

# 不同批次的重组诱饵型受体创新药物 RC28-E1 与 RC28-E2 对视网膜新生血管的药效学比较及机制

谷中秀 姜静 黄敏 吴绵绵 郭芳 李慎军 房健民 赵少贞 张琰

300384 天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼科研究所 天津医科大学眼视光学院(谷中秀、吴绵绵、郭芳、赵少贞、张琰);264003 滨州医学院药学院(姜静);264006 荣昌生物制药(烟台)有限公司(黄敏、李慎军);200092 上海,同济大学生命科学与技术学院(房健民)

通信作者:赵少贞,Email:szhao04@tmu.edu.cn;张琰,Email:yanzhang04@tmu.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.08.002

**【摘要】** 目的 探讨不同批次的重组诱饵型受体创新药物 RC28-E1 与 RC28-E2 对视网膜新生血管的药效学比较及作用机制。方法 选取健康清洁级 4 日龄 C57BL/6J 幼鼠 60 只,应用随机数字表法随机分为正常对照组、血管内皮生长因子(VEGF)+成纤维细胞生长因子 2(FGF2)组、VEGF+FGF2+RC28-E1 组、VEGF+FGF2+RC28-E2 组、VEGF+FGF2+conbercept 组、VEGF+FGF2+FGF trap 组,每组 10 只。取各组视网膜组织块构建培养体系,加入用饥饿培养基配置的相应因子和药物刺激,正常对照组加饥饿培养基。将各组视网膜组织块进行植物凝集素(Isolectin B4)染色并拍照,计算各组单位血管长度下视网膜血管顶细胞分叉的数量。另选 96 只健康清洁级 7 日龄 C57BL/6J 幼鼠,应用随机数字表法随机分为正常对照组、氧诱导视网膜病变(OIR)模型对照组、OIR+RC28-E1 组、OIR+RC28-E2 组、OIR+conbercept 组和 OIR+FGF trap 组,每组 16 只。正常对照组在常氧下饲养 10 d,其余各组在高氧环境中饲养 5 d 后在常氧状态下再饲养 5 d。各组取 17 日龄鼠视网膜进行 Isolectin B4 染色并拍照,用计算机软件分析视网膜相对无灌注区面积和新生血管像素。Western blot 法检测 OIR 实验各组视网膜中 VEGF 和 FGF2 的蛋白水平。最后,在 VEGF 和 FGF2 刺激下的视网膜血管内皮细胞(RF/6A)中,检测给予 RC28-E1、conbercept 以及 FGF trap 处理后,细胞的 MEK-细胞外调节蛋白激酶(Erk)、蛋白激酶 C(PKC)以及蛋白激酶 B(Akt)信号传导通路的活性变化。**结果** 视网膜组织块研究结果显示,VEGF+FGF2+RC28-E1 组、VEGF+FGF2+RC28-E2 组、VEGF+FGF2+conbercept 组和 VEGF+FGF2+FGF trap 组中单位血管长度的顶细胞分叉数目均明显少于 VEGF+FGF2 组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.001$ ),其中 RC28-E1 组与 RC28-E2 组的血管顶细胞分叉数量相似,差异无统计学意义( $P = 0.15$ ),但均明显少于 VEGF+FGF2+conbercept 组和 VEGF+FGF2+FGF trap 组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.001$ )。OIR 模型对照组无灌注区相对面积明显大于各药物干预组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ),OIR+RC28-E1 组与 OIR+RC28-E2 组视网膜无灌注区相对面积的比较,差异无统计学意义( $P = 0.17$ ),但二者明显小于 OIR+conbercept 组和 OIR+FGF trap 组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。各干预组新生血管的相对像素值明显低于 OIR 模型对照组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.001$ ),OIR+RC28-E1 组视网膜新生血管的相对像素值明显低于 VEGF+FGF2+conbercept 组和 VEGF+FGF2+FGF trap 组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ),但与 OIR+RC28-E2 组相比,差异无统计学意义( $P = 0.39$ )。Western blot 结果显示,OIR 小鼠视网膜中 VEGF 和 FGF2 的蛋白表达均较正常对照组显著上调,差异均有统计学意义(均  $P < 0.001$ ),而 RC28-E1 和 RC28-E2 可使其降至正常水平。VEGF 和 FGF2 可诱导 RF/6A 细胞中的 MEK-Erk 通路活性增强,而 RC28-E1 可显著抑制这一通路的过度激活。**结论** RC28-E1 和 RC28-E2 可在初生小鼠视网膜组织块中抑制血管生成,并减少 OIR 小鼠模型中视网膜的无灌注区,减轻新生血管生成。药理批次和中试批次的 RC28-E 在体内外模型中的效果相当,稳定性可靠,且优于临床同类药物 conbercept 和 FGF trap。RC28-E1 可能是通过抑制视网膜血管内皮细胞中 MEK-Erk 通路的过度激活而达到抑制病理性新生血管生成的效果的。

**【关键词】** 视网膜新生血管; 诱饵型受体; 碱性成纤维细胞生长因子; 血管内皮生长因子; 重组蛋白质药物

**基金项目:** 荣昌生物制药(烟台)有限公司与天津医科大学眼科医院横向合作项目

**Comparison of pharmacodynamics between different batches of recombinant decoy receptor innovative drug RC28-E1 and RC28-E2 in retinal angiogenesis and neovascularization and its mechanism** Gu Zhongxiu, Jiang Jing, Huang Min, Wu Mianmian, Guo Fang, Li Shenjun, Fang Jianmin, Zhao Shaozhen, Zhang Yan

Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin Medical University Eye Institute, College of Optometry and Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300384, China (Gu ZX, Wu MM, Guo F, Zhao SZ, Zhang Y); School of Pharmacy, Binzhou Medical University, Binzhou 264003, China (Jiang J); Remegen, Ltd., Yantai 264006, China (Huang M, Li SJ); School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China (Fang JM)  
Corresponding authors: Zhao Shaozhen, Email: szhao04@tmu.edu.cn; Zhang Yan, Email: yanzhang04@tmu.edu.cn

