

可溶性 VEGF 受体 1 在视网膜新生血管疾病中的研究进展

崔晓媛, 徐国兴

基金项目:福建省社会发展高校产学研合作项目(No. 2014Y4003)
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眼科 福建省眼科研究所
作者简介:崔晓媛, 硕士, 住院医师, 研究方向:晶状体、视网膜疾病。
通讯作者:徐国兴, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向:晶状体、视网膜病. fjmuxgx@163.com
收稿日期:2017-08-24 **修回日期:**2018-03-06

Research on soluble VEGF receptor 1 in retinal neovascularization

Xiao-Yuan Cui, Guo-Xing Xu

Foundation item: Industry-Academy Cooperation Project for Social Development of Fujian Province (No. 2014Y4003)
Fujian Institute of Ophthalmology; Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China
Correspondence to: Guo - Xing Xu. Fujian Institute of Ophthalmology; Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. fjmuxgx@163.com
Received:2017-08-24 Accepted:2018-03-06

Abstract

• The common feature of retinal neovascularization is the formation of pathological neovascularization. The primary one of endogenous retinal neovascularization factor in current research is vascular endothelial growth factor (VEGF). sFlt-1, the soluble form of splicing in mRNA extracellular region of VEGFR-1, which is short of intracellular tyrosine kinase domain can only encode the extracellular domain. Therefore, it only can bind with ligands but can not transmit signals, thus preventing the formation of neovascularization. sFlt-1, as a hot research topic in recent years, may provide a new gene therapy method for this disease. This review focus on the mechanism and research progress of sFlt-1 in retinal neovascularization.

• **KEYWORDS:** vascular endothelial growth factor; soluble vascular endothelial growth factor receptor 1; retinal neovascularization

Citation: Cui XY, Xu GX. Research on soluble VEGF receptor 1 in retinal neovascularization. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018; 18(4):649-651

摘要

视网膜新生血管性疾病共同特征是病理性新生血管形成。目前研究的内源性视网膜新生血管因子最主要的是 VEGF。可溶性 VEGF 受体 1 (sFlt-1) 是 VEGFR-1 的 mRNA 胞外区剪接形成的可溶性形式, 只编码胞外区, 缺乏细胞内酪氨酸激酶区域, 所以其仅具有与配体结合的能力, 而无信号转导能力, 从而阻止新生血管的形成。sFlt-1 作为近年来的研究热点, 有可能成为治疗该类疾病的新的基因治疗方法。本文就 sFlt-1 在视网膜新生血管疾病治疗中的作用机制及研究进展做一综述。

关键词: 血管内皮生长因子; 可溶性血管内皮生长因子受体 1; 视网膜新生血管

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.4.13

引用: 崔晓媛, 徐国兴. 可溶性 VEGF 受体 1 在视网膜新生血管疾病中的研究进展. *国际眼科杂志* 2018; 18(4):649-651

0 引言

视网膜新生血管性疾病的主要特征是病理性、增殖性的新生血管形成, 并伴有内皮屏障的破坏、血管渗漏, 可引起水肿、出血、视网膜脱离等, 这类疾病主要包括湿性年龄相关性黄斑变性 (wet age-related macular degeneration, wAMD)、糖尿病性视网膜病变、视网膜中央静脉阻塞、早产儿视网膜病变等^[1], 已成为世界范围的致盲性疾病^[2]。目前针对这类疾病, 主要是对症治疗、经瞳孔温热疗法、光动力疗法和反复、多次的玻璃体腔内注射抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的药物, 结合玻璃体切割术和激光光凝治疗等, 目前取得了可喜的效果。但部分患者疗效不佳, 且反复、多次进行玻璃体腔注射可能引起眼内炎等并发症, 严重者甚至发生视网膜萎缩^[3], 缺乏长期有效的治疗方法。可溶性 VEGF 受体 1 (soluble vascular endothelial growth factor receptor-1, VEGFR-1, sFlt-1) 的基因片段可以以腺病毒或慢病毒为载体^[4], 直接行玻璃体腔注射, 也可转染骨髓间充质干细胞或其它细胞得到稳定表达后行玻璃体腔或视网膜下注射, 在眼部新生血管疾病的应用前景十分广阔。

