

外泌体负载的 KV11 通过 VDAC1 和自噬机制对角膜新生血管的抑制作用

陈文倩 杜玮 于文贞

北京大学人民医院眼科 北京大学人民医院眼视光中心 北京大学人民医院眼病与视光医学研究所 视网膜脉络膜疾病诊治研究北京市重点实验室 北京大学医学部眼视光学院, 北京 100044

通信作者: 于文贞, Email: wenzhen_yu@sina.com

【摘要】 目的 探讨外泌体(EXO)负载的抗新生血管短肽 KV11 在角膜新生血管(CNV)中的作用及其机制。方法 利用 EXO 锚定肽 CP05 将 KV11 结合到血管内皮来源的 EXO 膜表面,形成 EXO-KV11。通过 Apogee 纳米流式分析 EXO 负载 KV11 的效率和最佳浓度比。选取 8 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 100 只,其中 10 只大鼠不做任何处理,为正常对照组;其余大鼠在建立碱烧伤诱导 CNV 大鼠模型后,采用随机数字表法随机将大鼠分为 EXO-KV11 组、KV11 组和生理盐水组,每组各 30 只。从碱烧伤后第 1 天开始每隔 1 天,各组分别结膜下注射 100 μ l EXO-KV11 (25 μ g)、KV11 (25 μ g)或生理盐水。观察第 1、4、7、14 天时 CNV 的生成情况;采用荧光素心室灌注、角膜血管造影法计算 CNV 面积;采用苏木精-伊红染色法观察各组 CNV 管腔数量;采用免疫组织化学法检测角膜组织中 CD31 的表达分布;采用 Western blot 法检测电压依赖性阴离子通道 1 (VDAC1)和内质网应激、自噬及凋亡相关蛋白的表达水平。结果 Apogee 流式分析确定 KV11 与 EXO 最佳浓度比为 4:1,EXO 负载 KV11 效率高达 87.5%。碱烧伤后 7 d 和 14 d,各组 CNV 面积总体比较差异均有统计学意义($F=4.613, 15.590$,均 $P<0.05$),其中碱烧伤后 7 d,EXO-KV11 组 CNV 面积小于 KV11 组和生理盐水组;碱烧伤后 14 d,EXO-KV11 组和 KV11 组 CNV 面积均小于生理盐水组,EXO-KV11 组 CNV 面积小于 KV11 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。角膜荧光铺片定量分析结果显示,生理盐水组、KV11 组和 EXO-KV11 组 CNV 相对荧光面积分别为 $(8.3\pm 1.7)\%$ 、 $(5.2\pm 1.6)\%$ 和 $(3.4\pm 0.7)\%$,总体比较差异有统计学意义($F=11.735, P<0.01$),其中 KV11 组和生理盐水组 CNV 相对荧光面积均大于 EXO-KV11 组,生理盐水组 CNV 相对荧光面积大于 KV11 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。碱烧伤后 14 d,生理盐水组基质内可见大量新生血管管腔;KV11 组基质内新生血管管腔数量较生理盐水组少;EXO-KV11 组角膜结构趋于正常,少见新生血管管腔。生理盐水组角膜基质内可见大量 CD31 染色阳性细胞,细胞围成大小不一的管腔结构;KV11 组角膜基质内 CD31 染色阳性细胞围成的管腔数量较生理盐水组少,EXO-KV11 组管腔数量较 KV11 组少。EXO-KV11 组、KV11 组、生理盐水组和正常对照组 VDAC1、蛋白质激酶 R 样内质网激酶(PERK)、自噬接头蛋白(SQSTM1/p62)、活化半胱氨酸蛋白酶 3(cleaved caspase 3)相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F=35.960, 8.947, 17.791, 101.168$,均 $P<0.01$),其中 EXO-KV11 组 VDAC1、PERK、p62、cleaved caspase 3 相对表达量高于 KV11 组和生理盐水组,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)。各组自噬微管相关蛋白轻链 3B(LC3B) II/LC3B I 蛋白相对表达量总体比较,差异无统计学意义($F=0.445, P=0.727$)。结论 与 KV11 相比,EXO-KV11 可通过增加 VDAC1 表达、刺激 PERK 产生、抑制自噬流的发生等机制更有效地抑制 CNV。

【关键词】 角膜新生血管;自噬;外泌体;纤溶酶原 kringle 5;电压依赖性阴离子通道 1

基金项目:北京市自然科学基金(京津冀基础研究合作专项)(J190005)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220402-00132

Inhibitory effect of exosome-loaded KV11 on corneal neovascularization via VDAC1 and autophagy

Chen Wenqian, Du Wei, Yu Wenzhen

Department of Ophthalmology, Peking University People's Hospital, Eye Diseases and Optometry Institute, Beijing Key Laboratory of Diagnosis and Therapy of Retinal and Choroid Diseases, College of Optometry, Peking University Health Science Center, Beijing 100044, China

Corresponding author: Yu Wenzhen, Email: wenzhen_yu@sina.com

[Abstract] Objective To investigate the effects and mechanism of exosome (EXO)-loaded kringle V11 (KV11) delivery on corneal neovascularization (CNV). **Methods** KV11 was bound to the surface of endothelial cell-derived exosomes by using CP05, an EXO-targeting anchoring peptide, to produce EXO-KV11. The binding efficiency and optimal concentration ratio were determined using the Apogee flow system. A total of 100 8-week-old healthy male SPF grade SD rats were selected, 10 of which were randomly selected as a normal control group without any treatment. The CNV model was established by alkali burn in the other 90 rats, which were randomly divided into three groups, EXO-KV11 group, KV11 group, and normal saline group by the random number table method, with 30 rats in each group. Each group was injected subconjunctivally with 100 μ l of EXO-KV11 (25 μ g), KV11 (25 μ g), or normal saline every other day from the first day after the alkali burn, respectively. The CNV of rats was observed on days 1, 4, 7, and 14 after alkali burn. The CNV area was calculated by ventricular perfusion with fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) and corneal angiography. The amount of CNV lumen was observed by hematoxylin and eosin staining. The distribution of CD31 in rat corneas was determined by immunohistochemical method. The expression levels of voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1), endoplasmic reticulum stress, autophagy and apoptosis-associated proteins were detected by Western blot. This study was approved by the Animal Ethics Committee of Peking University People's Hospital (No. 20210019). All animal procedures complied with the regulations of the Vision and Ophthalmology Association and the Animal Protection and Use Committee of Peking University. **Results** The optimal concentration ratio of KV11 to EXO was 4:1 and the binding affinity reached up to 87.5% by Apogee flow cytometers. On days 7 and 14 after alkali burn, there were significant differences in CNV area among the four groups ($F = 4.613, 15.590$; both at $P < 0.05$). On day 7 after alkali burn, the CNV area was smaller in EXO-KV11 group than in KV11 and normal saline groups, with statistically significant differences (both at $P < 0.05$). On day 14 after alkali burn, the CNV area was smaller in EXO-KV11 and KV11 groups than in normal saline group, and smaller in EXO-KV11 group than in KV11 group, showing statistically significant differences (all at $P < 0.05$). The results of quantitative analysis of corneal fluorescence mounts showed that the relative CNV fluorescence area of the normal saline group, KV11 group and EXO-KV11 group were $(8.3 \pm 1.7)\%$, $(5.2 \pm 1.6)\%$ and $(3.4 \pm 0.7)\%$, respectively, showing a statistically significant overall comparison difference ($F = 11.735$, $P < 0.01$). The relative CNV fluorescence area was larger in KV11 and normal saline groups than in EXO-KV11 group, and larger in normal saline group than in KV11 group, showing statistically significant differences (all at $P < 0.05$). On day 14 after alkali burn, massive neovascular lumens were observed in the matrix of the normal saline group. The number of neovascular lumens in KV11 group was smaller than that in normal saline group. The corneal structure appeared normal in EXO-KV11 group, and neovascular lumens were rare. Numerous CD31-positive cells were observed in the corneal stroma of the normal saline group, which formed into lumen structures. The number of lumens surrounded by CD31-positive cells in the corneal stroma was smaller in KV11 group than in normal saline group, and smaller in EXO-KV11 group than in KV11 group. There were significant differences in the relative expression levels of VDAC1, protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), p62, cleaved caspase 3 among the four groups ($F = 35.960, 8.947, 17.791, 101.168$; all at $P < 0.01$). The relative expression levels of VDAC1, PERK, p62, cleaved caspase 3 were higher in EXO-KV11 group than in KV11 and normal saline groups, showing statistically significant differences (all at $P < 0.001$). There was no significant difference in the relative expression of microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B (LC3B) II/LC3B I protein among all four groups ($F = 0.445$, $P = 0.727$).

