

## · 实验研究 ·

# 不同批次重组诱饵型受体创新药物 RC28-E 体外药效学比较

郑嘉琳 杨千惠 孙靖 张红 姜静 黄敏 李慎军 房建民 李筱荣 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(郑嘉琳、杨千惠、孙靖、张红、李筱荣、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(房建民)

通信作者:李筱荣,Email:lixiaorong@tmu.edu.cn;张琰,Email:yanzhang04@tmu.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.12.003

**【摘要】 目的** 比较不同药理批次重组诱饵型受体创新药物 RC28-E 的体外药效学,验证工艺变更前后生物治疗药物的效果是否存在差异。**方法** 将 RF/6A 细胞分为正常对照组、血管内皮生长因子(VEGF)+成纤维细胞生长因子(FGF)组和不同质量浓度 RC28-E1 组,采用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)法筛选出 RC28-E1 最适作用浓度。将细胞分为正常对照组、VEGF+FGF 组、RC28-E1 处理组、RC28-E2 处理组、康柏西普处理组和 FGF trap 处理组,分别用无血清正常培养液、含 VEGF+FGF 无血清培养液、含 VEGF+FGF+RC28-E1 无血清培养液、含 VEGF+FGF+RC28-E2 的无血清培养液、含 VEGF+FGF+康柏西普无血清培养液以及含 VEGF+FGF+FGF trap 无血清培养液进行培养。采用 CCK-8 法检测各组细胞增生率;采用 Transwell 试验检测各组细胞迁移能力;采用 Matrigel 实验检测各组细胞管腔形成能力。**结果** 正常对照组、VEGF+FGF 组、0.025 mg/ml RC28-E1 组、0.080 mg/ml RC28-E1 组和 0.240 mg/ml RC28-E1 组细胞增生率总体比较差异有统计学意义( $F=6.601, P=0.012$ );其中 0.080 mg/ml RC28-E1 组细胞增生率明显低于 VEGF+FGF 组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),以 0.080 mg/ml 为 RC28-E 最适工作浓度。正常对照组、VEGF+FGF 组、RC28-E1 处理组、RC28-E2 处理组、康柏西普处理组、FGF trap 处理组细胞增生率总体比较,差异有统计学意义( $F=3.210, P=0.019$ );其中 RC28-E1 处理组、RC28-E2 处理组和 FGF trap 处理组的细胞增生率均明显低于 VEGF+FGF 组,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。各组移行细胞数目总体比较差异有统计学意义( $F=24.640, P=0.000$ );其中 RC28-E1 处理组、RC28-E2 处理组、康柏西普处理组及 FGF trap 处理组移行细胞数均明显低于 VEGF+FGF 组,差异均有统计学意义(均  $P=0.000$ );RC28-E2 处理组移行细胞数少于 RC28-E1 处理组,差异有统计学意义( $P=0.002$ )。各组细胞管腔形成数总体比较,差异有统计学意义( $F=9.273, P=0.000$ ),其中 RC28-E1 处理组、RC28-E2 处理组、康柏西普处理组及 FGF trap 处理组内皮细胞管腔形成数均明显低于 VEGF+FGF 组,差异均有统计学意义( $P=0.003, 0.001, 0.009, 0.018$ );RC28-E2 处理组细胞管腔形成数与正常对照组、RC28-E1 处理组和康柏西普处理组相比,差异均无统计学意义(均  $P>0.05$ );FGF trap 处理组细胞管腔形成数明显高于 RC28-E1 处理组、RC28-E2 处理组、康柏西普组及正常对照组,差异均有统计学意义( $P=0.014, 0.000, 0.008, 0.014$ )。**结论** 在体外 VEGF+FGF 刺激下,RC28-E 对视网膜血管内皮细胞的增生抑制效果优于康柏西普,对管腔形成能力的抑制作用优于 FGF trap。不同批次的重组诱饵型受体创新药物在视网膜血管内皮细胞中的效果无显著差异。

**【关键词】** 细胞增生;细胞移行;管腔成型;血管生成;重组诱饵型受体

**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 the pharmacodynamics between different batches of recombinant decoy receptor innovative drug RC28-E in retinal vascular endothelial cells** Zheng Jialin, Yang Qianhui, Sun Jing, Zhang Hong, Jiang

Jing, Huang Min, Li Shenjun, Fang Jianmin, Li Xiaorong, Zhang Yan

Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin Medical University Eye Institute, College of Optometry and Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300384, China (Zheng JL, Yang QH, Sun J, Zhang H, Li XR, 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: Li Xiaorong, Email: lixiaorong@tmu.edu.cn; Zhang Yan, Email: yanzhang04@tmu.edu.cn

