

内皮抑素在抗新生血管性眼病治疗中的研究进展

薛文文, 邹海东

作者单位:(200080) 中国上海市, 上海交通大学附属第一人民医院眼科

作者简介:薛文文,女,在读硕士研究生,研究方向:白内障。

通讯作者:邹海东,男,主任医师,博士研究生导师,中华眼科学会全国防盲和流行病学学组组长,上海眼科学会青年委员、防盲和流行病学学组副组长、白内障学组组长,研究方向:白内障、防盲和流行病学. zouhaidong@263. net

收稿日期:2011-07-25 修回日期:2011-10-08

Recent advances of endostatin in the treatment of ocular neovascularization

Wen-Wen Xue, Hai-Dong Zou

Department of Ophthalmology, Shanghai First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

Correspondence to: Hai-Dong Zou. Department of Ophthalmology, Shanghai First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China. zouhaidong@263. net

Received: 2011-07-25 Accepted: 2011-10-08

Abstract

• Ocular neovascularization always happens in common vision impairing diseases. Current animal experiments have proven that endostatin (ES) may be used as a new drug which can inhibit ocular neovascularization effectively. In this paper, the recent advances of ES in the treatment of ocular neovascularization were reviewed.

• KEYWORDS: endostatin; ocular neovascularization; treatment

Xue WW, Zou HD. Recent advances of endostatin in the treatment of ocular neovascularization. *Guoji Yanke Zazhi(Int J Ophthalmol)* 2011;11(12):2138-2140

摘要

眼部新生血管性疾病严重危害视力,目前的动物实验已证明内皮抑素(endostatin, ES)有望成为一种新型、有效的抑制眼部新生血管的药物。我们就ES在抗新生血管性眼病治疗中的研究进展作一综述。

关键词:内皮抑素;眼部新生血管;治疗方法

DOI:10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 12. 025

薛文文, 邹海东. 内皮抑素在抗新生血管性眼病治疗中的研究进展. 国际眼科杂志 2011;11(12):2138-2140

0 引言

角膜新生血管不仅严重影响视力,也是角膜移植术后发生排斥反应的高危因素。目前治疗方法有药物、光动力、眼表重建等,但效果并不理想。脉络膜及视网膜新生血管则是年龄相关性黄斑变性、糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变等疾病中的常见病理改变,其治疗也面临着相似的困境。内皮抑素(endostatin, ES)是作用最强的抑制血管生长的因子之一,对多种起源的新生血管内皮细胞增殖都有抑制作用,而不影响静止的血管内皮细胞或非内皮源性的细胞^[1]。同时,ES无毒性,无耐药性,是理想的抗新生血管生物制剂。我们就ES在眼科抗新生血管治疗中的研究进展作一综述。

1 ES的结构

ES是胶原XVIII分子的C端酶解产物,参与酶解的可能有弹性蛋白酶、组织蛋白酶L和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)^[2]。它是哈佛大学O'Reilly等^[3]从小鼠血管内皮细胞瘤的培养上清液中分离纯化的分子量为20kDa的蛋白质,在一定浓度范围内(100~600mg/L)表现出对内皮细胞剂量依从的特异性抑制增殖作用,并抑制肿瘤的形成和转移。

2 ES在眼部的分布

XVIII胶原广泛分布于各组织上皮间质细胞的基底膜和血管内皮细胞中,在眼部的组织中也有大量的表达。Maatta等^[4]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,并且在泪液、房水、玻璃体液中也可检出ES片段,一些眼组织能保持无血管状态可能与局部存在高浓度的ES相关。

3 ES的作用机制

ES的可能作用机制包括:(1)下调抗凋亡蛋白Bcl-2和Bcl-XL的表达,诱导血管内皮细胞凋亡^[5]。(2)通过细胞周期蛋白CyclinD1使内皮细胞停滞在G₁期,阻滞血管内皮细胞增殖^[6]。(3)其和MMP前体形成稳定的复合物,阻止MMP-2, MMP-9, MMP-13的激活^[7]。(4)通过直接阻断VEGF受体KDR/Flk-1的酪氨酸磷酸化、细胞外信号调节蛋白激酶和有丝分裂原激活蛋白激酶的激活,阻断VEGF介导的信号转导^[8]。(5)直接结合整合素 β_1 ,影响内皮细胞同细胞外基质的黏附,抑制内皮细胞的迁移和生长^[9]。(6)与原肌球蛋白结合,破坏微丝结构完整性,使细胞运动功能丧失,诱导凋亡^[10]。(7)通过抑制VEGF mRNA基因的表达来抑制新生血管的形成^[11]。

