

# 血管新生抑制因子在糖尿病微血管并发症中的研究及应用前景

高国全<sup>1,2</sup>

(中山大学 1.中山医学院生化教研室, 2.中山医学院心血管研究群体, 广东 广州 510080)

**作者简介:**高国全教授,现任中山大学中山医学院副院长、生物化学教研室主任,广东省生物化学和分子生物学学会理事长,广东省基因操作和生物大分子产物工程技术研究中心主任,海洋微生物功能分子广东省高校重点实验室主任,中国生物化学和分子生物学学会理事、医学分会常务理事;入选教育部新世纪优秀人才计划、广东省高等学校千百十工程国家级培养对象、“广东特支计划”百千万工程领军人才、宝钢优秀教师;享受国务院政府津贴;主编人民卫生出版社国家级规划教材《生物化学》。主要研究方向:病理性血管新生的机制及治疗,研究成果以第一完成人获教育部和广东省自然科学二等奖。  
E-mail:gaogq@mail.sysu.edu.cn。



高国全

**摘要:**糖尿病微血管并发症累及全身各个器官,导致糖尿病患者寿命下降和生活质量降低。血管新生是糖尿病微血管并发症的基本病理特征,而血管新生抑制因子在血管新生平衡调控和糖尿病微血管并发症发生发展中起了重要作用。本文就血管新生抑制因子与糖尿病微血管并发症的研究进展及治疗前景作一综述,包括血管新生抑制因子与糖尿病各种微血管并发症(糖尿病视网膜病变、糖尿病足、糖尿病勃起功能障碍和糖尿病肾病等)等的关系,最后概述了糖尿病微血管并发症的临床治疗现状与内源性新生血管抑制因子在其中的应用前景。

**关键词:**血管新生抑制因子;糖尿病视网膜病变;糖尿病足;糖尿病勃起功能障碍;糖尿病肾病

中图分类号:R774.1

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)02-0169-08

## Research Progress and Therapeutic Prospect of Angiogenesis Inhibitors in the Microvascular Complication of Diabetic Mellitus

GAO Guo-quan<sup>1,2</sup>

(1. Department of Biochemistry, 2. Cardiovascular Research Program, Zhongshan School of Medicine, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** Microvascular complications of diabetic mellitus injure entire organs of the body. Diabetic retinopathy, foot ulcer, erectile dysfunction and diabetic nephropathy are the major pathogenesis of blindness, non-traumatic amputation, kidney failure and even death, respectively. Thus, early intervention of microvascular complications is the optimized strategy for improving the quality and prolonging the lifespan. Angiogenesis is the one of most significant pathologic features in microvascular complications of diabetic mellitus. Angiogenesis inhibitors are closely involved in the balance regulation of angiogenesis. Therefore, this review aims to present the research progress and the therapeutic prospect of angiogenesis inhibitors in the microvascular complication of diabetic mellitus.

**Key words:** angiogenesis inhibitor; diabetic retinopathy; foot ulcer; erectile dysfunction; diabetic nephropathy

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(2): 169-176]

收稿日期:2017-01-16

基金项目:国家自然科学基金(81172163, 81272338, 81471033);科技部新药创制重大专项(2009ZX09103-642, 2013ZX09102-053);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20120171110053);广东省自然科学基金重点项目(2015A030311043);广州市科技计划产学研协同创新重大专项(201508020033)

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种以血糖升高为特征的代谢性疾病,可分为1型糖尿病(T1DM)和2型糖尿病(T2DM)。T1DM表现为胰岛素的绝对缺乏,大部分由先天性胰岛 $\beta$ 细胞破坏引起;T2DM以胰岛素抵抗或伴有胰岛素相对缺乏为特征,是一种常见的代谢综合征<sup>[1]</sup>。目前,我国18岁以上人群2型糖尿病的患病率达9.7%<sup>[2]</sup>,而随着人口老龄化的发展和人们生活方式的改变,糖尿病的流行趋势进一步加剧,由糖尿病引起的代谢紊乱及血管并发症已严重影响患者身心健康。糖尿病血管并发症包括大血管病变和微血管病变<sup>[3]</sup>,其中由大血管病变引起的心脑血管事件是糖尿病患者的重要死亡原因之一;微血管并发症主要包括糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)、糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)、糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)和糖尿病勃起功能障碍(erec-tile dysfunction, ED)等,此外,糖尿病足(diabetic foot, DF)受周围神经病变、外周血管病变和感染的综合影响。糖尿病微血管并发症是糖尿病患者生活质量下降和致残的重要原因。

