

# 视网膜新生血管抑制因子的研究进展

罗琰君, 徐国兴

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81271026); 福建省

科技创新领军人才基金资助项目 (No. 2016B011)

作者单位: (350005) 中国福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院 福建省眼科研究所

作者简介: 罗琰君, 女, 硕士研究生, 研究方向: 晶状体、视网膜疾病。

通讯作者: 徐国兴, 男, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 晶状体、视网膜疾病。fjmuxg@163.com

收稿日期: 2017-02-12 修回日期: 2017-07-28

## Research advance of retinal neovascularization inhibitory factor

Yan-Jun Luo, Guo-Xing Xu

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 81271026); Fujian Provincial Science and Technology Innovation Leadership Talent Foundation (No. 2016B011)

Fujian Institute of Ophthalmology; the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

**Correspondence to:** Guo - Xing Xu. Fujian Institute of Ophthalmology; the first Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. fjmuxg@163.com

Received: 2017-02-12 Accepted: 2017-07-28

### Abstract

• The normal growth of blood vessels is the result of dynamic balance of angiogenic factor and inhibitory factor in vascular tissue. However, when the balance is broken, the growth of new blood vessels will be induced. Endogenous angiogenesis inhibitory factor, is a group of negative feedback molecules produced by the body itself that inhibit angiogenesis. Its function of inhibiting angiogenesis is mainly realized by promoting the binding of angiogenic factor to its receptor, or its downstream angiogenesis signal, or promoting vascular endothelial apoptosis. The study of angiogenesis inhibitory factor has potential clinical significance for the prevention and treatment of retinal neovascularization. Recent studies on retinal neovascularization inhibitory factor are reviewed in this paper.

• **KEYWORDS:** retinal neovascularization; endostatin; pigment epithelium - derived factor; angiostatin; soluble VEGF receptor inhibitor; tissue inhibitors of matrix metalloproteinase; VEGF siRNA

**Citation:** Luo YJ, Xu GX. Research advance of retinal neovascularization inhibitory factor. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(9):1663-1666

### 摘要

血管的正常生长是血管组织中促生长因子和抑制因子相互协调达到动态平衡的结果,但是当这种平衡被打破后,就会诱发新生血管的生长。内源性的新生血管抑制因子,是一组机体自身产生的抑制血管生成的负反馈分子,其产生血管抑制的作用主要是通过影响促新生因子与其受体或其下游促增生信号结合,或者自身促进内皮凋亡而实现的。血管新生抑制因子的研究对于防治眼底视网膜新生血管生长具有潜在的临床意义。本文就视网膜新生血管抑制因子的最新研究进展进行系统综述。

**关键词:** 视网膜新生血管; 内皮抑素; 色素上皮衍生因子; 血管抑素; 可溶性 VEGF 受体阻断剂; 基质金属蛋白酶抑制因子; VEGF siRNA

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.9.14

**引用:** 罗琰君, 徐国兴. 视网膜新生血管抑制因子的研究进展. 国际眼科杂志 2017;17(9):1663-1666

### 0 引言

视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 是由多种病因所致的脉络膜新生血管芽穿越 Bruch 膜并在视网膜色素上皮和 (或) 上增殖形成纤维血管组织, 常伴有视网膜下的浆液性渗出和 (或) 出血, 为多种眼底疾病, 如早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP)、糖尿病性视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR)、增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR)、视网膜静脉阻塞等导致视力丧失的最主要原因<sup>[1-2]</sup>。目前发现, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、白细胞介素 8、类胰岛素样生长因子与视网膜新生血管的生长密切相关<sup>[3]</sup>。经研究发现 VEGF 是最主要的促视网膜新生血管生长因子<sup>[4-5]</sup>, 目前其已成为多种新生血管抑制因子作用的靶点。近年研究表明内皮抑素、色素上皮衍生因子、血管抑素、可溶性 VEGF 受体阻断剂等可有效抑制新生血管的生成。

