

角膜新生血管转基因老鼠模型的应用进展

方健文*, 袁晴*, 邵毅

引用: 方健文, 袁晴, 邵毅. 角膜新生血管转基因老鼠模型的应用进展. 国际眼科杂志 2019; 19(11): 1866-1869

基金项目: 国家自然科学基金资助 (No. 81660158, 81400372); 江西省自然科学基金重大项目 (No. 20161ACB21017); 江西省重点研发项目重大项目 (No. 20151BBG70223); 江西省青年科学基金 (No. 20151BAB215016); 江西省教育厅重点项目 (No. GJJ160020); 江西省卫计委科技计划面上项目 (No. 20175116)

作者单位: (330006) 中国江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院眼科

注: * 方健文和袁晴对本文贡献一致。

作者简介: 方健文, 男, 本科, 研究方向: 角膜病、眼表疾病; 袁晴, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 角膜病、眼表疾病。

通讯作者: 邵毅, 博士, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼表疾病. freebee99@163.com

收稿日期: 2019-02-21 修回日期: 2019-10-09

摘要

角膜新生血管是由于毛细血管或淋巴管侵入角膜所致, 如不及时处理, 将严重影响视力, 角膜新生血管转基因老鼠模型的建立和应用为角膜新生血管机制的研究、抗血管药物的筛选和治疗方案的评估等提供了良好的平台, 是一种非常有价值和潜力的动物模型。本文主要介绍转基因老鼠模型在角膜新生血管研究中的应用进展。

关键词: 角膜; 角膜新生血管; 转基因; 老鼠; 动物模型

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.11.11

Application progress of transgenic mouse models of corneal neovascularization

Jian-Wen Fang*, Qing Yuan*, Yi Shao

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81660158, 81400372); Natural Science Key Project of Jiangxi Province (No. 20161ACB21017); Key Research Foundation of Jiangxi Province (No. 20151BBG70223); Youth Science Foundation of Jiangxi Province (No. 20151BAB215016); Education Department Key Project of Jiangxi Province (No. GJJ160020); Health Development Planning Commission Science Foundation of Jiangxi Province (No. 20175116)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Co-first authors: Jian-Wen Fang and Qing Yuan.

Correspondence to: Yi Shao. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. freebee99@163.com

Received: 2019-02-21 Accepted: 2019-10-09

Abstract

• The invasion of the cornea by capillary or lymphatic

vessels leads to corneal neovascularization and if not handled in time, it will seriously affect vision, the establishment and application of transgenic mouse models of corneal neovascularization provides a good platform for the study of corneal neovascularization mechanism, the screening of antiangiogenic drugs and the evaluation of treatments. Transgenic mouse model of corneal neovascularization is a very valuable and potential animal model. This paper mainly introduces the application of transgenic mouse models in the research of corneal neovascularization.

• KEYWORDS: cornea; corneal neovascularization; transgene; mouse; animal model

Citation: Fang JW, Yuan Q, Shao Y. Application progress of transgenic mouse models of corneal neovascularization. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019; 19(11): 1866-1869

0 引言

角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 是一种在炎症、缺氧、创伤或角膜缘干细胞缺损情况下发生的病理状态^[1]。正常的角膜是无血管的, 在某些情况下, 毛细血管或淋巴管侵入角膜后会产生 CNV^[2]。角膜的透明程度对于视力十分重要。CNV 的产生使得过多的血管从结膜向角膜生长, 可能导致视力障碍, 甚至失明, 是一种常见的疾病后遗症^[3]。CNV 可以通过新型抗血管生成疗法治疗, 尽管目前治疗效果仍不理想^[4], 但是通过在动物模型中进行参数对比和机制研究, 同时进行组织学比较及药物治疗等研究将会为 CNV 的治疗带来新的方向。

