

# 小鼠角膜新生血管内皮细胞的分离培养及其趋化因子受体的表达

刘高勤 肖艳辉 陈志刚 徐静 陆培荣

215006 苏州大学附属第一医院眼科

通信作者:陆培荣, Email: lupeirong@suda.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.02.008

**【摘要】** **背景** 研究角膜新生血管生成的病理机制对角膜新生血管的治疗具有重要意义,但目前的相关研究多采用非角膜新生血管来源的血管内皮细胞,研究结果的可靠性受到一定影响。**目的** 探索从碱烧伤诱导实验性小鼠角膜新生血管组织中分离和培养血管内皮细胞的方法,并检测新生血管内皮细胞中趋化因子受体的表达,为角膜新生血管内皮细胞的生物学特性研究奠定基础。**方法** 7~8 周龄 SPF 级健康雄性 BALB/c 小鼠 10 只,采用 NaOH 碱烧伤法构建小鼠实验性角膜新生血管模型,采用免疫荧光技术检测 CD31 在角膜新生血管中的表达。在碱烧伤后 2 周摘取眼球分离角膜组织,眼科手术剪剪碎角膜组织后应用胶原酶 D 消化获取单个细胞,使用包被 CD31 抗体的磁珠分选获取血管内皮细胞。采用免疫组织化学染色法检测 CD31 在细胞中的表达以鉴定培养的细胞,采用逆转录 PCR 法检测血管内皮细胞中趋化因子受体基因的表达。**结果** 碱烧伤后 7 d 裂隙灯显微镜下可见小鼠左眼角膜出现新生血管,碱烧伤后 2 周角膜新生血管的形成达高峰,免疫荧光检测可见角膜组织内特异性 CD31 染色的血管网。角膜新生血管血管内皮细胞培养后 2 h 贴壁生长,形态呈扁平多边形,体积较大,传代培养后细胞生长速度明显加快。培养的角膜新生血管内皮细胞 CD31 表达阳性,细胞质中呈棕黄色染色,而角膜基质细胞中 CD31 表达阴性。逆转录 PCR 结果显示分离培养的血管内皮细胞中 CCR1、CCR2、CCR3 和 CCR4 mRNA 相对表达量最高, CXCR3、CCR6、CCR10 和 CX3CR1 mRNA 呈中等强度表达, CCR5、CCR8 mRNA 相对表达量较低,而 CCR9、CXCR4 和 CXCR5 mRNA 表达未检测到。**结论** CD31 抗体的磁珠分选法可有效分离纯化小鼠角膜新生血管内皮细胞,并可进行体外培养且培养的细胞可表达趋化因子受体。

**【关键词】** 内皮细胞/角膜新生血管来源; 细胞培养; 角膜新生血管/化学诱导; 趋化因子受体; 动物模型; 近交系 BALB/c 小鼠

**基金项目:** 国家自然科学基金青年项目 (81200727); 江苏省医学重点人才项目 (RC2011104); 苏州市科技计划项目 (SYS201448); 苏州大学博士研究生学术新人奖子项目 (5832001313)

**Isolation and culture of corneal neovascular endothelial cells and expression of chemokine receptors** Liu Gaoqin, Xiao Yanhui, Chen Zhigang, Xu Jing, Lu Peirong

Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

Corresponding author: Lu Peirong, Email: lupeirong@suda.edu.cn

**【Abstract】** **Background** The pathogenesis and mechanism research of corneal neovascularization is of important significance for the prevention and management of corneal neovascularization. Some relative researches are being performed on non-corneal neovascularization-derived vascular endothelial cells, so the results are affected to a certain extent. **Objective** This study was to isolate and culture vascular endothelial cells from experimental corneal neovascularization tissue and detect the expression of chemokine receptors *in vitro*. **Methods** Corneal neovascularization models were established on 10 SPF male BALB/c mice with the age of 7-8 weeks by sticking the filter papers with NaOH on the central corneas, and then the immunofluorescence technique was used to assay the CD31 expression in corneal flatmount 2 weeks after modeling. Corneal pieces were made in 2 weeks after alkali burn and then were digested by collagenase type D. Vascular endothelial cells were isolated from neovascularized tissue by affinity purification using magnetic beads coated with anti-CD31. The cells were cultured on fibronectin-coated walls

