NVG组PIGF平均浓度为577.4±277.2pg/mL,表明PIGF升高程度与疾病的严重程度密切相关^[33]。Miyamoto等^[34]研究发现给予人视网膜色素上皮细胞系ARPE-19一定量的PIGF能诱导细胞间的通透性增加;并且在缺氧或给予胰岛素刺激的情况下,ARPE-19细胞系的PIGF mRNA水平显著上升,细胞间的通透性也随之提高。同时,他们给大鼠玻璃体腔内注射PIGF,发现注射后24h视网膜色素上皮细胞间紧密连接被明显破坏、通透性增加,推测PIGF-1水平升高可引起RPE细胞胞浆的转运过程,造成视网膜外屏障改变,导致细胞间隙增大,这些细胞间紧密连接的破坏可引起血浆外渗,导致视网膜下液体体积聚、视网膜水肿、脉络膜毛细血管扩张等病理改变。他们进一步研究发现PIGF表达上调的机理与MEK/ERK信号通路有关。另有研究指出PIGF基因敲除小鼠对于糖尿病所引起的视网膜细胞坏死、血管变性、视网膜毛细血管周细胞丧失以及血视网膜屏障的破坏具有一定保护作用,保护机制与Akt的磷酸化和HIF1α-VEGF通路抑制相关^[35]。以上众多实验都表明PIGF在糖尿病视网膜病变及糖尿病黄斑水肿中起着至关重要的作用。

3 PIGF与抗VEGF药物

VEGF是治疗新生血管性眼病的重要靶点。近年来抗VEGF药物的问世使眼部新生血管疾病的治疗状况发生了革命性的进展^[36]。单靶点抗VEGF-A药物在新生血管性眼病的治疗中取得了良好的效果。贝伐单抗(bevacizumab, avastin)为一类重组的人源化IgG1型单克隆抗体,能广泛结合VEGF-A₁₆₅及其他VEGF-A,因其具有对眼内新生血管生成的抑制作用,被尝试用于治疗各类眼内新生血管疾病,玻璃体注射bevacizumab能有效抑制视网膜及脉络膜新生血管^[37]。另一种与其作用相似

抗 VEGF 药物雷珠单抗 (ranibizumab, lucentis) 是一种抗体片段,可与 VEGF-A 的所有异构体结合并使其失活,从而抑制新生血管的形成。它是第一个被美国 FDA 批准用于治疗眼部新生血管性黄斑变性的抗新生血管类药物^[21]。近两年来,能广泛结合 VEGF-A、VEGF-B 及 PIGF 的新一代多靶点抗 VEGF 药物相继上市,其中以阿柏西普 (aflibercept, VEGF Trap-Eye, Eylea) 和康柏西普 (conbercept, KH902) 为代表。新一代多靶点抗 VEGF 药物可改善一些对单靶点抗 VEGF 药物治疗无反应患者的临床症状^[38]。

