

## 基础研究

## 论著

## 血管生成素1对大鼠脉络膜新生血管的治疗作用及其初步机制

徐欢, 姚浩, 雷武龙, 周希媛\*

重庆医科大学附属第二医院眼科/眼科学重庆市重点实验室, 重庆 400010

[中图分类号] R773.4; R965.1 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1834.2023.0307

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 徐欢, 姚浩, 雷武龙, 等. 血管生成素1对大鼠脉络膜新生血管的治疗作用及其初步机制[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(10): 1122-1128.

[收稿日期] 2022-09-05 [录用日期] 2022-11-05 [上线日期] 2023-03-07

**[摘要]** **目的** 探究血管生成素1(Ang1)对大鼠脉络膜新生血管(CNV)的治疗作用及其可能机制。**方法** 选取30只6~8周龄挪威(BN)大鼠, 雌雄不限, 随机分为正常组、模型组、Ang1治疗组, 每组10只。正常组不做处理; 其余两组采用多波长氩激光对BN大鼠双眼进行CNV造模, 于造模后14 d进行眼底荧光素血管造影检查。造模成功后1 d, Ang1治疗组玻璃体腔注射200 μg/L的Ang1 20 μl, 其余两组注射等量生理盐水; 注药后10 d进行眼底荧光素血管造影检查, 使用FITC标记葡聚糖(FITC-dextran)心脏灌注法进行脉络膜铺片测量CNV面积, 采用苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠视网膜-脉络膜结构变化; 取大鼠视网膜-脉络膜-巩膜复合体, 采用Western blotting检测Ang1、Rap1、小分子G蛋白Rap1(GAPRap1)、血管内皮-钙黏蛋白(VE-cadherin)的表达情况。取对数生长期大鼠脉络膜血管内皮细胞(RCVECs), 用血管内皮生长因子(VEGF)刺激培养24 h后, 分为阴性对照组(siRNA-NC组)、GAPRap1小干扰RNA组(GAPRap1-siRNA组)、GAPRap1-siRNA+Ang1组。GAPRap1-siRNA组及GAPRap1-siRNA+Ang1组转染GAPRap1-siRNA试剂, siRNA-NC组细胞转染siRNA-NC试剂, 转染6 h后, 在GAPRap1-siRNA+Ang1组中加入200 μg/L Ang1, 继续培养24 h后提取细胞蛋白, 采用Western blotting检测细胞中GAPRap1、Rap1、VE-cadherin的表达情况, 免疫荧光染色检测转染后细胞中VE-cadherin的表达水平。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠新生血管渗漏面积、脉络膜损伤程度明显升高, 脉络膜中GAPRap1、VE-cadherin蛋白表达明显降低( $P<0.05$ ), Rap1蛋白表达无明显变化( $P>0.05$ ); 与模型组比较, Ang1治疗组大鼠新生血管渗漏面积、脉络膜损伤程度明显降低, 脉络膜与细胞中GAPRap1、VE-cadherin蛋白表达明显升高(均为 $P<0.01$ ), Rap1蛋白表达无明显变化( $P>0.05$ )。脉络膜组织中, Ang1蛋白在Ang1治疗组的表达明显高于其余两组( $P<0.01$ )。细胞实验中, GAPRap1-siRNA组GAPRap1与VE-cadherin的表达水平较GAPRap1-siRNA+Ang1组及siRNA NC组明显降低( $P<0.01$ ), 而Rap1表达无明显变化( $P>0.05$ )。免疫荧光染色检测结果显示, GAPRap1-siRNA组VE-cadherin表达水平较GAPRap1-siRNA+Ang1组及siRNA NC组明显降低( $P<0.001$ )。**结论** Ang1可减少大鼠CNV的渗漏, 对CNV生长具有一定抑制作用, 其机制可能与通过GAPRap1-VE-cadherin途径加强细胞黏附作用有关。

**[关键词]** 血管生成素1; 脉络膜新生血管; 小分子G蛋白Rap1; VE-钙黏蛋白

## Therapeutic effect and mechanism of angiotensin 1 on choroidal neovascularization

Xu Huan, Yao Hao, Lei Wu-Long, Zhou Xi-Yuan\*

Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University/Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, Chongqing 400010, China

\*Corresponding author, E-mail: zhousiyuan2002@aliyun.com

This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82070976)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect and potential mechanism of angiotensin 1 (Ang1) on choroidal

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(82070976)

