

引文格式:王群,姜严明,赵杰,侯宝杰,吕明,黄一飞. 血管内皮生长因子靶向抗体对大鼠角膜碱烧伤后新生血管抑制作用的研究[J]. 眼科新进展,2017,37(11):1010-1014. doi:10.13389/j.cnki.rao.2017.0256

【实验研究】

血管内皮生长因子靶向抗体对大鼠角膜碱烧伤后新生血管抑制作用的研究[△]

王群 姜严明 赵杰 侯宝杰 吕明 黄一飞

作者简介:王群,女,1984年11月出生,山东人,博士,主治医师。主要研究方向:新生血管性眼病和眼外伤。E-mail: 13911607728@139.com; ORCID:0000-0002-2517-9356
作者简介:姜严明,女,1975年9月出生,辽宁人,博士,主治医师。主要研究方向:眼表疾病和屈光。E-mail: jiangyanming@yeah.net; ORCID:0000-0002-1426-4598
注:王群和姜严明同为第一作者!

About WANG Qun: Female, born in November, 1984. E-mail: 13911607728@139.com; ORCID: 0000-0002-2517-9356

About JIANG Yan-Ming: Female, born in September, 1975. E-mail: jiangyanming@yeah.net; ORCID: 0000-0002-1426-4598

收稿日期:2017-05-16

修回日期:2017-07-20

本文编辑:盛丽娜

△基金项目:武警总医院院内课题(编号:wz2015011)

作者单位:100039 北京市,武警总医院眼科(王群,赵杰,侯宝杰); 100088 北京市,火箭军总医院眼科(姜严明); 100086 北京市,军事医学科学院(吕明); 100053 北京市,解放军总医院眼科(黄一飞)

通讯作者:黄一飞, E-mail: 301yk@sina.com; ORCID: 0000-0002-1078-2515

Received date: May 16, 2017

Accepted date: Jul 20, 2017

Foundation item: Intrahospital Project of General Hospital of CAPF (No: wz2015011)

From the Department of Ophthalmology, General Hospital of CAPF (WANG Qun, ZHAO Jie, HOU Bao-Jie), Beijing 100039, China; Department of Ophthalmology, General Hospital of PLA Rocket Force (JIANG Yan-Ming), Beijing 100088, China; Academy of Military Medical Sciences (LV Ming), Beijing 100086, China; Department of Ophthalmology, General Hospital of PLA (HUANG Yi-Fei), Beijing 100053, China

Responsible author: HUANG Yi-Fei, E-mail: 301yk@sina.com; ORCID: 0000-0002-1078-2515

Inhibitory effects of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody MIL60 on alkali-induced corneal angiogenesis in rats

WANG Qun, JIANG Yan-Ming, ZHAO Jie, HOU Bao-Jie, LV Ming, HUANG Yi-Fei

【Key words】 vascular endothelial growth factor; MIL60; corneal neovascularization; alkali cauterization

【Abstract】 Objective To investigate the efficacy of an anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody, MIL60, in inhibiting corneal neovascularization (CoNV) formation in a rat model of alkali cauterization and its involved mechanisms.

Methods Rat CoNV model induced by alkali burn was founded in the right eyes, and then 72 cases were randomly divided into four groups according to the subconjunctival administration of medicine next day after the successful establishment of this model: 25 mg · mL⁻¹ MIL60 group, dexamethasone group, MIL60 solvent group and NaCl group. Then CoNV was observed for recording the its length and the involved area using digital photograph. Next the rats were sacrificed on day 7, 14, 21 and 28, followed by the collection of rats' cornea for HE and immunohistochemical staining to analyze the protein expression of VEGF, VEGF receptor-1 (VEGFR-1), VEGFR-2 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). **Results** At each time point, the area and length of CoNV in the 25 mg · mL⁻¹ MIL60 and dexamethasone group were significantly less than those in the MIL60 solvent and NaCl group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.01$), and 25 mg · mL⁻¹ MIL60 group had the similar CoNV area and length with the dexamethasone group (all $P > 0.05$). Moreover, HE and immunohistochemical staining showed that MIL60 could inhibit the protein expression of VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 and MMP-9, which could explain its effective anti-angiogenic activity. **Conclusion** Subconjunctival administration of MIL60 can significantly inhibit corneal neovascularization formation and alleviate the inflammation in rats suffered from alkali burn.

