

抑制角膜新生血管的研究

杨章晖,葛红岩,刘平

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 81300728)
作者单位:(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第一医院眼科医院
作者简介:杨章晖,在读硕士研究生,研究方向:角膜病、晶状体病。
通讯作者:刘平,教授,主任医师,博士研究生导师,研究方向:角膜病、晶状体病. ping_liu53@126.com
收稿日期:2015-07-20 **修回日期:**2015-11-11

Research on inhibition of corneal neovascularization

Zhang-Hui Yang, Hong-Yan Ge, Ping Liu

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (Youth Science Foundation) (No. 81300728)
Eye Hospital, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Ping Liu. Eye Hospital, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. ping_liu53@126.com
Received:2015-07-20 **Accepted:**2015-11-11

Abstract

• Corneal transparency is the basis of the normal physiological functions. However, corneal neovascularization (CNV) may occur in the infection, mechanical and chemical injury or under other pathological conditions, which make the cornea lose original transparency and severe visual impairment. In recent years, along with the development of immunology, molecular biology, biochemistry and other disciplines, there is more in-depth understanding on the CNV, and clinical treatment of CNV has made new breakthroughs. This article provides an overview of the inhibition of CNV.

• **KEYWORDS:** neovascularization; inhibition; vascular endothelial growth factor; treatment

Citation: Yang ZH, Ge HY, Liu P. Research on inhibition of corneal neovascularization. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2015;15(12):2071-2075

摘要

角膜的透明特性是其发挥正常生理功能的基础,但在感染、机械及化学损伤等病理情况下可以导致角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)生成,使其失去原有的透明性,严重损害视力。近年来,随着免疫学、分子生物学、生物化学等学科发展,对CNV的认识更加深入,临床上

CNV的治疗也不断取得新的突破。本文将主要对抑制角膜新生血管研究方面进行综述。

关键词:角膜新生血管;抑制;血管内皮生长因子;治疗
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.12.12

引用:杨章晖,葛红岩,刘平.抑制角膜新生血管的研究.国际眼科杂志2015;15(12):2071-2075

0 引言

角膜的无血管化是角膜区别于其他组织的重要特点,也是维持角膜透明性的基础。临床上很多角膜疾病均会造成角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV),尽管CNV一定程度上有利于感染的清除以及组织的修复,但却可使角膜正常的生理微环境改变,不再呈“免疫赦免”状态,使角膜失去透明性,引起严重的视力下降,因此,探讨角膜新生血管的发病机制及抑制研究成为当今的科研热点。

1 CNV 发病机制概述

生理情况下,角膜的无血管状态是由低水平的促血管生成因子及高水平的抗血管生成因子之间的平衡而形成的,在病理状态下,这种平衡一旦打破,便会出现角膜的新生血管。目前研究发现,在CNV形成过程中,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、白细胞介素(interleukin, IL)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)等细胞因子起重要作用。其中VEGF是公认的新生血管形成过程中最重要的细胞因子,Chang等^[1]实验证明VEGF通过与血管内皮细胞上的特异性受体结合,对内皮细胞产生强烈的促分化和趋化作用,从而促进血管内皮细胞增殖、迁徙、以及成管。在兔外伤及炎症性角膜新生血管模型中,伴随角膜新生血管及炎症因子的出现,VEGF mRNA的表达量较其在正常角膜中的表达量增加十余倍,提示VEGF在角膜新生血管的发生、发展过程中起关键作用^[2]。由单核细胞和巨噬细胞所产生的IL-1是炎症早期重要的细胞因子,IL-1可调节细胞外基质(EMC)的降解从而诱发新生血管,此外,其还通过增强VEGF和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达促进新生血管形成^[3]。Hisa等^[4]指出单纯疱疹性角膜炎CNV患者可能通过病毒本身直接激活黏着斑激酶(FAK),抑或角膜基质中浸润的炎症细胞释放细胞因子,激活FAK及其下游成员导致角膜组织中MMP-2分泌增加,从而促进角膜溃疡及CNV的形成。bFGF激活血管内皮细胞表面的FGFR1/FGFR2等受体后,多个信号通路如促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、1-磷脂酰肌醇-3-激酶(1-phosphatidylinositol 3-kinase, PI-3K)和蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)通路等同时被激活,引起血管内皮细胞增殖和移行^[5]。CNV的形成是

