

内皮抑素和 avastin 对小鼠脉络膜新生血管抑制作用的比较观察

李 静¹, 马 勇¹, 王红美², 谢安明³, 刘 轩³

作者单位:¹(710061) 中国陕西省西安市, 陕西省人民医院眼科;²(710004) 中国陕西省西安市第四医院眼科;³(710061) 中国陕西省西安市, 西安交通大学附属第一医院眼科
作者简介: 李静, 毕业于西安交通大学医学院, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 李静. lix-www@163.com

收稿日期: 2013-12-25 修回日期: 2014-03-31

Comparison of endostatin (endostar) and avastin's inhibition effect on mice choroidal neovascularization

Jing Li¹, Yong Ma¹, Hong-Mei Wang², An-Ming Xie³, Xuan Liu³

¹Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China; ²Department of Ophthalmology, Xi'an No. 4 Hospital, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China; ³Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jing Li. Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. lix-www@163.com

Received: 2013-12-25 Accepted: 2014-03-31

Abstract

• **AIM:** To observe the inhibition effect of endostatin (endostar) on mice choroidal neovascularization model (CNV) and compare with the Avastin.

• **METHODS:** Using 532nm laser photocoagulation to establish a mouse model of CNV. We observed the formation of CNV by histopathological examination after 2wk later. Forty successful models of mice were randomly divided into control group (group 1, 10 rats), normal saline group (group 2, 10 rats), endostatin group (group 3, 10 rats) and avastin group (group 4, 10 rats). The drugs were injected into the mice' vitreous after photocoagulation 2wk later. Then 1wk later, we took the mice eyeballs to perform the HE and immunohistochemical staining to observe. The statistical analysis of ANOVA was done by SPSS 16.0 and the LSD-t test was used for multiple samples, taking $P < 0.05$ as the test standards.

• **RESULTS:** Two weeks later, HE histopathological examination was done, light microscope showed large amount of new vessels' formation, the positive rate for

CNV was 72.8%. The blank control group compared with the normal saline group $P > 0.05$, had no inhibitory effect on CNV; endostatin treated group compared with control group, $P < 0.05$, had a certain inhibitory effect; avastin group compared with the control group, $P < 0.05$, had an inhibitory effect on CNV; the LSD-t was performed on Avastin group and endostatin group, $P < 0.05$, which were statistically significant. We thought that the two drugs have different inhibitory effect on mice' CNV, because $\bar{x}_{\text{Avastin}} = 26.90$, $\bar{x}_{\text{endostatin}} = 29.13$, $\bar{x}_{\text{Avastin}} < \bar{x}_{\text{endostatin}}$, we can infer that endostar had lower inhibitory effect on mice CNV than Avastin.

• **CONCLUSION:** Laser-induced CNV animal models of colored mice C57BL/6J is of short time and high rate establishment and it is an ideal model for CNV study. Endostar has certain inhibitory effect on CNV, and it is likely to become one of the important drugs for CNV-related diseases in the future.

• **KEYWORDS:** choroidal neovascularization; endostatin; avastin

Citation: Li J, Ma Y, Wang HM, et al. Comparison of endostatin (endostar) and avastin's inhibition effect on mice choroidal neovascularization. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(6): 996-999

摘要

目的: 观察内皮抑素(恩度)对 C57BL/6J 小鼠脉络膜新生血管的抑制效应,并与 avastin 作比较。

方法: 采用 532nm 激光光凝建立小鼠脉络膜新生血管模型, 2wk 后进行病理组织学检查, 观察 CNV 的形成情况。取 40 只成功造模的小鼠, 随机分成空白对照组(1 组, 10 只)、生理盐水组(2 组, 10 只)、内皮抑素组(3 组, 10 只)和 avastin 组(4 组, 10 只), 光凝后 2wk 玻璃体腔给药 1 次, 1wk 后取材行 HE、免疫组化染色观察结果。统计分析采用 SPSS 16.0, 方法为方差分析, 多个样本两两比较用 LSD-t 检验, 取 $P < 0.05$ 作为检验水准。