**[Abstract] Objective** To compare the protective effects of pharmacological batch RC28-E1 and pilot batch RC28-E2 on retinal vascular endothelial cells (RF/6A) under the stimulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF). **Methods** RF/6A cells were divided into normal control group, VEGF + FGF group and RC28-E1 groups with different concentrations. The optimal concentration of RC28-E1 was determined by cell counting kit-8 (CCK-8) method. Cells were divided into normal control group, VEGF+FGF group, RC28-E1 group, RC28-E2 group, conbercept group and FGF trap group, and cultured with serum-free culture medium, serum-free culture medium containing VEGF+FGF, serum-free culture medium containing VEGF+FGF+RC28-E1, serum-free culture medium containing VEGF+FGF+RC28-E2, and serum-free culture medium containing VEGF+FGF+conbercept, serum-free medium containing VEGF+FGF+FGF trap, respectively. Cell proliferation rate was measured by CCK-8 method, cell migration ability was detected by Transwell test, and tube formation ability was detected by Matrigel assay. **Results** The cell proliferation rate of 0.080 mg/ml RC28-E1 group was significantly lower than that of VEGF+FGF group ( $P < 0.05$ ). The cell proliferation rate of RC28-E1 group, RC28-E2 group and FGF trap group were significantly lower than that of VEGF+FGF group ( $P < 0.05$ ). The number of migrated cells in RC28-E1 group, RC28-E2 group, conbercept group and FGF trap group were significantly lower than that in VEGF+FGF group ( $P = 0.000$ ). The numbers of meshes formed by retinal vascular endothelial cells in RC28-E1 group, RC28-E2 group, conbercept group and FGF trap group were significantly lower than that in VEGF+FGF group ( $P = 0.003, 0.001, 0.009, 0.018$ ). The number of tube formation in FGF trap group was significantly higher than those in RC28-E1 group, RC28-E2 group, conbercept group and normal control group ( $P = 0.014, 0.000, 0.008, 0.014$ ).

**Conclusions** Under the stimulation of VEGF+FGF, the inhibitory effect of RC28-E on the proliferation of retinal vascular endothelial cells is greater than that of conbercept, and its inhibitory effect on the tube formation is superior to that of FGF trap. There is no significant difference in the effects of different batches of recombinant decoy receptor innovative drugs on retinal vascular endothelial cells.

**[Key words]** Proliferation; Migration; Tube formation; Angiogenesis; Recombinant decoy receptor

**Fund program:** Cooperative Project between Tianjin Medical University Eye Hospital and Remegen Ltd.

病理性新生血管是糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞等眼病共同的病理改变;目前新生血管性视网膜疾病已成为发达国家首要的致盲眼病,中国以糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑变性为主的眼底血管性疾病亦成为近年临床研究的热点<sup>[1-4]</sup>。研究表明,缺血、缺氧诱发的病理性视网膜新生血管管壁脆弱、渗透性增强,易破裂出血,进而机化牵拉引起视网膜脱离,从而致盲<sup>[5]</sup>。病理性新生血管的形成与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)等促血管生成因子的表达上调和/或活性增加有关<sup>[6-9]</sup>。因此,研发可同时拮抗 VEGF 和 FGF2 靶标的生物制剂,从而抑制新生血管产生,可作为新生血管性眼病的有效干预手段。荣昌生物制药(烟台)有限公司研发了具有自主知识产权的、可同时高亲和力和高特异性结合 VEGF 和 FGF2 的新型重组诱饵型受体 RC28-E, 其已在肿瘤和氧诱导视网膜病变小鼠模型中显示出拮

抗新生血管的作用<sup>[8]</sup>。我们已在前期研究中完成了对药理批次药物(RC28-E1)在动物模型中的药效学检测及其作用机制的探索。为了应对后续临床试验及大规模、标准化生产,制药企业对 RC28-E 药物的制备工艺进行了相应的改进,获得中试批次药物(RC28-E2)。为了探究药理批次 RC28-E1 与中试批次 RC28-E2 药效是否存在差异,我们前期已在氧诱导视网膜病变小鼠模型和新生小鼠视网膜组织块中进行了 RC28-E1 和 RC28-E2 的药效学比较。为了完善该药物的药效学比较体系,本研究以临床上常用的药物康柏西普和 FGF trap 作为对照药,比较 RC28-E1 和 RC28-E2 对 VEGF+FGF 双因子刺激下的猴视网膜血管内皮细胞增生、移行和管腔形成的直接作用效果,为后续临床试验和大规模生产提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试药物及对照药物 供试药物:药理批次

