

# PEDF 和 Avastin 对大鼠角膜碱烧伤新生血管作用的比较

朱丹, 陆晓和, 付月, 吴伟, 陈晓红

基金项目: 广东省科技计划基金 (No. 2008B080703037); 广州市海珠区科技计划基金 (No. 2010-T-26)

作者单位: (510282) 中国广东省广州市, 南方医科大学珠江医院眼科

作者简介: 朱丹, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼表疾病。

通讯作者: 陆晓和, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 眼表疾病。luxh63@163.com

收稿日期: 2012-11-14 修回日期: 2013-01-21

## Comparison of inhibitory effects of PEDF and Avastin on alkali - induced corneal neovascularization of rat

Dan Zhu, Xiao-He Lu, Yue Fu, Wei Wu, Xiao-Hong Chen

**Foundation items:** Guangdong Provincial Science and Technology Fund, China (No. 2008B080703037); Haizhu District Science and Technology Fund of Guangzhou, China (No. 2010-T-26)

Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

**Correspondence to:** Xiao-He Lu. Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. luxh63@163.com

Received: 2012-11-14 Accepted: 2013-01-21

### Abstract

• **AIM:** To compare the inhibitory effects of PEDF and Avastin on alkali - induced corneal neovascularization (CNV) of rat.

• **METHODS:** Thirty eyes of 30 SD rats were chemically cauterized by applying a 3mm - diameter filter paper soaked 1mol/L NaOH solution at the central cornea for 40 seconds. All animals were randomly assigned to five groups: group A, the PEDF drops was used the day after cauterization; group B, the PEDF drops was used the third day after cauterization; group C, the Avastin drops was used the day after cauterization; group D, the Avastin drops was used the third day after cauterization; group E, normal saline solution drops was used the day after cauterization (control group). All the eye drops were applied 10 $\mu$ L every time and 4 times per day. The growth of CNV was observed by slit lamp microscope and the area of CNV was calculated. Expression of VEGF and CD31 was detected by immunohistochemistry on the twelfth day after experiment.

• **RESULTS:** On the twelfth day, the area of CNV in group A was smaller than that of group B, C ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference in terms of CNV areas

between group B and D ( $P = 0.215$ ) and between group C and D ( $P = 0.058$ ). Immunohistochemistry revealed that the expression of VEGF and CD31 was little in group A and massive in group E. In group B, C and D, expression of VEGF and CD31 was more than that of group A.

• **CONCLUSION:** Topical application of PEDF and Avastin can inhibit alkali - induced CNV, moreover PEDF is superior to Avastin if applied early after cauterization.

• **KEYWORDS:** corneal neovascularization; PEDF; Avastin; ocular alkaliburn

**Citation:** Zhu D, Lu XH, Fu Y, et al. Comparison of inhibitory effects of PEDF and Avastin on alkali - induced corneal neovascularization of rat. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013; 13 (2): 235-239

### 摘要

**目的:** 比较局部应用 PEDF 与 Avastin 对大鼠碱烧伤角膜新生血管 (CNV) 的作用。

**方法:** 建立碱烧伤诱导大鼠 CNV 模型, 将 30 只 SD 大鼠随机分为 5 组: A 组于烧伤当日开始给予 10 $\mu$ g/mL PEDF 点眼; B 组于烧伤后第 3d 开始给予 10 $\mu$ g/mL PEDF 点眼; C 组于烧伤当日开始给予 5mg/mL Avastin 点眼; D 组于烧伤后第 3d 开始给予 5mg/mL Avastin 点眼; E 组于烧伤当日开始使用生理盐水点眼, 均每日 4 次, 每次 10 $\mu$ L。裂隙灯显微镜观察 CNV 情况并计算各组 CNV 的面积, 采用免疫组织化学染色观察 VEGF 和 CD31 的表达。

**结果:** 第 12d 时, A 组 CNV 面积小于 B 组和 C 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); B, C 组与 D 组相比, 差异无统计学意义 ( $P = 0.215, 0.058$ )。免疫组织化学检测 VEGF 及 CD31 示 A 组 VEGF 及 CD31 表达较弱, B, C, D 组表达增多, E 组表达显著增强。