1 VEGF 与视网膜新生血管性疾病

1.1 VEGF 早在 1948 年, 研究人员推测缺氧可诱导视网膜产生一种促血管形成的因子。随后 Shweiki 等^[5]发现在缺氧组织内 VEGF 的表达量明显增高。Ohno-Matsui 等^[6]使用视紫红质启动子启动的 VEGF 转基因大鼠研究发现, 视网膜新生血管形成时大鼠视网膜内 VEGF mRNA 和蛋白质的表达量均明显增加, 证实 VEGF 与视网膜新生血管的形成密切相关。VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C 和 VEGF-D、VEGF-E 以及胎盘生长因子 (PLGF) 都是 VEGF 的家族成员, 其中 VEGF-A、VEGF-B 和 PLGF 主要与血管生成有

关,特别是 VEGF-A 对早期胚胎发生过程中的血管形成至关重要^[7]。VEGF 是一种由二硫键将两个 17~22kD 的亚单位连接而成的高度保守的分泌型同源二聚体糖蛋白,其分子量为 36~45kD^[8]。VEGF 广泛分布于人体的肝、脑、肾、眼等组织器官,正常眼的血管内皮细胞、视网膜色素上皮细胞等均可产生低水平的 VEGF,对维持血管的完整性起着重要作用,但其过度表达可增加血管壁的通透性,造成新生血管渗漏^[9]。

1.2 VEGF 受体 1990年,Shibuya 等^[10]从人类胎盘中分离出编码新型酪氨酸激酶(TK)受体的基因。TK 受体在细胞外区域具有 7 个免疫球蛋白(Ig)样结构域,以及 60 个氨基酸长度的激酶插入序列的 TK 结构域,命名为 Fms 样 TK-1(Flt-1),现称为 VEGFR-1。VEGFR-1 基因全长 7680bp,编码 1338 个氨基酸,该受体的结构由 3 部分构成:胞外区、跨膜区、含有酪氨酸激酶的胞内区。胞外区 7 个 Ig 样结构域负责与配体 VEGF 结合,促进血管形成^[11]。除此之外还有 VEGFR-2,与配体亲和力较低。VEGFR-1、VEGFR-2 主要通过蛋白激酶(protein kinase C,PKC)通路和磷脂酰肌醇(phosphoinositide-3 kinase,PI3K)通路介导新生血管的形成^[12]。近年来对视网膜新生血管治疗方法的研究主要集中在直接针对 VEGF 上,而忽略了 Flt-1 及 sFlt-1 的潜在治疗意义^[13]。

2 可溶性 VEGF 受体的结构及作用机制

2.1 sFlt-1 的结构 VEGFR-1 基因主要产生两种蛋白:全长蛋白即 Flt-1 和 sFlt-1^[12]。1993 年,Kendall 和 Thomas 首次描述了 sFlt-1^[11]。sFlt-1 是由胞外区的 Flt-1 mRNA 选择性剪接所形成,是 Flt-1 的可溶性形式,其在体内天然存在,来源于血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、角膜上皮细胞以及胎盘滋养细胞等。分子结构上仅有细胞外序列,缺乏细胞内酪氨酸激酶区,因此它只具有与配体 VEGF 结合的能力,没有后续信号转导的能力,故可与功能受体竞争性结合其配体 VEGF,从而达到拮抗 VEGF 的生物学效应效果^[14]。sFlt-1 只具有 Flt-1 胞外区的第 1~6 Ig 样结构域,其中结构域 1 是分泌信号序列;结构域 2 和 3 是与配体结合的主要功能区,但与配体的亲和力较弱;结构域 4 不直接参与与配体 VEGF 的结合,但它参与受体的二聚体化,与配体有较强的亲和力,可协助 sFlt-1 的主要功能区与 VEGF 结合^[15]。

