

Apelin/APJ 与视网膜新生血管

伍蒙爱 傅方贤 蔡晶晶

随着人类寿命的延长,糖尿病等疾病发生率的增加及低月龄、低体重早产儿存活率的提高,增殖性糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变等以血管新生为基本病理改变的一类严重影响患者视力的眼科疾病的发生率正在逐年增加。新生血管结构和功能的异常常导致渗出、出血、增生等一系列改变,是导致视力障碍甚至失明的重要原因,因此也是研究的热点。新生血管的形成是血管新生刺激因子和血管新生抑制因子共同作用的结果,apelin 是新发现的血管新生刺激因子,参与了多种视网膜血管新生疾病的发生发展,本文就 apelin 及其受体 APJ 在视网膜新生血管形成中的作用做一综述。

一、Apelin/APJ 简介

1. Apelin/APJ 的结构和生物学特征:血管紧张素受体 AT1 相关受体蛋白(putative receptor protein related to AT1, APJ)基因是 1993 年发现的位于 11 号染色体上发现的孤儿 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)基因,编码 380 个氨基酸,APJ 与血管紧张素受体(angiotensin receptor, AT1R)相似,在跨膜区有 86 个氨基酸相同(54%),但是血管紧张素 II(angiotensin-Ⅱ)不能与 APJ 结合^[1];1998 年 Tatamoto 等^[2]在牛胃的分泌物中提取到了 APJ 的天然配体 apelin, apelin 基因位于人染色体 Xq25~26 上,编码 77 个氨基酸的前蛋白原,该蛋白原水解断裂后可以产生分别含 36, 17 和 13 个氨基酸的生物活性肽,目前认为其主要的生物活性在最后的 13 个氨基酸片段中。Apelin 在体内分布广泛,有多种作用,在心血管系统,apelin-16 是极强的心脏收缩剂,能舒张血管降低血压;在中枢神经系统,apelin 参与体液平衡的调节,具有利尿作用;在代谢方面,apelin 抑制胰岛素的分泌并参与肥胖相关疾病的发生;有研究发现 apelin 能阻止 HIV 病毒的侵入,apelin 广泛的生理

作用表明 apelin 信号通路可能具有重要的治疗前景^[3]。

2. Apelin/APJ 与血管发生:apelin 和其受体 APJ mRNA 高度表达于血管系统,特别是血管内皮细胞,在鼠类胚胎血管的形成和新生小鼠的视网膜血管发育过程中强烈表达,提示其与血管生成有着密切的关系^[4,5]。2004 年 Kasai 等^[6]发现 apelin 能够刺激视网膜内皮细胞增殖和迁移,形成血管样管状结构,并且将加入 apelin 的基质胶放入小鼠体内可以观察到其上有新生血管生长。此后, Cox 等^[7]在青蛙胚胎和小鸡绒毛尿囊膜实验中也证实了 apelin 的促血管生长作用。同时,研究表明 apelin/APJ 参与了肿瘤的血管发生及肿瘤生长,在 1/3 的人类肿瘤中能够检测到 apelin 的表达^[8,9]。这些研究均证实 apelin/APJ 与血管的形成有着密切的关系。

三、Apelin/APJ 与生理性的视网膜血管发育

小鼠的视网膜血管在出生后才开始发育,因此是研究视网膜血管发育的良好模型。小鼠的视网膜血管分为表层、中间层、深层 3 层。表层血管丛位于视网膜表面,在其发育过程中,它起源于视盘并逐渐向周边延伸生长,在出生后第 8 天(postnatal 8, P8)到达视网膜边缘,深层血管丛位于视网膜外核层,由表层血管在 P7 开始向下垂直生长形成(P12),中间层血管层也起源于表层血管但其发育落后于深层,在 P12~P15 形成,在 P21 左右视网膜血管全部发育成熟^[10]。Saint-Geniez 等^[4]利用原位杂交技术检测 apelin/APJ 系统与视网膜血管发育的关系发现 APJ 的表达方式与视网膜血管离心式的发育十分符合:在出生后第 1 天 APJ mRNA 主要出现在由视盘处发出的大血管,在 P5 到达其放射的血管及其小分支,在 P10 整个视网膜都有 APJ 的反义探针结合,而从 P10~P15,随着血管的重塑和成熟,APJ 的表达反而下调;与 APJ 不同,apelin 在血管发育的任何阶段都不表达于大血管,而只表达于小血管最前端的内皮细胞:P3 时出现在视盘周围,P5 在视网膜中央,P7 左右到达视网膜边缘。有研究报道 P84 以后在小鼠视网膜上不能检测到 apelin 和 APJ mRNA^[11]。

