

色素上皮细胞衍生因子与脉络膜新生血管性疾病

韩渊慧, 谢伯林, 杨建宇, 姜 蕾

基金项目: 中国云南省昆明医学院研究生创新基金资助项目
作者单位: (650032) 中国云南省昆明市, 成都军区昆明总医院眼科中心
作者简介: 韩渊慧, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。
通讯作者: 谢伯林, 主任医师, 主任, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病、眼外伤。 bolin_xie@tom.com
收稿日期: 2009-11-16 修回日期: 2010-02-25

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2010. 03. 037

韩渊慧, 谢伯林, 杨建宇, 等. 色素上皮细胞衍生因子与脉络膜新生血管性疾病. 国际眼科杂志 2010; 10(3): 517-519

PEDF and choroidal neovascular diseases

Yuan-Hui Han, Bo-Lin Xie, Jian-Yu Yang, Lei Jiang

Foundation item: Kunming Medical College Graduate Innovation Fund, China
Eye Center, Kunming General Hospital of Chengdu Military Region, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Correspondence to: Bo-Lin Xie. Eye Center, Kunming General Hospital of Chengdu Military Region, Kunming 650032, Yunnan Province, China. bolin_xie@tom.com
Received: 2009-11-16 Accepted: 2010-02-25

Abstract

• Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is a relative molecular weight 50 000 secreting protein and a member of the serp in super-family. Recent studies demonstrated that PEDF has multiple biological functions, including antiangiogenic, neurotrophic and neuroprotective properties. It has recently been shown that PEDF is the most potential endogenous inhibitor of angiogenesis in eyes. PEDF has a wide prospect for treatment of human neovascular diseases and retinal degenerative diseases. Finding of PEDF brings new hope for treatment of neovascular diseases. Research progresses in PEDF and the relations between PEDF and choroidal neovascular diseases are reviewed.

• **KEYWORDS:** pigment epithelium-derived factor; choroidal neovascular diseases

Han YH, Xie BL, Yang JY, *et al.* PEDF and choroidal neovascular diseases. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010; 10(3): 517-519

摘要

色素上皮细胞衍生因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) 是一种分泌蛋白, 相对分子量为 50 000, 属于丝氨酸超家族的一员。近年来大量研究发现 PEDF 具有多种生物学功效, 包括抗新生血管、神经营养及神经保护功能。PEDF 是最有效的内源性眼部新生血管抑制物。PEDF 对于治疗血管增生性疾病及视网膜变性疾病具有广阔的前景, 就近年来关于 PEDF 的研究进展及其与脉络膜新生血管性疾病的相关研究进展给以综述。

关键词: 色素上皮细胞衍生因子; 脉络膜新生血管性疾病

0 引言

色素上皮衍生因子由 Tombran-Tink 等于 1989 年首次发现, 并从胎儿视网膜色素上皮细胞分泌物中通过离子交换最初分离出。PEDF 是相对分子量为 50 000 的蛋白质, 是一个没有抑制作用的丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族成员, 但它不是蛋白酶的抑制剂, 而是他们的底物。目前发现 PEDF 是多功能蛋白, 具有神经营养的、亲神经元的、神经保护作用的、抗肿瘤的、抗新生血管的、抗血管通透性的特性。

1 色素上皮衍生因子

1.1 PEDF 的产生及分布 免疫荧光检测人尸体眼发现在视网膜内核层、神经节细胞层、脉络膜、睫状体、角膜上皮细胞、角膜内皮细胞、RPE 细胞以及光感受器均有 PEDF 存在, 提示这些细胞可能具有合成和分泌 PEDF 的能力^[1]。有研究发现, 在人胎儿和牛的眼睛中, PEDF 的表达局限在视网膜色素上皮层, 分泌到周围的光感受器基质中间^[2]。胎儿 7wk 时, 可在 RPE 与光感受器细胞中发现 PEDF; 18wk 时, 可在光感受器间基质 (interphotoreceptor matrix, IPM) 检测出, 但是 PEDF 在早期发挥的作用并没有明确^[3]。另外两个 PEDF 的主要表达部位在角膜和睫状上皮^[4]。玻璃体、房水中也含有 PEDF, 依物种不同, 玻璃体内 PEDF 浓度为 1 ~ 2mg/L^[5]。除眼部有 PEDF 的分泌与分布外, 新近发现, 人脑组织、脑脊液中也有 PEDF 存在。已明确中枢神经系统中腹侧角运动神经元可以分泌 PEDF, 室管膜细胞也可产生 PEDF。另外, PEDF 在肝、睾丸、卵巢、胎盘等组织也有分布, 血浆中也可以提纯出 PEDF, 约 5g/L^[6]。