2.2 sFlt-1 抑制新生血管形成的机制 sFlt-1 是目前发现的唯一一个内源性 VEGF 抑制剂^[16-17],主要通过以下两种分子机制发挥作用:(1)即上述的 sFlt-1 可与 VEGF 高度结合,与 VEGFR-1 竞争性结合 PLGF、VEGF-A,与 VEGFR-2 竞争性结合 VEGF-A,竞争性抑制 VEGF 与其功能受体的结合,从而有效降低了与 VEGFR 结合的游离配体 VEGF 的浓度。游离 VEGF 属于细胞外 VEGF,其还包括基质结合型 VEGF、由纤溶酶及金属蛋白酶降解所形成的活化 VEGF 片段。sFlt-1 可作为基质结合型 VEGF 与 VEGFR 结合,形成无活性的二聚体,或与胞外 VEGF 结合,避免其被纤溶酶及金属蛋白酶降解活化,从而抑制毛细血管芽的生长,发挥抗新生血管的作用^[18]。(2)sFlt-1 还可与完整的 VEGFR-1 结合,或与完整的 VEGFR-2 结合,形成异源二聚体,从而竞争性抑制 VEGF 与其功能受体的结合,降低可结合的 VEGFRs 的数量,阻滞 VEGF 的正常信号转导,阻断 VEGF 对视网膜血管内皮细胞的刺激增殖作用^[19]。因此增加体内 sFlt-1 的水平,可竞争性结

合游离 VEGF,并减少有功能的 VEGFRs 的数量,从而减少视网膜新生血管的形成^[11,16]。但上述两种机制哪种发挥主要作用,目前还存在争论。

3 sFlt-1 的研究应用进展

2000 年,Chen 等^[20]进行了体外细胞实验,通过磷酸钙共沉淀法将含有 VEGF 和 sFlt-1(pCMV-VEGF 和 pCMV-sFlt-1)的质粒转染人胚胎肾(HEK)-293 细胞。将转染后的 HEK-293 细胞培养 24h 后收集其条件培养液,通过将³H 胸苷加入人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中用以测试条件培养液对血管生成的影响,观察到由 sFlt-1 基因转染的 HEK-293 细胞的条件培养液显著抑制由 VEGF 诱导的 HUVECs 中³H 胸苷的量,该研究结果提示 sFlt-1 基因转移可以抑制血管内皮细胞的 VEGF 诱导的 DNA 合成。

2004 年,Rota 等^[21]使用大鼠早产儿视网膜病变模型,证明了腺相关病毒(AAV)介导的 sFlt-1 基因几乎能够完全抑制缺血诱导的视网膜新生血管的形成,而不影响先前存在的视网膜血管。2005 年,Lai 等^[22]分别在小鼠和猴子眼中注射腺病毒介导的 sFlt-1 基因,检测到其表达分别高达 8mo 和 17mo。sFlt-1 的表达与 85% 的 trVEGF029 眼中新血管的长期(8mo)消退有关。此外,它还可维持视网膜形态。同年,Le 等^[23]给予 14 只米格鲁猎犬和 9 只恒河猴单眼视网膜下 rAAV。sFlt-1(血清型 2,4 或 5)注射,随访研究 2mo 评估术后情况,对 3 只狗和 1 只灵长类动物进行长期研究。在 23 只视网膜下注射的动物(无论是否有玻璃体切除术)中,其中 20 只有转基因的表达,并且所有研究对象均未检测到炎症反应。长期研究中,在狗注射 rAAV-2 后 36mo、注射 rAAV-4 和 rAAV-5 后 24mo 以及灵长类动物注射 rAAV-4 后 18mo,仍可检测到转基因的表达。血管造影检查视网膜无异常,功能评估显示注射眼 ERG 幅度与未注射的对侧眼相似。这表明,rAAV。sFlt-1 转基因表达对人眼基因治疗的应用有广阔的前景。2012 年,Lai 等^[24]在灵长类动物眼中做了类似的实验,证明了视网膜下注射 AAV2。sFlt-1 的基因治疗具有良好的安全性和耐受性,有望长期用于治疗眼部新生血管性疾病。同年,Javanmard 等^[25]检测了糖尿病视网膜病变患者体内 VEGF 和 sFlt-1 的浓度,结果表明 sFlt-1 的整合作用降低可能是导致 VEGF 促进血管内皮细胞生成并使其渗透性增高的原因。VEGF 与抗血管生成因子 sFlt-1 之间的不平衡可能与糖尿病性黄斑水肿的发生有关。

