

人血管内皮抑素腺病毒注射液抑制大鼠脉络膜新生血管实验研究

陈丽娟, 宋鹤翔, 苗 林

基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会科研课题资助项目 (No. 20124110)

作者单位: (200060) 中国上海市普陀区人民医院眼科

作者简介: 陈丽娟, 女, 毕业于山东大学, 硕士研究生, 副主任医师, 科室副主任, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病。

通讯作者: 陈丽娟. chenlijuan_sh@sina.com

收稿日期: 2016-12-21 修回日期: 2017-05-09

Inhibition of the recombinant human endostatin adenavirus on experimental choroidal neovascularization in rats

Li-Juan Chen, He-Xiang Song, Lin Miao

Foundation item: Science Foundation of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (No. 20124110)

Department of Ophthalmology, People's Hospital of Putuo District, Shanghai 200060, China

Correspondence to: Li-Juan Chen. Department of Ophthalmology, People's Hospital of Putuo District, Shanghai 200060, China. chenlijuan_sh@sina.com

Received: 2016-12-21 Accepted: 2017-05-09

Abstract

• **AIM:** To investigate the inhibition of the recombinant human endostatin adenavirus (Ad - Es) on the experimental choroidal neovascularization (CNV) models by intravitreal injection.

• **METHODS:** Experimental CNV models were induced by semiconductor laser in 30 male Brown Norway (BN) rats and randomly divided into 3 groups with 10 rats in each group. At 21d after photocoagulation, the single administration group were given intravitreal injection with Ad-Es 0.01mL; the repeated administration group were given intravitreal injection with Ad-Es 0.01mL and a repeated injection 7d later; the saline control group were given intravitreal injection with saline 0.01mL. At 7d after final administration, the leakage of fundus fluorescein angiography (FFA) was observed. Various CNV areas were measured by using laser confocal microscopy of choroidal flatmount method. Pathology and ultrastructure were observed with light microscopy, the expressions of CD105 were measured by immunohistochemistry.

• **RESULTS:** The leakage of CNV of the administration group obviously decreased as compared with those in the saline group, the leakage of repeated administration group decreased compared with that of single

administration group ($P < 0.05$). Laser confocal microscope quantitative CNV analysis showed that CNV area of the administration group was significantly smaller than that of control group, the area of repeated administration group was smaller than that of single administration group ($P < 0.05$). Under the light microscope, the vascular endothelial cell number and quantity of the administration group were significantly lower than that of the control group, the cell number of repeated administration group was lower than that of single administration group. CD105 expression of the administration group was significantly weaker than that in the saline group; the expression of repeated administration group was weaker than that of single administration group.

• **CONCLUSION:** Ad - Es can effectively inhibit semiconductor laser induced CNV in BN rats, and the inhibition effect of repeated administration group is better than that of single administration group. It may be a useful new method in the treatment of CNV.

• **KEYWORDS:** choroidal neovascularization; animal model; endostatin; adenavirus

Citation: Chen LJ, Song HX, Miao L. Inhibition of the recombinant human endostatin adenavirus on experimental choroidal neovascularization in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(6):1037-1041

摘要

目的: 探讨人血管内皮抑素腺病毒注射液 (Ad-Es) 玻璃体注射对半导体激光诱导的 BN (Brown Norway) 大鼠脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 的抑制作用。

方法: 雄性 BN 大鼠 30 只, 右眼眼底采用激光光凝建立 CNV 模型, 按随机数字表法分为三组: 单次给药组、重复给药组及生理盐水对照组。光凝后 21d, 单次给药组玻璃体腔内注射 Ad-Es 0.01mL; 重复给药组玻璃体腔内注射 Ad-Es 0.01mL, 并于 1wk 后重复给药; 生理盐水对照组玻璃体腔内注射生理盐水 0.01mL。观察各组末次给药后 7d 荧光眼底血管造影荧光素渗漏情况, 应用激光共焦显微镜下脉络膜血管平铺法测量各组 CNV 面积, 光镜下观察组织细胞学变化, 免疫组织化学检测 CNV 组织中 CD105 的表达。