Conclusions EXO-KV11 can inhibit CNV more remarkably than KV11. EXO-KV11 inhibits CNV by promoting the expression of VDAC1 and PERK and suppressing the autophagic flux.

[Key words] Corneal neovascularization; Autophagy; Exosomes; Plasminogen kringle 5; Voltage-dependent anion channel 1

Fund program: Natural Science Foundation of Beijing (Beijing-Tianjin-Hebei Special Program) (J190005)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220402-00132

角膜是重要的屈光介质之一,无血管是其维持光学透明的主要原因之一^[1-2]。但在缺氧、炎症、创伤等

情况下,角膜缘血管网的新生血管容易生长到角膜内,对角膜的透光性造成损害,从而导致视力下降,称为角



膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV)^[3-4]。现有的 CNV 治疗方法存在一定缺陷和局限性,如糖皮质激素诱导的青光眼、抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 药物对于成熟 CNV 效果较差、光动力疗法对周围角膜和角膜缘干细胞造成损害等^[2,5]。CNV 治疗方法的部分有效性和相关不良反应提示我们,需要探索新的 CNV 治疗方法。Krigle 结构域广泛存在于纤溶酶原和载脂蛋白中,在抑制血管生成中发挥关键作用,尤其是 Krigle V (KV)^[6-10]。KV 可抑制胃癌、肝细胞癌和 CNV 等的形成^[11-13],KV 来源的十一肽 KV11 (YTMNPRKLFYD) 对视网膜新生血管具有明显抑制作用^[14-15]。然而,短肽存在不稳定、生物膜渗透性较差等缺点^[16-18]。因此,需要一种药物载体协助 KV11 在体内稳定发挥抑制血管生成的作用。外泌体 (exosome, EXO) 是各种细胞分泌的直径为 30~150 nm 的胞外囊泡^[19-20],可以作为药物的微载体直接将药物递送入细胞,增强药物稳定性,延长药物半衰期^[21-22]。Gao 等^[23] 研究发现了一种名为 CP05 的锚定肽,可以靶向 EXO 膜标记蛋白 CD63,从而负载药物。Dong 等^[24] 利用 CP05 将 KV11 负载到 EXO 上,发现该系统可以通过侵袭性较低的方式较好地治疗视网膜新生血管。然而,EXO-KV11 对 CNV 的作用及其机制尚不清楚。本研究拟探讨 EXO 负载抗新生血管短肽 KV11 在 CNV 中的作用和相关机制,以期期为 EXO-KV11 可能的临床应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及动物来源 原代人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 购自浙江美森科技有限公司。8 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 100 只,体质量 180~220 g,购自北京华阜康实验动物技术有限公司 [许可证号: SCXK (京) 2019-0008]。其中 10 只大鼠不做任何处理,为正常对照组;其余大鼠均经角膜碱烧伤构建 CNV 模型。本研究经北京大学人民医院动物伦理委员会批准 (批文号: 20210019),所有动物操作均符合视觉与眼科学协会及北京大学动物保护与使用委员会的规定。

1.1.2 主要试剂及仪器 短肽 KV11 (YTMNPRKLFYD)、KV11 (CP05) (YTMNPRKLFYDCRHSQMTVSRL)、FITC 标记的 KV11 (CP05) (苏州强耀生物科技有限公司);ECM 培养基 (美国 Sciencell 公司);总 EXO 提取试剂 (细胞培养基)、Bis-Tris 预制胶、MOPS SDS 电泳缓冲液、MES SDS 电泳缓冲液、RIPA 溶液 (美国 Thermo 公

司);0.22 μm 、0.45 μm NC 膜 (德国 Merck Millipore 公司);蛋白酶抑制剂混合物 (苏州新赛美生物科技有限公司);电转缓冲液、BCA 蛋白定量试剂盒 (北京兰博利德生物技术有限公司);TBS 封闭液 (美国 LI-COR 公司);兔抗四跨膜蛋白 30 (tetraspanin 30, CD63) 多克隆抗体 (25682)、兔抗电压依赖性阴离子通道 1 (voltage-dependent anion channel 1, VDAC1) 多克隆抗体 (55259)、兔抗半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase 3) 多克隆抗体 (19677)、鼠抗 β -actin 单克隆抗体 (66009) (武汉 Proteintech 公司);兔抗蛋白质激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 单克隆抗体 (C33E10)、兔抗自噬接头蛋白 1 (sequestosome-1, SQSTM1/p62) 单克隆抗体 (D10E10) (美国 Cell Signaling Technology 公司);兔抗血小板内皮细胞黏附分子 1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31) 多克隆抗体 (ab281583)、兔抗自噬微管相关蛋白轻链 3B (microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B, LC3B) 单克隆抗体 (ab192890) (美国 Abcam 公司);CruzFluor™ 790 标记小鼠抗兔 IgG (sc-516253)、CruzFluor™ 790 标记小鼠 IgG κ 结合蛋白 (sc-516181) (美国 Santa Cruz 公司);异硫氰酸荧光素标记的右旋糖酐 (FITC-dextran, 相对分子质量 2 000 000) (德国 Sigma 公司);异氟烷 (深圳瑞沃德生命科技有限公司)。Olympus BX41 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司);Apogee A-50 微流式细胞仪 (美国 Apogee 公司);石蜡切片机、透射电子显微镜 JEM-1400 (德国 Leica 公司);Nanosight NS300 纳米跟踪分析仪 (英国 Malvern 公司);裂隙灯显微镜 (日本拓普康公司);Odyssey Clx 显影仪 (美国 LI-COR 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HUVECs 用 ECM 完全培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,当细胞生长至 70% 融合时,将细胞消化常规传代或低温保存。取第 3~6 代 HUVECs 用于后续实验。