**[作者简介]** 徐欢, 硕士研究生, 主要从事视网膜脉络膜等疾病的相关研究

**[通信作者]** 周希媛, E-mail: zhousiyuan2002@aliyun.com

neovascularization (CNV) of rats. **Methods** A total of 30 Norwegian (BN) rats aged 6-8 weeks were randomized into three groups ( $n=10/\text{group}$ ): normal group, model group, and Ang1 treatment group. The normal group was not processed, but the other two groups used multi-wavelength krypton laser to model the eyes of BN rats. We then performed fundus fluorescein angiography 14 days post-surgery. After confirming the success of the surgery, on the next day, the Ang1 treatment group received 200  $\mu\text{g}/\text{L}$  Ang1 20  $\mu\text{l}$  through vitreous cavity injection, while the other two groups received an equal volume of saline. After another 10-day, we performed Fundus fluorescein angiography examination, measured the CNV area through choroidal patching using FITC-labeled dextran (FITC-dextran) cardiac perfusion, and observed the retinal-choroidal structure changes of rats by Hematoxylin-eosin staining (HE) staining. We also detected the expression of Ang1, Rap1, GAPRap1, and vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin) in the retinal-choroidal-sclera complex by Western blotting. Next, we cultured the rat choroidal vascular endothelial cells (RCVECs). When the cells were in the logarithmic growth phase, we stimulated these cells with vascular endothelial growth factor (VEGF) and cultured them for 24 hours, and divided into negative control group (siRNA-NC group), GAPRap1-siRNA group and GAPRap1-siRNA+Ang1 group. We further transfected cells with siRNA-NC (siRNA-NC group) or GAPRap1 small interfering RNA (GAPRap1-siRNA group and GAPRap1-siRNA+Ang1 group). In the GAPRap1 small interfering RNA transfected cells, 6 hours after transfection, we set aside some cells coculture with 200  $\mu\text{g}/\text{L}$  Ang1 (GAPRap1-siRNA+Ang1 group). After another 24 hours, we extracted and quantified the expression levels of GAPRap1, Rap1, and VE-cadherin by Western blotting. We detected the expression of VE-cadherin using immunofluorescence. **Results** Compared with normal group, in model group, the neovascular leakage area and choroidal damage degree significantly increased ( $P<0.01$ ), the expression of GAPRap1 and VE-cadherin proteins significantly reduced ( $P<0.05$ ), and the expression of Rap1 had no significant change ( $P>0.05$ ). Compared with model group, in the Ang1 treatment group the neovascular leakage area and choroidal damage degree were significantly reduced ( $P<0.01$ ), the expression of GAPRap1 and VE-cadherin proteins in the choroid and cells significantly increased ( $P<0.01$ ), the expression of Rap1 had no statistical change ( $P>0.05$ ). In choroidal tissue, the expression of Ang1 protein in Ang1 treatment group was significantly higher than that in the other two groups ( $P<0.01$ ). In the cell experiment, the expressions of GAPRap1 and VE-cadherin in GAPRap1-siRNA group were significantly lower than those in the GAPRap1-siRNA+Ang1 group and the siRNA-NC group ( $P<0.01$ ), while the expression of Rap1 had no significant change ( $P>0.05$ ). The immunofluorescence results showed that the fluorescence of VE-cadherin in the GAPRap1-siRNA group was significantly lower than that in the GAPRap1-siRNA+Ang1 group and siRNA-NC group ( $P<0.001$ ). **Conclusion** Ang1 can reduce the leakage of choroidal neovascularization in rats, which has an inhibitory effect on CNV growth, and its mechanism may be related to the enhancement of cell adhesion through the GAPRap1-VE-cadherin pathway.

**[Key words]** angiopoietin 1; choroidal neovascularization; GAPRap1; VE-cadherin

老年性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是老年致盲的主要疾病,而脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是AMD患者发生不可逆视觉障碍的主要原因<sup>[1-5]</sup>,且发病因素较复杂<sup>[6-7]</sup>。抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是CNV治疗的主要方式,但有部分患者对抗VEGF治疗应答不明显<sup>[8-10]</sup>。目前非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)、二甲双胍、激素治疗(hormone therapy, HT)及年龄相关眼病补充剂(age related eye disease supplements, AREDS)等药物已被证实AMD的治疗中具有一定作用<sup>[11-13]</sup>。血管生成素(angiopoietin, Ang)在血管形成、重塑、成熟及维持中起重要作用<sup>[14-15]</sup>,酪氨酸激酶-2(tyrosine kinase-2, Tie-2)/Ang通路调节可作为视网膜疾病的治疗策略<sup>[16]</sup>。Ang是一族分泌型的生长因子,在血管重塑、胚胎血管发育、血管生成等过程中起着重要作用。有研究证实,Ang2与VEGF合作并通过破坏现有血管的稳定来启动血管生成,引发血管的重新塑型及内膜去稳定作用<sup>[17-18]</sup>。而Ang1在病理性血管生成中起保护作用,

使新生血管趋于表现出静止的成熟血管表型,具有调节内皮之间、内皮-基质之间相互作用的功能;Ang1还能稳定内皮细胞(endothelial cells, EC)并促进其生长、抑制其凋亡<sup>[19-20]</sup>。Ang1作用于血管内皮-钙黏蛋白(VE-cadherin),其作用是通过rap1或小分子G蛋白rap1进行调节的,关于Ang1在CNV治疗过程中的作用机制尚待进一步明确。本研究采用多波长氮激光建立大鼠CNV模型,并通过玻璃体腔注射Ang1来评估Ang1对CNV的治疗效果,探讨Ang1在CNV治疗中的作用机制,旨在为临床治疗CNV提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 30只6~8周龄SPF级挪威(BN)大鼠,体重(180±30)g,雌雄不限,购于重庆医科大学动物中心,饲养于本校动物中心实验室。将30只大鼠随机分为正常组、模型组、Ang1治疗组,每组10只。实验过程中对动物的各种处理均遵照中华人民共和国科技部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》中有关动物的使用及伦理学

