

血管抑制因子治疗血管增生性疾病的研究进展

高国全

[关键词] 肿瘤, 实验性; 视网膜疾病; 血管增生; 血管抑制因子; 综述

[中国图书资料分类法分类号] R 73-354; R 774. 12 [文献标识码] A

血管增生(neovascularization),即从已存在的毛细血管网上大量生成新生血管的过程;最新研究表明,新生血管可以直接由内皮祖细胞分化产生。血管增生在创伤和外周循环闭塞情况下具有恢复血供和促进伤口愈合的积极作用,但在更多的情况下血管增生则是持续、无控性的过程,已成为肿瘤和血管增生性眼病等重大疾病的主要病理特征之一。血管增生是这些疾病的共同表现,以血管增生为靶点正成为治疗恶性肿瘤和其他血管增生性疾病的研究热点^[1,2]。本文就血管抑制因子治疗血管增生性疾病的研究进展作一综述。

1 新生血管形成的平衡失控假说

血管生成过程受到血管增生刺激因子和血管增生抑制因子的调节。常见的刺激因子有血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维生长因子(bFGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)等,常见的抑制因子有血管抑素(angiotatin)、内皮抑素(endostatin)、色素上皮衍生因子(PEDF)、kallistatin,肿瘤抑素(tumstatin)等。刺激因子和抑制因子之间的平衡在血管增生的调节中起关键作用。在生物发育的早期,组织增生、分化需要大量的新生血管提供营养,此时,血管新生刺激因子高表达,在平衡中占主导地位;成年以后,除去伤口愈合等特殊情况,血管新生减弱甚至停止,此时,血管新生抑制因子高表达,在平衡中占主导地位;但在病理状态下如糖尿病性视网膜病和肿瘤,局部微环境出现低氧(hypoxia),低氧诱导刺激因子(如VEGF)过度产生而抑制因子(如PEDF)产生下降,正常的平衡被打破从而导致大量不正常的新生血管形成。

新生血管形成的平衡假说已为大量的研究所证实。几乎所有的新生血管丰富的实体瘤(solid tumor)都有VEGF及其受体的高表达;在实验性角膜、视网膜血管增生动物模型和相应的患者中均检测到VEGF及其受体的高表达和内源性抑制因子(如PEDF、kallistatin)的低表达。目前治疗血管增生性疾病着眼于血管增生平衡调控的两个方面:要么应用血管增生抑制剂,要么采用血管增生刺激因子的拮抗剂,以恢复病理状况下被打破的血管增生调控的平衡。

2 血管新生抑制因子

血管新生的研究,早期着重于血管增生刺激因子的拮抗,但只阻断VEGF的作用仅能部分抑制肿瘤和血管增生性眼病的血管新生。内源性血管生成抑制因子血管抑素、内皮抑素等在20世纪90年代初被发现并成功用于肿瘤生长抑制的实验研究并进入临床试验^[3],极大促进了多个新的血管增生抑制因子的发现及其功能研究。

内源性血管生成抑制因子包括两类,一类是蛋白质家族中的一些成员,如目前最典型的丝氨酸蛋白酶抑制剂家族(serine proteinase inhibitor, serpin super family)中的PEDF,激肽释放酶结合蛋白(kallikrein-binding protein, KBP),抗凝血酶(antithrombin),maspin等均具有抑制血管增生的活性,本文以PEDF为例介绍该类抑制剂的特点。另一类为蛋白质大分子前体的水解产物,如纤溶酶原(plasminogen)水解后可产生一组具有抑制血管增生作用的小分子片段:angiostatin(kringles 1~4), kringles 1~5, kringles 1~3和 kringles 5(plasminogen kringle 5, K5)^[4];内皮抑素是胶原蛋白XVIII的水解多肽;肿瘤抑素是胶原蛋白IV的水解多肽。本文以K5为列介绍该类抑制剂的特点。

2.1 PEDF

2.1.1 PEDF的定义及生物学活性 PEDF最初于1989年由Tombran-Tink等从胎儿视网膜色素上皮细胞培养液中分离出来。分子量50 kDa。基因位于染色体17p13。PEDF属于丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine protease inhibitor, serpin)基因家族, PEDF最早在人胚胎RPE细胞中表达,显示PEDF是影响早期神经元发育的一个候补因子。随后研究表明, PEDF不仅对原代培养的小脑颗粒细胞的生存有显著促进作用,还可以有效地促进脊髓神经元的分化和生存^[5]。