#### 1 内皮抑素

内皮抑素 (endostatin) 是血管周围基底膜部位的胶原 X、VIII 羧基末端的相对分子质量 (Mr) 为 20kD 的多肽片段, 从鼠血管内皮瘤细胞中分离而来, 体外实验表明它具有抑制内皮细胞增殖和新生血管生长的作用<sup>[6-7]</sup>。其包含三个主要片段: Mr 为 5kD 的 N-末端区域、中间蛋白酶敏感绞链区域和 C-末端内皮抑素区域, 其中 C-末端序列被认为是其发挥抗血管生成活性作用的关键。

内皮抑素通过以下机制发挥抗血管生成的作用: (1) 通过调节微血管内皮细胞表面相关尿激酶型纤溶酶原激活因子 (urokinase-type plasminogen activator, uPA) 和纤溶酶原激活因子抑制因子-1 (plasminogen activator inhibitor-1,

PAI-1)的分布,清除灶性黏附上的 uPA 受体,下调 uPA 系统,引起灶性黏附和肌动蛋白张力纤维网的解离而发挥抗血管生成作用<sup>[8]</sup>; (2) 下调细胞周期蛋白启动子活性,抑制细胞周期蛋白 D1 的 mRNA 转录和蛋白质在内皮细胞中的表达从而引起内皮细胞 G1 期阻滞和细胞凋亡<sup>[9]</sup>; (3) 内皮抑素可以与 VEGF 和 bFGF 竞争细胞表面的硫酸乙酰肝素糖蛋白结合位点,抑制内皮细胞增殖<sup>[10]</sup>,也可以通过减少内皮细胞一氧化氮合成酶(NOS)的磷酸化,减少一氧化氮(NO)的释放而抑制 VEGF 介导的内皮细胞迁移和血管形成<sup>[11]</sup>; (4) 内皮抑素还可通过含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteinyI aspartate specific proteinase, caspase)信号通路促进细胞凋亡来抑制血管新生。

内皮抑素作为最早发现的抑制新生血管生长的抑制因子,已被大量的实验研究及临床研究证实。重组人血管内皮抑素采用大肠杆菌作为蛋白表达体系,因其价格便宜且可大批量生产的优点使其成为了理想的抗新生血管形成类生物制剂。实验证实,重组人血管内皮抑素能通过抑制视网膜 VEGF 表达而抑制视网膜新生血管形成,且腹腔内注射有效<sup>[12]</sup>。为了探索更有效的抗血管生成途径,2014年, Bai 等<sup>[13]</sup>研究合成了一种 N 端含有 H1D/H3D 的内皮抑素(M-ES),并在随后的研究中将聚乙烯二醇(polyethylene glycol, PEG)加在了 H1D/H3D M-ES 上,合成 PEG-M-ES,并对其与锌离子结合及稳定性、迁移、增殖等进行了相关研究,结果首次表明 PEG-M-ES 在体内和体外都可以长期抑制眼底新生血管的生成,这可能预示一种新的治疗方案的形成。

## 2 色素上皮衍生因子

色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)最早是由 Tombrall-Tink 等<sup>[14]</sup>于 1989 年从胎儿视网膜色素上皮细胞培养上清中分离提纯而来,是一种 Mr 约为 50kD 的糖蛋白。在成人眼组织, PEDF mRNA 广泛表达于 RPE 细胞、视网膜内核层、光感受器和神经节细胞层,房水、玻璃体腔中也有较高浓度的 PEDF 存在<sup>[15-16]</sup>,其具有营养神经、抗新生血管、调节细胞生长及诱导细胞凋亡的作用。

正常眼组织中自身能够维持血管生成的稳定性是由血管生成刺激因子(如 VEGF)和血管生成抑制因子(如 PEDF)共同作用的结果,两者之间关系失衡是促使视网膜新生血管生成的最主要原因<sup>[17]</sup>。除了 VEGF 的直接增高,老龄化、低氧、高糖等原因引起的 PEDF 下调在促进新生血管形成过程中的作用也不容忽视。实验证明,在脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)模型小鼠玻璃体腔或视网膜下注射带有 PEDF 基因的腺相关病毒与未注射组对比,注射组的 CNV 比未注射组的明显减少,差异具有统计学意义<sup>[18]</sup>。PEDF 抑制血管生成的机制目前尚未明确,可能通过促进具有活性的内皮细胞凋亡、抑制内皮细胞的移行和增殖及与其它抑制血管生成的因子相互作用而实现。但 PEDF 并非对所有的新生血管都具有抑制作用,它只能抑制新生血管的形成,而对已经形成的新生血管无作用,体现出其具有“选择性”的特点<sup>[19]</sup>。