规定。

**1.2 主要试剂与仪器** 多波长氩激光仪(美国Lumenis公司), Western blotting仪(美国Bio-Rad公司), 石蜡切片机、倒置显微镜、正置显微镜(德国Leica公司)。Ang1(中国义翘神州科技有限公司), 苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒、Anti-Rap1抗体、Anti-小分子G蛋白Rap1(GAPRap1)抗体、TBS、HRP-羊抗鼠IgG(武汉塞维尔生物科技有限公司), VE-cadherin多克隆抗体(苏州百远生物公司), Anti-Ang1(杭州华安生物技术有限公司), HRP-羊抗兔IgG(中国武汉博士德生物工程有限公司), 特超敏ECL化学发光试剂盒(中国大连美仑生物技术有限公司), 荧光素钠注射液(美国爱尔康公司), FITC标记葡聚糖(FITC-dextran)(中国西安瑞禧生物科技有限公司), 多聚甲醛(中国兰杰柯科技有限公司), 大鼠脉络膜血管内皮细胞(rat choroid vascular endothelial cells, RCVECs, 中国北纳创联生物科技有限公司), Lipofectamine™ 8000转染试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司), GAPRap1-SiRNA试剂盒(中国擎科生物技术有限公司)。

### 1.3 体内实验

**1.3.1 大鼠CNV模型建立** 30只挪威大鼠中随机取20只造模。造模方法: 大鼠麻醉后采用复方托比卡胺眼液散瞳, 双眼用盖玻片压平后, 找到视盘, 以视盘为中心的2PD(视盘直径)范围为使用波长532 nm的氩激光(功率140 mW, 直径100 μm, 曝光时间0.07 s)光凝7个点, 以气泡产生为标志表示Bruch膜破裂, 造模成功。

**1.3.2 动物分组及处理** 造模成功后第1天, 各组大鼠完全麻醉后, 在其结膜囊滴用盐酸丙美卡因进行眼部表面麻醉, Ang1治疗组大鼠玻璃体腔注射20 μl Ang1(200 μg/L), 模型组在同一时间注射等量生理盐水, 正常组不予任何处理。

**1.3.3 FITC-dextran心脏灌注及CNV渗漏面积检测** 玻璃体腔注药后10 d, 对各组大鼠进行麻醉, 暴露心脏, 用生理盐水注入右心室, 将体内血液从右心房排净后, 注射4%多聚甲醛溶液固定, 再灌注FITC-dextran溶液, 直至大鼠双唇及四肢出现荧光黄。取下眼球, 剔除前节组织及玻璃体, 小心取出视网膜-脉络膜-巩膜复合体进行铺片。通过荧光渗漏点大小测量CNV渗漏面积。

**1.3.4 苏木精-伊红(HE)染色观察脉络膜结构损伤程度** 各组玻璃体腔注药10 d后随机抽取2只大鼠, 取其眼球进行石蜡切片, 并选取视网膜及脉络膜结构完整连续的石蜡切片, 放入60℃恒温箱中烤片20 min; 使用二甲苯液脱蜡, 使用体积分数75%、

95%、100%的乙醇梯度脱水; 漂洗后使用苏木精染色5 min, 再次漂洗后使用1%盐酸乙醇分化10 s, 再用氨水返蓝15 s; 继续使用蒸馏水漂洗3次, 伊红染色5 min, 蒸馏水漂洗3次; 中性树脂封片并在显微镜下观察脉络膜结构的损伤程度。

**1.3.5 Western blotting检测组织蛋白表达水平** SDS裂解法提取大鼠眼球视网膜-脉络膜-巩膜复合体及细胞总蛋白, BCA法测定蛋白浓度, 煮沸15 min后, 取20 μg样品进行SDS-PAGE电泳, 转PVDF膜, 用快速封闭液封闭15 min, 加入Rap1、GAPRap1、VE-cadherin及内参β-actin一抗(稀释比例1:1000)4℃过夜, TBST洗膜3次, 加入二抗(稀释比例1:5000), 室温孵育2 h, TBST洗膜3次, 超敏ECL显色液曝光显影。以目的蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值表示蛋白相对表达水平。实验重复3次。

### 1.4 体外实验

**1.4.1 细胞转染与处理** 取对数生长期的RCVECs细胞接种于6孔板( $2 \times 10^5$ 个/孔)。加入20 μmol/L VEGF后于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养24 h, 待细胞融合至70%时按照转染试剂操作说明进行细胞转染, 设置阴性对照组(siRNA-NC组, 转染siRNA-NC)、GAPRap1-siRNA组(转染GAPRap1 siRNA)及GAPRap1-siRNA+Ang1组(转染GAPRap1 siRNA), 转染后培养6 h, 吸出培养基, 3组均加入完全培养基, GAPRap1-siRNA+Ang1组加入200 μmol/L的Ang1继续培养细胞24 h, 提取蛋白进行Western blotting实验。实验重复3次。

**1.4.2 细胞免疫荧光染色** 将RCVECs接种于24孔板( $5 \times 10^4$ 个/孔)的细胞爬片上, 按“1.4.1”的方法对细胞进行转染并加药。培养后对爬片上的细胞用PBS洗涤3次, 4%多聚甲醛溶液固定20 min, 山羊血清溶液封闭30 min, VE-cadherin抗体(1:200)4℃过夜, 山羊抗兔Alexa Fluor R488染料(1:400)室温孵育1 h, DAPI(1 μg/ml)染色核3 min, PBS清洗3次, 防淬灭封片液封片, 在荧光显微镜下观察并拍照。