**[Abstract] Objective** To compare the pharmacodynamics between different batches of recombinant decoy receptor innovative drug RC28-E1 and RC28-E2 in retinal angiogenesis and neovascularization, and analyze its mechanism. **Methods** Sixty postnatal Day 4 (P4) C57BL/6J mice were randomly divided into normal control group, vascular endothelial growth factor (VEGF)+fibroblast growth factor 2 (FGF2) group, VEGF+FGF2+RC28-E1 group, VEGF+FGF2+RC28-E2 group, VEGF+FGF2+conbercept group and VEGF+FGF2+FGF trap group by using a random number table, with 10 mice in each group. The mouse retinal explant culture system was established, and stimulated with the corresponding factors and drugs prepared in the starving culture media. The normal controls were treated with the starving media. Then the retinal explants were stained with Isolectin B4 and imaged. The number of filopodia per vascular length was quantified. In addition, ninety-six P7 C57BL/6J mice were randomly divided into normal control group, oxygen-induced retinopathy (OIR) model control group, OIR+RC28-E1 group, OIR+RC28-E2 group, OIR+conbercept group and OIR+FGF trap group by using a random number table, with 16 mice in each group. The normal controls were raised under normoxia for 10 days, and the rest of the groups were raised under hyperoxia for 5 days, then returned to normoxia for another 5 days. On P17, the retinas were isolated and stained with Isolectin B4. The stained retinas were mounted on the slides and photographed. The relative vessel obliteration and neovascularization in retina were analyzed with computer software. Then the protein levels of VEGF and FGF2 were examined by Western blot in the retinas of each group in the OIR experiment. Finally, in the RF/6A cells stimulated with VEGF and FGF2, the activities of the signaling pathways, including MEK-extracellular regulated protein kinases (Erk), protein kinase C (PKC) and protein kinase B (Akt) pathways, were examined by Western blot. All experimental procedures were evaluated and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Tianjin Medical University (SYXK 2009-0001), and were in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. **Results** The results of retinal explant cultures showed that the numbers of filopodia per vascular length in VEGF+FGF2+RC28-E1, VEGF+FGF2+RC28-E2, VEGF+FGF2+conbercept, and VEGF+FGF2+FGF trap groups were all significantly less than that in the VEGF+FGF2 group (all at  $P < 0.001$ ). The filopodia number in retinal vascular front in RC28-E1 group was similar to that in the RC28-E2 group ( $P = 0.15$ ), whereas the filopodia numbers in both groups were significantly decreased as compared to those in VEGF+FGF2+conbercept group and VEGF+FGF2+FGF trap group (all at  $P < 0.001$ ). The results from the OIR mouse model showed that the relative vessel obliteration area in OIR model control group was dramatically higher than those in the drug intervention groups (all at  $P < 0.05$ ). There was no statistical significance in the relative vessel obliteration area between OIR+RC28-E1 group and OIR+RC28-E2 group ( $P = 0.17$ ), while the obliteration areas in both RC28-E-intervened groups were significantly lower than those in the OIR+conbercept group and OIR+FGF trap group (all at  $P < 0.05$ ). The relative neovascular pixels in the intervention groups were significantly lower than those in the OIR model control group (all at  $P < 0.001$ ). The neovascular pixels in OIR+RC28-E1 group were significantly lower than those in VEGF+FGF2+conbercept group and VEGF+FGF2+FGF trap group (both at  $P < 0.05$ ), but comparable to those in OIR+RC28-E2 group ( $P = 0.39$ ). Western blot result showed that, the protein expression of VEGF and FGF2 in the OIR mouse retinas were significantly upregulated compared to those in the normal ones (both at  $P < 0.001$ ). The upregulation of both genes were normalized by both RC28-E1 and RC28-E2. In addition, the stimulation of VEGF and FGF2 induced an enhanced activity in MEK-Erk pathway in RF/6A cells, whereas RC28-E1 inhibited the overactivation. **Conclusions** RC28-E1 and RC28-E2 both can inhibit angiogenesis in the retinal explants isolated from neonatal mice; they also reduce vessel obliteration and mitigate neovascularization in the OIR mouse model. Therefore, the pharmacology batch and pilot test batch of RC28-E have similar efficacies and reliable stability, and are superior in the anti-angiogenic and anti-neovascular efficacy to the currently clinically available drugs conbercept and FGF trap. RC28-E1 may suppress pathological neovascularization through inhibiting the overactivation of MEK-Erk pathway in retinal vascular endothelial cells.

**[Key words]** Retinal neovascularization; Decoy receptor; Basic fibroblast growth factor; Vascular endothelial growth factor; Recombinant protein drugs

**Fund program:** The Collaborative Project between Remegen, Ltd., Yantai and Tianjin Medical University Eye Hospital

年龄相关性黄斑变性、增生性糖尿病视网膜病变、起促血管生成因子和抗血管生成因子之间的平衡失  
早产儿视网膜病变等眼病会导致视网膜缺血、缺氧,引调,促使视网膜新生血管生成<sup>[1-3]</sup>。目前,靶向血管内

皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的药物,如雷珠单抗 (ranibizumab),已成为干预视网膜新生血管生成的一线药物<sup>[4]</sup>,但临床应用中会出现相当一部分患者对抗 VEGF 药物不反应;或在使用一段时间后,出现药物疗效下降的情况,这 2 种情况可能分别与造成视网膜新生血管生成的促血管生成因子的多样性和复杂性,以及药物的半衰期有关<sup>[5-6]</sup>。成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2) 能促进血管内皮细胞的增生、迁移及存活<sup>[7-8]</sup>。在 1 型和 2 型糖尿病大鼠模型,以及年龄相关性黄斑变性小鼠模型中,均可检测到 FGF2 表达显著上调<sup>[9-12]</sup>;在早产儿视网膜病变的动物模型氧诱导视网膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 小鼠模型中,用抗 VEGF 的核酸适配体单纯拮抗 VEGF 可引起 FGF2 代偿性表达上调<sup>[13]</sup>。另有体外研究表明,FGF2 不但可以促进视网膜血管内皮细胞分泌 VEGF,而且可与 VEGF 协同作用,促进新生血管生成<sup>[14-17]</sup>。因此,能同时拮抗 VEGF 和 FGF2 靶点,并且半衰期较长的新型药物可能对这 3 种新生血管性眼底疾病有更佳的干预效果。荣昌生物制药(烟台)有限公司开发的具有自主知识产权的新型重组诱饵型受体 RC28-E 能同时以高亲和力结合 VEGF 和 FGF2,而且其半衰期长于仅有单克隆抗体 Fab 段的 ranibizumab,具有能够更好干预视网膜新生血管生成的潜能。事实上,研究表明 RC28-E 能有效抑制人脐静脉内皮细胞的增生和迁移以及 OIR 小鼠模型中的视网膜新生血管生成,效果显著优于拮抗 VEGF-A 的 VEGF-Trap 对照品<sup>[18]</sup>。另外,药理批次的 RC28-E1 的药效学研究已在糖尿病大鼠和 OIR 小鼠模型中进行,并证实干预效果良好。为了后续临床试验的需要,公司开发了中试批次的 RC28-E2 药物。本研究拟在体外初生小鼠视网膜组织块培养体系以及 OIR 小鼠模型中,以临床上已有的同类药物康柏西普 (conbercept,能特异性结合 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C 和胎盘生长因子) 和 FGF trap (能特异性结合 FGF2)<sup>[19-21]</sup> 为对照品,对不同批次的 RC28-E1 与 RC28-E2 进行药效比较研究,为 RC28-E 的后续临床试验提供基础;探索 RC28-E 抗血管生成的分子机制,为寻找视网膜新生血管生成新型干预靶点提供思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 选取 60 只健康清洁级 4 日龄 (P4) C57BL/6J 幼鼠及相应母鼠 (北京维通利华实验动物技术有限公司),应用随机数字表法将乳鼠随机

分为正常对照组、VEGF+FGF2 组、VEGF+FGF2+RC28-E1 组、VEGF + FGF2 + RC28-E2 组、VEGF + FGF2 + conbercept 组和 VEGF+FGF2+FGF trap 组,每组 10 只。另选取 96 只健康清洁级 P7 C57BL/6J 幼鼠及相应母鼠 (北京维通利华实验动物技术有限公司),应用随机数字表法随机分为正常对照组、OIR 模型对照组、OIR+RC28-E1 组、OIR + RC28-E2 组、OIR + conbercept 组、OIR+FGF trap 组,每组 16 只。所有实验动物的操作规程均经天津医科大学动物伦理委员会审批 (批准号:SYXK 2009-0001),并且符合 ARVO 有关眼科与视觉科学研究中动物使用的相关规定。

