

新型 VEGF 靶向抗体眼局部应用的安全性评价

王群^{1*}, 白华^{2*}, 赵杰¹, 侯宝杰¹, 黄一飞³, 吕明⁴

基金项目:武警总医院院内课题(No. WZ2015011)

作者单位:¹(100039)中国北京市,武警总医院眼科;²(100700)中国北京市,陆军总医院眼科;³(100853)中国北京市,解放军总医院眼科;⁴(100850)中国北京市,军事医学科学院基础研究所

* 王群和白华对本文贡献一致。

作者简介:王群,毕业于解放军总医院,博士,在站博士后,主治医师,研究方向:新生血管性眼病;白华,毕业于解放军总医院,博士,主治医师,研究方向:角膜病。

通讯作者:黄一飞,主任医师,博士研究生导师,研究方向:角膜病和人工角膜. 301yk@sina.com

收稿日期:2017-06-16 修回日期:2017-10-09

Safety of a novel VEGF-target antibody's ocular application

Qun Wang^{1*}, Hua Bai^{2*}, Jie Zhao¹, Bao-Jie Hou¹, Yi-Fei Huang³, Ming Lyu⁴

Foundation item: Intra-hospital Project Fund of Chinese PAP General Hospital (No. WZ2015011)

¹Department of Ophthalmology, Chinese PAP General Hospital, Beijing 100039, China; ²Department of Ophthalmology, Chinese Army General Hospital, Beijing 100700, China; ³Department of Ophthalmology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ⁴Fundamental Research Institute, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

* Co-first authors: Qun Wang and Hua Bai.

Correspondence to: Yi-Fei Huang. Department of Ophthalmology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China. 301yk@sina.com

Received:2017-06-16 Accepted:2017-10-09

Abstract

• **AIM:** To verify the safety application of MIL60 in the treatment of corneal neovascularization both *in vivo* and *in vitro*.

• **METHODS:** We observed the biological characteristics of human corneal epithelial cells. The cell proliferation was analyzed using CCK-8 assay, which also used to test the toxicity of MIL60 and the solvent on cultured human corneal epithelial (HCE). FACs was used to analyze the apoptosis of HCE after treated with MIL60. Also we evaluated the effect of subconjunctival injection of MIL60 on corneal epithelial healing model in normal rat and rats with epithelium defect through slit lamp-microscopy, Draize scores and histopathology way.

• **RESULTS:** The proliferation speed of HCE in three

groups was the same. MIL60 did no harm on the proliferation of HCE and the apoptosis of HCE, and has no effect on corneal epithelial healing and other parts of the ocular in rats without inflammation cells infiltration.

• **CONCLUSION:** When given subconjunctival injection, MIL60 does no harm to the proliferation and apoptosis of HCE, and is safe with ocular application.

• **KEYWORDS:** monoclonal antibody; safety; subconjunctival injection

Citation: Wang Q, Bai H, Zhao J, *et al.* Safety of a novel VEGF-target antibody's ocular application. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(11):2019-2023

摘要

目的:通过体外细胞实验和在体动物实验初步评价 MIL60 在眼局部应用的安全性。

方法:常规培养人角膜上皮细胞, CCK8 法体外检测 MIL60 抗体对角膜上皮细胞毒副作用。流式细胞仪检测 MIL60 对角膜上皮细胞的凋亡影响。正常 SD 大鼠结膜下注射 MIL60 抗体, 观察眼部反应情况, 通过裂隙灯显微镜检查、Draize 的评分系统和病理切片等, 分析结膜和角膜病理改变。建立 SD 大鼠角膜上皮缺损模型, 结膜下注射 MIL60 抗体, 观察角膜上皮愈合情况。

结果:MIL60 不影响角膜上皮细胞增殖, 不促进角膜上皮细胞的凋亡。结膜下注射 MIL60 抗体后, 大鼠角结膜和眼部其他各组织形态正常, 组织学检查显示结构正常, 未见炎症细胞浸润。结膜下注射 MIL60 不影响角膜上皮愈合。