PEDF除了上述的神经保护作用, Dawson等^[6]于1999年首次发现PEDF还具有很强的抑制血管的作用,可能是维持角膜、玻璃体等眼内组织无血管形成的主要原因。缺氧诱导的视网膜新生血管小鼠模型实验发现视网膜细胞产生的抑制性PEDF的量与氧浓度成正相关,因此PEDF浓度的降低可引起缺血所致的视网膜新生血管的形成,提示PEDF是一种强有力的新生血管形成抑制剂。

2.1.2 PEDF与肿瘤的关系 原发性肿瘤的生长、入侵与转移都依赖于肿瘤的血管生成,抑制血管生长就有可能有效地控制肿瘤的生长与转移。包括内皮抑素、血管抑素、肿瘤抑素在内的多种血管抑制因子在临床前实验中被证实具有抗肿瘤的作用, PEDF这种天然高效的新生血管抑制剂和肿瘤的关系及其用于肿瘤治疗的潜在可能性也引起了人们的注意。研究表明, PEDF有3种不同的抗肿瘤活性:(1)诱导肿瘤细胞分化^[7];(2)抑制血管生成;(3)促进Schwann细胞及神经节细胞的生长以产生更多的PEDF。

2.1.3 PEDF抗血管增生机制 PEDF抑制新生血管的机制目前尚未明确。Stellmach等认为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。同样,在体内实验中,用PEDF处理的高氧动物的视网膜凋亡的血管内皮细胞与未用PEDF处理的视网膜相比,高达8倍^[6],对已经存在的正常的血管内

[收稿日期] 2008-07-26

[作者单位] 中山大学中山医学院 生化系, 广东 广州 510080

[作者简介] 高国全(1965-),男,博士,博士生导师,教授。

皮细胞则无反应,说明 PEDF 仅对活化的血管内皮细胞起作用。PEDF 促进血管内皮细胞凋亡,与前文中提到的在神经元生存活动中抑制凋亡作用相反,PEDF 对小脑颗粒细胞的保护作用是由一种分子量为 80 kDa 的受体介导,PEDF 对血管内皮细胞的抑制作用也可能是由受体介导的,但可能是另一种受体。PEDF 存在胶原蛋白-1 结合位点,且与肝素结合位点、神经保护活性区域、serpin 裸露环结构域等分布在 PEDF 多肽链不同区域,PEDF 与胶原蛋白-1 和肝素有高度亲和性,提示 PEDF 可能作用于细胞黏附分子,即靶向细胞外基质来调节其抑制内皮细胞增生的活性。是否存在 PEDF 特异性受体及 PEDF 抑制内皮细胞的信号转导通路等,均有待进一步研究。

2.2 Kringle 5 (K5)

2.2.1 K5 的分子结构与生物学特性

1994 年 O'Reilly 等从携肺癌低转移突变株 (LLG-LM) 小鼠的尿液和血清中分离纯化得到血管抑素,它与人纤溶酶原 kringle1-4 功能区有高度同源性。人纤溶酶原是分子量为 92 kDa 亮的糖蛋白,由一个丝氨酸蛋白酶结构域和 5 个通过二硫键连接的联环结构域 (kringle) 构成,每个联环结构域由 80 个氨基酸组成,含 3 个二硫键。血管抑素的分子量为 38 kDa 亮,其氨基酸序列与纤溶酶原 N 末端第 98 位缬氨酸以后的氨基酸序列有 98% 以上的同源性,包含纤溶酶原前 4 个联环结构域 (见图 1)。Cao 等通过实验证明血管抑素能特异地抑制内皮细胞增殖,也可以抑制原发性及转移瘤组织中的血管生成。