**结论:** 局部应用 Avastin 及 PEDF 均能抑制大鼠角膜化学伤后的 CNV。烧伤后早期使用 PEDF 效果优于 Avastin。

**关键词:** 角膜新生血管; PEDF; Avastin; 角膜碱烧伤

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.02.05

**引用:** 朱丹, 陆晓和, 付月, 等. PEDF 和 Avastin 对大鼠角膜碱烧伤新生血管作用的比较. *国际眼科杂志* 2013; 13 (2): 235-239

### 0 引言

角膜的无血管化是角膜完全透明的重要因素之一, 感染、炎症、外伤、变性以及角膜缘干细胞的丢失均会导致角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 的形成<sup>[1]</sup>, 导致角膜透明性降低, 造成严重的视觉障碍。许多研究表明, 血管生成刺激因子如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 与血管生成抑制因子如色素上皮衍生因子 (pigment epithelium derived factor, PEDF)

之间平衡的破坏是导致新生血管发生的主要原因<sup>[2]</sup>。目前,对于新生血管性疾病的治疗着眼于恢复双方的平衡,一方面可以削弱血管新生刺激因素,另一方面可加强血管新生抑制因素<sup>[3]</sup>。PEDF是一种内源性的新生血管抑制剂,它直接作用于新生血管的血管内皮细胞从而发挥抑制新生血管的作用<sup>[4]</sup>;贝伐单抗(Bevacizumab),商品名Avastin,是一种抗VEGF人源化单克隆抗体,可以间接阻断VEGF和其受体的结合从而发挥作用<sup>[5]</sup>。已有的动物实验表明,两种因子均有抑制CNV的作用,本实验旨在比较两种药物作用于CNV的效果,发现两种药物抑制CNV作用的特点。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** (1)实验动物:健康雌性SD大鼠30只(南方医科大学动物实验中心提供),雌性,体质量180~220g,鼠龄6~8wk。将实验动物随机分为5组,每组6只。所有动物均选择右眼作为实验眼,左眼作为正常对照眼,实验前用裂隙灯显微镜检查排除双眼眼前节病变,实验动物及使用条件均符合《实验动物管理条例》(国家科学技术委员会颁布)。(2)主要试剂:重组人PEDF(美国PeproTech公司),Avastin(美国Roche公司),一抗:兔抗鼠VEGF抗体(英国abcam公司),小鼠抗大鼠CD31(美国novus公司),二抗:辣根酶标记山羊抗兔IgG(北京中杉金桥),抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒(丹麦DAKO公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 建立角膜碱烧伤模型** 10%水合氯醛按3.5mL/kg腹腔注射麻醉,氯霉素滴眼液冲洗右眼后,滴0.5%爱尔凯因3次行表面麻醉,吸干结膜囊液体,将直径为3mm的圆形滤纸片在1mol/L的NaOH溶液中充分浸泡20s,取出滤纸,置于干燥滤纸上1s吸去多余液体,贴于角膜中央烧灼30s,移除滤纸后立即用50mL生理盐水冲洗结膜囊60s,局部应用氯霉素滴眼液预防感染,每日2次,共用7d。

**1.2.2 干预方法及实验分组** A组于烧伤当天开始点用PEDF滴眼液(无菌条件下用生理盐水稀释成10 $\mu$ g/mL<sup>[6]</sup>,4℃冰箱保存),B组于烧伤后第3d使用PEDF滴眼液,C组于烧伤当天开始使用Avastin滴眼液(无菌条件下用生理盐水稀释成5mg/mL<sup>[7]</sup>,分装成0.5mL小瓶保存于-20℃备用),D组于烧伤后第3d使用Avastin滴眼液,E组于烧伤当日使用生理盐水滴眼,均每日4次,每次10 $\mu$ L。