PEDF 是目前公认的最有效的血管抑制剂,大量研究已证实其具有高效性、安全性、特异性等独特的优越性<sup>[20]</sup>。为了使 PEDF 在视网膜中更稳定地表达,一些以病毒为载体介导的 PEDF 基因转导实验大量展开。Virginia

等将带有 PEDF 基因的腺相关病毒 2 型(adeno-associated virus type 2, AAV2)载体转移到小鼠视网膜上,实验证明 AAV2 介导的 PEDF 不仅可以在视网膜中稳定、持久表达,还可以通过下调视网膜中的 VEGF 表达水平,使视网膜新生血管形成的下游效应物减少以抑制视网膜新生血管的生成<sup>[21]</sup>。Yu 等<sup>[22]</sup>通过慢病毒介导 PEDF 的表达可有效地阻止激光治疗诱发的 CNV,其作用可持续 28d,与腺病毒表达持续时间短、需重复眼内注射和可能发生免疫反应等缺点相比,慢病毒载体似乎更加安全、有效,并具有能够长期稳定的基因表达、接受者免疫反应发生少的优点。Bai 等<sup>[23]</sup>将 PEG 修饰的 PEDF 与单纯的 PEDF 进行对比实验,结果发现 PEG 化的 PEDF 可以明显地抑制 VEGF 的分泌,且与单纯的 PEDF 治疗组存在着明显差异。PEDF 因其有效的神经营养作用及抗新生血管生成的作用已在眼部疾病治疗中广泛应用,这为视网膜新生血管的治疗提供了一个新的前景。

## 3 血管抑素

血管抑素(angiotain, AS)是 1994 年 O'Reilly 等<sup>[24]</sup>从 Lewis 肺癌小鼠血浆中提纯出的一个纤溶酶原片段,是一种特异性抑制血管内皮细胞(blood endothelial cell, BEC)增殖的因子,是迄今发现的最有效的血管抑制因子之一。O'Reilly 等对 AS 进行氨基酸测序分析发现其具有 4 个三环结构(即 Kringle 区)和部分 Kringle 5 区,依靠 3 个二硫键连接<sup>[25]</sup>,不同的 Kringle 区有不同的作用: Kringle 1 区主要影响 AS 的构象,对 BEC 的增殖具有中等程度的抑制作用,而对 BEC 细胞的移行无作用; Kringle 2 区和 Kringle 2~3 区表现为弱的 BEC 增殖抑制作用; Kringle 4 区抑制 BEC 增殖作用弱,而抑制移行作用较强; Kringle 5 区具有较强的抑制 BEC 增殖的能力<sup>[26]</sup>。

许多研究发现, AS 抗血管生成的作用机制可能表现为以下几点: (1) 下调体内 VEGF 表达水平; (2) 与细胞膜中的 ATP 合酶结合抑制内皮表面 ATP 代谢,从而抑制内皮细胞(endothelial cell, EC)增殖和迁移; (3) 促进 EC 凋亡; (4) 阻断整合素等黏附分子介导的 VEGF 信号通路; (5) 抑制诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,降低 NO 浓度<sup>[27-29]</sup>。但是, AS 具有在体内代谢速度较快,生物活性不够稳定,提纯蛋白费用较为昂贵,不易运输和储存等缺点,为其广泛应用带来了困难。目前,关于通过病毒、脂质体、质粒作为载体携带 AS 的基因治疗已经开展了大量的研究,结果表明,腺相关病毒载体系统具有安全性好、宿主范围广、无或低免疫原性、可长期表达等特性<sup>[30-31]</sup>,这也为以病毒作为载体的基因治疗在视网膜新生血管中的应用带来了希望。

