

Avastin 两种用药方法抑制大鼠角膜碱烧伤后早期新生血管增生的比较

李 灵¹, 席兴华², 岳 辉¹

作者单位:¹(410006)中国湖南省长沙市四医院眼科;²(518020)中国广东省深圳市人民医院眼科

作者简介:李灵,硕士,研究方向:眼表疾病及眼外伤。

通讯作者:席兴华,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:眼表疾病及眼外伤。xhx96@yahoo.com.cn

收稿日期:2010-12-08 修回日期:2011-02-14

Comparison of Avastin's two different treatment methods to early proliferation of corneal neovascularization after alkali burn in rats

Ling Li¹, Xing-Hua Xi², Hui Yue¹

¹Department of Ophthalmology, the Fourth Hospital of Changsha City, Changsha 410006, Hunan Province, China; ²Department of Ophthalmology, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China

Correspondence to: Xing-Hua Xi. Department of Ophthalmology, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China. xhx96@yahoo.com.cn

Received: 2010-12-08 Accepted: 2011-02-14

Abstract

• **AIM:** To investigate avastin eyedrops and subconjunctival injection of avastin on corneal neovascularization (CNV) induced by corneal alkali burns (CAB) in SD rats.

• **METHODS:** Single eye corneal alkali burn model was established in 60 SD rats. The rats were divided into 3 groups randomly. Group A (control group), group B (avastin eyedrops group) and group C (subconjunctival injection of avastin group), 20 rats in each group. The occurrence and development of CNV were observed termly by slit lamp microscope on the 3th, 5th, 7th, 14th day after corneal alkali burn, and the area of CNV was calculated by computer image analysis. Then five rats of each group were killed on the 3th, 5th, 7th, 14th day after corneal alkali burn, and the corneas were taken for Immunohistochemistry technique to detect VEGFR-2, and immunofluorescence examination to detect CD31.

• **RESULTS:** The CNV areas of group B, C was smaller than group A ($P < 0.01$), however there is no significant difference between B and C in terms of CNV areas ($P > 0.01$). The level of VEGFR-2 and CD31 expression in group B, C was lower than group A ($P < 0.01$), however there is no significant difference between B and C ($P > 0.01$).

• **CONCLUSION:** Avastin eyedrops and subconjunctival injection of avastin can effectively inhibit CNV after alkali burns.

• **KEYWORDS:** corneal neovascularization; avastin; treatment methods

Li L, Xi XH, Yue H. Comparison of Avastin's two different treatment methods to early proliferation of corneal neovascularization after alkali burn in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(3):400-402

摘要

目的:探讨 avastin 滴眼液和结膜下注射方法对 SD 大鼠角膜碱烧伤后早期新生血管增生的影响。

方法:制作 SD 大鼠角膜碱烧伤动物模型,随机分成 3 组, A 组(对照组)、B 组(avastin 滴眼液组)、C 组(avastin 结膜下注射组),每组 20 只。各组分别在烧伤后 3, 5, 7, 14d 应用裂隙灯显微镜观察角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 增生情况,拍照并计算 CNV 面积变化。同时每组各处死大鼠 5 只,摘取角膜组织,采用免疫组织化学方法检测 VEGFR-2 的表达,免疫荧光法检测 CD31 表达。

结果:A 组在伤后各时段 CNV 增生面积均大于 B, C 组; B, C 组伤后各个时段 VEGFR-2 及 CD31 的表达均显著低于 A 组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 而 B, C 两组之间 CNV 增生面积及伤后各时段 VEGFR-2 及 CD31 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.01$)。

结论:角膜碱烧伤后早期应用 avastin 滴眼液和结膜下注射均能有效地抑制 CNV 生成。

关键词:角膜新生血管; avastin; 用药方法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.03.007