目前,我国仍缺乏糖尿病血管并发症较为全面的流行病学调查资料。1991年至2000年北京、天津、上海、重庆四地10家医院的流行病学调查显示,2型糖尿病患者DR患病率31.5%,DPN患病率51.1%,DN患病率39.7%,DF患病率达9.3%,而我国的2型糖尿病患者普遍存在数年隐性糖尿病时期,在诊断糖尿病时已有部分患者存在一种或多种慢性并发症<sup>[2]</sup>,因此认识糖尿病血管病变的机制,预防和控制糖尿病血管并发症是目前糖尿病治疗的主要策略。

## 1 血管新生与内源性血管新生抑制因子

血管新生(angiogenesis)是在已有血管基础上,内皮细胞发生增殖、迁移和成管,形成一个新的血流单位的过程。生理情况下,血管新生常常发生在子宫内膜增生、胎盘形成和伤口愈合等过程,而异常的血管新生往往导致肿瘤生长和糖尿病微血管并发症的发生<sup>[4]</sup>。血管新生主要由血管新生刺激因子与抑制因子失衡而诱发,且该平衡

失调假说已为大量的研究所证实<sup>[5-6]</sup>:在生物发育的早期,组织器官的形成需要大量的新生血管为其提供营养,此时血管新生刺激因子在平衡中占主导地位;发育完全以后,除了伤口愈合、女性月经周期等生理情况外,血管处于静息状态,血管新生抑制因子与刺激因子的表达处于平衡,也可能存在抑制因子高表达;但是在某些病理情况下,如糖尿病视网膜病、直径>3 mm的肿瘤,会出现局部缺氧,包括我们在内的研究已证实<sup>[7]</sup>,低氧(hypoxia)会诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等血管新生刺激因子高表达,同时减少抑制因子如色素上皮衍生因子(pigment epithelium derived factor, PEDF)的生成,平衡被打破从而出现病理性的血管新生。

内源性血管生成抑制因子包括两类,一类是细胞分泌性的蛋白质,如PEDF<sup>[8]</sup>、激肽释放酶结合蛋白(kallikrein-binding protein, KBP/kallistatin)<sup>[9]</sup>、血小板反应蛋白(thrombospondin-1, TSP-1)<sup>[10]</sup>等。另一类是前体蛋白的水解片段,例如纤溶酶原(plasminogen)水解后可产生的小分子片段——血管抑素(angiotatin/Kringle1-4)和Kringle5均具有抑制血管新生的活性;基质来源的多肽片段,如内皮抑素(endostatin)是胶原蛋白XVIII的水解多肽,肿瘤抑素(tumstatin)是胶原蛋白IV的水解多肽。其中,PEDF<sup>[11]</sup>、kallistatin<sup>[12]</sup>和TSP-1<sup>[13]</sup>的水平在糖尿病外周循环中均升高。

PEDF属于serpin超家族成员,但不具备抗蛋白酶活性,最早发现在人胚胎视网膜色素上皮细胞中表达,显示PEDF是影响早期神经元发育的一个候补因子<sup>[14]</sup>。Dawson等<sup>[8]</sup>1999年在体外实验中,首次发现PEDF在半数有效量(ED<sub>50</sub>)0.4 nmol/L基础上以剂量依赖方式特异性抑制内皮细胞增殖,故PEDF被视为最具有潜在价值的内源性血管新生抑制因子,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。过去我们在低氧诱导的Brown Noway大鼠视网膜病变模型(oxygen induced retinopathy, OIR)中发现VEGF/PEDF比值的改变与视网膜新生血管形成的程度呈正相关,表明血管刺激因子与血管抑制因子之间的平衡打破是导致视网膜病理新生血管形成的一个重要机制<sup>[7]</sup>。在临床上,通过比较增殖型糖尿病视网膜病变(proliferation diabetic reti-

nopathy, PDR)的病人与非增殖型糖尿病视网膜病变病人(NPDR)房水中的PEDF含量,结果显示前者PEDF水平显著下降,再次证明了PEDF是人体眼组织异常血管新生主要的抑制因子,同时提示PEDF对血管增生性眼病有潜在的治疗价值<sup>[11]</sup>。

PEDF抑制血管新生的机制尚未完全阐明,关键问题包括介导PEDF效应的受体及PEDF自身的基因表达调控尚不十分明确。PEDF可能通过阻断Wnt或p38 MAPK-GSK3- $\beta$ -catenin信号通路<sup>[15-17]</sup>,下调尿激酶纤维蛋白酶原激活物受体(uPA receptor)的表达,或者结合F1 ATP合成酶并抑制ATP的合成<sup>[18]</sup>,从而抑制细胞的增殖;有研究发现PEDF可以上调 $\gamma$ -分泌酶( $\gamma$ -secretase)剪切VEGFR2胞内段,从而拮抗VEGF介导的内皮细胞增殖与血管通透性升高<sup>[19]</sup>。我们的研究除了证明PEDF通过阻断Wnt通路介导内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)数量的减少和功能的抑制,从而减缓了糖尿病患者末梢血管的新生和伤口愈合外,还发现PEDF可以通过p53介导Fas-L上调以及增加Fas蛋白膜转位诱导内皮细胞或肿瘤细胞凋亡<sup>[20]</sup>。由此可见,PEDF增多或减少均与血管新生密切相关,PEDF可能成为治疗糖尿病血管并发症的靶标。