结果: FFA 造影显示给药组渗漏发生率明显低于生理盐水对照组, 重复给药组渗漏发生率低于单次给药组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 激光共焦显微镜下 CNV 定量分析显示给药组 CNV 面积显著低于对照组, 重复给药组 CNV 面积低于单次给药组, 差异均有统计学意义 ($P <$

0.05)。光镜下光凝部位新生血管内皮细胞数,给药组明显低于对照组,重复给药组低于单次给药组;CNV组织中CD105的表达,给药组明显低于生理盐水组,重复给药组低于单次给药组。

结论:Ad-Es可以有效抑制动物模型的CNV生成,重复给药组抑制效果优于单次给药组,为治疗CNV提供了一种可能的途径。

关键词:脉络膜新生血管;动物模型;内皮抑素;腺病毒

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.6.07

引用:陈丽娟,宋鹤翔,苗林.人血管内皮抑素腺病毒注射液抑制大鼠脉络膜新生血管实验研究.国际眼科杂志2017;17(6):1037-1041

0 引言

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是湿性年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)的病理基础和视功能损害的关键因素^[1]。脉络膜新生血管缺乏正常血管的组织结构,因而会造成所在部位的水肿、渗漏等病理性改变,进而引起疾病发生^[2]。如何有效地抑制CNV内皮细胞的异常增殖,已经成为控制CNV的新靶点。当前一些用于肿瘤的化疗药,如ranibizumab和bevacizumab能有效地治疗眼部的CNV,提高视力。内皮抑素是一种特异性血管内皮生长抑制因子,具有很强的血管生成抑制作用,人血管内皮抑素腺病毒注射液(recombinant human endostatin adenovirus, Ad-Es)是以腺病毒作为载体携带内皮抑素基因在体内表达和作用的制剂,是首个进入临床研究的新抗肿瘤基因治疗药物。本研究采用Ad-Es玻璃体腔注射,观察对半导体激光诱导的BN(Brown Norway)大鼠CNV的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级6~8周龄雄性Brown Norway(BN)大鼠30只,体质量200~220g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司(实验动物质量合格证:SCXK2012-0001)。眼科检查确认屈光介质及眼底检查均正常,取右眼为实验眼,符合动物保护条例。Ad-Es注射液(广州达博生物制品有限公司,含Ad-Es 1×10^{12} VP病毒颗粒/mL/支)、复方托吡卡胺滴眼液(日本参天株式会社)、荧光素钠注射液(美国爱尔康公司)、半导体激光机(法国光太)、激光扫描共焦眼底血管造影机(HRT II,德国海德堡公司)、鼠CD105单克隆抗体(美国NeoMarkers公司)、SP免疫组化试剂盒为福州迈新公司产品。

1.2 方法

1.2.1 CNV模型建立 BN大鼠采用氯胺酮腹腔注射(5mg/kg)麻醉,右眼滴复方托吡卡胺滴眼液散瞳后,放置于810nm半导体激光机前,选择激光波长为810nm,光斑100 μ m,曝光时间0.1s,调整激光功率在100~150mW,将瞄准光斑聚焦在视网膜上,通过裂隙灯间接眼底镜,对距离视盘1.5~2.0个视盘直径处视网膜进行光凝,每只眼光凝10次,光凝后光斑反应为Ⅲ级,颜色呈浓白色,光凝后有气泡表明击穿Bruch膜。

1.2.2 实验动物分组及给药 BN大鼠(30只)CNV模型,按随机数字表法分为3组,每组10只。单次给药组:激光光凝后21d,右眼玻璃体腔内注射Ad-Es 0.01mL。重复

表1 各组大鼠荧光造影渗漏比较

组别	眼数	无明显渗漏	轻度渗漏	中度渗漏	重度渗漏
单次给药组	10	1	5	4	0
重复给药组	10	3	6	1	0
生理盐水对照组	10	0	0	3	7

给药组:激光光凝后21d,右眼玻璃体腔内注射Ad-Es 0.01mL,1wk后重复玻璃体腔内注射Ad-Es 0.01mL。生理盐水组:激光光凝后21d,右眼玻璃体腔内注射生理盐水0.01mL。