1.2 PEDF 抑制新生血管的功能 Dawson 等在 1999 年首次发现 PEDF 还具有很强的抑制血管的作用, 现已经从眼内分离出多种能抑制血管生成的蛋白质, 如血管他丁、内皮他丁、抗凝血酶 III、血小板因子 IV 等, 其中仅 PEDF 对维持这些眼内角膜、玻璃体等组织无血管状态具有重要作用^[7]。在所有的抗新生血管因子中作用最强的 PEDF, 其抑制血管新生的能力明显强于内生抑制素制管素^[8]。实验证明^[9], PEDF 可以在体内拮抗多种管新生因子, 并能完全抑制它们活性的发挥。有相应的假说认为 PEDF 赋予了玻璃体良好的抗血管新活性, 它可能也是角膜、玻璃体免受新生血管影响的应因子。现已有大量的动物及临床试验证明, PEDF 能够抑制角膜、脉络膜、视网膜新生血管的形成。Ogata 等^[10]测定糖尿病视网膜病变、孔源性视网膜剥离或特发性黄斑裂孔而经受玻璃体切除术患者的玻璃体液 PEDF 中的含量, 发现糖尿病视网膜病变的 PEDF 浓度低, 活动性者显著低于非活动性者, 而 VEGF 呈现相反改变。证明了 PEDF 具有抑制眼新生血管形成

的生理活性。Duh 等^[11]用人重组 PEDF 治疗视网膜新生血管小鼠模型,发现提高 PEDF 浓度能抑制视网膜新生血管形成。Gao 等^[12]在氧诱导的视网膜新生血管大鼠模型中也发现视网膜病理新生血管形成与血管抑制剂和血管刺激剂之间的平衡被打破有关,这一发现进一步证明了 PEDF 作为血管抑制剂参与了眼后段新生血管形成的调节。

1.3 PEDF 抑制新生血管的机制 研究表明,新生血管的形成不仅与诱导新生血管因子浓度增高有关,而且与抗血管新生因子水平低有关。现在有多种关于 PEDF 抗新生血管的机制研究。

1.3.1 针对新生血管内皮细胞的作用机制 Stellmach 等^[13]认为 PEDF 可能是通过促进活化的血管内皮细胞凋亡,使血管内皮细胞对缺氧诱发的新生血管的信号不起反应,当 PEDF 处理的动物缺血性视网膜和用赋形剂所处理的对照组相比较,前者凋亡的内皮细胞数比后者高 8 倍左右^[14]。Hutchings 等^[15]的研究表明, PEDF 通过抑制成纤维母细胞生长因子(FGF)对内皮细胞的修复从而抑制血管新生。研究者通过 PEDF 对糖尿病视网膜病变患者视网膜内皮细胞作用的研究发现, PEDF 对不同表型的内皮细胞具有不同的,甚至是相反的作用。同时 PEDF 也抑制了血管内皮生长因子(VEGF)诱导的 MAPK 的激活,从而抑制了血管新生。Ren 等^[16]发现 VEGF 与受体结合后,受体自动磷酸化激活 Src FAK Ras 信号传导途径,形成独特信号,调节细胞增殖和移动。当 PEDF 与整合蛋白结合后能释放蛋白酪氨酸磷酸酶阻止 VEGF 受体磷酸化,从而阻断此信号传导通路,减少了 VEGF 引起的血管内皮细胞的增殖和移动。PEDF 抑制血管新生依赖 Fas/FasL 介导的细胞凋亡途径,正常内皮细胞,不表达 Fas 受体,能够对抗 PEDF 诱导的细胞凋亡,而 VEGF 等新生血管诱导因子诱导产生的内皮细胞表达 Fas 受体, PEDF 上调 FasL,通过 Fas/FasL 相互作用,引发细胞凋亡反应,这就解释了 PEDF 选择性抑制新生血管增生的能力,即只针对新生血管作用,而对已成熟血管无抑制及诱导凋亡的作用。PEDF 对内皮细胞的抑制作用呈剂量依赖性,其半数有效剂量为 0.4 nmol/L 是目前用抑制内皮细胞移行方法测得的活性最高的抑制因子。在超过 1.0 nmol/L 剂量时 PEDF 可以抑制碱性成纤维细胞生长因子诱导的毛细血管内皮细胞增殖,抑制率可达 40%^[17]。