RC28-E1 和中试批次 RC28-E2 眼用注射液[质量浓度均为 10 mg/ml,规格均为 0.2 ml/支,荣昌生物制药(烟台)有限公司提供];FGF trap 眼用注射液[质量浓度为 2 mg/ml,规格为 5 ml/支,荣昌生物制药(烟台)有限公司提供];康柏西普眼用注射液(质量浓度 10 mg/ml,规格 0.2 ml/支,成都康弘生物科技有限公司)。药物使用前均用无菌生理盐水(中国大冢制药有限公司)稀释为 0.08 mg/ml。

**1.1.2 细胞系、主要试剂及仪器** 猴视网膜血管内皮细胞系(RF/6A)(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青霉素、链霉素、谷氨酰胺(美国 Gibco 公司);RPMI-1640 培养液(美国 HyClone 公司);细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8)(日本 Dojindo 公司);基质胶(Matrigel)(美国 BD 公司);VEGF(美国 R&D 公司);FGF2(美国 Peprotech 公司);中性树胶、结晶紫染料(北京索莱宝科技有限公司)。侵袭小室(Transwell)细胞培养板(美国 Corning 公司);酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 RF/6A 细胞的培养** 用含体积分数 10% FBS、体积分数 1% 青链霉素及质量分数 1% 谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养液,在 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱内培养 RF/6A 细胞。待细胞生长融合度达 80% ~ 90% 时,使用质量分数 0.25 % 的胰蛋白酶按照 1:3 或 1:2 比例消化传代,选用第 3 ~ 5 代细胞进行实验。

**1.2.2 VEGF 和 FGF2 药液配制** 按说明书将 VEGF 和 FGF2 配置成贮存液后,储存在 -80 °C。根据文献[10]所述,本研究中选择 VEGF 刺激 RF/6A 的工作质量浓度为 80 ng/ml,同时根据 VEGF 和 FGF2 的相对分子质量,计算出等摩尔 FGF2 的工作质量浓度为 70 ng/ml,使用无血清 RPMI-1640 培养液稀释 VEGF 及 FGF 至工作浓度。

**1.2.3 CCK-8 法筛选 RC28-E1 工作质量浓度** 将 RF/6A 细胞以  $8 \times 10^3$ /孔的密度接种于 96 孔板,分为正常对照组、VEGF+FGF 组及不同质量浓度 RC28-E1 (0.025、0.080 和 0.240 mg/ml) 处理组。用含 VEGF 和 FGF2 的无血清培养液分别配制含 0、0.025、0.080 和 0.240 mg/ml RC28-E1 的培养液,根据分组加入相应的培养液,正常对照组细胞用无血清 RPMI-1640 培养液培养。细胞培养 48 h,更换为含体积分数 10% CCK-8 的 RPMI-1640 培养液,37 °C 孵育 2 h,用酶标仪测量 450 nm 处吸光度(A)值。每组 6 个复孔,重复测

量 3 次,计算各组细胞增生率:细胞增生率 = 各组 A 值/正常对照组 A 值  $\times 100\%$ 。选取与 VEGF+FGF 组细胞增生有明显差异的 RC28-E1 处理质量浓度作为最适工作质量浓度。

### 1.2.4 CCK-8 法检测不同处理组细胞增生率

RF/6A 细胞以  $8 \times 10^3$ /孔的密度接种入 96 孔板,并分为正常对照组、VEGF+FGF 组、RC28-E1 处理组、RC28-E2 处理组、康柏西普处理组和 FGF trap 处理组。细胞贴壁后分别用无血清 RPMI-1640 培养液、含 VEGF+FGF 的 RPMI-1640 培养液、含 VEGF+FGF+RC28-E1 的 RPMI-1640 培养液、含 VEGF+FGF+RC28-E2 的 RPMI-1640 培养液、含 VEGF+FGF+康柏西普的 RPMI-1640 培养液,以及含 VEGF+FGF+FGF trap 的 RPMI-1640 培养液培养 48 h;更换为含 10% CCK-8 的 RPMI-1640 培养液,37 °C 孵育 2 h,用酶标仪测量 450 nm 处吸光度(A)值。每组设 6 个复孔,重复测量 3 次,计算各组细胞增生率:细胞增生率 = 各组 A 值/正常对照组 A 值  $\times 100\%$ 。