结论:MIL60 结膜下应用安全性较好, 不影响角膜上皮细胞正常功能。

关键词:单克隆抗体; 安全性; 结膜下注射

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.11.07

引用:王群, 白华, 赵杰, 等. 新型 VEGF 靶向抗体眼局部应用的安全性评价. 国际眼科杂志 2017;17(11):2019-2023

0 引言

角膜新生血管使角膜失去正常的透明性, 导致视力减退甚至致盲。角膜新生血管还是造成角膜“免疫赦免”机制破坏的主要因素, 是角膜移植术后发生免疫排斥反应的常见高危因素。如何抑制角膜新生血管生长是目前角膜病和角膜移植排斥的研究热点。目前抗新生血管治疗大多着眼于干扰 VEGF 通路, 其中研究最多的抗血管生成因子靶向药物, 大多数是以 VEGF 及其相应的酪氨酸激酶受体作为药靶而设计的。MIL60 是通过噬菌体抗体库技术得到的新型单克隆抗体, 能特异性地与 VEGF

结合。我们既往的实验已在体外较全面地评价了 MIL60 的生物学特性, MIL60 与 VEGF 能高特异性和亲和力地结合, 有效抑制 VEGF 诱导的人脐静脉内皮细胞的增殖^[1]。研究表明, MIL60 可以有效抑制碱烧伤诱导的大鼠角膜新生血管的生长^[2]。作为新型单克隆抗体药物的评价, 不仅需要评价药效学特性, 更要评价该新药物眼局部应用的毒副作用。本实验将通过细胞增殖和细胞凋亡的检测实验来评价 MIL60 是否对角膜上皮细胞存在毒副作用, 通过裂隙灯显微镜观察和病理学检测结膜下注射 MIL60 对大鼠角结膜组织是否存在毒副作用; 并观察 MIL60 对大鼠角膜上皮愈合的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人角膜上皮细胞 (human corneal epithelial, HCE) 细胞系由中山大学眼科馈赠。36 只清洁型健康 6~8 周龄雄性 SD 大鼠, 体质量 100~200g, 由军事医学科学院实验动物中心提供。实验动物和实验所使用的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 MIL60 对 HCE 细胞增殖和凋亡的影响

1.2.1.1 HCE 细胞培养和传代 将 HCE 细胞置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中, 混合培养基 10mL (KSF:M:DMEM/F₁₂=1:1) 培养。随后每 2d 换液 1 次, 每天观察细胞生长情况。待细胞生长至 80%~90% 融合时, 传代培养。倒置相差显微镜下观察 HCE 形态并拍照记录。

1.2.1.2 HCE 细胞的鉴定 HCE 以 20 000 个/孔接种于 24 孔板, 细胞贴壁后去上清, 加入 1mL 4% 多聚甲醛固定 15min。加入 200μL 0.1% Triton-100 作用 20min, PBS 洗去残余 Triton-100。200μL BSA 封闭 30min。加入 100μL 1:200 稀释的 CK12 抗体, 37℃ 孵育 30min, 室温孵育 1h。PBS 漂洗 4 次。加入 100μL 1:50 稀释的荧光标记的二抗, 室温避光孵育 30min。PBS 漂洗 4 次。荧光显微镜下观察照相。

1.2.1.3 CCK8 检测 MIL60 对 HCE 增殖的影响 消化重悬细胞, 计数后调整 HCE 细胞密度为 1×10⁴ 个/mL, 按每孔 100μL 接种于 96 孔板, 单纯培养基作空白对照, 置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中。细胞贴壁后分别更换含 25mg/mL MIL60 和溶剂的培养液, 继续原条件孵育 24、48、72h, 然后用 CCK8 法测吸光度, 分别观察各组细胞生长情况。按照 CCK8 试剂盒要求在每个待测孔中加入 10μL 检测试剂, 置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中避光孵育 2h, 培养液颜色由红色变成蓝色, 用酶标仪在 450nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 参比波长为 650nm, 计算每组 A 值的平均值。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