李灵, 席兴华, 岳辉. Avastin 两种用药方法抑制大鼠角膜碱烧伤后早期新生血管增生的比较. 国际眼科杂志 2011;11(3):400-402

0 引言

碱烧伤常引起弥漫性眼前段损伤,并迅速激发炎症反应,导致角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 的生成。CNV 的生长是一个复杂的过程,受多种因素的综合调控,主要与促血管生成因子和抗血管生成因子的平衡失调有关^[1]。Lai 等^[2]实验证明,特异性地下调 VEGF 的产生可以明显减少 CNV 的形成。近年来已有人将 avastin 应用于眼部新生血管性疾病的防治,我们通过建立 SD 大鼠角膜碱烧伤模型的方法,比较观察应用 avastin 滴眼液和结膜下注射两种不同用药方法对早期 CNV 增生的影响,为临床寻找一种既简单易行又经济有效的 CNV 早期防治方法。

1 材料和方法

1.1 材料 健康雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 200 ~ 250g,并经眼部检查排除外眼和眼底疾患,均由中南大学湘雅二医院

表 1 SD 大鼠角膜碱烧伤后 CNV 面积和 VEGFR-2 及 CD31 表达的比较 (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

分组		3d	5d	7d	14d
CNV (mm ²)	A 组	5.31 ± 0.26 ^{b,d}	9.13 ± 0.57 ^{b,d}	12.95 ± 0.68 ^{b,d}	13.20 ± 0.73 ^{b,d}
	B 组	3.17 ± 0.26	5.12 ± 0.16	6.10 ± 0.26	8.90 ± 0.40
	C 组	3.16 ± 0.14	5.23 ± 0.30	6.33 ± 0.30	8.48 ± 0.61
VEGFR-2	A 组	5810 ± 344 ^{b,d}	10062 ± 776 ^{b,d}	8594 ± 407 ^{b,d}	6525 ± 414 ^{b,d}
	B 组	4848 ± 481	8486 ± 375	7679 ± 400	5642 ± 421
	C 组	4839 ± 395	8527 ± 374	7647 ± 363	5488 ± 439
CD31	A 组	3732 ± 393 ^{b,d}	7734 ± 444 ^{b,d}	6760 ± 410 ^{b,d}	4772 ± 4100 ^{b,d}
	B 组	2587 ± 4061	6565 ± 428	5594 ± 418	3508 ± 429
	C 组	2570 ± 499	6527 ± 457	57892 ± 348	3810 ± 4592

^bP < 0.01 vs B 组; ^dP < 0.01 vs C 组。

动物实验中心提供。一抗:兔抗鼠 VEGFR-2 抗体(Thermo Fisher Scientific 公司),小鼠抗大鼠 CD31 抗体(Santa 公司)。二抗:即用型 SP 系列检测试剂盒 SP-9001(北京中杉生物技术有限公司),羊抗小鼠 Ig-FITC (Santa 公司)。二氨基联苯胺(DAB)显色剂(北京中杉生物技术有限公司)。眼科显微手术器械、光学显微镜 Olympus-PM-10AK, 荧光造影仪 TRC-50EXHPIAS-1000, 图像分析仪(Image-Pro Plus 6.0)及其他相关试剂由中南大学湘雅二医院提供。将 avastin 加入灭菌用水中配置成 4g/L 滴眼液, 放于 4℃ 冰箱储存。

1.2 方法 用 100g/L 水合氯醛(3mL/kg) ip 麻醉, 10g/L 丁卡因滴眼液表面麻醉, 将直径为 3mm 圆形滤纸在 1mol/L NaOH 中充分浸透 20s, 取出滤纸, 吸去多余滤液, 贴于角膜中央烧灼 30s, 移去滤纸后立即用 30mL 无菌生理盐水冲洗结膜囊, 以 3g/L FPA 滴眼, 复方托吡卡胺散瞳。碱烧伤动物模型制备后, 随机将 60 只大鼠分为 3 组, 每组 20 只。A: 对照组, 3g/L FPA, 2 次/d, 用药 2wk。B: avastin 滴眼液组, 4g/L avastin 滴眼液 + 3g/L FPA, 2 次/d, 用药 2wk。C: avastin 结膜下注药组, 3g/L FPA, 2 次/d, 用药 2wk, 第 2 和 6d 结膜下注射 avastin 1.25mg。

