

角膜新生血管发生机制及治疗研究新进展

叶芬¹, 於翔², 黄振平¹

基金项目:中国南京军区南京总医院科研基金资助项目(No. M2011057)

作者单位:¹(210002)中国江苏省南京市,南京大学医学院临床学院南京军区南京总医院眼科;²(210002)中国江苏省南京市,南京军区机关医院耳鼻咽喉科

作者简介:叶芬,在读硕士研究生,研究方向:角膜病、白内障。

通讯作者:黄振平,医学博士,主任医师,研究方向:角膜病、白内障、屈光手术。hzp19633@hotmail.com

收稿日期:2012-08-13 修回日期:2012-12-04

Progress on mechanism and therapeutic of corneal neovascularization

Fen Ye¹, Xiang Yu², Zhen-Ping Huang¹

Foundation item: Scientific Research Fund of Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, China (No. M2011057)

¹ Department of Ophthalmology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China; ² Department of E. N. T, Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China

Correspondence to: Zhen-Ping Huang. Department of Ophthalmology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. hzp19633@hotmail.com

Received: 2012-08-13 Accepted: 2012-12-04

Abstract

• Normal cornea is in stabile angiogenic privilege statement with many factors' effects, which is also the basement for cornea to maintain normal physiology functions. However, angiogenesis forms the pathophysiological basis of some disease. Because the balance between cornea angiogenic and antiangiogenic factors is broken and corneal neovascularization (CNV) switch turned on. CNV usually causes and aggravates corneal clouding and corneal graft rejection. It is one of the reasons leading to blindness. In the recent years, with the development of immunology, molecule biology and pharmacology, there are a lot of break on the cognition of CNV. This review mainly discusses corneal neovascularization mechanism and the therapeutic advance of CNV.

• KEYWORDS: corneal neovascularization; mechanism; treatment

Citation: Ye F, Yu X, Huang ZP. Progress on mechanism and therapeutic of corneal neovascularization. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(1):82-84

摘要

正常角膜在多种因素共同作用下处于稳定的“血管赦免”状态而保持角膜的透明性,这也是角膜发挥正常生理功能的基础。然而一系列临床疾病的病理过程中,角膜血管生成因子和抑制因子的平衡被打破,角膜血管化开关开启。角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)常引起并加重角膜混浊和角膜移植排斥反应,是重要的致盲原因之一。近年来,随着免疫学、分子生物学和药理学的发展,对CNV的认识有很大突破,本文重点对CNV的形成机制以及治疗研究进展加以综述。

关键词:角膜新生血管;发病机制;治疗

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.01.20

引用:叶芬,於翔,黄振平.角膜新生血管发生机制及治疗研究新进展.国际眼科杂志2013;13(1):82-84

0 引言

角膜无血管状态的维持是一个积极主动地过程,然而一些特定的条件下,微血管可以从角膜缘血管丛侵入角膜,导致角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)的发生。炎症失调、角膜移植排斥反应、碱灼伤、角膜溃疡、角膜干细胞缺失等均能引起CNV的发生^[1]。

1 发生机制

CNV的确切发生机制并不明确,主要有以下两种理论。

1.1 促血管生成因子与抗血管生成因子失衡理论 角膜中含有许多血管因子,主要可以分为两大类:促血管生成因子,例如血管内皮细胞生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞因子(bFGF)等,促血管生成辅助蛋白:核心蛋白多糖、激素受体样激酶(ALK-1);抗血管生成因子,例如内皮抑素(ES)、血管生成抑素等。目前研究较为成熟的促血管生成因子为:VEGF, bFGF。VEGF最初作为血管渗透性的刺激因子被发现,随后证明对内皮细胞有特异性促有丝分裂和促血管生成作用。其中VEGF-A在血管形成方面作用最为显著,可以通过促进内皮细胞的增殖和迁移,蛋白水解活化以及微血管形成来促进CNV发生。此外,VEGF通过旁分泌机制,增加血管通透性,有利于新生血管和基质细胞的生长^[2]。而bFGF促进血管平滑肌细胞及内皮细胞增殖,参与炎症反应和损失组织修复过程。目前推测,细胞基底膜可能是bFGF的储存库,使其与促血管生成因子隔离,起到抗血管形成作用^[3]。目前研究热点聚集于VEGF和bFGF的相互作用。最近研究表明,在血管形成过程中,bFGF和VEGF介导的信号通路存在相互作用,共同维持血管的完整性^[4,5],而基质金属蛋白酶7(MT1-MMP)可能是连接两种促血管形成路径的因子之一。MT1-MMP可以使bFGF诱导的VEGF表达上调,增强CNV发生^[6]。1月龄的小鼠在MT1-MMP基