**1.2.3 角膜新生血管的观察** 从烧伤后第1d开始,每日用裂隙灯显微镜观察CNV生长情况,于第7d行角膜烧伤程度分级<sup>[8]</sup>,并于第12d照相并测量CNV长度和计算CNV面积。烧伤程度分级:依据烧伤后角膜水泡及隆起高度分为0级(未见水泡,没有隆起于角膜表面),1级(小水泡,轻微隆起于角膜表面),2级(中等大小水泡,中度隆起于角膜表面),3级(大水泡,高度隆起于角膜表面)。CNV长度测量及面积计算:用规尺测量从角膜缘与角膜缘切线垂直生长的新生血管长度,测量时,以连续弯曲度最小,朝向角膜中心生长最长为准,CNV面积依据Robert电脑公式计算: $S=C/12 \times 3.14 \times [r^2 - (r-l)^2]$ ,其中C为新生血管累及的角膜圆周钟点数,r为角膜半径,l为新生血管生长长度。

**1.2.4 组织病理学检查** 烧伤后第12d,断颈处死所有大鼠,迅速摘除眼球,沿角膜缘剪下角膜组织,置于4%多聚

甲醛溶液中固定,石蜡包埋后做4 $\mu$ m连续切片,取其中一份,常规苏木精-伊红染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察并拍照。

**1.2.5 免疫组织化学检测 VEGF 和 CD31 表达** 各取一份切片分别行VEGF和CD31免疫组织化学染色。二甲苯脱蜡,3%过氧化氢室温湿盒孵育10min,柠檬酸抗原修复液加热修复,10%正常山羊血清室温湿盒封闭30min。一抗4℃孵育过夜,二抗室温下孵育30min。DAB显色,苏木素复染、水洗、返蓝。乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光镜下观察并拍照。VEGF工作液稀释比例1:2000,CD31工作液稀释比例1:800。以PBS代替一抗作为阴性对照。结果分析:以细胞膜和/或细胞质出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞。

统计学分析:采用SPSS 13.0统计学软件进行分析,各组测试指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示。5个组角膜烧伤分级的比较采用Kruskal-Wallis H检验,各组CNV面积的比较采用单因素方差分析,进一步组间的两两比较采用LSD-t检验。 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠角膜烧伤程度分级** 烧伤后第7d,裂隙灯下观察各组实验大鼠角膜烧伤分级均 $\geq 1$ 级,各组大鼠角膜烧伤分级均数为:A组 $2.00 \pm 0.89$ ,B组 $1.83 \pm 0.41$ ,C组 $2.17 \pm 0.41$ ,D组 $1.83 \pm 0.75$ ,E组 $2.17 \pm 0.75$ ,各组差异无统计学意义( $\chi^2 = 1.824, P = 0.768$ )。

**2.2 CNV的观察** 碱烧伤后24h,角膜缘血管网充盈,角膜中央浑浊水肿;第3d,A,C组新生血管相对稀疏,长势较缓;B,D,E组新生血管芽深入角膜缘,新生血管密集,在角膜上方呈刷状迅速生长。第12d时A组新生血管未达烧灼区,血管细小,色淡,稀疏;B,C,D组新生血管较短,血管刚达烧灼区,末梢血管有交联,血管较细小;E组新生血管接近角膜中央,血管密集,粗大;空白对照眼未见改变(图1)。

**2.3 各组 CNV 新生血管面积** A组 $13.18 \pm 0.61 \text{mm}^2$ ,B组 $16.03 \pm 0.48 \text{mm}^2$ ,C组 $15.82 \pm 0.50 \text{mm}^2$ ,D组 $16.42 \pm 0.44 \text{mm}^2$ ,E组 $31.95 \pm 0.55 \text{mm}^2$ 。A组与B,C组相比,差异有统计学意义( $t = -2.850, -2.633; P < 0.01$ );B组与D组相比,差异无统计学意义( $t = -0.383, P = 0.215$ );C组与D组相比,差异无统计学意义( $t = -0.600, P = 0.058$ );A,B,C,D组分别与E组相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