1.2.3 荧光素眼底血管造影观察CNV荧光渗漏 各组于给药前及给药后第7d,腹腔内注射10%荧光素钠0.5mL/kg,行荧光造影,采用激光扫描共焦海德堡眼底造影机判断CNV形成情况,以静脉晚期(注入荧光素钠后500~600s)荧光素渗漏程度进行评分。0:无渗漏;1:轻微渗漏;2:中度渗漏;3:剧烈渗漏。

1.2.4 脉络膜血管平铺法激光共焦显微镜下CNV面积测定 于给药后7d行荧光造影后,每组各取动物4只(4眼)行CNV面积测量。麻醉大鼠后快速分离暴露两侧颈总动脉,血管灌注异硫氰酸荧光素-右旋糖酐(FITC-dextran)1mL,摘除眼球,于4%多聚甲醛液中固定1h,沿赤道部打开眼球,去除眼前节,用毛笔去除视网膜神经上皮,做4~6条放射状切口,使眼杯平铺于含液体介质的载玻片,巩膜面朝下。利用激光共焦显微镜进行观察和测量,以488nm激光激发样品,收集530nm荧光信号,观察CNV形态并测定CNV区域面积,计算机采集的数字图像经confocal assistant转换后由Photoshop 6.0编辑排版,CNV面积采用Laserpix软件(美国Bio-Rad公司产品)进行自动测量。

1.2.5 视网膜病理HE染色观察各组光凝部位血管数量及内皮细胞变化 每组各取动物6只(6眼),于给药后7d行荧光造影后,摘除眼球,立即固定于4℃、4%多聚甲醛PBS液,石蜡包埋,4 μ m连续切片,HE染色。每组各取10张切片,每张病理切片分别对3个视野进行观察。

1.2.6 应用免疫细胞化学标志CD105识别血管内皮细胞 从各组随机抽取20张4 μ m石蜡切片,采用SP法染色,以血管内皮细胞胞质中见棕黄色或棕褐色颗粒为阳性,用缓冲液替代一抗作为阴性对照,检测各组大鼠CNV组织中CD105的表达变化。

统计学分析:采用SPSS20.0统计学软件进行数据分析,计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组之间的构成比比较采用 χ^2 检验,CNV面积比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用SNK-q检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组给药后7d时FFA荧光渗漏情况 正常大鼠FFA:视网膜血管以视盘为中心呈放射状,脉络膜血管呈网状分布。在给药前造影,造模眼均出现强荧光渗漏,光凝斑中CNV阳性部位动脉早期出现血管性强荧光,且造影后期荧光素持续增强扩散的高荧光区(图1)。给药后7d,每组10眼行荧光造影,结果见表1。经统计学检验,三组差异有统计学意义($P < 0.05$),单次给药组和重复给药组渗漏的发生率明显低于生理盐水对照组,重复给药组渗漏发生率低于单次给药组。