基金项目:浙江省大学生科技创新活动计划项目(2011R413007)

作者单位:325000 温州医学院眼视光学院(伍蒙爱、傅方贤);温州医学院眼视光学院/附属眼视光医院(蔡晶晶)

通讯作者:蔡晶晶,电子邮箱:caijingjing6@gmail.com

Apelin 和 APJ 的这种不同的表达方式暗示 apelin 可能起到类似细胞因子的作用诱导内皮细胞表达 APJ。Kasai 等^[11]发现在视网膜血管发育过程中, apelin 基因敲除小鼠视网膜 APJ 的表达水平明显低于正常小鼠,进一步说明 apelin 可能起到诱导 APJ 受体表达的作用。

为了进一步研究 apelin 在视网膜血管发育中的作用, Kasai 等^[11]制作了 apelin 基因敲除小鼠模型, 发现 apelin 缺乏小鼠能够正常存活和生长, 除了眼球畸形的发生率增加和所有小鼠都有玻璃体血管残留外, apelin 缺乏主要引起视网膜血管发育延迟, 表现为表层血管在 P5 和 P7 存在生长缺陷, 但在 P15 可以完全恢复, 深层血管在 P15 显示生长缺陷, 在 P84 恢复, 血管形态没有明显异常。这说明 apelin 对血管生长并不是必须的, 但是能够促进血管的生成。用 apelin-KO 小鼠的眼球做角膜袋实验 (corneal pocket assay), 发现 200ng 的 apelin 本身不能诱导角膜血管新生, 但是能够明显增强 VEGF 和 FGF2 的促血管新生的作用, 说明在血管生成过程中 apelin/APJ 通路可能通过与 VEGF 或 FGF 的协同作用发挥效应。但也有研究表明在加入 VEGF 和 FGF 受体的抑制剂后 apelin 促进内皮细胞增殖的作用并不受明显影响, 说明 apelin 促进细胞增殖不依赖于 VEGF 或 FGF 途径, 其具体的作用机制有待于进一步的研究^[8]。

四、Apelin/APJ 与病理性的视网膜血管新生

目前已有文献报道 apelin/APJ 系统参与了增殖性糖尿病视网膜病变 (PDR)、早产儿视网膜病变 (ROP)、中央视网膜静脉阻塞 (CRVO) 等眼部血管新生性疾病的发生发展。增殖性糖尿病视网膜病变是在非增殖性糖尿病视网膜病变 (微动脉瘤、水肿、渗出、出血等) 的基础上出现新生血管和纤维增殖, 增生的纤维收缩牵拉视网膜将导致视网膜脱离, 是糖尿病患者视功能严重受损甚至失明的主要原因之一。Tao 等^[12]收集了 54 位因增殖性糖尿病视网膜病变做玻璃体切除术的病人为实验组, 另外 34 位特发性视网膜外膜和黄斑裂孔病人做对照组, 分别测量两组病人玻璃体内 apelin 和 VEGF 的浓度, 发现实验组玻璃体内 apelin 和 VEGF 的浓度均显著高于对照组, 但是 apelin 升高的水平与 VEGF 升高的水平没有显著的相关性。免疫荧光组织化学染色显示 apelin 和 APJ 表达于糖尿病视网膜病变病人纤维血管膜的内皮细胞。Qian 等^[13]发现玻璃体内注射贝伐单抗 (BEV-ACIZUMAB) 的 PDR 病人, 玻璃体和血浆中 VEGF 的