1.2.2 免疫荧光染色法鉴定细胞 取细胞爬片,4% 多聚甲醛固定 30 min,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗 3 次,每次 5 min;滴加 5% Triton X-100,室温下孵育 15 min,甩干载玻片上的液滴,滴加封闭液,室温下孵育 1 h;甩干载玻片上的封闭液,加 CD31 抗体 50 μl ,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PBS 洗 3 次,每次 5 min;加入荧光二抗 50 μl ,室温下避光孵育 1 h;PBS 洗 3 次,每次 5 min;加入 50 μl DAPI 染核 10 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min;抗荧光猝灭剂封片,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.3 HUVECs 源 EXO 的提取和鉴定 实验前将胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 以 $100\ 000\times g$ 超速离心 16 h 以耗竭 FBS 源 EXO。通过总 EXO 分离试剂盒 (细胞培养基) 分离 HUVECs 来源的 EXO。将 HUVECs 在 T75 中培养 48~72 h, 收集培养液, $2\ 000\times g$ 离心 30 min, 弃去细胞和碎片。将上清液与 1/2 体积的总 EXO 分离试剂在 $4\ ^\circ\text{C}$ 下孵育过夜。将混合物在 $4\ ^\circ\text{C}$ 下 $10\ 000\times g$ 离心 1 h。每毫升上清生成的 EXO 沉淀用 $10\ \mu\text{l}$ 生理盐水重悬, 并采用纳米粒子跟踪分析、透射电子显微镜观察 EXO 的浓度和大小形态, 采用 Western blot 实验进行 EXO 标志物鉴定。BCA 检测 EXO 蛋白质量浓度约为 $2\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

1.2.4 EXO-KV11 的合成和鉴定 FITC 标记的 KV11 (CP05) 与 EXO 在 $4\ ^\circ\text{C}$ 下避光孵育过夜。通过配备 488 nm 激发光的 Apogee A-50 微流式细胞仪检测 EXO 负载 KV11 的效率。Apogee 参考混合珠由折射率为 1.42 且直径为 180、240、300、590、880、1 300 nm 非荧光二氧化硅微球和折射率为 1.59 且直径为 110 nm 和 500 nm 的绿色荧光乳胶球组成。使用 Apogee 参考混合珠进行校正, 样品上样进行检测, 采样速度为 $0.75\ \mu\text{l}/\text{min}$, 样品体积不小于 $150\ \mu\text{l}$, 采样时间为 180 s。EXO 浓度和荧光阳性事件数 (n) 根据样品体积、细胞仪流速自动测量。采用中角光散射和 488 nm 荧光触发通道, 并定义带有 FITC 荧光、直径为 30~180 nm 的颗粒为 EXO-KV11 (FITC) 阳性事件。

1.2.5 大鼠角膜碱烧伤诱导 CNV 模型的建立 采用 2.5% 异氟醚麻醉大鼠。直径为 3 mm 的圆形滤纸片浸于 $1\ \text{mol}/\text{L}$ NaOH 溶液中 30 s, 吸水纸吸去多余液体, 烧灼大鼠角膜中心 30 s (第 0 天), 用 15 ml 生理盐水充分清洗结膜囊以去除残余的 NaOH 溶液。采用随机数字表法随机将碱烧伤角膜大鼠分为 EXO-KV11 组 30 只、KV11 组 30 只和生理盐水组 30 只 (本课题组体外实验结果表明, 单纯 EXO 组与生理盐水组指标差异无统计学意义, 因此动物实验排除了单纯 EXO 这一对照组)。从碱烧伤后第 1 天开始, 各组分别每隔 1 d 给予结膜下注射 $100\ \mu\text{l}$ EXO-KV11 ($25\ \mu\text{g}$)、KV11 ($25\ \mu\text{g}$) 或生理盐水。在第 1、4、7、14 天, 裂隙灯显微镜下观察 CNV 生长情况并拍照。

1.2.6 大鼠 CNV 相对荧光面积定量分析 参照文献 [25] 中的方法对裂隙灯显微镜下的角膜照片进行 CNV 定量分析。测量角膜缘血管长度 (L) 和角膜钟时数 (C), $\text{CNV 面积} = C/12 \times 3.141\ 6 [r^2 - (r-L)^2]$, 其中 $r = 3\ \text{mm}$, 为大鼠角膜半径。为了进一步精确计算 CNV 面积, 通过 FITC-dextran 心室灌注、角膜血管造影

计算角膜荧光面积与角膜总面积的比值来定量分析 CNV 相对荧光面积^[26]。采用氯胺酮 ($80\ \text{mg}/\text{kg}$)/噻拉嗪 ($10\ \text{mg}/\text{kg}$) 麻醉大鼠, 左心室灌注 $25\ \text{mg}/\text{ml}$ FITC-dextran $1\ \text{ml}$; 1 min 后, 摘取眼球并在 4% 多聚甲醛溶液中固定 30 min。眼球后节组织分离后将大鼠角膜平均剪成 4 瓣平铺在玻片上, 荧光显微镜下观察并拍照。采用 Image Pro Plus 6 软件检测 CNV 荧光面积与角膜总面积的比值, 定量分析 CNV 相对荧光面积。

1.2.7 苏木精-伊红染色观察各组 CNV 管腔数量 每组选取 6 只大鼠, 于 14 d 过量麻醉处死后摘取眼球, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 置于 55% 乙醇中过夜, 梯度乙醇 (60%、70%、80%、90%、100%) 脱水, 二甲苯透明 5 min, 浸蜡 1 h, 石蜡包埋, $4\ \mu\text{m}$ 厚连续切片, $37\ ^\circ\text{C}$ 烤片过夜。按照试剂盒说明书进行苏木精-伊红染色, 观察各组角膜形态和基质 CNV 数量。

1.2.8 免疫组织化学法检测大鼠角膜组织中 CD31 的表达分布 每组取 8 只大鼠, 将组织石蜡切片置于 $60\ ^\circ\text{C}$ 烤箱中烤片 2 h, PBS 浸洗后放入 $0.01\ \text{mol}/\text{L}$ 枸橼酸盐缓冲液, $100\ ^\circ\text{C}$ 水浴 30 min 修复抗原; 自然冷却后于 3% H_2O_2 溶液中室温孵育 10 min, 10% 山羊血清溶液中室温封闭 30 min; 滴加兔抗 CD31 一抗 (1:500), $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜; PBS 浸洗 3 次, 滴加山羊抗鼠 HRP 标记二抗 (1:100), 室温孵育 30 min; PBS 浸洗 3 次, 滴加适当比例的 HRP 标记链霉卵白素, 室温孵育 30 min, 滴加 DAB 显色液显色 15 s~3 min, 显微镜下观察组织呈褐色, 立即放入水中中止反应, 采用苏木素染液复染核。切片用中性树脂封片后于显微镜下观察并拍照。

