

引文格式:王蔚,李学东,刘光旭,何燕.两种血管内皮生长因子抑制剂对血管内皮细胞功能的抑制作用比较[J].眼科新进展,2019,39(10):920-923. doi:10.13389/j.cnki.rao.2019.0209

【实验研究】

两种血管内皮生长因子抑制剂对血管内皮细胞功能的抑制作用比较[△]

王蔚 李学东 刘光旭 何燕

Comparison of inhibitory effects of two vascular endothelial growth factor inhibitors on proliferation of vascular endothelial cells

WANG Wei, LI Xue-Dong, LIU Guang-Xu, HE Yan

[Abstract] Objective To explore the inhibitory effect of tenomodulin (TNMD) and avastin on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) proliferation and capillary-like morphogenesis *in vitro* induced by vascular endothelial growth factor (VEGF). **Methods** HUVECs between passages 3 and 6 were inoculated into microplates for growth, and then placed in an incubator for 6 hours. Different doses of VEGF were added for 24 hours. MTT assay was used to measure cell proliferation and screen out the appropriate VEGF dose (A) for the maximum proliferation effect. A dose of VEGF + different doses (0.25 mg · L⁻¹, 0.50 mg · L⁻¹, 1.00 mg · L⁻¹, 200.00 mg · L⁻¹) of TNMD or avastin was added into HUVEC in the incubator for 24 hours of culture. MTT assay was used to detect the difference of VEGF-induced inhibition of HUVEC proliferation by TNMD and avastin. The length and morphology of capillary-like structures formed by HUVEC was evaluated by Matrigel tube formation assay. Cells were divided into the positive control (A group), A + VEGF group (B group), B + avastin group (C group), B + TNMD group (D group). Cell morphology was observed under confocal microscopy, and image processing analysis software was used to quantify the differences in capillary-like structures. **Results** MTT measured the absorbance (A value) at 490 nm to detect cell proliferation. The results showed that the A value of TNMD was significantly lower than that of avastin at the same VEGF concentration (both $P < 0.01$). The results of matrix colloidal experiment showed that the capillary-like structure of D group was destroyed obviously; the total length of cells in A group, B group, C group and D group were (7422 ± 311) μm, (9369 ± 121) μm, (6499 ± 258) μm, (5292 ± 137) μm, and the difference between the two groups was statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** TNMD has a stronger inhibitory effect on angiogenesis *in vitro* than avastin.

[Key words] tenomodulin; avastin; human umbilical vein endothelial cells; cell proliferation

【摘要】 目的 对比 tenomodulin (TNMD) 和 avastin 对血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 诱导的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 增殖和体外血管样结构形成的抑制作用。**方法** 将传至 3~6 代的 HUVEC 接种于微孔板中贴壁生长,再置于孵箱中培养 6 h,分别加入不同剂量 VEGF 处理 24 h,MTT 法测量细胞增殖能力,筛选促进细胞最大增殖作用的 VEGF 剂量 A。将 HUVEC 分别加入 A 剂量的 VEGF + 不同剂量 (0.25 mg · L⁻¹, 0.50 mg · L⁻¹, 1.00 mg · L⁻¹, 2.00 mg · L⁻¹) 的 TNMD 或 avastin 置于孵箱中培养 24 h,MTT 法检测 TNMD 和 avastin 对 VEGF 诱导的 HUVEC 增殖抑制的差异。基质胶体实验检测细胞体外血管形成的形态和长度:实验分为 4 组,A 组为阳性对照;B 组添加 VEGF;C 组添加 VEGF 和 avastin;D 组添加 VEGF 和 TNMD,共焦显微镜下观察细胞形态,图像处理分析软件量化分析毛细血管样结构的差异。**结果** MTT 在 490 nm 波长处测定吸光值 (A 值) 检测细胞增殖,结果显示,相同药物浓度时 TNMD 的 A 值均明显低于 avastin 的 A 值 (均为 $P < 0.01$)。基质胶体实验结果显示,D 组的毛细血管样结构破坏明显;A 组、B 组、C 组和 D 组细胞总长度分别为 (7422 ± 311) μm、(9369 ± 121) μm、(6499 ± 258) μm、(5292 ± 137) μm,两两相比差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$)。**结论** TNMD 比 avastin 对体外培养的 HUVEC 增殖具有更强的抑制作用。