Aflibercept 为可溶性重组 VEGFR 蛋白,包含 VEGFR-1 的第 2 免疫球蛋白域、VEGFR-2 的第 3 免疫球蛋白域以及人类免疫球蛋白 Fc 融合而成,可诱导 VEGF-A 的所有亚型、VEGF-B 及 PIGF 与其结合,从而阻断 VEGFR 下游信号通路,抑制新生血管及血管渗漏^[39]。有研究指出对 CNV 大鼠模型进行注射 aflibercept 治疗,不仅减缓并抵消了部分 CNV 的生长,更极大地减少了 CNV 合并的白细胞浸润和纤维生长^[40]。国外以 ranibizumab 为对照组评价 VEGF Trap-Eye 玻璃体腔注射治疗 AMD 的随机双盲 III 期临床试验 VIEW 1 和 VIEW 2^[39]。受试者被随机分为 ranibizumab 0.5mg q4wk、VEGF Trap-Eye 0.5mg q4wk、VEGF Trap-Eye 2.0mg q4wk 以及 VEGF Trap-Eye 2.0mg q4wk×12w+2.0mg q8wk 共 4 个组。观察至 52wk,3 个 VEGF Trap-Eye 治疗组最佳矫正视力 (best corrected visual acuity, BCVA) 较基线下降不超过 15 个字母的患者比例均与 ranibizumab 组相当,而各 VEGF Trap-Eye 治疗组中 BCVA、中央视网膜厚度 (central retinal thickness, CRT) 等指标的变化值与 ranibizumab 组接近,各组的眼部或全身不良事件相似。该研究结果表明,VEGF Trap-Eye 对 VEGF-A 的亲合力明显高于 ranibizumab,且药物作用时间更长,VEGF Trap-Eye 每 2mo 注射与 ranibizumab 每月注射具有相似的有效性和安全性。这可能与抑制 PIGF,从而抑制了 VEGFR-1 活化及人视网膜内皮细胞迁移有关^[41]。在 VISTA-DME 研究中^[42],患者随机分为 VEGF Trap-Eye 2mg q4wk、VEGF Trap-Eye 2mg q8wk (完成最初 5mo 每月 2mg VEGF Trap-Eye 治疗后),激光光凝治疗 3 组。数据表明,治疗 100wk 后,VEGF Trap-Eye 2mg q4wk 治疗组,BCVA 相对基线增加了 11.5 个字母,CRT 平均减少 185.9 μ m;VEGF Trap-Eye 2mg q8wk 治疗组,BCVA 相对基线增加了 11.1 个字母,CRT 平均减少 183.1 μ m;激光光凝治疗组,BCVA 相对基线增加了 0.9 个字母,CRT 平均减少 66.2 μ m,说明与激光光凝相比,VEGF Trap-Eye 在改善视力,减轻水肿方面具有显著优势。

Conbercept 是由我国自主研发的新一代抗 VEGF 药物^[43],于 2013 年年底上市,其结构为 VEGFR-1 的免疫球蛋白样区域 2 和 VEGFR-2 的免疫球蛋白样区域 3,4 融合到人 IgG 的 Fc 段所组成的融合蛋白。与 aflibercept 不同的是 conbercept 包含了 VEGFR-2 的第 4 免疫球蛋白域,可使结合更加紧密,同时它也可减少 VEGF 与受体的解离速率,降低细胞外基质的附着力^[44]。一项多中心、随机、双盲、不同剂量和不同频度给药的平行对照临床试验 AURORA^[43]中,AMD 受试者在前 3mo 按 1:1 随机