### 1.2.5 Transwell 试验检测各组细胞迁移情况

将 RF/6A 细胞以  $1 \times 10^6$ /孔的密度接种在 6 孔板内,待细胞贴壁之后,用含 0.5% FBS 的 RPMI-1640 培养液培养 16 h。随后将 RF/6A 细胞以  $1 \times 10^5$ /孔的密度接种到 Transwell 上层小室中,按照 1.2.4 方法将细胞分为 6 个组,每个小室接种 200  $\mu$ l 细胞悬液。按照分组,分别配置 0.5% FBS+RPMI-1640 培养液、含有 VEGF+FGF 的 0.5% FBS+RPMI-1640 培养液、含 VEGF+FGF+RC28-E1 的 0.5% FBS+RPMI-1640 培养液、含 VEGF+FGF+RC28-E2 的 0.5% FBS+RPMI-1640 培养液、含有 VEGF+FGF+康柏西普的 0.5% FBS+RPMI-1640 培养液和含有 VEGF+FGF+FGF trap 的 0.5% FBS+RPMI-1640 培养液,并在下层小室中加入 600  $\mu$ l 相应培养液。每组设 3 个复孔,培养后 24 h,结晶紫染色,湿棉签去除小室内层底面细胞后,100 倍光学显微镜下观察,将小室外层底面分为 4 个象限,每个象限选取 3 个有代表性的区域拍照,计数染色细胞。

**1.2.6 细胞管腔形成实验** 将 RF/6A 细胞以  $1 \times 10^6$ /孔的密度接种在 6 孔板内,待细胞贴壁之后,用含 0.5% FBS+RPMI-1640 培养基培养细胞 16 h。将融化的 Matrigel 胶铺平于 24 孔板,每孔 300  $\mu$ l,37 °C 孵育 0.5 h 使 Matrigel 凝固。按照 1.2.4 方法将细胞分为 6 个组,并配置相应培养液,将各组细胞用相应培养基重悬,并以  $5 \times 10^4$ /孔的密度接种于铺好 Matrigel 胶的 24 孔板中,每孔接种 500  $\mu$ l。每组设 3 个复孔,培养 8 h 后,100 倍光学显微镜下观察细胞管腔形成状况,将含

Matrigel 胶的每孔细胞分为 4 个象限, 每个象限选取 3 个有代表性的区域拍照, 计数照片中的细胞成管数目。

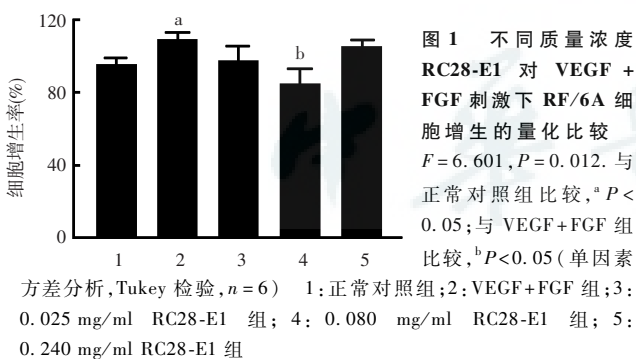
### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件(美国 SPSS 公司)进行统计分析。各组检测结果的计量资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示; 各组间数据资料均数经 Levene 检验证实方差齐。各组间细胞增生率、移行细胞数、管腔形成数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RC28-E1 工作浓度筛选

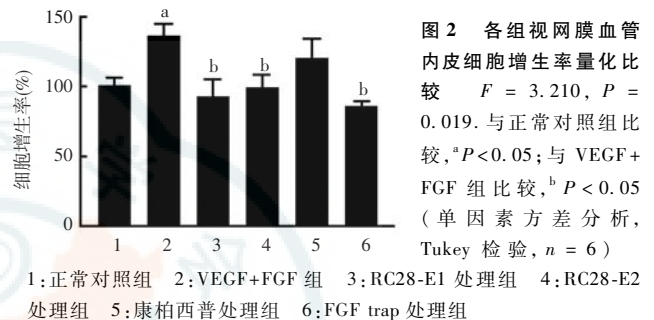
正常对照组、VEGF+FGF 组、0.025 mg/ml RC28-E1 组、0.080 mg/ml RC28-E1 组和 0.240 mg/ml RC28-E1 组细胞增生率分别为  $(100.00 \pm 1.59)\%$ 、 $(108.83 \pm 9.70)\%$ 、 $(96.87 \pm 20.24)\%$ 、 $(84.27 \pm 14.97)\%$  和  $(104.60 \pm 10.13)\%$ , 各组细胞增生率总体比较差异有统计学意义 ( $F = 6.601, P = 0.012$ ), 其中 VEGF+FGF 组细胞增生率明显高于正常对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 0.080 mg/ml RC28-E1 组细胞增生率明显低于 VEGF+FGF 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 0.025 mg/ml RC28-E1 组和 0.240 mg/ml RC28-E1 组细胞增生率与 VEGF+FGF 组相比, 差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ) (图 1)。因此, 后续实验中选用 0.080 mg/ml 作为 RC28-E1 的工作质量浓度。



