

结膜下注射 Avastin 抑制角膜新生血管的实验研究

吴作红¹,冯春霞²,田 浩³,张玉光³,颜世龙⁴

作者单位:¹(430064)中国湖北省武汉市,武汉爱尔眼科医院;
²(250000)中国山东省济南市,济南市市中区人民医院;
³(250010)中国山东省济南市,济南眼科医院;⁴(250010)中国山东省济南市,济南爱尔眼科医院

作者简介:吴作红,男,毕业于中山大学中山眼科中心,硕士,副主任医师,研究方向:青光眼。

通讯作者:颜世龙,男,毕业于中山大学中山眼科中心,硕士,主治医师,研究方向:眼外伤、玻璃体视网膜疾病. shilongy828@163.com

收稿日期:2012-09-17 修回日期:2012-12-20

Study on the inhibitory effect of avastin by subconjunctival injection on corneal neovascularization and its mechanisms

Zuo-Hong Wu¹, Chun-Xia Feng², Jie Tian³, Yu-Guang Zhang³, Shi-Long Yan⁴

¹Department of Glaucoma and Vitroretinopathy, Wuhan Aier Eye Hospital, Wuhan 430064, Hubei Province, China; ²People's Hospital of Jinan Central District, Jinan 250000, Shandong Province, China; ³Jinan Eye Hospital, Jinan 250010, Shandong Province, China; ⁴Jinan Aier Eye Hospital, Jinan 250010, Shandong Province, China

Correspondence to: Shi-Long Yan. Jinan Aier Eye Hospital, Jinan 250010, Shandong Province, China. shilongy828@163.com
Received:2012-09-17 Accepted:2012-12-20

Abstract

• **AIM:** To test whether subconjunctival injection of avastin could suppress corneal neovascularization induced by alkali injury and study its mechanisms.

• **METHODS:** Alkali injury was induced by application of 1mol/L NaOH to right eyes of New Zealand white rabbits for 30 seconds ($n = 20$). All animals were randomly assigned to A, B groups, each consisting of 10 eyes. Group A received subconjunctival injection of avastin after alkali injury immediately in 2.5mg dosage. Group B received subconjunctival injection of normal salt. Biomicroscopic neovascularization was observed on 3, 7, 14, 21 and 28 days. The average length, area and inhibitory rate of corneal neovascularization (CNV) were calculated respectively. Five rabbits were randomly killed in each group on 7 and 28 days and the corneas were taken for histopathological examination. Immunohistochemical studies on the expression of VEGF in corneal paraffin sections were also carried out.

• **RESULTS:** The vessel meshworks of corneal limb were

dilated and congested on the 1st day, then neovascularization (NV) began to invade cornea on 3rd day, and reached to its developmental peaks between 7 and 14 days, lastly, NV started to regress on 14-21 days after alkali injury. Significant difference ($P < 0.05$) in the area of NV, average length of NV and corneal edema were found respectively between group A and B ($P < 0.05$); the inhibitory rate of CNV ranges from 44.2% to 55% in group A. There were slight epithelium and fiber edema in group A, and disappeared in the late, the fiber arranged straightly and less NV intruded into the central cornea. Immunohistochemical studies indicated that the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in group A was obvious lower compared to group B on 7 and 28 days.

• **CONCLUSION:** Avastin suppresses corneal neovascularization induced by alkali injury on rabbit eyes with subconjunctival injection through decreasing expression of VEGF.