**1.5 统计学处理** 采用SPSS 25.0、Image J软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用t检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用LSD-t法。P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 脉络膜铺片及各组CNV渗漏面积** BN大鼠造模后14 d眼底荧光素血管造影可见激光斑形成, 提示造模成功(图1)。FITC-dextran心脏灌注结果显示, 与模型组比较, Ang1治疗组大鼠CNV渗漏面积明显减小, 差异有统计学意义(P<0.01, 图2)。

**2.2 组织切片HE染色结果** 正常组大鼠视网膜、

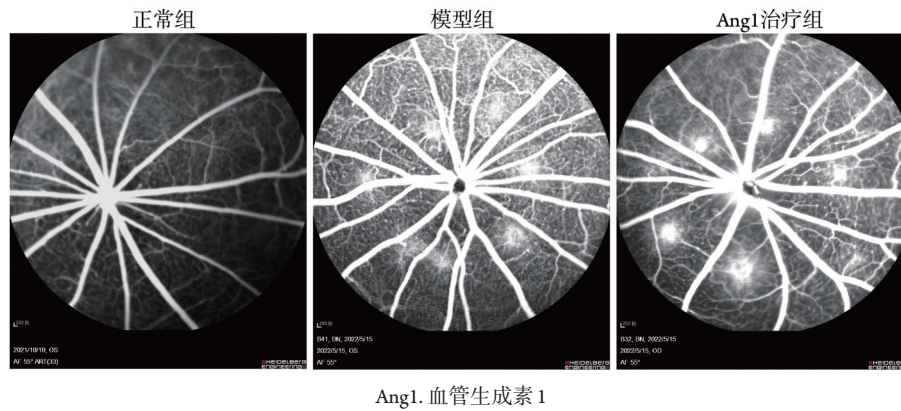
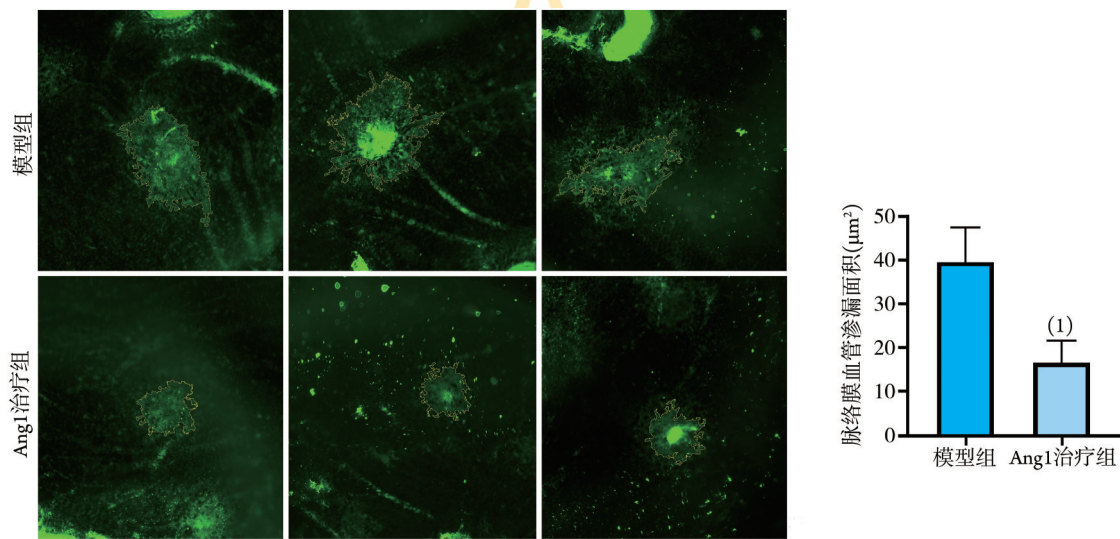


图1 大鼠造模成功后眼底荧光素血管造影结果

Fig.1 Results of fundus fluorescein angiography after successful modeling in rats



Ang1. 血管生成素 1; CNV. 脉络膜新生血管; 与模型组比较, (1) $P < 0.01$

图2 模型组与 Ang1 治疗组大鼠脉络膜铺片及 CNV 渗漏面积( $n=12$ )

Fig.2 Choroidal patches and the area of choroidal neovascular leakage in rats of model group and Ang1 treatment group ( $n=12$ )

脉络膜结构完整、清晰; 模型组大鼠视网膜、Bruch膜及 RPE 层结构紊乱, 内、外核层处可见组织构造不连续, 并可见异常增生的细胞突破脉络膜血管网基底膜。Ang1 治疗组大鼠视网膜、脉络膜损伤面积及程度较模型组明显减小(图3)。

**2.3 大鼠视网膜-脉络膜中 Ang1、Rap1、GAPRap1、VE-cadherin 蛋白的表达** Ang1 治疗组 Ang1 蛋白表达水平高于其他两组( $P < 0.05$ ); 3 组 Rap1 蛋白表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与正常组比较, 模型组大鼠视网膜-脉络膜中 GAPRap1、VE-cadherin 蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, Ang1 治疗组大鼠视网膜-脉络膜中 GAPRap1、VE-cadherin 蛋白表达水平明显增高( $P < 0.05$ , 图4)。