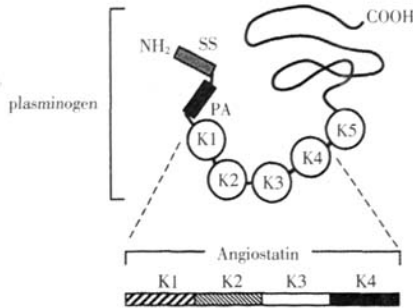


图 1 纤溶酶原与血管抑素结构关系示意图

K5 是纤溶酶原中与血管抑素相连的另一个联环结构域 (见图 1),由 80 个氨基酸残基组成,包含 3 个二硫键,分子量为 16 kDa。Castellino 等发现 K5 在结构上与其它 4 个联环区相似,具有较高的同源性,其中与 K1 同源性最高,为 57.5%。K5 与 K1 结构上的相似性可能与它们都有较强的抑制内皮细胞增殖活性相关。K5 是抑制内皮细胞增殖和迁移最有效的纤溶酶原片段,其活性是血管抑素的 2 倍以上^[8]。

2.2.2 K5 抑制血管增生的分子机制

血管增生是一个复杂过程,包含多个步骤。K5 能在多个环节上发挥抗血管增生活性,但其作用的具体机制目前尚不清楚。(1) K5 与内皮细胞的迁移、增殖和凋亡:K5 能特异地作用于血管内皮细胞,使细胞周期停滞,并能诱导内皮细胞凋亡^[9,10]。细胞增

殖周期是受正负信号严密调控,K5 能直接或间接拮抗生长刺激因子和细胞周期调控因子,如 bFGF, cyclin, cyclin-dependent protein kinases 等,从而选择性使内皮细胞周期停滞,阻止细胞从 G₁ 期进入 S 期,而对其它细胞无此作用,这也可能是 K5 抑制内皮细胞增殖的部分原因。Claesson-Welsh 等用 K5 处理内皮细胞 8 h 可以观察到部分细胞收缩、变小,呈颗粒化,用 TUNEL 法检测到细胞凋亡特异性 DNA 断裂片段。血管抑素也可以诱导内皮细胞凋亡,但不能使内皮细胞周期停滞于 G₁ 期。K5 选择性抑制内皮细胞迁移是其抗血管增生的重要环节。Ji 等研究发现 K5 能抑制 bFGF 诱导的内皮细胞迁移,这种作用与血管抑素相似。K5 和血管抑素都只能影响处于增殖状态的内皮细胞,对静止内皮细胞或正常内皮细胞无作用。(2) K5 与血管增生平衡:K5 能通过抑制 HIF-1 和 p42/p44 MAPK 的活性来下调内源性血管刺激因子 VEGF 的表达,同时提高内源性血管增生抑制因子 PEDF 的表达。这种调节有利于已打破的血管增生平衡恢复正常,也揭示了血管刺激因子和抑制因子之间的联系。

VEGF 是视网膜中主要血管增生刺激因子,在缺氧情况下,HIF-1 能促进 VEGF 产生,在这过程中 HIF-1 α 的核转位是关键步骤。在低氧诱导视网膜血管增生动物模型中核 HIF-1 α 升高与 VEGF 的增加密切相关。在该动物模型玻璃体中注射 K5 能显著降低视网膜中核 HIF-1 α 的水平,抑制 HIF-1 α 的核转位。这表明 K5 可能是通过抑制 HIF-1 α 的活化来减少 VEGF 表达。

Sodhi 等实验发现 P42/P44 有丝分裂原激活蛋白激酶 (P42/P44 MAPK) 途径能调节 VEGF 的表达,同时 VEGF 也能通过相应受体激活 P42/P44 MAPK 途径。内皮细胞中 K5 能快速地抑制 P42/P44 活化,K5 可能通过抑制 P42/P44 活化来降低 VEGF 活性。Redlitz 等研究表明,血管抑素也可以抑制内皮细胞中 P42/P44 MAPK 的活性,K5 与血管抑素可能有相似的抗血管增生机制。(3) K5 的受体:对于内皮细胞上是否存在 K5 的特异性受体目前也没有一致的看法,有报道认为内皮细胞上电压依赖性阴离子通道 (voltage-dependent anion channel, VDAC)^[11] 和伴侣分子 GRP78^[12] 是 K5 结合的受体。也有学者^[13]认为,K5 可能是通过细胞外基质中某些多糖分子如整合素来发挥作用,因为整合素是维持 MAPK 活性所必需的。