因剔除 3wk 后死亡。然而具体的作用途径和机制有待进一步研究。

促血管生成辅助因子包括:核心蛋白多糖、激素受体样激酶等。核心蛋白多糖属于富含亮氨酸的小蛋白聚糖家族,与多种细胞外基质蛋白相互作用,参与胶原纤维形成的调节。Schönherr 等^[7]利用碱烧灼 CNV 模型,发现核心蛋白多糖缺失的小鼠 CNV 显著减少,证明核心多糖参与 CNV 的形成。激素受体样激酶使内皮细胞从 G₁ 期进入细胞周期,进行增殖,并通过内皮细胞骨架的动力学的修饰来调节内皮细胞的移形^[8]。

血管形成抑制因子主要为:ES 和血管生成抑素。ES 具有抗血管生成特性,可以有效地抑制 bFGF 诱导角膜 CNV 在体内形成,以及在体外由 VEGF 诱导的内皮细胞增殖和迁移。ES 可以将血管内皮细胞周期阻滞在 G₁ 期,同时可以阻止血管内皮生长因子在血管内皮细胞上的结合位点,从而促进血管内皮细胞发生凋亡。血管生成抑素由原发性肿瘤分泌,在机体创伤后,抑制内皮细胞的移形和增殖,诱导内皮细胞的凋亡,从而参与维持角膜无血管状态。

1.2 角膜缘血管屏障理论 角膜缘是角膜上皮干细胞对损伤的角膜上皮细胞更新的场所。研究发现在角膜干细胞缺乏或者实验性损伤角膜缘时,角膜新生血管和炎症大量增加,同时在角膜缘干细胞移植的时候,大量 CNV 出现。因此提出角膜缘屏障假说:认为角膜上皮细胞通过角膜缘不断地更新,角膜基质板层胶原排列规则紧密,具有屏障功能,阻止了血管的侵入,从而作为一个物理屏障来阻止结膜和导管的过度增长^[9]。角膜水肿状态下,紧密排列的层状胶原分开,屏障功能受到破坏,不能阻止角膜缘新生血管长入,于是形成 CNV^[10]。然而这一理论不能解释一些特殊的病例如角膜营养不良、角膜内皮失代偿等,可以发生角膜基质水肿和屏障功能破坏,但不出现 CNV。因此目前认为角膜缘屏障功能破坏并非 CNV 发生的唯一机制,可能与其他机制相互作用共同导致 CNV 的发生。

2 临床治疗

持久而有效的病因治疗是 CNV 相关疾病治疗的核心。从对传染性角膜炎进行抗菌疗法,到对自身免疫性疾病的系统性免疫抑制疗法,随着 CNV 发病机制的研究,治疗方法也取得了很大进展。

2.1 药物治疗

2.1.1 抗炎化合物治疗 例如类固醇,被长期用于抑制炎症及相关血管生成性疾病的治疗。通过抑制趋化现象和细胞因子的合成来抑制 CNV。然而,这些化合物广泛的副作用以及对非炎症性 CNV 的治疗限制均阻碍了治疗效果。非甾体抗炎药已经广泛用于眼表疾病的治疗:包括构成型 COX-1 和诱导型 COX-2。COX-2 可显著抑制 CNV,这一作用于吡罗昔美辛——一种非选择性 COX-1 抑制剂的抗血管生成作用类似。此外,局部应用 IL-1 受体拮抗剂,如奥曲肽、环孢素 A、血管抑素、螺内酯、沙利度胺、姜黄素、血小板活化因子拮抗剂等均显示抗血管生成活性。

2.1.2 抗 VEGF 治疗 贝伐单抗是一种能特异性中和 VEGF 的单克隆抗体,抑制内皮细胞的有丝分裂,抑制 CNV。Manzano 通过局部滴用一定浓度的贝伐单抗滴眼液,可抑制大鼠 CNV^[11]。兰尼单抗是另一种抗血管内皮