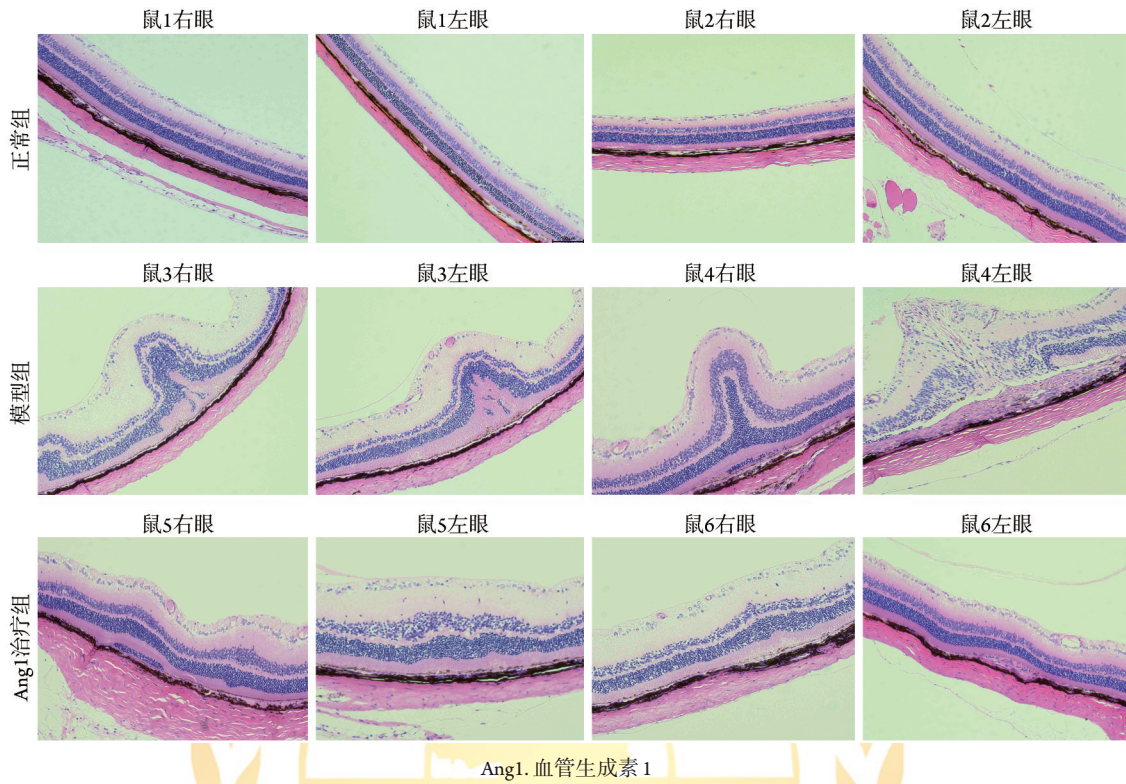
**2.4 RCVECs 细胞中 GAPRap1、VE-cadherin 蛋白的表达** 在沉默 GAPRap1 后, GAPRap1-siRNA+Ang1 组的 GAPRap1、VE-cadherin 蛋白表达较 GAPRap1-siRNA 组明显增加( $P < 0.01$ ), 但 3 组 Rap1 蛋白表达水

平差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 图5)。

**2.5 转染细胞后免疫荧光检测** 免疫荧光检测结果显示, 在 GAPRap1 干扰后, GAPRap1-siRNA+Ang1 组的 VE-cadherin 蛋白荧光强度较 GAPRap1-siRNA 组明显增加( $P < 0.01$ , 图6)。

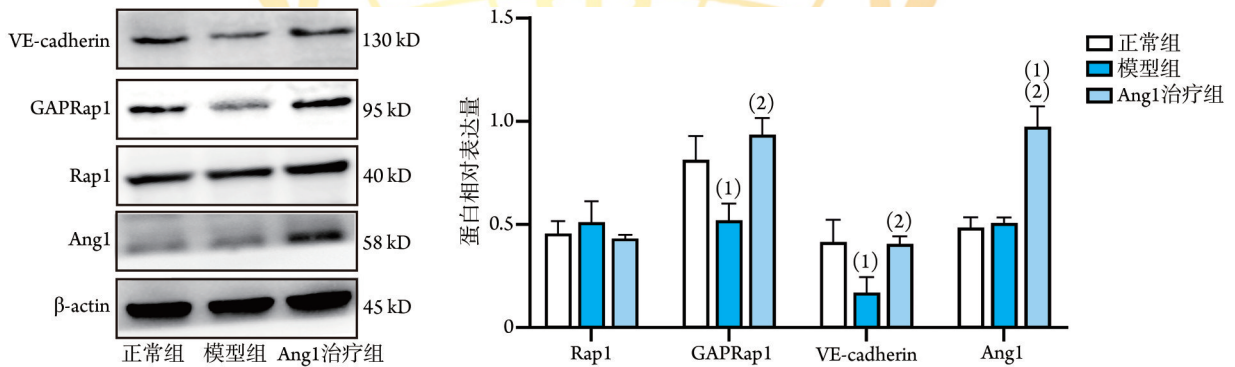
### 3 讨论

CNV 是湿性老年性黄斑病变(wet age-related macular degeneration, wAMD)晚期最严重的症状之一, 如不及时治疗还会不断加重, 给视力造成不可逆的损害<sup>[2,6]</sup>。目前 CNV 的治疗方法主要是抗 VEGF 治疗, 但临床上发现有部分患者抗 VEGF 治疗无效, 很多眼科专家也在研究新的药物或治疗靶点, 目前也有一些公司在研究双抗药物, 可以双途径阻断 CNV 的发生发展, 但仍没有具体的药物应用于临床<sup>[21]</sup>。Ang1 可通过稳定血管内皮细胞而减少血管渗漏, 促进未成熟血管成熟<sup>[22-23]</sup>。此外, Ang1 还可通



