

# 角膜新生血管的显影方法

许多<sup>1,2</sup>,何宇茜<sup>1</sup>,王瑞卿<sup>1</sup>,李富强<sup>1</sup>,姚博远<sup>1,2</sup>,张妍<sup>1</sup>

引用:许多,何宇茜,王瑞卿,等.角膜新生血管的显影方法.国际眼科杂志 2019;19(8):1330-1333

基金项目:吉林省科技厅自然科学基金(No.20180101146JC);吉林省科技发展计划项目(No.20160520153JH)

作者单位:<sup>1</sup>(130041)中国吉林省长春市,吉林大学第二医院眼科;<sup>2</sup>(130021)中国吉林省长春市,吉林大学白求恩医学部

作者简介:许多,在读本科,研究方向:角膜新生血管。

通讯作者:张妍,博士,主任医师,研究方向:眼表疾病.zhangy66@jlu.edu.cn

收稿日期:2018-12-14 修回日期:2019-07-04

## 摘要

角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)的产生是角膜盲的常见原因,但到目前为止,还没有十分有效的治疗方法。CNV面积这一参数在衡量药物或治疗方案效果好坏时具有重要参考价值。目前有多种方法可对CNV进行显影,包括墨汁灌注、免疫荧光染色等,近年来的光学相干断层成像技术等也是极有潜力的新方法。本文综述了显影CNV的相关方法,希望能对CNV的研究提供参考。

关键词:角膜新生血管;显影;免疫组织化学技术;内皮细胞标志物;灌注显像

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.8.15

## Imaging methods of corneal neovascularization

Duo Xu<sup>1,2</sup>, Yu-Xi He<sup>1</sup>, Rui-Qing Wang<sup>1</sup>, Fu-Qiang Li<sup>1</sup>, Bo-Yuan Yao<sup>1,2</sup>, Yan Zhang<sup>1</sup>

Foundation items: Jilin Province Science and Technology Department (No. 20180101146JC); Jilin Province Science and Technology Development Project (No.20160520153JH)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, Jilin Province, China; <sup>2</sup>Norman Bethune Health Science Center of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Correspondence to: Yan Zhang, Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, Jilin Province, China. zhangy66@jlu.edu.cn

Received: 2018-12-14 Accepted: 2019-07-04

## Abstract

• Corneal neovascularization (CNV) is a common cause of corneal diseases, but there is still no effective drug or treatment. At present, the common methods cannot inhibit the growth of CNV completely, cannot last for a long the therapeutic effect time, and there are also serious side effects, so the specific treatment of CNV

inhibition is still being explored. The pathogenesis and treatment of CNV are the current research hotspots. CNV area is an important indicator to evaluate the efficacy of drugs and treatment regimens. There are multiple methods to develop CNV, including ink perfusion, immunofluorescence staining and so on, in recent years, optical coherence tomography (OCT) technology is also a potential new method. This article reviews the developing methods of CNV, hopes to provide a reference for the study of CNV.

• KEYWORDS: corneal neovascularization; imaging; immunohistochemistry; endothelial cell markers; perfusion imaging

Citation: Xu D, He YX, Wang RQ, et al. Imaging methods of corneal neovascularization. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(8):1330-1333

## 0 引言

生理条件下,角膜是不含血管和淋巴的透明介质,因此被免疫系统忽略而处于“免疫赦免”的状态。但在病理条件下,角膜缘的血管向角膜内延伸,角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)因此形成。目前常见的方法,如激素治疗<sup>[1]</sup>、细针透热<sup>[2]</sup>、光动力疗法<sup>[3]</sup>等,只能在一定程度上抑制CNV的生长,作用时间短,并伴有副作用,因此对CNV特异性抑制的治疗方法还在不断探索。CNV会引起视力下降、视物模糊,甚至失明<sup>[4]</sup>,在探索药物疗效的研究中,CNV的面积是衡量药物或者治疗方案效果好坏的重要参考,CNV高效清晰的显影对研究也有重大价值。目前针对CNV的显影方法有显影剂造影、免疫组织化学法、光学相干断层成像技术(optical coherence tomography, OCT)等。本文就CNV的显影方法进行综述,分析每一种显影方法的优缺点,希望对后续的研究起到一定的参考作用。