• **KEYWORDS:** avastin; corneal neovascularization; alkali injury; vascular endothelium growth factor

Citation: Wu ZH, Feng CX, Tian J, *et al.* Study on the inhibitory effect of avastin by subconjunctival injection on corneal neovascularization and its mechanisms. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(1):52-55

摘要

目的:观察结膜下注射 Avastin 对实验性兔眼角膜新生血管(neovascularization, NV)的抑制作用,初步探讨作用机制。

方法:应用 5mm 直径的加样器(末端附有棉片)吸入 1mol/L NaOH 接触新西兰兔右眼(20 眼)中央角膜区烧灼 30s,制作碱烧伤兔眼角膜 NV 模型。将实验兔随机分成 2 组,10 眼(A 组)碱烧伤后立即结膜下注射 Avastin 2.5mg;其余 10 眼为对照组(B 组),结膜下注射等量生理盐水。烧灼后次日每天裂隙灯观察角膜 NV、角膜水肿情况,分别于 3,7,14,21,28d 裂隙灯照相并计算 NV 面积及 NV 抑制率。伤后 7,28d 各组随即处死 5 只实验兔,取角膜组织做石蜡切片行组织病理学检查及 VEGF 免疫组织化学检测。

结果:两组兔眼伤后第 1d 角膜缘血管网明显扩张充血,3d 时血管开始侵入角膜,7~14d 时 NV 达到高峰,14~21d 后 NV 稳定并逐渐回退。两组角膜 NV 长度、NV 面积及角膜水肿程度存在差异($P < 0.05$);A 组各时间点角膜 NV 抑制率为 44.2%~55%。A 组角膜上皮及实质层水肿较轻,NV 较少,后弹力层基本完整,VEGF 表达明显弱于 B 组。

结论:结膜下注射 Avastin 对碱烧伤诱导的兔眼角膜 NV 形成及生长具有明显的抑制作用,可能通过下调 VEGF 表达发挥作用。

关键词:Avastin;角膜新生血管;碱烧伤;血管内皮生长因子

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.01.11

引用:吴作红,冯春霞,田洁,等.结膜下注射 Avastin 抑制角膜新生血管的实验研究.国际眼科杂志 2013;13(1):52-55

0 引言

角膜新生血管(neovascularization,NV)是多种眼表疾病共同的病理转归特征。大量的角膜 NV 不仅严重影响视力,也是角膜移植术后排斥反应的高危因素,目前无理想治疗方法。近年研究显示,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)在角膜 NV 形成中发挥着重要作用^[1]。Bevacizumab(Avastin)是单克隆抗血管内皮生长因子 IgG₁ 抗体,引入眼科领域后主要通过玻璃体腔注射^[2]治疗脉络膜 NV、年龄相关性黄斑变性、糖尿病、视网膜分支静脉阻塞等引起的黄斑水肿和视网膜 NV 等眼底疾病,并取得了肯定的疗效。Avastin 目前在眼表 NV 的研究相对较少,现将结膜下注射 Avastin 抑制兔眼角膜 NV 的实验研究作下报告,为今后的临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 健康新西兰大白兔 20 只,兔体质量 2.0~2.5kg,雌雄兼用。右眼为实验眼。所有动物由山东省医学检验动物中心提供。随即分为 2 组:(1)A 组-实验组;碱烧伤后立即结膜下注射 Avastin 2.5mg。(2)B 组-对照组;结膜下注射等量生理盐水。

1.1.2 实验试剂 APES 防脱片剂,抗山羊血清,即用型兔抗人 VEGF,二步法染色试剂盒(EliVision plus Kit),DAB 显色剂,以上试剂均为福州迈新生物技术开发有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 兔眼角膜新生血管模型制作 20 只实验兔用氯胺酮及氯丙嗪肌肉注射诱导全身麻醉,5g/L 丁卡因角膜表面麻醉。生理盐水充分冲洗结膜囊。应用 5mm 直径的加样器(末端附有棉片)吸入 1mol/L NaOH 接触右眼中央角膜区烧灼 30s,随后用生理眼水冲洗,制作碱烧伤兔眼角膜 NV 模型。