**2.4 组织病理学观察** A组新生血管少,管腔小且较为稀疏,炎症细胞浸润少,角膜组织结构趋于整齐;B,C,D组新生血管增多,未见大量炎性细胞浸润,角膜组织结构相对整齐;E组角膜基质层见大量新生血管,管腔大且密集,血管腔内可见较多成熟的红细胞,周围大量炎性细胞浸润,角膜组织结构紊乱(图2)。

**2.5 VEGF 和 CD31 免疫组织化学分析** 正常对照眼无新生血管,VEGF在角膜上皮层有微弱的表达;A组新生血管稀少,VEGF在角膜上皮及基质层少量表达;B,C,D组新生血管密度增高,VEGF表达增多;E组新生血管密集而粗大,角膜上皮和基质层可见VEGF大量表达,主要分布于上皮全层和新生血管区域(图3)。正常对照眼未见CD31阳性表达;A组第表达较弱;B,C,D组表达增强;E组可见CD31大量表达,主要分布于新生血管区域(图4)。

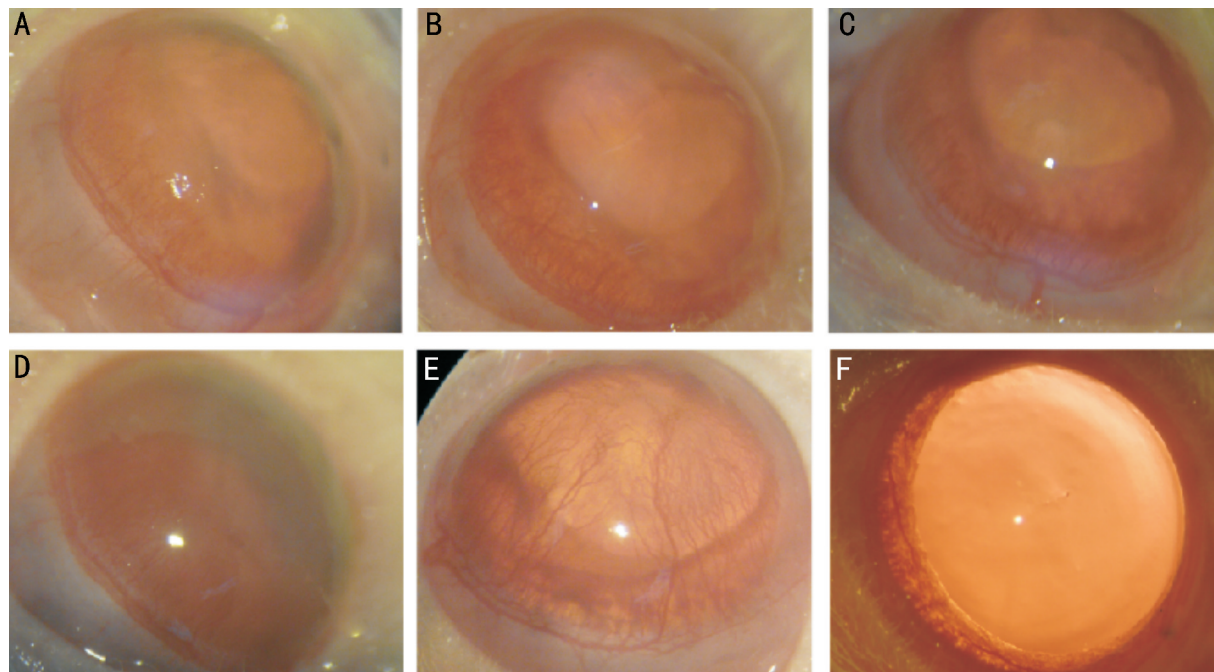


图1 大鼠角膜碱烧伤后第12d CNV 观察 A:A组;B:B组;C:C组;D:D组 E:E组;F:空白对照眼。

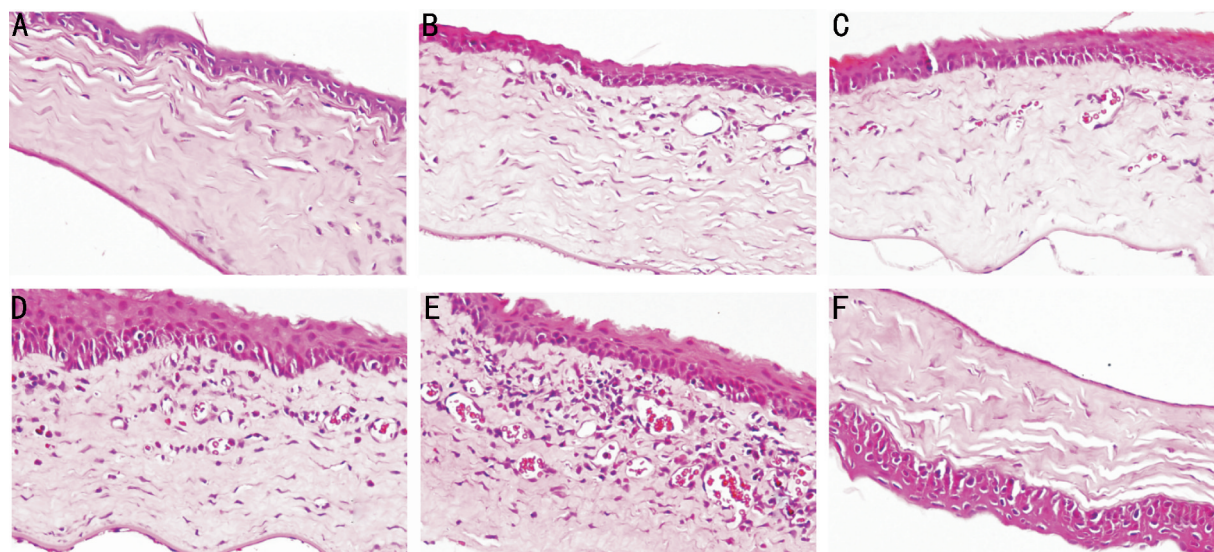


图2 实验第12d角膜组织苏木精-伊红染色(×400) A:A组;B:B组;C:C组;D:D组 E:E组;F:空白对照眼。

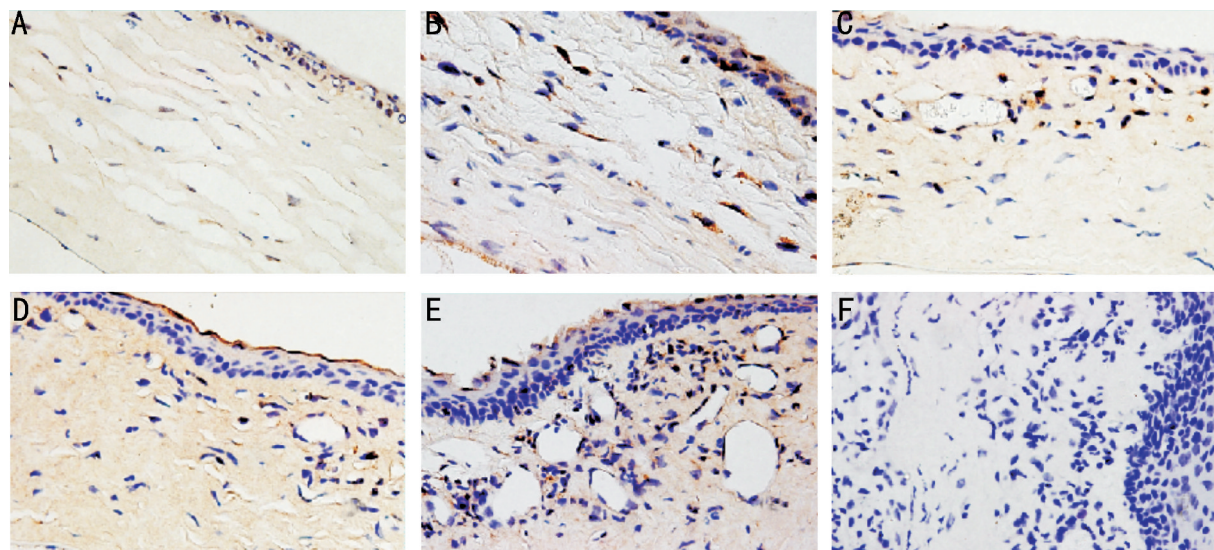


图3 实验第12d角膜组织 VEGF 免疫组化染色(×400) A:A组;B:B组;C:C组;D:D组;E:E组;F:不加一抗的阴性对照。

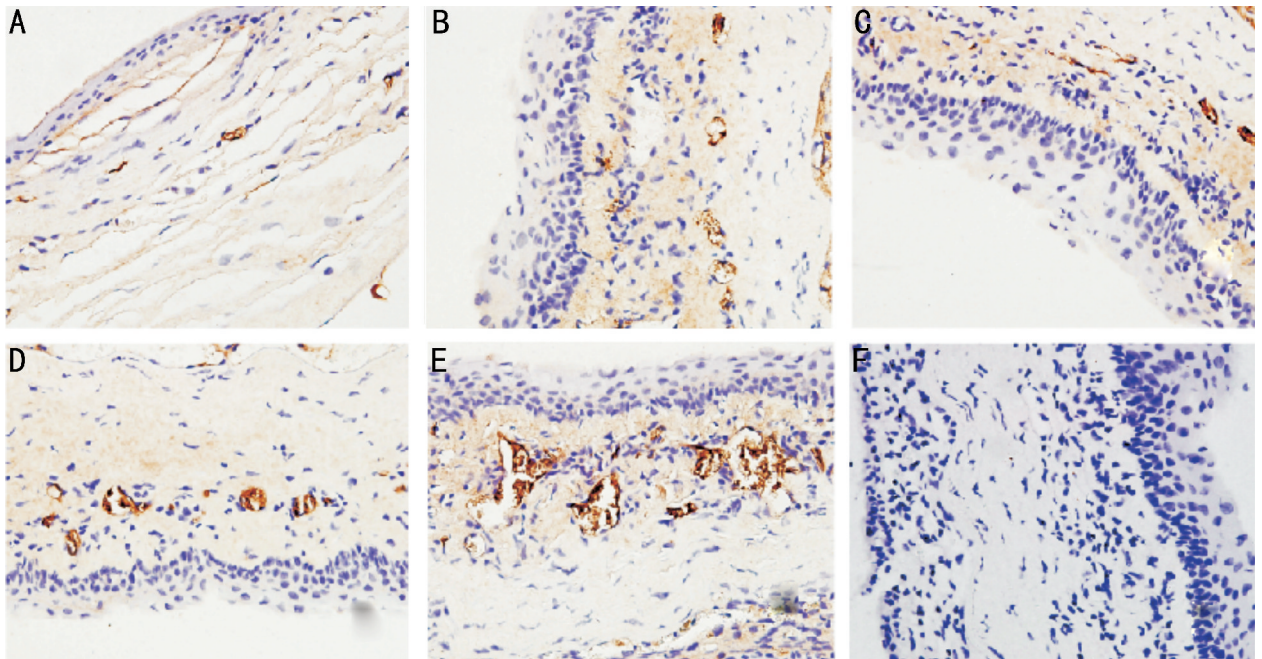