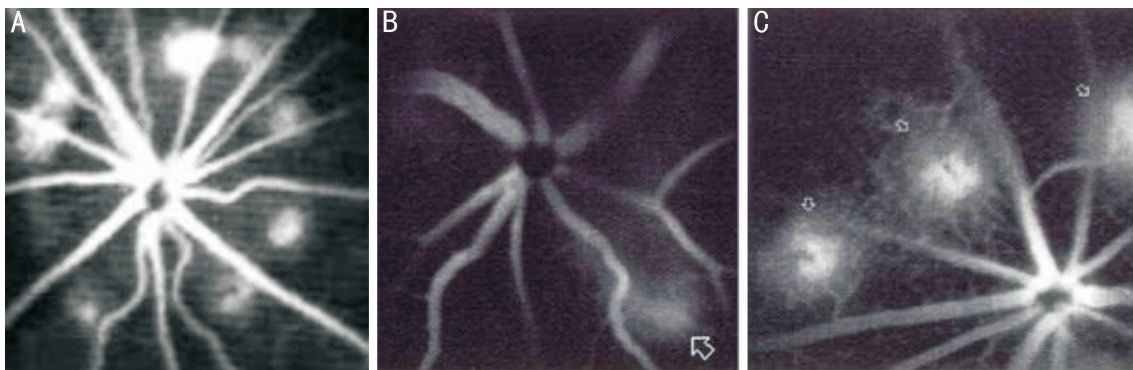


图1 大鼠视网膜血管荧光造影 A:轻度渗漏;B:中度渗漏;C:重度渗漏。

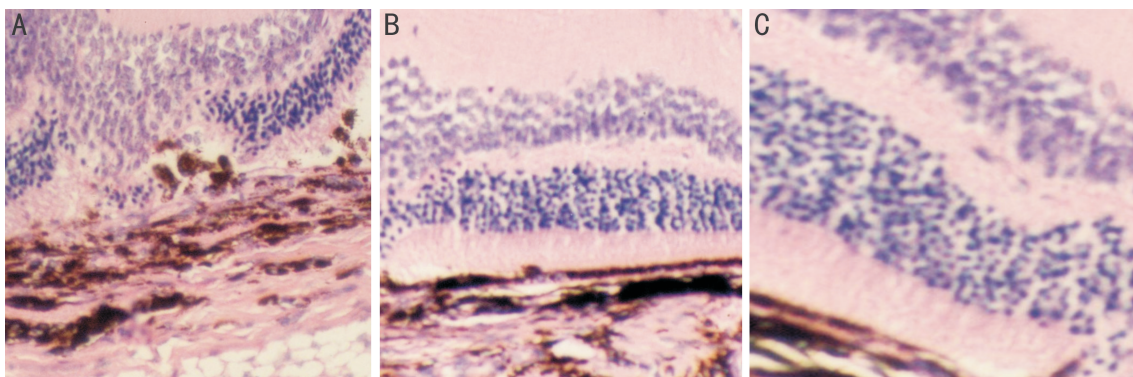


图2 各组大鼠视网膜形态学变化(HE×400) A:生理盐水对照组;B:单次给药组;C:重复给药组。

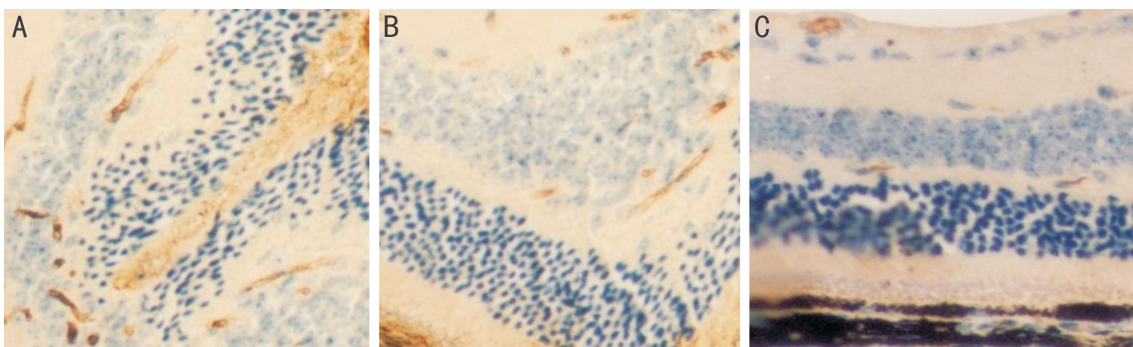


图3 各组大鼠视网膜 CD105 的表达(SP×400) A:生理盐水对照组;B:单次给药组;C:重复给药组。

2.2 各组大鼠 CNV 面积定量分析 FITC-右旋糖酐标记 CNV,激光共聚焦显微镜下 CNV 呈网状高荧光斑,测量出 CNV 面积。单次给药组 CNV 面积 $20\,709 \pm 1\,321 \mu\text{m}^2$,重复给药组 CNV 面积 $7\,980 \pm 1\,424 \mu\text{m}^2$,生理盐水对照组 CNV 面积 $45\,667 \pm 1\,744 \mu\text{m}^2$,通过 SNK-q 统计方法进行两两比较,结果显示:给药后 7d,玻璃体腔注射单次给药组和重复给药组 CNV 的平均面积明显低于生理盐水组,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。且单次给药组和重复给药组 CNV 平均面积的组间差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠光凝部位血管数量及内皮细胞变化 给药后 7d,光镜观察各组光凝部位血管数量及内皮细胞。生理盐水对照组(图 2A)激光斑处内外核层细胞排列失去正常形态,视网膜内屏障破坏,RPE 色素呈现不规则增殖或脱失,Bruch 膜破裂,可见大量炎症细胞聚集,脉络膜显著增厚,脉络膜毛细血管层可见大量内皮细胞和新生血管形成;单次给药组(图 2B)光凝区纤维血管形成较少,可见炎症细胞浸润;重复给药组(图 2C)内皮细胞和新生血管形