一个的众多血管生成因子相互作用和调节的复杂过程,对角膜血管形成赦免机制的多级过程进行综合性研究,阐明多种细胞分子之间的相互作用,以及它们影响血管生成和淋巴管血管生成的信号转导通路,从而来探索更为有效的治疗方法。

2 抑制 CNV

血管生成抑制因子对于维持角膜的透明状态起着至关重要的作用,其与血管生成因子之间保持动态平衡,共同维持角膜的无血管状态。

2.1 可溶性 fm 样酪氨酸激酶受体-1 可溶性 fm 样酪氨酸激酶受体-1(soluble fms-like tyrosine kinase receptor-1, Flt-1)是一种 fm 样酪氨酸激酶受体,是 VEGF 高度亲和受体,而 sFlt-1 则是由 VEGF 受体 cDNA 编码的 RNA 经选择性拼接后翻译的 Flt-1 的可溶性形式,与 Flt-1 相比,sFlt-1 缺少第七位上的免疫球蛋白样的结构域、跨膜序列以及胞浆结构域^[6]。sFlt-1 通过自身形成同源二聚体或者和 Flt-1 或完整 II 型 VEGF 受体形成异源二聚体,然后与 VEGF 高亲和力结合,从而竞争性地抑制 VEGF 与血管内皮细胞膜上 Flt-1 同源二聚体或完整 II 型 VEGF 受体同源二聚体结合,阻断 VEGF 对内皮细胞的刺激增殖作用,这样也可以达到抑制新生血管形成的目的。研究发现,正常角膜中存在的 VEGF,大部分是与 sFlt-1 结合,正因如此角膜才能维持透明的无血管状态,而血管化的角膜组织中,sFlt-1 含量则显著减少^[7]。Ambati 等^[8]在动物角膜内注射能够同时拮抗 Flt-1 及 sFlt-1 的 Flt-1 抗体,发现实验组角膜均逐渐血管化,其中的游离 VEGF-A 增多,而对照组角膜仍然透明。由此可以推断,sFlt-1 与 VEGF 结合很可能是抑制角膜新生血管的重要条件。

2.2 细胞凋亡诱导因子 细胞凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)是 1999 年克隆的第一个能够诱导 Caspase 非依赖性细胞凋亡的因子,是一类进化保守的黄素蛋白。Hisatomi 等^[9]研究了在敲除相关基因导致 AIF 缺乏的小鼠 VEGF 诱导 CNV 模型中,缺少 AIF 的实验组小鼠较野生型小鼠产生的 CNV 更加明显,同时发现 AIF 缺乏的新生血管化的角膜中巨噬细胞的数量明显增加,内皮细胞凋亡减少,血管生成位点增加,AIF 相关的细胞凋亡在新生血管形成中可能起着重要的作用。

2.3 Kelch 样 ECT2 互作蛋白 Kelch 样 ECT2 互作蛋白(Kelch-like ECT2 interacting protein, KLEIP) Kelch 蛋白包含一种特殊的模序:Kelch 样 ECT2(一种致癌基因)互作蛋白,KLEIP 在机体缺氧条件下产生,通过黏钙素调节细胞间的黏附。Hahn 等^[10]报道 KLEIP 有维持角膜内皮完整性的功能,在敲除表达 KLEIP 基因的小鼠模型中,由于 KLEIP 表达的缺失,小鼠角膜对于机械损伤相比于野生型小鼠更加敏感,表现出更多的 CNV。Kather 等^[11]发现敲除 KLEIP 基因的小鼠会发生角膜内皮营养不良,新生血管及淋巴管由 KLEIP-/-小鼠的角膜缘长向其营养不良的角膜内皮,而阻断 VEGF 信号通路并不能延缓或阻止 CNV 和新生淋巴管发展,相应的基因芯片检测同样未见明显的血管生成因子上调,可见,KLEIP 在角膜的完整性方面起重要调节作用。

2.4 内皮抑素 内皮抑素(endostatin, ES)是由哈佛大学的 O'Reilly 等从小鼠血管内皮细胞瘤培养液中分离出的一种新型蛋白质,相对分子质量约为 20kD,是胶原 XVIII 的蛋白降解产物,共 184 个氨基酸片段。它是由弹性蛋白