图4 实验第12d角膜组织CD31免疫组化染色( $\times 400$ ) A:A组;B:B组;C:C组;D:D组;E:E组;F:不加一抗的阴性对照。

### 3 讨论

PEDF是丝氨酸蛋白酶抑制剂家族中的非抑制性成员,由单基因编码,是相对分子质量为50000的糖蛋白,存在于所有的脊椎动物中,在不同物种间高度保守。它是一种多功能蛋白,已证实的功能包括神经营养、亲神经元性、神经保护、胶质抑制、抗肿瘤、抗新生血管和抗血管渗漏。在抗新生血管方面,PEDF是已知的最强的内源性血管抑制因子,是“加强血管新生抑制因素”最主要的方式,它在正常人眼组织中高表达,被认作是维持角膜、玻璃体无血管的关键因素<sup>[9]</sup>。PEDF抑制新生血管的机制目前尚未明确,可能机制有:抑制血管内皮细胞增生、移行,诱导血管内皮细胞凋亡,下调VEGF表达,减少血管渗漏及控制炎症反应<sup>[10-14]</sup>。Avastin是抗VEGF重组单克隆抗体,可与VEGF-A的所有亚型结合,从而阻止其与VEGFR结合,进而阻断VEGF的信号转导通路,是“削弱血管新生刺激因素”最主要的方式。有研究表明,在体外培养人真皮内皮细胞时,在低浓度(0.5~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的情况下,PEDF可以抑制内皮细胞的迁移和血管形成;但在高浓度(25~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的情况下,PEDF则表现出刺激内皮细胞迁移并分泌VEGF的作用<sup>[15]</sup>,且Petersen等<sup>[6]</sup>报道PEDF在人血浆中浓度大约为5~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,此浓度便可有抑制眼部异常血管的生长。