2015 年,Rakoczy 等^[26]进行了 1 期临床随访试验,9 例 wAMD 患者随机分为 3 组,分别接受 1×10^{10} 载体基因组(vg; 低剂量 rAAV。sFLT-1 组)、 1×10^{11} vg(高剂量 rAAV。sFLT-1 组)、无基因治疗(对照组),所有患者在基线和第 4wk 接受雷珠单抗治疗,结果未发现与药物有关的不良事件,轻度的手术相关不良反应均可自主恢复,未发现脉络膜视网膜萎缩。2016 年,Constable 等^[27-28]进行了为期 2a 的随机临床试验,32 例 wAMD 患者在基线和第 4wk 均接受雷珠单抗注射,其中 21 例患者同时接受 rAAV。sFlt-1(1×10^{11} vg)注射,所有患者每 4wk 直至第 52wk 进行疗效评估,结果未发现与 rAAV。sFlt-1 相关的严重不良事件。在 rAAV。sFlt-1 组中,治疗后的最佳矫正视力(BCVA)的中位数为 1.0(-3.0~9.0)。rAAV。sFlt-1 组患者视力不变或改善 12 例(57%),而对照组患者视力不变或改善仅 4 例(36%)。基因治疗组雷珠单抗再治疗

的中位数为 2.0 (1.0 ~ 6.0) 次, 而对照组为 4.0 (3.5 ~ 4.0) 次。2017-05, Constable 等^[4]进行了为期 3a 的 1 期临床随机剂量递增试验, 8 例 wAMD 患者被随机为基因治疗组和非基因治疗组。治疗组 3 例受试者视网膜下注射低剂量 (1×10^{10} vg) rAAV. sFlt-1, 3 例注射高剂量 (1×10^{11} vg) rAAV. sFlt-1, 所有受试者在基线和第 4wk 接受玻璃体内注射雷珠单抗, 研究发现视网膜下注射与玻璃体切割术在该队列中耐受性均良好, 表明 sFlt-1 基因治疗具有良好的安全性和耐受性, 可考虑长期治疗相关疾病。

2017-07, Moore 等^[29]专家提出, AMD 基因治疗的未来方向将集中在优化载体、启动子和递送方法上, 并评估慢性表达抗血管生成或抗补体蛋白的风险。以上从体外细胞实验、体内动物实验到临床试验, 都表明了 sFlt-1 在基因治疗方面的潜力和良好的前景。

4 展望

人体眼球是一个相对独立的器官, 因此眼部疾病特别适合基因治疗。基因治疗是抑制眼内新生血管的理想治疗手段, 目前已有多种药物进入临床试验阶段。玻璃体腔或视网膜下注射能稳定表达抗新生血管蛋白的转基因治疗也是未来的热门研究方向。但 sFlt-1 基因治疗新生血管性疾病仍然存在临床试验样本数量较少、病毒对人体的安全性、最低有效剂量以及远期并发症等一系列问题亟待解决。

参考文献

- Lawrence PF, Oderich GS. Ophthalmologic findings as predictors of carotid artery disease. *Vasc Endovascular Surg* 2002;36(6):415-424
- Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China. *N Engl J Med* 2010;362(12):1090-1101
- Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15(6):385-403
- Constable IJ, Lai CM, Magno AL, et al. Gene Therapy in Neovascular Age-related Macular Degeneration: Three-Year Follow-up of a Phase 1 Randomized Dose Escalation Trial. *Am J Ophthalmol* 2017; 177: 150-158
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359(6398):843-845
- Ohno-Matsui K, Hirose A, Yamamoto S, et al. Inducible expression of vascular endothelial growth factor in adult mice causes severe proliferative retinopathy and retinal detachment. *Am J Pathol* 2002;160(2):711-719
- Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312(5):549-560
- Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and the eye: biochemical mechanisms of action and implications for novel therapies. *Ophthalmic Res* 1997;29(5):354-362
- Paulus YM, Sodhi A. Anti-angiogenic Therapy for Retinal Disease. *Handb Exp Pharmacol* 2017;242:271-307
- Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990;5(4):519-524
- Owen LA, Uehara H, Cahoon J, et al. Morpholino-mediated increase

in soluble Flt-1 expression results in decreased ocular and tumor neovascularization. *PLoS One* 2012;7(3):e33576