【关键词】 tenomodulin; avastin; 人脐静脉内皮细胞; 细胞增殖

【中图分类号】 R77

作者简介:王蔚,女,1968 年 10 月出生,北京人,硕士,主任医师。研究方向:新生血管性眼病。联系电话:18310105200; E-mail: wendy_wen81@126.com; ORCID: 0000-0002-1919-7486

About WANG Wei: Female, born in October, 1968. Master degree, chief physician. Tel: 18310105200; E-mail: wendy_wen81@126.com; ORCID: 0000-0002-1919-7486

收稿日期:2018-12-11

修回日期:2019-03-08

本文编辑:盛丽娜

△ 基金项目:首都医科大学基础-临床科研合作课题 (编号:13JL13)

作者单位:100020 北京市,首都医科大学附属北京朝阳医院眼科 (王蔚,李学东);100069 北京市,首都医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系 (刘光旭,何燕)

Received date: Dec 11, 2018

Accepted date: Mar 8, 2019

Foundation item: The Cooperation Fund for Clinic and Scientific Research of Capital Medical University (No: 13JL13)

From the Department of Ophthalmology, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University (WANG Wei, LI Xue-Dong), Beijing 100020, China; Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Capital Medical University (LIU Guang-Xu, HE Yan), Beijing 100069, China

新生血管性眼病是以病理性新生血管异常增生为病变特征的致盲率极高的眼病^[1],其中湿性年龄相关性黄斑变性(wet age-related macular degeneration, wAMD)更是导致老年人视力丧失的主要元凶^[2]。wAMD的特点是黄斑区脉络膜新生血管形成,非正常的血管增生、渗漏、出血导致黄斑区微结构破坏,最终瘢痕化造成不可逆的视力破坏^[3]。近年来,随着lucentis(又名ranibizumab)、avastin(又名bevacizumab)等血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抑制剂玻璃体内注射的广泛应用,抗VEGF治疗已成为目前最有效的治疗wAMD的手段。

avastin是一种重组的人类单克隆IgG1抗体,包含了人源抗体的结构区和可结合VEGF的鼠源单抗的互补决定区,能与人VEGF结合并阻断其生物学活性,目前已被广泛应用于抗肿瘤及新生血管性眼病的治疗中^[4-5]。虽然抗VEGF治疗为wAMD等视网膜新生血管性眼病提供了有效的治疗办法,但为维持治疗的有效性目前仍需长期重复注射,带来的是安全风险的增加及患者负担的加重。报道过的不良事件包括眼内炎、眼出血、中风和心肌梗塞等^[3]。基于此,寻找更安全有效的眼内抗新生血管药物一直是眼科医师追寻的热点。