3 本实验室开展的研究工作

笔者于 1999 年 1 月~2002 年 5 月在美国期间开始研究人纤溶酶原 K5 等血管抑制因子抑制视网膜血管增生的作用和机制。阐明了内源性抑制因子 PEDF 降低在视网膜新生血管发生中起核心作用,而非过去认为的单纯刺激因子如 VEGF 的上调所导致,提出并证明内源性血管增生抑制因子和刺激因子之间的平衡失调是血管增生的基本分子机制;发现大鼠对低氧诱导的视网膜血管增生具有种属特异性,并回答了差异的分子机制;首次成功建立了理想的视网膜血管增生大鼠模型,利用该模型发现 K5 通过上调 PEDF 同时下调 VEGF 纠正抑制因子和刺激因子之间的平衡失调,从而抑制视网膜血管增生。在生物化学和糖尿病专业国际权威杂志上,如 *Journal of Biological Chemistry*, *Diabetes* 等发表论文 6 篇 (第一作者 4 篇)。

2002年6月回国后获得中山大学985学科建设基金近300万元支持,组建了先进的分子生物学实验室,建立和培养了一支以年轻教师和研究生并重的研究队伍,继续深入探讨血管抑制因子对恶性肿瘤、角膜和视网膜血管增生性疾病的治疗作用和分子机制。获得国家自然科学基金、CMB学者项目、教育部新世纪优秀人才支持计划、广东省团队项目等基金的资助,课题经费约400万元。发现K5通过诱导内皮细胞凋亡、抑制新生血管阻止肝癌生长和角膜血管增生。新构建一种较K5具有更强抑制血管增生活性的缺失突变体,已申请发明专利,该基因工程产品具有产业化潜力,正在进行中试;初步明确了K5抑制血管增生的结构域。证明KBP是一种新的血管抑制因子,发现KBP通过抑制新生血管抑制异位和原位种植型胃癌、肝癌生长并阻止原位胃癌向腹腔淋巴结和肝脏浸润转移;PEDF具有抗炎作用。发表SCI论文15篇(通讯作者6篇,第一作者1篇)。发表论文被国际期刊引用307次,最高单篇引用97次。

3.1 建立研究血管增生必需的和非理想的动物模型

3.1.1 建立低氧诱导的视网膜血管增生模型并发现血管抑制因子的重要性

理想的动物模型是科学研究极其重要的工具和进入人体研究前必不可少的阶段,研究血管增生同样需要合适的动物模型。早产儿从高压氧仓撤出后会产生相对低氧(hypoxia),引起新生儿视网膜血管增生和视网膜病,1994年美国哈佛大学的Smith教授等模拟该环境,将新生小鼠放入高压氧仓,5天后取出放在空气中,几天后即可诱导出视网膜病理性血管增生^[14]。由于大鼠模型比小鼠模型在新生血管研究方面具有更多的优点,多家实验室用Sprague Dawley大鼠拟建立氧诱导的大鼠视网膜血管增生模型,但均未达到小鼠模型的效果^[15,16]。

我们用Brown Norway大鼠建立的大鼠模型具有和经典的小鼠模型相同程度的典型的视网膜血管增生(见图2);大鼠的玻璃体腔远大于小鼠,可容纳更大体积的注射液(药物等),该大鼠模型可代替经典的小鼠模型用于血管增生的研究;利用该模型观察到内源性血管抑制因子PEDF下调和刺激因子VEGF上调共同负责病理性血管增生,这也是国际上证明PEDF是血管抑制因子的第2篇报道,研究结果提示内源性血管抑制因子在血管增生过程中起关键作用,现在认为PEDF是维持正常角膜、玻璃体无血管的主要因子^[17]。