1 CNV 的形成机制

CNV 的形成机制涉及炎性介质、细胞、细胞因子和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 之间的相互作用, 是一个相互调节的复杂过程^[5]。正常情况下, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 蛋白在角膜上皮细胞、内皮细胞和角膜缘血管内皮细胞中基础性表达, 被内源性表达的可溶性 VEGF 受体隔离, 以维持角膜无血管的状态及其良好的透明度^[5]。在眼前段炎症、创伤和缺血等病理情况下, 或是在角膜水肿、角膜瘢痕、脂质沉积、角膜移植等其他情况下, VEGF 诱导 CNV 发生^[6]。碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 通过诱导 CNV 的内皮细胞产生尿激酶型纤溶酶原激活剂, 使纤溶酶原转化为纤溶酶, 纤溶酶激活胶原酶, 溶解血管的基底膜, 诱导内皮细胞移行, 从而促进 CNV 生长^[7]。CNV 的形成还可能与缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor - 1 α , HIF - 1 α) 和促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 相关^[8]。缺氧状态下, 缺氧诱导因子-1 α 活性增强调控 VEGF 基因表达^[9]。

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 由血管内皮细胞分泌, 能够使细胞外基质和基底膜水解^[10]。

基质金属蛋白酶与 CNV 的发生密切相关,通过抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达,新生血管的生长受到明显抑制^[11]。

2 CNV 动物模型制备方法

目前建立的 CNV 模型有家兔模型和老鼠模型,家兔在研究人类角膜疾病方面具有多方面的优势^[12]:(1)家兔眼球相对较大,方便手术操作和观察;(2)实验中可以同时对同一家兔的左右眼进行对照实验,避免个体差异;(3)家兔眼角膜与人类角膜解剖结构相似等。

建立 CNV 模型的方法有:缝线法、热烧灼法、化学烧伤法,以及角膜囊袋法,如 VEGF 缓释药丸诱导法、bFGF 缓释药丸诱导法和内毒素缓释聚合物诱导法等。缝线法损伤角膜上皮和基底细胞,一方面会引起角膜微环境缺氧,触发 VEGF 的表达,另一方面炎症细胞浸润产生大量促新生血管生长因子,使 VEGF 高表达^[13]。热烧灼法主要是通过热损伤角膜引起局部的前列腺素合成增加,持续产生促血管生成因子,使白细胞浸润和新生血管增生^[14]。这些基于损伤制作的 CNV 模型被广泛地应用,具有操作简单、成本低等优点。其缺点是容易造成其他非血管因素影响,如角膜穿孔、上皮增生等。

角膜囊袋法是通过将包含促血管生成因子的药丸聚合物植入角膜,药物的缓慢释放诱导血管生成^[15]。金玲等^[16]分别将 7.5%、15% 和 30% 3 种浓度内毒素缓释聚合物植入兔角膜基质层,观察到 7.5% 内毒素药膜诱导产生的新生血管生长稀疏、速度缓慢、范围较小,达不到建立模型的要求;植入 30% 内毒素药膜,角膜局部水肿反应严重,新生血管粗乱且密集生长,不利于观察及定量分析;15% 内毒素药膜诱导产生的 CNV 生长规律、密度均匀、血管清晰、角膜水肿轻,便于连续、动态地观察和分析。结果表明内毒素能够诱导 CNV 的生成并呈现出剂量依赖型,可以通过调节内毒素浓度制作不同的模型,来满足各种实验研究需要。

此外,还可以通过角膜移植^[17]、角膜基质内注射牛白蛋白^[18]等方法制作免疫原性 CNV 模型。该种模型高度模拟了临床环境中的 CNV 病程,是研究角膜移植术后排斥反应的理想模型。

3 转基因老鼠模型在研究 CNV 中的应用

CNV 的转基因老鼠模型可以不需要任何其他的操作干涉,可以用来研究不同的相互关联的促血管生成信号级联反应。近年来,基因工程老鼠的研究进展激发了对自发性 CNV 的研究。

Nieder Korn 等^[19]发现,无胸腺裸鼠 (nu/nu) 的角膜上皮上会长出新生血管,而重度联合免疫缺陷 (severe combined immune deficiency, SCID) 小鼠的角膜是无血管的,说明角膜血管的存在与裸鼠的免疫缺陷状态无关,然而在无毛的突变老鼠株 (SKH1; hr/hr) 中发现了与裸鼠相似的角膜血管化。裸鼠这种自发性 CNV 可能是由于血管生成因子与抗血管生成因子之间的局部失衡所致^[20]。