生长因子抗体,已被批准使用在 AMD 的治疗上。将其结膜下注射以及局部涂药,可用于治疗单纯疱疹病毒性角膜炎,复发性翼状胬肉,角膜排斥反应移植和 Stevens Johnson 综合征^[12]。然而它也会损伤角膜上皮的完整性,这可能是由于抗 VEGF 治疗阻碍了正常的血管内皮生长因子对角膜神经的修复作用,从而影响角膜神经生长和修复,其药物治疗的适当剂量级安全性还有待进一步的研究

2.1.3 替代性药物治疗 如蜂胶提取物、儿茶素-3-没食子酸、白藜芦醇等。巴西蜂胶乙醇提取物可以在体内抑制肿瘤诱导的血管生成,在体外通过诱导细胞凋亡来抑制内皮细胞的肿瘤形成。蜂胶提取物治疗 CNV 是通过抑制 VEGF, MMP-2 和 MMP-9 的分泌来抑制血管的增殖和管壁的塑形。绿茶中含有儿茶素源性多酚复合物,儿茶素通过减少血管生成因子,特别是 VEGF 和 MMP-2 和 MMP-9^[13],来抑制 CNV。白藜芦醇是一种多酚类化合物,在红酒和其他葡萄制品中含量丰富。据报道,它具有抗肿瘤活性,并且这种活性似乎与细胞类型无关。体外研究显示,白藜芦醇抑制血管内皮细胞和血管平滑肌细胞的增殖和移形,以及两种主要地促血管形成因子 VEGF 和 MMP-2 的表达,从而抑制 CNV。

2.1.4 实验阶段药物治疗 如 ES、抑制血小板衍生生长因子 β 链(PDGF-β)、维生素 D 等。ES 是内源性血管生成抑制物,可抑制血 VEGF 在角膜细胞表达,促进内皮细胞凋亡以及抑制内皮细胞的迁移。同时抑制 MT1-MMP 的活化,从而抑制角膜新生血管的形成。PDGF-β: PDGF 是强有力的促有丝分裂因子,抗-PDGFR-β 抗体抑制 PDGF-B 信号传导,阻断内皮细胞或周细胞之间的联系,使其变得不稳定。将抗-PDGFR-β 抗体与抗-VEGF 联合治疗,能有效改善抗 VEGF 治疗受血管成熟度的影响的缺陷,显著提高治疗效果^[14]。维生素 D:局部应用 1α,25(OH)₂D₃,随着浓度的增高可有效抑制小鼠朗格汉斯细胞的迁移和 CNV,其作用机制与抑制相关细胞因子有关。研究发现,1α,25(OH)₂D₃可抑制角膜上皮细胞分泌 IL-1α,IL-1β 和 IL-8,而 IL-1 可诱导郎罕细胞迁移,IL-8 能诱发 CNV。

2.2 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。基因治疗要求外源基因的导入必须是安全、有效、无致畸活性,基因产物能够持续表达,机体对产物没有不良反应及治疗细胞有合理的生存期。基因治疗的成功取决于多种因素,包括选择合适的疾病,具有将目的基因释放到治疗部位的技术,保证治疗基因在适当的细胞以恰当的水平表达等。因为眼球具有体积小,组织结构紧密。基因治疗的靶点为:VEGF,VEGF 的反义寡核苷酸——指一类人工合成的反义脱氧核糖核酸、VEGF 受体、VEGF 的 RNA 干扰等;ES、色素上皮衍生因子(PEDF)、血管生成抑素(AS)、纤溶酶原 K-5、血管内皮细胞生长抑制因子等^[15]。基因治疗为角膜新生血管提供了新的治疗途径。目前基因治疗在动物实验中的成功预示着不久的将来能用于临床。

2.3 手术治疗

2.3.1 激光治疗 氩激光能诱导血管凝结,从而导致血管退化。630nm 激光深部穿透的光动力学法(Photodynamic

Therapy, PDT)可破坏肿瘤并选择性破坏相关的新生血管。514nm 氩激光 PDT 可有效的治疗 IL-2 诱发的 CNV, 角膜水肿以及脂质角膜病均能显著地改善症状, 提高生活质量。然而, 氩激光直接凝固封闭位于角膜缘处的单支和吻合很少的 CNV 效果较好, 但对密集吻合成网的 CNV 效果较差^[16]。目前研究一种局限性光凝法, 通过凝血激活的炎症级联反应, 导致血管内皮生长因子上调, 从而对广泛的 CNV 进行治疗, 这将是一种全新的尝试。