1.2.9 Western blot 法检测 VDAC1 和内质网应激、自噬及凋亡相关蛋白表达量 每组取 5 只大鼠, HUVECs 和角膜组织的蛋白通过 RIPA 裂解液提取。制备好的蛋白样品通过 SDS 凝胶电泳后电转到 0.22 或 $0.45\ \mu\text{m}$ 的 NC 膜上, 封闭液封闭 1.5 h, 分别加入 CD63、VDAC1、PERK、p62、LC3B、caspase 3 或 β -actin (均 1:1 000 稀释) 抗体, $4\ ^\circ\text{C}$ 下孵育过夜; TBST 洗 3 次后分别用相应二抗常温下避光孵育 1 h, 在 Odyssey Clx 显影仪上显影。采用 ImageJ 软件定量分析条带, 以 β -actin 为内参, 目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值/ β -actin 灰度值; LC3B 蛋白表达量 = LC3B II 灰度值/LC3B I 灰度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件 (美国 IBM SPSS 公司) 进行统计分析。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组各指标总体比

较采用单因素方差分析,事后比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HUVECs 形态观察及表型鉴定

原代 HUVECs 传代培养至第 3~6 代,细胞形态均匀一致,呈铺路石样。免疫荧光检测结果显示,第 3 代 HUVECs 高表达内皮细胞标志物 CD31(图 1)。

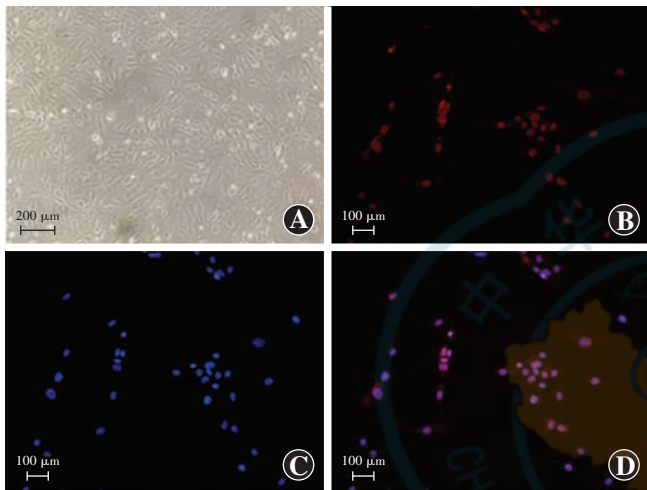


图 1 HUVECs 形态及 CD31 表达 A:第 3~6 代 HUVECs 呈铺路石样形态($\times 100$,标尺=200 μm) B:HUVECs CD31 染色阳性($\times 400$,标尺=100 μm) C:DAPI 染色见细胞核居于细胞中央($\times 400$,标尺=100 μm) D:图 B 和 C 的融合图($\times 400$,标尺=100 μm)

Figure 1 Morphological observation of HUVECs and expression of CD31 A:The paving-stone pattern of primary HUVECs at passage 3-6 under a microscope ($\times 100$,scale bar=200 μm) B:HUVECs positive for CD31 staining ($\times 400$,scale bar=100 μm) C:DAPI staining showed that the nuclei were in the center of cells ($\times 400$,scale bar=100 μm) D:Emerging images B and C ($\times 400$,scale bar=100 μm)

2.2 EXO 的鉴定及其与 KV11(CP05)的结合效率

通过透射电子显微镜、纳米粒径分析仪和 Western blot 法鉴定 EXO,结果显示提取的 EXO 为双面凹的杯状囊泡(图 2A);平均直径为 127 nm,浓度为($2.15 \times 10^9 \pm 6.55 \times 10^7$) particles/ml(图 2B);EXO 标志蛋白 CD63 阳性(图 2C)。Apogee 流式检测不同浓度比(EXO:KV11=2:1,1:1,1:2,1:4)下 EXO 负载 KV11 的效率,结果表明当 EXO:KV11=1:4(6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$:25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)时,结合效率最佳,为 87.5%,后续实验采用此浓度(图 2D)。

2.3 各组 CNV 不同指标及 CD31 表达情况比较

2.3.1 各组大鼠角膜碱烧伤后不同时间点裂隙灯显微镜下 CNV 形成比较 碱烧伤 1 d,各组角膜中央基质混浊,球结膜充血,角膜组织几乎无新生血管长入;

碱烧伤 4 d,可见各组新生血管芽从角膜缘长入角膜;碱烧伤 7 d,EXO-KV11 组 CNV 面积小于 KV11 组和生理盐水组;碱烧伤 14 d,EXO-KV11 组和 KV11 组 CNV 面积均小于生理盐水组,EXO-KV11 组 CNV 面积小于 KV11 组(图 3)。碱烧伤后 7 d 和 14 d,各组 CNV 面积总体比较差异均有统计学意义($F = 4.613, 15.590$,均 $P < 0.05$),其中碱烧伤后 7 d,EXO-KV11 组 CNV 面积小于 KV11 组和生理盐水组;碱烧伤 14 d,EXO-KV11 组和 KV11 组 CNV 面积均小于生理盐水组,EXO-KV11 组 CNV 面积小于 KV11 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 1)。

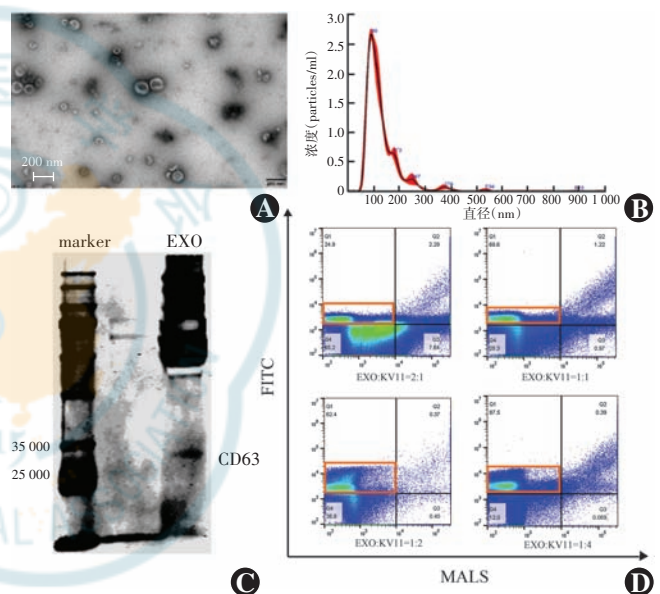


图 2 外泌体的形态及其与 KV11(CP05)的结合效率 A:HUVECs 来源的外泌体透射电子显微镜图像($\times 100\ 000$,标尺=200 nm) B:纳米粒径分析 HUVECs 来源的外泌体大小分布 C:Western blot 分析 HUVECs 来源外泌体中 CD63 蛋白表达 D:Apogee 流式检测外泌体与 FITC 标记的 KV11(CP05)不同浓度比下结合形成 EXO-KV11(FITC)的效率[橙色方框圈出 EXO-KV11(FITC)阳性事件] EXO:外泌体