1.2.1.4 流式细胞仪检测 MIL60 对 HCE 凋亡的影响

用不含胎牛血清的培养基培养 HCE 48h, 随机分组: 空白对照组、溶剂组、25mg/mL MIL60、12.5mg/mL MIL60 和 3.125mg/mL MIL60 组。培养 24h 观察细胞生长情况。2.5g/L 胰蛋白酶消化收集细胞, 1 000r/min 离心 5min, 调整细胞浓度为 1×10⁶ 个/mL。各取 490μL 细胞悬液加入 5μL FITC-Annexin V 及 5μL PI (浓度 250μg/mL), 混匀后置冰浴, 暗室温育 10min, PBS 洗 2 遍, 上机分析。流

式细胞仪分析: 光源为 488nm 氩离子激光器, FITC 受激发后发绿色荧光, PI 发红色荧光, 每份标本收集 10 000 个细胞, 然后用软件进行分析。

1.2.2 大鼠结膜下注射 MIL60 后眼部组织的观察

1.2.2.1 实验动物分组准备 将 36 只 SD 大鼠随机分为 25mg/mL MIL60 组、溶剂组和 0.9% NaCl 组。10% 水合氯醛 (3.5mL/kg) 腹腔注射麻醉, 爱尔凯因滴眼液点右眼 2 次, 麻醉充分后固定大鼠, 手术显微镜下在大鼠右眼颞上结膜下注射 0.05mL 相应药物或溶液。

1.2.2.2 常规检查 注射前和注射后第 1、3、7、14d, 用裂隙灯和直接眼底镜对所有大鼠的双眼进行检查, 并进行眼前节照相。根据 Draize 等的评分系统进行改良后, 在该评分系统中, 分别对角膜厚度、损伤面积、荧光素染色和新生血管化情况进行评分, 分别为 0~4 分, 然后将各分值进行相加, 乘以 5 得到加权的角膜评分。对房闪、虹膜组织和瞳孔反射情况以及结膜充血、水肿和溃疡情况进行评分^[3]。同时还需要观察其他的组织病变情况, 如角膜裂伤或眼球破裂等。

1.2.2.3 病理学检查 球结膜注射后第 14d, 处死大鼠并取出眼球, 用 4% 多聚甲醛混合液固定。然后梯度脱水、包埋、切片, 取结膜、角膜组织做 HE 染色, 显微镜下观察照相。

1.2.3 大鼠结膜下注射 MIL60 对角膜上皮愈合能力的影响

1.2.3.1 建立角膜上皮缺损动物模型 SD 大鼠 12 只麻醉后用爱尔凯因滴眼液点右眼 2 次, 麻醉充分后固定大鼠, 手术显微镜下用直径 3.75mm 的环钻于右眼角膜中央作浅表压痕, 取同直径的 Whatman 3 号滤纸片浸于 20% 酒精 20s 后, 置于干燥滤纸 1s, 然后放在角膜中央压痕处并紧贴角膜 60s, 用刀片刮去压痕内全部上皮, 用荧光素染色后呈均匀着色圆盘状上皮缺损区, 即为造模成功。将 12 只大鼠随机分为 25mg/mL MIL60 组、溶剂组和 0.9% NaCl 组。建模成功后即刻右眼颞上结膜下注射 0.05mL 的相应溶液。

1.2.3.2 角膜上皮缺损区域面积计算 建模后分别于 12、24、36h 进行角膜荧光素染色, 观察角膜上皮缺损修复情况直至上皮基本愈合并照相。通过裂隙灯显微镜图像分析系统计算角膜上皮缺损面积并进行统计分析。设初始缺损面积为 1, 其后各时间点与其相比得出数值。

统计学分析: 采用 IBM SPSS20.0 软件进行统计学分析。实验数据中的计量资料以均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。样本均数经 Levene 检验证实方差齐, 采用单因素方差分析, 各组间两两比较用 LSD-t 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MIL60 对 HCE 细胞增殖和凋亡的影响变化

2.1.1 HCE 细胞培养和鉴定 HCE 细胞呈三角形、短梭形或不规则的多边形, 生长较迅速, 3d 长满呈铺路石样, 可复层生长, 会发生接触抑制从而导致细胞迅速凋亡 (图 1A, B)。免疫荧光结果示: 细胞胞浆内见红色荧光, 即 CK12 表达阳性, 胞核呈蓝色荧光, 为 DAPI 核染 (图 1C), 可确定为 HCE 细胞。