成最少,各层组织结构清晰、较完整。

2.4 各组大鼠 CNV 组织中 CD105 的表达变化 生理盐水对照组光凝斑部位血管内皮细胞胞质中见大量棕黄色颗粒,在单次给药组及重复给药组光凝斑部位棕黄色颗粒表达量明显降低,重复给药组表达量更低(图 3)。生理盐水对照组样本内 CD105 的表达量为 1 时,其余各组的相对表达量见图 4。采用 SNK-q 法两两比较计算,各组之间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

CNV 是许多眼部疾病如 ARMD、病理性近视、眼底血管样条纹、外伤性脉络膜破裂、弓形体脉络膜视网膜炎和小柳原田综合症的常见并发症^[3],是多种眼部疾病的重要病理改变,最终导致视力丧失,生活质量下降^[4]。近年来,随着人们对 CNV 发病机制和病理变化有了更加深入的认识,新生血管形成抑制剂为预防 CNV 形成及防止复发带来了希望,已成为基础研究和临床研究的热点^[5]。

CNV 的形成与视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)-Bruch 膜-脉络膜毛细血管复合体的完

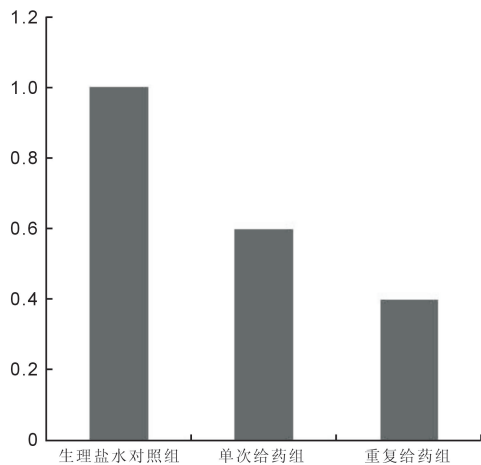


图4 各组大鼠 CD105 的相对表达量。

整性受损有关。由于 RPE 的老化,使其吞噬降解感光细胞外端脱落物的能力下降,沉积于 Bruch 膜表面的脂质物作为外来抗原引发免疫反应,引起 Bruch 膜增厚、破裂以及变性,使来自于脉络膜的毛细血管经 Bruch 膜入侵^[6]。脉络膜新生血管的形成包括了血管内皮细胞活化,细胞外基质的降解,内皮细胞的移行和增殖,血管基底膜被覆,血管腔形成以及周围纤维组织增生等多个病理过程。

机体内有促血管新生因子以及血管新生抑制因子,它们共同调节着血管新生的过程。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)之间的平衡破坏,VEGF 的过量表达导致 CNV 发生。VEGF 的生物学特性是促进血管内皮细胞增殖,然而一旦过量表达则会导致血管通透性增加,促进血管内皮细胞增殖、迁移,从而诱导血管新生。CNV 形成与其他多种疾病新生血管形成过程大致相同,与肿瘤血管具有相同的组织结构特征,血管壁具有高通透性,极易引起出血和渗出。目前,许多抗肿瘤新生血管药物也用于眼部 CNV 的治疗。以雷珠单抗为代表的抗 VEGF 药物已经成为 CNV 的一线治疗药物,但存在效率低、长期用药后疗效降低、停药后复发以及对萎缩型 AMD 无效等缺点。近年开创的基因疗法在脉络膜新生血管的治疗上又提供了一个新的治疗手段。