### 2.2 各组视网膜血管内皮细胞增生率比较

正常对照组、VEGF+FGF 组、RC28-E1 处理组、RC28-E2 处理组、康柏西普处理组和 FGF trap 处理组细胞增生率分别为  $(100.00 \pm 15.76)\%$ 、 $(135.25 \pm 20.54)\%$ 、 $(91.89 \pm 32.19)\%$ 、 $(98.96 \pm 21.15)\%$ 、 $(119.43 \pm 36.46)\%$  和  $(84.99 \pm 10.37)\%$ , 各组细胞增生率总体比较, 差异有统计学意义 ( $F = 3.210, P =$

$0.019$ ), 其中 VEGF+FGF 组细胞增生率明显高于正常对照组, 差异有统计学意义 ( $P = 0.009$ ); RC28-E1 处理组、RC28-E2 处理组和 FGF trap 处理组的细胞增生率均明显低于 VEGF+FGF 组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 康柏西普处理组与 VEGF+FGF 组的细胞增生率比较, 差异无统计学意义 ( $P = 0.413$ ); RC28-E1 处理组和 RC28-E2 处理组细胞增生率与正常对照组比较, 差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ) (图 2)。



### 2.3 各组细胞迁移能力比较

正常对照组、VEGF+FGF 组、RC28-E1 处理组、RC28-E2 处理组、康柏西普处理组和 FGF trap 处理组移行细胞数目分别为  $(243.42 \pm 37.89)$ 、 $(363.56 \pm 57.49)$ 、 $(271.30 \pm 20.23)$ 、 $(229.17 \pm 29.74)$ 、 $(239.00 \pm 43.36)$  和  $(233.08 \pm 36.71)$ /视野, 各组移行细胞数总体比较, 差异有统计学意义 ( $F = 24.640, P = 0.000$ ), 其中 VEGF+FGF 组细胞移行数目较正常对照组明显增多, 差异有统计学意义 ( $P = 0.000$ ); RC28-E1 处理组、RC28-E2 处理组、康柏西普处理组及 FGF trap 处理组移行细胞数均明显少于 VEGF+FGF 组, 差异均有统计学意义 (均  $P = 0.000$ ); RC28-E2 处理组移行细胞数与康柏西普处理组及 FGF trap 处理组相比, 差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ); RC28-E2 处理组移行细胞数少于 RC28-E1 处理组, 差异有统计学意义 ( $P = 0.002$ ) (图 3)。

### 2.4 各组细胞管腔形成能力比较

正常对照组、VEGF+FGF 组、RC28-E1 处理组、RC28-E2 处理组、康柏西普处理组和 FGF trap 处理组管腔形成数分别为  $(20.38 \pm 9.32)$ 、 $(50.19 \pm 29.37)$ 、 $(22.09 \pm 5.84)$ 、 $(19.25 \pm 4.94)$ 、 $(21.00 \pm 4.78)$  和  $(29.00 \pm 6.52)$ /视野, 各组管腔形成数总体比较, 差异有统计学意义 ( $F = 9.273, P = 0.000$ ); 其中 VEGF+FGF 组管腔形成数较正常对照组明显增多, 差异有统计学意义 ( $P = 0.000$ ); RC28-E1 处理组、RC28-E2 处理组、康柏西普处理组及 FGF trap 处理组内皮细胞管

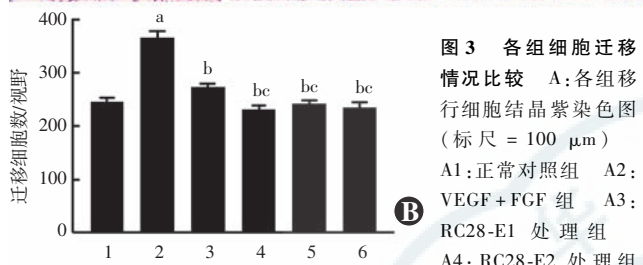
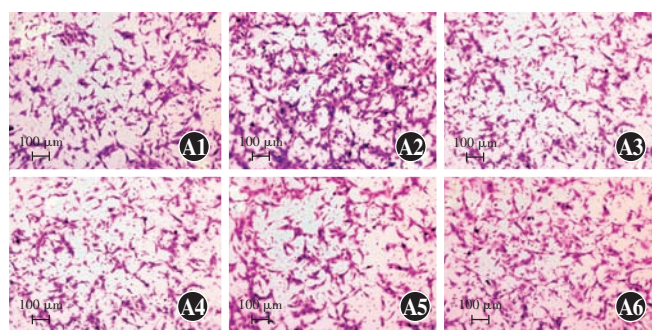