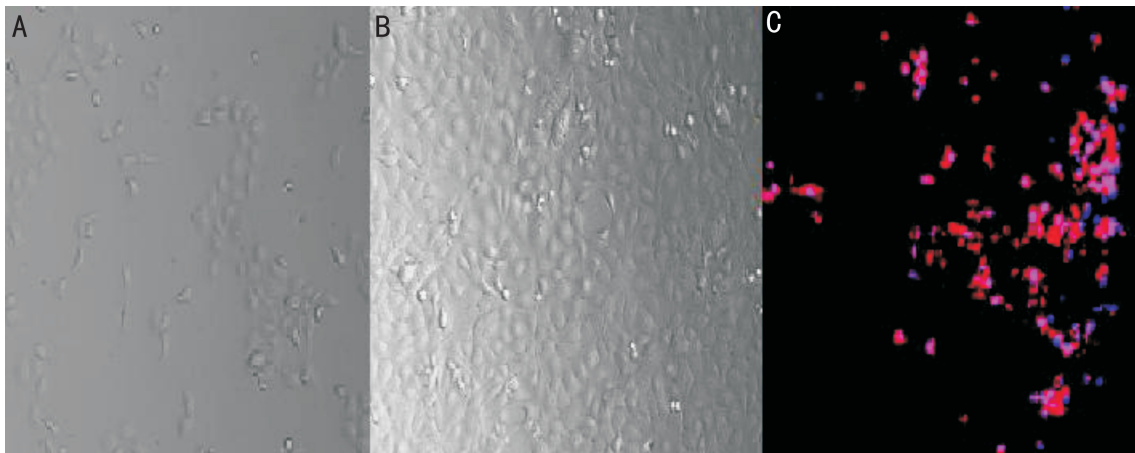


图1 HCE 的培养与鉴定 A:HCE 细胞培养后 1d 倒置显微镜下观察($\times 100$),可见 HCE 呈短梭状、多边形;B:HCE 培养 3d 后细胞呈三角形、短梭状;C:CK12 免疫荧光染色显微镜下观察($\times 400$),细胞胞浆可见红色荧光,即 CK12 表达阳性,胞核呈蓝色荧光,为 DAPI 核染,可确定为 HCE。

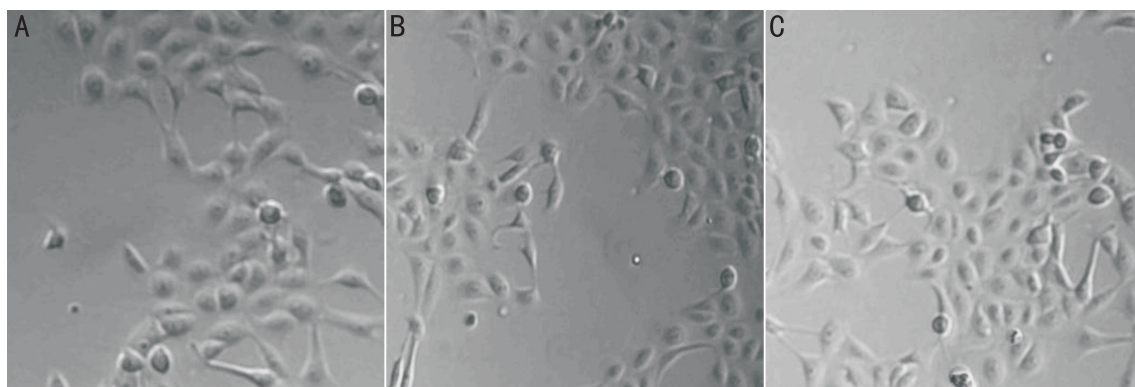


图2 各组角膜上皮细胞形态变化($\times 100$) A:MIL60 组;B:溶剂组;C:对照组。

表1 各组角膜上皮细胞吸光度值比较 $\bar{x} \pm s$

组别	培养时间		
	24h	48h	72h
MIL60 组	1.10 \pm 0.04 ^a	1.32 \pm 0.07 ^a	1.46 \pm 0.04 ^a
溶剂组	1.08 \pm 0.09 ^a	1.29 \pm 0.03 ^a	1.42 \pm 0.03 ^a
对照组	1.12 \pm 0.10	1.33 \pm 0.09	1.45 \pm 0.08