**1.1.2 主要试剂及仪器** DMEM 细胞培养基、RPMI-1640 细胞培养基 (美国 Gibco 公司);胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素、链霉素、谷氨酰胺 (美国 Gibco 公司);VEGF、FGF2 因子 (美国 BD 公司);Alexa 488 标记的 isolectin-B4 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司);封片剂 (美国 Vector Laboratories 公司);RIPA 中性蛋白裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、蛋白印迹膜再生液 (北京康为世纪公司);组织培养半透膜、兔源 VEGF 多抗 (美国 Millipore 公司);兔源 FGF2 多抗、兔源全部蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)  $\beta$  多抗、兔源全部 PKC $\gamma$  多抗、HRP 标记羊抗兔二抗、HRP 标记羊抗鼠二抗 (美国 Abcam 公司);兔源磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, Erk) 1/2 单抗、鼠源全部 Erk1/2 单抗、兔源磷酸化蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 单抗、兔源全部 Akt 单抗、兔源磷酸化 PKC $\alpha/\beta$  II 多抗、兔源磷酸化 PKC $\gamma$  多抗、兔源全部 PKC $\alpha$  多抗、兔源 GAPDH 单抗 (美国 CST 公司);鼠源  $\beta$ -微管蛋白单抗 (美国 BD 公司)。直径 35 mm 细胞培养皿 (美国 Corning 公司);细胞培养孵箱 (日本 Sanyo 公司);荧光显微镜 (日本 Olympus 公司);手术显微镜 (日本 OPTON 公司);CY-12C 数字测氧仪 (浙江梅城电化分析仪器厂);UVP 多光谱成像系统 (美国 UVP 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 体外新生小鼠视网膜组织块培养体系的建立

根据文献<sup>[22-23]</sup>的方法,将组织培养半透膜放入直径 35 mm 细胞培养皿中,在其上方、下方各加入 1 ml 完全培养基 (DMEM+体积分数 10% FBS+谷氨酰胺+青链霉素),放入孵箱,在 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的条件下平衡。将 4 日龄乳鼠埋入冰中 3 min,使其麻醉后断颈,摘取双侧眼球。在手术显微镜下剥离完整的视网膜,并转移至半透膜上,节细胞层朝下,继而以视盘为中心将视网膜剪成 3 瓣。在组织块表面滴加



100  $\mu$ l 完全培养基,防止视网膜组织块表面干燥,再将培养物放入孵箱中恢复 2 h,然后加药刺激。

**1.2.2 OIR 小鼠模型的建立** 参照文献[24]的方法,将 OIR 模型对照组、OIR+RC28-E1 组、OIR+RC28-E2 组、OIR+conbercept 组和 OIR+FGF trap 组的 P7 幼鼠在通入体积分数(75 $\pm$ 2)%氧气的密闭氧舱中饲养,每组 16 只,每 12 小时监测氧体积分数,每 24 小时开仓换食水、垫料,替换母鼠。幼鼠在高氧环境下饲养 5 d 后,于 P12 出舱,再于常氧环境下饲养 5 d。正常对照组则在常氧环境下饲养 10 d。

**1.2.3 视网膜血管内皮细胞的培养与分组** 猴视网膜血管内皮细胞 RF/6A 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(上海)。RF/6A 细胞在含 RPMI-1640 培养基、10% FBS、100 U/ml(商品单位)青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素以及 2 mmol/L 谷氨酰胺的完全培养基中,在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、95% 湿度条件下培养。细胞生长至 90% 融合时以 1:2 或 1:3 传代,每 1~2 天更换培养基。细胞以 1 $\times$ 10<sup>6</sup>/孔的密度接种于 6 孔板中,分为正常对照组、VEGF+FGF2 组、VEGF+FGF2+RC28-E1 组、VEGF+FGF2+conbercept 组和 VEGF+FGF2+FGF trap 组,每组设 5 个孔。

**1.2.4 给药方法** 在体外视网膜组织块研究中,分别对 VEGF+FGF2 组、VEGF+FGF2+RC28-E1 组、VEGF+FGF2+RC28-E2 组、VEGF+FGF2+conbercept 组和 VEGF+FGF2+FGF trap 组加入 1 ml 用饥饿培养基(DMEM+3% FBS+谷氨酰胺+青链霉素)配成的相应刺激液,其中 VEGF 为 1  $\mu$ g/ml,FGF2 为 0.875  $\mu$ g/ml,RC28-E1、RC28-E2、conbercept 和 FGF trap 均为 0.08  $\mu$ g/ $\mu$ l;同时在视网膜组织块表面加上 100  $\mu$ l 相应的刺激液,防止视网膜干燥。

在 OIR 模型小鼠研究中,OIR+RC28-E1 组、OIR+RC28-E2 组、OIR+conbercept 组和 OIR+FGF trap 组小鼠经右眼玻璃体腔注射 1  $\mu$ l 相应药液,其中 RC28-E1、RC28-E2、conbercept、FGF trap 的药液质量浓度均为 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l;正常对照组和 OIR 模型对照组小鼠右眼经玻璃体腔各注射 1  $\mu$ l 生理盐水。

在 RF/6A 细胞研究中,细胞种于 6 孔板,待细胞贴壁后,用细胞饥饿培养液(0.5% FBS+RPMI-1640+青链霉素)培养细胞 15~16 h。然后,分别对 VEGF+FGF2 组、VEGF+FGF2+RC28-E1 组、VEGF+FGF2+conbercept 组和 VEGF+FGF2+FGF trap 组加入用细胞饥饿培养基配置的相应刺激液,其中 VEGF 为 80 ng/ml,FGF2 为 70 ng/ml,RC28-E1、conbercept 和 FGF trap 均为 0.08  $\mu$ g/ $\mu$ l,刺激细胞 6 h。

**1.2.5 免疫荧光标本的处理** 视网膜组织块在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中刺激 4 h 后,用预热的质量分数 4% 多聚甲醛(组织培养半透膜的上方和下方各 1 ml)在 37  $^{\circ}$ C 固定 40 min,然后转至 4  $^{\circ}$ C 过夜固定。腹腔内注射过量 10% 水合氯醛处死 P17 的 OIR 及正常对照组小鼠,摘取眼球,在 4% 多聚甲醛中室温固定 40 min,之后将眼球放入 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)中 4  $^{\circ}$ C 保存。在手术显微镜下剥离完整的视网膜,并于 4  $^{\circ}$ C 用 4% 多聚甲醛固定过夜。

**1.2.6 Isolectin B4 染色** 次日,将视网膜组织块或视网膜标本用 pH 7.4 的 PBS 漂洗 2 遍后,用含 pH 6.8 的 PBS、质量分数 1% BSA 和体积分数 0.5% Triton X-100 通透缓冲液在 4  $^{\circ}$ C 条件下对视网膜通透约 20 h,再用含 pH 6.8 的 PBS、1% Triton X-100、0.1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、0.1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.1 mmol/L MnCl<sub>2</sub> 的 PBlec 缓冲液中漂洗 3 遍,用 Alexa-488 标记 Isolectin B4 (1:500, PBlec 缓冲液稀释)在 4  $^{\circ}$ C 条件下孵育约 20 h,对视网膜血管进行染色。用 pH 7.4 的 PBS 漂洗 3 遍。然后,将染色后的标本以节细胞层向上平铺于载玻片上,用含 DAPI 的抗荧光衰退封片剂封片。