## 4 可溶性 VEGF 受体阻断剂

VEGF 有三种跨膜受体: VEGF 受体-1(Flt-1)、VEGF 受体-2(在人体中称为 KDR, 在小鼠中称为 Flk-1)、VEGF 受体-3<sup>[32]</sup>。研究发现可溶性 Flt 受体-1(soluble Flt-1, sFlt-1), 是体内针对 VEGF 的天然抑制因子,首次于人脐静脉内皮细胞的培养液中分离出来<sup>[33]</sup>。sFlt-1 是 Flt-1 的细胞外区剪接形成的可溶性形式,可与 VEGF 功能受体 KDR/Flk-1 竞争结合 VEGF 起到间接抗新生血管作用<sup>[34]</sup>。动物实验表明, sFlt-1 可以抑制视网膜及脉络膜新生血管的发生、发展<sup>[35]</sup>。目前,眼科疾病基因治疗大多采用腺病毒和腺相关病毒作为基因转移载体,但是由于腺病毒及腺相关病毒应用的局限性,慢病毒载体具有更广



阔的应用空间。张敏等<sup>[36]</sup>发现慢病毒转导 sFlt-1 竞争结合 VEGF 间接导致 KDR/Flk-1 蛋白呈低水平表达的作用更为明显,初步肯定了 sFlt-1 基因转导在 RNV 疾病方面的治疗价值,但其安全性还需要进一步研究和考证。

### 5 基质金属蛋白酶组织抑制因子

基质金属蛋白酶组织抑制因子 (tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, TIMPs) 是一组内源性抑制因子,可以高度特异地抑制金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 或其前体,从而抑制其降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)。TIMPs 家族共有四个成员:TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4。2007 年,Mathalone 等<sup>[37]</sup>发现金属蛋白酶-2 (MMP-2)、金属蛋白酶-9 (MMP-9) 在视网膜发生缺血病变后立即增加,为正常对照组的两倍多,TIMP-1 中适度增加,提示在缺血视网膜病变中 MMP-9 与 TIMP-1 的比值失调促进了脉络膜血管内皮细胞的移行、增生和管腔的形成。TIMPs 抑制 MMPs 的机制可能为:(1)TIMP-2 与 pro-MMP-2 结合形成稳定的复合体而抑制 pro-MMP 酶原的自我激活;(2)TIMP-2 可直接与活化的 MMPs 等比例结合使其活性丧失;(3)TIMP-3 对 ECM 具有强亲和力,在局部发挥作用,因此作为 MMP 活性的有效局部抑制剂,其对限制新生血管的形成更具有针对性<sup>[38-39]</sup>。

### 6 VEGF siRNA

随着 RNA 干扰技术的日渐成熟及其在各个领域中的广泛应用,眼科医生看到了基因干扰在眼科领域中研究、治疗和药物开发上潜在可能性。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种在动植物中广泛存在的、通过双链 RNA 分子在 mRNA 水平上诱导特异性序列基因沉默的过程<sup>[40]</sup>。现研究认为 RNAi 的作用机制包括三个阶段:(1)起始阶段:dsRNA 在细胞内被切割成 siRNA;(2)效应阶段:siRNA 和内切酶及其它蛋白一起形成 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC),RISC 中 siRNA 变性后解开双链,其中的反义链引导 RISC 与同源的靶 mRNA 结合,在核酸内切酶的作用下切割 mRNA,被切割后的 mRNA 片段随即降解而使该基因的表达受到抑制;(3)扩增阶段:siRNA 在解开双链后,其反义链中的 RNA 可作为 RNA 合成的引物,以 mRNA 为模板形成一个新的 dsRNA。新的 dsRNA 再次被切割成 siRNA,以此反复,如此可在短时间内形成大量的 siRNA,有效地抑制 mRNA 翻译形成蛋白质或多肽,从而有效地抑制靶向基因蛋白质或多肽的合成<sup>[41]</sup>。随后开展的大量研究也证实了 siRNA 可有效降解 VEGF 的 mRNA,从而达到了抑制视网膜新生血管形成的作用<sup>[42-43]</sup>。