激肽释放酶结合蛋白(kallikrein binding protein, KBP/Kallistatin),能与组织激肽释放酶结合并抑制其功能,首先由Chao等<sup>[21-22]</sup>研究者从肺成纤维细胞的无血清培养基中纯化出来,并证明其具有抑制内皮细胞增殖的作用。我们以往的研究发现,在OIR模型玻璃体腔注射KBP可以抑制低氧诱导的视网膜血管新生和血管通透性升高;糖尿病患者血浆中kallistatin蛋白水平显著上调,抑制糖尿病伤口的血管新生<sup>[23]</sup>。已有研究指出,kallistatin能够结合LRP6并拮抗经典的Wnt信号通路,从而抑制内皮细胞的增殖<sup>[24]</sup>。此外,kallistatin在脓毒血症、高血压肾病和肿瘤等疾病中可以发挥抗炎、抗氧化应激的作用,其机制可能通过PI3K-Akt通路上调FOXO1的活性,并降低NADPH氧化酶的活性,从而下调活性氧(reactive oxygen species, ROS)介导的氧化应激<sup>[25-26]</sup>。因此,kallistatin除了调控血管新生,还可能通过调控炎症反应影响糖尿

病血管并发症。

I型血小板反应蛋白(thrombospondin-1, THBS-1/TSP-1)主要由血小板、内皮细胞和肿瘤细胞等分泌,存在于血浆和细胞外基质中。在TSP1-/-小鼠与PEDF-/-小鼠的研究中发现,两者的缺乏均能加重糖尿病视网膜病变的病理性血管新生<sup>[20]</sup>。TSP-1能够抑制TGF- $\beta$ 和bFGF促血管新生的信号,还可以直接拮抗MMP9的活化,从而抑制血管新生的开始。另外,TSP-1有较明确的细胞表面受体,包括CD36和CD47<sup>[27]</sup>;TSP-1/CD36可以抑制p-NOS的功能,CD47抑制NO下游的可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)和环磷酸鸟苷依赖的蛋白激酶(cGK)功能,从而拮抗VEGF介导的血管舒张和通透性增加<sup>[28]</sup>;另一方面,CD36还通过招募Fyn蛋白,诱导线粒体凋亡通路及促进Fas/FasL介导的凋亡信号通路,从而起到抑制血管新生的作用<sup>[29]</sup>。

## 2 血管新生抑制因子与糖尿病视网膜病变

糖尿病视网膜病变是指糖尿病患者视网膜微血管发生病变,以周细胞坏死,内皮屏障功能受损,血液成分由血管内渗出到组织中,造成视网膜病变和功能障碍。在DR的后期,由于血管闭塞和功能障碍,造成局部视网膜缺氧而诱发病理性的血管新生,然而新生的毛细血管依旧缺失屏障血管的功能,因此血管渗漏加重,进一步引起纤维化的发生,从而形成增殖型糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)。

在糖尿病视网膜膜中,高糖会通过多元醇通路<sup>[30]</sup>、糖基化终末产物<sup>[31]</sup>、蛋白激酶C信号通路<sup>[32-33]</sup>和抑制细胞活性氧清除<sup>[34]</sup>等机制,诱导周细胞凋亡,从而破坏血-视网膜屏障和激活血管内皮细胞,进而促进血管出芽和血管新生。此外,视网膜内几乎所有细胞在缺血缺氧的刺激下均能分泌VEGF,大量的临床资料显示PDR患者玻璃体腔内VEGF水平显著升高<sup>[35]</sup>,全视网膜光凝或玻璃体腔注射贝伐单抗可降低VEGF水平,有效抑制PDR的发生<sup>[36]</sup>。