注:^a $P > 0.05$ vs 对照组。

2.1.2 CCK8 法检测 MIL60 对 HCE 增殖的影响 25mg/mL MIL60 和溶剂处理 HCE 细胞后,在各个时间点细胞形态未见明显变化,细胞状态良好,生长迅速,细胞形态规则,细胞之间连接紧密,细胞贴壁性强,与对照组细胞未见明显差异(图2)。细胞在不同溶液分组处理培养 24、48、72h 后,MIL60 和溶剂培养组的 HCE 细胞增殖和普通培养基的细胞增殖无明显差别,各处理组分别和对照组进行对比,差异无统计学意义($P > 0.05$,表1)。

2.1.3 Annexin V FITC/PI 法检测 MIL60 对 HCE 细胞凋亡的影响 25mg/mL MIL60 组、12.5mg/mL MIL60 组、3.125mg/mL MIL60 组、溶剂处理组和对照组相比,HCE 细胞发生凋亡的细胞数和比率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),即 25mg/mL MIL60 组、12.5mg/mL MIL60 组、3.125mg/mL MIL60 组和溶剂对 HCE 细胞无明显诱导凋亡作用。流式细胞术检测发现,对照组细胞培养 24h 后破碎、坏死细胞的比率为 3.3%,凋亡细胞的比例为 2.2% \pm 0.59%;经过 25、12.5、3.125mg/mL MIL60 和溶剂对 HCE

细胞进行处理 24h 后,破碎、坏死细胞的比率未发生明显变化,分别为 5.6% \pm 0.48%、3.2% \pm 0.13%、1.8% \pm 0.34%、5.0% \pm 0.63%;凋亡细胞比例未发生明显变化,分别为 1.1% \pm 0.13%、0.4% \pm 0.21%、0.3% \pm 0.15%、0.7% \pm 0.36%(图3)。重复 3 次实验均得到相同趋势结果。

2.2 大鼠结膜下注射 MIL60 后眼部组织的观察

2.2.1 裂隙灯和检眼镜检查 结膜下注射相应溶液后大鼠右眼颞侧局部结膜隆起、稍苍白,注射后第 1d 结膜隆起消退,注射部位和毗邻角结膜未见明显异常。大鼠清醒后,三组大鼠行为学无明显差异,未见明显瞬目或流泪等症状。结膜下注射后,裂隙灯显微镜观察所有鼠眼未发现结膜下出血、坏死和角膜混浊水肿。观察期内各组大鼠结膜和巩膜未见充血、水肿和坏死,角膜保持透明,无水肿和内皮皱褶。前房无炎症反应,虹膜表面无渗出、出血和坏死,瞳孔对光反射灵敏,晶状体透明。直接检眼镜观察玻璃体未见混浊,视网膜血管未见闭塞,视网膜平伏,未见渗出及出血(图4)。三组大鼠结膜、角膜和虹膜 Draize 评分分析后提示,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2.2 病理学结果 光镜进行病理学观察,三组大鼠结膜组织上皮完整,未见炎性细胞浸润。角膜组织中各层均结构清晰,上皮细胞排列整齐,前弹力层完整,基质纤维排列规则,后弹力层完整,内皮细胞层连续,形态规整(图5)。