酶、基质金属蛋白酶、组织蛋白酶 L 等参与降解的,在角膜、虹膜、晶状体囊中均有表达^[12]。ES 可抑制内皮细胞的增殖和迁移、促进细胞凋亡、诱导细胞在内皮细胞周期 G1 期阻滞。李维义等^[13]在碱烧伤诱导的大鼠角膜新生血管模型中实验组局部给予 100mg/mL 重组人内皮抑素(rHES)点眼,对照组不予处理,结果 rHES 组角膜在碱烧伤后各时间点新生血管面积均小于阳性对照组,透射电镜检查显示 rHES 组较阳性对照组角膜结构变化小,表明 rHES 用于眼表可有效抑制碱烧伤诱导的角膜新生血管。葛红岩等^[14]通过 ES 基因点突变后,改变其碱基序列使其获得含 RGDGRD 串联重复序列产生聚合物效应,相较于野生型 ES,其抑制新生血管内皮细胞的黏附作用更强、更有效的抑制 CNV。

2.5 血小板反应蛋白 1 血小板反应蛋白 1(Thrombospondin-1, TSP-1)是一种重要的细胞外基质糖蛋白,最早是从培养细胞的上清液中分离出的一种新生血管抑制因子,TSP-1 广泛分布于全身多种组织中,在眼部主要表达在视网膜色素细胞中,参与损伤的修复、炎症反应和血管新生等许多病理过程。近年来,其抗肿瘤、抗血管新生的作用引起了广泛的关注。很多实验已表明 TSP-1 可以调控血管内皮细胞的黏附、移行和生长,能影响及调控血管内皮细胞的增殖、诱导内皮细胞的凋亡,也被公认为一种有效的内源性血管生成抑制因子^[15-16]。Aparicip 等^[17]将 CD36 表达载体转染到 CD36 缺乏的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)后可使细胞对 TSP-1 敏感,TSP-1 可抑制 HUVEC 的迁移和管状形成,这说明 CD36 是 TSP-1 发挥抗血管新生功能的重要受体。Jiménez 等^[18]证实 TSP-1 通过激活 CD36-Fyn-caspase-3-p38 MAPK 的级联反应激活其抑制血管生成的作用,同时也可诱导内皮细胞的凋亡。这种通路的激活使内皮细胞表达 Fas 配体的数量增加,内皮细胞对 Fas 的敏感性增强,抑制血管生成的作用也增强。TSP-1 还可通过以下两条途径抑制 VEGF 的活性:(1)TSP-1 抑制 MMP-9 的活化,抑制细胞外基质释放 VEGF,抑制新生血管的产生;(2)TSP-1 与 VEGF 相结合,介导 VEGF 的吸收和清除,从而起到抑制 CNV 的作用^[19]。

2.6 色素上皮细胞衍生因子 色素上皮细胞衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)是一种隶属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的糖蛋白,在视网膜色素上皮细胞、虹膜、睫状体和角膜中均有特异性表达。Dawson 等^[20]首先发现 PEDF 不仅具有神经营养和保护功能,还可通过抑制血管内皮细胞有丝分裂、诱导内皮细胞凋亡抑制血管形成,是维持角膜及玻璃体等组织无血管结构的主要因素。已有研究显示,PEDF 抑制血管可能是通过 Fas/FasL 系统介导的细胞凋亡起作用,其上调角膜 Fas 及 FasL 受体的表达,促进新生血管内皮细胞的凋亡以诱导 CNV 的退化^[21]。PEDF 是目前发现的最强的抗新生血管因子,其抑制血管新生的能力明显强于内皮抑素,血小板反应蛋白-1,以及血管抑素。PEDF 可以抑制多种新生血管形成因子的活性,如 VEGF、bFGF、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)等。随着研究的不断深入,PEDF 有望成为最具潜能的眼部疾病治疗药物之一。

2.7 血管抑素 血管抑素(Angiostatin, AS)是一个相对分子质量为 38kDa 的纤溶酶原片段,Murata 等^[22]将含有鼠 AS cDNA 的片段转染到 NRS-1 和 SCC-VII 鳞状细胞癌的小鼠,肿瘤的生长受到抑制,肿瘤组织内的血管生成明显