**1.2.7 荧光显微镜下拍照及定量分析** 染色后,在荧光显微镜下用相同的光学参数拍照。对于视网膜组织块,拍摄视网膜血管的 100 倍照片,采用 CellSens Standard 软件,根据文献[22]的方法,测算单位长度下的视网膜血管网顶细胞的分叉数目。对于 OIR 小鼠视网膜,拍摄视网膜血管的 40 倍照片,并拼合成整体视网膜照片,参照文献[25],采用 CellSens Standard 软件测量视网膜无灌注区占全视网膜的相对面积。最后根据文献[26]的方法,用 SWIFT-NV 辅助 Image J 软件定量分析新生血管占整个视网膜的相对像素。即由计算机将勾勒出无灌注区的视网膜血管染色图像分为 4 个象限,每个象限的图片转换成黑白两色并去除背景荧光,使新生血管的图像更加清晰。在每个象限中,需设置标记新生血管簇的荧光阈值,然后手动去除细胞碎片、非特异性标记的染料、标尺等无需分析的图像信息。SWIFT-NV 软件自动分析在设定阈值之上的像素值。将图片的 4 个象限按以上步骤分析完毕后,软件将自动给出整个图片中新生血管簇的像素值,并生成标记的新生血管簇(白色)与原始图片叠加的新图片。然后,用新生血管的像素值占整个视网膜像素值的百分率表示视网膜新生血管生成的指标。

**1.2.8 总蛋白的提取和浓度测定** 在 OIR 模型实验中,将 P17 小鼠深度麻醉后,迅速在显微镜下分离视网膜,液氮速冻后,-80  $^{\circ}$ C 储存;另一方面,将刺激后的

RF/6A 细胞孔板置于冰上,吸取上清液,用冰预冷的 PBS 洗细胞 2 遍。提取总蛋白时,向收集的小鼠视网膜组织和 RF/6A 细胞样品中加入适量的含蛋白酶抑制剂的 RIPA 蛋白裂解液,按试剂盒说明书提取细胞总蛋白。然后将提取的总蛋白用裂解液稀释 5 倍,按 BCA 蛋白定量试剂盒的说明书检测总蛋白浓度,并按 50 μg 将蛋白进行分装,冻存于 -80 °C 备用。

**1.2.9 Western blot 法测定视网膜中 VEGF 和 FGF2 的相对蛋白水平以及细胞中相关信号分子的相对表达水平** 将各组分装的 50 μg 蛋白进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 100 V 恒压电泳,直至各泳道前端的溴酚蓝到达电泳胶板的底部。然后,用湿转法在 100 V 恒压,100 min 的条件下,将胶上的蛋白转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上。用质量分数 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜,室温放置 1 h。将膜与各目标蛋白的一抗(均按抗体说明书,用封闭液稀释)孵育,4 °C 过夜。转天, TBST 缓冲液洗膜,膜与辣根过氧化物酶标记的相应二抗(按抗体说明书,用封闭液或 TBST 稀释)室温孵育 2 h, TBST 洗膜后, ECL 发光剂避光孵育 3 min, 在 UVP 多光谱成像系统中拍照。然后用蛋白印迹膜再生液去除膜上已有的蛋白印迹,再与 β-微管蛋白或 GAPDH 内参基因的抗体进行孵育,显色。各蛋白条带的发光强度用 Image J 软件进行分析,然后计算 VEGF 或 FGF2 的发光强度与内参基因(GAPDH)发光强度的比值;或者在信号通路机制研究中,计算磷酸化目标蛋白的发光强度与总体目标蛋白发光强度的比值,进行定量分析。

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 13.0 统计学软件 (SPSS Inc.; San Diego, CA, USA) 进行统计分析。各组量化的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间均数经 Levene 检验证实方差齐。各组检测数据的整体比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey post hoc 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 RC28-E1 和 RC28-E2 对视网膜组织块血管顶细胞的作用效果比较**

正常对照组的顶细胞分叉较少, VEGF+FGF2 组可见大量顶细胞分叉,各干预组的顶细胞分叉比 VEGF+FGF2 组减少(图 1)。正常对照组、VEGF+FGF2 组、VEGF+FGF2+RC28-E1 组、VEGF+FGF2+RC28-E2 组、VEGF+FGF2+conbercept 组和 VEGF+FGF2+FGF trap 组单位血管长度的顶细胞分叉数目整

体比较差异有统计学意义 ( $F = 40.20, P = 0.00$ ), 其中 VEGF+FGF2 组视网膜组织块血管的顶细胞分叉数目明显多于正常对照组, VEGF+FGF2+RC28-E2 组则低于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 其余各组与正常对照组比较差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。各干预组视网膜组织块血管的顶细胞分叉数目均明显少于 VEGF+FGF2 组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ), VEGF+FGF2+RC28-E1 组与 VEGF+FGF2+RC28-E2 组的微血管顶细胞分叉数量相似, 差异无统计学意义 ( $P = 0.15$ ), 但明显少于 VEGF+FGF2+conbercept 组和 VEGF+FGF2+FGF trap 组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.001$ ) (表 1)。

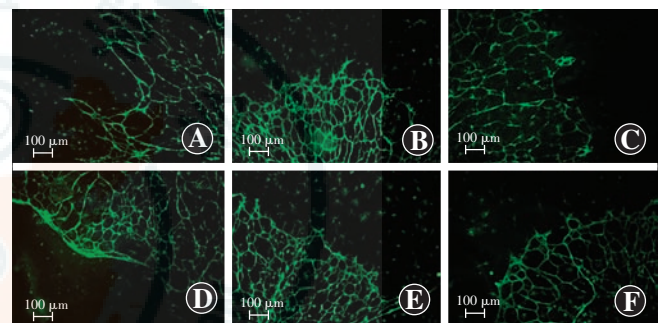


图 1 各组 P4 小鼠视网膜组织块血管顶细胞分叉情况 (Isolectin B4 ×100, 标尺=100 μm) 正常对照组的顶细胞分叉较少, VEGF+FGF2 组可见大量顶细胞分叉, 各干预组的顶细胞分叉比 VEGF+FGF2 组减少 A: 正常对照组 B: VEGF+FGF2 组 C: VEGF+FGF2+RC28-E1 组 D: VEGF+FGF2+RC28-E2 组 E: VEGF+FGF2+conbercept 组 F: VEGF+FGF2+FGF trap 组

表 1 各组单位血管长度的顶细胞分叉数目比较 ( $\bar{x} \pm s, /mm$ )

组别	样本量	单位血管长度的顶细胞分叉数目
正常对照组	10	9.11±2.20
VEGF+FGF2 组	10	17.27±4.94 <sup>a</sup>
VEGF+FGF2+RC28-E1 组	10	6.93±2.97 <sup>b</sup>
VEGF+FGF2+RC28-E2 组	10	5.94±2.20 <sup>ab</sup>
VEGF+FGF2+conbercept 组	10	10.48±2.48 <sup>bcd</sup>
VEGF+FGF2+FGF trap 组	10	11.22±3.61 <sup>bcd</sup>
F 值		40.20
P 值		0.00