1.3.2 针对新生血管周细胞作用机制 有研究认为 PEDF 通过其抗氧化特性对周细胞的保护作用而减少新生血管的形成,糖尿病性视网膜病变患者的最早病理改变为视网膜微血管周细胞丧失及功能障碍,细胞培养证明, AGEs 损伤培养的周细胞, PEDF 可保护周细胞免受 AGEs 的损伤,这一过程是通过 PEDF 的抗氧化特性来实现的^[18]。另有研究证明, PEDF 能够通过它的抗氧化的特性以及经由谷胱甘肽过氧化物酶途径阻止高糖和过氧化氢诱导的周细胞的凋亡和功能障碍^[19]。

1.3.3 针对新生血管促进因子 VEGF 作用机制 PEDF 还能阻止 VEGF 在 T 细胞中的表达^[20],血管紧张素 II 能够显著的提高 VEGF 的水平。PEDF 能够阻止 Ang-II 介导的活性氧簇在 MOLT-3 T 细胞中的产生。H₂O₂ 能够上调 VEGF mRNA 在 MOLT-3 细胞中的水平并有一定的剂量依赖性。PEDF 通过抑制活性氧簇的产生来抑制 Ang-II 介导的 VEGF 在 MOLT-3 T 细胞中的增高。但 PEDF 不会阻止血管紧张素 II 和其受体的结合^[21]。

2 脉络膜新生血管性疾病

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)以往多被称为视网膜下新生血管(subretinal neovascularization, SRN),是眼内新生血管的重要表现形式之一,变性、遗传、炎症、肿瘤、外伤等多种原因均可导致脉络膜新生血管的发生,但 CNV 不是一个单独的疾病,而是许多视网膜脉络膜疾病共有的一种体征,与其相关的疾病至少有 40 余种,是眼科临床常见的一大类致盲性疾病,如年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD),病理性近视(pathological myopia)黄斑变性、特发性 CNV 以及外伤等。其中 AMD 是发达国家老年人视力丧失的首要原因。CNV 较多见于黄斑区,其原因可能为黄斑区视网膜具有高代谢、高需氧等特性,且血管分布又不同于其他部位。血管生成是一个复杂的过程,首先血管舒张、血管通透性增加、周围基质降解,接着内皮细胞(endothelial cells, EC)活化、移行、增生、出芽生长并形成管腔,最后新生血管成熟、重塑构成血管网多种细胞因子参与新生血管的生成的调控,其中血管生成因子与血管抑制因子之间的平衡破坏是主要的因素之一。CNV 的发生机制尚未完全阐明,通常认为, CNV 生成与 RPE-Bruch 膜-脉络膜毛细血管复合体完整性的改变有关。视网膜外层的缺氧状态也可能参与了 CNV 的生成过程。来自脉络膜毛细血管的新生血管增生并穿过 Bruch 膜向内生长,进入 Bruch 膜与视网膜色素上皮层之间或者色素上皮与视网膜神经感觉层之间。CNV 现有激光光凝、手术、药物及放射等多种治疗方法,但因 CNV 发生机制尚未阐明,且其特殊的血管层构造,导致目前的治疗方法均有限,或处于探索阶段,不能有效防治其发生、发展及复发,因 CNV 的发生和发展过程中有多种细胞因子及信号转导通路参与调控,随着 CNV 生成机制研究的深入,积极寻找对 CNV 病因抑制新生血管的有效疗法,将为未来从根本上治愈 CNV 性疾病提供可能。