图 3 各组细胞迁移情况比较 A: 各组移行细胞结晶紫染色图 (标尺 = 100 μm) A1: 正常对照组 A2: VEGF+FGF 组 A3: RC28-E1 处理组 A4: RC28-E2 处理组 A5: 康柏西普处理组 A6: FGF trap 处理组 B: 各组移行细胞数的定量分析  $F=24.640, P=0.000$ 。与正常对照组比较,  $^a P<0.05$ ; 与 VEGF+FGF 组比较,  $^b P<0.05$ ; 与 RC28-E1 处理组比较,  $^c P<0.05$  (单因素方差分析, Tukey 检验,  $n=3$ ) 1: 正常对照组 2: VEGF+FGF 组 3: RC28-E1 处理组 4: RC28-E2 处理组 5: 康柏西普处理组 6: FGF trap 处理组

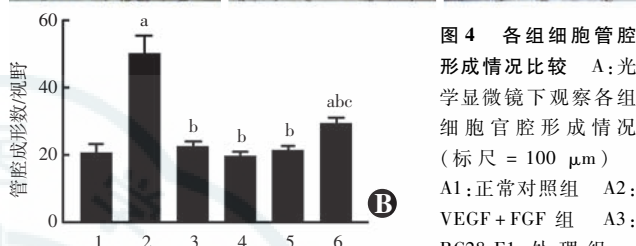
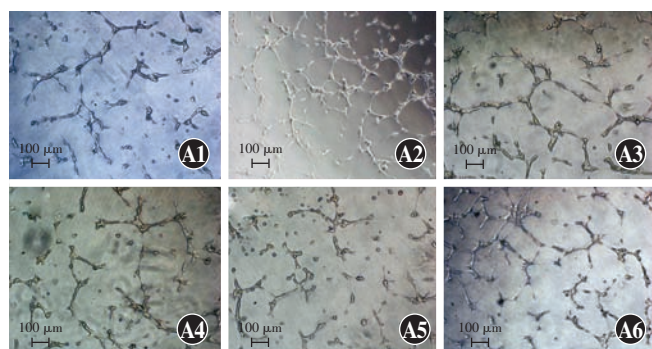


图 4 各组细胞管腔形成情况比较 A: 光学显微镜下观察各组细胞管腔形成情况 (标尺 = 100 μm) A1: 正常对照组 A2: VEGF+FGF 组 A3: RC28-E1 处理组 A4: RC28-E2 处理组 A5: 康柏西普处理组 A6: FGF trap 处理组 B: 各组管腔形成数定量分析  $F=9.273, P=0.000$ 。与正常对照组比较,  $^a P<0.05$ ; 与 VEGF+FGF 组比较,  $^b P<0.05$ ; 与 RC28-E1 处理组比较,  $^c P<0.05$  (单因素方差分析, Tukey 检验,  $n=3$ ) 1: 正常对照组 2: VEGF+FGF 组 3: RC28-E1 处理组 4: RC28-E2 处理组 5: 康柏西普处理组 6: FGF trap 处理组

腔形成数均明显少于 VEGF+FGF 组, 差异均有统计学意义 ( $P=0.003, 0.001, 0.009, 0.018$ )。RC28-E2 处理组细胞管腔形成数与正常对照组、RC28-E1 处理组、康柏西普处理组相比, 差异均无统计学意义 (均  $P>0.05$ ); FGF trap 处理组细胞管腔形成数明显多于 RC28-E1 处理组、RC28-E2 处理组、康柏西普处理组及正常对照组, 差异均有统计学意义 ( $P=0.014, 0.000, 0.008, 0.014$ ) (图 4)。