【中图分类号】 R772.2

【关键词】 血管内皮生长因子; MIL60; 角膜新生血管; 碱烧伤

【摘要】 目的 通过对角膜碱烧伤大鼠模型结膜下注射 VEGF 靶向抗体 MIL60, 观察其对角膜新生血管 (corneal neovascularization, CoNV) 生长的影响, 初步探讨 MIL60 抑制大鼠 CoNV 生长的基本作用机制。 **方法** 建立碱烧伤诱导的 SD 大鼠 CoNV 模型 (右眼造模), 根据碱烧伤后第 1 天结膜下注射的药物不同将 72 只大鼠随机分为: 25 mg · mL⁻¹ MIL60 组、地塞米松组、MIL60 溶剂组和 NaCl 组。观察并记录 CoNV 生长情况及角膜的形态变化, 通过软件分析 CoNV 的长度及累及面积。碱烧伤后第 3 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 28 天分别处死动物, 取角膜组织行 HE 染色和免疫组织化学染色, 同时检测角膜中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、VEGF 受体-1 (VEGF receptor-1, VEGFR-1)、VEGFR-2 和基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 蛋白的表达。 **结果** 在各个时间点, 与 MIL60 溶剂组和 NaCl 组比较, 地塞米松组、25 mg · mL⁻¹ MIL60 组 CoNV 面积和长度显著减少, 差异均具有统计学意义 (均为 $P < 0.01$); 25 mg · mL⁻¹ MIL60 组的 CoNV 长度和面积与地塞米松组相当 (均为 $P > 0.05$)。同时, MIL60 还能有效降低角膜组织中 VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 以及 MMP-9 蛋白的表达。 **结论** MIL60 能显著抑制角膜碱烧伤后 CoNV 的生长, 并且还能减轻碱烧伤引起的炎症反应。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前已知的促新生血管形成相关因子中最主要的因子之一,它在新生血管发生和发展过程中都发挥着重要作用。研究发现,VEGF在角膜新生血管(corneal neovascularization, CoNV)的形成过程中也发挥重要作用^[1]。在碱烧伤诱导的CoNV动物模型中,VEGF和CoNV的发生、发展密切相关^[2]。降低VEGF的表达,能够有效抑制CoNV的生长^[3]。近10 a来,大量的动物实验和临床研究都已证实通过VEGF靶向治疗CoNV可以取得很好的疗效。我们既往的体外实验已经较全面地评价了VEGF靶向抗体MIL60的生物学特性,MIL60不仅可以与VEGF进行高特异性和亲和力的结合,还能有效抑制VEGF诱导的人脐静脉内皮细胞的增殖^[4]。本研究将进一步探讨结膜下注射MIL60对角膜碱烧伤大鼠模型CoNV的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 军事医学科学院实验动物中心提供的清洁型健康6~8周雄性SD大鼠,体质量100~200 g。实验动物及实验中所使用的各项条件均符合国家科学技术委员会的《实验动物管理条例》。

1.2 方法

1.2.1 建立大鼠CoNV模型 所有大鼠均经过眼科裂隙灯显微镜和间接眼底镜检查,排除眼部疾病。以右眼为实验眼;左眼为空白对照眼,不做处理。100 g·L⁻¹水合氯醛(3.5 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉大鼠。奥布卡因滴眼液滴眼3次表面麻醉。开睑器开右眼睑,用棉签去除结膜囊内多余液体。将直径3 mm的圆形Whatman 3号滤纸用10 μL 1 mol·L⁻¹的NaOH溶液浸泡30 s,然后放置于角膜中央40 s,随即用40 mL 9 g·L⁻¹ NaCl冲洗角膜和结膜囊60 s。处理后可见大鼠角膜中央形成边界清楚的圆形白色烧伤区域。最后结膜囊涂红霉素眼膏预防感染。