减少,凋亡细胞增加。Matsumoto 等^[23]采用 AS 滴眼液治疗碱性成纤维细胞生长因子诱导的 CNV,结果显示 CNV 生长受抑制。Veitonmaki 等^[24]报道,AS 可能通过 3 种信号传导途径使细胞凋亡:(1)通过 p53、Bax 和 tBid 基因的活化介导更多的细胞色素 C 进入细胞质,导致细胞凋亡;(2)通过 Fas mRNA 的上调、细胞型 Fas 相关死亡域样白介素-1 β 转换酶抑制蛋白的下调和半胱天冬氨酸酶的活化,通过 Fas 途径介导细胞凋亡;(3)通过 ATP 触发的凋亡途径。目前,AS 在美国进行的临床 I 期实验未显示剂量限制性毒性,不会诱发免疫反应,长期应用也不会耐药,具有良好的应用前景。但确切机制仍未完全阐明,需进一步研究。

2.8 Fas 配体 Fas 配体(Fas ligand)在正常角膜组织中广泛存在,它的存在是维持角膜免疫赦免状态的必要条件。在病理状态下的角膜中,fas 配体在炎症细胞及内皮细胞中与 fas 受体结合,引起细胞凋亡从而抑制新生血管的产生^[25]。Rodrigues 等^[26]研究表明,PEDF 抑制新生血管有可能是通过 fasL 介导的细胞凋亡,而上调角膜 fas/fasL 受体的表达,可促进新生血管内皮细胞的退化及 CNV 的退化。Stuart 等^[27]发现相比于野生型大鼠,敲除 fas 配体相关基因的小鼠更易产生 CNV。

2.9 金属蛋白酶组织抑制剂 金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitors of MMPs, TIMPs)是一组多基因家族的编码蛋白,广泛存在于体内,能在多种细胞因子诱导下产生,至今已经明确的有 4 个成员,分别为 TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 及 TIMP-4。TIMPs 是 MMPs 的特异性抑制物,MMPs 与 TIMPs 之间的动态平衡是保持 ECM 完整性的前提条件,这种平衡一旦被打破,便产生 CNV^[28]。有研究表明 TIMPs 的作用机制可能是与酶分子中的底物识别部位结合,并在酶的活性中心与催化所需的 Zn²⁺结合,抑制 MMPs 的活性,阻碍 VEGF 对内皮细胞的趋化作用,使 MMPs、VEGF 表达下调,抑制内皮细胞发展成管状结构,从而抑制 CRNV 的发生和进展^[29]。

3 临床应用

近年来,以参与新生血管病理机制的分子为靶向的药物,特别是抗 VEGF 药物的研究取得了很大进展,治疗效果也令人鼓舞。

3.1 贝伐单抗 贝伐单抗是人源化的重组单克隆免疫球蛋白 G1 抗体片段,可特异性结合人 VEGF 的所有亚型。Koenig 等^[30]随机选取了 27 例患有严重 CNV 的患者,给予贝伐单抗 5mg/mL,5 次/d 局部点眼,研究发现,病患 CNV 面积平均减少了 61%,同时新生血管的管腔直径平均减少了 24%。除了局部点眼,贝伐单抗还可通过结膜下注射抑制 CNV。Benayoun 等^[31]通过结膜下注射 2.5mg 贝伐单抗对 11 例 CNV 患者进行治疗,1wk 后所有患者 CNV 均明显减少。

3.2 雷珠单抗 雷珠单抗是一种高度相关性重组人源化单克隆抗体,其与贝伐单抗是从相同亲本鼠抗体获得,但雷珠单抗只有贝伐单抗相对分子质量的 1/3。雷珠单抗能特异性结合 VEGF-A 的所有亚型。Stevenson 等^[32]对 CNV 患者应用贝伐单抗及雷珠单抗结膜下注射进行对比治疗,结果发现,早期应用雷珠单抗患者的治疗效果优于应用贝伐单抗的患者,这可能与雷珠单抗相对分子质量较小,更易渗透入角膜有关,但应用雷珠单抗的患者停药 1mo 后 CNV 增多,可能与雷珠单抗半衰期较短有关,提示