内皮抑制素(endostatin, ES)是 1997 年 O'Reilly 等^[7]从小鼠血管内皮细胞瘤(EOMA)中分离和提纯出来的一种内源性血管生成抑制剂,是一种较血管生长抑制素更强的特异性血管新生抑制剂^[8]。内皮抑制素能特异性地抑制血管内皮细胞的增殖和迁移,诱导内皮细胞的凋亡。但在临床治疗中 ES 产生作用所需的量很大,需反复多次注射,价格昂贵。同时 ES 的性质不稳定,其活性蛋白难以获得。通过腺病毒载体转导内皮抑素基因,使其转染后在眼部细胞中长期稳定高效地表达,可以有效地弥补蛋白治疗的缺点。同时因血-眼屏障存在,眼球和全身循环相对独立,可以直接作用于 CNV,减少影响眼外器官的机会。其在眼局部的治疗效果最大,对全身的副作用最小,这是基因治疗眼部疾病的优势之一^[9]。

目前,基因治疗常用的载体多为病毒载体^[9],腺病毒载体为临床基因治疗的首选载体,应用最为广泛。其优点在于腺病毒载体宿主范围广,可以快速感染哺乳动物细胞,对人体致病性低,能有效进行增殖,滴度高,与人类基

因同源,且可以携带较大的 DNA 片段^[10]。目前研究表明,RPE 细胞、视网膜血管内皮细胞、周皮细胞、Muller 细胞均能作为转染的靶细胞^[11],RPE 细胞是治疗眼内新生血管性疾病非常合适的靶细胞。

Ad-Es 是以腺病毒作为载体携带内皮抑素基因在体内表达和作用的制剂,是首个进入临床研究的新型抗肿瘤基因治疗药物。该制剂导入人体后,可直接表达大量的活性内皮抑素蛋白,其单位活性优于原核细胞表达系统。另外,其产生的内皮抑素结构更接近于人生理性的内皮抑素,因此不良反应轻。目前已在临床应用于乳腺癌、肝癌、鼻咽癌等肿瘤的治疗^[12-15]。本研究根据肿瘤治疗的给药方式,采取单次给药和重复给药,观察对眼部新生血管的抑制作用。本研究中,我们采用 810nm 半导体激光制造 BN 大鼠的 CNV 模型。激光介导的造模方式简单低廉,易于操作,成模率高,激光功率从 100 ~ 500mW 都有报道^[16-17]。CNV 模型的实验动物主要有猴、兔、鼠等。兔的眼底血循环结构与人类有较大的差异,以猴为代表的灵长目类动物视网膜、脉络膜循环以及黄斑解剖与人类相似,但动物来源有限,费用高。于是鼠成为目前诱导 CNV 模型应用最广泛的实验动物。小鼠眼球小,操作要求更高,BN 大鼠的视网膜和色素成分与人极其相似,是制作 CNV 模型的理想动物^[18-20]。我们的结果表明,光凝后 21d 荧光素眼底血管造影(fundus fluorescence angiography, FFA)显示 CNV 形成且稳定,成模率高,是一种可靠、安全、有效的方法。

抗 VEGF 药物玻璃体腔内注射是一种安全有效的干预手段^[21],广泛应用于临床和动物研究。研究显示,CD105 参与血管生成^[22],特异性表达于处于增生状态的新生血管内皮细胞上,且仅表达于增生的小血管,在大血管为弱阳性及阴性表达,正常组织的血管内皮细胞上无表达^[22]。选择 CD105 作为观察和检测新生血管的判定指标更为准确,优于 VIII 因子,CD105 与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也有 VIII 因子的表达,干扰实验结果。

本研究结果显示,各组 FFA 晚期图像荧光素渗漏,激光共焦显微镜下观察 CNV 面积,组织病理学观察及 CD105 表达均表明,实验组较对照组对 CNV 有抑制作用,重复给药组有更强的抑制效果。研究表明,内皮抑素对脉络膜新生血管有明显的抑制作用^[23-24],我们认为本实验采用较少的眼内注射次数同样达到或优于内皮抑素对 CNV 的抑制效果,但尚缺乏对基因表达内皮抑素蛋白的测定,缺乏与内皮抑素注射的对比研究,缺乏与已应用于临床的雷珠单抗和康柏西普药物对比研究,并且也未比较玻璃体注射与球周注射不同方式的治疗效果,还需进一步实验来完善。

本研究结果说明,Ad-Es 可以有效地抑制 CNV 的发生,两种给药方式中采用重复给药方式对 CNV 有更强的抑制作用,Ad-Es 有望应用于眼科 CNV 的基因治疗。同时对其长期疗效、给药途径、剂量、毒副作用等方面尚需进行进一步实验研究。

