

· 实验研究 ·

贝伐单抗对小鼠单纯疱疹病毒性角膜炎角膜新生血管和瘢痕形成的抑制作用

周洪伟 王同松 张松梅 谢立信

266071 青岛,山东省眼科研究所

通信作者:谢立信,Email:lixinxie@public.qd.sd.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.12.007

【摘要】 背景 单纯疱疹病毒性角膜炎(HSK)可诱导发生角膜新生血管和炎症反应,传统的治疗药物为阿昔洛韦(ACV),研究已证实贝伐单抗具有抑制新生血管的作用,但其是否对 HSK 发挥治疗作用值得研究。目的 研究贝伐单抗对小鼠 HSK 角膜瘢痕和新生血管的抑制作用。方法 利用体外培养并感染的 Vero 细胞生产单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1),以无血清 DMEM 培养基于冰上对 HSV-1 进行 10 倍梯度稀释后制备成 HSV-1 液。选用 SPF 级雄性 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠 200 只,用 0.6 μ l 滴度为 1×10^7 空斑形成单位(PUF)/ml 的 HSV-1 行小鼠角膜基质注射以制备 HSK 模型,将模型眼分为单纯 ACV 注射组、ACV+贝伐单抗注射组和生理盐水注射组,按照组别分别于感染后 5、8、11 和 14 d 选择角膜混浊评分为 1 分的模型眼结膜下注射 50 μ g ACV、50 μ g ACV+5 μ l 贝伐单抗和 5 μ l 生理盐水。此外采用紫外线照射均有轻度新生血管和瘢痕的 6 只模型小鼠双眼诱导 HSK 复发,于复发后 0、2、4 和 6 d 行 5 μ l 贝伐单抗(25 mg/ml)右眼结膜下注射,左眼结膜下注射 5 μ l 生理盐水。于造模后 5、7、11、14 和 17 d 以及复发的 0、2、4 和 6 d 行小鼠角膜裂隙灯显微镜检查并用角膜知觉测量仪行中央角膜敏感度检测;制备角膜铺片,采用免疫荧光检测法检测角膜中 CD31 和 β III Tubulin 荧光表达以评估角膜新生血管和角膜神经纤维分布;采用 Image J 软件测定角膜新生血管面积和瘢痕面积。结果 HSK 成模率达 80% 以上,造模后 7 d 和复发后 2 d 角膜混浊最重,造模后 15 d 和复发后 2 d 角膜新生血管面积最大。造模后模型眼中央角膜敏感度逐渐降低,于造模后 9 d 下降到最低。ACV+贝伐单抗注射组角膜病变面积小于单纯 ACV 注射组,ACV+贝伐单抗注射组小鼠中央角膜敏感度为 5.50 ± 0.71 ,明显高于生理盐水注射组的 0.50 ± 1.41 ,差异有统计学意义($Z = -2.397, P = 0.029$)。ACV+贝伐单抗注射组小鼠角膜病变面积增长率为 $(167.10 \pm 52.53)\%$,低于生理盐水注射组的 $(312.30 \pm 74.18)\%$,差异有统计学意义($Z = -1.992, P = 0.046$)。实时荧光定量 PCR 显示造模后 7 d,模型眼角膜及同侧三叉神经节(TG)中胸苷激酶(TK)和感染细胞蛋白-27(ICP-27)mRNA 相对表达量均较高,造模后 45 d 明显下降,诱导复发后 2 d TK mRNA 和 ICP-27 mRNA 均再次升高,复发后 7 d 表达量降至最低。造模后 45 d 同侧 TG 中均可见 LAT mRNA 表达量达峰值,诱导复发后 2 d 相对表达量下降,复发后 7 d 相对表达量再次升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。角膜铺片结果显示,造模后生理盐水注射组小鼠较正常对照小鼠角膜新生血管明显增加,角膜神经纤维明显减少,单纯 ACV 注射组和 ACV+贝伐单抗注射组小鼠角膜新生血管少于生理盐水注射组,ACV+贝伐单抗注射组小鼠角膜神经纤维较生理盐水注射组和单纯 ACV 注射组均增加。结论 贝伐单抗结膜下注射可抑制 HSK 模型小鼠角膜新生血管生成和瘢痕形成,与 ACV 联合应用时二者有协同作用。

【关键词】 疱疹病毒性角膜炎;单纯疱疹病毒 I 型;贝伐单抗;角膜新生血管/药物疗法;紫外线;复发;动物模型;近交系 C57BL 小鼠

基金项目:国家自然科学基金项目(81570820)

Inhibitory effects of bevacizumab on corneal neovascularization and scarring in mice with herpes simplex keratitis Zhou Hongwei, Wang Tongsong, Zhang Songmei, Xie Lixin

Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, China

Corresponding author: Xie Lixin, Email:lixinxie@public.qd.sd.cn

[Abstract] **Background** Corneal neovascularization and inflammation occur in herpes simplex keratitis (HSK). Aciclovir (ACV) is an antiviral medication which is primarily used for the treatment of HSV infection.