注:与正常对照组比较, <sup>a</sup>P<0.05; 与 VEGF+FGF2 组比较, <sup>b</sup>P<0.05; 与 VEGF+FGF2+RC28-E1 组比较, <sup>c</sup>P<0.05; 与 VEGF+FGF2+RC28-E2 组比较, <sup>d</sup>P<0.05(单因素方差分析, Tukey post hoc 检验) VEGF: 血管内皮生长因子; FGF: 成纤维细胞生长因子

**2.2 RC28-E1 和 RC28-E2 对 OIR 小鼠视网膜无灌注区相对面积的影响**

正常对照组视网膜中央未见无灌注区; OIR 模型对照组视网膜血管排列紊乱、迂曲, 中央可见大片无灌注区, 在无灌注区和灌注区交界处可见大量新生血管



芽。各干预组无灌注区面积明显缩小, OIR+RC28-E1 组和 OIR + RC28-E2 组无灌注区面积小于 OIR + conbercept 组和 OIR+FGF trap 组(图 2)。定量分析结果显示, 正常对照组、OIR 模型对照组、OIR+RC28-E1 组、OIR + RC28-E2 组、OIR + conbercept 组、OIR + FGF trap 组的无灌注区整体比较差异有统计学意义( $F = 11.64, P = 0.00$ ), 其中 OIR 模型对照组无灌注区相对面积明显大于各干预组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ), OIR+RC28-E1 组和 OIR+RC28-E2 组视网膜无灌注区的相对面积比较, 差异无统计学意义( $P = 0.17$ ), 但二者均明显小于 OIR+conbercept 组和 OIR + FGF trap 组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(表 2)。

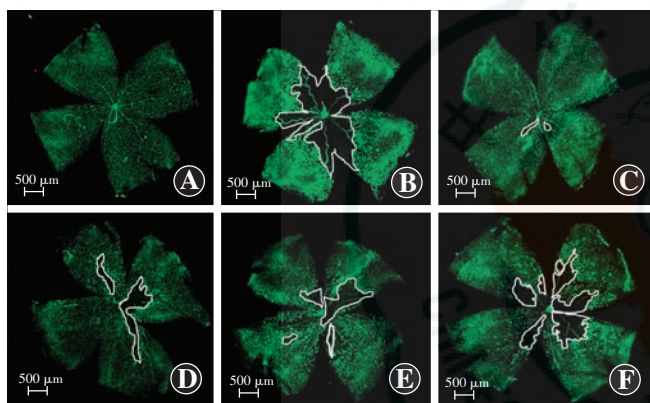


图 2 OIR 小鼠视网膜无灌注区比较 (Isolectin B4  $\times 20$ , 标尺 = 500  $\mu\text{m}$ )  
 正常对照视网膜中央未见无灌注区; OIR 模型对照视网膜血管排列紊乱、迂曲, 中央可见大片无灌注区, 在无灌注区和灌注区交界处可见大量新生血管芽; 各干预组无灌注区面积明显缩小, OIR+RC28-E1 组和 OIR+RC28-E2 组无灌注区面积小于 OIR+conbercept 组和 OIR+FGF trap 组(无灌注区用白色线条勾勒) A: 正常对照组 B: OIR 模型对照组 C: OIR+RC28-E1 组 D: OIR+RC28-E2 组 E: OIR+conbercept 组 F: OIR+FGF trap 组

表 2 各组视网膜无灌注区相对面积及视网膜新生血管的相对像素值比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	样本量	视网膜无灌注区 相对面积	视网膜新生血管 的相对像素值
正常对照组	8	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
OIR 模型对照组	8	22.50 $\pm$ 3.39 <sup>a</sup>	14.94 $\pm$ 2.89 <sup>a</sup>
OIR+RC28-E1 组	8	6.41 $\pm$ 2.68 <sup>b</sup>	2.99 $\pm$ 0.52 <sup>ab</sup>
OIR+RC28-E2 组	8	11.68 $\pm$ 9.26 <sup>ab</sup>	3.74 $\pm$ 2.15 <sup>ab</sup>
OIR+conbercept 组	8	15.58 $\pm$ 8.29 <sup>acd</sup>	4.48 $\pm$ 0.86 <sup>abc</sup>
OIR+FGF trap 组	8	13.63 $\pm$ 8.92 <sup>acd</sup>	5.34 $\pm$ 2.45 <sup>abc</sup>
F 值		11.64	57.97
P 值		0.00	0.00

注: 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 OIR 模型对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 OIR+RC28-E1 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 OIR+RC28-E2 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, Tukey post hoc 检验) OIR: 氧诱导视网膜病变; FGF: 成纤维细胞生长因子

### 2.3 RC28-E1 和 RC28-E2 对 OIR 小鼠视网膜新生血管的影响

正常对照组视网膜中未见新生血管。OIR 模型对照组中可见大量新生血管, 集中在视网膜无灌注区、血管覆盖区交界处和视网膜周边部, 各干预组新生血管减少(图 3)。定量分析结果显示, 正常对照组、OIR 模型对照组、OIR+RC28-E1 组、OIR+RC28-E2 组、OIR + conbercept 组、OIR+FGF trap 组视网膜中新生血管的相对像素数量整体比较差异有统计学意义( $F = 57.97, P = 0.00$ ), 其中各干预组视网膜新生血管的相对像素数量显著低于 OIR 模型对照组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.001$ )。OIR+RC28-E1 组视网膜新生血管的相对像素值显著低于 OIR+conbercept 组和 OIR+FGF trap 组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ), 但 OIR+RC28-E1 组与 OIR+RC28-E2 组比较差异无统计学意义( $P = 0.39$ )。OIR+RC28-E2 组视网膜新生血管的相对像素值与 OIR+conbercept 组和 OIR+FGF trap 组比较, 差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )(表 2)。

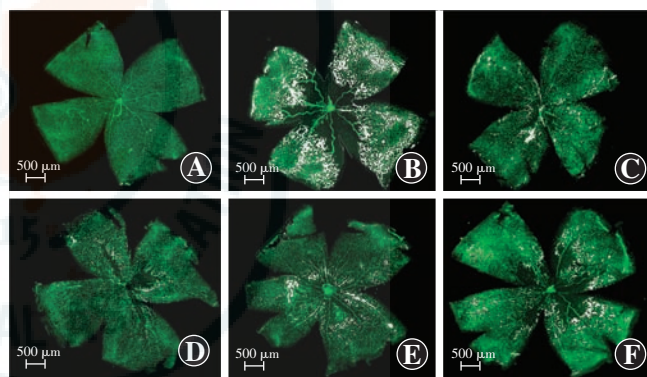
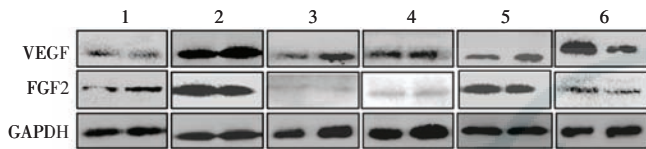


图 3 OIR 小鼠视网膜新生血管情况 (Isolectin B4  $\times 20$ , 标尺 = 500  $\mu\text{m}$ )  
 正常对照组视网膜中未见新生血管; OIR 模型对照组中可见大量新生血管, 集中在视网膜无灌注区、血管覆盖区交界处和视网膜周边部, 各干预组新生血管减少 A: 正常对照组 B: OIR 模型对照组 C: OIR+RC28-E1 组 D: OIR+RC28-E2 组 E: OIR+conbercept 组 F: OIR+FGF trap 组