结果: 2wk 后 HE 病理组织学检查, 光镜下可见大量新生血管形成, CNV 阳性检出率为 72.8%。生理盐水组与对照组比较, $P > 0.05$, 对 CNV 无抑制作用; 内皮抑素组与空白对照组比较, $P < 0.05$, 具有一定的抑制效应; avastin 组与空白对照组比较, $P < 0.05$, 对 CNV 有明显的抑制效应; 对 avastin 和内皮抑素组进行 LSD-t 检验, 得出 $P < 0.05$, 差别有统计学意义, 可以认为两者抑制 CNV 的效应是不相等的, 由于 $\bar{x}_{\text{avastin}} = 26.90$, $\bar{x}_{\text{内皮抑素}} = 29.13$, $\bar{x}_{\text{avastin}} < \bar{x}_{\text{内皮抑素}}$, 我们可推测, 内皮抑素的抗 CNV 作用弱于 avastin。

结论: 激光诱导有色小鼠 C57BL/6J 的 CNV 动物模型, 成

模时间短,成模率高,是进行 CNV 研究的理想模型。内皮抑素对 CNV 具有一定的抑制作用,未来很有可能成为眼科临床抗击 CNV 相关疾病的重要药物。

关键词:脉络膜新生血管;内皮抑素;avastin

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.06.04

引用:李静,马勇,王红美,等.内皮抑素和 Avastin 对小鼠脉络膜新生血管抑制作用的比较观察.国际眼科杂志 2014;14(6):996-999

0 引言

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)又称视网膜下新生血管(subretinal neovascularization, SRNV),是指脉络膜新生的血管穿过破裂受损的 Bruch 膜,进入视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)下或神经上皮生长。CNV 是许多致盲眼病的共同病理基础。CNV 的发病机制目前尚不完全清楚,但公认的是血管生成因子与抑制因子的失衡^[1],且其中血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在视网膜膜细胞异常增殖和新生血管形成过程中发挥主要作用^[2-6]。目前最有效抑制新生血管的研究集中在内皮抑素和 VEGF-拮抗剂^[7-9]。本实验将对内皮抑素抑制小鼠脉络膜新生血管疗效进行实验分析,并与当前临床抗击 CNV 的一线药物 avastin 的疗效进行比较,探究内皮抑素应用于 CNV 治疗的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 C57BL/6J 成年雄性小鼠由西安交通大学实验动物中心提供,8 周龄,体质量 18~22g。经裂隙灯显微镜及眼底检查,排除屈光间质及眼底疾病。

1.1.2 主要设备及试剂 532 多波长激光机(美国科医人公司);M844 眼科手术显微镜(德国莱卡公司);显微手术器械(六六公司);冰冻切片(陕西省人民医院中心实验室);10%水合氯醛(陕西省人民医院中心实验室)复方托吡卡胺滴眼液(日本参天制药);4%多聚甲醛(陕西省人民医院中心实验室);普通光学-荧光显微镜(OLYMPUS BX51)照相机(OLYMPUS DP71);内皮抑素(烟台麦得津津生物工程有限公司);avastin(罗氏公司);CD105(BD 公司);DAB 免疫组化二抗试剂盒(欣博盛公司);免疫荧光二抗试剂盒(欣博盛公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备 C57BL/6J 成年雄性小鼠 50 只,随机选取两只未进行激光干涉的正常小鼠,HE 染色观察正常眼底组织结构;另 48 只 10%水合氯醛 0.1mL 小鼠腹腔注射麻醉后,复方托吡卡胺充分散瞳,通过裂隙灯显微镜和三面镜,将波长为 532nm 的激光(参数 200mW,光斑直径 20 μm,曝光时间 0.2s)导入小鼠眼底,避开大血管,围绕视盘周围照射 8~10 个点。激光光凝成功的标准为有气泡产生,表示已经击穿 Bruch's 膜。光凝斑处偶尔可见小出血点。于光凝后 2wk 随机抽取 3 只实验成功小鼠行冰冻切片、HE 染色证实脉络膜新生血管的存在。