Bevacizumab is an angiogenesis inhibitor which has the ability to slow the growth of corneal neovascularization. However, whether bevacizumab play treating effects on HSK is worth studing. **Objective** This study attempted to study the effects of bevacizumab on cornea lesion in mouse models of HSK. **Methods** The solution containing herpes simplex virus type-1 (HSV-1) of Mckrae strain was induced by cultured and infectious Vero cells and prepared by ten-times step dilution with free-serum DMEM, and plaque assay was used to detect the viral titers. HSV-1 of 1×10^7 plaque-forming unit (PFU) in $0.6 \mu\text{l}$ was injected into the corneal stroma of 6 to 8-week-old SPF male C57BL/6 mice using a microliter syringe to establish latent HSK mouse models. The models were examined under the slit lamp microscope at day 5, 7, 11, 14 and 17 after modeling as well as day 0, 2, 4 and 6 after recurrence, and the central cornea touch sensitivity was recorded. The models were divided into ACV-injected group, ACV+bevacizumab-injected group and normal saline-injected group, and $5 \mu\text{l}$ normal saline with $50 \mu\text{g}$ ACV, $50 \mu\text{g}$ ACV + $5 \mu\text{l}$ bevacizumab or $10 \mu\text{l}$ normal saline was subconjunctivally injected according to grouping in 4 eyes of each group, respectively. Twelve model eyes were exposed to ultraviolet (UV)-B to induce the recurrent HSK. Corneal wholemounts were prepared at day 9 after modeling for the assessment of corneal neovascularization and nerve fiber distribution by immunofluorescence assay of CD31 and β III Tubulin antibodies. The areas of corneal neovascularization and scarring were measured with Image J software. The change rate of lesion was calculated and described as a ratio of lesion size at day 8 with day 0 after induction recurrence. **Results** The modeling success rate was over 80%, and all infected mice showed latent period at day 45 after modeling. Corneal opacification was the most serious at day 7 after modeling and day 2 after recurrence, and the largest corneal neovascular area was seen at day 15 after modeling and at day 2 after recurrence, and the central cornea touch sensitivity was the worst at day 9 after initial infection. The mean corneal lesion area was 3.348 mm^2 in the ACV+bevacizumab-injected group, which was smaller than 3.930 mm^2 in the ACV-injected group ($Z = -2.309, P = 0.021$). The central corneal sensitivity in the ACV+bevacizumab-injected group was significantly higher than that in the normal saline-injected group (5.50 ± 0.71 versus $0.50 \pm 1.41, Z = -2.397, P = 0.029$). The increase rate of corneal lesion area in the ACV+bevacizumab-injected group was evidently lower than that in the normal saline-injected group ($[167.10 \pm 52.53]\%$ versus $[312.30 \pm 74.18]\%$, $Z = -1.992, P = 0.046$). At the 7th day after modeling, the relative expressing levels of thymidine kinase (TK) and infected-cell protein-27 (ICP-27) mRNA in the corneal tissue and trigeminal ganglion were significantly increased at day 7 and reduced at day 45 after modeling, and the factors raised again at day 2 and retreated at day 7 after induction of recurrence. In addition, the expression of LAT mRNA peaked at day 45 after modeling and reduced gradually at day 2 after recurrence until a new increasing peak at day 7 after recurrence (all at $P < 0.01$). Immunofluorescence showed that compared with the normal saline-injected group, the corneal new vessels were lessened and corneal never fibers were increased in the ACV-injected group and ACV+bevacizumab-injected group. **Conclusions** The combination of bevacizumab with ACV can inhibit corneal neovascularization and scarring in HSK mice, and bevacizumab exhibits a synergistic effect with ACV in management of HSK.

[Key words] Keratitis, herpetic; Herpes simplex virus type-1; Bevacizumab; Corneal neovascularization/drug therapy; Ultraviolet rays; Recurrence; Disease models, animal; Mice, inbred C57BL

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81570820)

单纯疱疹病毒 I 型 (herpes simplex virus type-1, HSV-1) 引起的单纯疱疹病毒性角膜炎 (herpes simplex keratitis, HSK) 是导致中青年患者盲的常见眼病之一^[1]。HSK 过程中常致角膜新生血管生成, 其机制尚未完全阐明。新生血管的管壁结构不完整, 炎症因子可透过新生血管管壁引起炎症反应过程。此外, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是重要的促新生血管生长因子, 其 4 种异构体均可与血管内皮细胞表面的酪氨酸激酶受体结合, 促进血管内皮细胞的分裂和迁移^[2]。正常角膜无血管,

可表达 VEGF 可溶性受体 1 (soluble VEGF receptor 1, sVEGFR-1), 后者与 VEGF 结合并使 VEGF 失活, 从而参与角膜无血管状态和免疫赦免状态的维持^[3], 而 HSV-1 感染使角膜中的 sVEGFR-1 持续性减少^[4], 易引起新生血管, 破坏角膜的免疫赦免状态。此外, HSV-1 DNA 是 Toll 样受体 9 (Toll like receptor 9, TLR9) 配体, 可诱导眼部新生血管生成^[5]。研究发现 HSV-1 感染小鼠角膜后角膜上皮和基质中 VEGF mRNA 及其蛋白表达均升高, 利用 VEGF 受体-1, 即 fms 相关的酪氨酸激酶 1 (fms related tyrosine kinase 1,