据Yoeruek等<sup>[16]</sup>报道,在浓度为5mg/mL时,Avastin对体外培养的角膜细胞无明显的细胞毒性作用;且有动物实验表明<sup>[17]</sup>,短期局部应用5mg/mL Avastin对大鼠角膜上皮缺损愈合速率和正常角膜结构无影响。在抑制大鼠碱烧伤新生血管的实验中<sup>[18]</sup>,5mg/mL浓度Avastin对新生血管的抑制作用优于3mg/mL及1mg/mL。因此,可以认为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PEDF和5mg/mL浓度Avastin是其局部应用较为理想的浓度。

VEGF是一种血管生成的刺激因子,新生血管的形成与VEGF的过度表达密切相关。CD31是血管内皮细胞的标志物,正常角膜无血管,没有CD31表达,因此它的表达

水平可以反映新生血管的数量。在本实验中,与E组相比,A,B,C,D组CNV面积显著减小,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),且免疫组化染色示VEGF和CD31的表达明显减弱。A组CNV面积小于B组和C组,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),苏木精-伊红染色和免疫组化染色结果显示A组新生血管较B组和C组稀少,VEGF和CD31的表达也较弱;B组和C组CNV面积分别与D组比较,差异无统计学意义( $P>0.01$ ),苏木精-伊红染色和免疫组化染色结果未见明显差异。