Ang1. 血管生成素1  
图3 各组大鼠视网膜脉络膜结构损伤程度观察(HE ×400)

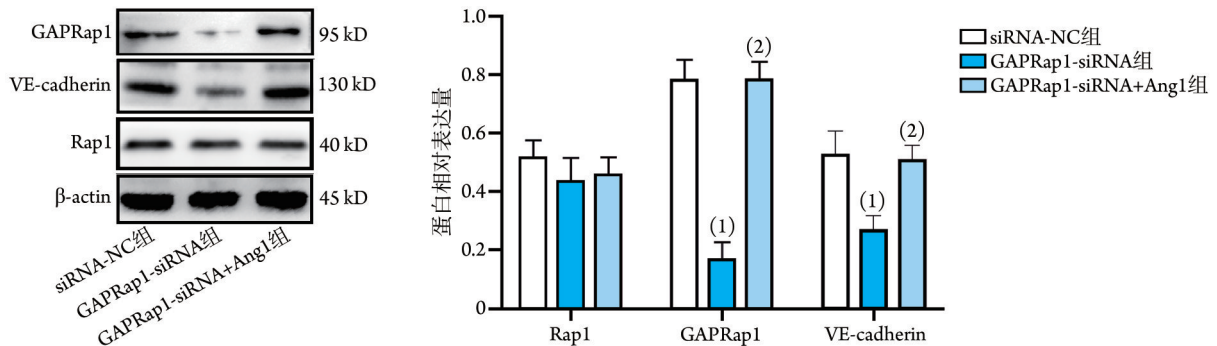
Fig.3 Structural damage degree of retina and choroid of rats in each group (HE ×400)



Ang1. 血管生成素1; 与正常组比较, (1) $P < 0.05$ ; 与模型组比较, (2) $P < 0.01$

图4 各组大鼠视网膜-脉络膜组织中Rap1、GAPRap1、VE-cadherin、Ang1蛋白表达比较( $n=3$ )

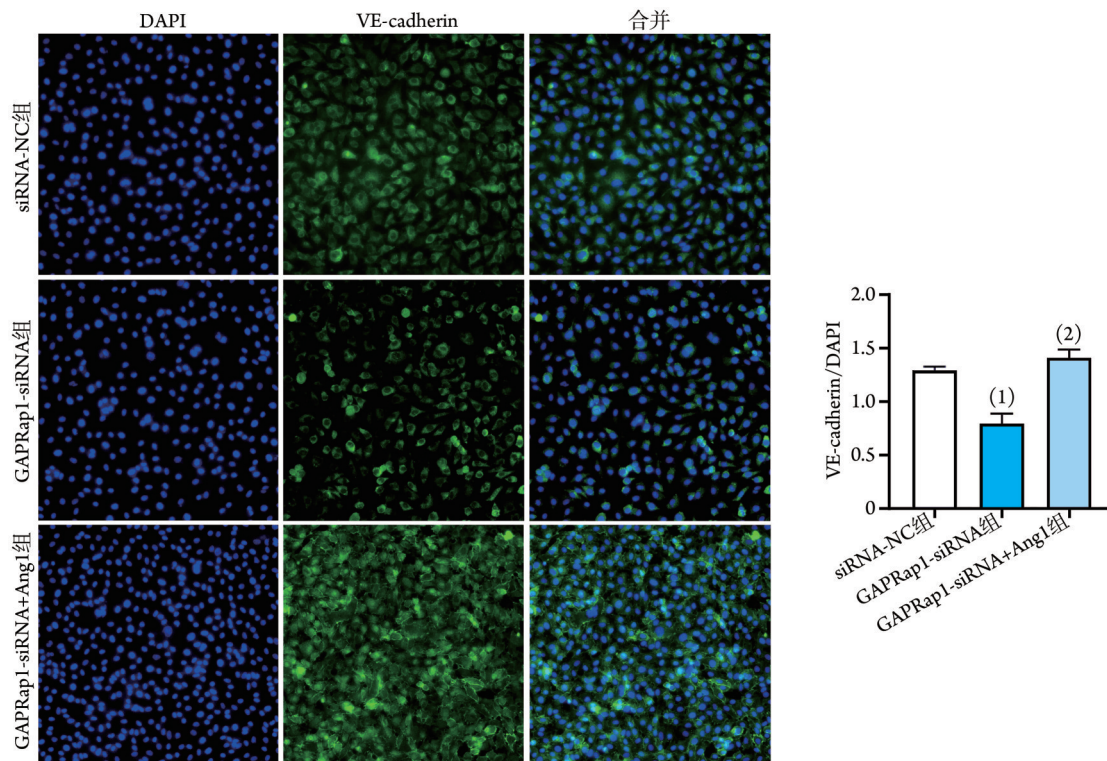
Fig.4 Expression levels of Rap1, GAPRap1, VE-cadherin and Ang1 proteins in retina and choroidal tissues of rats in each group ( $n=3$ )