### 2.4 RC28-E1 和 RC28-E2 对 OIR 小鼠视网膜中 VEGF 和 FGF2 蛋白水平的影响

在正常对照组中, 可检测到 VEGF 的基础蛋白表达水平。在 OIR 模型对照组中 VEGF 蛋白表达上调。在药物干预组中, 除 OIR+FGF trap 组外, 其余各组 VEGF 蛋白相对表达水平下降至与正常对照组相似的水平(图 4)。正常对照组、OIR 模型对照组、OIR + RC28-E1 组、OIR + RC28-E2 组、OIR + conbercept 组、OIR+FGF trap 组小鼠视网膜中 VEGF 蛋白相对表达水平的整体比较, 差异有统计学意义( $F = 9.33, P = 0.00$ ), 其中 OIR 模型对照组 VEGF 表达水平较正常对照组明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ ); OIR+RC28-E1 组、OIR+RC28-E2 组和 OIR+conbercept

组 VEGF 相对表达水平均较 OIR 模型对照组明显降低, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.001$ ); OIR+RC28-E1 组、OIR+RC28-E2 组和 OIR+conbercept 组 VEGF 相对表达水平与正常对照组比较, 差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。OIR+FGF trap 组视网膜中 VEGF 的相对表达水平显著高于正常对照组及其他干预组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ), 且与 OIR 模型对照组相比差异无统计学意义( $P = 0.99$ )(表 3)。



**图 4 Western blot 法检测各组视网膜中 VEGF 和 FGF2 的水平比较** 正常对照组中可检测到 VEGF 和 FGF2 蛋白的基础表达水平; OIR 模型对照组中 VEGF 和 FGF2 蛋白表达均上调; OIR+RC28-E1 组、OIR+RC28-E2 组和 OIR+conbercept 组 VEGF 的蛋白水平均较 OIR 模型对照组降低; 而 OIR+RC28-E1 组、OIR+RC28-E2 组和 OIR+FGF trap 组 FGF2 的蛋白水平均较 OIR 模型对照组降低 1: 正常对照组 2: OIR 模型对照组 3: OIR+RC28-E1 组 4: OIR+RC28-E2 组 5: OIR+conbercept 组 6: OIR+FGF trap 组 注: VEGF: 血管内皮生长因子; FGF: 成纤维细胞生长因子; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶

**表 3 各组视网膜中 VEGF 和 FGF2 蛋白相对表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	样本量	VEGF 蛋白 相对表达水平	FGF2 蛋白 相对表达水平
正常对照组	8	0.51 ± 0.23	0.62 ± 0.17
OIR 模型对照组	8	1.24 ± 0.71 <sup>a</sup>	1.30 ± 0.13 <sup>a</sup>
OIR+RC28-E1 组	8	0.67 ± 0.27 <sup>b</sup>	0.60 ± 0.18 <sup>b</sup>
OIR+RC28-E2 组	8	0.66 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.66 ± 0.08 <sup>b</sup>
OIR+conbercept 组	8	0.62 ± 0.10 <sup>b</sup>	1.21 ± 0.53 <sup>acd</sup>
OIR+FGF trap 组	8	1.24 ± 0.62 <sup>acde</sup>	0.53 ± 0.06 <sup>be</sup>
F 值		9.33	15.01
P 值		0.00	0.00

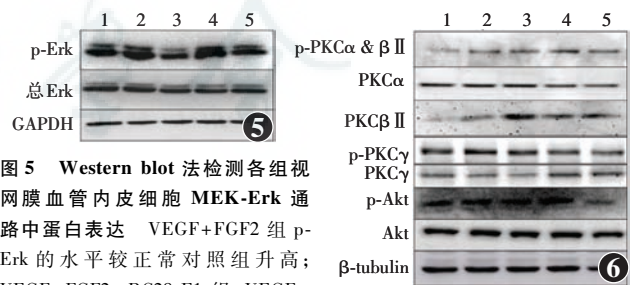
注: 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 OIR 模型对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 OIR+RC28-E1 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 与 OIR+RC28-E2 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与 OIR+conbercept 组比较, <sup>e</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, Tukey post hoc 检验) VEGF: 血管内皮生长因子; FGF: 成纤维细胞生长因子; OIR: 氧诱导视网膜病变

在正常对照组中, 可检测到 FGF2 的基础蛋白表达水平。OIR 模型对照组中 FGF2 蛋白表达上调。在药物干预组中, 除 OIR+conbercept 组外, 其余各组 FGF2 蛋白相对表达水平下降至与正常对照组相似的水平(图 4)。正常对照组、OIR 模型对照组、OIR+RC28-E1 组、OIR+RC28-E2 组、OIR+conbercept 组和 OIR+FGF trap 组小鼠视网膜中 FGF2 蛋白相对表达水平的整体比较, 差异有统计学意义( $F = 15.01, P = 0.00$ ), 其中 OIR 模型对照组 FGF2 的蛋白水平较正常对照组显著增加, 差异有统计学意义( $P < 0.001$ );

OIR+RC28-E1 组、OIR+RC28-E2 组和 OIR+FGF trap 组 FGF2 的蛋白水平与正常对照组比较, 差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。OIR+conbercept 组视网膜中 FGF2 的相对表达水平显著高于正常对照组及其他干预组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ), 与 OIR 模型对照组相比差异无统计学意义( $P = 0.65$ )(表 3)。

### 2.5 RC28-E1 在 VEGF 和 FGF2 刺激下视网膜血管内皮细胞中的信号通路机制

VEGF+FGF2 组 p-Erk 的水平较正常对照组升高; 相对于 VEGF+FGF2 组, VEGF+FGF2+RC28-E1 组 p-Erk 的水平明显降低, 而 VEGF+FGF2+conbercept 组和 VEGF+FGF2+FGF trap 组有下降的趋势, 但效果并不显著(图 5)。正常对照组、VEGF+FGF2 组、VEGF+FGF2+RC28-E1 组、VEGF+FGF2+conbercept 组和 VEGF+FGF2+FGF trap 组小鼠视网膜血管内皮细胞 p-Erk 相对表达水平的整体比较, 差异有统计学意义( $F = 5.72, P = 0.03$ ), 其中 VEGF+FGF2 组视网膜血管内皮细胞 p-Erk 的水平较正常对照组明显升高, VEGF+FGF2+RC28-E1 组 p-Erk 的水平较 VEGF+FGF2 组明显减低, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ); VEGF+FGF2+conbercept 组和 VEGF+FGF2+FGF trap 组 p-Erk 有下降的趋势, 与 VEGF+FGF2 组相比, 差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )(表 4)。正常对照组、OIR 模型对照组、OIR+RC28-E1 组、OIR+conbercept 组和 OIR+FGF trap 组小鼠视网膜血管内皮细胞中 p-PKC $\alpha$ 、p-PKC $\beta$ 、p-PKC $\gamma$  和 p-Akt 相对表达水平的整体比较, 差异均无统计学意义( $F = 0.31, P = 0.86; F = 0.42, P = 0.79; F = 2.87, P = 0.08; F = 0.66, P = 0.63$ )(图 6, 表 4)。