and then identified by immunocytochemistry. Reverse transcription-PCR was employed to detect the expressions of chemokine receptors in the cells. The use and care of the animals complied with ARVO Statement and this experimental procedure was approved by Soochow University Animal Care Committee. **Results** Corneal neovascularization occurred at 7 days and peaked at 2 weeks after modeling, and immunofluorescence exhibited the green network-like fluorescence for CD31 antibody in corneas. The cells grew against the wall 2 hours after culture with the polygon shape and large dimension, and the growth obviously quickened after passage. The cultured cells showed the positive response for CD31 antibody, showing the brown dye in cytoplasm, in contrast, the expression of CD31 was absent in corneal stromal cells. Chemokine receptors were positively expressed in the cells with the strongest expression levels in CCR1, CCR2, CCR3 and CCR4 mRNA and the weakest expression levels in CCR9, CXCR4 and CXCR5 mRNA, while CXCR3, CCR6, CCR10 and CX3CR1 mRNA were expressed with the moderate intensity.

**Conclusions** Vascular endothelial cells can be obtained from experimental neovascularized corneas by affinity purification and express chemokine receptors, which facilitate the study of their biological properties.

**[Key words]** Endothelial cells/corneal neovascularization-derived; Cells, cultured; Corneal neovascularization/chemically induced; Receptors, chemokine; Diseases models, animal; Mice, inbred BALB/c

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81200727); Jiangsu Province's Key Provincial Talents Program (RC2011104); Suzhou Municipal Natural Science Foundation (SYS201448); Soochow University Doctoral Academic Talents Program (5832001313)

新生血管形成是一个复杂的病理生理过程,其中包括血管内皮细胞的分化成熟、增生、迁移和管腔形成等,任何影响血管内皮细胞生物学行为的因素均能影响新生血管形成<sup>[1-3]</sup>。正常情况下,角膜是无血管的透明组织,但在炎症、化学烧伤、感染等病理状态下,角膜组织的结构和屏障功能受损,导致病变组织的炎症细胞和血管内皮祖细胞浸润,最终引起角膜新生血管形成<sup>[4]</sup>。研究角膜新生血管的发生因素有助于理解角膜新生血管的发病机制,为临床治疗相关疾病提供理论依据,也为其他新生血管性眼病发病机制的研究提供参考。近年来,有关角膜新生血管的研究多采用局部或全身药物干预后的在体观察,但药物干预常对组织和机体产生系统性和综合性的影响,无法直接获得对新生血管内皮细胞的直接作用和独立影响的结果,体外实验时对细胞的选择成了关键问题。从新生血管组织中分离和培养血管内皮细胞用于体外生物学功能的研究将弥补体内研究的不足<sup>[5]</sup>。由于对新生血管组织来源的内皮细胞进行分离和培养的难度较大,故目前多采用其他组织来源的血管内皮细胞系,因此相关干预因子对角膜新生血管内皮细胞作用机制研究的可靠性受到一定的影响。基于以上因素,本研究拟构建实验性角膜新生血管模型,应用磁珠分选法分离角膜新生血管组织来源的血管内皮细胞,通过特殊的培养条件进行培养,并检测血管相关因子受体在细胞中的表达,为进一步研究其生物学功能和相关干预实验提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 7~8 周龄 SPF 级健康雄性 BALB/c 小鼠以及动物饲料购自上海中科院斯莱克动物中心,体质量 25~30 g。实验动物的使用遵循 ARVO 声明,并通过苏州大学实验动物伦理委员会批准。

**1.1.2 主要试剂** 引物由南京金思瑞生物科技有限公司合成;mRNA Mini 抽提试剂盒(美国 QIAGEN 公司);rTaq 酶、逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 生物技术公司);DMEM 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、PBS(美国 GIBCO 公司);胶原酶 D(德国 Roche 公司);肝素、内皮细胞生长因子(美国 Sigma 公司);小鼠重组  $\gamma$  干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )蛋白(美国 R&D 公司);纤连蛋白、大鼠抗小鼠 CD31 一抗(550274)、明胶包被培养皿(美国 BD PharMingen 公司);SABC 组化试剂盒(美国 VECTOR 公司);小鼠 CD31 抗体包被磁珠、多聚甲醛、Alexa flour488 驴抗大鼠荧光二抗(A-21208)(美国 Invitrogen 公司);DAB 显色试剂盒、苏木精(美国 DAKO 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 角膜碱烧伤新生血管模型的构建** 取 BALB/c 小鼠,用质量分数 1.8% 的 Avertin 腹腔内注射进行麻醉。将直径约 2 mm 的滤纸片浸泡在 1 mol/L 的 NaOH 溶液中 15 s,饱和后,置于 BALB/c 小鼠左眼中央角膜 45 s 后用 10 ml 生理盐水冲洗眼球,清除残留的 NaOH。用角膜刮铲刮除中央角膜上皮,结膜囊内涂红