因此,本实验表明,大鼠角膜碱烧伤后局部应用10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PEDF和5mg/mL的Avastin均有抑制CNV的作用。对于PEDF,烧伤后当日使用对CNV的抑制效果优于3d后使用;对于Avastin,烧伤后当日使用对CNV的抑制作用与3d使用比较效果相当,这与Barros等<sup>[19]</sup>的研究结果相似。烧伤后早期使用,PEDF效果优于Avastin;3d后使用,PEDF效果与Avastin比较无明显差异。推测可能的原因是PEDF可以通过不同的机制实现抗新生血管的作用<sup>[5]</sup>,而Avastin仅通过抑制VEGF与其受体结合这一条路来抑制新生血管,但本实验观察到,碱烧伤后3d使用PEDF和Avastin效果相当,可能的原因是Avastin不仅可以抑制新生血管的产生,且可使已诱发的CNV减退,而PEDF对已产生的新生血管作用较弱或无效果。章玉群等<sup>[20]</sup>采用角膜线法制备兔眼CNV模型,分别于伤后1d和14d球结膜下注射Avastin,1d治疗组显示了显著的血管抑制作用,而14d治疗组也有一定的血管回退现象,但治疗效果远差于1d治疗组,通过上述实验结果,推测Avastin对正在生长的新生血管和刚生长的新生血管有抑制作用,对已经长成的血管抑制作用不明显,本实验Avastin在碱烧伤后3d使用,属于新生血管增殖期的早期阶段<sup>[21]</sup>,故此时使用Avastin也对其有较好的抑制作用。