### 3 讨论

研究表明, VEGF 与 FGF2 共同参与诱导新生血管产生<sup>[11]</sup>。临床研究发现, 视网膜新生血管患者眼内 VEGF 表达水平显著高于正常人, 而 VEGF 可通过增强血管通透性、促进血管内皮细胞增生及迁移等方式促进新生血管的发生和发展<sup>[12-16]</sup>。FGF2 在正常生理和肿瘤新生血管生成中的作用已得到广泛证实。在早产儿视网膜病变及增生期糖尿病视网膜病变患者中均发现 FGF2 的表达上调<sup>[7, 17]</sup>; 此外, 在 1 型和 2 型糖尿病以及氧诱导视网膜病变大鼠模型中, FGF2 的表达也均显著上调<sup>[18-20]</sup>。这些结果均提示 FGF2 在视网膜新生血管形成阶段具有重要作用。在细胞水平, FGF2 是血管内皮细胞强有力的有丝分裂原<sup>[7, 21]</sup>, 其与 VEGF 联合应用可增强视网膜血管内皮细胞的移行、管腔形成的能力以及内皮细胞通透性<sup>[22-23]</sup>。在信号通路水

平上, VEGF 通过结合 VEGF 受体 2 (VEGF receptor 2, VEGFR2) 并激活其下游通路, 介导 VEGF 的生物活性; 而 FGF2 也可激活 VEGF/VEGFR2 通路系统, 从而对 VEGF 的生物活性起到增强/协同作用<sup>[8]</sup>。

本实验选用 VEGF 与 FGF2 双因子刺激视网膜血管内皮细胞, 在体外模拟病理性视网膜新生血管生成的微环境, 结果显示在 VEGF+FGF2 刺激下, 细胞的增生、移行以及管腔形成能力均显著提高, 同时证实 RC28-E1 和 RC28-E2 均可直接作用于视网膜血管内皮细胞, 并显著抑制 VEGF+FGF2 因子刺激下的上述 3 项细胞行为学指标。更重要的是, 在双因子的刺激下, 不同批次 RC28-E 对视网膜血管内皮细胞增生、移行、管腔形成能力的抑制效果相似, 其中 RC28-E2 在抑制细胞移行方面略优于 RC28-E1。本实验结果提示康柏西普对内皮细胞增生的抑制作用略低于其他药物, FGF trap 对血管内皮细胞管腔形成能力的抑制效果稍逊于其他药物, 可能与这 2 种对照药物在细胞内代谢动力学及作用机制不同有关; FGF2 直接诱导血管内皮细胞有丝分裂, 所以阻断 FGF2 对细胞增生的作用要强于单纯阻断 VEGF 所介导的效果; 而 VEGF 的作用主要是在已有血管支架的基础上促进内皮细胞的移行和管腔形成, 即新生血管芽的形成, 因此阻断 VEGF 的管腔形成效果强于单纯阻断 FGF2 的效果。

综上所述, 在 VEGF 和 FGF2 双因子刺激下, 药理

批次 RC28-E1 与中试 RC28-E2 均对视网膜血管内皮细胞的增生、迁移以及管腔形成起到显著抑制作用,提示不同批次的重组诱饵型受体创新药物在视网膜血管内皮细胞中的效果无显著差异,对比康柏西普和 FGF trap,其总体效果更优,为新型药物 RC28-E 的后续大规模生产和临床试验提供了实验基础。