1.2.2 角膜新生血管长度、面积计算和角膜水肿评估

伤后 1d 所有实验兔右眼滴妥布霉素眼药水,4 次/d,晚上涂妥布霉素眼膏。连续观察 28d,每天裂隙灯观察角膜及 NV 生长情况。并在 3,7,14,21,28d 检测自角膜缘长出的 NV 长度和 NV 累及角膜的圆周钟点数(角膜 NV 长度和 NV 累计的角膜圆周钟点范围均是计算 NV 面积的指标)。NV 长度计算:将角膜分成 4 个象限,分别测量各象限内最长的一支血管长度。角膜 NV 面积计算: $A=C/12 \times 3.1416[r^2-(r-l)^2]$ ^[3],其中 C 为 NV 累及角膜的圆周钟点数,l 即所取的血管长度,角膜半径 $r=7\text{mm}$ 。NV 总面积等于 4 个象限面积之和。角膜 NV 抑制率为对照组与治疗组 NV 平均面积之差除以对照组 NV 平均

表 1 不同时间各组兔眼角膜新生血管平均长度 ($\bar{x} \pm s, \text{mm}$)

分组	3d	7d	14d	21d	28d
A 组	1.12±0.25	2.08±0.82	4.22±1.01	4.36±1.14	4.34±1.21
B 组	1.86±0.42	2.78±0.68	5.64±0.82	6.13±1.42	6.64±1.47
t	3.0613	2.0990	2.6106	2.0225	1.6281
P	0.0039	0.0422	0.0127	0.0298	0.0148

表 2 不同时间各组兔眼角膜新生血管面积 ($\bar{x} \pm s, \text{mm}^2$)

分组	3d	7d	14d	21d	28d
A 组	6.4±1.89	18.2±6.18	24.4±11.14	20.5±7.86	21.2±7.95
B 组	14.2±4.14	32.6±13.32	46.8±10.56	42.1±12.23	40.8±11.82
t	3.7632	3.4787	2.8157	2.4980	2.1577
P	0.0005	0.0012	0.0075	0.0167	0.0370

面积。角膜水肿采用 Dickey^[4] 分级标准,于上述时间点记录角膜水肿情况。

1.2.3 取材 分别于烧伤后 7,28d 采用耳缘静脉栓塞法随机处死各组 5 只实验兔,无菌条件下取其眼球放入 10% 福尔马林溶液内固定 48h 以上,脱水。

1.2.4 角膜与组织病理学切片的制备 石蜡包埋,切片 4 μm 厚。石蜡切片进行苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察角膜各层的病理改变、NV 的形态和分布部位。

1.2.5 角膜切片免疫组织化学染色测定 VEGF 表达 取上述标本的石蜡切片进行二甲苯脱蜡、常规系列梯度乙醇清洗二甲苯、水化,所用一抗为兔抗人 VEGF,免疫组化二步法染色技术进行操作:枸橼酸修复液,PBS 冲洗,加正常山羊血清,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温箱中,孵育后加 1 抗,分别加 A 液和 B 液,PBS 冲洗后加 DAB 液,镜下观察组织显色效果,自来水洗终止反应,Mayer 苏木素复染,自来水冲洗 10min,树胶封片。光学显微镜下观察 VEGF 表达强弱。

统计学分析:数据统计采用 SPSS 12.0 统计软件包进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异显著性采用重复测量数据分析检验及 t 检验。计数资料采用 CATMOD 模块对具有重复测量的分等级反应变量进行分析,部分资料采用 χ^2 检验。取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同时间点两组兔眼角膜新生血管长度和面积与新生血管抑制率

A 组:角膜 NV 细小稀疏,生长迟缓,烧伤后 24h 内可见角膜缘血管网扩张充血,3d 时 NV 开始侵入角膜,7~14d 达到生长高峰,NV 较少侵入角膜烧灼区内,随后 NV 逐渐回退。各时间点角膜 NV 的平均长度为 1.12±0.25~4.36±1.14mm,角膜 NV 面积为 6.4±1.89~24.4±11.14mm²。B 组:角膜 NV 粗大而长,较稠密,几乎 NV 均侵入烧灼区,其生长消退周期基本与 A 组一致,但 NV 持续时间延长,回退时间延迟。各时间点角膜 NV 的平均长度为 1.86±0.42~6.64±1.47mm,角膜 NV 面积为 14.2±4.14~46.8±10.56mm²。各时间点两组角膜 NV 长度见表 1,t 检验显示 3,7,14,21,28d 两组角膜 NV 平均长度的差异均具有统计学意义($P<0.05$);重复测量数据分析检验显示两组 NV 平均长度具有总体差异($P<0.05$)。NV 面积见表 2,t 检验同时表明各时间点两组角膜 NV 面积差异有统计学意义($P<0.05$);重复测量数据分析检验显示两组 NV 面积有总体差异及组内 NV 面积的时间效应差异均有统计学意义($P<0.05$)。3,7,14,21,28d 角膜 NV 的抑制率为 55%,44.2%,47.9%,51.3%,48%。