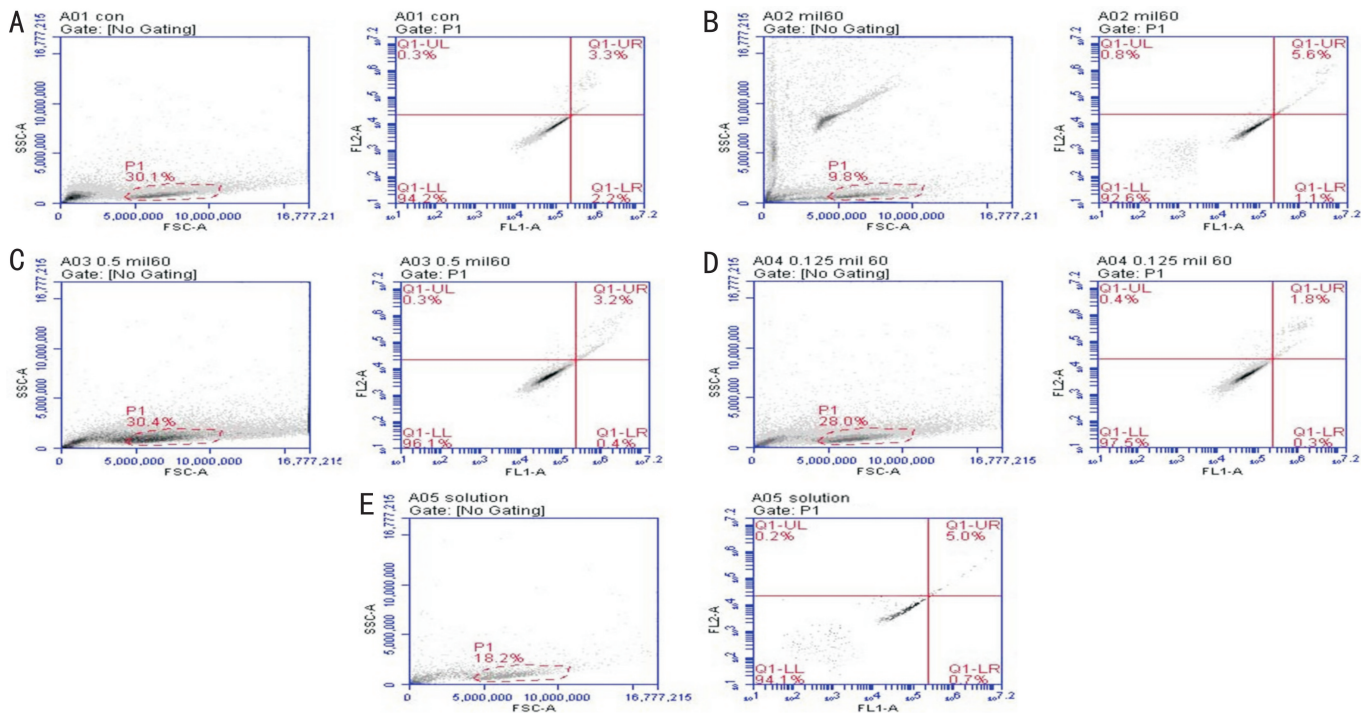


图3 流式细胞仪检测 MIL60 对 HCE 细胞凋亡的影响 A: 空白对照; B: 25mg/mL MIL60 组; C: 12.5mg/mL MIL60 组; D: 3.125mg/mL MIL60 组; E: 溶剂组。



图4 三组大鼠结膜下注射 MIL60、溶剂和 0.9% NaCl 后的外观表现(眼部未见异常表现) A: MIL60 组; B: 溶剂组; C: 0.9% NaCl 组。

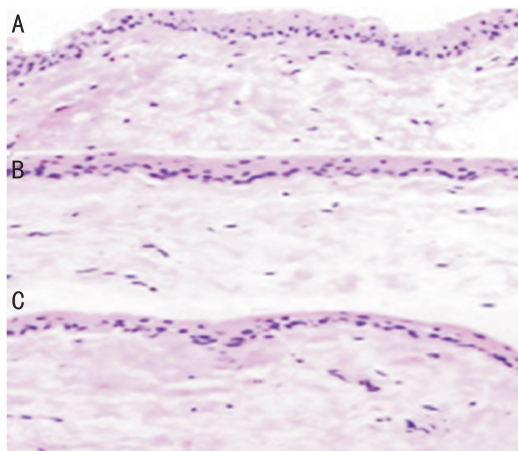


图5 三组大鼠分别结膜下注射 MIL60、溶剂和 0.9% NaCl 后第14d 角膜组织病理学检查(HE×200) A: MIL60 组; B: 溶剂组; C: 0.9% NaCl 组。

2.3 MIL60 结膜下注射对角膜上皮愈合的影响 根据裂隙灯观察和照相结果分析,在 12h 时 0.9% NaCl 组、溶剂组、MIL60 组的大鼠角膜上皮缺损面积分别为 7.06 ± 2.15 、 6.91 ± 2.44 、 $7.14 \pm 1.59 \text{mm}^2$; 24h 时 0.9% NaCl 组、溶剂组、MIL60 组的大鼠角膜上皮缺损面积分别为 $3.14 \pm$