霉素眼膏以预防感染。

**1.2.2 免疫荧光化学法检测角膜中 CD31 的表达**

参照文献[6]方法,分别于造模后 7 d、14 d 在裂隙灯显微镜下观察小鼠角膜碱烧伤状况以及新生血管形成情况,拍照并记录。于造模后 14 d,颈椎脱臼法处死 5 只小鼠,迅速取角膜,置于丙酮中固定 10 min,滴加驴血清进行封闭,滴加一抗(1:150)室温孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次后滴加荧光二抗(1:120),室温避光孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次后封片,于荧光显微镜下观察并拍照,观察角膜新生血管中 CD31 的表达。

**1.2.3 角膜新生血管组织血管内皮细胞的分离** 于造模后 2 周用颈椎脱臼法处死模型小鼠,摘取左眼,解剖显微镜下分离角膜, PBS 漂洗 2 次,聚维酮碘中浸泡 5 min,再用 PBS 清洗,完全清除聚维酮碘。将角膜组织置于无血清 DMEM 培养液中,用眼科剪剪碎。离心半径 14.74 cm, 1 600 r/min 离心 5 min 后收集细碎组织,置于 5 mg/ml 胶原酶 D 工作液中,于 37 ℃、转速为 150 r/min 恒温摇床上消化 2 h。添加体积分数 20% 的 FBS 终止消化,离心半径 14.75 cm, 1 200 r/min 离心 5 min 后收集细胞。将细胞重悬于 DMEM 培养液中, 60 μm 孔径无菌尼龙膜过滤,形成 1.5 ml 单细胞悬液。将细胞悬液与 CD31 抗体包被的磁珠混合, 37 ℃ 水浴锅内孵育 1 h 进行亲和反应,使 CD31 阳性细胞与磁珠充分结合;将混合液置于磁柱中,然后将磁柱插入配套的分选磁铁。倒出液体,加入无血清 DMEM 培养液洗涤磁柱 4~5 次,倒出多余液体。磁柱中加入 1.5 ml 含 20% FBS DMEM 培养液,脱离磁铁取出磁柱,吹打贴壁细胞,将获得的细胞置于明胶包被的培养板中进行培养。

**1.2.4 角膜新生血管组织来源血管内皮细胞的培养**

细胞培养后 2 h 贴壁,于培养液中添加 55 U/ml(商品单位)肝素、100 μg/ml 内皮细胞生长因子及 44 U/ml 小鼠重组 IFN-γ 蛋白。将细胞置于 33 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养,每隔 3 日换液 1 次。与细胞结合的磁珠在培养后 2 d 大部分与细胞分离,更换培养基时通过洗涤清除磁珠。贴壁细胞生长 2 周后达 90% 融合时进行传代。

**1.2.5 角膜新生血管组织来源血管内皮细胞的鉴定**

参照文献[7]的方法,细胞重悬后经过甩片机甩片,细胞贴于载玻片上。将载玻片上的细胞用质量分数 4% 的多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗涤每次 5 min,共 3 次;丙酮处理 10 min, PBS 洗涤 5 min,体积分数 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 20 min,蒸馏水洗涤 5 min, PBS 洗涤 5 min;加封闭液封闭 1 h,一抗 4 ℃ 孵育过夜, PBS 洗涤每次

5 min,共 3 次;加羊抗大鼠二抗孵育 1 h, PBS 洗涤每次 5 min,共 3 次;滴加 SABC 工作液孵育 1 h, PBS 洗涤每次 5 min,共 3 次;滴加 DAB 工作液显色,在光学显微镜下观察并控制反应时间;苏木素复染 40 s,洗涤清除残留染剂,封片。以角膜组织内同时分离获取的角膜基质细胞作为阴性对照,光学显微镜下观察并拍照。