雷珠单抗治疗 CNV 时应多次足量给药。

3.3 哌加他尼 哌加他尼是一种聚乙二醇化核酸适体,能够特异性结合 VEGF165 亚型,而 VEGF165 在所有 VEGF 亚型中被认为是引起 CNV 最重要的一种亚型。在碱烧伤诱导鼠 CNV 模型中,Sener 等^[33]将鼠分为四组,分别结膜下注射贝伐单抗(1.25mg/0.05mL),曲妥单抗(1.2mg/0.1mL),雷珠单抗(0.5mg/0.05mL)以及哌加他尼(0.3mg/0.1mL),四组小鼠 CNV 均减轻,且哌加他尼组与雷珠单抗组,曲妥单抗组治疗效果相当,三组短期效果均不及贝伐单抗组。正是由于哌加替尼只特异性结合 VEGF165 亚型,这一特性恰恰增加了用药的安全性,所以哌加他尼可以用于 CNV 的远期维持治疗。

3.4 多西环素 多西环素除了本身抗菌活性外,还有着较强的 Zn²⁺结合能力,能与 MMPs 酶活性中心的金属离子结合形成螯合物,竞争性抑制了 MMPs 与 Zn²⁺结合的催化活性位点,从而阻断 MMPs 降解胶原等细胞外基质,对新生血管的形成有较强抑制作用。Dan 等^[34]报道在鼠角膜碱烧伤新生血管模型中,应用多西环素凝胶局部涂眼,2wk 后发现鼠 CNV 明显减少。Su 等^[35]在鼠 CNV 模型中,眼表 1g/L 多西环素凝胶涂眼配合结贝伐单抗(2.5mg/0.1mL)结膜下注射,结果表明,多西环素联合贝伐单抗可有效减少单独应用贝伐单抗引起的例如角膜愈合延迟,角膜溃疡加重等副作用。多西环素对眼部的副作用及毒性在四环素类药物中最小,但结合 Zn²⁺的能力却最强,作为 CNV 抑制剂,多西环素潜力巨大。

3.5 改良 BIGH3 蛋白 BIGH3 基因亦称为 beta-igh3 基因(β -igh3)、TGFBI 基因,其产物是一个相对分子质量 68000 的蛋白质,称为 p68 β -igh3,是细胞外的一种基质蛋白,包含一个氨基端的分泌前导信号序列和一个位于密码子 642~644 间的羧基端 RGD 序列,该序列为精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸结构^[36]。RGD 序列作为整合素和其配体相互作用的识别位点,成为细胞外基质与细胞整合素间结合的强效竞争性拮抗剂,进而通过封闭整合素的信号转导通路而起到抑制新生血管的作用^[37]。RGD 肽具有聚合效应,重复 RGD 序列的 poly(RGD)要比单肽作用强^[38]。Ge 等^[39]通过定点诱变 PCR 法获得了含有 RGDRGD 膜序的 BIGH3 基因,通过 PCR 法,克隆其自第四个 FAS1 结构开始的 C 末端,构建其原核表达载体,表达纯化其有活性的含 RGDRGD 结构域 rhtBIGH3-(RGD)₂,并且改良 BIGH3 蛋白制成的滴眼液对兔角膜新生血管的抑制作用明显强于野生型 BIGH3 蛋白,且未见明显副作用^[40]。

3.6 KR-31831 作为一种氨基苯并吡喃类似物,KR-31831 是一种新型的人工合成抗局部缺血药物,以往常用于于心梗及中风等疾病的治疗,最近有研究表明 KR-31831 还具有抗新生血管作用^[41],这可能与其在新生血管发生过程中能够特异性下调 VEGFR2 和 MMP-2 有关。Park 等^[42]实验发现 KR-31831 通过抑制细胞内 Ca²⁺释放及细胞外调节蛋白激酶(ERK1/2)的活化从而下调 VEGF 的表达,起到抑制新生血管的作用。Kim 等^[41]在小鼠 CNV 模型中对 KR-31831 以及贝伐单抗的抗 CNV 作用进行了对比,发现局部应用 KR-31831 和贝伐单抗点眼的抗 CNV 效果大致相同,而结膜下注射 KR-31831 的效果要好于结膜下注射贝伐单抗。