Figure 2 Morphology of exosomes and its binding efficacy with KV11 (CP05) A: Transmission electron microscopy image of HUVECs-derived exosomes ($\times 100\ 000$,scale bar=200 nm) B: Nanoparticle size analysis of the size distribution of HUVECs-derived exosomes C:Expression of CD63 protein in HUVECs-derived exosomes by Western blot D: Apogee flow system analysis for the efficiency of exosomes binding to FITC-labeled KV11 (CP05) at different concentration ratios (orange box indicated EXO-KV11 (FITC) positive events) EXO:exosome;KV:kringle V

2.3.2 各组大鼠 CNV 相对荧光面积比较 角膜碱烧伤后 14 d,生理盐水组新生血管已长入角膜中央,CNV 荧光面积最大,新生血管密集,迂曲扩张;KV11 组 CNV 相对荧光面积较生理盐水组小,新生血管密度较稀疏,迂曲扩张程度较轻;EXO-KV11 组 CNV 面积最

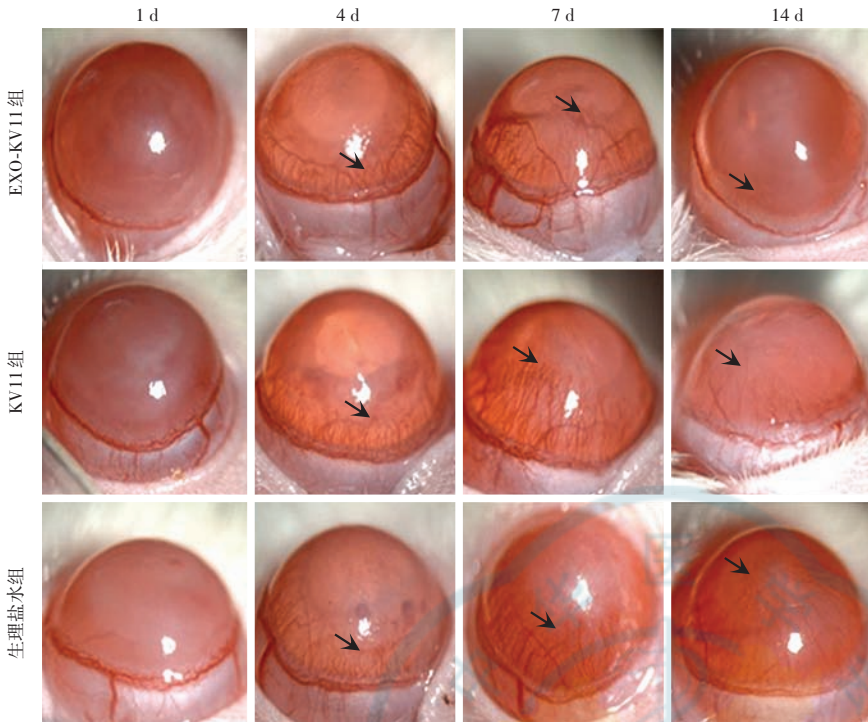


图 3 各组大鼠碱烧伤后不同时间点裂隙灯显微镜下图像(×16) 碱烧伤 1 d,各组大鼠角膜中央基质混浊,球结膜充血,角膜组织几乎无新生血管长入;碱烧伤 4 d,各组新生血管芽从角膜缘长入角膜;碱烧伤 7 d,EXO-KV11 组 CNV 面积小于 KV11 组和生理盐水组;碱烧伤 14 d, EXO-KV11 组和 KV11 组 CNV 面积均小于生理盐水组,EXO-KV11 组 CNV 面积小于 KV11 组 箭头示 CNV EXO:外泌体

Figure 3 Slit-lamp images of rat eyeballs at different time points after corneal alkali burns in each group (×16) On day 1 after alkali burn, cloudy central corneal matrix and congested bulbar conjunctiva were seen, and almost no new blood vessels grew in corneal tissue. On day 4 after alkali burn, neovascularization buds grew from the corneal limbus into the cornea could be seen in each group. On day 7 after alkali burn, the CNV area was smaller in EXO-KV11 group than in KV11 and normal saline groups. On day 14 after alkali burn, the CNV area was smaller in EXO-KV11 and KV11 groups than in normal saline group, and was smaller in EXO-KV11 group than in KV11 group The arrows showed CNV EXO: exosome; KV: kringle V

表 1 各组大鼠角膜碱烧伤后 7 d 和 14 d CNV 面积比较 ($\bar{x}\pm s, \text{mm}^2$)
Table 1 Comparison of CNV area after corneal alkali-burn injury in rats on days 7 and 14 among various groups ($\bar{x}\pm s, \text{mm}^2$)

组别	样本量	碱烧伤后 7 d	碱烧伤后 14 d
EXO-KV11 组	7	16.82±3.20	14.46±4.30
KV11 组	7	22.29±4.07 ^a	19.23±2.37 ^a
生理盐水组	7	20.96±3.29 ^a	23.68±2.63 ^{ab}
F 值		4.613	15.590
P 值		<0.05	<0.001

注:与 EXO-KV11 组比较,^a $P<0.05$;与 KV11 组比较,^b $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) CNV:角膜新生血管;EXO:外泌体

Note:Compared with EXO-KV11 group,^a $P<0.05$;compared with KV11 group,^b $P<0.05$ (One-way ANOVA,LSD-*t* test) CNV:corneal neovascularization;EXO:exosome;KV:kringle V

小,新生血管密度稀疏,迂曲扩张程度最轻。角膜荧光铺片定量分析结果显示,生理盐水组、KV11 组和 EXO-KV11 组 CNV 相对荧光面积分别为(8.3±1.7)%、(5.2±1.6)%和(3.4±0.7)%,总体比较差异有统计学意义($F=11.735, P<0.01$),其中 KV11 组和生理盐水组 CNV 相对荧光面积均大于 EXO-KV11 组,生理盐水组 CNV 相对荧光面积大于 KV11 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)(图 4)。

2.3.3 各组大鼠角膜组织形态学特征比较 碱烧伤后 14 d,生理盐水组基质内可见大量新生血管管腔;KV11 组基质内新生血管管腔数量较生理盐水组少;EXO-KV11 组角膜结构趋于正常,少见新生血管管腔(图 5)。

2.3.4 各组 CD31 表达情况比较 角膜免疫组织化学染色结果显示,碱烧伤后 14 d,生理盐水组角膜基质内可见大量 CD31 染色阳性细胞,细胞围成大小不一的管腔结构;KV11 组角膜基质内 CD31 染色阳性细胞围成的管腔数量较生理盐水组少,EXO-KV11 组较 KV11 组少(图 6)。

2.4 各组 VDAC1 和内质网应激、自噬及凋亡相关蛋白表达量比较

Western blot 检测结果显示,EXO-KV11 组、KV11 组、生理盐水组和正常对照组大鼠角膜组织中 VDAC1、PERK、p62、cleaved caspase 3 相对表达量总体比较差异均有统计学意义($F=35.960、8.947、17.791、101.168$,均 $P<0.01$),其中 EXO-KV11 组 VDAC1、PERK、p62、cleaved caspase 3 相对表达量高于 KV11 组和生理盐水组,差异均有统计学意义(均 $P<0.001$)。各组 LC3B II/LC3B I 蛋白相对表达量总体比较差异无统计学意义($F=0.445, P=0.727$)(表 2,图 7)。