3 PEDF 与脉络膜新生血管性疾病

现有大量实验结果证实, PEDF 在患有 CNV 患者的玻璃体中的缺乏导致了 AMD 的发生。PEDF 随着年龄的的增长在玻璃体和房水中浓度的降低在 AMD 患者中是尤为显著的^[22]。在激光诱导的脉络膜新生血管实验中,损伤后的不同时期视网膜和玻璃体内 PEDF 的浓度,明显下降, PEDF 表达和脉络膜新生血管(CNV)呈负相关。但经过全视网膜光凝治疗成功后, PEDF 的表达增加^[23],进一步说明了 PEDF 与脉络膜新生血管的密切相关性。Gehlbach 等^[24]用 AdPEDF.11 眼周注射治疗激光诱导 CNV 模型,发现 AdPEDF.11 能抑制激光诱导的 CNV。Rasmussen 等^[25]在玻璃体腔内注射 Ad(GV)PEDF(1 × 10⁸ ~ 1 × 10⁹)能够显著抑制激光诱导的脉络膜新生血管鼠模型、VEGF 转基因鼠模型及早发性视网膜病模型所造成的新生血管化,且高达 85%。Mori 等^[26]用 rho/VEGF 转基因鼠及激光损伤所致 CNV 鼠模型进行实验,14d 及 21d 分别处死一部分激光损伤所致 CNV 的小鼠及 rho/VEGF 转基因鼠,测定 CNV 及视网膜下新生血管的基线水平。剩下的小鼠给予玻璃体注射或视网膜下注射以腺病毒为载体的 PEDF AdPEDF.11,对照组注射腺病毒的空载体(AdNull.11)。结果显示注药 7d 后 rho/VEGF 鼠组和 10d 后激光诱导组中,实验组血管增生的量远低于基线水平,并且明显低于空载体组及未注射组。TUNEL 法染色示视网膜下注射 AdPEDF.11 组脉络膜血管增生区可见 TUNEL 染色阳性

细胞,新生血管退化,血管内皮细胞凋亡。说明 PEDF 不仅可抑制视网膜和脉络膜新生血管形成,还可逆转已形成的新生血管。Mori 等^[27]利用腺相关病毒(AAV)载体介导的 PEDF 进行实验,给予 C57BL/6 鼠玻璃体腔内及视网膜下注射腺相关病毒(AAV)载体介导的 PEDF 及对对照物 AAV2 绿荧光蛋白(AAV2GFP),4~6wk 后用激光破坏 Bruch's 膜,结果显示注药 6wk 后实验组眼内的 PEDF 水平为 6~70ng,CNV 明显减少,但空载体组和未注射组没有区别。以上相关试验均说明 PEDF 对于抑制 CNV 的有效性。

4 展望

当今 CNV 性疾病的治疗方法包括激光凝固或冷冻杀死小范围的细胞,减缓视力的下降。但由于这种治疗在保护视网膜的同时会引起视力的有限损害,而且它们的疗效会由于异常新生血管的复发而减弱。PEDF 作为一种有效的神经营养和保护因子,具有强大的抗病理性血管形成功能,能够在增加疗效的同时最大限度地保护视力。在以 PEDF 作为药物治疗的大量实验中,Wong 等^[28]证实,其具有相对安全性,而且其抑制新生血管的作用具有选择性,大量实验表明,PEDF 对于已成熟的血管无作用,只针对正在形成的和新生血管作用,在体外实验中^[29],证明其高效性。因此 PEDF 具有有广阔的临床应用前景。