**图 5 Western blot 法检测各组视网膜血管内皮细胞 MEK-Erk 通路中蛋白表达** VEGF+FGF2 组 p-Erk 的水平较正常对照组升高; VEGF+FGF2+RC28-E1 组、VEGF+FGF2+conbercept 组和 VEGF+FGF2+FGF trap 组 p-Erk 的水平均较 VEGF+FGF2 组降低, 以 VEGF+FGF2+RC28-E1 组最为明显 1: 正常对照组 2: VEGF+FGF2 组 3: VEGF+FGF2+RC28-E1 组 4: VEGF+FGF2+conbercept 组 5: VEGF+FGF2+FGF trap 组 注: p-Erk: 磷酸化细胞外调节蛋白激酶; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶 **图 6 Western blot 法检测各组视网膜血管内皮细胞中 PKC $\alpha$ 、PKC $\beta$ 、PKC $\gamma$  以及 Akt 通路中蛋白表达** 各组磷酸化及总体目标蛋白分子均无明显变化趋势 1: 正常对照组 2: VEGF+FGF2 组 3: VEGF+FGF2+RC28-E1 组 4: VEGF+FGF2+conbercept 组 5: VEGF+FGF2+FGF trap 组 注: p-PKC: 磷酸化蛋白激酶 C; p-Akt: 磷酸化蛋白激酶 B; tubulin: 微管蛋白



表 4 各组视网膜血管内皮细胞中 p-Erk、p-PKC $\alpha$ 、p-PKC $\beta$ 、p-PKC $\gamma$  和 p-Akt 相对表达水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	样本量	p-Erk	p-PKC $\alpha$	p-PKC $\beta$	p-PKC $\gamma$	p-Akt
正常对照组	5	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
VEGF+FGF2 组	5	1.20 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	3.87 $\pm$ 4.45	1.48 $\pm$ 1.51	1.10 $\pm$ 0.20	1.17 $\pm$ 0.53
VEGF+FGF2+RC28-E1 组	5	0.84 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	3.38 $\pm$ 3.96	1.83 $\pm$ 0.81	1.23 $\pm$ 0.27	1.39 $\pm$ 0.14
VEGF+FGF2+conbercept 组	5	1.05 $\pm$ 0.19	4.67 $\pm$ 5.69	1.38 $\pm$ 1.26	0.88 $\pm$ 0.18	1.19 $\pm$ 0.10
VEGF+FGF2+FGF trap 组	5	1.02 $\pm$ 0.47	3.12 $\pm$ 4.65	2.16 $\pm$ 2.25	0.79 $\pm$ 0.10	0.80 $\pm$ 1.25
F 值		5.72	0.31	0.42	2.87	0.66
P 值		0.03	0.86	0.79	0.08	0.63

注:与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 VEGF+FGF2 组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ (单因素方差分析,Tukey post hoc 检验) p-Erk:磷酸化细胞外调节蛋白激酶;p-PKC:磷酸化蛋白激酶 C;p-Akt:磷酸化蛋白激酶 B;VEGF:血管内皮生长因子;FGF:成纤维细胞生长因子

### 3 讨论

本研究证明了 RC28-E1 和 RC28-E2 能有效抑制 VEGF 和 FGF2 因子诱导的发育中小鼠视网膜血管顶细胞的分叉,进而起到抑制视网膜血管生成的作用,二者效果相当,且明显优于 conbercept 和 FGF trap。RC28-E1 对 OIR 小鼠视网膜无血管灌注区和新生血管的改善作用明显优于 conbercept 和 FGF trap,与 RC28-E2 的效果类似。在分子水平上,Western blot 检测结果提示,促血管生成因子 VEGF 和 FGF2 的水平在 OIR 小鼠视网膜中异常增高,而 RC28-E1 和 RC28-E2 可以拮抗这 2 种因子的异常表达,并将 VEGF 和 FGF2 的水平降至正常,且效果与 conbercept 和 FGF trap 相似。总之,本研究结果表明 RC28-E1 和 RC28-E2 均可有效抑制病理性视网膜新生血管生成,且效果相当,并明显优于 conbercept 和 FGF trap,提示同时拮抗 VEGF 和 FGF2 的优越性。

本研究中,体外新生小鼠视网膜组织块培养体系的构建采用了近年来发展的血管顶细胞分叉的定量分析方法,即在小鼠视网膜组织块中检测药物对视网膜血管生成的作用,既可保留视网膜组织、细胞结构的完整性及其相互作用的可能性,又保留了体外实验动物用量少、过程简便迅速的优点<sup>[22]</sup>,为比较药物的作用效果提供了良好的平台。在视网膜发育过程中,处于视网膜血管网前缘的内皮顶细胞会伸出大量可以动态伸展、收缩的丝状伪足,从而决定发育中的视网膜血管的出芽方向<sup>[23,27-28]</sup>。这些丝状伪足对环境的改变,诸如周围环境中 VEGF 和 FGF2 等促血管生成因子的浓度变化尤为敏感<sup>[23,29]</sup>。因此,视网膜组织块中的血管顶细胞在单位血管长度上的分叉数量可以作为一个非常敏感的急性指标,反映药物对血管生成的效力。因此,我们在体外研究中通过这一分析系统评估、比较不同批次的 RC28-E 对发育中视网膜血管生成的作用效果。

本研究中采用 Isolectin B4 对 OIR 模型视网膜铺片的血管进行染色,可以显示出视网膜血管,特别是尚未与已有血管联通成网络的新生血管芽和新生血管簇的诸多细节,因此利用染色后的图片可以同时计算机的辅助下进行无灌注区和新生血管的分析。本研究中定量分析新生血管时采用 SWIFT-NV 辅助分析的方法<sup>[26]</sup>,与传统的苏木精-伊红染色后计数各组突入玻璃体腔的新生血管内皮细胞核数的方法显示了相同的趋势<sup>[25]</sup>,但是更为全面、高效。

最后,基于在视网膜组织块和 OIR 小鼠模型中的研究结果,RC28-E1 和 RC28-E2 抑制生理和病理状态下血管生成的效果相似,而且在 OIR 小鼠视网膜中下调 VEGF 和 FGF2 蛋白表达的效果亦相似,所以本研究中仅选取 RC28-E1 进行作用机制研究。另据文献报道,VEGF 和 FGF2 在血管新生中的主要细胞作用靶点为血管内皮细胞<sup>[14,17]</sup>,因此,本研究中选取猴视网膜血管内皮细胞,用 VEGF 和 FGF2 因子直接刺激以模拟 OIR 视网膜中促血管生成的微环境,进而探索 RC28-E1 在视网膜血管内皮细胞中作用的分子信号机制。已有研究表明,FGF2 和 VEGF 通过与细胞表面受体特异性结合,激活受体的酪氨酸激酶活性,进而增强 Ras/Raf/MEK/Erk 信号通路的活性,促进血管内皮细胞的增生、迁移和分化<sup>[30-31]</sup>。本实验结果表明,视网膜血管内皮细胞中 MEK-Erk 通路的活性在 VEGF 和 FGF2 因子的刺激下显著上调,RC28-E1 可显著降低过强的 MEK-Erk 通路活性,其效果优于 conbercept 和 FGF trap,提示 RC28-E1 可能通过抑制 MEK-Erk 通路的过度激活而在视网膜血管内皮细胞中起到拮抗新生血管生成的作用。

综上所述,本研究证明了 RC28-E1 和 RC28-E2 对体内外视网膜新生血管具有明显的抑制作用,二者效果相当,并优于临床现有的 conbercept 和 FGF trap,提示同时干预 VEGF 和 FGF2 靶点对视网膜新生血管生