## 1 显影剂造影

用显影剂对CNV造影可以实时快速地成像,具有操作简单、易于观察等优点。造影后的图像使用荧光显微镜技术进行观察,但是荧光显微镜得到的图像质量不高,分辨率较低。随着技术的发展,激光共聚焦技术<sup>[5]</sup>显著地提高了分辨率,并且能对切片进行三维成像。

1.1 荧光素钠 荧光素钠(fluorescein sodium)分子式为C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>,分子量为332D。利用荧光素钠对CNV造影是经典方法之一<sup>[6]</sup>,将荧光素钠注入静脉,或者从左心室灌注,荧光素钠随着血液流入血管,使CNV清晰可见<sup>[7]</sup>。荧光素钠被蓝光激发时显示出黄绿色光。由于它不参与机体代谢,因此该方法具有毒性低、不良反应少等优点,现在也用于检查角膜是否破损。传统观点认为,角膜完好的地方不着色而仅在损伤处染色,但有趣的是,在Bandamwar

等<sup>[8]</sup>研究中发现,健康内皮细胞也可以被着色,不过破损或者衰老的细胞显示出更强烈的荧光<sup>[9]</sup>,即“中等强度背景下的超荧光”(hyper-fluorescence)。

**1.2 吖啶菁绿** 吖啶菁绿(indocyanine green)的化学式为 $C_{43}H_{47}N_2NaO_6S_2$ ,分子量为775D。同样,吖啶菁绿也能与血浆白蛋白、球蛋白等物质结合,但对血管的显示更加精细,具有轮廓清晰、定位精确等优点,目前已应用于临床,因为它可以增强眼内结构层次的对比度,从而使手术更加方便。在实际操作的时候,可以将吖啶菁绿和荧光素钠混合进行染色<sup>[2,10]</sup>。不过以上两种染色方式均为侵入性检查,需要在静脉中注射造影剂才能显影,也会在一定程度上损伤眼组织。有文献报道,吖啶菁绿对视网膜有潜在的毒性,并且渗漏的造影剂也会降低显影效果,影响最终结果的评估。

**1.3 伊文氏蓝** 伊文氏蓝(Evans blue)是一种偶氮染料<sup>[11]</sup>,分子量为960.8D,化学分子式为 $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$ ,能不可逆地结合血浆白蛋白,形成复合物。而血管内皮细胞膜上有血浆白蛋白受体,其与血浆白蛋白亲和力较强,因此可以通过灌注方法显示血管形态。复合物在白光下呈蓝色,在荧光显微镜绿光下呈鲜红色,灵敏度很高,不易淬灭,易于长期保存,但该方法不能复染<sup>[12]</sup>。

## 2 光学相干断层成像技术

裂隙灯观察 CNV 是一种常见的、十分简便的方法,能够对活体 CNV 的生长状况进行初步观察和粗略判断,在实验动物建模期间可以经常使用这种方法以观察角膜的各个部位。但涉及精细观察和准确判断时,不得不提到 OCT<sup>[13]</sup>。角膜是无色透明介质,利用相干光进行检测,光线容易进入角膜。在眼科应用该技术,可为我们提供有价值的信息。其最大的优点在于能够快速、非侵入式<sup>[14]</sup>地评估 CNV,还可以获得血流量、血管面积等重要数据。相比荧光素染色,这种无需使用造影剂的方法简单快捷、分辨率高、诊断精确,还能无创伤地追踪观察。OCT 技术于 1991 年被提出<sup>[15]</sup>,对眼科诊断有着革命性的促进作用,在未来有很大发展空间。