1.2.2 造模成功的评定标准 碱烧伤后第1天,裂隙灯显微镜下观察到大鼠的角膜缘血管充盈扩张,中央角膜可见灰白色圆形烧伤区,烧伤区角膜水肿、混浊,隐约可见虹膜,即可确认为中度碱烧伤模型造模成功。如果在实验过程中发生角膜感染或角膜穿孔,则被剔除,及时补充大鼠,重新造模。

1.2.3 动物分组及处理 根据随机数字表法,在碱烧伤后第1天,将72只造模成功的大鼠随机分为4组:MIL60溶剂组、25 mg·mL⁻¹ MIL60组、地塞米松组和NaCl组,分别给予一次性结膜下注射0.05 mL MIL60溶剂、25 mg·mL⁻¹ MIL60、50 mg·mL⁻¹地塞米松和9 g·L⁻¹ NaCl,每组各18只。

1.2.4 CoNV的观察和记录 分别在碱烧伤后第3天、第7天、第14天、第21天和第28天通过裂隙灯显微镜观察并照相,记录大鼠角膜病变进展情况。通过计算机软件进行CoNV的长度和生长面积分

析。CoNV生长面积按公式 $S = C/12 \times 3.14 \times [r^2 - (r-l)^2]$ 计算。其中C代表角膜新生血管累及角膜的圆周钟点数,r为大鼠角膜半径,l为CoNV从角膜缘生长入角膜的长度。

1.3 标本的取材和处理

1.3.1 组织病理标本的制作与观察 分别在碱烧伤后第3天、第7天、第14天、第21天和第28天每组各处死3只大鼠,取大鼠患眼角膜组织,放置于40 g·L⁻¹多聚甲醛溶液中固定。取第14天角膜组织行HE染色及免疫组织化学染色。

1.3.2 免疫组织化学染色 对碱烧伤后第14天角膜组织行免疫组织化学染色。VEGF一抗(Santa Cruz,美国),MMP-9一抗、VEGF受体-1(VEGF receptor-1, VEGFR-1; Abcam,美国),VEGFR-2(LifeSpan BioSciences,美国),二抗(EMD Millipore,美国)。免疫组织化学染色结果的判定:VEGF在细胞浆内表达,其阳性反应呈黄色或棕黄色。VEGFR-1、VEGFR-2表达阳性以细胞质或细胞膜中出现棕黄色颗粒为判定标准。基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)以细胞浆和(或)细胞膜中出现棕色或者黄色颗粒为表达阳性。

1.4 统计学分析 使用IBM SPSS(IBM SPSS,芝加哥,IL)软件进行数据统计学分析。实验中的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示;多组间数据比较采用完全随机设计资料和随机区组资料的方差分析;多个样本均数间每两个均数比较应用SNK-q检验。两组比较应用t检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 裂隙灯显微镜观察和软件分析结果 碱烧伤后第1天,裂隙灯下见大鼠右眼结膜混合充血,中央烧伤区的角膜灰白水肿,角膜缘血管网明显扩张,但未见有新生血管生长(图1-2)。分组处理后,在碱烧伤后第3天,裂隙灯下见大鼠角巩膜缘血管扩张较前明显加重,局部可发现新生血管芽自角巩膜缘血管环处长出,已侵入透明角膜,但各处理组的CoNV生长范围并不均匀,血管长度也不相同;与NaCl组和MIL60溶剂组比较,地塞米松组、25 mg·mL⁻¹ MIL60组的CoNV长度和侵入面积明显减少,差异均具有统计学意义(均为 $P < 0.01$),但NaCl组和MIL60溶剂组之间、地塞米松组和25 mg·mL⁻¹ MIL60组之间的差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。碱烧伤后第7天,大鼠CoNV生长迅速,明显变长,且新生血管的顶端分叉更加明显,血管浓密,部分血管交织成网状,已侵入透明角膜的新生血管继续向中央生长延伸,累及角膜的范围变大;各组之间的CoNV密度和管径有明显差异。NaCl组和MIL60溶剂组的CoNV扩张明显,血管浓密且生长较快,累及角膜范围大;25 mg·mL⁻¹ MIL60组的