3.1 与 VEGF 信号通路相关的 CNV 转基因鼠 Com1 小鼠缺失细胞骨架蛋白 destrin 的编码基因,表现出早发性、自发性 CNV 和新生淋巴管,新生血管和淋巴管可以通过阻断 VEGF-VEGFR-3 信号减少:通过外部应用抗 VEGFR-3 抗体或 sVEGFR-1^[21]。CNV 在出生后 4wk 达到 100% 患病率,12mo 内未见消退,而角膜新生淋巴管患病率不完全 (3mo 达到 60%,12mo 下降至约 15%)。值得注

意的是,该模型显示低炎症形式的血管生成。以角膜切片 CD45 阳性细胞数量来衡量炎症活性,Com1 角膜炎症活性明显低于同种异体角膜移植后角膜炎症活性。虽然应用抗 VEGFR-3 抗体后 CNV 部分消退,但仍存在一定程度的病理新生血管。Com1 表型发病早,外显率高,非常适合用于新生血管的研究,可用于评估已知或未知的抗血管生成药物。

角膜表达的可溶性 VEGF 受体-1^[22] (soluble VEGF receptor-1, sVEGFR-1) 和可溶性 VEGF 受体-2^[23] (soluble VEGF receptor-2, sVEGFR-2) 分别能抑制血管生成和淋巴管生成。在对它们的研究中发现, pCre/VEGFR1^{loxP/loxP} 和 LeCre/VEGFR-2^{loxP/loxP} 小鼠模型缺少这些可溶性受体的表达,从而会自发地出现新生血管和淋巴管。

连接黏附分子 A (junctional adhesion molecule A, JAM-A) 是一种与调节白细胞和内皮细胞迁移、血管发生与血小板聚集相关的紧密连接蛋白^[24]。JAM-A 缺陷小鼠表现出自发性 CNV、炎症和混浊^[25]。这些变化与多种促炎和促血管生成系统的激活有关,其中包括 TGF- β 通路和 VEGF-A-VEGFR-2 通路。尽管 JAM-A^{-/-} 小鼠模型的表现在实际应用中是不完全外显性的,在对新生血管的研究中该模型还是非常具有潜力。

3.2 与非 VEGF 信号通路相关的 CNV 转基因鼠 BTB-Kelch (bric-a-brac, tramtrack and broad complex, BTB-Kelch) 蛋白 KLEIP (kelch-like ECT2 interacting protein, KLEIP) 是调节细胞迁移和细胞间连接形成的重要分子^[26]。为了研究 KLEIP 对小鼠眼睛的作用, Hahn 等^[27] 制作了 KLEIP^{-/-} 小鼠模型, 出生时 KLEIP^{-/-} 小鼠与 KLEIP^{+/+} 小鼠的角膜无明显区别, 眼睑开放后 KLEIP^{-/-} 小鼠开始出现上皮增生、进行性角膜营养不良, 最终导致角膜混浊, 伴有自发性基质血管化。Kather 等^[28] 阻断 KLEIP^{-/-} 小鼠的 VEGF 信号并不能减少小鼠角膜血管和淋巴管的生长, 说明该模型可以用来评估非 VEGF 靶向药对新生血管的治疗效果。KLEIP^{-/-} 小鼠的 CNV 与营养不良的角膜中存在巨噬细胞有关, 但目前尚不清楚该模型中血管生成和 (或) 淋巴管生成是否需要这些巨噬细胞。在实践中, 由于 KLEIP^{-/-} CNV 具有高外显率, 且表型进展的时间进程具有良好的特征, 因此非常适合用于血管生成研究。