**1.2.6 逆转录 PCR 法检测细胞中趋化因子受体 mRNA 的表达**

参照文献[8]的方法,收集培养的细胞, PBS 洗涤 2 次,每次 5 min;应用 mRNA Mini 试剂盒抽提细胞总 RNA,使用 DNase 试剂盒清除残留的 DNA 后逆转录成 cDNA。应用各趋化因子受体引物扩增相应基因,引物序列见表 1。质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳扩增产物, EB 染色,凝胶成像仪拍照。使用 Image J 软件分析其条带灰度值。以 GAPDH 为内参,计算各趋化因子受体 mRNA 相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列	退火温度 (℃)	产物长度 (bp)
CCR1	F:5'-TTTTAAGGCCAGTGGGAGTTCAGTACCG-3'	58	457
	R:5'-TCGTATAGCCACATGCCCTTTGAAACAGCTG-3'		
CCR2	F:5'-AGAGGTCTCGGTTGGGTTGT-3'	57	376
	R:5'-ATCATAACGTTCTGGGCACC-3'		
CCR3	F:5'-CACAAGGCCATCCGTTTAT-3'	58	373
	R:5'-TGCCCAACTAAAACACCACA-3'		
CCR4	F:5'-AGACTACGCCATCCAGGCTA-3'	58	365
	R:5'-CTTGCCATGGTCTTGTTT-3'		
CCR5	F:5'-TGTGTAAGTATTCACAGGTGTCT-3'	58	377
	R:5'-CCTACAGCGAAACAGGGTGT-3'		
CCR6	F:5'-GTGGTGATGACCTTTGCCCTT-3'	58	345
	R:5'-AGGGCTTGAGATGATGATGG-3'		
CCR8	F:5'-TCCTTTTCAGACCCACAACC-3'	58	323
	R:5'-GCTTCCACCTCAAAGACTGC-3'		
CCR9	F:5'-CCCAGTTTCTGTTACTTTCAGATCTG-3'	57	593
	R:5'-GTAGCAGGGAGCCTCAGAAGGAAGGCC-3'		
CCR10	F:5'-GTCTCCTGGGACTTTAC-3'	57	516
	R:5'-GCTGAAAAGGAGCGCAGG-3'		
CX3CR1	F:5'-CCTGTTATTTGGGCGACATT-3'	58	400
	R:5'-ACGCCAGACTAATGCTGAC-3'		
CXCR2	F:5'-GGTCTACTGCCTATCCTGCCTCAG-3'	58	368
	R:5'-TAGCCATGATCTTGAGAAGTCCAT-3'		
CXCR3	F:5'-ATCAGCGCCTCAATGCCAC-3'	58	301
	R:5'-TGGCTTTCTCGACCACATT-3'		
CXCR4	F:5'-TTTGCCGACGTCAGCCAGGG-3'	58	142
	R:5'-GGATGACGATGCCGGCAGG-3'		
CXCR5	F:5'-ATGAACTACCCACTAACCCCTG-3'	56	658
	R:5'-AGTGAAACCAGGCTCTAGTTT-3'		
GAPDH	F:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	57	562
	R:5'-TCCACCACCCTGTGCTGTA-3'		

**2 结果**

**2.1 角膜碱烧伤后角膜新生血管的形成**

碱烧伤后 7 d 可见小鼠左眼角膜组织充血,出现

新生血管;碱烧伤后 2 周,角膜新生血管的形成达到高峰;碱烧伤后 3~4 周,新生血管逐渐减退,但在碱烧伤后 4 周仍可见少量角膜新生血管。新生血管沿角膜缘向角膜中心延伸。免疫荧光结果检查可见角膜组织内特异性 CD31 染色的血管网(图 1)。

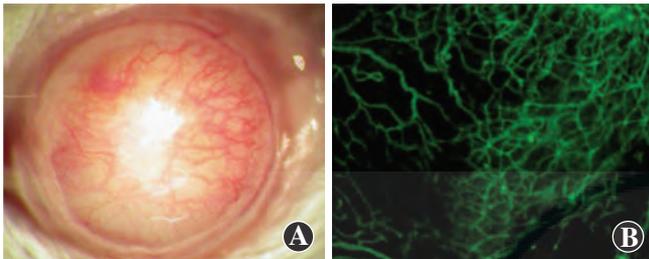


图 1 造模后 2 周角膜碱烧伤新生血管的形成 A:裂隙灯显微镜下可见模型眼角膜大量新生血管 B:免疫荧光检测可见 CD31 阳性染色的血管网(FITC ×400)