浓度均明显低于未注射组, 但 apelin 浓度没有显著变化, 并且免疫荧光染色显示两组病人纤维血管膜 (FVMs) 的内皮细胞中均仍有 apelin 表达, 而 VEGF 表达在注射组完全抑制, 这个结果不仅说明 apelin 可能与 PDR 中 FVMs 的形成有关, 并且提示 apelin 的表达可能不受 VEGF 的调控。

视网膜静脉阻塞不仅可以引起黄斑水肿导致视力下降, 还会因组织缺氧释放生长因子引起虹膜红变、新生血管性青光眼等严重并发症, 是成人致盲的重要原因之一。Zhao 等^[14]用激光光凝的方法在恒河猴眼睛上建立了 CRVO 模型, 结果显示 CRVO 组恒河猴视网膜中 apelin 和 VEGF 的基因和蛋白表达均比正常组明显增加, 但是在注射 VEGF 抑制剂 (bevacizumab) 的 CRVO 组, VEGF mRNA 显著降低, 达到与正常组接近的水平, 而 apelin mRNA 虽有所降低, 但仍显著高于正常组。这说明 apelin 参与了 CRVO 的发生发展, 且 apelin 的表达部分不受 VEGF 调控。

早产儿视网膜病变是早产低体重儿易出现的严重眼部并发症, 其主要致病原因为吸氧, 眼底表现为早期的视网膜缺血和后期的新生血管形成和增殖性视网膜病变, 至今仍是儿童失明的主要原因。研究 ROP 最常用的动物模型是 smith 等在 1994 年建立的氧诱导模型 (OIR), 具体方法是将出生后 7 天的 C57/BL6 小鼠放入 75% 的高氧环境 5 天, 再置于空气中 5 天, 在高氧过程中视网膜血管凋亡闭塞, 当小鼠出氧舱后在正常氧气环境中经历相对的缺氧从而引起血管生长因子释放, 导致显著的血管新生^[15]。Kasai 等^[16]利用这个动物模型发现, 与正常小鼠相比, 高氧组小鼠 apelin 的表达在高氧阶段下降了 3 倍左右, 而在缺氧阶段显著增加 (P15 时增加了 31.18 ± 2.39 倍, P17 时增加了 18.33 ± 2.37 倍), 这远高于 VEGF 的增加量 (P15 时 3.05 ± 0.14 倍, P17 时 2.91 ± 0.12 倍), 这说明 apelin 可能在 ROP 的发生发展过程中发挥重要的作用。为了进一步验证 apelin 的作用, 他们用同样的方法将 apelin 基因敲除 (apelin-KO) 小鼠放入氧舱, 发现与野生的高氧组小鼠相比, 虽然 apelin-KO 小鼠视网膜中 VEGF 和 EPO 的量显著增加, 但是没有表现出明显的血管密度增加和形态异常。在视网膜血管发育正常的 apelin 杂合子小鼠 (apelin 的表达量大约下降了一半), 也观察到血管增生面积减少了 40% 左右。这个实验说明 apelin/APJ 与病理性的视网膜血管新生有着密切的关系, 抑制 apelin 的表达能够显著减少血管增生。为了进一步

研究 apelin 与 VEGF 的关系,他们评价了 apelin 抑制剂能否独立于 VEGF 通路抑制内皮细胞的增殖,结果发现,在 MTT 实验中 apelin siRNA 能够抑制细胞活性到 80%,VEGF 抑制剂到 70%,两者具有相加效应抑制内皮细胞增殖到 55%,BrdU 实验有类似的结果。这说明抑制 apelin/APJ 系统可以独立于 VEGF/VEGFR 系统或者与 VEGF 抑制剂联合应用抑制内皮细胞增殖,从而抑制病理性的血管新生。