3.1.2 发现大鼠对低氧诱导的视网膜血管增生具有种属特异性

我们发现Brown Norway大鼠较Sprague Dawley大鼠对低氧诱导的视网膜血管增生更加敏感,Brown Norway大鼠是建立视网膜血管增生大鼠模型的理想动物。其差异的分子基础是低氧对两种大鼠视网膜组织VEGF/PEDF基因表达调控不同。低氧上调Brown Norway大鼠视网膜组织血管增生刺激因子VEGF同时下调血管增生抑制因子PEDF,VEGF/PEDF比值增加10倍,导致内源性血管增生抑制因子(PEDF)和刺激因子(VEGF)之间的平衡失调从而诱发新生血管;但低氧对Sprague Dawley大鼠视网膜组织VEGF/PEDF基因表达调控不明显^[18]。

3.2 血管抑制因子人纤溶酶原K5对血管增生性疾病的治疗作用

3.2.1 证明人纤溶酶原K5具有阻断视网膜、角膜血管增生

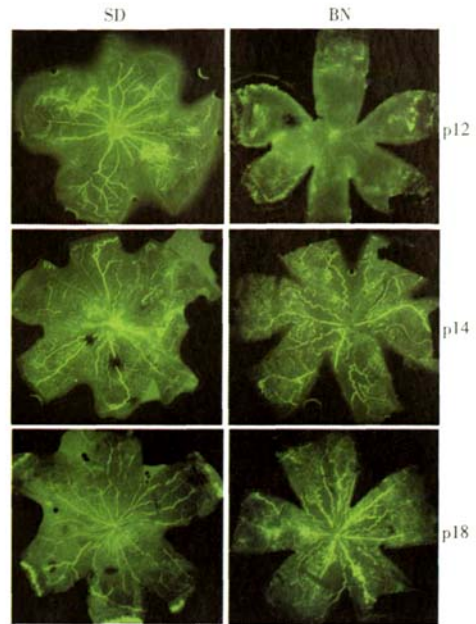


图2 Brown Norway大鼠与Sprague Dawley大鼠对低氧诱导的视网膜血管增生比较

和渗漏的作用 我们发现基因工程重组蛋白K5特异性抑制视网膜微血管内皮细胞的增殖,首次报道K5在视网膜血管增生大鼠模型中预防和阻断新生血管的形成,K5具有治疗糖尿病视网膜血管并发症的潜在应用价值^[8]。新生血管性眼病已成为发达国家致盲的首位因素,回国后我们继续拓展K5在眼科新生血管相关疾病中的应用价值。最近,我们发现K5尚具有抑制碱烧伤兔角膜模型角膜血管新生的作用^[19];在视网膜血管增生和糖尿病大鼠模型中降低血管渗漏^[20],血管渗漏是血管增生和炎症过程的早期重要特征之一,也是早期干预的有效环节。上述结果提示K5具有广泛的治疗眼血管增生性疾病的潜在价值和开发前景。

3.2.2 首次报道K5通过诱导内皮细胞凋亡、抑制新生血管阻止肝癌生长

K5的研究主要集中在眼新生血管领域,有关K5对恶性肿瘤血管增生和肿瘤生长转移的报道缺乏。一直到2005年才有K5基因治疗脑神经胶质瘤的首例报道^[21]。

回国后在国家自然科学基金等基金的资助下,我们证实肝癌细胞同种植小鼠模型和异种植裸鼠模型,K5基因工程重组蛋白通过诱导caspase切割和活化导致内皮细胞和肿瘤组织凋亡、抑制新生血管阻止肝癌生长,在肝癌裸鼠模型K5总剂量为12.5 mg/kg时抑瘤率达到68%(见图3)。这是有关K5治疗肝癌的首例报道,拓宽了K5治疗血管增生性疾病的范围,提高了其应用价值,也为肝癌等恶性肿瘤的治疗提供了新的强效候选药物^[22]。