3.7 糖皮质激素 局部应用糖皮质激素是目前临床角膜炎症和抗新生血管的标准治疗,1950 年即有糖皮质激素

素能够抑制 CNV 的报道^[43]。Hos 等^[44]分别局部应用氟米龙、泼尼松龙、地塞米松治疗鼠角膜缝线诱导的 CNV,发现各组 CNV 面积分别减少 30%、50%、57%。糖皮质激素通过抑制炎症因子活化、增殖、迁徙表达抗炎效应从而抑制 CNV^[45]。但由于糖皮质激素眼部长期应用过程中常发生后囊下白内障,继发性青光眼等副作用,故在临床应用过程中应密切监测眼压等指标变化。

3.8 非甾体抗炎药 研究表明,环氧化酶(COX)可促进花生四烯酸转化为前列腺素(PGE),在角膜中,PGE 可增强白细胞渗透,引起 VEGF 的上调,从而导致 CNV^[45]。消炎痛、氟比洛芬、酮咯酸、奈帕芬胺^[46]等非选择性非甾体抗炎药可能通过抑制 COX 的合成,降低 PGE 浓度,从而抑制 CNV。但有报道称,角膜长期局部应用 NSAIDs 可能造成角膜溃疡、角膜溶解等严重副作用^[47]。

3.9 基因治疗 基因治疗是将目的基因与表达载体通常是病毒 DNA 结合形成重组体,利用含重组体的病毒感染宿主细胞,通过宿主细胞中目的基因的表达来达到治疗目的。而角膜相对于其他人体组织,位置表浅容易接触,排斥概率低,使角膜病的基因治疗有独特优势。2001 年 Lai 等^[48]报道前房注射携有 sVEGFR 基因的重组腺病毒载体对抑制 CNV 有明显效果。在碱烧伤引起的 CNV 鼠模型中,实验组小鼠结膜下注射能够表达人血管抑素的重组腺病毒,相比于空白对照组,实验组小鼠 CNV 减少 56.6%^[49]。

3.10 激光及手术治疗 早在 1975 年即有氩激光治疗 CNV 的报道,氩激光束能够透过正常透明角膜,但血管内的血红蛋白却能够吸收绝大部分的氩激光能量,使得这种方法可以凝固角膜血管,从而治疗 CNV^[50]。光动力疗法治疗 CNV 是应用光敏化合物与血管内皮细胞上的低密度脂蛋白受体结合,通过激光的作用产生具有细胞毒性的氧自由基,造成血管内皮损伤和诱导血栓形成,从而使 CNV 退化^[51]。重度角膜损伤晚期患者常因角膜和角膜缘干细胞严重破坏,出现角膜全层混浊并新生血管化而失明,药物治疗效果不佳,而单纯角膜移植术后,角膜上皮持续缺损,且由于免疫排斥反应,失败率高,羊膜移植、羊膜移植联合角膜移植、羊膜移植和角膜缘上皮移植联合穿透性角膜移植,人工角膜及组织工程角膜移植,以上眼表重建手术可有效地阻截 CNV,可使移植区角膜表面血管在 2wk 后有所退化^[52]。

4 小结

角膜病是世界三大致盲眼病之一,中国公民因单眼和双眼角膜病致盲的盲人约四百万,占眼科致盲眼病的第 2 位^[6]。新生血管是大多角膜疾病过程中的重要病理改变。新生血管可破坏角膜免疫赦免,继发角膜水肿、混浊从而影响视力甚至致盲。角膜移植是治疗角膜病致盲的主要方法,但血管化植床的角膜移植排斥率高达 49%。新生血管发病机制至今尚未完全清楚,因此探索角膜新生血管形成机制及防治措施具有重要的理论价值和实际意义,将对防治 CNV、提高角膜移植的成功率,防盲、治盲都具有极其重要的现实意义。

参考文献

- Chang JH, Gabison EE, Kato T, et al. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12(4):242-249
- Amano R, Rohan R, Kuroki M, et al. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound - and inflammation - related

- cornealneovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(1):18-22
- Muller YA, Li B, Christinger HW, et al. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(14):192-197
- Hisa DA, Mitra SK, Hauck CR, et al. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol* 2003;160(5):753-767
- Ko MK, Kay Ep. Regulatory role of FGF-2 on type I collagen expression during endothelial mesenchymal transformation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(12):4495-4503
- Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med (Berl)* 1999;77(7):527-543
- Ambati BK, Patterson E, Jani P, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to the corneal antiangiogenic barrier. *Br J Ophthalmol* 2007;91(4):505-508
- Ambati BK, Nozaki M, Singh N, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* 2006;443(7114):993-997
- Hisatomi T, Nakao S, Murakami Y, et al. The regulatory roles of apoptosis-inducing factor in the formation and regression processes of ocular neovascularization. *Am J Pathol* 2012;181(1):53-61
- Hahn N, Dietz CT, Kühl S, et al. KLEIP deficiency in mice causes progressive corneal neovascular dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(6):3260-3268
- Kather JN, Friedrich J, Woik N, et al. Angiopoietin-1 is regulated by miR-204 and contributes to corneal neovascularization in KLEIP deficient mice. 2014;55(7):4295-4303
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88(2):277-285
- 李维义,高晓唯,任兵. 重组人内皮抑素抑制角膜新生血管的实验研究. *国际眼科杂志* 2009;27(8):688-693
- 葛红岩,肖楠,田雷,等. 改良内皮抑素基因对大鼠角膜新生血管中血管内皮生长因子及其受体表达的抑制作用. *中华实验眼科杂志* 2012;30(1):20-24
- Dawson DW, Volpert OV, Pearce SF, et al. Three distinct D-amino acid substitutions confer potent antiangiogenic activity on an inactive peptide derived from a thrombospondin-1 Type 1 repeat. *Mol Pharmacol* 1999;55(2):332-338
- Panetti TS, Kudryk BJ, Mosher DF. Interaction of recombinant peocollagen and preperdin modules of thrombospondin-1 with heparin and brin. *J Biol Chem* 1999;274(1):403-437
- Aparicio S, Sawant S, Lara N, et al. Hypoxia increase thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells. *J Lab Clin Med* 1998;132(6):519-529
- Jiménez B, Volpert OV, Crawford SE, et al. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 2000;6(1):41-48
- Kang SY, Watnick RS. Regulation of tumor dormancy as a function of tumor-mediated paracrine regulation of stromal Tsp-1 and VEGF expression. *Acta Pathologica Microbiologicaet Immunologica Scandinavica* 2008;116(7-8):638-647
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285(5425):245-248
- Rodrigues M, Turner O, Stolz D, et al. Production of reactive oxygen species by multipotent stromal cells/mesenchymal stem cells upon exposure to fas ligand. *Cell Transplant* 2012;21(10):2171-2187
- Murata M, Nakagawa M, Takahashi S. Inhibitory effects of plasminogen fragment on experimentally induced neovascularization of rat corneas. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;235(9):584-586
- Matsumoto G, Ohmi Y, Shindo J. Angiostatin gene therapy inhibits the growth of murine squamous cell carcinoma *in vivo*. *Oral Oncology* 2001;37(4):369-378
- Veitonmäki N, Cao R, Wu LH, et al. Endothelial cell surface ATP