眼内最主要的内源性血管新生抑制因子PEDF主要由RPE上极部、睫状肌和Müller细胞分

泌, PDR 患者循环血中 PEDF 升高, 但房水中 PEDF 水平明显下降<sup>[37]</sup>, 在玻璃体腔中过表达 PEDF 能够有效抑制视网膜的血管新生<sup>[38]</sup>。此外, 我们及合作者的研究还表明, Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路激活参与糖尿病视网膜炎症因子表达、纤维增生的形成<sup>[39]</sup>, 特异性抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可以缓解糖尿病大鼠视网膜血管渗漏, 抑制血管新生、视网膜炎症因子和视网膜纤维化的发生<sup>[40]</sup>, 具体机制可能与高糖诱导的上皮细胞间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 有关<sup>[41]</sup>。使用 PEDF 基因敲除小鼠或干扰 PEDF 表达, 我们发现 Wnt 信号通路明显活化, 而使用 kallistatin 转基因小鼠则发现在视网膜中过表达的 kallistatin 能够抑制 Wnt 信号通路的激活, 我们的实验证明了 PEDF 和 kallistatin 均能结合 LRP6 从而拮抗 Wnt 的作用<sup>[15, 42]</sup>, 提示血管新生抑制因子 PEDF、kallistatin 还可能通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路参与糖尿病视网膜病变。

### 3 血管新生抑制因子与糖尿病肾病

糖尿病肾病是由肾小球毛细血管病变所引起的渐进性肾病变, 早期以肾小球足突融合和基底膜增厚为主要病理改变, 引起肾小球滤过率增高和白蛋白尿为临床特征, 继而发生肾小球系膜增生, 并最终导致肾小球纤维化, 肾小球滤过率降低从而导致终末期肾病, 而这是糖尿病患者肾衰竭死亡的重要原因。与糖尿病视网膜病变相似, 研究表明肾小球损伤有高糖诱导的糖基化终末产物、生长因子、趋化因子和氧化应激等刺激因素的参与。

我们合作单位的相关研究表明<sup>[43-45]</sup>, PEDF 在糖尿病肾小球中的表达降低, 并参与肾小球纤维化的发生发展, 过表达 PEDF 能够抑制肾小球慢性炎症的发生, 从而改善糖尿病肾小球纤维化; 我们进一步研究证明<sup>[46]</sup>, Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路在糖尿病肾病肾脏中异常激活, 抑制 Wnt 信号通路激活能够减缓糖尿病肾病纤维化的发生。与糖尿病视网膜病变的研究相似, 血管新生抑制因子可能参与调控糖尿病肾病的炎症反应、Wnt 信号的激活和纤维化因子的表达等, 具体机制尚不明确。

### 4 血管新生抑制因子与糖尿病勃起功能障碍

糖尿病勃起功能障碍 (erectile dysfunction, ED) 以阴茎海绵体内皮细胞功能障碍为主要病理变化, 内皮细胞 NO 释放明显不足, 且阴茎海绵体动脉管径远比冠状动脉等大动脉管径小, 病变早期即可造成海绵体动脉粥样硬化, 从而导致糖尿病 ED 的发生, 所以 ED 又被认为是心血管发病的先兆<sup>[47]</sup>。在糖尿病 ED 的后期, 内皮细胞凋亡、基底膜增厚及纤维化发生, 对阴茎海绵体造成不可逆性的损伤。

我们最近尚未发表的研究发现, 在阴茎海绵体过表达 PEDF 可导致小鼠勃起功能受限, 且 NO 释放减少, 而在糖尿病模型小鼠给予 PEDF 中和抗体, 可增加海绵体 NO 的释放, 缓解糖尿病模型小鼠的勃起功能障碍, 并且糖尿病 PEDF<sup>-/-</sup>模型小鼠的海绵体内皮 NO 释放含量和勃起功能均较糖尿病 PEDF<sup>+/+</sup>模型小鼠高。我们进一步研究还发现, 外源给予 PEDF 重组蛋白或者在阴茎海绵体中过表达 PEDF, 可引起海绵体内皮细胞 Akt 磷酸化水平降低, 并且在 PEDF 处理的脐静脉内皮细胞和海绵体内皮细胞中加入 Akt 激动剂, 可以缓解 PEDF 介导的 NO 释放减少。

### 5 血管新生抑制因子与糖尿病足

伤口愈合的过程需要血管的形成, 包括血管新生 (angiogenesis) 和血管生成 (vasculogenesis), 前者是由原有的血管通过出芽或分裂方式形成新的血管, 是血管从少到多的过程, 而血管生成则是由内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 分化而成的内皮细胞连接成管, 是血管从无到有的过程<sup>[48]</sup>。在糖尿病、高血压、类风湿性疾病中, EPC 数量减少或功能缺失, 常作为评判血管损伤修复能力的指标<sup>[49]</sup>, 而补充 EPC 对治疗动脉粥样硬化和糖尿病足有较好的效果<sup>[50]</sup>。

糖尿病足是糖尿病综合因素引起的下肢远端神经异常和不同程度周围血管病变相关的足部感染、溃疡和深层组织破坏的肢端坏疽等病变总称, 由皮肤微血管病变和外周大血管病变的综合作用