## 3 墨汁灌注

大鼠在深麻醉状况下,向左心室或主动脉注入生理盐水使得 CNV 褪色<sup>[16]</sup>,再注入明胶-印度墨汁-生理盐水混合成的色胶灌注新生血管<sup>[17-18]</sup>,并用液氮迅速冷却眼球或放入冰箱冷冻,分离角膜后在其周围做切口使角膜变平,此方法能非常直观地显示出血管轮廓,可用图像分析软件对血管的面积进行测量,从而获得精确的数据。从最开始易于褪色的单纯墨汁染色到现在加入明胶固定,该方法经过多年改进日趋完善,有价格低廉、操作简便、重复性高等优点。但是其显影效果受到灌注方法、温度、压强等因素影响,并且一些细小的血管可能没有灌注完全,适用于批量处理死亡的实验动物。

## 4 免疫组织化学染色

虽然 HE 染色方法在过去几十年里得到了广泛的应用,能在一定程度上对 CNV 进行基础的观察,但是难以满足对研究的精细测量需求。而免疫组织化学染色具有高灵敏度、强特异性和准确定位的优势,能对 CNV 情况进行定性定量的观察。目前,显示血管内皮细胞的抗体种类繁多<sup>[19]</sup>,较为常用的主要抗体有 CD31、CD34、VIII 因子等,然而它们并未完全显示所有微血管,并且在不同文献中报道的标记范围和标记效应存在差异<sup>[20-22]</sup>。

**4.1 血管内皮生长因子** 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)能够刺激血管的增生,促进血管内皮细胞生成,并在 CNV 内皮细胞中强烈表达。已经有研究表明<sup>[23-25]</sup>,VEGF 在 CNV 中可以被免疫组织化学染色法检查出来,可见血管的管腔样结构,阳性组织中可见棕黄色颗粒,但部分炎性细胞也呈阳性。

**4.2 CD31** 微血管的标记和血管密度的测量也可利用 CD31 进行显影<sup>[26]</sup>。CD31 是血小板内皮细胞黏附分子,它可以在新生成的以及正常组织的血管内皮细胞中表达,是常见的标记物。血管内皮出现棕色颗粒作为阳性染色标准。与 VIII 因子比较,其能更清楚地显示微小的新生血管<sup>[27-28]</sup>。但是 CD31 特异性并不是很高,也会对组织中的基质细胞等染色,影响实验结果。

**4.3 CD34** CD34 是由糖蛋白组成的抗原,在多种细胞表面均可表达,包括基质细胞、上皮细胞、造血细胞和内皮细胞。它不仅在微血管内皮细胞中表达,而且在正常血管甚至大血管中表达。因此抗 CD34 染色能较为理想地显示微小的、新生的、不成熟的血管和原先存在的大血管<sup>[29]</sup>。CD34 是内皮细胞分化的高度敏感性标志物,抗 CD34 对新生内皮染色较正常内皮细胞更深。CD34 具有背景染色清晰、轮廓明显、对比度高等优点,其被认为是重复性最理想的内皮标记物<sup>[30]</sup>。

**4.4 CD105** CD105 相比于 CD34 和 CD31,其更为稳定,也有更高的特异性,但 CD34 和 CD31 对正常微血管系统染色效果较好<sup>[31]</sup>。CD105 对成熟血管具有弱亲和力,通常低表达或无表达,但在增殖的内皮细胞中高度表达。因此,它被认为是血管生成的可靠标志物<sup>[32]</sup>。研究表明,CD105 是染色新生血管的理想选择,但不适用于正常的微血管反应<sup>[33]</sup>。

**4.5 VIII 因子** VIII 因子是一种正常组织血管内皮细胞中非常重要的凝血蛋白,参与体内血液凝固,常用来标记新生的血管内皮<sup>[34-35]</sup>。Jason 等研究中发现,CNV 内皮细胞能产生 VIII 因子,并且染色效果良好<sup>[36-37]</sup>。