1.2.2 实验动物的分组及方法 (1)实验分组:取 40 只成功造模的小鼠,随机分成对照组(1 组,10 只)、生理盐水组(2 组,10 只)、内皮抑素组(3 组,10 只)和 avastin 组(4 组,10 只)。(2)给药途径:通过改良微量进样针玻璃

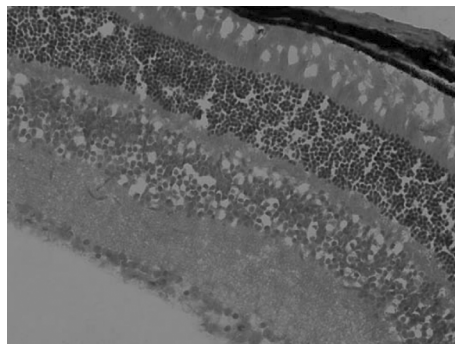


图 1 正常 C57BL/6J 小鼠的眼球壁各层组织(×400)。

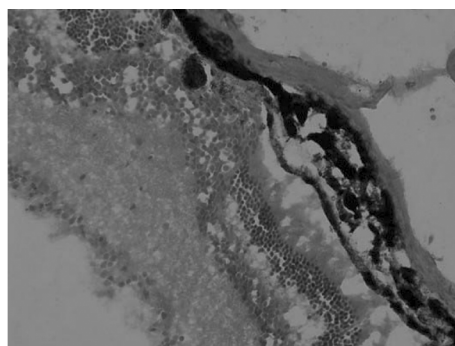


图 2 光凝后 2wk,视网膜水肿,细胞排列紊乱,结构破坏,可见 CNV 突破 Bruch 膜,出芽状伸向视网膜下,大量成纤维细胞增生,色素细胞移行(×400)。

体腔给药:内皮抑素组注射内皮抑素 2μL;avastin 组注射 avastin 2μL;生理盐水组注射生理盐水 2μL;对照组光凝后不做处理。(3)注药时间:光凝后 2wk 给药 1 次,1wk 后取材行 HE、免疫组化染色观察结果。

1.2.3 免疫组化染色 OCT 包埋已脱水的小鼠眼球组织,待全部冻透;做与角膜平行的连续切片,切片厚度 8 μm,每个标本连续切片 30 张,置于已过胶的载玻片上。于常温箱烘干水分。PBS 漂洗 3 次。加一抗(1:20 稀释的 CD105 抗体),室温下 1h,4℃过夜;PBS 洗 5min×3,加抗小鼠 IgG 生物素化二抗,室温下 2h;PBS 洗 5min×3,加 DAB 显色液,室温 2~5min(镜下控制显色程度);自来水充分冲洗,终止显色;复染,盐酸酒精分化;脱水、透明、封片、镜检。

1.2.4 免疫荧光染色 在避光条件下滴加荧光素标记的二抗,PBS 洗涤后用缓冲甘油封片,即刻镜检。

统计学分析:采用 SPSS 16.0,方法为方差分析,多个样本两两比较用 LSD-*t* 检验,取 $P < 0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 一般情况 激光光凝小鼠 48 只,共 96 眼,术中发生玻璃体出血小鼠共 2 只 3 眼,剔除;术后 2wk 发生晶状体混浊 1 只 1 眼,剔除。剩余 45 只成功眼底激光造模小鼠,随机抽取 3 只行 HE 染色,检测 CNV 形成情况。

2.2 HE 染色观察结果 正常 C57BL/6J 小鼠的视网膜、脉络膜各层组织结构清晰,细胞排列整齐(图 1)。光凝后 2wk,视网膜水肿,细胞排列紊乱,结构破坏,可见 CNV 突破 Bruch 膜,出芽状伸向视网膜下,大量成纤维细胞增生,色素细胞移行(图 2),CNV 阳性检出率为 72.8% (表 1)。