引起,通常发生在糖尿病后期,是糖尿病治疗费用最高的慢性并发症之一,重者可导致截肢<sup>[2]</sup>。与糖尿病视网膜病变相似,高血糖可通过多元醇、糖基化终末产物、蛋白激酶C和氧化应激等通路,损伤血管功能;但与糖尿病视网膜病变房水中PEDF水平下降矛盾的是,糖尿病外周循环中PEDF水平升高<sup>[11]</sup>。我们近期的研究提示<sup>[42]</sup>,糖尿病外周循环中升高的PEDF,可通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路影响EPC的迁移和释放,使得循环血中EPC数量降低,从而抑制糖尿病伤口愈合,使用PEDF中和抗体拮抗PEDF或外源补充EPC后,可缓解糖尿病小鼠伤口愈合障碍。然而,阻断PEDF并不能完全改善糖尿病受损的伤口愈合过程。糖尿病外周血中除了PEDF升高外,另一种血管新生抑制因子kallistatin水平也增加<sup>[12,24]</sup>,而kallistatin是通过调控伤口的血管内皮增殖还是炎症反应来抑制伤口愈合还在研究当中。

## 6 糖尿病微血管并发症的临床治疗现状

### 6.1 糖尿病视网膜病变的临床治疗现状

目前主要根据病灶的位置、大小及临床症状而采取不同的治疗手段,包括预防、外科手术治疗、激光光凝治疗和抗血管新生药物治疗。其中抗血管新生药物治疗主要应用在糖尿病未发生明显眼底血管病变时,使用阿司匹林抗血小板治疗、ruboxistaurin(蛋白激酶C抑制剂)、索比尼尔和托瑞司他(醛糖还原酶抑制剂)或奥曲肽(生长激素/胰岛素样生长因子抑制剂)等来抑制血管内皮增殖和血管闭塞的形成,此外还包括玻璃体内注射阿柏西普、贝伐单抗和雷珠单抗等VEGF中和抗体,均可有效改善糖尿病性黄斑水肿患者视力<sup>[51]</sup>。无论手术治疗还是单一靶点的抗血管新生药物治疗,均无法完全抑制DR的发生发展。由于眼或其他组织有基础VEGF表达的生理需要,无论是全身治疗还是局部应用,过度抑制VEGF均有其相应的副作用,而且玻璃体注射往往导致飞蚊症、玻璃体感染等损害,因此,获得使用便捷、耐受良好和毒性小的药物,是目前糖尿病视网膜病药物研发需要解决的难题。

### 6.2 糖尿病肾病的临床治疗现状

在糖尿病肾病的早期,以白蛋白尿为临床特征,应尽早使用肾素-血管紧张素酶抑制剂(ACEI或ARB类药物),这些药物能够有效降低糖尿病肾小球滤过率;而到糖尿病肾病的后期,肾小球纤维化及滤过率明显受损,患者出现少尿和尿毒症,则需要通过透析治疗维持糖尿病肾衰竭患者的代谢废物的排泄。因此,早期干预肾小球毛细血管病变是目前治疗糖尿病肾病的首要策略。

### 6.3 糖尿病勃起功能障碍的临床治疗现状

目前,糖尿病ED的治疗主要从以下几个方面入手:控制血糖、积极治疗原发病、应用PDE5抑制剂(西地那非、他达拉非等)等。有研究指出,控制血糖虽然能改善部分患者勃起功能,但总体效果不佳;此外,由于内皮功能受损,NO释放减少,治疗ED的首选药物PDE5抑制剂对糖尿病ED患者有效率只有50%~60%<sup>[52]</sup>。因此,针对糖尿病勃起功能障碍的始发核心事件,寻找一种能在早期修复受损的血管内皮功能进而改善其他继发病变的药物有可能产生更好的治疗效果。

### 6.4 糖尿病足的临床治疗现状

目前,PDGF是美国FDA唯一批准临床应用的生长因子。研究表明采用PDGF通过刺激成纤维细胞的分裂增殖,促进细胞的迁移及平滑肌的增生可以加快伤口愈合<sup>[53]</sup>,此外VEGF重组蛋白可以促进EPC动员从而加速伤口愈合<sup>[54]</sup>。有学者证明,EGF及FGF能够促进血管再生、肉芽组织形成及上皮化过程,作为增生因子治疗糖尿病足也取得了很好的效果<sup>[55-56]</sup>。TGF- $\beta$ 和胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)可以参与多种细胞的增殖和分化的调控,糖尿病足患者分泌生长因子明显降低<sup>[57-58]</sup>,因此应用生长因子治疗对创伤愈合有促进作用。