4 ES 的给药剂型和给药途径

4.1 ES 球结膜下注射 于安星等^[12]采用球结膜下注射重组人 ES 治疗碱烧伤诱导的新西兰大白兔角膜新生血管,对照组球结膜下注射生理盐水,裂隙灯下观察自角膜缘长出的角膜新生血管长度和数量,计算机分析数字摄影图像中角膜新生血管面积,结果表明实验组角膜新生血管面积及微血管密度明显少于对照组,差异有统计学意义,从而证明重组人 ES 可有效抑制角膜新生血管生长。李招娜等^[13]探讨并比较了化学修饰 ES 与重组人 ES 的作用效果,碱烧伤诱导新西兰大白兔角膜新生血管,实验组分别球结膜下注射 50 μ g/mL 聚乙二醇(PEG)化 ES 和 50 μ g/mL 重组 ES,对照组注射生理盐水。结果显示实验两组角膜新生血管长度及面积、微血管数量均明显少于对照组,而 PEG 化 ES 实验组角膜新生血管的长度和面积、微血管数量明显少于重组 ES 组,从而证明 PEG 化 ES 抑制角膜新生血管的效果更好。

4.2 重组人 ES 直接点眼 袁中芳等^[14]采用碱烧伤制备新西兰大白兔角膜新生血管模型,2 个实验组分别以 10 μ g/mL 和 50 μ g/mL 重组人 ES 点眼,对照组用生理盐水代替,结果发现实验组角膜新生血管平均生长面积比对照组明显减少,但炎性细胞成分及浸润程度与对照组相似。从而证明 10 μ g/mL 和 50 μ g/mL 重组人 ES 均可明显抑制角膜新生血管生长,无毒副作用。李维义等^[15]进一步实验证明,ES 球结膜下注射和直接点眼在抑制角膜新生血管作用上差异无统计学意义。

4.3 ES 腹腔注射 王洵等^[16]用激光光凝的方法建立 BN 大鼠角膜新生血管模型,实验组腹腔注射 ES,对照组注射生理盐水,激光损伤组不做任何处理,光凝后采用眼底血管荧光素造影检查、组织病理学检查、VEGF 免疫组织化学检测和 bFGF mRNA 的原位杂交检测。结果显示随着 ES 剂量增加,荧光素渗漏率和渗漏强度减弱;生理盐水组和激光损伤组差异无显著性。从而证明足量的 ES 能有效地抑制脉络膜新生血管的形成和发展程度。

4.4 ES 视网膜下注射 尚庆丽等^[17]采用激光光凝的方法建立 BN 大鼠脉络膜新生血管模型,实验组视网膜下注射 5g/L ES,对照组视网膜下注射 5g/L 生理盐水,光凝组不做处理,用脉络膜血管平铺及 CD105 作为检测指标,结果证明 ES 可有效抑制脉络膜新生血管的形成。

4.5 基因疗法 基因治疗关键在于正确选用能够在靶细胞中长期表达目的基因产物的载体。眼科常用基因转移方法为病毒载体和脂质体。Zhang 等^[18]实验发现,内源性 ES 在高氧诱导的血管增生性视网膜病变中表达虽有增高,但不足以抑制 VEGF 刺激的视网膜新生血管发生,这可能为病理性视网膜新生血管产生的作用机制,增加内源性 ES 的表达有可能成为视网膜新生血管化的一种潜在的治疗措施。但 ES 产生作用所需的蛋白量很大^[19],反复注射用药很不方便,且非常昂贵,同时 ES 的性质不稳定,其活性蛋白难以获得,无法达到预期的治疗效果。构建 hES 腺病毒对人视网膜上皮细胞(hRPE)具有极高的感染效率,可作为一种良好的基因导入载体,为 ES 基因治疗眼

内新生血管性疾病的进一步研究奠定了基础。以病毒为载体,可在活体眼组织中有效地表达具有特殊功能的基因产物,但是有可能导致病毒相关性疾病,其安全性有待进一步证实。以脂质体法转导的目的基因可在眼组织表达持续 1mo 以上,且一定浓度的脂质体对组织细胞无毒性、无抗原性,不会导致眼球结构的改变和眼内炎症。

4.5.1 基因疗法在角膜新生血管中的应用 王泳等^[20]采用基因疗法构建携带 ES-血管内皮生长因子融合基因的重组腺病毒,并以重组腺病毒-血管内皮生长因子作为对照组,发现该重组腺病毒在体外能有效表达具有生物学活性的融合基因产物,实验组与对照组相比较显示出更强大的静脉内皮细胞增殖抑制作用,提示融合基因可能从不同途径抑制静脉血管细胞增殖,产生协同作用。从而证明重组腺病毒-ES-血管内皮生长因子可用于治疗角膜新生血管。Zhang 等^[21]将脂质体包裹的质粒 Pblast-hES 30.8 μ g 结膜下注射,术后发现可抑制角膜新生血管的面积,对角膜新生血管密度、长度和角膜炎症细胞没有明显抑制作用。Murthy 等^[22]将包含人 ES 基因和 K-5 基因的融合基因(E:K-5)通过慢病毒载体转入新西兰大白兔体外的角膜植片中,孵育过夜后进行异体穿透性角膜移植手术。结果显示,角膜新生血管数明显减少且无排斥反应,从而指出 E:K-5 基因转导治疗是可以用于高危角膜移植手术中防止植片新生血管及排斥反应的新方法。