参考文献

- 1 Karakousis PC, John SK, Behling KC, et al. Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in develop ing and adult human ocular tissues. *Mol Vis* 2001;30(7):154-163
- 2 Awson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor;a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285(5425):245-248
- 3 孔怡淳.色素上皮源性因子在眼科研究中的进展.眼科研究 2006;12(24):662-664
- 4 Tombran-Tink J, Shivaram SM, Chader GJ, et al. Expression,secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor,a serpin with neurotrophic activity. *J Neurosci* 1995;15(Pt1):4992-5003
- 5 Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T, et al. Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2002;137(4):348-353
- 6 Petersen SV, Valnickova Z, Enghild JJ. Pigment epithelium derived factor (PEDF) occurs at a physiologically relevant concentration in human blood. Purification and characterization. *Biochem J* 2003;374(Pt1):199-206
- 7 Tombran-Tink J, Barnstable CJ. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor. *Nat Rev Neurosci* 2003;4(8):628-636
- 8 Department of Micryobiology-Immunology,Robert H. PEDF: antiangiogenic guideline of ocular function. *Trends Mol Med* 2002;8(7):330-334
- 9 Holekamp NM, Bouck N, Volpert O. Pigment epithelium-derived factor idificent in the vitreous ofpatientswith choroidal neovascularization duto age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2002;134(2):220-227
- 10 Ogata N, Tombran-Tink J, Nishikawa M, et al. Pigment epithelium-derived factor in the vitreous is low in diabetic retinopathy and high in rhexmatogenous retinal detachment. *Am J Ophthalmol* 2001;132(3):378-382
- 11 Duh EJ, Yang HS, Suzuma I, et al. Pigment epithelium-derived fac-

- tor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(3):821-829
- 12 Gao W, Tombran-Tink J, Elias R, et al. *In vivo*protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(7):1646-1652
- 13 Stellmatch 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 Sci* 2001;98(5):2593-2597
- 14 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 Sci USA* 2001;98:2593-2597
- 15 Hutchings H, Maitre-Boube M, Tombran-Tink J, et al. Pigment epithelium-derived factor exerts opposite effects on endothelial cells of different phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294(4):764-769
- 16 Ren JG, Jie C, Talbot C. How PEDF prevents angiogenesis;a hypothesized pathway. *Med Hypotheses* 2005;64(1):74-78
- 17 Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium derived factor; a Potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285(5425):245-248
- 18 樊小娟,张小玲.糖尿病视网膜病变发病机制中 VEGF 与 PEDF 的研究进展.国际眼科杂志 2007;7(2):485-488
- 19 Amano S, Yamagishi S, Inagaki Y, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits oxidative stress-induced apoptosis and dysfunction of cultured retinal pericytes. *Microvasc Res* 2005;69(1-2):45-55
- 20 Aparicio S, Sawant S, Lara N, et al. Expression of angiogenesis factors in human umbilical vein endothelial cells and their regulation by PEDF. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;326(2):387-394
- 21 Witmer AN, Vrensen GF, VanNoorden CJ, et al. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Ret Eye Res* 2003;22(1):1229
- 22 Holekamp NM, Bouck N, Volpert O. Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2002;134(2):220-227
- 23 Renno RZ, Youssri AI, Michaud N, et al. Exp ression of pigment epithelium2derived factor in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(5):1574-1580
- 24 Gehlbach P, Demetriades AM, Yamamoto S, et al. Periocular injection of an adenoviral vector encoding pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Gene Ther* 2003;10(8):637-646
- 25 Rasmussen H, Chu KW, Campochiaro P, et al. Clinical protocol. An open-label, phase I, single administration, dose2escalation study of ADGVPEDF. 11D(ADPEDF) in neovascular age2related macular degeneration(AMD). *Hum Gene Ther* 2001;12(16):2029-2032
- 26 Mori K, Gehlbach P, Ando A, et al. Regression of ocular neovascularization in response to increased exp ression of pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(7):2428-2434
- 27 Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, et al. AAV2mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(6):1994-2000
- 28 Wong WT, Rex TS, Auricchio A, et al. Effect of over expression of pigment epithelium derived factor (PEDF) on develop ing retinal vasculature in the mouse. *Mol Vis* 2004;10:837-844
- 29 Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment Epithelium-derivedfactor; a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285(5425):245-248