Flt-1)前 3 个 Ig 区和 IgG1 的 Fc 段嵌合受体可对 HSK 早期新生血管的生成和角膜瘢痕的形成发挥抑制作用,提示抗 VEGF 药物的应用可作为 HSK 的辅助治疗方法。贝伐单抗是一种人源化的重组 IgG1 抗 VEGF 单克隆抗体,于 2004 年在美国批准上市用于肿瘤新生血管的治疗,在中国广泛用于眼部新生血管性疾病的治疗^[6-8],但是目前尚无研究证据表明贝伐单抗对 HSK 引起的角膜新生血管生成具有抑制作用。阿昔洛韦(aciclovir, ACV)对 HSV-1 具有抑制作用,但贝伐单抗与 ACV 在治疗 HSK 过程中是否具有协同作用尚不清楚。本研究拟探讨贝伐单抗对复发型 HSK 角膜新生血管的抑制作用及其联合应用对初发型 HSK 角膜新生血管和瘢痕形成的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及 HSV-1 SPF 级雄性 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠 200 只[购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,实验动物许可证号:SCXK(鲁)20140007]。McKrae 株 HSV-1 由 Dr. Harvey M. Friedman 馈赠。本研究经山东省眼科研究所实验动物伦理委员会批准。实验动物的喂养和使用遵循 ARVO 声明。

1.1.2 主要试剂及仪器 低糖 DMEM 培养基(美国 Sigma 公司);贝伐单抗(规格:100 mg/4 ml,药品注册证号:S20120068)(瑞士罗氏公司);ACV(规格:0.25 g/瓶,国药准字 H20034034)(国药集团容生制药有限公司);RNA 小提取试剂盒(德国 MACHEREY-NAGEL 公司);逆转录 PCR 试剂盒(大连宝生物工程公司);荧光定量 PCR 染料试剂盒(BYBR Green)(北京天根生化科技有限公司);藻红蛋白(P-phycoerythrin, PE)荧光标记大鼠抗小鼠 CD31 单克隆抗体(货号:553373)(美国 BD 公司);Alexa Fluor 488 标记兔抗小鼠 β III Tubulin 多克隆抗体(AB15708A4)(美国 Millipore 公司)。逆转录 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);荧光定量 PCR 仪(上海拜力生物科技有限公司);10 μ l 微量进样针(瑞士哈美顿博纳图斯股份公司);裂隙灯显微镜(BQ900 型,瑞士 HAAG-STREIT 公司);EOS 600D 照相机(日本 Canon 公司);S4 解剖显微镜(德国 ZEISS 公司);E800 荧光显微镜(日本 Nikon 公司);Cochet 和 Bonnet 角膜知觉测量仪(美国 Richmond 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HSV-1 的生产及滴度测定 利用体外培养并感染的 Vero 细胞来生产 HSV-1,采用反复冻融并离心

取上清的方法收集病毒。以无血清 DMEM 培养基于冰上对 HSV-1 进行 10 倍梯度稀释;将 Vero 细胞接种至 12 孔板中,用无钙镁 PBS 漂洗 1 次,立即添加 200 μ l 梯度稀释的含 HSV-1 的培养液,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;无钙镁 PBS 漂洗 1 次,每孔加入以 1 ml 2 倍低糖 DMEM 培养基与质量分数 1.2% 低熔点琼脂糖 1:1 混和的混合液,继续培养 48 h,计数空斑,以空斑形成单位(plaque-forming unit, PFU)/ml 来确定病毒滴度。

1.2.2 小鼠 HSK 模型的建立及分组 采用腹腔内注射 100 mg/kg 氯胺酮和 12.5 mg/kg 氯丙嗪的方法麻醉小鼠,于解剖显微镜下以微量进样针将 0.6 μ l 1×10^7 PFU/ml 的 HSV-1 溶液自角膜 2:00 至 3:00 位近周边部注射进小鼠双眼角膜基质以建立 HSK 模型,注射后连续观察小鼠角膜形态变化并拍照,参照文献[9]中角膜混浊评分标准和新生血管评分标准进行评分,采用角膜知觉测量仪测量模型眼角膜中央敏感度。以 Cochet 和 Bonnet 角膜知觉测量仪垂直轻触角膜中央,测量过程中避免触及睫毛及角膜周边,否则视为无效测量。每个敏感度数值轻触 5 次,有 1 次有瞬反射即为能感觉到。计数麻醉和病毒感染致死的小鼠数量和成膜眼数。小鼠角膜进入感染潜伏状态后,以 300 mJ/cm² 的中波紫外线照射小鼠模型眼角膜诱导 HSK 复发,选择 6 只初发小鼠双侧角膜有轻度瘢痕和新生血管(角膜混浊评分为 1 分)的模型眼进行研究。建模后 5 d 裂隙灯显微镜下检查模型眼,分别于建模后 5、8、11、14 d 生理盐水注射组结膜下注射 10 μ l 生理盐水,单纯 ACV 注射组小鼠结膜下注射 5 μ l 10 mg/ml ACV 溶液+5 μ l 生理盐水,ACV+贝伐单抗注射组小鼠结膜下注射 5 μ l 10 mg/ml ACV+5 μ l 贝伐单抗。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测造模后不同时间小鼠角膜和三叉神经中相关基因的相对表达量 分别于造模后 7 d、造模后 45 d、复发后 2 d 和复发后 7 d 采用过量麻醉法各处死 4 只小鼠,各收集 4 只模型眼角膜和同侧三叉神经节(trigeminal ganglion, TG)以抽提总 RNA,逆转录为 cDNA。荧光定量 PCR 引物序列:GAPDH 上游序列为 5'-GATGCCCCCATGTTTGTGAT-3',下游序列为 5'-GGCATGGACTGTGTCATGAG-3'。感染细胞蛋白-27(infected-cell protein-27, ICP-27)上游序列为 5'-CGGGCCTGATCGAAATCCTA-3',下游序列为 5'-GACACGACTCGAACACTCCT-3'。胸苷激酶(thymidine kinase, TK)上游序列为 5'-AAGGTCCGGCGGATGAG-3',下游序列为 5'-CGGCCGCGGATAC-3'。潜伏相关转录子(latency-associated transcript, LAT)上游序列为 5'-GCATAGA