分配到 2 个剂量组:0.5mg q1mo 和 2.0mg q1mo。3mo 后两组患者 BCVA 分别提高了 8.97 和 10.43 个字母。在延长治疗期,受试者再按 1:1 随机分配到 4 个剂量组:0.5mg q1mo;0.5mg 按需给药;2.0mg q1mo;2.0mg 按需给药,研究周期为 12mo。结果表明,4 个剂量组的 BCVA、CRT 相对基线减少厚度、CNV 区域渗漏面积等临床治疗效果相当,说明 conbercept 对于 AMD 有很好的疗效,且药剂量及方案对试验结果无影响,有较强的安全性和有效性。Chen 等^[45]研究表明,用 Annexin-V/PI 染色和 MTT 比色法分析 KH902 对人体外培养人视网膜内皮细胞 (human retinal endothelial cells, HRECs) 的细胞毒性,发现 KH902 的浓度在 100ng/mL 至 100 μ g/mL 对 HRECs 无细胞毒性。ELISA 法检测到高糖环境下 KH902 能与 HRECs 分泌的 VEGF165 和 PIGF 相结合。通过划痕试验及 Transwell 试验发现 KH902 抑制高糖诱导 HRECs 的迁移和发芽,进一步用免疫印迹法检测 Src、p-Src、PI3K、Akt1、p-Akt1、Erk1/2 和 p-Erk1/2 蛋白水平发现, KH902 是通过抑制 Src-Akt1-Erk1/2 通路的激活,从而与 VEGF 和 PIGF 相结合。Huang 等^[46]研究将链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠模型作为实验组分为玻璃体腔内注射 KH902 (D+KH)、玻璃体腔内注射 avastin (D+A)、玻璃体腔内注射 PBS 缓冲液 (D+PBS)、不注射组 (D)、以及非糖尿病大鼠作为对照组,共 5 组。注药 4wk 后分别检测各组视网膜电图 (electroretinogram, ERG),了解视网膜电生理功能;伊文斯兰染色法观察视网膜内屏障 (inner blood retinal barrier, iBRB) 完整性;免疫组化检查检测 VEGFR-2 和 PIGF 的表达;蛋白印迹法检测 VEGF 信号通路的蛋白水平。结果发现实验组中各小组 ERG a 波与 b 波振幅均降低,视网膜电生理功能受损,视网膜血管渗漏,iBRB 完整性遭到破坏,PIGF 表达于视网膜神经节细胞层、内丛状层、视锥视杆细胞层以及色素上皮层,其中视网膜色素上皮层高度表达,VEGFR-2 表达于视网膜神经节细胞层、内丛状层、内核层、外丛状层、外核层以及视锥视杆细胞层,VEGFR-2、PI3K、AKT、p-AKT、p-ERK、p-SRC 蛋白水平均升高。玻璃体腔内注射 KH902 和 avastin 均可以升高 a、b 波振幅,提高视网膜电生理功能,减少视网膜血管渗漏,阻止 iBRB 被破坏,且 KH902 更加有效。KH902 可减少 PIGF 和 VEGFR-2 的表达,而 avastin 只能减少 VEGFR-2 的表达。KH902 可以降低 VEGFR-2、PI3K、AKT、p-AKT、p-ERK、p-SRC 的蛋白水平,但对于总的 ERK 和 SRC 蛋白水平并未见到显著影响。说明 KH902 可以通过抑制 VEGFR-2、PIGF 和 PI3K 的表达以及 SRC、AKT 和 ERK 的激活来抑制 iBRB 被破坏和保护视网膜电生理功能,是一个潜在的治疗 DR 或其他眼部新生血管性疾病的抗 VEGF 药物。

4 展望

目前抗 VEGF 药物在治疗多种眼部新生血管性疾病中起着重要作用。由于 VEGF 在血管生理、病理性生长的调节中均起着重要作用^[2],所以抗 VEGF 药物的潜在的风险引起注意。有研究报告显示 bevacizumab 可能会诱导视网膜光感受器细胞凋亡,引起毒性反应^[47]。两项针对糖尿病黄斑水肿的多中心 III 期临床实验 (RISE、RIDE) 中发现:ranibizumab 组中的患者死亡例数及脑血

管意外例数高于对照组^[48]。而 aflibercept 和 conbercept 由于在临床上使用时间并不长,仍需长期观察评判其有效性和安全性。因此,人们一直致力于寻找一个特异性更强,安全性更高的药物作用靶点。PIGF 不仅能在病理状态下能诱导产生新生血管,而且对它进行抑制并不影响处于正常组织中的静止期血管,这使 PIGF 有望成为治疗病理性新生血管的一个更为安全有效的靶点。抗 PIGF 抗体不仅可以抑制内皮细胞增殖、抑制血管生长,它还能促使内皮细胞死亡,从而使现存血管退化。Fischer 等^[49]研制出一种新的抗 PIGF 单克隆融合抗体:αPIGF,它能在动物体内有效抑制肿瘤新生血管的生长,并且未引起新生血管代偿性重生及其他严重的副作用。另一种抗 PIGF 单克隆抗体 TB-403 在治疗肿瘤方面已经进入临床实验阶段^[50]。在眼科领域中,对抗 PIGF 的研究及应用目前较少,有研究指出在激光诱导的 CNV 小鼠模型玻璃体腔内注射抗 PIGF 药物(5D11D4),可抑制 CNV 的形成,且这种作用是通过介导的 VEGFR-1 受体完成的^[51]。因此,针对 PIGF 及 VEGFR-1 抑制剂的研究有着重要的临床意义,它将有希望成为更安全有效抑制新生血管的新一代药物。