3.3 K5抑制血管增生、治疗血管增生性疾病的分子机制

3.3.1 阐明K5对内源性血管因子的双向调节作用

在血管内皮细胞和低氧诱导的视网膜血管增生模型,我们发现K5通过上调血管增生抑制因子PEDF并同时下调血管增生

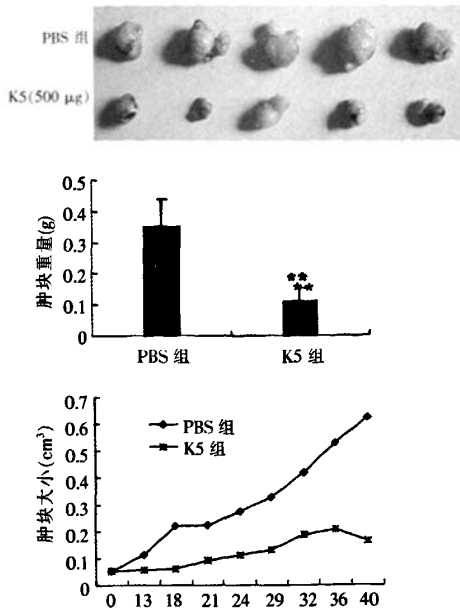


图3 肝癌裸鼠模型K5抑制肿瘤生长的效果

刺激因子 VEGF,降低了 VEGF/PEDF 比例,恢复或部分纠正了病理性低氧状态下内源性血管增生抑制因子和刺激因子之间的平衡失调;明确了 K5 下调 VEGF 的信号传导通路:通过抑制 MAP kinase 的活性和 HIF-1 α 的核转位。这也是第一次发现一种血管因子(K5)可以同时对其两种作用相反的血管因子(VEGF/PEDF)进行双向调控以更加有效地纠正病理性血管增生抑制因子和刺激因子之间的平衡失调^[23]。

3.3.2 率先提出并证明“内源性血管增生抑制因子和刺激因子之间的平衡失调假说”是血管增生的基本分子机制。较长一段时间,人们认为血管增生单纯是由内源性血管增生刺激因子如 VEGF、IGF-1、FGF 等表达增加促进血管内皮细胞增殖、迁移、重构毛细血管的结果。我们在上述建立的病理性血管增生动物模型中均发现除去血管增生刺激因子 VEGF 的升高,还同时伴有血管增生抑制因子 PEDF 的下调,内源性血管抑制因子和刺激因子平衡失调共同负责病理性血管增生;K5 通过降低 VEGF/PEDF 比例,恢复或部分纠正了病理性状态下血管增生抑制因子和刺激因子之间的平衡失调,从而产生抑制血管增生的作用。最近我们发现,在视网膜内皮细胞、Müller 细胞和低氧诱导的视网膜血管增生模型, PEDF 显著降低了 VEGF 的表达;发现在 Müller 细胞中通过 siRNA 沉默 PEDF 基因会导致 VEGF 在 RNA 水平和蛋白水平的表达明显增加,进一步研究表明 PEDF 通过抑制 HIF-1 核移位和 MAPK 磷酸化下调 VEGF。这说明血管增生抑制因子和刺激因子之间可能存在反向交互调控,病理状态下 PEDF 的降低会导致 VEGF 的显著增加,反之 VEGF 的增加又会进一步加剧 PEDF 的降低。

在此基础上,结合他人的研究结果,在《Drug Discovery Today》杂志邀约的综述中,我们提出了血管增生的平衡失调

假说:内源性血管增生抑制因子和刺激因子之间的平衡失调是血管增生的基本分子机制^[24]。该假说目前得到了普遍承认,并被邀请在美国 NIH“PEDF 论坛”上大会报告。

3.4 探讨 K5 抑制血管增生活性的结构基础

3.4.1 新构建一种较 K5 具有更强抑制血管增生活性的缺失突变体 K5 具有治疗血管增生性疾病的潜在临床应用价值,但 K5 完整多肽已获专利保护。为此,在国家自然科学基金(30370313)的资助下,我们对 K5 基因进行改造,获得较 K5 分子量更小、性质更稳定的突变型 K5 Mut1 基因工程纯化蛋白。体外实验结果表明突变型 K5 Mut1 具有较 K5 更强的抑制视网膜血管内皮细胞生长的活性;体内实验结果同样表明突变型 K5 具有较 K5 更强的抑制氧诱导的视网膜血管增生大鼠模型血管增生的作用。最近我们发现突变型 K5 重组蛋白具有较 K5 更强的抑制小鼠肝癌血管新生和肿瘤生长的作用^[25]。