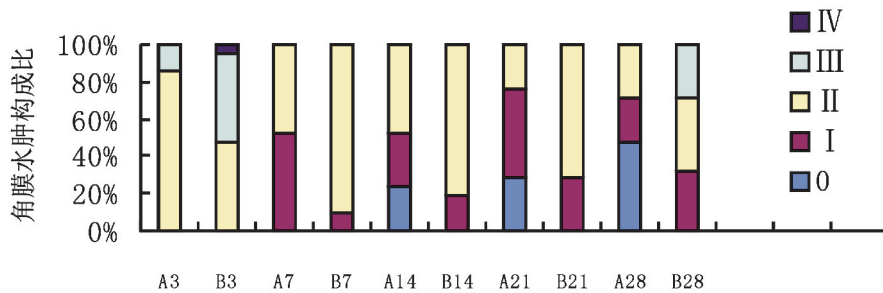


图1 治疗组与对照组角膜水肿比率图。

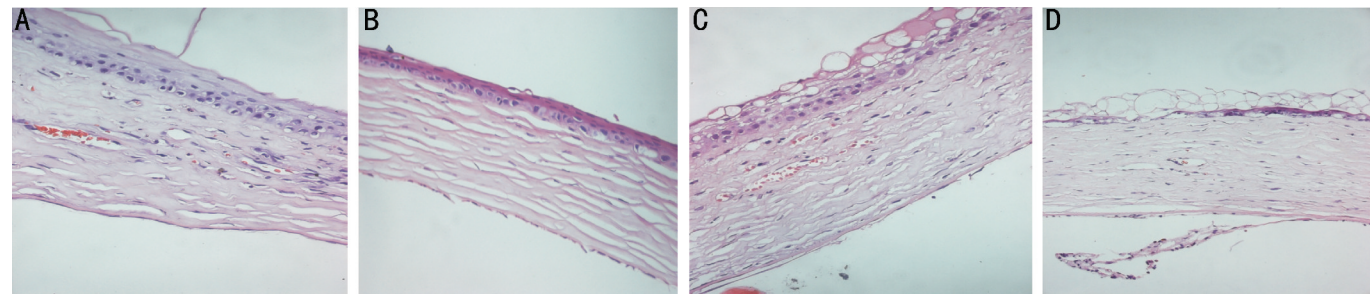


图2 各组兔不同时间角膜新生血管形态学变化(HE×400) A:A组7d;B:A组28d;C:B组7d;D:B组28d。

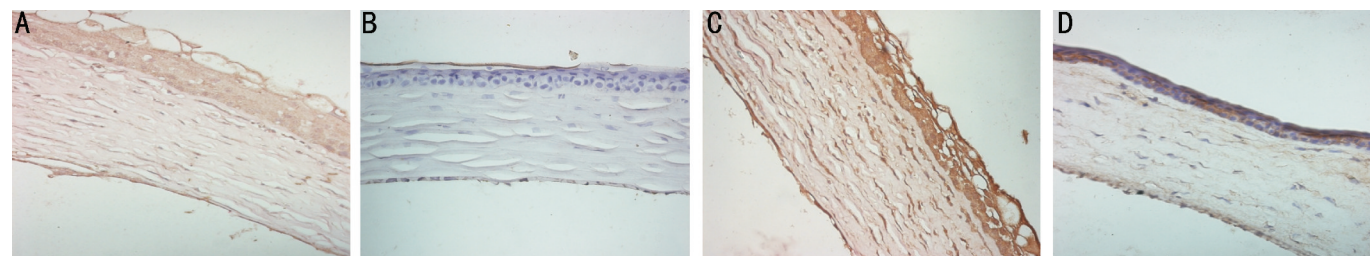


图3 各组兔不同时间眼球中 VEGF 的表达(免疫组化×400) A:A组7d;B:A组28d;C:B组7d;D:B组28d。

2.2 不同时间点两组兔角膜水肿程度比较 A组:早期角膜明显水肿,角膜 NV 生长稳定后,水肿逐渐消退,伴随着 NV 的回退,角膜水肿消失。B组:早期角膜明显水肿,角膜 NV 生长稳定后始终伴随着一定程度的角膜水肿,后期虽然减轻但角膜水肿消退明显延迟。两组角膜水肿程度构成比见图1, CATMOD 模块分析两组间差别有统计学意义($P < 0.05$),同时组内角膜水肿的时间效应亦具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 各组兔不同时间角膜新生血管形态学变化 A组:上皮水肿轻,实质层水肿轻,晚期水肿消失,纤维排列相对整齐,与上皮基本平行, CNV 较少侵入到中央区,后弹力层与内皮完整(图2)。B组:上皮及实质层水肿明显,晚期仍不同程度水肿,纤维排列紊乱及断裂, CNV 较多并侵入到中央区,后弹力层连续性中断(图2)。

2.4 VEGF 免疫组织化学染色 两组兔中 VEGF 均7d时在上皮、角膜内皮细胞、血管内皮细胞阳性表达,第28d在角膜上皮、内皮转为弱阳性表达,但A组表达强度明显低于B组(图3)。

3 讨论

自2004年 Avastin 作为抑制肿瘤血管生成的药物在美国第一个获准上市以来, Avastin 随后在眼底 NV 性疾病的研究非常活跃。Lien 等^[5] 回顾分析表明,临床应用 Avastin 能抑制 VEGF 诱导的 NV 形成。Hsu 等^[6] 则证实临床玻璃体腔多次注射 Avastin 可有效减轻视网膜分支静