参考文献

- Boltz A, Ruiss M, Jonas JB, et al. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms in the treatment success in patients with wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2012;119(8):1615-1620
- Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005;109(3):227-241
- Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, et al. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(20):9267-9271
- De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp Mol Med* 2012;44(1):1-9
- Ribatti D. The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. *Angiogenesis* 2008;11(3):215-221
- Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006;39(5):469-478
- Luttun A, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002;8(8):831-840
- Shen J, Samul R, Silva RL, et al. Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther* 2006;13(3):225-234
- Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 1997;99(11):2625-2634
- Gigante B, Tarsitano M, Cimini V, et al. Placenta growth factor is not required for exercise-induced angiogenesis. *Angiogenesis* 2004;7(3):277-284
- Dewerchin M, Carmeliet P. Placental growth factor in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2014;18(11):1339-1354
- Luttun A, Brusselmans K, Fukao H, et al. Loss of placental growth factor protects mice against vascular permeability in pathological conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295(2):428-434
- Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. Synergism between vascular

- endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;7(5):575-583
- Kim KJ, Cho CS, Kim WU. Role of placenta growth factor in cancer and inflammation. *Exp Mol Med* 2012;44(1):10-19
- Yoo SA, Yoon HJ, Kim HS, et al. Role of placenta growth factor and its receptor flt-1 in rheumatoid inflammation: a link between angiogenesis and inflammation. *Arthritis Rheum* 2009;60(2):345-354
- Oura H, Bertoncini J, Velasco P, et al. A critical role of placental growth factor in the induction of inflammation and edema formation. *Blood* 2003;101(2):560-567
- Hilfenhaus G, Gohrig A, Pape UF, et al. Placental growth factor supports neuroendocrine tumor growth and predicts disease prognosis in patients. *Endocr Relat Cancer* 2013;20(3):305-319
- Kowalczyk L, Touchard E, Omri S, et al. Placental growth factor contributes to micro-vascular abnormalization and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *PLoS One* 2011;6(3):e17462
- Liu X, Claus P, Wu M, et al. Placental growth factor increases regional myocardial blood flow and contractile function in chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;304(6):885-894
- Sung CY, Son MW, Ahn TS, et al. Expression of placenta growth factor in colorectal carcinomas. *J Korean Soc Coloproctol* 2012;28(6):315-320
- Patel RD, Momi RS, Hariprasad SM. Review of ranibizumab trials for neovascular age-related macular degeneration. *Semin Ophthalmol* 2011;26(6):372-379
- Shao J, Choudhary MM, Schachat AP. Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Dev Ophthalmol* 2016;55:125-136
- Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials Research Group, Maguire MG, Martin DF, et al. Five-year outcomes with anti-vascular endothelial growth factor treatment of neovascular age-related macular degeneration: the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. *Ophthalmology* 2016;123(8):1751-1761
- Rakic JM, Lambert V, Devy L, et al. Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(7):3186-3193
- Van de Veire S, Stalmans I, Heindryckx F, et al. Further pharmacological and genetic evidence for the efficacy of PIGF inhibition in cancer and eye disease. *Cell* 2010;141(1):178-190
- Huo X, Li Y, Jiang Y, et al. Inhibition of ocular neovascularization by co-inhibition of VEGF-A and PLGF. *Cell Physiol Biochem* 2015;35(5):1787-1796
- Abu El-Asrar AM, Al-Mezaine HS. Advances in the treatment of diabetic retinopathy. *Saudi J Ophthalmol* 2011;25(2):113-122
- Morello CM. Etiology and natural history of diabetic retinopathy: an overview. *Am J Health Syst Pharm* 2007;64(17 Suppl 12):S3-7
- Wong TY, Cheung CM, Larsen M, et al. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16012
- Dewerchin M, Carmeliet P. PIGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2(8):a011056
- Khaliq A, Foreman D, Ahmed A, et al. Increased expression of placenta growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Lab Invest* 1998;78(1):109-116
- Yamashita H, Eguchi S, Watanabe K, et al. Expression of placenta growth factor(PIGF) in ischaemic retinal diseases. *Eye (Lond)* 1999;13(Pt 3a):372-374
- Ando R, Noda K, Namba S, et al. Aqueous humour levels of