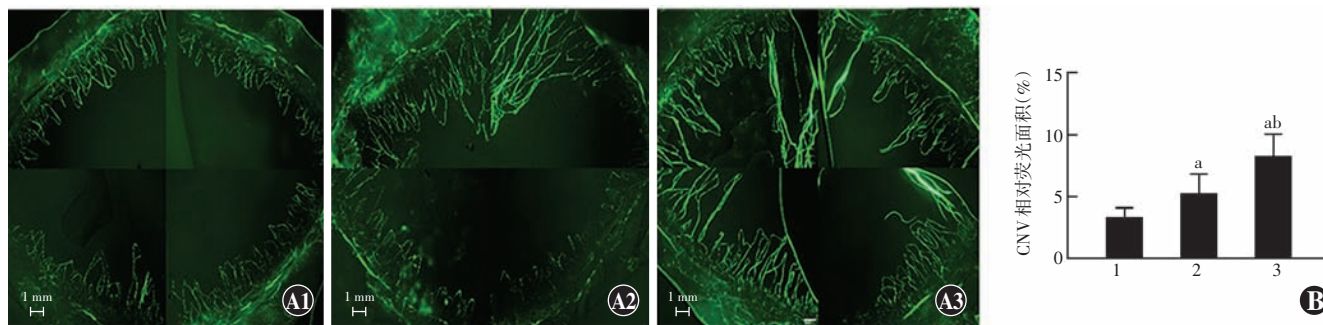


图 4 各组 CNV 相对荧光面积比较 A: 各组碱烧伤后 14 d 角膜荧光铺片 (FITC-dextran ×40, 标尺 = 1 mm) (A1: EXO-KV11 组; A2: KV11 组; A3: 生理盐水组) B: CNV 荧光面积与角膜总面积之比的定量分析 $F = 11.735, P < 0.01$. 与 EXO-KV11 组比较, $^a P < 0.05$; 与 KV11 组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验, $n = 8$) 1: EXO-KV11 组; 2: KV11 组; 3: 生理盐水组 CNV: 角膜新生血管

Figure 4 Comparison of CNV fluorescence area among various groups A: Corneal fluorescence flat mounts on day 14 after alkali burn in different groups (FITC-dextran ×40, scale bar = 1 mm) (A1: EXO-KV11 group; A2: KV11 group; A3: normal saline group) B: Quantitative analysis of the ratio of the CNV area to the total cornea area $F = 11.735, P < 0.01$. Compared with EXO-KV11 group, $^a P < 0.05$; compared with KV11 group, $^b P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test, $n = 8$) 1: EXO-KV11 group; 2: KV11 group; 3: normal saline group CNV: corneal neovascularization

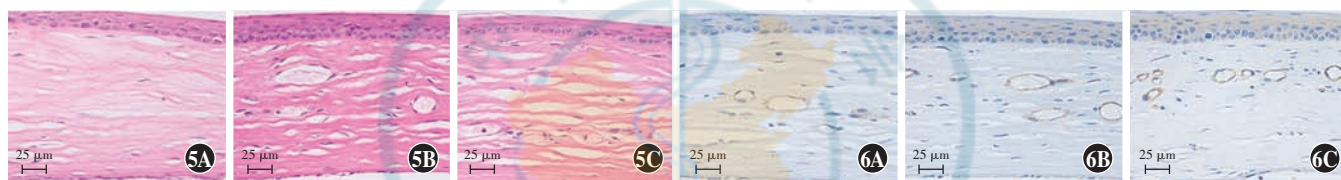


图 5 各组大鼠角膜组织形态学特征比较 (HE ×200, 标尺 = 25 μm) A: 角膜基质纤维趋于正常, 少见血管管腔 B: 角膜基质纤维紊乱, 可见新生血管管腔 C: 角膜基质纤维严重紊乱, 可见大量新生血管管腔 **图 6 各组 CD31 表达情况比较** (DAB ×200, 标尺 = 25 μm) A: EXO-KV11 组可见少量 CD31 阳性细胞围成的管腔 B: KV-11 组 CD31 阳性细胞围成的管腔增多 C: 生理盐水组可见大量 CD31 阳性细胞围成的管腔 CD31 阳性细胞呈棕褐色

Figure 5 Comparison of corneal histomorphologic characteristics of rats among various groups (HE ×200, scale bar = 25 μm) A: Corneal stromal fibers seemed normal, and vascular lumen was rare B: Corneal stromal fibers were disturbed, and neovascular lumens were visible C: Corneal stromal fibers were seriously disturbed, and a large number of neovascular lumens were seen **Figure 6 Comparison of CD31 expression among different groups** (DAB ×200, scale bar = 25 μm) A: A few lumens surrounded by CD31-positive cells were seen in the EXO-KV11 group B: More lumens surrounded by CD31-positive cells were seen in the KV-11 group C: A large number of lumens surrounded by CD31-positive cells were seen in the normal saline group Brown color for CD31-positive cells

表 2 各组大鼠角膜组织中 VDAC1 和内质网应激、自噬及凋亡相关蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of the expression levels of VDAC1, endoplasmic reticulum stress and apoptosis-associated proteins in rat cornea among various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	VDAC1	PERK	p62/SQSTM1	LC3B II / LC3B I	cleaved caspase 3
EXO-KV11 组	4	0.83 ± 0.02	0.95 ± 0.11	0.89 ± 0.05	1.04 ± 0.04	0.62 ± 0.03
KV11 组	4	0.65 ± 0.03 ^a	0.70 ± 0.06 ^a	0.66 ± 0.02 ^a	0.91 ± 0.26	0.45 ± 0.01 ^a
生理盐水组	4	0.59 ± 0.04 ^a	0.59 ± 0.06 ^a	0.77 ± 0.01 ^a	1.10 ± 0.33	0.24 ± 0.01 ^a
正常对照组	4	0.64 ± 0.02	0.88 ± 0.13	0.82 ± 0.04	0.98 ± 0.09	0.33 ± 0.05
<i>F</i> 值		35.960	8.947	17.791	0.445	101.168
<i>P</i> 值		<0.001	<0.01	<0.01	0.727	<0.001

注: 与 EXO-KV11 组比较, $^a P < 0.001$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) VDAC1: 电压依赖性阴离子通道 1; PERK: 蛋白质激酶 R 样内质网激酶; p62/SQSTM1: 自噬接头蛋白 1; LC3B: 自噬微管相关蛋白轻链 3B; cleaved caspase 3: 活化半胱氨酸蛋白酶 3

Note: Compared with EXO-KV11 group, $^a P < 0.001$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test) VDAC1: voltage-dependent anion channel 1; PERK: protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase; p62/SQSTM1: sequestosome-1; LC3B: microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B