GAGCCAGGCACAAAA-3', 下游序列为 5'-ACGTACTCCAAGAAGGCATGTG-3'。荧光定量 PCR 反应体系 10 μ l, 包括 2.5 倍 Real Master Mix/SYBR solution 4.5 μ l、cDNA 1.0 μ l、正反向引物各 0.3 μ l 和 ddH₂O 3.9 μ l。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 45 个循环。以 GAPDH 为内参照, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 ICP27、TK 和 LAT mRNA 的相对表达量。

1.2.4 贝伐单抗对潜伏状态小鼠 HSK 的干预研究

任意选取 6 只潜伏状态 HSK 模型小鼠, 分别于复发后 0、2、4 和 6 d 常规麻醉下右眼结膜下注射 5 μ l 贝伐单抗 (25 mg/ml) 作为贝伐单抗组, 左眼结膜下注射 5 μ l 生理盐水作为对照组, 观察双眼角膜情况并拍照。计算复发后 8 d 角膜病变面积与复发后 0 d 角膜病变面积的比率作为角膜病变面积增长率。

1.2.5 免疫荧光染色法观察各组初发小鼠角膜中血管的分布

分别于药物注射后 5、7、11、14 和 17 d 在裂隙灯显微镜下检查角膜反应并拍照, 于药物注射后 9 d 检测各组小鼠中央角膜敏感度, 然后采用过量麻醉法处死小鼠, 每组取 3 只小鼠眼球用质量分数 2% 多聚甲醛固定 20 min, 分离获取角膜组织制备成角膜铺片, 2% 多聚甲醛固定 40 min, 将角膜于 20 mmol/L EDTA 中 (用 PBS 配制) 37 $^{\circ}$ C 浸泡 1.0 ~ 1.5 h, 再以质量分数 10% Triton 透化角膜 1.0 ~ 1.5 h, 添加体积分数 5% 牛血清清蛋白封闭, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 然后分别滴加 PE 标记的大鼠抗小鼠 CD31 单克隆抗体 (1:200) 和 Alexa Fluor 488 标记兔抗小鼠 β III Tubulin 多克隆抗体 (1:200), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 以 TBS 洗 8 次, 每次 10 min, 封片, 荧光显微镜下观察小鼠角膜中血管和神经分布。以 Image J 软件的自由选择功能选中并测量角膜瘢痕+新生血管膜面积。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件行统计分析。本研究中小鼠角膜症状评分、小鼠角膜病变变化率及小鼠中央角膜敏感度的数据资料以大量测量后平均数 (趋势) 进行表达, 造模后不同时间角膜症状评分、小鼠角膜病变变化率及小鼠中央角膜敏感度及不同药物作用后 HSK 模型眼角膜瘢痕及新生血管变化的差异比较采用 Kruskal-Wallis 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。HSV-1 相关基因 TK、ICP-27 和 LAT mRNA 在成模小鼠眼角膜和同侧 TG 中相对表达量的数据资料经 W 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 进行表达, TK 和 ICP-27 mRNA 相对表达量的组间均数经 Levene 检验方差不齐 ($F = 23.358$, $P = 0.000$; $F = 4.028$, $P = 0.026$), LAT mRNA 相对表达

量组间均数方差齐 ($F = 0.265$, $P = 0.850$)。生理盐水注射组、单纯 ACV 注射组和 ACV+贝伐单抗注射组小鼠角膜及 TG 中 TK、ICP-27 和 LAT mRNA 造模后不同时间的差异比较采用两因素方差分析, TK 和 ICP-27 mRNA 相对表达量多重比较采用 Tamhane's T2 检验, LAT mRNA 相对表达量的多重比较采用 LSD-t 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠 HSK 模型的特点

2.1.1 造模小鼠成模率及眼部症状

造模后 7 d 内 200 只小鼠共存活 175 只, 存活率为 80% ~ 90%, 造模后 7 d 存活的小鼠中 169 只出现典型的 HSK 症状, 表现为角膜混浊和新生血管, 成模率为 80%。模型眼造模后第 2 天可出现典型的 HSK 角膜混浊体征, 造模后第 7 天角膜混浊评分最高, 为 3.6, 以后逐渐下降, 造模后第 15 天角膜混浊评分为 3.0, 至造模后第 45 天角膜混浊评分最低, 为 1.2。此外, 模型眼诱导复发后角膜混浊评分升高, 复发后第 1 天角膜混浊评分为 2.6, 复发后第 2 天角膜混浊评分最高, 为 3.8, 以后逐渐下降, 复发后第 9 天角膜混浊评分为 1.6, 至复发后第 9 天角膜混浊评分最低, 为 1.5。造模后角膜新生血管较角膜混浊出现晚 1 ~ 2 d, 造模后 7 d 角膜新生血管明显, 新生血管评分为 2.4, 至造模后 15 d 逐渐加重, 新生血管评分最高, 为 3.9, 活动期新生血管充盈呈鲜红色, 可见树枝样分支, 造模后 45 d 新生血管逐渐消退, 呈暗红色, 血管变细, 分枝不明显, 新生血管评分为 1.7; 复发后 1 d 新生血管评分为 2.9, 复发后 3 d 新生血管最明显, 新生血管评分为 4.1, 复发后 7 d 和复发后 9 d 新生血管消退至最轻, 呈暗红色, 血管变细, 分枝不明显, 新生血管评分均为 2.1。小鼠模型眼在造模后 3、9、13 和 45 d 中央角膜敏感度分别为 5.354、4.244、4.983 和 5.044。随着造模后时间的延长, 中央角膜敏感度逐渐减低, 造模后第 9 天中央角膜敏感度最低, 此后逐渐升高, 造模后 13 ~ 45 d 中央角膜敏感度仍缓慢升高。