3.3 与转录因子相关的 CNV 转基因鼠 cAMP 应答原件结合蛋白 (cAMP-responsive element-binding protein, CBP/p300) 的转录调节因子 CBP/p300 反式作用因子 (CBP/p300-interacting transactivators with glutamic acid (E) and aspartic acid (D)-rich tail 2, Cited2) 在成年老鼠角膜中较高表达, 提示 Cited2 可能与角膜成熟和维持有关^[29]。为了研究 Cited2 在角膜中的作用, Chen 等^[30] 通过将 Cited2-floxed 小鼠与 Le-Cre 转基因小鼠杂交, 建立了表面外胚层衍生的眼部结构 (包括角膜) 中 Cited2 缺失的小鼠模型, 表现为角膜混浊和自发性 CNV。该模型有助于研究角膜中涉及的分子机制, 还可以用来评估角膜疾病的治疗方案。

人类配对盒基因 Pax6 (paired-box gene 6, Pax6) 是脊椎动物和无脊椎动物眼睛发育的关键转录因子^[31]。Davis 等^[32] 通过将醛脱氢酶 3a1 (aldehyde dehydrogenase 3a1, Aldh3a1) 启动子融合到 Pax6 基因的编码区制作了 Pax6 过表达转基因小鼠模型, 表现出角膜上皮异常和炎症性基质新生血管。Pax6^{+/+} 杂合子小鼠则表现出相似的角膜血

管化特征^[33]。但是在对血管生成的实际研究中,Pax6^{+/-}小鼠并不完全适合:表型出现早在出生后2wk,但是外显率是不完整的。在Pax6过表达小鼠中,新生血管表型的患病率因遗传背景的不同而不同,通常低于70%。为了建立标准的CNV模型,可以对这种小鼠进行育种优化。

叉头框转录因子 FoxC1 (forkhead box transcription factor C1,FoxC1)是一种参与调控角膜血管生长的重要因子,Seo等^[34]建立的 FoxC1^{-/-}小鼠模型和神经嵴 (neural crest,NC)特异性敲除 NC-FoxC1^{-/-}小鼠模型表现出自发性角膜血管和淋巴管过度生长;杂合子 FoxC1^{+/-}小鼠模型和 NC-FoxC1^{+/-}小鼠模型则表现出相对温和的表型如角膜缘血管受损,而且在角膜损伤情况下,血管和淋巴管相较于对照组明显增多。该类模型的机制与 MMP 和 sVEGFR-1 密切相关^[35]。对血管生成的研究中,这个模型非常具有吸引力,因为它以两种方式简化了实验过程。首先,在这些小鼠中,CNV 在出生时就存在;其次,杂合子小鼠也可以用于研究,这使得每窝产仔的生物样本量增加了两倍。

T 细胞特异性表达组成性活性信号转导因子和转录活化因子 6 (signal transducer and activator of transcription factor 6,Stat6)的转基因小鼠是研究急性和慢性特异性皮炎的模式^[36]。Conwell 等^[37]报道该模型表现出 CNV。

3.4 与自发性角膜肿瘤相关的转基因鼠 RAS-丝裂原活化激酶 (RAS-mitogen activated kinase,RAS-MAPK) 信号传导是影响细胞增殖、迁移和细胞周期等细胞过程的多种生长因子和细胞外信号传递的主要途径^[38]。这一途径的关键效应激酶是细胞外信号调节激酶 1 和细胞外信号调节激酶 2 (extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, ERK1/2),它们被丝裂原激酶激酶 1 (mitogen kinase kinase 1,MEK1) 激活^[38]。Bargagna-Mohan 等^[39]报道了 ERK1/2 在转基因小鼠 Schwann 细胞中活性升高,表现出 CNV 和自发性角膜神经纤维瘤,CNV 的产生与入侵角膜中央的肥大细胞有关,这是对转基因小鼠自发形成角膜肿瘤的首次报道。