## 7 血管新生抑制因子的应用前景

综上所述,血管新生是治疗糖尿病血管并发症的靶点之一。从过去单纯抑制或促进血管新生而治疗糖尿病血管并发症,到现在对血管形成机制的日趋明确,以及对血管周细胞、内皮祖细胞以及单核/巨噬细胞等参与糖尿病血管并发症的进一步了解。研发促进血管正常化、降低通透

性以及多靶点协调作用的新药,已成为更好地治疗糖尿病血管并发症的新方向。我们实验室研发的几种内源性血管新生抑制分子也具有一定的应用前景。

Plasminogen Kringle 5(K5)是纤溶酶原中与血管抑素(K1-4)相连的第5个联环结构域,分子质量仅16 ku,是人纤溶酶原中最具有抗血管新生活性的片段。K5抑制血管新生主要通过诱导血管内皮细胞凋亡实现,我们最近的研究发现K5结合细胞膜受体VDAC1并促进其磷酸化,从而抑制VDAC1的泛素化降解,上调VDAC1线粒体膜转位,启动线粒体凋亡通路而诱导内皮细胞凋亡<sup>[59]</sup>。我们对K5 N端5个酸性氨基酸进行替代突变消除其对活性部位的“遮挡效应”,开发出新的活性更强的突变型重组蛋白K5M5<sup>[60-61]</sup>,已获得发明专利授权(授权号2012040100676330)。将K5M5重组蛋白制成外用滴眼液,可有效抑制大鼠角膜的血管新生<sup>[62]</sup>。

此外,本课题组获得分泌抗PEDF单克隆抗体的杂交瘤株,得到所需单克隆抗体,已获得专利“一种抗PEDF单克隆抗体及其制备方法和应用(专利号:ZL201210245123.2)”,已在糖尿病伤口愈合模型小鼠和糖尿病勃起功能障碍模型小鼠上初步验证其效果。

在上述工作基础上通过和相关单位协同合作,进行规范化的药理学、药效学、药代特性、安全性研究和评价,明确阐明这些候选药物的成药性特征,开发出可用于治疗糖尿病微血管并发症的新型基因工程药物或选择性小分子拮抗剂,并最终实现临床转化是我们的期望目标。

(致谢:感谢杨霞教授和本课题组全体成员的研究贡献,这些贡献体现在本文引用的已发表和尚待发表的研究成果中。特别感谢2015级博士生谢晋焯同学在本综述撰写过程中收集文献和准备初稿)

#### 参考文献:

- [1] American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus [J]. *Diabetes Care*, 2014, 37 Suppl 1: S81-90.
- [2] 中国2型糖尿病防治指南(2013年版)[J]. *中国糖尿病杂志*, 2014, 22(8): 2-42.
- [3] Yang WY, Lu JM, Weng JP, et al. Prevalence of Diabetes among Men and Women in China [J]. *New Engl J Med*, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [4] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine [J]. *Nature*, 2005, 438(7070): 932-936.
- [5] Folkman J. Angiogenesis [J]. *Annu Rev Med*, 2006, 57: 1-18.
- [6] Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(10): 3967-3979.
- [7] Gao GQ, Li Y, Zhang DC, et al. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization [J]. *Febs Letters*, 2001, 489(2-3): 270-276.
- [8] Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis [J]. *Science*, 1999, 285(5425): 245-248.
- [9] Miao RQ, Agata J, Chao L, et al. Kallistatin is a new inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Blood*, 2002, 100(9): 3245-3252.
- [10] Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *J Cellular Mol Med*, 2002, 6(1): 1-12.
- [11] Ogata N, Matsuoka M, Matsuyama K, et al. Plasma concentration of pigment epithelium-derived factor in patients with diabetic retinopathy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(3): 1176-1179.
- [12] Jenkins AJ, Mcbride JD, Januszewski AS, et al. Increased serum kallistatin levels in type 1 diabetes patients with vascular complications [J]. *J Angiogenesis Res*, 2010, 2: 19.
- [13] Daniel C, Schaub K, Amann K, et al. Thrombospondin-1 is an endogenous activator of TGF-beta in experimental diabetic nephropathy in vivo [J]. *Diabetes*, 2007, 56(12): 2982-2989.
- [14] Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity [J]. *Exp Eye Res*, 1991, 53(3): 411-414.
- [15] Park K, Lee K, Zhang B, et al. Identification of a novel inhibitor of the canonical Wnt pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(14): 3038-3051.
- [16] Konson A, Pradeep S, D'acunto CW, et al. Pigment epithelium-derived factor and its phosphomimetic mutant induce JNK-dependent apoptosis and p38-mediated migration arrest [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(5): 3540-3551.
- [17] Yang J, Duh EJ, Caldwell RB, et al. Antipermeability function of PEDF involves blockade of the MAP kinase/