2.1.2 HSV-1 相关基因 TK、ICP-27 和 LAT 在成模小鼠眼角膜和同侧 TG 中的表达

造模后 7 d、造模后 45 d、复发后 2 d 和复发后 7 d 模型鼠角膜中 TK mRNA 相对表达量分别为 18.58 ± 2.63 、 5.16 ± 0.42 、 33.20 ± 5.01 和 2.80 ± 0.33 , ICP-27 mRNA 相对表达量分别为 31.19 ± 3.40 、 4.33 ± 0.54 、 22.94 ± 1.60 和 2.82 ± 0.22 ; 同侧 TG 中 TK mRNA 相对表达量分别为 12.76 ± 0.67 、 3.49 ± 0.26 、 11.05 ± 2.39 和 1.81 ± 0.36 , ICP-27

mRNA 相对表达量分别为 13.26 ± 1.10 、 2.94 ± 0.99 、 10.04 ± 1.37 和 2.02 ± 1.05 , LAT mRNA 相对表达量分别为 12.32 ± 5.15 、 3331.00 ± 722.30 、 234.60 ± 41.57 和 1812.00 ± 217.70 。造模后 45 d 大鼠角膜和同侧 TG 中 TK mRNA 和 ICP-27 mRNA 相对表达量均明显低于造模后 7 d 和复发后 2 d, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 复发后 7 d 大鼠角膜和同侧 TG 中 TK mRNA 和 ICP-27 mRNA 相对表达量均明显低于复发后 2 d, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。造模后 45 d 大鼠 TG 中 LAT mRNA 相对表达量明显高于造模后 7 d 和复发后 2 d, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 复发后 7 d 大鼠 TG 中 LAT mRNA 相对表达量明显高于复发后 2 d, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

2.2 贝伐单抗注射对复发 HSK 模型眼角膜瘢痕和新生血管生成的抑制作用

复发前贝伐单抗注射眼和生理盐水注射眼角膜近似透明; 复发后 8 d, 贝伐单抗注射眼角膜瘢痕和新生血管均轻于生理盐水注射眼 (图 1)。复发 HSK 模型鼠 ACV+贝伐单抗注射组小鼠角膜病变面积增长率为

(167.10 ± 52.53)%, 低于生理盐水注射组的 (312.30 ± 74.18)%, 差异有统计学意义 ($Z = -1.992$, $P = 0.046$)。将前述 6 只小鼠 12 只眼的瘢痕增大率排序后, 左眼病变面积增长率显著大于右眼病变面积增长率, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2)。

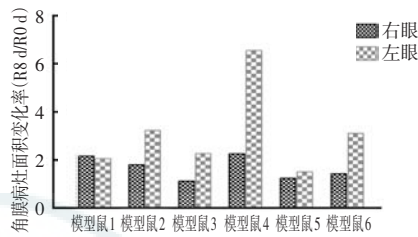


图 2 小鼠角膜新生血管及瘢痕面积的变化率比较 $Z = -1.992$, $P = 0.046$ (Wilcoxon 符号秩检验, 左右眼 $n = 6$) R: 复发后

2.3 各组 HSK 模型眼角膜瘢痕及新生血管变化

各组小鼠造模后 14 d, 角膜瘢痕和新生血管面积稳定, 单纯 ACV 注射组的角膜病变面积较大, ACV+贝伐单抗注射组角膜病变面积小于单纯 ACV 注射组, 生

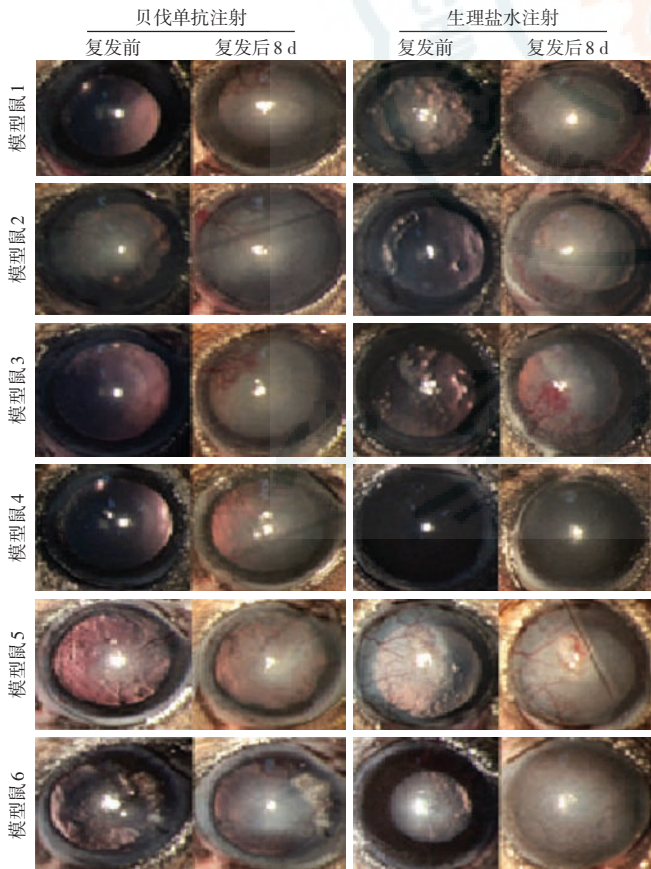


图 1 贝伐单抗注射眼与生理盐水注射眼复发前后角膜症状的比较 模型鼠贝伐单抗注射眼和生理盐水注射眼复发前角膜均近似透明; 复发后 8 d 贝伐单抗注射眼角膜轻度混浊, 上方少量新生血管, 生理盐水注射眼可见粗大角膜新生血管, 个别眼角膜出现明显混浊