2.3.2 电解针烧灼法和细针透热法 Wertheim 提出使用电解针烧灼法对 3 例脂质角膜病变伴有 CNV 的患者进行治疗, 3 例患者在手术后 8mo 的血管仍然闭塞^[17]。另一种类似方法是细针透热, 使用 3/8 弧不锈钢针(带 10-0 单丝黑尼龙线)接近角膜缘, 用一个单极电疗探头与 10-0 针接触, 产生凝血, 可封闭 50% ~ 100% 的 CNV。尽管这些方法安全性高但是治疗效果有限, 也许与药物治疗协同治疗时会产生更好的效果。

2.3.3 眼表重建手术 包括角膜缘移植、角膜缘移植联合板层或穿透性角膜移植、培养的角膜缘干细胞移植、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, 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^[18]。然而, 手术并发症以及移植并发症的发生不得不起大家的关注。目前倾向于将其作为最后的治疗手段并与药物治疗相结合。

3 小结

CNV 是多种病理因素共同作用形成的, 尽管研究很多, 并且取得了许多突破和进展, 但是目前的实验及临床研究多局限于单个或数个因素的研究, 未来的研究方向是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 CNV 治疗方法。

参考文献

- 1 Penn JS, Madan A, Caldwell RB, *et al*. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2008;27(4):331-371
- 2 Bjorndahl MA, Cao R, Burton JB, *et al*. Vascular endothelial growth factor - a promotes peritumoral lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res* 2005;65(20):9261-9268
- 3 Kettunen P, Karavanova I, Thesleff I. Responsiveness of developing dental tissues to fibroblast growth factors: expression of splicing alternatives of FGFR1, -2, -3, and of FGFR4; and stimulation of cell proliferation by FGF-2, -4, -8, and -9. *Dev Genet* 1998;22(4):

374-385

- 4 Weis SM, Lindquist JN, Barnes LA, *et al*. Cooperation between VEGF and beta3 integrin during cardiac vascular development. *Blood* 2007;109(5):1962-1970
- 5 Komarova Y, Malik AB. FGF signaling preserves the integrity of endothelial adherens junctions. *Dev Cell* 2008;15(3):335-336
- 6 Onguchi T, Han KY, Chang JH, *et al*. Membrane type-1 matrix metalloproteinase potentiates basic fibroblast growth factor - induced corneal neovascularization. *Am J Pathol* 2009;174(4):1564-1571
- 7 Schönherr E, Sunderkötter C, Schaefer L, *et al*. Decorin deficiency leads to impaired angiogenesis in injured mouse cornea. *J Vasc Res* 2004;41(5):499-508
- 8 Kojima T, Hang JH, Zar DT. Rngiogenic role of ephrinB1/EphB1 in basic fibroblast growth factor - induced corneal angiogenesis. *Am J Pathol* 2007;170(2):764-773
- 9 Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004;29(5):265-273
- 10 Nespoli A, Vercillo R, di Nola L, *et al*. Alk1 and Alk2 are two new cell cycle-regulated haspin-like proteins in budding yeast. *Cell Cycle* 2006;5(13):1464-1471
- 11 Albe E, Chang JH, Azar NF, *et al*. Proteomic analysis of the hyaloid vascular system regression during ocular development. *J Proteom Res* 2008;7(11):4904-4913
- 12 Yoeruek E, Ziemssen F, Henke-Fahle S, *et al*. Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol* 2008;86(3):322-328
- 13 Sen T, Moulik S, Dutta A, *et al*. Multifunctional effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in downregulation of gelatinase-A (MMP-2) in human breast cancer cell line MCF-7. *Life Sci* 2009;84(7-8):194-204
- 14 Jo N, Mailhos C, Ju M, *et al*. Inhibition of platelet-derived growth factor B signaling enhances the efficacy of anti-vascular endothelial growth factor therapy in multiple models of ocular neovascularization. *Am J Pathol* 2006;168(6):2036-2053
- 15 Okazaki T, Ni A, Ayeni OA, *et al*. alpha5beta1 integrin blockade inhibits lymphangiogenesis in airway inflammation. *Am J Pathol* 2009;174(6):2378-2387
- 16 Saika S. Yin and yang in cytokine regulation of corneal wound healing: roles of TNF-alpha. *Cornea* 2007;26(9 Suppl 1):S70-74
- 17 Wertheim MS, Cook SD, Knox-Cartwright NE, *et al*. Electrolysis-needle cauterization of corneal vessels in patients with lipid keratopathy. *Cornea* 2007;26(2):230-231
- 18 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