3.5 其他相关性 CNV 转基因鼠 富亮氨酸重复序列免疫球蛋白样结构域 (protein leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1,LRIG1)是角膜上皮角膜缘干细胞和眼上皮基底细胞的标志物,LRIG1 的敲除会导致自发性角膜上皮异型增生及基质的 CNV^[40]。LRIG1 是促炎症的 Stat3 通路的负性调控因子,而在 LRIG1^{-/-}小鼠中抑制 Stat3 可以抑制该病理表型,防止角膜混浊。表达组成性活性 Stat3 的 K5.Stat3C 转基因小鼠表现出相似的表型,包括角膜混浊和新生血管^[40]。LRIG1^{-/-}小鼠模型和 K5.Stat3C 转基因小鼠模型可以用来研究自发性炎症性 CNV 的机制。

4 转基因模型的优势和局限性

在转基因鼠模型中,角膜基质新生血管常与角膜上皮结构紊乱和角膜上皮向皮肤样上皮转化有关,例如,在 LRIG1^{-/-}、KLEIP^{-/-}、Pax6^{+/-} 和 Corn1 小鼠中^[21,28,40-41]。在小鼠模型中,导致角膜上皮结构改变的两个病因是角膜缘干细胞 (limbal stem cells, LSC) 缺乏和上皮细胞增殖紊乱^[42-43]。LSC 缺失、角膜上皮发育不良和基质新生血管在 LRIG1 缺失的小鼠中被观察到,LRIG1 是一种中度特异性的 LSC 标记物和炎症调节因子^[40]。此外,角膜上皮细胞增殖能力与肌动蛋白细胞骨架的功能相关,例如 Corn1 中

的角膜上皮营养不良是由于细胞内肌动蛋白细胞骨架重构受损所致^[43]。KLEIP 蛋白也与肌动蛋白细胞骨架组装的调节有关,因此在 KLEIP^{-/-}小鼠 CNV 的发展过程中,角膜上皮肌动蛋白聚合可能是一个病因^[26]。这些结果表明,不同转基因小鼠 CNV 模型可能具有共同的发育机制。这也展示出自发 CNV 模型在血管生成研究中的作用,同时这些模型使得我们对 CNV 的机制有了更加深入的认识。

在角膜囊袋法中,一个或多个促血管生成递质直接植入角膜,刺激血管和(或)淋巴管生长。然而,在基础性血管生成的研究中,以血管生成的单递质机制为中心的还原主义方法被更为全面的观点所取代,涉及到血管生成的相互关联调控机制。在转基因 CNV 模型中,促血管生成信号部分来源于规范的 VEGF 信号(如 Corn1 模型)或 VEGF 独立信号(如晚期 KLEIP^{-/-}CNV)。在几个转基因模型中,可以想象几种不同的促血管生成机制的参与。因此,转基因模型提供了在具有良好特征和实验可接近的环境中研究这些相互交织机制的可能性。

在经典的角膜损伤模型中,CNV 是由确切的刺激诱导产生的,遵循明确的发展模式。然而,一个潜在的问题是,损伤引发了过多的修复过程,其与 CNV 的具体关系尚不清楚。转基因模型由于不依赖实验干预,而是表现为继发于自发病理过程的血管生成,因此开辟了一条不同的途径。一些领域受益于转基因模型的使用,例如炎症机制的研究。CNV 在外伤性模型中通常与显著的炎症活动有关。相应的,在损伤模型中,抗炎治疗减少了 CNV。相比之下,在 CNV 转基因模型中,高炎症和低炎症模型都是可用的。此外,在其他转基因模型中,如 KLEIP^{-/-}模型,炎症存在,但其与血管生成的机制尚未研究。因此,CNV 的转基因模型为研究角膜炎症与血管生成的新机制提供了一个框架。尽管如此,转基因模型将补充而不是取代现有的 CNV 模型。

5 展望

转基因老鼠在对 CNV 的研究中可以补充其他新生血管模型,其表达的自发性 CNV 可以不用依赖实验干预,与其他模型相比使得有可能在更接近真实的病理生理状态下研究新生血管,加速了对角膜血管生成的研究。此外,转基因老鼠模型还有助于研究角膜中的各种信号分子和通路,为研究角膜血管生成的机制提供了一个方便可行的方法,有助于进一步揭示 CNV 发生的机制。但是,由于缺少角膜损伤的修复过程等因素,转基因老鼠模型并不能完全取代其他的 CNV 模型。CNV 转基因老鼠模型的出现,为抗新生血管治疗方案的评估提供了有力的前景,将会是研究 CNV 机制和治疗的良好平台。