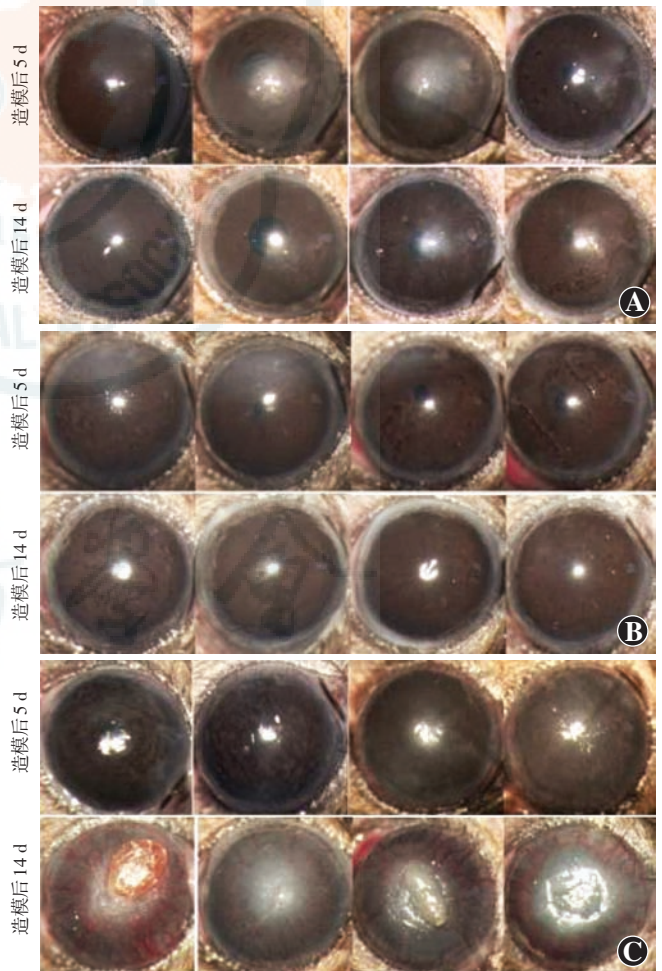
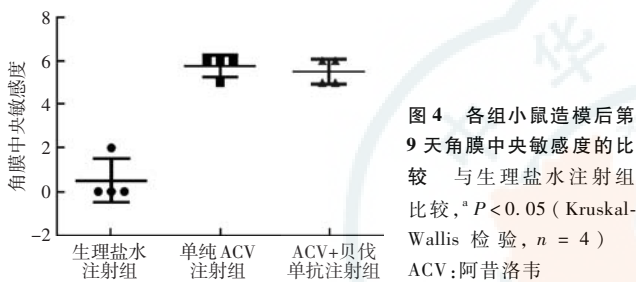


图 3 造模后 5 d 和 14 d 单纯 ACV 注射组, ACV+贝伐单抗注射组和生理盐水注射组小鼠各眼角膜病变面积 A: 单纯 ACV 注射组造模后 14 d 角膜病变面积较大 B: ACV+贝伐单抗注射组 角膜病变面积小于单纯 ACV 注射组 C: 生理盐水注射组 角膜病变面积明显大于单纯 ACV 治疗组和 ACV+贝伐单抗治疗组

理盐水注射组角膜病变面积明显大于单纯 ACV 注射组和 ACV+贝伐单抗注射组 (图 3)。ACV+贝伐单抗注射组小鼠 HSK 角膜病变面积明显小于单纯 ACV 注射组。造模后 9 d,生理盐水注射组、单纯 ACV 注射组和 ACV+贝伐单抗注射组小鼠角膜中央敏感度值分别为 0.50 ± 1.00 、 5.75 ± 0.50 和 5.50 ± 0.58 , 总体比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.357, P = 0.015$), ACV+贝伐单抗注射组小鼠角膜敏感度明显高于生理盐水注射组, 差异有统计学意义 ($Z = -2.397, P = 0.029$), ACV+贝伐单抗注射组与单纯 ACV 注射组间小鼠角膜中央敏感度比较差异无统计学意义 ($P = 1.000$) (图 4)。



2.4 各组小鼠角膜血管和神经纤维的变化

正常角膜无血管,造模后生理盐水注射组小鼠角膜出现大量的新生血管,单纯 ACV 注射组和 ACV+贝伐单抗注射组小鼠角膜新生血管少于生理盐水注射组 (图 5)。正常角膜分布有感觉神经纤维,造模后生理盐水注射组角膜神经纤维最少,ACV+贝伐单抗注射组小鼠角膜神经纤维较单纯 ACV 注射组多 (图 6)。