- placental growth factor in diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol* 2014; 92(3):e245-246
- 34 Miyamoto N, de Kozak Y, Jeanny JC, *et al.* Placental growth factor-1 and epithelial haemato-retinal barrier breakdown: potential implication in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2007;50(2): 461-470
- 35 Huang H, He J, Johnson D, *et al.* Deletion of placental growth factor prevents diabetic retinopathy and is associated with Akt activation and HIF1 alpha - VEGF pathway inhibition. *Diabetes* 2015; 64(3):200-212
- 36 Ushida H, Kachi S, Asami T, *et al.* Influence of preoperative intravitreal bevacizumab on visual function in eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res* 2013;49(1):30-36
- 37 Carneiro A, Falcao M, Pirraco A, *et al.* Comparative effects of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib at intravitreal dose range on endothelial cells. *Exp Eye Res* 2009;88(3):522-527
- 38 Kumar N, Marsiglia M, Mrejen S, *et al.* Visual and anatomical outcomes of intravitreal aflibercept in eyes with persistent subfoveal fluid despite previous treatments with ranibizumab in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2013;33(8): 1605-1612
- 39 Heier JS, Brown DM, Chong V, *et al.* Intravitreal aflibercept (VEGF trap - eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2012;119(12):2537-2548
- 40 Cao J, Zhao L, Li Y, *et al.* A subretinal matrigel rat choroidal neovascularization(CNV) model and inhibition of CNV and associated inflammation and fibrosis by VEGF trap. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(11):6009-6017
- 41 Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, *et al.* Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor(VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis* 2012;15(2):171-185
- 42 Korobelnik JF, Do DV, Schmidt - Erfurth U, *et al.* Intravitreal aflibercept for diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2014;121(11): 2247-2254
- 43 Li X, Xu G, Wang Y, *et al.* Safety and efficacy of conbercept in neovascular age-related macular degeneration: results from a 12-month randomized phase 2 study: AURORA study. *Ophthalmology* 2014;121(9):1740-1747
- 44 Wang Q, Li T, Wu Z, *et al.* Novel VEGF decoy receptor fusion protein conbercept targeting multiple VEGF isoforms provide remarkable anti-angiogenesis effect in vivo. *PLoS One* 2013;8(8):e70544
- 45 Chen X, Li J, Li M, *et al.* KH902 suppresses high glucose-induced migration and sprouting of human retinal endothelial cells by blocking VEGF and PIGF. *Diabetes Obes Metab* 2013;15(3):224-233
- 46 Huang J, Li X, Li M, *et al.* Effects of intravitreal injection of KH902, a vascular endothelial growth factor receptor decoy, on the retinas of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Obes Metab* 2012;14(7):644-653
- 47 Inan UU, Avci B, Kusbeci T, *et al.* Preclinical safety evaluation of intravitreal injection of full-length humanized vascular endothelial growth factor antibody in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(4):1773-1781
- 48 Nguyen QD, Brown DM, Marcus DM, *et al.* Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE. *Ophthalmology* 2012;119(4):789-801
- 49 Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, *et al.* Anti-PIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 2007;131(3):463-475
- 50 Nielsen DL, Sengelov L. Inhibition of placenta growth factor with TB-403: a novel antiangiogenic cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2012;12(6):795-804
- 51 Veire SVD, Bergen TV, Mazzone M, *et al.* The anti-PIGF antibody (5d11d4) specifically reduces choroidal neovascularization *in vivo* on a mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(13):4510