参考文献

1 Balaratnasingam C, Dhrami-Gavazi E, Mccann J, et al. Allibercept: a review of its use in the treatment of choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol* 2015;40(9):2355-2371

- 2 Munch IC, Linneberg A, Larsen M. Precursors of agerelated macular degeneration; associations with physical activity, obesity and serum lipids in the Inter 99 eye study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(6):3932-3940
- 3 Gliem M, Finger RP, Fimmers R, *et al.* Treatment of choroidal neovascularization due to angioid streaks: A comprehensive review. *Retina* 2013;33(7):1300-1314
- 4 Pascolini D, Mariotti SP, Pokharel GP, *et al.* 2002 global update of available data on visual impairment; a compilation of population-based prevalence studies. *Ophthalmic Epidemiol* 2004;11(2):67-115
- 5 Ratnapriya R, Chew EY. Age-related macular degeneration-clinical review and genetics update. *Clin Genet* 2013;84(2):160-166
- 6 苏彦, 刘芳. CD40 信号通路和脉络膜新生血管形成的关系. *国际眼科纵览* 2012;36(3):182-188
- 7 O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88(2):277-285
- 8 Benezra R, Bnfi S. Endostatin's endpoints-deciphering the endostatin antiangiogenic pathway. *Cancer Cell* 2004;5(3):205-206
- 9 吕菊玲. 眼部疾病的基因进展. *中华实验眼科杂志* 2016;34(10):952-954
- 10 Romano G, Pacilio C, Giordano A. Gene transfer technology in therapy; current application and future goals. *Stem Cells* 1999;17(4):191-202
- 11 Nielsen LL, Cumani M, Syed J, *et al.* Recombinant E1-deleted adenovirus-mediated gene therapy for cancer; efficacy studies with p53 tumor suppressor gene and liver histology in tumor xenograft models. *Hum Gene Ther* 1998;9(5):681-694
- 12 吴扬, 杨莉, 赵霞, 等. 重组人内皮抑素腺病毒抗肿瘤实验研究. *中华医学遗传学杂志* 2004;21(6):557-561
- 13 Hansma AH, Broxterman HJ, van der Horst I, *et al.* Recombinant human endostatin administered as a 28-day continuous intravenous infusion, followed by daily subcutaneous injections: a phase I and pharmacokinetic study in patients with advanced cancer. *Ann Oncol* 2005;16(10):1695-1701
- 14 曹焯. 重组人内皮抑素腺病毒注射液 I 期临床耐受性实验. *癌症* 2007;26(8):856-860
- 15 Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, *et al.* Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Clin Can Res* 2001;7(11):3410-3415
- 16 Kim SJ, Kim J, Lee J, *et al.* Intravitreal human complement factor H in a rat model of laser-induced choroidal neovascularization. *Br J Ophthalmol* 2013;97(3):367-370
- 17 Nakajima T, Hirata M, Shearer Tr, *et al.* Mechanism for laser-induced neovascularization in rat choroid; accumulation of integrin α chain-positive cells and their ligands. *Mol Vis* 2014;29(11):864-871
- 18 许琴, 黄亮, 林素香, 等. 激光诱导小鼠脉络膜新生血管中膜攻击物与血管生长因子的表达. *眼科新进展* 2013;33(8):729-732
- 19 杨秀梅, 王雨生, 徐建锋, 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
- 20 李瑾, 郝玉华, 赵欣. 实验性脉络膜新生血管动物模型的研究. *河北医科大学学报* 2010;31(4):419-422
- 21 Yan H, Cui J, Wang Y, *et al.* Comparison of the effects between intravitreal and periocular injections of adenoviral vectored pigment epithelium-derived factor on suppressing choroidal neovascularization in rats. *Ophthalmic Res* 2013;49(2):81-89
- 22 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
- 23 Jian L, Panpan Y, Zhaoan S. Suppression of choroidal neovascularization by Endostar in rats. *Mol Med Report* 2014;11(5):3621-3625
- 24 陈丽娟, 苗林. 重组人血管内皮抑素对脉络膜新生血管的抑制作用. *眼科新进展* 2012;32(10):923-925