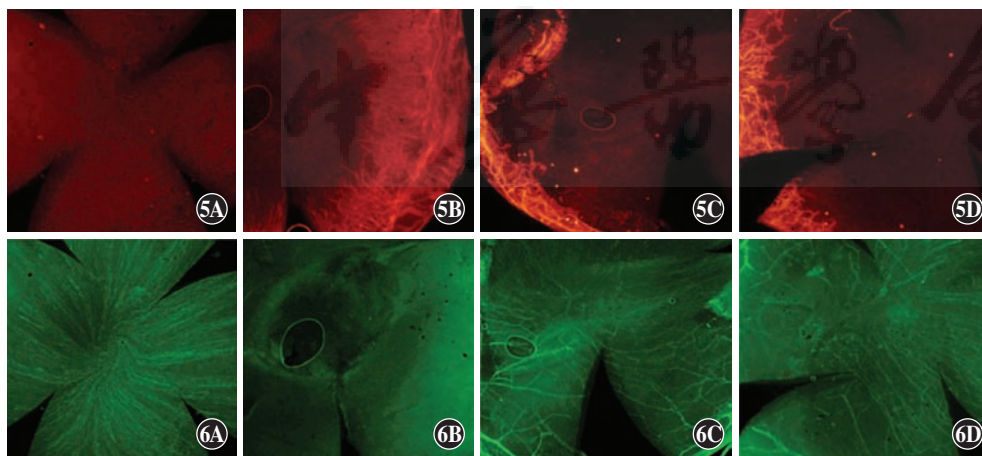


图 5 各组小鼠角膜新生血管变化 (PE ×10) A:正常小鼠角膜无新生血管 B:生理盐水注射组小鼠角膜可见大量新生血管 C:单纯 ACV 注射组小鼠新生血管明显少于生理盐水注射组 D: ACV+贝伐单抗注射组小鼠角膜新生血管较生理盐水注射组明显减少 图 6 各组小鼠角膜神经纤维数量变化 (Alexa Fluor 488 ×10) A:正常小鼠角膜布满神经纤维 B:生理盐水注射组小鼠角膜神经纤维明显减少 C:单纯 ACV 注射组小鼠神经纤维较生理盐水注射组增加 D: ACV+贝伐单抗注射组小鼠角膜神经纤维明显多于生理盐水组和单纯 ACV 注射组

3 讨论

大量观察小鼠角膜症状并评分后,初发感染期为在小鼠角膜症状最严重的感染后的第 7 天 (小鼠角膜症状最严重时期) 和活动性炎症基本结束进入潜伏的感染后第 45 天 (活动性炎症基本结束进入潜伏的时期), 复发感染期为在小鼠角膜症状最严重的复发后第 2 天 (小鼠角膜症状最严重时期) 和活动性炎症基本结束再次进入潜伏的复发后第 7 天 (活动性炎症基本结束进入潜伏的时期)。

本研究采用角膜基质注射法成功建立了复发型小鼠 HSK 模型。与划线法比较,基质注射法建立复发型小鼠 HSK 模型具有以下特点:病毒用量少,约为划线法的 1/100,且基质注射法操作熟练后比划线法机械损伤小,更接近自然感染过程。但是划线法在国内外应用广泛^[10-12],基质注射法有相当的操作难度。兔 HSK 模型有自发性复发的倾向,小鼠 HSK 模型极少出现自发性复发,因而被广泛使用^[13]。

虽然 Zheng 等^[14]研究发现在初发小鼠 HSK 模型中抗 VEGF 治疗可减轻初发模型的角膜新生血管和角膜混浊,但未研究抗 VEGF 药物对复发性病变角膜新生血管和角膜瘢痕的抑制作用,且研究中所使用的抗体为自制抗 VEGF 抗体,而非临床用药。Kim 等^[15]研究也发现,利用小干扰 RNA 抑制 VEGF 药物作用途径的基因表达可减少角膜新生血管。贝伐单抗为临床用药,有必要研究其对复发性小鼠 HSK 模型角膜新生血管和瘢痕形成的作用。角膜新生血管影响角膜透明性

且加重炎症反应,但炎症反应对 HSV-1 有清除作用^[16-19],因此本研究观察贝伐单抗与 ACV 联合治疗是否有协同作用,发现单纯应用贝伐单抗可减轻复发小鼠 HSK 模型的角膜新生血管和瘢痕,与 ACV 联合应用可显著减轻初发小鼠 HSK 模型的角膜新生血管和瘢痕。

研究表明,VEGF 有神经细胞保护作用^[20],本研究中贝伐单抗治疗后未发现贝伐单抗和 ACV 联合应用比 ACV 单纯应用角膜神经纤维密度明显减少,可能与

角膜水肿等症状减轻并减少了对角膜神经轴突的影响有关,此外本研究中还证实造模后 10 d 复发型小鼠 HSK 模型的角膜神经纤维消失^[21]。

具有血管系统的活体组织对损伤因子所发生的防御反应为炎症,血管反应是炎症过程的中心环节。引起角膜新生血管的因子较多,包括 VEGF、白细胞介素-17 和 HSV-1 DNA^[4,22-23],而抗 VEGF 药物治疗只是多种减轻 HSK 炎症反应的辅助方法中的一种,可为 HSK 的深入研究提供参考。