tenomodulin(TNMD)是肿瘤坏死因子家族的新成员^[6],属于跨膜蛋白类血管生成抑制因子^[7]。研究证实,TNMD在体外能抑制血管内皮细胞增生及血管样结构的形成,在体内能抑制肿瘤的发生^[8-11]。我们的前期研究证实,TNMD对血管内皮细胞增生有明显抑制作用^[12],并能抑制氧诱导视网膜病变小鼠模型新生血管的形成^[13]。本研究旨在比较TNMD与avastin对体外培养的血管内皮细胞增生抑制作用的强弱,为寻找更强有力的抗VEGF药物提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料 TNMD($1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,美国Abcam公司)于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存,在 $\text{pH } 7.4$ 、 $0.01\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(PBS)中溶解,溶解后的TNMD在 $2\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境中可以保存6周。avastin($25\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,瑞氏罗氏公司)保存在 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的环境中,不可冷冻。人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC; KeyGen 中国有限公司); VEGF (Biological 中国公司); MTT细胞增殖检测试剂盒(德国Applchem公司); Matrigel Matrix生长因子递减基质胶(美国BD公司); DMEM培养基(美国Hyclone公司); 体积分数10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、HuMedia EG2培养基(美国Gibco公司)。共焦显微镜(日本Olympus); 多功能酶标仪(Thermo Multiscan MK3, 美国); 24孔、96微孔细胞培养板(美国Corning公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HUVEC为贴壁生长细胞,在含有体积分数10% FBS和 $100 \times 10^3\text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素和链霉素的HuMedia EG2和DMEM培养基中生长,置于体积分数5% CO_2 、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养,2~3 d更换一次培养基,细胞生长至融合时,用 $1.25\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶乙二胺四乙酸消化,按1:2比例传代,传代至3~6代的HUVEC共焦显微镜下呈鹅卵石样外观,排列紧密、均匀,保持着血管内皮细胞所具有的基本结构和生物学共性,用于本实验。

1.2.2 细胞增殖实验

1.2.2.1 MTT法筛选VEGF的合适剂量 将传至3~6代的HUVEC按每孔 50×10^3 个接种于96微孔细胞培养板中(每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$),培养24 h后,置于含体积分数0.5% FBS的培养基中培养6 h,使细胞处于饥饿状态,之后分别加入 $25\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $200.00\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的VEGF刺激24 h,每孔加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ $5 \times 10^3\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT溶液行MTT染色,孵育4 h,加入 $150\text{ }\mu\text{L}$ 二甲基亚砷并充分混合10 min后,用微板读数器在490 nm处测量吸光度值(A值),检测细胞增殖能力,统计分析得出有促进增殖作用的VEGF剂量A。

1.2.2.2 比较TNMD和avastin对细胞增殖抑制的差异 HUVEC按每孔 50×10^3 个接种于96微孔细胞培养板中(每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$),培养24 h后,置于含体积分数0.5%的FBS培养基中6 h,之后分别加入A剂量的VEGF + $0.25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的TNMD及A剂量的VEGF + $0.25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的avastin置于孵箱中培养24 h, MTT法检测TNMD和avastin对VEGF诱导的血管内皮细胞增殖抑制的差异。

1.2.3 基质胶体实验 Matrigel Matrix基质胶呈冰冻固态,在冰水中缓慢融化,融化后的基质胶置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待用。24孔细胞培养板中每孔注入 $400\text{ }\mu\text{L}$ 基质胶,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵箱中放置30 min, Matrigel Matrix由黄色液态变为粉红色胶冻状态。HUVEC在含有体积分数1% FBS的培养基中孵育4 h,胰蛋白酶消化,分别以每孔 60×10^3 个细胞接种于粉红色基质胶表面,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育6 h。实验依据培养基不同分为4组, A组:体积分数1% FBS组作为阳性对照组; B组:体积分数1% FBS + $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ VEGF; C组:体积分数1% FBS + $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ VEGF + $2.50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ avastin; D组:体积分数1% FBS + $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ VEGF + $10.00\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TNMD。每组设5个复孔,剩余4孔在基质胶表面添加PBS作为阴性对照,同时起到保湿作用。共焦显微镜下观察细胞形态。为量化分析HUVEC毛细血管样结构,各视野随机选择,管型细胞总长度用美国国立研究院NIH 1.61版图像处理和分析软件测量获得,该

软件从美国国立卫生研究院公共软件区 <http://rsb.info.nih.gov/niH-image> 下载获得。实验进行 3 次,取其平均值。

1.3 统计学分析 实验数据采用 SPSS 13.0 统计学分析软件处理,多组间比较使用单因素方差分析,组间的多重比较采用 Scheffe multicomparison 检验。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MTT 法筛选 VEGF 最优剂量 在含体积分数 0.5% FBS 低浓度培养基中添加不同浓度的 VEGF,设对照 HUVEC 的 A 值为 1.0,MTT 检测结果显示,25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 VEGF 相对应 A 值分别为 1.068、1.159、1.184、1.174,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$),100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ VEGF 时 HUVEC 增殖最为显著,后续实验使用此浓度进行。