参考文献

- 1 Voiculescu OB, Voinea LM, Alexandrescu C. Corneal neovascularization and biological therapy. *J Med Life* 2015; 8 (4): 444-448
- 2 Ellenberg D, Azar DT, Hallak JA, et al. Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Prog Retin Eye Res* 2010; 29 (3):208-248
- 3 Hsu CC, Chang HM, Lin TC, et al. Corneal neovascularization and contemporary antiangiogenic therapeutics. *J Chin Med Assoc* 2015; 78 (6):323-330
- 4 Stanzel TP, Devarajan K, Lwin NC, et al. Comparison of Optical

Coherence Tomography Angiography to Indocyanine Green Angiography and Slit Lamp Photography for Corneal Vascularization in an Animal Model. *Sci Rep* 2018;8(1):11493

5 Lee JE, Kim KL, Kim D, et al. Apatinib - loaded nanoparticles suppress vascular endothelial growth factor - induced angiogenesis and experimental corneal neovascularization. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 4813-4822

6 Chen WL, Chen YM, Chu HS, et al. Mechanisms controlling the effects of bevacizumab (avastin) on the inhibition of early but not late formed corneal neovascularization. *PLoS One* 2014;9(4):e94205

7 张研,陆晓和. 角膜血管新生机制与调控新进展. *眼科新进展* 2008; 28(9):708-710

8 王济民,石蕊,魏会玲,等. 缺氧诱导因子-1 α 及促红细胞生成素在大鼠角膜新生血管中的表达. *国际眼科杂志* 2014; 14(12): 2139-2142

9 Oladipupo SS, Hu S, Santeford AC, et al. Conditional HIF - 1 induction produces multistage neovascularization with stage - specific sensitivity to VEGFR inhibitors and myeloid cell independence. *Blood* 2011;117(15):4142-4153

10 Das A, McGuire PG. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(6):721-748

11 贾雍,田学敏,张百珂,等. 塞来昔布与羊膜匀浆提取液对兔角膜热烧伤后角膜新生血管面积及基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达的影响. *眼科新进展* 2017;37(4): 321-325

12 魏欣,王琳,邓应平. 家兔常见角膜新生血管模型的建立. *国际眼科杂志* 2012;12(3):444-446

13 程光辉,姜威,朱雅琪,等. 白介素-1受体拮抗剂抑制角膜新生血管及血管内皮生长因子表达的研究. *氨基酸和生物资源* 2014;36(1):32-35

14 Cooper CA, Bergamini MV, Leopold IH. Use of flurbiprofen to inhibit corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1980;98(6):1102-1105

15 Tang Z, Zhang F, Li Y, et al. A mouse model of the cornea pocket assay for angiogenesis study. *J Vis Exp* 2011;(54): e3077

16 金玲,蔡郑东,楼月芳. 内毒素诱导兔角膜新生血管模型实验研究. *中华实验眼科杂志* 1998;16(2):85-86

17 方廷兵,严浩,徐志蓉,等. VEGF-C拮抗剂对大鼠角膜新生血管的抑制及对移植成功的的影响. *中国现代药物应用* 2018;12(16): 216-218

18 Damms T, Ross JR, Duplessie MD, et al. Intracorneal bovine albumin: an immunologic model of corneal angiogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;235(10):662-666

19 Niederkorn JY, Ubelaker JE, Martin JM. Vascularization of corneas of hairless mutant mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31(5):948-953

20 Kaminska GM, Niederkorn JY. Spontaneous corneal neovascularization in nude mice. Local imbalance between angiogenic and anti-angiogenic factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34(1):222-230

21 Cursiefen C, Ikeda S, Nishina PM, et al. Spontaneous corneal hem- and lymphangiogenesis in mice with destrin - mutation depend on VEGFR3 signaling. *Am J Pathol* 2005;166(5):1367-1377