### 7 小结

综上所述,视网膜新生血管是威胁人们视力的重要危险因素之一,目前临床对视网膜新生血管的治疗有玻璃体切割术、视网膜激光及冷凝术、光动力疗法、玻璃体腔抗-VEGF 治疗等。但由于手术具有创伤性、风险大、副作用多、费用高,玻璃体腔注射需重复给药等原因,许多患者并未得到及时治疗。近年来发现的多种视网膜新生血管抑制因子为 RNV 的治疗提供了新的方向。视网膜新生血管的形成是一个长期的发展过程,而内源性视网膜新生血管抑制因子均是蛋白制剂,半衰期短,需反复注射,有增加感染和免疫反应等风险。通过病毒作为载体介导的因子可延长其在体内稳定表达的时间,降低感染及免疫反应的发

生率,其中针对 VEGF 的基因治疗更是为 RNV 的治疗打开了一扇新的大门,可能从根本上解决新生血管形成的问题。但我们仍需意识到,目前发现的多种新生血管抑制因子尚处于实验研究阶段,其抑制机制仍需进一步研究,临床应用的有效性 & 安全性仍值得进一步考究,这些都是我们亟待解决的问题。

### 参考文献

- Liu S, Liu M, Peterson S, et al. Hydroxyl radical formation is greater in striatal core than in penumbra in a rat model of ischemic stroke. *J Neurosci Res* 2003;71(6):882-888
- Nanetti L, Taffi R, Vignini A, et al. Reactive oxygen species plasmatic levels in ischemic stroke. *Mol Cell Biochem* 2007;303(2):19-25
- 唐世波, 万婷, 丁小燕. 加强视网膜新生血管发生发展机制研究, 为预防和治疗视网膜新生血管性疾病奠定基础. *中华眼底病杂志* 2010;26(3):199-202
- Saishin Y, Takahashi K, Melia M, et al. Inhibition of protein kinase C decreases prostaglandin-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *J Cell Physiol* 2003;195(2):210-219
- Shama N, Ianchulev T. Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis. *Ophthalmol Clin North Am* 2006;19(3):335-344
- Marneros AG, Olsen BR. Physiological role of collagen X VIII and endostatin. *FASEB J* 2005;19(7):716-728
- Bai YJ, Huang LZ, Zhou AY, et al. Antiangiogenesis effects of endostatin in retinal neovascularization. *J Ocul Pharmacol Ther* 2013;29(7):619-626
- Wickstrom SA, Veikkola T, Rehn M, et al. Endostatin - induced modulation of plasminogen activation with concomitant loss of focal adhesions and actin stress fibers in cultured human endothelial cell. *Cancer Res* 2001;61(17):6511-6516
- 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
- Karumanchi SA, Jha V, Ramchandran R, et al. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Mol Cell* 2001;7(4):811-822
- Urbich C, Reissner A, Chavakis E, et al. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *FASEB J* 2002;16(7):706-708
- 李彩云, 张奕霞, 陈宁宁, 等. 重组人血管内皮抑素对视网膜新生血管的抑制作用. *中华实用诊断与治疗杂志* 2013;27(10):990-992
- Bai Y, Zhao M, Zhang C, et al. Anti-angiogenic effects of a mutant endostatin: a new prospect for treating retinal and choroidal neovascularization. *PLoS One* 2014;9(11):e112448
- Tombran - Tink J, Johnson LV. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30(8):1700-1707
- Karakousis PC, John SK, Behling KC, et al. Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol Vis* 2001;30(7):154-163
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285(5425):245-248
- 底煜, 盖春柳, 郑坤, 等. 血管内皮生长因子和色素上皮衍生因子在实验性视网膜新生血管中的表达. *中国实用眼科杂志* 2011;29(10):1091-1093
- Mori K, Gehibach P, Yamamoto S, et al. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium - derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(6):1994-2000
- Bouck N. PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends Mol Med* 2002;8(7):330-334
- Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, et al. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment

- epithelium derived factor. *Proc Natl Acad Science USA* 2001;98(5):2593-2597
- 21 Haurigot V, Villacampa P, Ribera A, et al. Long-term Retinal PEDF overexpression prevents neovascularization in a murine adult model of retinopathy. *PLoS One* 2012;7(7):e41511
- 22 Yu YJ, Mo B, Liu L, et al. Inhibition of choroidal neovascularization by lentivirus-mediated PEDF gene transfer in rats. *Int J Ophthalmol* 2016;9(8):1112-1120
- 23 Bai YJ, Huang YJ, Xu XL, et al. Polyethylene glycol-modified pigment epithelial-derived factor: new prospects for treatment of retinal neovascularization. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;342(1):131-139
- 24 O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994;79(2):315-328
- 25 Stathakis P, Lay AJ, Fitzgerad M, et al. Angiostatin formation involves disulfide bond reduction and proteolysis in kringle5 of plasmin. *J Biol Chem* 1999;274(13):8910-8916
- 26 解孝锋, 毕宏生. 血管抑素对视网膜新生血管抑制作用的实验研究. 山东: 山东中医药大学硕士论文 2004
- 27 Cao Y, Chen A, An SSA, et al. Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth. *Biol Chem* 1997;272(36):22924-22928
- 28 Yadav L, Puri N, Rastogi V, et al. Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *J Clin Diagn Res* 2015;9(6):XE01-XE05
- 29 毕宏生, 崔彦, 解孝锋, 等. 血管抑素对视网膜新生血管的抑制作用及机制. *中国中医眼科杂志* 2006;16(3):168-171
- 30 Zhang W, Fulci G, Wakimoto H, et al. Combination of oncolytic herpes simplex viruses armed with angiostatin and IL-12 enhances antitumor efficacy in human glioblastoma models. *Neoplasia* 2013;15(6):591-599
- 31 徐维, 李伟. 腺相关病毒介导血管抑素对血管内皮生长因子和细胞间黏附分子1表达的影响. *中华老年心脑血管病杂志* 2011;13(4):361-364
- 32 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
- 33 Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1 and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226(2):324-328
- 34 Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001;26(1):25-35
- 35 El Sanharawi M, Touchard E, Benard R, et al. Long-term efficacy of ciliary muscle gene transfer of three sFlt-1 variants in a rat model of laser-induced choroidal neovascularization. *Gene Ther* 2013;20(11):1093-1103
- 36 张敏, 吴强, 宋蓓雯, 等. 可溶性 fms-样酪氨酸激酶受体-1 不同基因片段对视网膜新生血管的抑制作用. *中国眼底病杂志* 2016;26(3):219-222
- 37 Mathalone N, Lahat N, Rahat MA, et al. The involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9 in rat retinal ischemia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245(5):725-732
- 38 Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem Biophys Acta* 2000;1477(1-2):267-283
- 39 张士胜, 廖华等. MMP-9、TIMP-3 在小鼠脉络膜新生血管形成中的作用. *国际眼科杂志* 2008;8(8):1500-1503
- 40 Gondai T, Yamaguchi K, Miyano-Kurosaki N, et al. Short-hairpin RNAs synthesized by T7 phage polymerase do not induce interferon. *Nucleic Acids Res* 2008;36(3):e18
- 41 Singh N, Higgins E, Amin S, et al. Unique homologous siRNA blocks hypoxia-induced VEGF upregulation in human corneal cells and inhibits and regresses murine corneal neovascularization. *Cornea* 2007;26(1):65-72
- 42 Zhang XZ, Huang X, Qiao JH, et al. Inhibition of hypoxia-induced retinal neovascularization in mice with short hairpin RNA targeting Rac1, possibly via blockading redox signaling. *Exp Eye Res* 2011;92(6):472-481
- 43 孟丽珠, 陈松, 刘艳, 等. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$  小干扰 RNA 对糖尿病大鼠视网膜血管内皮生长因子 mRNA 抑制作用的动态观察. *中国眼底病杂志* 2011;27(3):245-249