CoNV 在形态上明显较地塞米松组生长稀疏,管径较小,而且刚刚开始出现血管顶端的分叉现象; $25\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MIL60 组和地塞米松组的 CoNV 长度和累及面积明显少于 NaCl 组和 MIL60 溶剂组(均为 $P < 0.01$),NaCl 组和 MIL60 溶剂组之间以及地塞米松组与 $25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MIL60 组之间 CoNV 长度和面积差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。碱烧伤后第 14 天,裂隙灯下见 CoNV 呈垂柳状从四周向中心生长,生长速度明显减慢;地塞米松组和 $25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

MIL60 组 CoNV 长度和累及面积仍明显少于 NaCl 组和 MIL60 溶剂组,差异均具有统计学意义(均为 $P < 0.01$)。碱烧伤后第 21 天和第 28 天,各组仍有部分 CoNV 继续生长,但生长缓慢,部分原来粗大的 CoNV 管径开始变细;分别与 NaCl 组和 MIL60 溶剂组比较,地塞米松组和 $25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MIL60 组 CoNV 长度和累及面积明显减少,差异均具有统计学意义(均为 $P < 0.01$),同时,地塞米松组与 $25\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MIL60 组比较,差异亦具有统计学意义($P < 0.05$;见图 1-图 3)。

图 1 碱烧伤后大鼠 CoNV 的生长情况,黑色虚线表示 CoNV 的边界。图 2 碱烧伤后各个时间点大鼠 CoNV 的长度。与 MIL60 溶剂组和 NaCl 组相比, ** $P < 0.01$ 。图 3 碱烧伤后各个时间点大鼠 CoNV 的累及面积。与 MIL60 溶剂组和 NaCl 组相比, ** $P < 0.01$

2.2 角膜组织的 HE 染色结果 碱烧伤后第 14 天 HE 染色结果示,NaCl 组和 MIL60 溶剂组大鼠角膜仍有水肿,角膜上皮层增厚,但相对完整;角膜基质层的胶原纤维排列疏松紊乱,角膜上皮层和基质层及内皮细胞层皆可见炎症细胞浸润;角膜上皮下和基质层可见大量新生血管,血管管腔直径较大,管腔内可见成熟红细胞。与 NaCl 组和 MIL60 溶剂组比较,地塞米松组和 $25\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MIL60 组角膜基质新生血管数量明显减少,管径较小(图 4)。

图 4 角膜组织 HE 染色结果(箭头示 CoNV,其内部分可见成熟红细胞)。A:NaCl 组;B:MIL60 溶剂组;C: $25\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MIL60 组;D:地塞米松组

2.3 角膜组织的免疫组织化学染色结果

2.3.1 CoNV 密度 碱烧伤后第 14 天免疫组织化学染色结果示,与 NaCl 组和 MIL60 溶剂组相比较,地塞米松组和 $25\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MIL60 组的 CoNV 密度明显较低(图 5)。说明 MIL60 和地塞米松均能有效抑制 CoNV 的生长。

图 5 碱烧伤后第 14 天角膜组织的免疫组织化学染色示 CoNV 密度。A:NaCl 组;B:MIL60 溶剂组;C: $25\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MIL60 组;D:地塞米松组

2.3.2 各因子蛋白表达 在正常大鼠角膜中 VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 和 MMP-9 微量表达或者不表达。碱烧伤后角膜组织中 VEGF 表达明显增多。碱烧伤后第 14 天免疫组织化学染色结果示:NaCl 组和 MIL60 溶剂组的角膜全层都可见 VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 和 MMP-9 阳性表达,尤其在角膜基质新生血管附近细胞的细胞浆中和浅基质层附近呈弥漫性强阳性表达。与 NaCl 组和 MIL60 溶剂组比较,地塞米松组和 $25\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MIL60 组上述因子的蛋白表达明显减弱(图 6-图 9)。

3 讨论

CoNV 的发病机制有多种学说,最主要的有低氧诱导学说、炎症学说和血管形成相关因子失衡学说等^[5-7]。其中血管形成相关因子失衡学说是目前研究的热点。CoNV 的形成是一个复杂的生物学过程,