脉阻塞引起的黄斑水肿。Madhusudhana 等^[7] 研究证明,玻璃体腔注射 Avastin 能有效抑制湿性年龄相关性黄斑变性的脉络膜 NV 形成, Mandal 等^[8] 也证实玻璃体腔注射 Avastin 可抑制特发性中心凹下脉络膜 NV 生成。总之玻璃体腔注射 Avastin 在治疗脉络膜 NV、湿性年龄相关性黄斑变性、糖尿病、视网膜分支静脉阻塞等引起的黄斑水肿和视网膜 NV 等眼底疾病取得了肯定的疗效,并在 Coat's 病及早产儿视网膜病变 NV 疾病的治疗方面取得了进展。我们的实验采取碱烧伤后兔眼结膜下注射^[9] 1次 Avastin (2.5mg),连续观察28d, A组各时间点角膜 NV 的平均长度为 $1.12 \pm 0.25 \sim 4.36 \pm 1.14$ mm, NV 面积为 $6.4 \pm 1.89 \sim 24.4 \pm 11.14$ mm², 远低于 B 组角膜 NV 的平均长度 $1.86 \pm 0.42 \sim 6.64 \pm 1.47$ mm, NV 面积 $14.2 \pm 4.14 \sim 46.8 \pm 10.56$ mm²; A 组 NV 抑制率达到 44.2% ~ 55%, 说明 Avastin 对于碱烧伤诱导的兔眼角膜 NV 形成及生长均有明显的抑制作用。

角膜 NV 生成是一个极其复杂的生物学过程,需要内皮细胞侵入、细胞外基质降解、细胞因子活化三个主要过程,大量的血管生成调节因子参与其中。关于 CNV 确切的机制仍不完全十分清楚。VEGF 是近年来备受人们广泛关注的一类 NV 因子,已有研究表明^[10] VEGF 的生物学效应是通过内皮细胞表面的两个酪氨酸受体 Flt-1 和 KDR 来发挥作用的。内皮细胞受到 VEGF 刺激数秒钟后,胞浆内钙离子浓度升高4倍以上,并且发生有丝分裂。Philipp