4.5.2 基因疗法在脉络膜及视网膜新生血管中的应用 尚庆丽等^[23]指出,脂质体介导的 ES 基因可有效转染视网膜、RPE 及脉络膜,并持续稳定表达,有效抑制脉络膜新生血管的形成。王伟等^[24]构建缺氧诱导的视网膜新生血管模型,玻璃体腔注射阳离子脂质体及 pcDNA3-ES(重组质粒)复合物,结果显示,采用玻璃体腔注射方法行脂质体介导的 ES 基因转移可以一定程度抑制缺氧诱导的小鼠视网膜新生血管生长,对视网膜没有明显的毒副作用。

综上所述,ES 在眼科抗新生血管治疗中有着广泛的应用前景,但如何选择使用高效合理的给药途径或者基因表达系统,提高其生物利用度及安全性,以达到眼部新生血管的彻底根除等问题,尚待进一步研究。

参考文献

- 1 Dhannabal M, Ramchandran R, Volk R, et al. Endostatin: yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1999;59(1):189-197
- 2 Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, et al. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett* 2000;486(3):247-251
- 3 O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88(2):277-285
- 4 Maatta M, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T, et al. Collagen X VIII/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
- 5 Dhanabal M, Ramchandran R, Wateman MJ, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274(17):11721-11726
- 6 Dixelius J, Larsson H, Sasaki T. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell

- apoptosis. *Blood* 2000;95(11):3403-3411
- 7 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. *Cancer Res* 2000;60(19):5410-5413
- 8 Kim YH, 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):27872-27879
- 9 Rehn M, Veikkola T, Kukk-valdre E, *et al.* Interaction of endostatin with Integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(3):1024-1029
- 10 MacDonald NJ, Shiver S WY, Narum DL, *et al.* Endostatin binds tropomyosin: A potential modulator of the antitumor activity of endostatin. *J Biol Chem* 2001;276(27):25190-25196
- 11 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. *国际眼科杂志* 2009;9(1):25-27
- 12 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. *青岛大学医学院学报* 2009;45(4):379-383
- 13 李招娜,牟国营,袁中芳,等. 聚乙二醇化内皮抑素抑制碱烧伤角膜新生血管的实验研究. *眼外伤职业眼病杂志* 2007;29(4):241-244
- 14 袁中芳,魏增涛,王晓燕. 重组内皮抑素抑制兔角膜新生血管的实验研究. *山东大学耳鼻喉眼学报* 2006;20(6):552-558
- 15 李维义,高晓唯,郭继华,等. 重组人内皮抑素两种给药途径抑制角膜新生血管的实验研究. *农垦医学* 2008;30(3):185-187
- 16 王洵,唐罗生,许迅,等. 内皮抑素抑制脉络膜新生血管及 VEGF 和 bFGF 表达的研究. *中国现代医学杂志* 2006;16(14):2121-2125
- 17 尚庆丽,马景学,尚忠林,等. 脉络膜血管平铺及 CD105 染色在大鼠脉络膜新生血管研究中的评价意义. *眼科新进展* 2008;28(8):573-577
- 18 Zhang MX, Zhang JJ, Yan M. Expression and role of endostatin in the retina of oxygen-induced retinopathy mouse model. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006;37(4):614-617
- 19 Cao Y. Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer. *Haematologica* 1999;84(7):643-650
- 20 王泳,柳林,潘欣. 重组人内皮抑素与血管内皮生长抑制因子融合基因对角膜新生血管内皮细胞的协同作用. *中国临床康复* 2006;10(33):85-88
- 21 Zhang P, Wu DZ, Ge J, *et al.* Experimental inhibition of corneal neovascularization by endostatin gene transfection *in vivo*. *Chin Med J* 2003;116(12):1869-1874
- 22 Murthy RC, Trevor J, McFarland JY, *et al.* Corneal transduction to inhibit angiogenesis and graft failure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(5):1837-1842
- 23 尚庆丽,马景业,高健,等. 脂质体介导 endostatin 基因转染抑制脉络膜新生血管的实验研究. *第三军医大学学报* 2004;26(18):1650-1654
- 24 王伟,谢立信,董晓光,等. 内皮抑素基因转移抑制视网膜新生血管的实验研究. *中华眼科杂志* 2006;42(2):111-115