图6 碱烧伤后第14天各组 VEGF 蛋白表达($\times 20$)。A:NaCl 组;B:MIL60 溶剂组;C:25 mg \cdot mL⁻¹ MIL60 组;D:地塞米松组。**图7** 碱烧伤后第14天各组 VEGFR-1 蛋白表达($\times 20$)。A:NaCl 组;B:MIL60 溶剂组;C:25 mg \cdot mL⁻¹ MIL60 组;D:地塞米松组。**图8** 碱烧伤后第14天各组 VEGFR-2 的蛋白表达($\times 20$)。A:NaCl 组;B:MIL60 溶剂组;C:25 mg \cdot mL⁻¹ MIL60 组;D:地塞米松组。**图9** 碱烧伤后第14天各组 MMP-9 的蛋白表达($\times 20$)。A:NaCl 组;B:MIL60 溶剂组;C:25 mg \cdot mL⁻¹ MIL60 组;D:地塞米松组

该过程包括毛细血管内皮下基底膜的降解,内皮细胞增殖、迁移、管状形成和新的血管基底膜的形成等^[8],大量的血管形成相关因子、细胞外基质和炎症因子等参与其中。VEGF 作为目前研究发现的最重要的促血管形成因子,在 CoNV 的形成过程中发挥重要作用。本研究主要探讨了 VEGF 靶向抗体 MIL60 对碱烧伤诱导的大鼠 CoNV 的抑制作用。

通过碱烧伤诱导 CoNV 形成的动物模型已被广泛应用于 CoNV 发生机制的研究中。本研究的结果显示,在碱烧伤后第3-7天,大鼠 CoNV 处于初生期,生长相对缓慢,但第7-14天 CoNV 的生长速度明显加快,累及的面积也显著增加,并在第21天达到高峰。在碱烧伤后第21-28天,CoNV 进入生长晚期,生长速度明显减慢,而且部分 CoNV 的管径开始变细,尤其是一些小的 CoNV 开始萎缩,这可能与碱烧伤后不同阶段角膜组织内 VEGF 的含量发生改变有密切的关系。同时我们还发现,在各个观察时间点 25 mg \cdot mL⁻¹ MIL60 组的 CoNV 长度和累及面积均明显小于 NaCl 组和 MIL60 溶剂组。免疫组织化学染色结果也证实,碱烧伤后第14天 25 mg \cdot mL⁻¹ MIL60 组角膜组织中 VEGF 的蛋白表达水平明显低于上述两个对照组。这与 MIL60 能与 VEGF 直接结合,从而降低了游离 VEGF 的含量,阻止 VEGF 与血管内皮细胞表面的 VEGF 受体结合,进而抑制下游信号通路,达到抑制 CoNV 的形成有密切的关系。

VEGF 的生理学效应是通过与内皮细胞上两个酪氨酸激酶受体 VEGFR-2 和 VEGFR-1 高亲和力的结合来实现的。VEGF 通过与血管内皮细胞表面的 VEGFR-2 受体结合激活下游信号,促进新生血管的形成;而目前对于 VEGF 和 VEGFR-1 结合后的具体作用尚不是很清楚^[9]。有研究发现,VEGFR-1 和 VEGF 的亲合力是 VEGF 和 VEGFR-2 亲和力的 10 倍,曾被认为是抗血管形成因子^[10],但近几年研究发现,VEGFR-1 具有促血管生长作用,它可以显著促进内皮细胞的迁移和血管形成。Kappas 等^[11]发现

VEGFR-1 不仅参与调节 VEGFR-2 信号通路,并且可以调节血管内皮细胞的定向迁移和血管分叉的形成。还有研究发现 VEGFR-1 可能是通过激活 PLC γ 和 PI3K 的酪氨酸磷酸化来放大 VEGF 引起的促血管形成反应^[12]。Lee 等^[13]发现 PTK7 可能在 VEGFR-1 引起的促血管形成信号传递过程中发挥重要作用。本研究中我们发现,VEGFR-1 和 VEGFR-2 与 VEGF 的表达具有很强的一致性,这也证实了 VEGF 的两种受体在血管发育过程中及血管通透性的调节中发挥着协调作用^[14-15]。同时我们还发现,MIL60 不仅能显著抑制 CoNV 生成过程中 VEGF 蛋白的表达,还能抑制 VEGFR-1 和 VEGFR-2 蛋白的表达。免疫组织化学的结果表明,VEGFR-1、VEGFR-2 和 VEGF 蛋白表达的部位基本一致。碱烧伤后第14天,25 mg \cdot mL⁻¹ MIL60 组的 VEGF、VEGFR-1 和 VEGFR-2 蛋白表达均显著低于对照组。这说明 MIL60 不仅能中和 VEGF,而且还能下调 VEGFR 的表达,从而进一步降低 VEGF 与 VEGFR 结合反应的发生,减少 VEGF 和 VEGFR 结合后信号转导和效应蛋白的合成,最终抑制 CoNV 的形成。