PEDF和Avastin的局部应用均是治疗CNV研究的热点,许多实验采用结膜下注射Avastin,与滴眼相比,有报

道称两种用药方法无差异<sup>[22]</sup>,有报道称结膜下注射效果优于滴眼<sup>[23]</sup>,因 PEDF 半衰期并不确定,仅有报道其半衰期较短<sup>[5]</sup>,高频率反复结膜下注射副作用较大,故本实验采用滴眼的方法。对于两种药物对 CNV 的作用特点,尚需进一步探讨,以期寻求更好的治疗 CNV 的药物。

#### 参考文献

- 1 Chang JH, Gabison EE, Kato T, *et al.* Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12(4):242-249
- 2 Miller JW. Vascular endothelial growth factor and ocular neovascularization. *Am J Pathol* 1997; 151(1):13-23
- 3 Amano S, Rohan R, Kuroki M, *et al.* Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(1):18-22
- 4 Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, *et al.* Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285(5425):245-248
- 5 Cohen AF, van Bronswijk H. New medications: bevacizumab. *Ned Tijdschr Geneesk* 2006; 150(40):2194-2195
- 6 Petersen SV, Valnickova Z, Enghild JJ, *et al.* Pigment-epithelium-derived factor (PEDF) occurs at a physiologically relevant concentration in human blood: purification and characterization. *Biochem J* 2003;374(Pt 1):199-206
- 7 Yoeruek E, Spitzer MS, Tatar O, *et al.* Safety profile of bevacizumab on cultured human corneal cells. *Cornea* 2007;26(8):977-982
- 8 Mahoney JM, Waterbury LD. Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea. *Curr Eye Res* 1985;4(5):531-535
- 9 Zhang SX, Ma JX. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Prog Retin Eye Res* 2007;26(1):1-37
- 10 Duh EJ, Yang HS, Suzuma I, *et al.* Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(3):821-829

- 11 Ueda S, Yamagishi SI, Okuda S. Anti-vasopermeability effects of PEDF in retinal-renal disorders. *Curr Mol Med* 2010;10(3):279-283
- 12 Jin J, Ma JX, Guan M, *et al.* Inhibition of chemical cautery-induced corneal neovascularization by topical pigment epithelium-derived factor eyedrops. *Cornea* 2010;29(9):1055-1061
- 13 Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, *et al.* Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(5):2593-2597
- 14 Zhang SX, Wang JJ, Gao G, *et al.* Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor. *FASEB J* 2006;20(2):323-325
- 15 Apte RS, Barreiro RA, Duh E, *et al.* Stimulation of neovascularization by the anti-angiogenic factor PEDF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(12):4491-4497
- 16 Yoeruek E, Spitzer MS, Tatar O, *et al.* Safety profile of bevacizumab on cultured human corneal cells. *Cornea* 2007;26(8):977-982
- 17 沙翔垠, 宋莉, 罗春云. Avastin 对大鼠角膜结构和缺损愈合速率的影响. *眼科新进展* 2010;30(11):1013-1016
- 18 沙翔垠, 宋莉. Avastin 和地塞米松在大鼠角膜新生血管中的作用. *眼科研究* 2010;7:591-595
- 19 Barros LF, Belfort RJ. The effects of the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin) on angiogenesis in the rat cornea. *An Acad Bras Cienc* 2007;79(3):389-394
- 20 章玉群, 彭清, 赵培泉. Bevacizumab(Avastin)抑制兔眼角膜新生血管的实验研究. *第二军医大学学报* 2009;30(8):907-912
- 21 Burger PC, Klintworth GK. Autoradiographic study of corneal neovascularization induced by chemical cautery. *Lab Invest* 1981;45(4):328-335
- 22 Papatianassiou M, Theodossiadis PG, Liarakos VS, *et al.* Inhibition of corneal neovascularization by subconjunctival bevacizumab in an animal model. *Am J Ophthalmol* 2008;145(3):424-431
- 23 Ahmed A, Berati H, Nalan A, *et al.* Effect of bevacizumab on corneal neovascularization in experimental rabbit model. *Clin Exp Ophthalmol* 2009;37(7):730-736