参考文献

- [1] Xu F, Sternberg MR, Kottiri BJ, et al. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States [J]. *JAMA*, 2006, 296(8): 964-973. DOI: 10.1001/jama.296.8.964.
- [2] 周洪伟, 吴强. 血管内皮生长因子及其受体与眼底新生血管 [J]. 国际眼科杂志, 2007, 7(3): 791-795. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2007.03.060.
Zhou HW, Wu Q. Vascular endothelial growth factor and its receptors in choroid and retinal neovascularization [J]. *Int J Ophthalmol*, 2007, 7(3): 791-795. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2007.03.060.
- [3] Ambati BK, Nozaki M, Singh N, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1 [J]. *Nature*, 2006, 443(7114): 993-997. DOI: 10.1038/nature05249.
- [4] Suryawanshi A, Veiga-Parga T, Reddy PB, et al. IL-17A differentially regulates corneal vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and soluble VEGF receptor 1 expression and promotes corneal angiogenesis after herpes simplex virus infection [J]. *J Immunol*, 2012, 188(7): 3434-3446. DOI: 10.4049/jimmunol.1102602.
- [5] Zheng M, Klinman DM, Gierynska M, et al. DNA containing CpG motifs induces angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(13): 8944-8949. DOI: 10.1073/pnas.132605599.
- [6] 王丽丽, 张雯, 李立婕, 等. 贝伐单抗与曲安耐德玻璃体腔注射治疗糖尿病黄斑水肿近期疗效的比较 [J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(6): 559-563. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.06.017.
Wang LL, Zhang W, Li LJ, et al. Comparison of efficacy and safety between intraocular bevacizumab and triamcinolone for diabetic macular edema [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2011, 29(6): 559-563. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.06.017.
- [7] 李洪超, 黎晓新, 谢锋. 贝伐单抗与雷珠单抗治疗新生血管性年龄相关性黄斑变性的经济学评价 [J]. 中华眼科杂志, 2014, 50(6): 426-433. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2014.06.006.
Li HC, Li XX, Xie F. Economic evaluation of bevacizumab versus ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2014, 50(6): 426-433. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2014.06.006.
- [8] Martin DF, Maguire MG, Ying GS, et al. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(20): 1897-1908. DOI: 10.1056/NEJMoa1102673.
- [9] Morris J, Stuart PM, Rogge M, et al. Recurrent herpetic stromal keratitis in mice, a model for studying human HSK [J/OL]. *J Vis Exp*, 2012, (70): e4276 [2017-01-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23271160>. DOI: 10.3791/4276.
- [10] Twardy BS, Channappanavar R, Suvas S. Substance P in the corneal stroma regulates the severity of herpetic stromal keratitis lesions [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(12): 8604-8613. DOI: 10.1167/iovs.11-8089.
- [11] Zhou G, Du T, Roizman B. HSV carrying WT REST establishes latency but reactivates only if the synthesis of REST is suppressed [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(6): 498-506. DOI: 10.1073/pnas.1222497110.
- [12] Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, et al. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs [J]. *Nature*, 2008, 454(7205): 780-783. DOI: 10.1038/nature07103.
- [13] Spurney RV, Rosenthal MS. Ultraviolet-induced recurrent herpes simplex virus keratitis [J]. *Am J Ophthalmol*, 1972, 73(4): 609-610.
- [14] Zheng M, Deshpande S, Lee S, et al. Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis [J]. *J Virol*, 2001, 75(20): 9828-9835. DOI: 10.1128/JVI.75.20.9828-9835.2001.
- [15] Kim B, Tang Q, Biswas PS, et al. Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes: therapeutic strategy for herpetic stromal keratitis [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(6): 2177-2185. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63267-1.
- [16] Bigley NJ. Complexity of Interferon- γ Interactions with HSV-1 [J/OL]. *Front Immunol*, 2014, 5: 15 [2017-01-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24567732>. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00015.
- [17] Jin X, Qin Q, Chen W, et al. Expression of toll-like receptors in the healthy and herpes simplex virus-infected cornea [J]. *Cornea*, 2007, 26(7): 847-852. DOI: 10.1097/ICO.0b013e318093de1f.
- [18] Conrady CD, Zheng M, Stone DU, et al. CD8⁺ T cells suppress viral replication in the cornea but contribute to VEGF-C-induced lymphatic vessel genesis [J]. *J Immunol*, 2012, 189(1): 425-432. DOI: 10.4049/jimmunol.1200063.
- [19] Mott KR, Ghiasi H. Role of dendritic cells in enhancement of herpes simplex virus type 1 latency and reactivation in vaccinated mice [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(12): 1859-1867. DOI: 10.1128/CVI.00318-08.
- [20] Jin K, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor stimulates neurite outgrowth from cerebral cortical neurons via Rho kinase signaling [J]. *J Neurobiol*, 2006, 66(3): 236-242. DOI: 10.1002/neu.20215.
- [21] Yun H, Lathrop KL, Hendricks RL. A central role for sympathetic nerves in herpes stromal keratitis in mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(4): 1749-1756. DOI: 10.1167/iovs.16-19183.
- [22] Xia L, Zhang S, Cao Z, et al. Interleukin-17 enhanced immunoinflammatory lesions in a mouse model of recurrent herpetic keratitis [J]. *Microbes Infect*, 2013, 15(2): 126-139. DOI: 10.1016/j.micinf.2012.10.017.
- [23] Hayashi K, Hooper LC, Detrick B, et al. HSV immune complex (HSV-IgG:IC) and HSV-DNA elicit the production of angiogenic factor VEGF and MMP-9 [J]. *Arch Virol*, 2009, 154(2): 219-226. DOI: 10.1007/s00705-008-0303-7.

(收稿日期: 2017-04-13 修回日期: 2017-08-27)

(本文编辑: 尹卫靖 张宇)