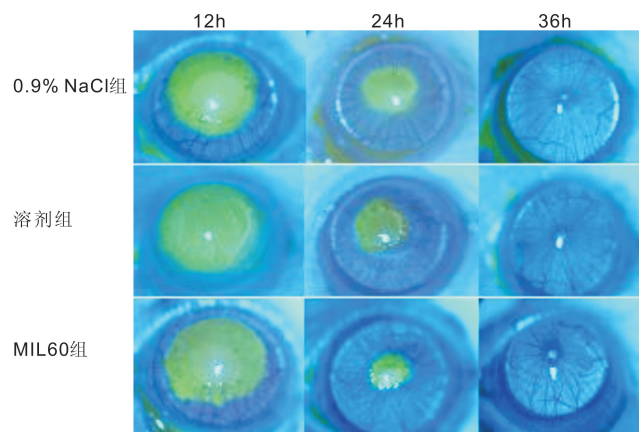


图6 MIL60 结膜下注射对角膜上皮愈合的影响。

0.79 、 3.20 ± 1.15 、 $2.97 \pm 1.67 \text{mm}^2$; 24h 时 0.9% NaCl 组、溶剂组、MIL60 组的大鼠角膜上皮缺损面积皆为 0。在各个观察时间点的三组大鼠角膜上皮缺损面积比较,差异无统计学意义($P > 0.05$); 各时间点的三组大鼠上皮缺损面积与基线上皮缺损面积之比,组间差异无统计学意义($P > 0.05$),说明 MIL60 和溶剂结膜下注射对角膜上皮愈合无明显延迟作用(图 6)。

3 讨论

高效低毒的眼用抗新生血管药物的研究开发,一直都是防治眼部新生血管的重要课题。药物在眼内产生毒副作用通常是由功能性改变到亚微观形态学改变,再到微观形态学改变,最后到肉眼可见的改变。

角膜是眼科局部用药吸收的主要途径,同时也是药物毒性损伤的首要组织。眼部局部用药对角膜的毒性研究主要通过体外细胞模型、在体动物实验和临床观察进行评价。本实验中采用体外培养的 HCE 细胞作为体外模型,观察了 MIL60 用药后 HCE 细胞的形态学变化,同时用 CCK8 法检测细胞的增殖能力,最终对比细胞凋亡率,一定程度上以评价 MIL60 眼局部应用的药物毒性。该方法简单快捷、可重复性。

CCK-8 (cell counting kit-8) 法检测细胞增殖能力的原理主要是:活细胞的线粒体脱氢酶转化的黄色结晶水溶性高,并不需要裂解细胞就可以直接进行比色,该方法操作便捷,准确性高,比 MTT 法灵敏度高,显色时间短,重复性好,而且 CCK-8 检测过的细胞可重复利用^[4-5]。MIL60 和溶剂分别处理 HCE 细胞后,HCE 的细胞形态并未发生显著变化。CCK-8 法的检测结果显示,MIL60 和溶剂处理后的 HCE 细胞增殖数、吸光度值与 0.9% NaCl 对照组无明显差异,即 MIL60 和溶剂对 HCE 的细胞增殖无明显抑制作用。

检测细胞凋亡的方法有很多,比如 ELISA、Annexin V-FITC/PI、TUNEL 等方法。ELISA 敏感性高、所需细胞数少,无法检测凋亡细胞的绝对数量,且无法分辨凋亡细胞的种类^[6]。TUNEL 特异性和敏感性高,对样品处理要求高,操作复杂,而且只能检测凋亡中晚期的细胞^[7]。Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡原理是:细胞在凋亡早期时,位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸(PS)从细胞膜内侧外翻到细胞膜外侧;Annexin V 是一种钙依赖性磷脂结合蛋白,能够特异性识别并结合到磷脂酰丝氨酸上。通过荧光素 FITC 将 Annexin V 进行标记,凋亡早期的细胞在荧光显微镜下会发出绿色荧光;而碘化丙啶(propidine iodide,PI)是一种核酸染料,它不能穿透正常细胞的细胞膜,但可以穿透凋亡晚期和已死细胞的细胞核,与细胞核 DNA 嵌合,在荧光显微镜下发出红色荧光。因此 Annexin V-FITC 和 PI 联合使用,就可以通过流式细胞仪来检出不同凋亡阶段的细胞,而且能够检测凋亡早期细胞,可以区分凋亡和坏死^[8-9]。不同浓度的 MIL60 和溶剂处理细胞后的细胞凋亡率和对照组的凋亡率间,差异无统计学意义($P>0.05$)。提示 MIL60 和溶剂对 HCE 的凋亡无明显促进作用。