等^[11]发现在角膜 NV 生成中 VEGF 受体 Flt-1 和 Flk-1 均明显增加。角膜受伤时 VEGF 的超常表达使血管内皮细胞分裂、增殖和迁移,毛细血管基底膜发生降解,形成新的血管腔^[12]。160ng VEGF 即可诱导家鼠角膜 NV,并形成毛细血管窗,从而增强血管通透性^[13]。本实验研究表明,碱烧伤诱导的兔眼角膜 NV 7~14d 时 NV 达到高峰,14~21d 后 NV 稳定并逐渐回退,对应的 VEGF 也是在 7d 时强阳性表达,28d 时呈弱阳性表达,表明 VEGF 的表达强弱与角膜 NV 的生长周期相吻合,充分说明 VEGF 在角膜 NV 形成与生长中发挥着重要作用。结膜下注射 Avastin 不仅能抑制角膜 NV,角膜组织中的 VEGF 表达亦明显变弱,说明 Avastin 能下调 VEGF 表达,通过抑制 VEGF 发挥抗 NV 效应,但其确切靶点尚需进一步验证。本研究还发现结膜下注射 Avastin 研究组的角膜水肿程度较对照组轻,我们推测,Avastin 除了下调 VEGF 外,还可能通过影响炎症介质而阻止 NV 形成。

角膜 NV 形成的治疗目前仍是临床的难题,无论手术、光动力学及激光治疗存在移植物排斥、NV 复发、损伤周围正常组织的缺点。Avastin 作为单克隆抗 VEGF IgG₁ 抗体,本研究证实其抑制角膜 NV 效果明显,没有发现明显的眼局部副作用,无疑在角膜 NV 治疗上展示了良好的应用前景,但有必要进一步探讨治疗的最佳量效关系。

参考文献

- 1 Kamat AA. Clinical and biological significance of vascular endothelial growth factor in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(24):7487-795
- 2 Iu LP, Kwok AKh. An update of treatment options for neovascular age-related macular degeneration. *Hong Kong Med J* 2007;13(6):460-470
- 3 D'Amato RJ, Laughnan MS, Flyy E, et al. Thalidomide is an inhibitor of

- angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(9):4082-4085
- 4 王智崇,徐锦堂,郑通枢. 不同程度性水肿性混浊角膜透光率和吸光度的定量分析. *眼科研究* 1999;17(5):346-348
- 5 Lien S, Lowman HB. Therapeutic anti-VEGF antibodies. *Handb Exp Pharmacol* 2008;181:131-150
- 6 Hsu J, Kaiser RS, Sivalingam A, et al. Intravitreal bevacizumab (avastin) in central retinal vein occlusion. *Retina* 2007;27(8):1013-1019
- 7 Madhusudhana KC, Hannan SR, Williams CP. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for the treatment of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration; results from 118 cases. *Br J Ophthalmol* 2007;91(12):1716-1717
- 8 Mandal S, Garg S, Venkatesh P, et al. Intravitreal bevacizumab for subfoveal idiopathic choroidal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 2007;125(11):1487-1492
- 9 Hosseini H, Nejabat M, Mehryar M, et al. Bevacizumab inhibits corneal neovascularization in an alkali burn induced model of corneal angiogenesis. *Clin Experiment Ophthalmol* 2007;35(8):745-748
- 10 Key BA, Nguyen HV, Berleau LT, et al. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding LDR and flt-1 receptors. *J Biol Chem* 1996;271(10):5638-5646
- 11 Philipp W, Speicher L, Humpe LC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(9):2514-2522
- 12 Zhu SN, Dana MR. Expression of cell adhesion molecules neovascular endothelium in corneal inflammatory neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(7):1427-1434
- 13 Renhai C, Ebba B, Pohla G, et al. Lepin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(11):6390-6395