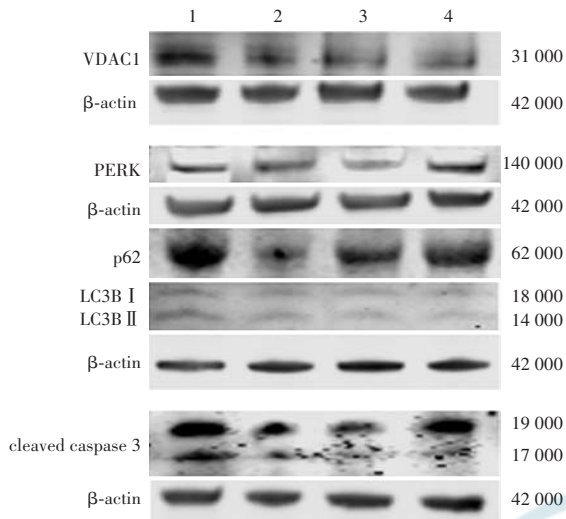


图 7 Western blot 检测角膜碱烧伤后各组角膜组织中 VDAC1、PERK、p62、LC3B II/LC3B I、cleaved caspase 3 的表达 1: EXO-KV11 组; 2: KV11 组; 3: 生理盐水组; 4: 正常对照组 VDAC1: 电压依赖性阴离子通道 1; β -actin: β -肌动蛋白; PERK: 蛋白质激酶 R 样内质网激酶; p62/SQSTM1: 自噬接头蛋白 1; LC3B: 自噬微管相关蛋白轻链 3B; cleaved caspase 3: 活化半胱氨酸蛋白酶 3

Figure 7 Expressions of VDAC1, PERK, p62, LC3B II/LC3B I, and cleaved caspase 3 in corneal tissue after corneal alkali burn in different groups by Western blot 1: EXO-KV11 group; 2: KV11 group; 3: normal saline group; 4: normal control group VDAC1: voltage-dependent anion channel 1; PERK: protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase; p62/SQSTM1: sequestosome-1; LC3B: microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B

3 讨论

CNV 可造成严重的视力损害,目前临床上已有的 CNV 治疗方式均存在一定不足^[27],仍需进一步研究抗 CNV 药物。

近年来,大量研究表明 EXO 作为天然发生的细胞外囊泡可以增加药物递送效率和稳定性^[28-29]。有研究发现,CP05 可以通过非共价键方式与 EXO 4 次跨膜蛋白 CD63 结合,通过多肽与 CP05 的融合可以使 EXO 负载多肽^[30]。因此,本研究将 CP05 与 KV11 体外融合,并与 EXO 孵育形成 EXO-KV11,结果显示当 EXO:KV11=1:4(6.25 μ g/ml:25 μ g/ml)时,结合效率最佳,为 87.5%,说明 KV11 能够通过 CP05 与 EXO 高效结合。本研究中裂隙灯显微镜下眼前节照相定量分析结果表明,EXO-KV11 能够早于 KV11 抑制 CNV;角膜荧光铺片、CD31 免疫组织化学染色和苏木精-伊红染色结果显示,EXO-KV11 对 CNV 的抑制效果优于 KV11。

既往研究已证实,线粒体 VDAC1 是纤溶酶原来源 KV 的受体,KV 通过激活 VDAC1 诱导血管内皮凋亡^[31-32]。VDAC1 定位于线粒体外膜,调节线粒体和细胞其他部分的代谢和能量交流,在线粒体介导的凋亡中起重要作用。其中,VDAC1 参与内质网-线粒体

交流,调节自噬和炎症^[33]。目前尚不明确 KV11 是否是 KV 结构域与 VDAC1 作用的有效激活片段。本研究结果显示,EXO-KV11 能显著促进 VDAC1、内质网跨膜感受器 PERK 的表达,活化凋亡蛋白 caspase 3,表明 EXO-KV11 在 CNV 中能够激活 VDAC1,促进内质网应激和血管内皮细胞凋亡。

研究发现,自噬在内质网应激激活下起到促生存的作用^[34],LC3B I 转化为膜结合形式的 LC3B II 表明自噬流的进行,自噬中晚期标志蛋白 p62 的表达水平增加表明自噬溶酶体降解过程受阻,自噬流受阻^[35]。本研究结果显示,EXO-KV11 增加 p62 表达,而 EXO-KV11 组 LC3B II/LC3B I 比值与生理盐水组比较差异无统计学意义,表明 EXO-KV11 阻滞自噬中晚期降解过程,自噬流受阻。因此,EXO-KV11 诱导内质网应激导致错误折叠蛋白的堆积和自噬流消化错误折叠蛋白这一途径的阻滞,导致内皮细胞稳态障碍,从而发生凋亡。值得注意的是,在抑制 CNV 中,KV11 的表现与 EXO-KV11 截然不同,KV11 不能改变 VDAC1 和 PERK 表达,表明 KV11 在 CNV 中不能激活 VDAC1,不能通过 PERK 激活内质网应激;KV11 下调了 p62 的表达,但 KV11 组 LC3B II/LC3B I 的比值与生理盐水组比较差异亦无统计学意义,表明 KV11 可能是从与 EXO-KV11 不同的途径改变了自噬流的进程。同时,KV11 活化 caspase 3,促进了血管内皮细胞的凋亡。

综上所述,本研究结果表明 EXO-KV11 通过激活 VDAC1 和阻滞自噬流等相关途径抑制 CNV,且 EXO-KV11 的抑制效果优于单独的 KV11 短肽。尽管关于 EXO-KV11 抑制视网膜新生血管的实验已有开展^[24],但 EXO-KV11 对于新生血管的抑制机制仍不明确。鉴于 VDAC1 是 KV 的受体且 VDAC1 在线粒体-内质网交流及线粒体介导的凋亡中起到重要作用,以上结果提示 EXO-KV11 抑制 CNV 的作用机制可能与 VDAC1 的激活相关,内质网应激和自噬也参与其中,这为新生血管性眼病的治疗靶点研究提供了新的思路和实验基础,VDAC1 有望成为抑制新生血管的新靶点。本研究仍存在一定局限性,如 EXO 作为运输药物的载体,进入细胞后的运输是否会影响药物本身的作用途径尚不明确,正如本研究发现 EXO-KV11 和 KV11 在内质网应激和自噬方面不同的分子机制,仍需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

作者贡献声明 陈文倩:设计实验、实施研究、统计分析、起草文章;杜玮:设计实验、对文章知识性内容进行审阅和智力性内容修改;于文贞:直接参与选题、酝酿和设计实验、对文章的知识性内容作批评性审阅及定稿