- synthase-triggered caspase-apoptotic pathway is essential for k1-5-induced antiangiogenesis. *Cancer Res* 2004;64(10):3679-3686
- 25 Zhang SX, Ma JX. Ocular neovascularization: implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Prog Retin Eye Res* 2007;26(1):1-37
- 26 Rodrigues M, Turner O, Stolz D, et al. Production of reactive oxygen species by multipotent stromal cells/mesenchymal stem cells upon exposure to fas ligand. *Cell Transplant* 2012; 21(10):2171-2187
- 27 Stuart PM, Pan F, Plambeck S, et al. FasL-Fas interactions regulate neovascularization in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(1):93-98
- 28 van Waveren C, Sun Y, Cheung HS, et al. Oxidative phosphorylation dysfunction modulates expression of extracellular matrix - remodeling genes and invasion. *Carcinogenesis* 2006; 27(3):409-418
- 29 Ries C. Cytokine functions of TIMP-1. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(4):659-672
- 30 Koenig Y, Bock F, Horn F, et al. Short- and long-term safety profile and efficacy of topical bevacizumab (Avastin) eye drops against corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247(10):1375-1382
- 31 Benayoun Y, Adenis JP, Casse G, et al. Effects of subconjunctival bevacizumab on corneal neovascularization: results of a prospective study. *Cornea* 2012; 31(8):937-944
- 32 Stevenson W, Cheng SF, Dastjerdi MH, et al. Corneal neovascularization and the utility of topical VEGF inhibition: ranibizumab (lucentis) vs bevacizumab (avastin). *Ocul Surf* 2012;10(2):67-83
- 33 Sener E, Yuksel N, Yildiz DK, et al. The impact of subconjunctivally injected EGF and VEGF inhibitors on experimental corneal neovascularization in rat model. *Curr Eye Res* 2011;36(11):1005-1013
- 34 Dan L, Shi-long Y, Miao-li L, et al. Inhibitory effect of oral doxycycline on neovascularization in a rat corneal alkali burn model of angiogenesis. *Curr Eye Res* 2008;33(8):653-660
- 35 Su W, Li Z, Li Y, et al. Doxycycline enhances the inhibitory effects of bevacizumab on corneal neovascularization and prevents its side effects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(12):9108-9115
- 36 Poulson R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 2001;195(2):229-235
- 37 Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 2003; 24(24):4385-4415
- 38 Hahnfeldt P, Panigrahy D, Folkman J, et al. Tumor development under angiogenic signaling: a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy. *Cancer Res* 1999;59(19):4770-4775
- 39 Ge HY, Xiao N, Yin XL, et al. Comparison of the antiangiogenic activity of modified RGDRGD-endostatin to endostatin delivered by gene transfer *in vivo* rabbit neovascularization model. *Molecular Vision* 2011; 17:1918-1928
- 40 Ge H, Tian P, Guan L, et al. A C-terminal fragment BIGH3 protein with an RGDRGD motif inhibits corneal neovascularization *in vitro* and *in vivo*. *Exp Eye Res* 2013;112:10-20
- 41 Kim IT, Park HY, Choi JS, et al. Anti-angiogenic effect of KR-31831 on corneal and choroidal neovascularization in rat models. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(6):3111-3119
- 42 Park SY, Seo EH, Song HS, et al. KR-31831, benzopyran derivative, inhibits VEGF-induced angiogenesis of HUVECs through suppressing KDR expression. *Int J Oncol* 2008;32(6):1311-1315
- 43 Jones IS, Meyer K. Inhibition of vascularization of the rabbit cornea by local application of cortisone. *Proc Soc Exp Biol Med* 1950;74(1):102-104
- 44 Hos D, Saban DR, Bock F, et al. Suppression of inflammatory corneal lymphangiogenesis by application of topical corticosteroids. *Arch Ophthalmol* 2011;129(4):445-452
- 45 Castro MR, Lutz D, Edelman JL. Effect of COX inhibitors on VEGF-induced retinal vascular leakage and experimental corneal and choroidal neovascularization. *Exp Eye Res* 2004;79(2):275-285
- 46 Takahashi K, Saishin Y, Saishin Y, et al. Topical nepafenac inhibits ocular neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(1):409-415
- 47 Guidera AC, Luchs JI, Udell IJ. Keratitis, ulceration, and perforation associated with topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Ophthalmology* 2001;108(5):936-944
- 48 Lai CM, Brankov M, Zaknich T, et al. Inhibition of angiogenesis by adenovirus-mediated sFlt-1 expression in a rat model of corneal neovascularization. *Hum Gene Ther* 2001;12(10):1299-1310
- 49 Cheng HC, Yeh SI, Tsao YP, et al. Subconjunctival injection of recombinant AAV-angiostatin ameliorates alkali burn induced corneal angiogenesis. *Mol Vis* 2007;13:2344-2352
- 50 Reed JW, Fromer C, Klintworth GK. Induced corneal vascularization remission with argon laser therapy. *Arch Ophthalmol* 1975; 93(10):1017-1019
- 51 Al-Torbak AA. Photodynamic therapy with verteporfin for corneal neovascularization. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2012;19(2):185-189
- 52 Kajanne R, Miettinen P, Mehlem A, et al. EGF-R regulates MMP function in fibroblasts through MAPK and AP-1 pathways. *J Cell Physiol* 2007;212(2):489-497