1.2.1 角膜新生血管的观察 烧伤后 3, 5, 7, 14d 裂隙灯显微镜观察 CNV 发生情况, 并进行照相, 计算面积。一旦发现角膜缘内有 CNV 增生, 每次均测量自角巩膜缘长出的 CNV 长度, 记录其累及角膜的圆周钟点数。测量时, 以连续弯曲度小, 朝向角膜混浊中心生长的最长血管为准。按 Robert 公式计算新生血管面积 $S = c/12 \times 3.1416 \times [r^2 - (r-l)^2]$, c 为 CNV 累及角膜的圆周钟点数, l 为 CNV 从角膜缘深入角膜的长度, r 为 SD 大鼠角膜半径。

1.2.2 VEGFR-2 蛋白表达的测定 烧伤后 3, 5, 7, 14d 观察结束后, 采用颈椎脱臼法处死 SD 大鼠, 沿角膜缘剪下整个角膜组织, 置于 40g/L 多聚甲醛溶液中固定 12 ~ 24h。常规脱水, 石蜡包埋, 做 4μm 连续切片。石蜡切片脱蜡, 30mL/L H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶, 0.01mmol/L 枸橼酸盐缓冲液高压抗原修复, 滴加封闭用正常山羊血清工作液, 血清封闭。一抗湿盒中 4℃ 过夜, 二抗室温下孵育 15min。DAB 显色, 苏木素复染、脱水、透明、封片, 光镜下观察。细胞质内或核膜上呈棕黄色者为阳性, 仅细胞核着蓝色者为阴性。利用图像分析仪(Image-Pro Plus 6.0)测定免疫组织化学染色阳性反应物的 IA 值以反映各组标本检测的蛋白相对含量。

1.2.3 CD31 表达的测定 烧伤后 3, 5, 7, 14d 观察结束后, 采用颈椎脱臼法处死 SD 大鼠, 沿角膜缘剪下整个角

膜组织, 置于 40g/L 多聚甲醛溶液中固定 12 ~ 24h。常规脱水, 石蜡包埋, 做 4μm 连续切片。石蜡切片脱蜡, 30mL/L H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶, 0.01mmol/L 枸橼酸盐缓冲液高压抗原修复, 滴加一抗小鼠抗大鼠 CD31 抗体, 将玻片置于有盖搪瓷盒内, 37℃ 保温 30min。加一滴一定稀释度的荧光标记的羊抗小鼠 Ig-FITC, 37℃ 保温 30min, 甘油封片, 荧光显微镜高倍视野下观察。波长 550nm 光线照射下可见绿色荧光, 呈点状或管状为阳性, 未发出绿色荧光者为阴性。利用图像分析仪(Image-Pro Plus 6.0)测定免疫荧光阳性反应物的 IA 值以反映各组标本检测的蛋白相对含量。

统计学分析: 所有数据均采用 SPSS 11.0 统计软件包进行分析。计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多个样本均数间两两比较的 SNK-q 检验。P < 0.01 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜新生血管的观察 角膜碱烧伤后 1d, 角膜上皮缺失, 浅层基质水肿, 角巩缘血管扩张充血; 3d, 角膜缘部可见毛刷状新生血管生长, 可见角巩缘处毛细血管扩张; 5d, 新生血管伸向透明角膜生长, 并且相互之间有吻合支; 7d, 可观察到大量、密集粗乱的新生血管长入角膜; 14d, 角膜缘全周都可见新生血管并长入损伤区。碱烧伤后 3, 5, 7, 14d 新生血管面积比较, A 组与 B, C 组差异有统计学意义(P < 0.01); B, C 组之间比较差异无统计学意义(表 1)。