参考文献

- [1] Zhong W, Montana M, Santosa SM, et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis in corneal transplantation—a review [J]. *Surv Ophthalmol*, 2018, 63 (4) : 453–479. DOI: 10.1016/j.survophthal.2017.12.008.
- [2] Nicholas MP, Mysore N. Corneal neovascularization [J/OL]. *Exp Eye Res*, 2021, 202 : 108363 [2023-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33221371/>. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108363.
- [3] Hsu CC, Chang HM, Lin TC, et al. Corneal neovascularization and contemporary antiangiogenic therapeutics [J]. *J Chin Med Assoc*, 2015, 78 (6) : 323–330. DOI: 10.1016/j.jcma.2014.10.002.
- [4] Mobaraki M, Abbasi R, Omidian Vandchali S, et al. Corneal repair and regeneration; current concepts and future directions [J/OL]. *Front Bieng Biotechnol*, 2019, 7 : 135 [2023-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31245365/>. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00135.
- [5] Giannaccare G, Pellegrini M, Bovone C, et al. Anti-VEGF treatment in corneal diseases [J]. *Curr Drug Targets*, 2020, 21 (12) : 1159–1180. DOI: 10.2174/1389450121666200319111710.
- [6] Scanu AM, Edelstein C. Kringle-dependent structural and functional polymorphism of apolipoprotein (a) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1256 (1) : 1–12. DOI: 10.1016/0005-2760(95)00012-2.
- [7] Cao Y, Chen A, An SS, et al. Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth [J/OL]. *J Biol Chem*, 1997, 272 (36) : 22924–22928 [2023-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9278456/>. DOI: 10.1074/jbc.272.36.22924.
- [8] Lin YL, Tsai MJ, Lo MJ, et al. Evaluation of the antiangiogenic effect of kringle 1-5 in a rat glioma model [J]. *Neurosurgery*, 2012, 70 (2) : 479–489; discussion 489–490. DOI: 10.1227/NEU.0b013e31822f3aea.
- [9] Bian L, Li Q, Ji X. Binding of angiogenesis inhibitor kringle 5 to its specific ligands by frontal affinity chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1401 : 42–51. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.04.058.
- [10] Kalaivani V, Jaleel A. Apolipoprotein (a), an enigmatic anti-angiogenic glycoprotein in human plasma: a curse or cure? [J/OL]. *Pharmacol Res*, 2020, 158 : 104858 [2023-08-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32430285/>. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104858.
- [11] 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) : 4062–4071. DOI: 10.1167/iovs.04-1330.
- [12] 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. DOI: 10.4161/cbt.5.4.2511.
- [13] Fang S, Hong H, Li L, et al. Plasminogen kringle 5 suppresses gastric cancer via regulating HIF-1 α and GRP78 [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2017, 8 (10) : e3144 [2023-08-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29072683/>. DOI: 10.1038/cddis.2017.528.
- [14] Yi ZF, Cho SG, Zhao H, et al. A novel peptide from human apolipoprotein(a) inhibits angiogenesis and tumor growth by targeting c-Src phosphorylation in VEGF-induced human umbilical endothelial cells [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124 (4) : 843–852. DOI: 10.1002/ijc.24027.
- [15] Zhao H, Jin H, Li Q, et al. Inhibition of pathologic retinal neovascularization by a small peptide derived from human apolipoprotein(a) [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50 (11) : 5384–5395. DOI: 10.1167/iovs.08-3163.
- [16] Jain A, Jain A, Gulbake A, et al. Peptide and protein delivery using new drug delivery systems [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2013, 30 (4) : 293–329. DOI: 10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.2013006955.
- [17] Lee AC, Harris JL, Khanna KK, et al. A comprehensive review on current advances in peptide drug development and design [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (10) : 2383 [2023-08-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31091705/>. DOI: 10.3390/ijms20102383.
- [18] Tesaro D, Accardo A, Diaferia C, et al. Peptide-based drug-delivery systems in biotechnological applications: recent advances and perspectives [J/OL]. *Molecules*, 2019, 24 (2) : 351 [2023-08-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30669445/>. DOI: 10.3390/molecules24020351.
- [19] 林浩, 王颖. 间充质干细胞来源外泌体靶向修饰在眼病治疗中的应用前景 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38 (10) : 890–894. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200319-00186.
- [20] Lin H, Wang Y. Modification of mesenchymal stem cell derived exosomes and its application prospects in the treatment of eye disease [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2020, 38 (10) : 890–894. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200319-00186.
- [21] 张慧, 张晓敏, 李筱荣. 外泌体在糖尿病视网膜病变中的研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38 (9) : 799–803. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200424-00285.
- [22] Zhang H, Zhang XM, Li XR. Research progress of exosomes in diabetic retinopathy [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2020, 38 (9) : 799–803. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200424-00285.
- [23] Elsharkasy OM, Nordin JZ, Hagey DW, et al. Extracellular vesicles as drug delivery systems; why and how? [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 159 : 332–343. DOI: 10.1016/j.addr.2020.04.004.
- [24] Wang J, Chen D, Ho EA. Challenges in the development and establishment of exosome-based drug delivery systems [J]. *J Control Release*, 2021, 329 : 894–906. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.10.020.
- [25] Gao X, Ran N, Dong X, et al. Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy [J/OL]. *Sci Transl Med*, 2018, 10 (444) : eaat0195 [2023-08-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29875202/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.aat0195.
- [26] Dong X, Lei Y, Yu Z, et al. Exosome-mediated delivery of an anti-angiogenic peptide inhibits pathological retinal angiogenesis [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (11) : 5107–5126. DOI: 10.7150/thno.54755.
- [27] Yuan K, Zheng J, Huang X, et al. Neutrophil extracellular traps promote corneal neovascularization-induced by alkali burn [J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 88 : 106902 [2023-08-14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32829090/>. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106902.
- [28] Sasaki H, Yamamura K, Tei C, et al. Ocular permeability of FITC-dextran with absorption promoter for ocular delivery of peptide drug [J]. *J Drug Target*, 1995, 3 (2) : 129–135. DOI: 10.3109/10611869509059212.
- [29] Feizi S, Azari AA, Safapour S. Therapeutic approaches for corneal neovascularization [J/OL]. *Eye Vis (Lond)*, 2017, 4 : 28 [2023-08-14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29234686/>. DOI: 10.1186/s40662-017-0094-6.
- [30] Shao J, Zaro J, Shen Y. Advances in exosome-based drug delivery and tumor targeting; from tissue distribution to intracellular fate [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15 : 9355–9371. DOI: 10.2147/IJN.S281890.
- [31] Meng W, He C, Hao Y, et al. Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system; considering cell source [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27 (1) : 585–598. DOI: 10.1080/10717544.2020.1748758.
- [32] Gao X, Zhao J, Han G, et al. Effective dystrophin restoration by a novel muscle-homing peptide-morpholino conjugate in dystrophin-deficient mdx mice [J]. *Mol Ther*, 2014, 22 (7) : 1333–1341. DOI: 10.1038/mt.2014.63.
- [33] Liang YK, Bian LJ. Voltage-dependent anion channel-1, a possible ligand of plasminogen kringle 5 [J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11 (10) : e0164834 [2023-08-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27749918/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0164834.
- [34] 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/OL]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (29) : 27312–27318 [2023-08-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12736244/>. DOI: 10.1074/jbc.M303172200.
- [35] Shoshan-Barmatz V, Shteinfein-Kuzmine A, Verma A. VDAC1 at the intersection of cell metabolism, apoptosis, and diseases [J/OL]. *Biomolecules*, 2020, 10 (11) : 1485 [2023-08-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33114780/>. DOI: 10.3390/biom10111485.
- [36] Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response [J]. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40 (3) : 141–148. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.01.002.
- [37] Yin Y, Sun G, Li E, et al. ER stress and impaired autophagy flux in neuronal degeneration and brain injury [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 34 : 3–14. DOI: 10.1016/j.arr.2016.08.008.

(收稿日期:2023-08-20 修回日期:2023-12-27)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