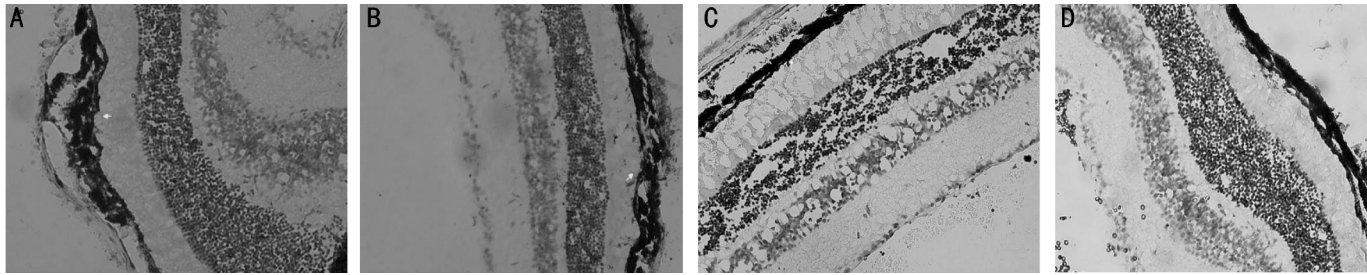


图3 免疫组织化学染色($\times 400$) A:空白对照组 CD105 抗体 DAB 染色显示大量 CD105 阳性细胞(箭头),RPE 结构紊乱,呈团状、芽状伸向视网膜下,CD105 强阳性反应;B:生理盐水组仍可见大量 CD105 阳性细胞,RPE 强阳性反应,芽状生长;C:内皮抑素组 CD105 阳性细胞表达较前两组明显减少,RPE 结构尚整齐;D:avastin 组 CD105 阳性细胞表达数量较空白对照组及生理盐水组明显减少,RPE 结构尚可。

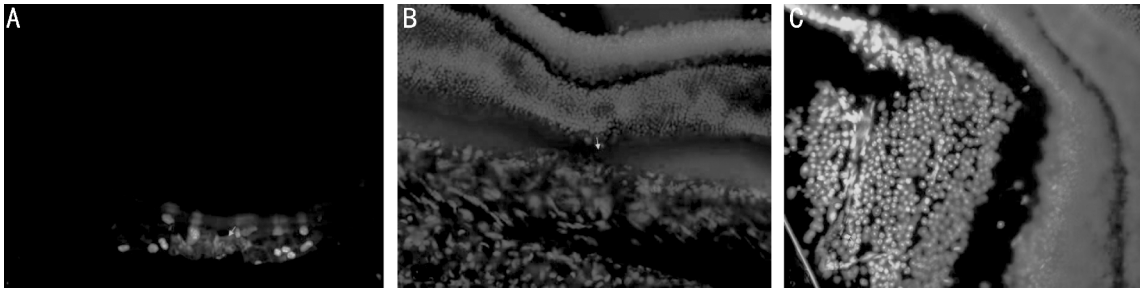


图4 CD105 阳性内皮细胞荧光染色 A:空白对照组;B:内皮抑素组;C:avastin 组。

2.3 免疫组织化学及免疫荧光染色结果 CD105 是增殖性血管内皮细胞特异性免疫组织化学标志因子,从各组中抽取 30 张 $8\mu\text{m}$ 切片,分别进行 DAB 和免疫荧光染色,比较各组光凝部位血管数量和内皮细胞(表 2),生理盐水组内皮细胞数与空白对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),说明生理盐水不具有抑制 CNV 的效应。内皮抑素组及 avastin 组与空白对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),说明内皮抑素及 avastin 均具有抑制 CNV 的效应。生理盐水组和对照组光凝斑部位呈强阳性表达(图 3A,B),内皮抑素组和 avastin 组 CD105 表达量明显降低($P < 0.05$,图 3C,D,图 4),根据统计学分析,两者差别有显著性意义($t = 4.032, P = 0.049$)。由此认为二者间抑制新生血管的效应是不同的,内皮抑素的抗 CNV 作用弱于 avastin。