3.4.2 初步明确了 K5 抑制血管增生的结构域 为明确 K5 抑制血管增生的活性和 Kringle 结构域中二硫键的位置、数量所决定的内外环结构的关系,我们构建了第二种突变型 K5 Mut2:仅保留 2 个二硫键和 K5 内环结构域,进一步降低分子量。观察打开一个二硫键、破坏 K5 外环结构域的突变型 K5 是否仍具有抑制血管增生的活性,体外细胞实验结果表面该突变型失去了抗血管增生的活性,提示完整的包括三个二硫键的 Kringle 结构域是该类多肽抑制血管增生活性的结构基础^[26]。

3.5 对其它内源性血管抑制因子的研究

3.5.1 首次证明 KBP 是一种新的血管抑制因子 KBP 是激肽释放酶-激肽系统的重要组成部分,并属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族,参与了高血压、变态反应及炎症等病理生理过程。我们首次发现 KBP 尚具有独立于上述功能之外的抑制血管增生的作用,体外细胞实验证实 KBP 特异性抑制视网膜毛细血管内皮细胞的增生,在低氧诱导的视网膜血管增生大鼠模型上进一步发现 KBP 呈剂量依赖性降低血管渗漏和血管增生;KBP 下调视网膜组织 VEGF 表达。这些结果表明,KBP 是一种新的血管抑制因子,为治疗血管增生性疾病提供了新的候选药物^[27]。

3.5.2 KBP 通过抑制新生血管抑制胃癌、肝癌生长并阻止原位胃癌向腹腔淋巴结和肝脏浸润转移 最近我们发现 KBP 抑制异位和原位种植型胃癌^[28]、肝癌^[29] 生长,并首次发现 KBP 阻止原位胃癌向腹腔淋巴结和肝脏浸润转移,KBP 通过降低转录因子 HIF-1 α 的核转位下调血管内皮细胞和肿瘤细胞表达 VEGF,通过抑制新生血管发挥作用。

3.5.3 首次发现 PEDF 具有抗炎作用 我们最新的研究表明,在脂多糖(LPS)诱导的葡萄膜炎大鼠视网膜和血浆中 PEDF 表达显著降低,玻璃体腔注射 PEDF 在下调炎症因子 VEGF、MCP-1、TNF- α 和 ICAM-1 的同时降低糖尿病及低氧诱导的视网膜病大鼠血管渗漏;PEDF 同样下调低氧条件下视网膜毛细血管内皮细胞产生的炎症因子 ICAM-1 和 TNF- α ;用 RNA 干扰技术沉默 PEDF 的表达可以显著增加视网膜 Müller 细胞 TNF- α 和 VEGF 的分泌。这些结果表明, PEDF 通过抗炎作用抑制血管渗漏和血管增生, PEDF 是一种新的内源性抗炎因子^[30]。

上述研究所需要的 PEDF 基因工程纯化蛋白是我们首次从大肠埃希菌原核表达体系中获得。这是目前获得 PEDF 基因工程纯化蛋白最简便和最有效的方法^[31]。

[参 考 文 献]