## 参考文献

- [1] 周琦,张俊. miRNA 在新生血管性眼病中作用的研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(4): 380-384. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 04. 023.
- Zhou Q, Zhang J. Current research of microRNAs in ocular neovascularization [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2012, 30(4): 380-384. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 04. 023.
- [2] Campochiaro PA. Ocular neovascularization [J]. J Mol Med (Berl), 2013, 91(3): 311-321. DOI: 10. 1007/s00109-013-0993-5.
- [3] 周骏,刘涛. 胎盘生长因子在新生血管性眼病中的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2016, 16(11): 2053-2058. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2016. 11. 17.
- Zhou J, Liu T. Progress in placental growth factor in ocular neovascular disease [J]. Int Eye Sci, 2016, 16(11): 2053-2058. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2016. 11. 17.
- [4] 许迅. 我国眼底病研究发展现状、进展和努力方向[J]. 中华眼科杂志, 2014, 50(11): 801-803. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0412-4081. 2014. 11. 001.
- Xu X. Ocular fundus disease in China: the current situation, progression, and issues to be resolved [J]. Chin J Ophthalmol, 2014, 50(11): 801-803.
- [5] Kim KL, Suh W. Apatinib, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor 2, suppresses pathologic ocular neovascularization in mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(9): 3592-3599. DOI: 10. 1167/iovs. 17-21416.
- [6] Whitmire W, Al-Gayyar MM, Abdelsaid M, et al. Alteration of growth factors and neuronal death in diabetic retinopathy: what we have learned so far [J]. Mol Vis, 2011, 17: 300-308.
- [7] Yafai Y, Iandiev I, Lange J, et al. Basic fibroblast growth factor contributes to a shift in the angioregulatory activity of retinal glial (Müller) cells [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(7): e68773 [2018-02-17]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23861940>. DOI: 10. 1371/journal.pone.0068773.
- [8] 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.
- [9] Zhang Y, Cai S, Jia Y, et al. Decoding noncoding RNAs: role of microRNAs and long noncoding RNAs in ocular neovascularization [J]. Theranostics, 2017, 7(12): 3155-3167. DOI: 10. 7150/thno. 19646.
- [10] Zhang X, Yu W, Dong F. Cysteine-rich 61 (CYR61) is up-regulated in proliferative diabetic retinopathy [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2012, 250(5): 661-668. DOI: 10. 1007/s00417-011-1882-7.
- [11] 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.
- [12] Penn JS, Madan A, Caldwell RB, et al. Vascular endothelial growth factor in eye disease [J]. Prog Retin Eye Res, 2008, 27(4): 331-371. DOI: 10. 1016/j. preteyeres. 2008. 05. 001.
- [13] 陈庆中,张静楷,黄利明,等. 血管内皮生长抑制因子在糖尿病视网膜病变患者血清及玻璃体中的变化[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(12): 1163-1168. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 12. 015.
- Chen QZ, Zhang JC, Huang LM, et al. Change of vascular endothelial growth inhibitor in serum and vitreous of diabetic retinopathy patients [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31(12): 1163-1168. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 12. 015.
- [14] Noma H, Funatsu H, Mimura T, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 and inflammatory factors in macular edema with branch retinal vein occlusion [J]. Am J Ophthalmol, 2011, 152(4): 669-677. DOI: 10. 1016/j. ajo. 2011. 04. 006.
- [15] Sternberg PJ, Durrani AK. Evolving concepts in the management of retinopathy of prematurity [J]. Am J Ophthalmol, 2018, 186: xxiii-xxxii. DOI: 10. 1016/j. ajo. 2017. 10. 027.
- [16] Mesquita J, Castro-de-Sousa JP, Vaz-Pereira S, et al. Vascular endothelial growth factors and placenta growth factor in retinal vasculopathies: current research and future perspectives [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2018, 39: 102-115. DOI: 10. 1016/j. cytogfr. 2017. 11. 005.
- [17] Fang L, Barber AJ, Shenberger JS. Regulation of fibroblast growth factor 2 expression in oxygen-induced retinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 56(1): 207-215. DOI: 10. 1167/iovs. 14-15616.
- [18] Dorfman AL, Polosa A, Joly S, et al. Functional and structural changes resulting from strain differences in the rat model of oxygen-induced retinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(5): 2436-2450. DOI: 10. 1167/iovs. 08-2297.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Wang ZL, Cheng SM, Ma MM, et al. Intranasally delivered bFGF enhances neurogenesis in adult rats following cerebral ischemia [J]. Neurosci Lett, 2008, 446(1): 30-35. DOI: 10. 1016/j. neulet. 2008. 09. 030.
- [22] Deissler HL, Deissler H, Lang GK, et al. Ranibizumab efficiently blocks migration but not proliferation induced by growth factor combinations including VEGF in retinal endothelial cells [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2013, 251(10): 2345-2353. DOI: 10. 1007/s00417-013-2393-5.
- [23] Deissler HL, Deissler H, Lang GK, et al. VEGF but not PlGF disturbs the barrier of retinal endothelial cells [J]. Exp Eye Res, 2013, 115: 162-171. DOI: 10. 1016/j. exer. 2013. 07. 018.

(收稿日期:2018-05-14 修回日期:2018-10-20)

(本文编辑:张宇)

## 更正

《中华实验眼科杂志》2018 年第 36 卷第 10 期 808~811 页刘洋、罗学廷所著《烟酰胺腺嘌呤二核苷酸失衡介导视网膜变性的研究进展》的 DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 010. 016 应为 DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 10. 016, 特此更正。

《中华实验眼科杂志》2018 年第 36 卷第 11 期 887~891 页王付燕、周庆军、谢立信所著《体外培养组织工程细胞膜片重建眼表研究进展》一文中 890 页第 1 栏 16 行“COMET 术后色素上皮脱离发生率高”, 应为“COMET 术后持续角膜上皮缺损发生率高”, 特此更正。

(本刊编辑部)