12 Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem* 2013;153(1):13-19

13 张敏, 吴强, 贾丽丽, 等. 慢病毒介导 sFlt-1 基因转移抑制视网膜新生血管的实验研究. *眼科研究* 2010;28(11):1029-1034

14 Wu FT, Stefanini MO, Mac GF, et al. A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use. *J Cell Mol Med* 2010;14(3):528-552

15 Farnia P, Bandehpour M, Ghanavi J, et al. Cloning and expression of soluble vascular endothelial growth factors receptor-1 (sFlt-1) fragments in CHO-K1. *Int J Clin Exp Med* 2013;6(9):773-778

16 asumi Y, Mizukami H, Urabe M, et al. Soluble FLT-1 expression suppresses carcinomatous ascites in nude mice bearing ovarian cancer. *Cancer Res* 2002;62(7):2019-2023

17 Shiose S, Sakamoto T, Yoshikawa H, et al. Gene transfer of a soluble receptor of VEGF inhibits the growth of experimental eyelid malignant melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(9):2395-2403

18 肖美春, 王晓寒, 汪枫桦. 可溶性血管内皮生长因子受体-1 在年龄相关性黄斑变性中的作用和应用前景. *上海交通大学学报* 2017; 37(9):1297-1302

19 张静, 刘晓惠. 可溶性血管内皮生长因子受体 1 的研究进展. *中华临床医师杂志* 2015;9(19):3625-3629

20 Chen H, Ikeda U, Shimpo M, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by transfection with the soluble FLT-1 Gene. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36(4):498-502

21 Rota R, Riccioni T, Zaccarini M, et al. Marked inhibition of retinal neovascularization in rats following soluble-flt-1 gene transfer. *J Gene Med* 2004;6(9):992-1002

22 Lai CM, Shen WY, Brankov M, et al. Long-term evaluation of AAV-mediated sFlt-1 gene therapy for ocular neovascularization in mice and monkeys. *Mol Ther* 2005;12(4):659-668

23 Le MG, Weber M, Péréon Y, et al. Postsurgical assessment and long-term safety of recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into the retinas of dogs and primates. *Arch Ophthalmol* 2005;123(4):500-506

24 Lai CM, Estcourt MJ, Himbeck RP, et al. Preclinical safety evaluation of subretinal AAV2. sFlt-1 in non-human primates. *Gene Ther* 2012;19(10):999-1009

25 Javanmard SH, Hasanpour Z, Abbaspoor Z, et al. Aqueous concentrations of VEGF and soluble VEGF receptor-1 in diabetic retinopathy patients. *J Res Med Sci* 2012;17(12):1124-1127

26 Rakoczy EP, Lai CM, Magno AL, et al. Gene therapy with recombinant adeno-associated vectors for neovascular age-related macular degeneration: 1 year follow-up of a phase 1 randomised clinical trial. *Lancet* 2015;386(10011):2395-2403

27 Constable IJ, Blumenkranz MS, Schwartz SD, et al. Gene Therapy for Age-Related Macular Degeneration. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 2016;5(4):300-303

28 Constable IJ, Pierce CM, Lai CM, et al. Phase 2a Randomized Clinical Trial; Safety and Post Hoc Analysis of Subretinal rAAV. sFLT-1 for Wet Age-related Macular Degeneration. *EBioMedicine* 2016;14:168-175

29 Moore NA, Bracha P, Hussain RM, et al. Gene therapy for age-related macular degeneration. *Expert Opin Biol Ther* 2017;17(10):1235-1244