22 Ambati BK, Nozaki M, Singh N, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* 2006;443(7114):993-997

23 Albuquerque RJC, Hayashi T, Cho WG, et al. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med* 2009;15(9):1023-1030

24 Bazzoni G, Tonetti P, Manzi L, et al. Expression of junctional adhesion molecule-A prevents spontaneous and random motility. *J Cell Sci* 2005;118(3):623-632

25 Chatterjee S, Wang Y, Duncan MK, et al. Junctional adhesion

molecule - A regulates vascular endothelial growth factor receptor - 2 signaling-dependent mouse corneal wound healing. *PLoS One* 2013; 8(5): e63674

26 Hara T, Ishida H, Raziuddin R, et al. Novel kelch-like protein, KLEIP, is involved in actin assembly at cell-cell contact sites of Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 2004;15(3):1172-1184

27 Hahn N, Dietz CT, Kuhl S, et al. KLEIP deficiency in mice causes progressive corneal neovascular dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(6):3260-3268

28 Kather JN, Friedrich J, Woik N, et al. Angiopoietin-1 is regulated by miR-204 and contributes to corneal neovascularization in KLEIP-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(7):4295-4303

29 Norman B, Davis J, Piatigorsky J. Postnatal gene expression in the normal mouse cornea by SAGE. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(2): 429-440

30 Chen Y, Carlson EC, Chen ZY, et al. Conditional Deletion of Cited2 Results in Defective Corneal Epithelial Morphogenesis and Maintenance. *Dev Biol* 2009;334(1):243-252

31 Gehring WJ, Ikeo K. Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet* 1999;15(9):371-377

32 Davis J, Piatigorsky J. Overexpression of Pax6 in mouse cornea directly alters corneal epithelial cells: changes in immune function, vascularization, and differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(7):4158-4168

33 Ramaesh T, Collinson JM, Ramaesh K, et al. Corneal abnormalities in Pax6+/- small eye mice mimic human aniridia-related keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(5):1871-1878

34 Seo S, Singh HP, Lacial PM, et al. Forkhead box transcription factor FoxC1 preserves corneal transparency by regulating vascular growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(6):2015-2020

35 Koo HY, Kume T. FoxC1 - dependent regulation of vascular endothelial growth factor signaling in corneal avascularity. *Trends Cardiovasc Med* 2013;23(1):1-4

36 DaSilva-Arnold SC, Thyagarajan A, Seymour LJ, et al. Phenotyping acute and chronic atopic dermatitis - like lesions in Stat6VT mice identifies a role for IL-33 in disease pathogenesis. *Arch Dermatol Res* 2018;310(3):197-207

37 Conwell M, DaSilva - Arnold S, Luo N, et al. Model of allergic keratoconjunctivitis - Stat6 signaling in chronic inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(15):2081

38 Fey D, Matallanas D, Rauch J, et al. The complexities and versatility of the RAS-to-ERK signalling system in normal and cancer cells. *Semin Cell Dev Biol* 2016;58:96-107

39 Bargagna-Mohan P, Ishii A, Lei L, et al. Sustained activation of ERK1/2 MAPK in Schwann cells causes corneal neurofibroma. *J Neurosci Res* 2017;95(9):1712-1729

40 Nakamura T, Hamuro J, Takaishi M, et al. LRIG1 inhibits STAT3-dependent inflammation to maintain corneal homeostasis. *J Clin Invest* 2014;124(1):385-397

41 Baulmann DC, Ohlmann A, Flugel-Koch C, et al. Pax6 heterozygous eyes show defects in chamber angle differentiation that are associated with a wide spectrum of other anterior eye segment abnormalities. *Mech Dev* 2002;118(1):3-17

42 Ksander BR, Kolovou PE, Wilson BJ, et al. ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. *Nature* 2014;511(7509):353-357

43 Sakae I, Cunningham LA, Dawnalyn B, et al. Aberrant actin cytoskeleton leads to accelerated proliferation of corneal epithelial cells in mice deficient for destrin (actin depolymerizing factor). *Human Molecular Genetics* 2003;12(9):1029-1037