RCVECs. 大鼠脉络膜血管内皮细胞; 与 siRNA-NC 组比较, (1) $P < 0.01$ ; 与 GAPRap1-siRNA 组比较, (2) $P < 0.01$

图5 各组干扰GAPRap1后大鼠RCVECs细胞中Rap1、GAPRap1、VE-cadherin蛋白表达比较( $n=3$ )

Fig.5 Expression of Rap1, GAPRap1 and VE-cadherin in RCVECs of rats after GAPRap1 interference in each group ( $n=3$ )



RCVECs. 大鼠脉络膜血管内皮细胞; 与 siRNA-NC 组比较, (1) $P < 0.001$ ; 与 GAPRap1-siRNA 组比较, (2) $P < 0.001$

图6 各组大鼠 RCVECs 细胞 VE-cadherin 免疫荧光检测( $\times 200$ ,  $n=3$ )

Fig.6 Detection of VE-cadherin fluorescence in RCVECs of rats in each group ( $\times 200$ ,  $n=3$ )

过吸引血管周细胞及内皮平滑肌细胞聚集并相互作用, 增强血管内皮细胞间连接, 从而有利于维持血管壁完整, 具有稳定血管、防止血管渗漏的作用<sup>[24]</sup>, 与本研究结果一致。本研究采用激光建立 CNV 模型成功后, 玻璃体腔注射 Ang1 后脉络膜铺片可见脉络膜血管渗漏较模型组减少, HE 染色可见模型组大鼠视网膜、Bruch 膜及 RPE 层结构紊乱, 内、外核层处可见组织构造不连续, 并可见异常增生的细胞突破脉络膜血管网基底膜, Ang1 治疗组大鼠视网膜、脉络膜损伤面积及程度较模型组明显减小。

体外研究证实, GAPRap1 活性受鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF)与 GTPase 激活蛋白(GTPase activating protein, GAPs)的时空调节, 且是多种细胞(包括内皮细胞)中细胞-基质及细胞-细胞黏附的重要调节剂<sup>[25-26]</sup>。在内皮细胞中, GTP 结合的 Rap1 可通过微调血管通透性来调节血管生成与内皮屏障<sup>[27-28]</sup>。Rap1 在 Ang1 刺激后被激活, 且是 Ang1 对单层内皮细胞发挥抗渗透作用所必需的。在 CNV 的治疗中, 已有实验证实活化的 Rap1 (GAPRap1)在 CNV 中的表达明显降低, 而 Rap1 的表达无明显变化<sup>[29-30]</sup>。基于过去的研究, 本实验主要研究在 Ang1 治疗 CNV 的过程中 GAPRap1 是否作为下游因子调控 VE-cadherin 的表达。Western blotting 检测结果证实, Ang1 治疗组大鼠脉络膜组织中

GAPRap1、VE-cadherin 的表达较模型组明显增加。细胞实验证实 Ang1 可在 rap1GTP 结合状态下激活 Rap1, 从而诱导血-视网膜屏障信号通路的激活, 表明 GAPRap1(一种抑制 Rap1 活性的 GTPase 激活蛋白)的过度表达阻断了内皮细胞的血管生成发芽及成管活性<sup>[25,31]</sup>。本实验证实, 在 Ang1 治疗 CNV 的过程中, GAPRap1 与 VE-cadherin 对于调节黏附连接组装及内皮通透性的动力学至关重要, 且 Ang1 刺激在血管生成发芽期间诱导这两种蛋白质之间的合作, 揭示了 GAPRap1 在 Ang1 抑制大鼠 CNV 生成及渗漏中的作用。

综上所述, Ang1 对大鼠 CNV 的渗漏有抑制作用, 其作用机制可能是 Ang1 激活下游因子 Rap1, GAPRap1 促进大鼠 CNV 中 VE-cadherin 的生成, 使血管黏附紧密, 从而减少血管渗漏, 抑制新生血管的继续生长。但是对于激活 GAP 后, 下游是否存在其他蛋白因子改变还需进一步研究。

#### 【参考文献】

- [1] Jonas JB, Cheung CMG, Panda-Jonas S. Updates on the epidemiology of age-related macular degeneration[J]. Asia Pac J Ophthalmol (Phila), 2017, 6(6):493-497.
- [2] Ferrington DA, Fisher CR, Kowluru RA. Mitochondrial defects drive degenerative retinal diseases[J]. Trends Mol Med, 2020, 26(1): 105-118.