- [1] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease[J]. *Nat Med*, 1995, 1(1): 27-31.
- [2] Ferris FL 3rd, Davis MD, Aiello LM. Treatment of diabetic retinopathy[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(9): 667-678.
- [3] Matter A. Tumor angiogenesis as a therapeutic target[J]. *Drug Discov Today*, 2001, 6(19): 1 005-1 024.
- [4] Soff GA. Angiostatin and angiostatin-related proteins[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2000, 19(1-2): 97-107.
- [5] 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]. *J Neurosci*, 1995, 15(7 Pt 1): 4 992-5 003.
- [6] Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis[J]. *Science*, 1999, 285(5 425): 245-248.
- [7] Crawford SE, Stellmach V, Ranalli M, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity[J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(Pt 24): 4 421-4 428.
- [8] Zhang D, Kaufman PL, Gao G, et al. Intravitreal injection of plasminogen kringle 5, an endogenous angiogenic inhibitor, arrests retinal neovascularization in rats[J]. *Diabetologia*, 2001, 44(6): 757-765.
- [9] Lu H, Dhanabal M, Volk R, et al. Kringle 5 causes cell cycle arrest and apoptosis of endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 258(3): 668-673.
- [10] Ji WR, Barrientos LG, Llinás M, et al. Selective inhibition by kringle 5 of human plasminogen on endothelial cell migration, an important process in angiogenesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 247(2): 414-419.
- [11] Gonzalez-Gronow M, Kalfa T, Johnson CE, et al. The voltage-dependent anion channel is a receptor for plasminogen kringle 5 on human endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(29): 27 312-27 318.
- [12] Davidson DJ, Haskell C, Majest S, et al. Kringle 5 of human plasminogen induces apoptosis of endothelial and tumor cells through surface-expressed glucose-regulated protein 78[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(11): 4 663-4 672.
- [13] Tarui T, Miles LA, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(43): 39 562-39 568.
- [14] Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(1): 101-111.
- [15] Penn JS, Tolman BL, Henry MM. Oxygen-induced retinopathy in the rat: relationship of retinal nonperfusion to subsequent neovascularization[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(9): 3 429-3 435.
- [16] Holmes JM, Duffner LA. The effect of litter size on normal retinal vascular development in the neonatal rat[J]. *Curr Eye Res*, 1995, 14(8): 737-740.
- [17] Gao G, Li Y, Zhang D, et al. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization[J]. *FEBS Lett*, 2001, 489(2-3): 270-276.
- [18] Gao G, Li Y, Fant J, et al. Difference in ischemic regulation of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor in brown norway and sprague dawley rats contributing to different susceptibilities to retinal neovascularization[J]. *Diabetes*, 2002, 51(4): 1 218-1 225.
- [19] Zhang Z, Ma JX, Gao G, et al. Plasminogen kringle 5 inhibits alkali-burn-induced corneal neovascularization[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(11): 4 062-4 071.
- [20] Zhang SX, Sima J, Shao C, et al. Plasminogen kringle 5 reduces vascular leakage in the retina in rat models of oxygen-induced retinopathy and diabetes[J]. *Diabetologia*, 2004, 47(1): 124-131.
- [21] Perri SR, Nalbantoglu J, Annabi B, et al. Plasminogen kringle 5-engineered glioma cells block migration of tumor-associated macrophages and suppress tumor vascularization and progression[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(18): 8 359-8 365.
- [22] Yang X, Cheng R, Li C, et al. Kringle 5 of human plasminogen suppresses hepatocellular carcinoma growth both in grafted and xenografted mice by anti-angiogenic activity[J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(4): 399-405.
- [23] Gao G, Li Y, Gee S, et al. Down-regulation of vascular endothelial growth factor and up-regulation of pigment epithelium-derived factor: a possible mechanism for the anti-angiogenic activity of plasminogen kringle 5[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(11): 9 492-9 497.
- [24] Gao G, Ma J. Tipping the balance for angiogenic disorders[J]. *Drug Discov Today*, 2002, 7(3): 171-172.
- [25] Cai W, Ma J, Li C, et al. Enhanced anti-angiogenic effect of a deletion mutant of plasminogen kringle 5 on neovascularization[J]. *J Cell Biochem*, 2005, 96(6): 1 254-1 261.
- [26] 李朝阳, 蔡卫斌, 杨中汉, 等. 纤溶酶原 K5 抗血管增生活性依赖于其完整 Kringle 结构域[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22(1): 17-23.
- [27] Gao G, Shao C, Zhang SX, et al. Kallikrein-binding protein inhibits retinal neovascularization and decreases vascular leakage[J]. *Diabetologia*, 2003, 46(5): 689-698.
- [28] Zhu B, Lu L, Cai W, et al. Kallikrein-binding protein inhibits growth of gastric carcinoma by reducing VEGF production and angiogenesis[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(12 Pt 1): 3 297-3 306.
- [29] Lu L, Yang Z, Zhu B, et al. Kallikrein-binding protein suppresses growth of hepatocellular carcinoma by anti-angiogenic activity[J]. *Cancer Lett*, 2007, 257(1): 97-106.
- [30] Zhang SX, Wang JJ, Gao G, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous anti-inflammatory factor[J]. *FASEB J*, 2006, 20(2): 323-325.
- [31] Wang QS, Yang X, Yang ZH, et al. Novel method for expression and purification of human pigment epithelium-derived factor with biological activities in *Escherichia coli*[J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2006, 36(2): 127-138.