**4.6 Weibel-Palade 小体** Weibel-Palade 小体(Weibel-Palade body, WPB)是内皮细胞的细胞器,对正常止血和炎症反应至关重要。它的主要成分蛋白是血管性血友病因子<sup>[38]</sup>(Von Willebrand, vWF),vWF 是一种多聚体蛋白,能参与凝血,在内皮细胞、血小板和巨核细胞中表达。

**4.7 JG-12 染色** JG-12 仅由血管内皮细胞合成,是一种小鼠抗大鼠氨肽酶 P 的单克隆抗体,能高效地检测和定位血管内皮<sup>[39-41]</sup>,从而特异性标记 CNV,毛细血管内皮胞浆内可见棕黄色颗粒。

**4.8 Ki67** Ki67 是一种核内蛋白质,与细胞有丝分裂关系密切,在除 G<sub>0</sub>期外的细胞周期所有阶段均有表达,现在已经成为一种被广泛使用的增殖标记,因此可以使用 Ki67 免疫组织化学来检测 CNV 内皮细胞增殖情况<sup>[42-43]</sup>,在阳性细胞的细胞核中可见棕黄色颗粒。

**4.9 巢蛋白** 巢蛋白(nestin)定位于胞质,是一种中间丝蛋白,参与细胞骨架重构<sup>[44-45]</sup>。组织成熟时,巢蛋白的表达被终止。因此巢蛋白能表达于新生的以及不成熟的小血管。对于 CNV 的显影,因为抗巢蛋白的抗体能特异性识别,所以使用巢蛋白抗体标记也是不错的选择。

## 5 展望

CNV 显影的方法很多,其精细程度也不同。粗略观察可以使用裂隙灯、HE 染色等方法,而精细观察可以选

择免疫荧光染色或者光学相干断层扫描血管造影。相信随着科技的发展,显影方法也会不断进步,敏感性更好、特异性更高的标志物也会不断被发现,OCT的分辨率和穿透力也会得到进一步的提升。目前还没有能全面显示所有CNV的特异性标志物,本文所列举的方法大多也同样适用于其它新生血管。是否存在能够特异性识别CNV的内皮细胞的标志物,各种染色方法联合应用效果如何,怎样才能让CNV尽可能多地显影,这些问题值得进一步的研究。