- GSK/beta-catenin signaling pathway and uPAR expression [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(6): 3273-3280.
- [18] Notari L, Arakaki N, Mueller D, et al. Pigment epithelium-derived factor binds to cell-surface F(1)-ATP synthase[J]. *FEBS J*, 2010, 277(9): 2192-2205.
- [19] Cai J, Wu L, Qi XP, et al. PEDF Regulates Vascular Permeability by a gamma-Secretase-Mediated Pathway [J]. *Plos One*, 2011, 6(6): e21164.
- [20] Li L, Yao YC, Fang SH, et al. Pigment Epithelial-derived Factor (PEDF)-triggered Lung Cancer Cell Apoptosis Relies on p53 Protein-driven Fas Ligand (Fas-L) Up-regulation and Fas Protein Cell Surface Translocation[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(44): 30785-30799.
- [21] Chao J, Tillman DM, Wang MY, et al. Identification of a new tissue-kallikrein-binding protein[J]. *Biochem J*, 1986, 239(2): 325-331.
- [22] Chao J, Stallone JN, Liang Y-M, et al. Kallistatin is a potent new vasodilator [J]. *J Clin Investig*, 1997, 100(1): 11-17.
- [23] McBride JD, Jenkins AJ, Liu XC, et al. Elevated Circulation Levels of an Antiangiogenic SERPIN in Patients with Diabetic Microvascular Complications Impair Wound Healing through Suppression of Wnt Signaling [J]. *J Investig Dermatol*, 2014, 134(6): 1725-1734.
- [24] Liu XC, Zhang B, McBride JD, et al. Antiangiogenic and Antineuroinflammatory Effects of Kallistatin Through Interactions With the Canonical Wnt Pathway [J]. *Diabetes*, 2013, 62(12): 4228-4238.
- [25] Shen B, Hagiwara M, Yao YY, et al. Salutary effect of kallistatin in salt-induced renal injury, inflammation, and fibrosis via antioxidative stress [J]. *Hypertension*, 2008, 51(5): 1358-1365.
- [26] Li P, Bledsoe G, Yang ZR, et al. Human kallistatin administration reduces organ injury and improves survival in a mouse model of polymicrobial sepsis [J]. *Immunology*, 2014, 142(2): 216-226.
- [27] Sorenson CM, Wang S, Gendron R, et al. Thrombospondin-1 Deficiency Exacerbates the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy [J]. *J Diabetes Metab*, 2013, Suppl 12: S2-S6.
- [28] Isenberg JS, Martin-Manso G, Maxhimer JB, et al. Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(3): 182-194.
- [29] Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, et al. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1 [J]. *Nat Med*, 2000, 6(1): 41-48.
- [30] Huang SP, Palla S, Ruzycki P, et al. Aldo-Keto Reductases in the Eye [J]. *J Ophthalmol*, 2010: ? 2010(4):521204.
- [31] Koyama H, Tanaka S, Monden M, et al. Comparison of effects of pioglitazone and glimepiride on plasma soluble RAGE and RAGE expression in peripheral mononuclear cells in type 2 diabetes: randomized controlled trial (Pi-oRAGE) [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 234(2): 329-334.
- [32] Geraldine P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, et al. Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy [J]. *Nat Med*, 2009, 15(11): 1298-1306.
- [33] Yokota T, Ma RC, Park JY, et al. Role of protein kinase C on the expression of platelet-derived growth factor and endothelin-1 in the retina of diabetic rats and cultured retinal capillary pericytes [J]. *Diabetes*, 2003, 52(3): 838-845.
- [34] Geraldine P, King GL. PDGF Inactivation and Oxidative/NF-kappa B Are Equally Important and Independent Pathway To Cause Pericyte Apoptosis in Diabetic Retinopathy [J]. *Diabetes*, 2009, 58: A101-A101.
- [35] Watanabe D, Suzuma K, Suzuma I, et al. Vitreous levels of angiopoietin 2 and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Am J Ophthalmol*, 2005, 139(3): 476-481.
- [36] Schmidinger G, Maar N, Bolz M, et al. Repeated intravitreal bevacizumab (Avastin((R))) treatment of persistent new vessels in proliferative diabetic retinopathy after complete panretinal photocoagulation [J]. *Acta Ophthalmol*, 2011, 89(1): 76-81.
- [37] Jenkins AJ, Fu D, Azar M, et al. Clinical correlates of serum pigment epithelium-derived factor in type 2 diabetes patients [J]. *J Diabetes Complic*, 2014, 28(3): 353-359.
- [38] Park K, Jin J, Hu Y, et al. Overexpression of pigment epithelium-derived factor inhibits retinal inflammation and neovascularization [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(2): 688-698.
- [39] Zhou T, Zhou KK, Lee K, et al. The role of lipid peroxidation products and oxidative stress in activation of the canonical wingless-type MMTV integration site (WNT) pathway in a rat model of diabetic retinopathy [J]. *Diabetologia*, 2011, 54(2): 459-468.
- [40] Chen Y, Hu Y, Zhou T, et al. Activation of the Wnt