2.2 TNMD 和 avastin 对 HUVEC 增殖的抑制作用

100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ VEGF + 不同浓度的 avastin 经 MTT 染色后显示,设对照 HUVEC 的 A 值为 1,则单纯添加 VEGF 的 A 值为 1.163,100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ VEGF + 0.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、0.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、1.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ avastin 的 A 值呈不断下降趋势,分别为 1.138、1.122、1.115、1.081;100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ VEGF + 0.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、0.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、1.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TNMD 的 A 值分别为 1.117、1.095、1.081、1.061,相同浓度下 TNMD 的 A 值明显低于 avastin 的 A 值,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$),表明 TNMD 比 avastin 具有更强的抑制细胞增殖的作用(图 1)。

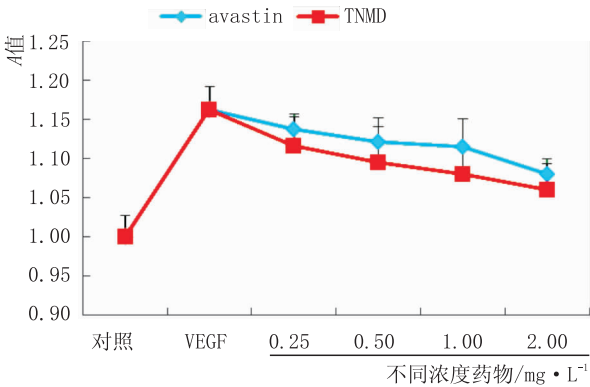


图1 TNMD 和 avastin 对 VEGF 诱导的 HUVEC 增殖的抑制作用

2.3 TNMD 和 avastin 对 HUVEC 体外血管样结构形成的抑制作用

HUVEC 在基质胶表面形成的毛细血管样结构依据培养基的不同而有明显差异,A 组:HUVEC 在基质胶表面形成毛细血管样结构并相互连接成网状,细胞总长度为 $(7422 \pm 311) \mu\text{m}$;B 组:毛细血管样结构增多,管状结构长度明显增长,细胞总长度为 $(9369 \pm 121) \mu\text{m}$;C 组:网状结构稀疏变少,细胞总长度降为 $(6499 \pm 258) \mu\text{m}$;D 组:毛细血管样结构破坏明显,各视野内管型细胞总长度明显变短,细胞总长度降至 $(5292 \pm 137) \mu\text{m}$ 。4 组间细胞总长度差异有统计学意义($F = 121.37, P < 0.01$),两两相比差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。表明 TNMD 对 HUVEC 血管样结构的形成较 avastin 有更强的抑制作用(图 2)。

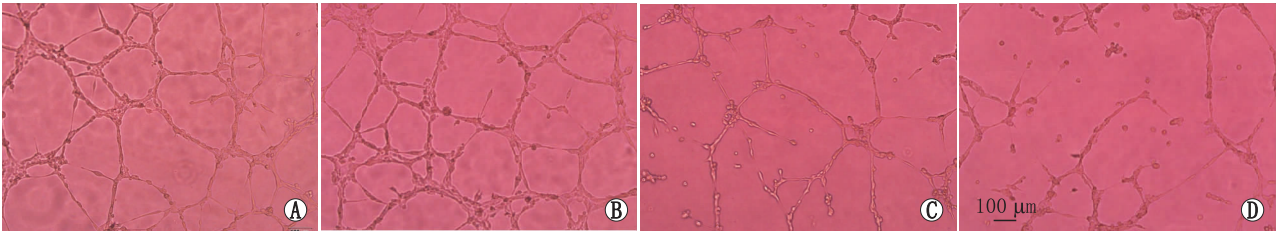


图2 各组 HUVEC 血管样结构($\times 100$)。A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组