#### 参考文献

- 1 Belghmaidi S, Hajji I, Ennassiri W, et al. Management of corneal neovascularization prior to corneal transplantation: Report of 112 cases. *J Fr Ophthalmol* 2016;39(6):515-520
- 2 Romano V, Steger B, Brunner M, et al. Method for Angiographically Guided Fine - Needle Diathermy in the Treatment of Corneal Neovascularization. *Cornea* 2016;35(7):1029-1032
- 3 Kim RY, Chung SK, Kim MS, et al. Effects of Combined Photodynamic Therapy and Topical Bevacizumab Treatment on Corneal Neovascularization in Rabbits. *Cornea* 2016;35(12):1615-1620
- 4 Wu H, Dai X, Li H, et al. Effect of minocycline on vascular proliferation after corneal alkaline burn: A mechanism study. *Cancer Biomark* 2017[Epub ahead of print]
- 5 Thompson DS, Henriquez MF, Scime EE, et al. Confocal laser induced fluorescence with comparable spatial localization to the conventional method. *Rev Sci Instrum* 2017;88(10):103506
- 6 Kotsolis AI, Killian FA, Ladas ID, et al. Fluorescein angiography and optical coherence tomography concordance for choroidal neovascularisation in multifocal choroiditis. *Br J Ophthalmol* 2010;94(11):1506-1508
- 7 Nagai N, Ju M, Izumi-Nagai K, et al. Novel CCR3 Antagonists Are Effective Mono- and Combination Inhibitors of Choroidal Neovascular Growth and Vascular Permeability. *Am J Pathol* 2015;185(9):2534-2549
- 8 Bandamwar KL, Papas EB, Garrett Q. Fluorescein staining and physiological state of corneal epithelial cells. *Cont Lens Anterior Eye* 2014;37(3):213-223
- 9 Glasgow BJ. Fluorescence lifetime imaging microscopy reveals quenching of fluorescein within corneal epithelium. *Exp Eye Res* 2016;147:12-19
- 10 Agrawal RV, Biswas J, Gunasekaran D. Indocyanine green angiography in posterior uveitis. *Indian J Ophthalmol* 2013;61(4):148-159
- 11 Qiu F, Matlock G, Chen Q, et al. Therapeutic Effects of PPARalpha Agonist on Ocular Neovascularization in Models Recapitulating Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(12):5065-5075
- 12 Zhao W, Guo MX, Xiang DM, et al. Effects of pericytes on the leakage of rat corneal neovascularization. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2013;93(27):2164-2166
- 13 Albert DM, Neekhra A, Wang S, et al. Development of Choroidal Neovascularization in rats with Advanced Intense Cyclic Light-induced Retinal Degeneration. *Arch Ophthalmol* 2010;128(2):212-222
- 14 Ang M, Cai Y, Shahipasand S, et al. En face optical coherence tomography angiography for corneal neovascularisation. *Br J Ophthalmol* 2016;100(5):616-621
- 15 Huang D, Swanson EA, Lin CP, et al. Optical coherence tomography. *Science* 1991;254(5035):1178-1181
- 16 Wang H, Wang Y, Xue C, et al. Angiogenesis in tissue-engineered nerves evaluated objectively using MICROFIL perfusion and micro-CT scanning. *Neural Regen Res* 2016;11(1):168-173

- 17 Xue S, Gong H, Jiang T, et al. Indian-Ink Perfusion Based Method for Reconstructing Continuous Vascular Networks in Whole Mouse Brain. *PLoS One* 2014;9(1):10
- 18 Feinberg RN, Noden DM. Experimental analysis of blood vessel development in the avian wing bud. *Anat Rec* 1991;231(1):136-144
- 19 Basilio-de-Oliveira RP, Pannain VL. Prognostic angiogenic markers (endoglin, VEGF, CD31) and tumor cell proliferation (Ki67) for gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2015;21(22):6924-6930
- 20 Afshar Moghaddam N, Mahsuni P, Taheri D. Evaluation of Endoglin as an Angiogenesis Marker in Glioblastoma. *Iran J Pathol* 2015;10(2):89-96
- 21 Weijer R, Broekgaarden M, Krekorian M, et al. Inhibition of hypoxia inducible factor 1 and topoisomerase with acriflavine sensitizes perihilar cholangiocarcinomas to photodynamic therapy. *Oncotarget* 2016;7(3):3341-3356
- 22 Polley MYC, Leung SCY, McShane LM, et al. An International Ki67 Reproducibility Study. *J Natl Cancer Inst* 2013;105(24):1897-1906
- 23 Kim EK, Kong SJ, Chung SK. Comparative study of ranibizumab and bevacizumab on corneal neovascularization in rabbits. *Cornea* 2014;33(1):60-64
- 24 Badescu A, Georgescu CV, Vere CC, et al. Correlations between Her2 oncoprotein, VEGF expression, MVD and clinicopathological parameters in gastric cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2012;53(4):997-1005
- 25 Friedlander LT, Hussani H, Cullinan MP, et al. VEGF and VEGFR2 in dentigerous cysts associated with impacted third molars. *Pathology* 2015;47(5):446-451
- 26 Desch A, Strozyk EA, Bauer AT, et al. Highly invasive melanoma cells activate the vascular endothelium via an MMP - 2/integrin alphavbeta5-induced secretion of VEGF-A. *Am J Pathol* 2012;181(2):693-705
- 27 Bertz S, Abee C, Schwarz-Furlan S, et al. Increased angiogenesis and FGFR protein expression indicate a favourable prognosis in bladder cancer. *Virchows Arch* 2014;465(6):687-695
- 28 Uras N, Oguz SS, Zergeroglu S, et al. CD31 and Factor VIII in angiogenesis of normal and pre-eclamptic human placentas. *J Obstet Gynaecol* 2012;32(6):533-536
- 29 Miyata Y, Mitsunari K, Asai A, et al. Pathological significance and prognostic role of microvessel density, evaluated using CD31, CD34, and CD105 in prostate cancer patients after radical prostatectomy with neoadjuvant therapy. *Prostate* 2015;75(1):84-91
- 30 Deliu IC, Neagoe CD, Bezna M, et al. Correlations between endothelial cell markers CD31, CD34 and CD105 in colorectal carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2016;57(3):1025-1030
- 31 Litwiniuk M, Niemczyk K, Niderla - Bielinska J, et al. Soluble Endoglin (CD105) Serum Level as a Potential Marker in the Management of Head and Neck Paragangliomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2017;126(10):717-721
- 32 Mineo TC, Ambrogi V, Baldi A, et al. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2004;57(6):591-597
- 33 Miyata Y, Sagara Y, Watanabe S, et al. CD105 is a more appropriate marker for evaluating angiogenesis in urothelial cancer of the upper urinary tract than CD31 or CD34. *Virchows Arch* 2013;463(5):673-679
- 34 Ota S, Yamada N, Ogihara Y, et al. High plasma level of factor VIII: an important risk factor for venous thromboembolism. *Circ J* 2011;75(6):1472-1475