- [3] Miller JW, D'Anieri LL, Husain D, *et al.* Age-related macular degeneration (AMD): a view to the future[J]. *J Clin Med*, 2021, 10(5): 1124.
- [4] Spaide RF, Jaffe GJ, Sarraf D, *et al.* Consensus nomenclature for reporting neovascular age-related macular degeneration data: consensus on neovascular age-related macular degeneration nomenclature study group[J]. *Ophthalmology*, 2020, 127(5): 616-636.
- [5] Mitchell P, Liew G, Gopinath B, *et al.* Age-related macular degeneration[J]. *Lancet*, 2018, 392(10153): 1147-1159.
- [6] Wong WL, Su X, Li X, *et al.* Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and Meta-analysis[J]. *Lancet Glob Health*, 2014, 2(2): e106- e116.
- [7] Seddon JM. Macular degeneration epidemiology: nature-nurture, lifestyle factors, genetic risk, and gene-environment interactions-the weissenfeld award lecture[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(14): 6513-6528.
- [8] Chen YX, Tang J. Problems and challenges of anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular diseases[J]. *Chin J Experiment Ophthalmol*, 2019, 37(1): 1-4. [陈有信, 汤加. 抗血管内皮生长因子治疗眼部新生血管性疾病问题与挑战[J]. *中华实验眼科杂志*, 2019, 37(1): 1-4.]
- [9] Rofagha S, Bhisitkul RB, Boyer DS, *et al.* Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON[J]. *Ophthalmology*, 2013, 120(11): 2292-2299.
- [10] IVAN Study Investigators, Chakravarthy U, Harding SP, *et al.* Ranibizumab versus bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: one-year findings from the IVAN randomized trial[J]. *Ophthalmology*, 2012, 119(7): 1399-1411.
- [11] Rasoulinejad SA, Karkhah A, Paniri A, *et al.* Contribution of inflammasome complex in inflammatory-related eye disorders and its implications for anti-inflammasome therapy[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2020, 42(5): 400-407.
- [12] Giannaccare G, Pellegrini M, Senni C, *et al.* Clinical applications of astaxanthin in the treatment of ocular diseases: emerging insights[J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(5): E239.
- [13] Campbell M, Doyle SL. Current perspectives on established and novel therapies for pathological neovascularization in retinal disease[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 164: 321-325.
- [14] Liu S, Wang LY, Guo HY, *et al.* The mechanism and function of angiopoietin[J]. *Chin J Pathol*, 2003, 32(3): 273-275. [刘舒, 王绿娅, 郭恒怡, 等. 血管生成素的作用机制和功能[J]. *中华病理学杂志*, 2003, 32(3): 273-275.]
- [15] Yao JX, Xiao Y, Wang Q, *et al.* Analysis of the correlation between hepatokine FABP1 and dyslipidemia[J]. *Med J Chin PLA*, 2021, 46(6): 580-586. [姚俊秀, 肖毅, 王强, 等. 肝脏因子 FABP1 与血脂异常的相关性分析[J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(6): 580-586.]
- [16] Hussain RM, Neiweem AE, Kansara V, *et al.* Tie-2/Angiopoietin pathway modulation as a therapeutic strategy for retinal disease[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2019, 28(10): 861-869.
- [17] Ziegler T, Horstkotte J, Schwab C, *et al.* Angiopoietin 2 mediates microvascular and hemodynamic alterations in sepsis[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(8): 3436-3445.
- [18] 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.
- [19] Augustin HG, Koh GY, Thurston G, *et al.* Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(3): 165-177.
- [20] Nambu H, Nambu R, Oshima Y, *et al.* Angiopoietin 1 inhibits ocular neovascularization and breakdown of the blood-retinal barrier[J]. *Gene Ther*, 2004, 11(10): 865-873.
- [21] Regula JT, Lundh von Leithner P, Foxton R, *et al.* Targeting key angiogenic pathways with a bispecific CrossMAB optimized for neovascular eye diseases[J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(11): 1265-1288.
- [22] Lee J, Park DY, Park DY, *et al.* Angiopoietin-1 suppresses choroidal neovascularization and vascular leakage[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(4): 2191-2199.
- [23] Lambert NG, Zhang X, Rai RR, *et al.* Subretinal AAV2. COMP-Ang1 suppresses choroidal neovascularization and vascular endothelial growth factor in a murine model of age-related macular degeneration[J]. *Exp Eye Res*, 2016, 145: 248-257.
- [24] Zhao J, Chen L, Shu B, *et al.* Angiopoietin-1 protects the endothelial cells against advanced glycation end product injury by strengthening cell junctions and inhibiting cell apoptosis[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(8):1895-905.
- [25] Jeon TJ, Lee DJ, Merlot S, *et al.* Rap1 controls cell adhesion and cell motility through the regulation of myosin II[J]. *J Cell Biol*, 2007, 176(7):1021-1033.
- [26] Ando K, Fukuhara S, Moriya T, *et al.* Rap1 potentiates endothelial cell junctions by spatially controlling myosin II activity and actin organization[J]. *J Cell Biol*, 2013, 202(6): 901-916.
- [27] Pannekoek WJ, Post A, Bos JL. Rap1 signaling in endothelial barrier control[J]. *Cell Adh Migr*, 2014, 8(2): 100-107.
- [28] Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, *et al.* Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(1): 136-146.
- [29] Wang X, Shang QL, Ma JX, *et al.* Rap1, guanosine triphosphate Rap1, vascular endothelial growth factor and  $\beta$ -study on the expression of catenin[J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2018, 34(5): 475-480. [王鑫, 尚庆丽, 马景学, 等. 实验性脉络膜新生血管中 Rap1、鸟苷三磷酸-Rap1、血管内皮生长因子及  $\beta$ -连环蛋白的表达研究[J]. *中华眼底病杂志*, 2018, 34(5):475-480.]
- [30] Wimmer R, Cseh B, Maier B, *et al.* Angiogenic sprouting requires the fine tuning of endothelial cell cohesion by the Raf-1/Rok- $\alpha$  complex[J]. *Dev Cell*, 2012, 22(1): 158-171.
- [31] Yan J, Li F, Ingram DA, *et al.* Rap1a is a key regulator of fibroblast growth factor 2-induced angiogenesis and together with Rap1b controls human endothelial cell functions[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(18): 5803-5810.

(责任编辑: 熊晓然)