- pathway plays a pathogenic role in diabetic retinopathy in humans and animal models [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(6): 2676–2685.
- [41] Che D, Zhou T, Lan Y, et al. High glucose-induced epithelial-mesenchymal transition contributes to the up-regulation of fibrogenic factors in retinal pigment epithelial cells [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(6): 1815–1822.
- [42] Qi WW, Yang C, Dai ZY, et al. High Levels of Pigment Epithelium-Derived Factor in Diabetes Impair Wound Healing Through Suppression of Wnt Signaling [J]. *Diabetes*, 2015, 64(4): 1407–1419.
- [43] Wang JJ, Zhang SX, Lu KM, et al. Decreased expression of pigment epithelium-derived factor is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2005, 54(1): 243–250.
- [44] Wang JJ, Zhang SX, Mott R, et al. Salutary effect of pigment epithelium-derived factor in diabetic nephropathy – Evidence for antifibrogenic activities [J]. *Diabetes*, 2006, 55(6): 1678–1685.
- [45] Wang JJ, Zhang SX, Mott R, et al. Anti-inflammatory effects of pigment epithelium-derived factor in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2008, 57: A208–A208.
- [46] Zhou T, He X, Cheng R, et al. Implication of dysregulation of the canonical wingless-type MMTV integration site (WNT) pathway in diabetic nephropathy [J]. *Diabetologia*, 2012, 55(1): 255–266.
- [47] Jevtich MJ, Khawand NY, Vidic B. Clinical significance of ultrastructural findings in the corpora cavernosa of normal and impotent men [J]. *J Urol*, 1990, 143(2): 289–293.
- [48] Risau W, Flamme I. Vasculogenesis [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11: 73–91.
- [49] Yoder MC. Human Endothelial Progenitor Cells [J]. *Cold Spring Harbor Perspect Med*, 2012, 2(7): a006692.
- [50] Liu HB, Gong YF, Yu CJ, et al. Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases: from biomarker to therapeutic agent [J]. *Regen Med Res*, 2013, 1(1): 9.
- [51] Diabetic Retinopathy Clinical Research Network, Wells JA, Glassman AR, et al. Aflibercept, bevacizumab, or ranibizumab for diabetic macular edema [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(13): 1193–1203.
- [52] Kirby M, Jackson G, Simonsen U. Endothelial dysfunction links erectile dysfunction to heart disease [J]. *Int J Clin Pract*, 2005, 59(2): 225–229.
- [53] Senet P. [Becaplermin gel (Regranex gel)] [J]. *Ann Dermatol Venerol*, 2004, 131(4): 351–358.
- [54] Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(5): 1219–1222.
- [55] Uchi H, Igarashi A, Urabe K, et al. Clinical efficacy of basic fibroblast growth factor (bFGF) for diabetic ulcer [J]. *Eur J Dermatol*, 2009, 19(5): 461–468.
- [56] Fernandez-Montequin JI, Valenzuela-Silva CM, Diaz OG, et al. Intra-lesional injections of recombinant human epidermal growth factor promote granulation and healing in advanced diabetic foot ulcers: multicenter, randomised, placebo-controlled, double-blind study [J]. *Int Wound J*, 2009, 6(6): 432–443.
- [57] Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, et al. Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers [J]. *Diabet Med*, 2002, 19(6): 440–447.
- [58] Blakytyn R, Jude EB, Martin Gibson J, et al. Lack of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers [J]. *J Pathol*, 2000, 190(5): 589–594.
- [59] Li L, Yao YC, Gu XQ, et al. Plasminogen kringle 5 induces endothelial cell apoptosis by triggering a voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) positive feedback loop [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(47): 32628–32638.
- [60] 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): 1254–1261.
- [61] Yang X, Cai W, Xu Z, et al. High efficacy and minimal peptide required for the anti-angiogenic and anti-hepatocarcinoma activities of plasminogen K5 [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(10): 2519–2530.
- [62] Li C, Li L, Cheng R, et al. Acidic/neutral amino acid residues substitution in NH2 terminal of plasminogen kringle 5 exerts enhanced effects on corneal neovascularization [J]. *Cornea*, 2013, 32(5): 680–688.

(编辑 刘清海)