- 35 Akdur NC, Donmez M, Gozel S, *et al.* Intravascular papillary endothelial hyperplasia: histomorphological and immunohistochemical features. *Diagn Pathol* 2013;8:167
- 36 Lim JC, Ko KI, Mattos M, *et al.* TNFalpha contributes to diabetes impaired angiogenesis in fracture healing. *Bone* 2017;99:26-38
- 37 Al-Debasi T, Al-Bekairy A, Al-Katheri A, *et al.* Topical versus subconjunctival anti - vascular endothelial growth factor therapy (Bevacizumab, Ranibizumab and Aflibercept) for treatment of corneal neovascularization. *Saudi J Ophthalmol* 2017;31(2):99-105
- 38 Lin L, Chen YS, Yao YD, *et al.* CCL18 from tumor - associated macrophages promotes angiogenesis in breast cancer. *Oncotarget* 2015;6(33):34758-34773
- 39 Maric - Bilkan C, Flynn ER, Chade AR. Microvascular disease precedes the decline in renal function in the streptozotocin - induced diabetic rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;302(3):F308-315
- 40 Chrastina A, Valadon P, Massey K, *et al.* Lung Vascular Targeting Using Antibody to Aminopeptidase P: CT - SPECT Imaging, Biodistribution and Pharmacokinetic Analysis. *J Vasc Res* 2010;47(6):531-543
- 41 Maïga S, Allain G, Hauet T, *et al.* Renal auto - transplantation promotes cortical microvascular network remodeling in a preclinical porcine model. *PLoS One* 2017;12(7):10
- 42 Wang LW, Qu AP, Liu WL, *et al.* Quantum dots - based double imaging combined with organic dye imaging to establish an automatic computerized method for cancer Ki67 measurement. *Sci Rep* 2016;6:20564
- 43 Bock F, Onderka J, Rummelt C, *et al.* Safety profile of topical VEGF neutralization at the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(5):2095-2102
- 44 Rusu MC, Hostiuc S, Loreto C, *et al.* Nestin immune labeling in human adult trigeminal ganglia. *Acta Histochem* 2013;115(1):86-88
- 45 Matsuda Y, Hagio M, Ishiwata T. Nestin: a novel angiogenesis marker and possible target for tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2013;19(1):42-48