3 讨论

虽然 lucentis、avastin 等抗 VEGF 药物因其有效性、安全性已成为治疗新生血管性眼病最主要的手段之一,但眼内多次重复注射带来诸多安全隐患并增加了患者的经济负担。目前研究发现,许多具有重要调节功能的新的蛋白类分子具有强有效的抗新生血管作用,能阻断 VEGF 活性,从而抑制新生血管化的进程^[14]。

TNMD 是近年在研究肿瘤时发现的对新生血管具有极强抑制作用的蛋白类分子之一,是一种 II 类跨膜糖蛋白,主要在致密少血管的结缔组织,包括肌

腱、韧带和眼巩膜、玻璃体、房水中表达^[15-16],缺乏 TNMD 的新生小鼠出现软骨发育迟滞,成年鼠表现为胶原纤维断裂。TNMD 存在于细胞表面,其结构上包含一个 C-羧基端,与 ChM-I 前体同源,ChM-I 抑制血管形成的功能性领域也正是在这个 C-羧基端^[10]。有研究表明,TNMD 在体外抑制血管内皮细胞的增殖和血管样结构的形成,在体内抑制肿瘤血管的生成而具有相当强的抗肿瘤效果^[11]。我们早期的研究也证实,TNMD 对血管内皮细胞增生有明显抑制作用^[12],并对高氧诱导的缺血性视网膜病变及病理性新生血管的形成有明显的抑制作用^[17]。

近年来研究发现,生理状态下,刺激和抑制血管

生成受到内源性正向、负向调节因子的调控,其生长和抑制处于一种动态平衡,导致血管的数量、形态、结构保持高度稳定^[10]。病理状态下这种动态平衡被打破,其中 VEGF 是导致血管生成的主要因素,缺氧是促使 VEGF 高表达的主要原因。阻断 VEGF 活性抑制新生血管化的进程。

本研究通过比较 TNMD 和 avastin 两种 VEGF 抑制剂对 VEGF 刺激下的 HUVEC 增殖和毛细血管样结构形成的抑制作用,旨在为研究新生血管的发生发展机制及筛选更强有力的新生血管抑制剂提供可靠的实验依据。本研究采用 MTT 染色法测定细胞增殖,与 HUVEC 比较,单纯添加 VEGF 的 A 值明显上升,但在添加 avastin 后,随 avastin 浓度的增加,A 值呈不断下降趋势,另外一组添加 TNMD 的 A 值也随药物浓度的增加而呈明显下降趋势,且下降速度比添加 avastin 组更快,经统计学分析,相同药物浓度的 TNMD 的 A 值明显低于 avastin 的 A 值,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.01$)。本研究结果提示,TNMD 比 avastin 具有更强的抑制细胞增殖的作用。本研究利用基质胶体实验对比观察 TNMD 和 avastin 对 HUVEC 体外血管形成的抑制作用。细胞在基质胶表面形成的毛细血管样结构依据培养基的不同而有明显差异,与阳性对照组(A 组)比较,添加 VEGF 组(B 组)毛细血管样结构增多,管状结构长度明显增长;添加 avastin 组(C 组)网状结构稀疏变少,细胞总长度下降;添加 TNMD 组(D 组)毛细血管样结构破坏明显,各视野内管型细胞总长度明显变短,本研究结果提示,TNMD 对 HUVEC 血管样结构的形成较 avastin 有更强的抑制作用。

本研究结果表明,TNMD 作为一种更强有效的 VEGF 抑制剂,在预防和治疗新生血管性眼病的进程中有巨大的潜力,本实验也为该药用于体内研究提供了一定的实验基础。

参考文献

[1] BERG K, PEDERSEN T R, SANDVIK L, BRAGADÓTTIR R. Comparison of ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration according to LUCAS treat-and-extend protocol[J]. *Ophthalmology*, 2015, 122 (1): 146-152.