2.2 VEGFR-2 的表达 角膜碱烧伤后 3d, A 组可见炎性细胞, 角膜前 1/3 基质层可见 VEGFR-2 染色阳性表达, B, C 两组呈弱阳性表达。5, 7d, A 组在前 1/3 基质层及中基质层 VEGFR-2 阳性信号强于 B, C 组。14d, A 组全基质层内胞质可见 VEGFR-2 表达, 较前减弱, 而 B, C 组 VEGFR-2 表达呈弱阳性, 角膜内炎性改变稍轻。VEGFR-2 IA 值分析显示, 烧伤后 3, 5, 7, 14d, A 组均与 B, C 组有显著性差异(P < 0.01), 而 B, C 组之间比较无显著性差异(表 1)。

2.3 CD31 的表达 角膜碱烧伤后 3 d, A 组角膜浅 1/3 基质层可见绿色荧光的新生管腔, 但管腔不连续, B, C 组可见少量散在点状绿色荧光; 5d, A 组角膜组织新生血管轮廓稍分明, 荧光明显增强, B, C 组虽然荧光增强, 模糊可见血管轮廓, 但弱于 A 组; 7d, A 组依稀可见血管轮廓, 少许管腔连续, 荧光稍减弱, B, C 组荧光减弱; 14d, A 组血管结构不清晰, 且荧光逐渐减弱, B, C 组角膜组织可见点线状绿色荧光, 荧光较 A 组弱。总之, B, C 两个实验组各个时段 CD31 的荧光表达低于 A 组, 差异均具有统计学意义(P < 0.01), 而 B, C 两个实验组各个时段 CD31 的荧光表达差异无统计学意义(表 1)。

3 讨论

CNV 的形成与 VEGF 的过度表达密切相关。在炎症性角膜血管化时,上皮细胞和内皮细胞中的 VEGF 表达显著增加,特别是在瘢痕组织的成纤维细胞和巨噬细胞周围^[3]。VEGF 与 VEGFR 结合后,VEGFR 发生自磷酸化,继而激活磷脂酰胆碱特异性磷脂酶 C,后者水解磷脂酰肌醇二磷酸,产生二磷脂甘油和三磷酸肌醇,激活胞质中的蛋白激酶 C,并固定于细胞膜上,诱导内皮细胞的生长,增加血管通透性^[3]。VEGF 家族的成员与不同的受体结合产生不同的作用。其中 VEGFR-2 特异地表达于血管内皮祖细胞和血管内皮细胞上,与血管生成密切相关。它是内皮细胞中介导 VEGF 信号的功能性受体,VEGF 与 VEGFR-2 结合后能促进内皮细胞的移行和出芽、血管渗漏和新生血管的形成^[4]。CD31 与内皮细胞的运动有关,由于在发育和成熟个体的所有血管内皮细胞都有高度表达的 CD31,因此 CD31 常常被用来作为血管内皮细胞的标志物。将培养的内皮细胞在其培养基中加入 CD31 抗体时,不能形成正常的细胞与细胞之间的接触。如将抗体去除,则可以逆转这种抑制作用,但向完整的单细胞层中加入抗体并不影响细胞的黏附,提示 CD31 在内皮细胞的相互接触中起了重要作用。因此 VEGFR-2 和 CD31 均是 CNV 的特异性标志物。本实验采用免疫组织化学的方法观察 VEGFR-2 的表达,免疫荧光的方法观察 CD31 的表达,均能特异地定量分析 CNV 的数量,有效地比较不同用药方法的差异。