目前治疗角膜新生血管的抗体药物主要采用结膜下注射的方式给药。结膜下注射可降低点眼的泪液清除,增

加药物经角膜和非角膜途径在眼部的吸收,同时减少了基质内注射、前房注射和玻璃体腔给药的风险和全身应用的并发症,降低了毒副作用^[10]。结膜下给药后药物通过局部血液循环进入角膜、前房,治疗效率高,因此结膜下给药是单克隆抗体比较理想的给药方式。MIL60 结膜下注射后,结膜、角膜和眼内组织形态学上都未观察到和对照组不一致的变化,病理切片显示组织结构正常,结膜上皮完整,角膜上皮完整,基质胶原排列整齐,未见炎性细胞浸润。我们用大鼠角膜缺损模型来观察 MIL60 是否有延迟角膜上皮愈合的作用。MIL60 给药后,角膜上皮愈合未见明显延迟,与对照组角膜缺损面积的差异无统计学意义($P>0.05$)。

综上所述,MIL60 局部应用比较安全。本实验初步分析了 MIL60 的眼部用药安全性,后继需要进行一系列的研究,系统探讨 MIL60 安全性,如检测不同浓度 MIL60 对结膜上皮细胞和角膜上皮细胞的毒性作用,确定安全用药浓度区间;对 MIL60 结膜下注射后的大鼠进行电生理检查,了解 MIL60 是否对视网膜视神经功能产生影响;对 MIL60 结膜下注射后的眼内组织进行病理学检查,了解 MIL60 是否引起眼底组织的形态变化等。

参考文献

- 1 Yang J, Wang Q, Qiao C, *et al.* Potent anti-angiogenesis and anti-tumor activity of a novel human anti-VEGF antibody, MIL60. *Cell Mol Immunol* 2014;11(3):285-293
- 2 Qun W, Jing Y, Kun T, *et al.* Pharmacological characteristics and efficacy of a novel anti-angiogenic antibody MIL60 in corneal neovascularization. *BMC Biotechnol* 2014;14:17
- 3 NAS committee for revision of NAS Publication. Dermal and eye toxicity Tests. In: Principles and Procedures for Evaluating the Toxicity of Household Substances. Washington: National Academy of sciences D. C 1977: 41-54
- 4 熊建文,肖化,张镇西. MTT 法和 CCK8 法检测细胞活性之测试条件比较. *激光生物学报* 2007;16(5):559-562
- 5 侯春梅,李新颖,叶伟亮,等. MTT 法和 CCK 8 法检测悬浮细胞增殖的比较. *军事医学科学院院刊* 2009;33(4):400-401
- 6 佟俊杰,张广耘,袁晓. 细胞凋亡检测方法的研究进展. *口腔医学* 2010;30(7):437-439
- 7 赵振军,张丽杰,易小兵,等. 几种凋亡细胞检测方法的比较. *医学综述* 2003;9(7):387-389
- 8 黄健,沈永生,周宏平,等. AnnexinV/PI、TdT 和 PI 法检测细胞凋亡的比较. *中华微生物学和免疫学杂志* 2000;20(4):387-388
- 9 郑骏年,谢叔良,陈家存,等. 流式细胞术定量检测细胞凋亡 3 种方法的比较研究. *中国免疫学杂志* 1999;15(10):467-469
- 10 Hosoya K, Lee VH, Kim KJ. Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanisms and the regulation. *Eur J Pharm BioPharm* 2005;60(2):227-240