[2] SOLOMON S D, LINDSLEY K, VEDULA S S, KRZYSTOLIK M G, HAWKINS B S. Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014, 8; CD005139.

[3] MOJA L, LUCENTEFORTE E, KWAG K H, BERTELE V, CAM-

POMORI A, CHAKRAVARTHY U, *et al.* Systemic safety of bevacizumab versus ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014, 9; CD011230.

[4] KIM M M, UMEMURA Y, LEUNG D. Bevacizumab and glioblastoma: past, present, and future directions[J]. *Cancer J*, 2018, 24 (4): 180-186.

[5] BROWN D M, MICHELS M, KAISER P K, HEIER J S, SY J P, LANCHULEY T, *et al.* Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: two-year results of the ANCHOR study[J]. *Ophthalmology*, 2009, 116 (1): 57-65.

[6] ZHAI Y, NI J, JIANG G W, LU J, XING L, LINCOLN C, *et al.* VEGF1, a novel cytokine of the tumor necrosis factor family, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of colon carcinomas *in vivo* [J]. *FASEB J*, 1999, 13 (1): 181-189.

[7] OSHIMA Y, SHUKUNAMI C, HONDA J, NISHIDA K, TASHIRO F, MIYAZAKI J, *et al.* Expression and localization of tenomodulin, a transmembrane type chondromodulin-I-related angiogenesis inhibitor, in mouse eyes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (5): 1814-1823.

[8] DOCHEVA D, HUNZIKER E B, FASSLER R, BRANDAU O. Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25 (2): 699-705.

[9] OSHIMA Y, SATO K, TASHIRO F, MIYAZAKI J, NISHIDA K, HIRAKI Y, *et al.* Anti-angiogenic action of the C-terminal domain of tenomodulin that shares homology with chondromodulin-I [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117 (Pt 13): 2731-2744.

[10] SHUKUNAMI C, OSHIMA Y, HIRAKI Y. Chondromodulin-I and tenomodulin: a new class of tissue-specific angiogenesis inhibitors found in hypovascular connective tissues [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333 (2): 299-307.

[11] FUNAKI H, SAWAGUCHI S, YAOEDA K, KOYAMA Y, YAOITA E, FUNAKI S, *et al.* Expression and localization of angiogenic inhibitory factor, chondromodulin-I, in adult rat eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42 (6): 1193-1200.

[12] WANG W, OSHIMA Y, TANO Y. Inhibitory effect of tenomodulin protein on proliferation of vascular endothelial cells [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2010, 28 (7): 617-621.

王蔚, 大岛佑介, 田野保雄. Tenomodulin 蛋白对血管内皮细胞增殖的抑制作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2010, 28 (7): 617-621.

[13] WANG W, OSHIMA Y, TANO Y. Anti-angiogenic effect of the transmembrane protein (Tenomodulin) on retinal neovascularization in a mouse model [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2010, 28 (2): 114-118.

王蔚, 大岛佑介, 田野保雄. Tenomodulin 抑制氧诱导视网膜病变小鼠模型新生血管形成的研究[J]. *中华实验眼科杂志*, 2010, 28 (2): 114-118.

[14] ALEXANDROV V P, NAIMOV S I. A prospectus of Tenomodulin [J]. *Folia Med*, 2016, 58 (1): 19-27.

[15] BRANDAU O, MEINDL A, FASSLER R, ASZODI A. A novel gene, tendin, is strongly expressed in tendons and ligaments and shows high homology with chondromodulin-I [J]. *Dev Dyn*, 2001, 221 (1): 72-80.

[16] YAMANA K, WADA H, TAKAHASHI Y, SATO H, KASAHARA Y, KIYOKI M. Molecular cloning and characterization of CHM1L, a novel membrane molecule similar to chondromodulin-I [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280 (4): 1101-1106.

[17] WANG W, LI Z Q, SATO T, OSHIMA Y. Tenomodulin inhibits retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 15373-15386.