成效果的优越性。本研究为重组诱饵型受体创新药物 RC28-E1 和 RC28-E2 的后期临床试验提供了实验基础。

## 参考文献

- [1] 薄其玉,张琰,吴玉伟,等.血小板源性生长因子家族在新生血管性眼病中作用的研究进展[J].中华眼科杂志,2014,50(6):471-475. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2014.06.26.  
Bo QY, Zhang Y, Wu YW, et al. Research advances of platelet derived growth factor family and its significance in neovascular eye diseases [J]. Chin J Ophthalmol, 2014, 50(6): 471-475. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2014.06.26.
- [2] Campochiaro PA, Aiello LP, Rosenfeld PJ. Anti-vascular endothelial growth factor agents in the treatment of retinal disease: from bench to bedside [J]. Ophthalmology, 2016, 123(10S): S78-S88. DOI: 10.1016/j.ophtha.2016.04.056.
- [3] Dreyfuss JL, Giordano RJ, Regatieri CV. Ocular angiogenesis [J/OL]. J Ophthalmol, 2015, 2015: 892043 [2017-12-06]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4600930/. DOI: 10.1155/2015/892043.
- [4] de Oliveira Dias JR, de Andrade GC, Novais EA, et al. Fusion proteins for treatment of retinal diseases: aflibercept, ziv-aflibercept, and conbercept [J/OL]. Int J Retina Vitreous, 2016, 2: 3 [2017-11-06]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5088480/. DOI: 10.1186/s40942-016-0026-y.
- [5] Mizukami Y, Jo WS, Duerr EM, et al. Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells [J]. Nat Med, 2005, 11(9): 992-997. DOI: 10.1038/nm1294.
- [6] Yang S, Zhao J, Sun X. Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: a comprehensive review [J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10: 1857-1867. DOI: 10.2147/DDDT.S97653.
- [7] Bremnes RM, Camps C, Sirera R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood [J]. Lung Cancer, 2006, 51(2): 143-158. DOI: 10.1016/j.lungcan.2005.09.005.
- [8] Presta M, Dell'Era P, Mitola S, et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16(2): 159-178. DOI: 10.1016/j.cytogr.2005.01.004.
- [9] Kirwin SJ, Kanaly ST, Linke NA, et al. Strain-dependent increases in retinal inflammatory proteins and photoreceptor FGF-2 expression in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(11): 5396-5404. DOI: 10.1167/iovs.09-3474.
- [10] Gong CY, Lu B, Sheng YC, et al. The development of diabetic retinopathy in Goto-Kakizaki rat and the expression of angiogenesis-related signals [J]. Chin J Physiol, 2016, 59(2): 100-108. DOI: 10.4077/CJP.2016.BAE383.
- [11] Wohlfart P, Lin J, Dietrich N, et al. Expression patterning reveals retinal inflammation as a minor factor in experimental retinopathy of ZDF rats [J]. Acta Diabetol, 2014, 51(4): 553-558. DOI: 10.1007/s00592-013-0550-2.
- [12] Kyoosseva SV, Chen L, Seal S, et al. Nanoceria inhibit expression of genes associated with inflammation and angiogenesis in the retina of Vldlr null mice [J]. Exp Eye Res, 2013, 116: 63-74. DOI: 10.1016/j.exer.2013.08.003.
- [13] Dorrell MI, Aguilar E, Schepcke L, et al. Combination angiostatic therapy completely inhibits ocular and tumor angiogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(3): 967-972. DOI: 10.1073/pnas.0607542104.
- [14] Goto F, Goto K, Weindel K, et al. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels [J]. Lab Invest, 1993, 69(5): 508-517.
- [15] Ishibashi T. Cell biology of intraocular vascular diseases [J]. Jpn J Ophthalmol, 2000, 44(3): 323-324.
- [16] Sun XT, Ding YT, Yan XG, et al. Angiogenic synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in an *in vitro* quantitative microcarrier-based three-dimensional fibrin angiogenesis system [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(17): 2524-2528.
- [17] Yan Q, Li Y, Hendrickson A, et al. Regulation of retinal capillary cells by basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, and hypoxia [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2001, 37(1): 45-49. DOI: 10.1290/1071-2690(2001)037<0045:RORCCB>2.0.CO;2.
- [18] Li D, Xie K, Zhang L, et al. Dual blockade of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (FGF-2) exhibits potent anti-angiogenic effects [J]. Cancer Lett, 2016, 377(2): 164-173. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.04.036.
- [19] Wu Z, Zhou P, Li X, et al. Structural characterization of a recombinant fusion protein by instrumental analysis and molecular modeling [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(3): e57642 [2017-12-13]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3587646/. DOI: 10.1371/journal.pone.0057642.
- [20] Lu X, Sun X. Profile of conbercept in the treatment of neovascular age-related macular degeneration [J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 2311-2320. DOI: 10.2147/DDDT.S67536.
- [21] Li D, Wei X, Xie K, et al. A novel decoy receptor fusion protein for FGF-2 potently inhibits tumour growth [J]. Br J Cancer, 2014, 111(1): 68-77. DOI: 10.1038/bjc.2014.282.
- [22] Sawamiphak S, Ritter M, Acker-Palmer A. Preparation of retinal explant cultures to study *ex vivo* tip endothelial cell responses [J]. Nat Protoc, 2010, 5(10): 1659-1665. DOI: 10.1038/nprot.2010.130.
- [23] Sawamiphak S, Seidel S, Essmann CL, et al. Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis [J]. Nature, 2010, 465(7297): 487-491. DOI: 10.1038/nature08995.
- [24] Smith LE, Wesolowski E, Mclellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(1): 101-111.
- [25] 杨千惠,张琰,薄其玉,等.α-黑色素细胞刺激素抑制氧诱导视网膜病变小鼠视网膜新生血管的生成[J].中华实验眼科杂志,2016,34(12):1072-1076. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.12.004.  
Yang QH, Zhang Y, Bo QY, et al. α-Melanocyte-stimulating hormone inhibits retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(12): 1072-1076. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.12.004.
- [26] Stahl A, Connor KM, Sapieha P, et al. Computer-aided quantification of retinal neovascularization [J]. Angiogenesis, 2009, 12(3): 297-301. DOI: 10.1007/s10456-009-9155-3.
- [27] Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia [J]. J Cell Biol, 2003, 161(6): 1163-1177. DOI: 10.1083/jcb.200302047.
- [28] le Noble F, Klein C, Tintu A, et al. Neural guidance molecules, tip cells, and mechanical factors in vascular development [J]. Cardiovasc Res, 2008, 78(2): 232-241. DOI: 10.1093/cvr/cvn058.
- [29] Rattner A, Yu H, Williams J, et al. Endothelin-2 signaling in the neural retina promotes the endothelial tip cell state and inhibits angiogenesis [J/OL]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(40): E3830-3839 [2017-12-09]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3791783/. DOI: 10.1073/pnas.1315509110.
- [30] Boilly B, Vercoutter-Edouart AS, Hondermarck H, et al. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2000, 11(4): 295-302.
- [31] Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition [J]. Trends Pharmacol Sci, 2001, 22(4): 201-207.

(收稿日期:2018-02-26 修回日期:2018-06-24)

(本文编辑:刘艳)