Avastin 是针对 VEGF 人工合成的一种重组人源化 IgG₁ 型 mAb,其轻链可变区由鼠源部分组成,能与 VEGF 结合,重链固定区和大部分轻链区为人源部分。Avastin 对 VEGF-A 的所有亚型都具有亲和力,其抗新生血管的主要机制为阻止 VEGF 与内皮细胞表面的 VEGFR-1 和 VEGFR-2 受体结合,阻止血管渗漏和新生血管的形成,从而使内源化 VEGF 的生物活性失效。Avastin 这种良好的抗 VEGF 活性作用,不仅改善了肿瘤患者的预后,也为眼科等新生血管增生性病治疗带来了希望^[5]。Yoeruek 等^[6]报道浓度 0.25 ~ 5.0g/L avastin 对角膜细胞没有毒性作用。因而 avastin 能安全地用于治疗 CNV。我们所用 avastin 浓度分别为 4 和 25g/L,均在安全范围以内,保证了用药的安全性。然而,值得注意的是 avastin 是一种生物制剂,其生物活性可随着储藏时间的延长会发生少量降解,并与保存的环境温度密切相关。已有研究发现,avastin 药液抽取后在 4℃ 条件下保存 6mo 后的降解比例为 15.9%,其保存环境温度以 4℃ 条件下的有效浓度为最高^[7]。因此,在使用过程中应注意药物的冷藏保存,并尽可能做到即配即用。

对于 CNV,我们常用的眼局部给药方式主要有眼局部外用滴眼液和球结膜下注射。滴眼剂滴眼后能使药物在受体部位的眼前段达到适当的浓度,又不引起全身其他系统的不良反应,相对于以全身给药来治疗眼病,具有明显的优势。但药液滴入结膜囊后容易流失,生物利用度相对低。药物直接注入球结膜下后,通过巩膜浸润扩散进入

角膜基质层和角巩膜缘组织进入眼内,适用于眼前段的病变。但注射时患者常会有一定程度的疼痛不适和刺破眼球的危险,以上两种用药方法各有优缺点。而 Yoeruek 等^[8]研究发现,角膜碱烧伤后应用 25g/L avastin 滴眼液滴眼,能有效地抑制 CNV 生成。同时,药物也能有效地渗透角膜进入前房,并无明显的毒副作用。Kim 等^[9]在实验中证实,缝线法制作兔 CNV 模型,结膜下注射 avastin 能有效抑制 CNV 增生,实验组和对照组 VEGF 和 CD31 检测结果有显著性差异。Papathanassiou 等^[10]也证实,结膜下注射 avastin 能有效抑制 CNV,而且早期应用的效果更好。为了寻找既简单方便又经济实用的临床用药方法,本实验比较观察了上述两种 avastin 不同用药方法对早期角膜碱烧伤的治疗作用。结果显示,与对照组(A组)比较,应用 4g/L avastin 滴眼液治疗组(B组)和结膜下注射 avastin 0.05mL(1.25mg)治疗组(C组)的新生血管生长面积显著减小,而且 VEGFR-2 和 CD31 表达明显减弱,差异存在显著性($P < 0.01$)。这些结果充分地说明,与对照组比较,avastin 无论是局部滴眼或结膜下注射均能有效抑制碱烧伤后早期 CNV 增生,而且这两种方法抑制早期 CNV 增生的效果相当。

参考文献

- 1 Benelli R, Morini M, Carrozzino F, et al. Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. *FASEB J* 2002;16(2):267-269
- 2 Lai CM, Spilbury K, Brankov M, et al. Inhibition of corneal neovascularization by recombinant adenovirus mediated antisense VEGF RNA. *Exp Eye Res* 2002;75(6):625-634
- 3 Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis* 2007;38(3):258-268
- 4 Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* 2007;19(10):2003-2012
- 5 Andreoli CM, Miller JW. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2007;18(6):502-508
- 6 Yoeruek E, Spitzer MS, Tatar O, et al. Safety profile of bevacizumab on cultured human corneal cells. *Cornea* 2007;26(8):977-982
- 7 Bakri SJ, Snyder MR, Pulido JS, et al. Six-month stability of bevacizumab (Avastin) binding to vascular endothelial growth factor after withdrawal into a syringe and refrigeration or freezing. *Retina* 2006;26(5):519-522
- 8 Yoeruek E, Ziemssen F, Henke-Fahle S, et al. Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol* 2008;86(3):322-328
- 9 Kim TI, Kim SW, Kim S, et al. Inhibition of experimental corneal neovascularization by using subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin). *Cornea* 2008;27(3):349-352
- 10 Papathanassiou 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