五、Apelin/APJ 促进新生血管形成的信号通路

目前关于 apelin/APJ 促进新生血管形成的分子机制还不是十分清楚,比较明确的是与 VEGF 相似,缺氧是引起 apelin 表达增加的重要原因。在 VEGF 的研究中,人们已经发现缺氧能激活转录因子低氧诱导因子 1(HIF-1),HIF-1 与 VEGF 5'端增强子内的低氧反应基因(HRE)结合使 VEGF 转录和表达增加,促进新生血管生成。Eyries 等^[17]在 apelin 基因上发现了 3 个 HRE 元件,在缺氧环境下,HIF1- α 可以与 apelin 基因第一个内含子上的 HRE 件结合引起 apelin 表达增加。有研究发现 apelin 与 APJ 结合后,可以通过百日咳毒素敏感的 G 蛋白的介导引起 ERK 激活,进而引起细胞增殖。Bernard 等发现 apelin 与受体 APJ 结合后分别通过 PI₃K/Akt 和 ERK 两条信号通路激活 p70S6K 激酶。p70S6K 介导的蛋白合成可以促进内皮细胞增殖。所以 apelin 可能通过这些通路引起内皮细胞增殖,促进新生血管形成。

六、展 望

目前的研究表明 apelin 对生理性的血管生长不是必须的,但是能够显著促进其生长。Apelin/APJ 系统与 PDR、ROP、CRVO 等多种视网膜血管新生疾病的发生发展密切相关,OIR 模型显示减少 apelin 表达能够抑制血管新生,提示 apelin 可能对病理性的视网膜血管新生疾病有独特的治疗优势,有望成为新的作用靶点。Macaluso 等已经研发出 apelin 受体 APJ 的竞争性拮抗剂,其是否具有抑制视网膜新生血管的作用还需要进一步研究,但其潜在的治疗作用和药物价值无法估量,有望成为 VEGF 抑制剂之后抗血管新生类疾病的又一大突破。

参考文献

- O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, *et al.* A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11 [J]. *Gene*, 1993, 136(1-2): 355-360
- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, *et al.* Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251(2):471-476
- Sorli SC, van den Berghe L, Masri B, *et al.* Therapeutic potential of interfering with apelin signalling [J]. *Drug Discov Today*, 2006, 11(23-24):1100-1106
- Saint-Geniez M, Masri B, Malecaze F, *et al.* Expression of the murine msr/apj receptor and its ligand apelin is upregulated during formation of the retinal vessels [J]. *Mech Dev*, 2002, 110(1-2):183-186
- Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells [J]. *Regul Pept*, 2004, 118(3):119-125
- Kasai A, Shintani N, Oda M, *et al.* Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325(2):395-400
- Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, *et al.* Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo [J]. *Dev Biol*, 2006, 296(1):177-189
- Sorli SC, Le Gonidec S, Knibiehler B, *et al.* Apelin is a potent activator of tumour angiogenesis [J]. *Oncogene*, 2007, 26(55):7692-7699
- Kälin RE, Kretz MP, Meyer AM, *et al.* Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis [J]. *Dev Biol*, 2007, 305(2):599-614
- Stahl A, Connor KM, Sapieha P, *et al.* The mouse retina as an angiogenesis model [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(6):2813-2826
- Kasai A, Shintani N, Kato H, *et al.* Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(10):1717-1722
- Tao Y, Lu Q, Jiang YR, *et al.* Apelin in plasma and vitreous and in fibrovascular retinal membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(8):4237-4242
- Qian J, Lu Q, Tao Y, *et al.* Vitreous and plasma concentrations of apelin and vascular endothelial growth factor after intravitreal bevacizumab in eyes with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Retina*, 2011, 31(1):161-168
- Zhao T, Lu Q, Tao Y, *et al.* Effects of apelin and vascular endothelial growth factor on central retinal vein occlusion in monkey eyes intravitreally injected with bevacizumab: a preliminary study [J]. *Mol Vis*, 2011, 17:1044-1055
- Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, *et al.* Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(1):101-111
- Kasai A, Ishimaru Y, Kinjo T, *et al.* Apelin is a crucial factor for hypoxia-induced retinal angiogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(11):2182-2187
- Eyries M, Siegfried G, Ciumas M, *et al.* Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis [J]. *Circ Res*, 2008, 103(4):432-440

(收稿日期:2012-10-31)

(修回日期:2012-11-22)