在 CoNV 的形成过程中,除了内皮细胞增殖,其他重要的步骤是细胞外基质和基底膜的降解,以及管状形成后基底膜的二次形成。在新生血管形成过程中,内皮细胞要穿过细胞外基质和基质外纤维支架,而细胞外基质的降解要依赖纤溶酶原-纤溶酶系统、组织蛋白酶和 MMPs 等的作用,其中 MMPs 发挥主要作用。MMPs 是肽链内切酶家族,可以由多种细胞分泌;激活的 MMPs 能对细胞外基质中不同分子结构的成分进行降解。MMPs 常以无活性酶原形式存在于正常角膜组织中,在化学、物理和各种不同病理情况下 MMPs 均可以被激活。发生角膜病变的过程中,角膜细胞分泌的蛋白水解酶中有 95% 以上是 MMPs^[16]。通常情况下,组织内的 MMPs 及其抑制剂能够保持相对平衡状态,但在病理状态下,如 CoNV 形成过程中,细胞外基质被过度破坏,该平衡就被打

破, MMPs 表达增加, 从而发挥重要作用^[17]。MMP-9 作为参与调节 CoNV 形成过程中的主要因子之一, 其通过调节角膜细胞外基质来影响细胞和细胞之间、细胞和基质之间的信号传递, 从而调节细胞分化、黏附、迁移、损伤修复和组织重塑, 促进 CoNV 的生成。Cejka 等^[18]在间充质干细胞治疗兔角膜碱烧伤的研究中发现, 干细胞可以有效降低 MMP-9 和 VEGF 的表达, 二者表达存在一定协同性。同时, MMP-9 与 VEGF 之间也存在协同作用, 即 MMP-9 能促进 VEGF 的释放, 而 VEGF 也能促进血管内皮细胞分泌 MMP-9^[19-21]。借助活化巨噬细胞来诱导 CoNV 生成的研究中发现 VEGF 和 MMP-9 均明显上调^[13]。将成纤维细胞生长因子-2 缓释药片植入鼠板层角膜诱发 CoNV 的研究中, 不仅发现 MMP-9 的表达增加, 而且 MMP-9 的增加程度与新生血管的生长程度一致。抑制 MMP-9 的活性, 可以减小 MMP-9 降解细胞外基质的作用从而降低新生血管的发生率^[22]。在本研究中, 我们发现碱烧伤后第 3 天 MMP-9 表达最强, 给予 MIL60 治疗后 MMP-9 的表达水平明显低于对照组。

综上所述, 本研究证实 MIL60 能有效抑制角膜碱烧伤后 CoNV 的形成并减轻炎症反应。其早期的抗 CoNV 形成效果和抗炎作用与地塞米松相当, 有望成为抗 CoNV 治疗过程中的一种新的选择。但最佳的给药途径和给药剂量等问题仍有待于进一步研究。