3 讨论

CNV 的病理过程是多种细胞、血管生成调节剂、蛋白水解酶参与的,包括变性反应、Bruch 膜-RPE-脉络膜内皮细胞机械性损伤、增殖和迁移等一系列的复杂过程,目前 CNV 模型的建立方法主要有激光诱导 CNV 模型、血管生成刺激因子诱导 CNV 模型和基因方法诱导 CNV 模型等。后两者存在操作技术要求高、CNV 形成周期长和形成率低、成本高等缺点,激光诱导 CNV 的机制为选择性破坏 RPE 细胞-Bruch 膜-脉络膜毛细血管复合体,其中,Bruch 膜的破坏在脉络膜新生血管形成中至关重要,成功诱导 CNV 的前提为激光击穿 Bruch 膜,检验标准为激光斑形成时有气泡产生。组织病理学检查是 CNV 检测的金标准^[10],本实验成功运用 532 多波长激光诱导有色小鼠 C57BL/6J 脉络膜新生血管模型。根据王康等^[11]研究,小鼠 C57BL/6J 脉络膜新生血管模型中,CNV 于 7d 开始形成,14d 达高峰,造模成功率为 75%,但随时间延长,部分 CNV 可能发生回退,因此在应用该模型进行干预性研究时,应考虑模型的自然病程变化,选择合适的时机。本实验于激光干预后 2wk 验证 CNV 成功率,阳性率为 72.8%,可顺利进行下一步实验。

表 1 小鼠 CNV 模型 CNV 阳性检出率

小鼠编号	切片总数	CNV 检出	阳性率 (%)
1	60	46	76.7
2	60	43	71.7
3	60	42	70.0
合计	180	131	72.8

表 2 四组内皮细胞计数 ($\bar{x} \pm s$, 个/ mm^2)

组别	EC 细胞计数	t	P
1 组	54.80 \pm 10.27	-	-
2 组	52.57 \pm 8.89	0.809	0.372
3 组	29.13 \pm 4.75 ^a	153.89	0.000
4 组	26.90 \pm 3.81 ^{a,c}	194.07	0.000
合计	40.85 \pm 14.88	119.59	0.000

^a $P < 0.05$ vs 1 组, ^c $P < 0.05$ vs 3 组。

本实验采用 CD105 标记内皮细胞,与以往采用 VIII 因子等标记的方法不同^[12]。CD105 是一种在新生血管内皮高表达的蛋白,参与 TGF 受体的信号转导,参与血管生成,已证实肿瘤新生血管形成过程中的重要作用,与肿瘤的生长、转移、预后密切相关^[13]。动物实验和临床研究表明,与总血管内皮细胞标志物 CD31 等不同的是,CD105 是增生性血管内皮细胞的标志,特异性强表达于处于增生状态的新生血管内皮细胞上,正常组织的血管内皮细胞上无表达^[14,15]研究显示,CD105 与以往用于标记内皮细胞的 VIII 因子在组织的分布一致,但正常视网膜脉络膜组织有 VIII 因子的表达,干扰实验结果,因此选择 CD105 作为新生血管的定量指标更有意义。并且,CD105 用于标记脉络膜新生血管内皮细胞并进行定量分析比传统的 VIII 因子标记更具有优势。

马萍等^[16]指出,内皮抑素同现有的其他血管生成抑制剂(如阿伐斯汀、易瑞沙),由于对 VEGF、bFGF、bFGF 受

体、EGF受体等具有广泛的阻滞作用,对VEGF的抑制作用效果优于单一阻滞VEGF的avastin和阻滞VEGF、Bfgf、肿瘤生长因子TGF的易瑞沙,应更具有高效性。从本实验的内皮细胞计数结果来看,生理盐水组与对照组比较 $P>0.05$,对CNV无抑制作用,内皮抑素组与空白对照组比较, $P<0.05$,对新生血管有抑制作用;avastin组与空白对照组比较, $P<0.05$,对CNV有明显抑制作用;对avastin组和内皮抑素组进行统计分析,得出 $P<0.05$,差别有统计学意义,可以认为二者抑制CNV的效应是不相等的,由于 $\bar{x}_{avastin} = 26.90$, $\bar{x}_{内皮抑素} = 29.13$, $\bar{x}_{avastin} < \bar{x}_{内皮抑素}$,我们可大胆推测,内皮抑素的抗CNV作用弱于avastin。本实验得出以上研究结果有可能与以下因素有关:内皮抑素在小鼠玻璃体腔内的有效浓度是否优于avastin;内皮抑素的药物纯度是否能够使其发挥优于avastin的抑制效应;小鼠CNV模型与人体CNV作用效果是否一致;由于本实验仍存在一些不足:比如样本量小,检测指标较少,观察抑制效应周期短,未设立内皮抑素与avastin联合用药组等,所以二者作用于CNV的效应高低仍不可断然结论。

脉络膜新生血管因其与AMD等多种眼科致不可逆盲的疾病相关,对抗击脉络膜新生血管药物的研究已成为眼科研究者们追求的热点问题。目前眼科领域抗击新生血管的一线用药avastin等,在抑制新生血管方面疗效显著,但需要长期反复多次的注射,这就使得治疗带来效应的同时,也大大增加了多次玻璃体腔给药的风险。未来抗击CNV的研究方向为研发具有高效性、长效性的新的CNV抑制剂,既可以减少用药次数,又可获得长久稳定的疗效。根据内皮抑素抑制新生血管的理论基础,即可以更加广泛的抑制新生血管效应,内皮抑素很有可能发挥长久稳定的抑制新生血管作用的潜质,在本次研究中,初步验证了内皮抑素对CNV具有一定的抑制作用,但其抑制效应还需大量的实验研究来进一步证实。由于其广泛的抑制CNV效应,其应用于眼科CNV相关疾病的治疗具有诱人前景,但在眼内应用内皮抑素还需要大量的验证其安全性、可靠性、眼内病理毒理等效应,有待于进一步更深层次的研究。

参考文献

- 1 Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, *et al.* Age - related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol* 2003;48(3):257-293
- 2 Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, *et al.* Vascular endothelial growth factors and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004;56(4):549-580
- 3 朱洁,王雨生,惠延年. 脉络膜新生血管的生成和抑制. *眼科新进展* 2004;24(1):57-60
- 4 许建华. 眼内新生血管发生机制的研究进展. *国际眼科杂志* 2008;8(12):2496-2498
- 5 Cheung CM, Tai ES, Kawasaki R, *et al.* Prevalence of and risk factors for age-related macular degeneration in a multiethnic asian cohort. *Arch Ophthalmol* 2012 ;130(4):480-486
- 6 Ciulla TA, Rosenfeld PJ. Anti - vascular endothelial growth factor therapy for neovascular ocular diseases other than age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* 2009;20(3):166-174
- 7 陈琳,孙旭光,王智群,等. 内皮抑素对大鼠角膜碱烧伤后新生血管抑制作用的实验研究. *中华眼科杂志* 2005;41(10):940-941
- 8 王伟,谢立信,董晓光,等. 内皮抑素基因转移抑制视网膜新生血管的实验研究. *中华眼科杂志* 2006;42(2):111-115
- 9 Marneros AG, She H, Zambarakji H, *et al.* Endogenous endostatin inhibits choroidal neovascularization. *FASEB J* 2007;21(14):3809-3818
- 10 李学晶,唐由之,王慧娟,等. 脉络膜新生血管动物模型的建立与评估. *国际眼科杂志* 2009;9(2):246-249
- 11 王康,王康孙,王玲,等. 应用半导体激光诱导鼠脉络膜新生血管模型. *中华眼科杂志* 2002;38(12):750-752
- 12 杨秀梅,王雨生,徐建峰,等. 激光诱导有色大鼠脉络膜新生血管的形态学观察. *眼科新进展* 2006;26(3):161-166
- 13 Kim YM, Hwang S, Kim YM, *et al.* Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem* 2002;277(31):27872-27879
- 14 Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, *et al.* Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7(11):3410-3415
- 15 徐建锋,王雨生. CD105与脉络膜新生血管. *国际眼科杂志* 2008;8(1):126-128
- 16 马萍,樊映川. 血管内皮抑素对眼内新生血管抑制的展望. *国际眼科杂志* 2009;9(5):929-931