参考文献

- [1] PHILIP PW, SPEICHER L, HUMPEL C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 41(9):2514-2522.
- [2] 周兰新, 李立, 鄢秀菊. 奥曲肽抑制角膜新生血管形成的实验研究[J]. *眼科新进展*, 2006, 26(9):674-677.
ZHOU LX, LI L, YAN XJ. Octreotide inhibits corneal neovascularization induced by alkali burn[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2006, 26(9):674-677.
- [3] 李宇, 邓应平, 张明, 唐静, 孟丹. KH902 抑制大鼠角膜新生血管的实验研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2013, 44(1):64-67.
LI Y, DENG YP, ZHANG M, TANG J, MENG D. Experimental research of KH902 inhibition of corneal neovascularization in rats[J]. *J Sichuan Univ(Med Sci Edit)*, 2013, 44(1):64-67.
- [4] YANG J, WANG Q, QIAO C, LIN Z, LI X, HUANG Y, et al. Potent anti-angiogenesis and anti-tumor activity of a novel human anti-VEGF antibody, MIL60[J]. *Cell Mol Immunol*, 2014, 11(3):285-293.
- [5] LU P, LI L, LIU G, VAN ROOIJEN N, MUKAIDA N, ZHANG X. Opposite roles of CCR2 and CX3CR1 macrophages in alkali-induced corneal neovascularization[J]. *Cornea*, 2009, 28(5):562-569.
- [6] SIMPSON DA, MURPHY GM, BHADURI T, GARDINER TA, ARCHER DB, STITT AW. Expression of the VEGF gene family during retinal vaso-obliteration and hypoxia[J]. *Biochem*

- Biophys Res Commun*, 1999, 262(2):333-340.
- [7] ZHANG SX, MA JX. Ocular neovascularization; Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2007, 26(1):1-37.
- [8] DETAMR M. Molecular regulation of angiogenesis in the skin[J]. *Invest Dermatol*, 1996, 106:207-208.
- [9] ORMEROD LD, ABELSON MB, KENYON KR. Standard models of corneal injury using alkali-immersed filter discs[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1988, 20(10):2148-2153.
- [10] FERRARA N, GERBER HP, LECOUTER J. The biology of VEGF and its receptors[J]. *Nat Med*, 2003, 9(6):669-676.
- [11] KAPPAS NC, ZENG G, CHAPPELL JC, KEARNEY JB, HAZARIKA S, KALLIANOS KG, et al. The VEGF receptor Flt-1 spatially modulates Flk-1 signaling and blood vessel branching[J]. *J Cell Biol*, 2008, 181(5):847-858.
- [12] BANERJEE S, MEHTA S, HAQUE I, SENGUPTA K, DHAR K, KAMBHAMPATI S, et al. VEGF-A165 induces human aortic smooth muscle cell migration by activating neopilin-1-VEGFR1-PI3K axis[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(11):3345-3351.
- [13] LEE HK, CHAUHAN SK, KAY E, DANA R. Flt-1 regulates vascular endothelial cell migration via a protein tyrosine kinase-7-dependent pathway[J]. *Blood*, 2011, 117(21):5762-5771.
- [14] KANNO S, ODA N, ABE M, TERA I Y, ITO M, SHITARA K, et al. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells[J]. *Oncogene*, 2000, 19(12):2138-2146.
- [15] BREKKEN RA, OVERHOLSER JP, STASTNY VA, WALTEBERGER J, MINNA JD, THORPE PE. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice[J]. *Cancer Res*, 2000, 60:5117-5124.
- [16] ZHANG EP, MULLER A, SCHULTE F, KÖNIG MS, SACK F, JUNG HANS C, et al. Minimizing side effects of ballistic gene transfer into the murine corneal epithelium[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2002, 240:114-119.
- [17] 于晓晖, 郝敏, 康凤英. 基质金属蛋白酶抑制剂在角膜疾病中的应用[J]. *国际眼科纵览*, 2006, 30(1):54-57.
YU XH, HAO M, KANG FY. The application of matrix metalloproteinase inhibitors in the corneal diseases[J]. *Int Rev Ophthalmol*, 2006, 30(1):54-57.
- [18] CEJKA C, HOLAN V, TROSAN P, ZAJICOVA A, JAVORKOVA E, CEJKOVA J. The favorable effect of mesenchymal stem cell treatment on the antioxidant protective mechanism in the corneal epithelium and renewal of corneal optical properties changed after alkali burns[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016:5843809.
- [19] DERYUGINA EI. Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(2):580-588.
- [20] BELOTTI D, PAGANONI P, MANENTI L. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells; implications for ascites formation[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(17):5224-5229.
- [21] BERGERS G, BREKKEN R, MCMAHON G, VU TH, ITOH T, TAMAKI K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(10):737-744.
- [22] MOHAN R, SIVAK J, ASHTON P, RUSSO LA, PHAM BQ, KASAHARA N, et al. Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(14):10405-10412.