## 2.2 培养细胞的形态及鉴定

角膜新生血管组织来源的血管内皮细胞培养后 2 h 贴壁,形态由圆形逐渐展开,呈扁平多边形,体积较大(图 2)。初期细胞生长速度较慢,2~3 周后细胞生长融合至 80%。传代培养后细胞生长速度明显加快,无明显细胞悬浮现象,传代能力为 2~3 代。培养细胞的 CD31 蛋白表达阳性,而对照组角膜基质细胞 CD31 表达阴性(图 3)。

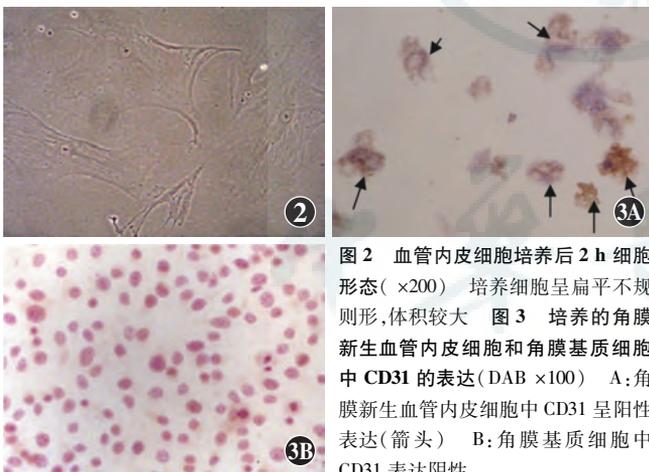


图 2 血管内皮细胞培养后 2 h 细胞形态(×200) 培养细胞呈扁平不规则形,体积较大 图 3 培养的角膜新生血管内皮细胞和角膜基质细胞中 CD31 的表达(DAB ×100) A:角膜新生血管内皮细胞中 CD31 呈阳性表达(箭头) B:角膜基质细胞中 CD31 表达阴性

## 2.3 角膜新生血管内皮细胞中各趋化因子受体基因的相对表达

逆转录 PCR 结果显示,角膜新生血管内皮细胞中 CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR8、CCR10、CX3CR1、CXCR2 和 CXCR3 mRNA 的相对表达量分别为  $1.32 \pm 0.21$ 、 $0.77 \pm 0.19$ 、 $1.18 \pm 0.30$ 、 $0.49 \pm 0.14$ 、 $0.15 \pm 0.09$ 、 $0.36 \pm 0.15$ 、 $0.25 \pm 0.13$ 、 $0.25 \pm 0.17$ 、

$0.21 \pm 0.15$ 、 $0.30 \pm 0.16$  和  $0.38 \pm 0.14$ ,其中 CCR1、CCR2、CCR3 和 CCR4 mRNA 的相对表达量较高,CXCR3、CCR6、CCR10 和 CX3CR1 mRNA 具有中等程度的表达,CCR5 和 CCR8 mRNA 的相对表达量较低,未检测到 CCR9、CXCR4 和 CXCR5 mRNA 的表达(图 4)。

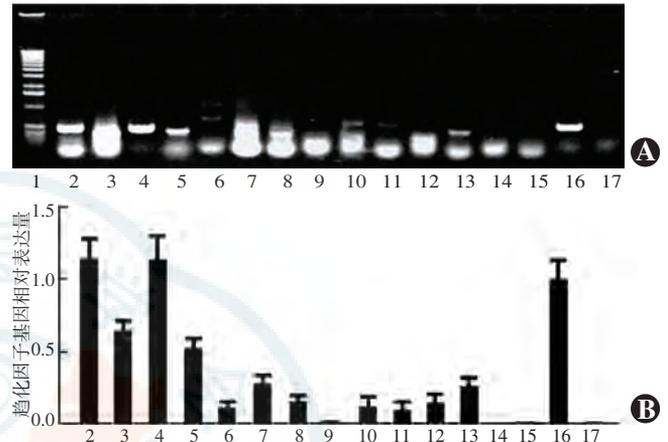


图 4 小鼠角膜新生血管组织来源血管内皮细胞趋化因子受体的相对表达 A:PCR 扩增产物凝胶电泳图 B:Image J 灰度分析结果 1:DNA marker 2:CCR1 3:CCR2 4:CCR3 5:CCR4 6:CCR5 7:CCR6 8:CCR8 9:CCR9 10:CCR10 11:CX3CR1 12:CXCR2 13:CXCR3 14:CXCR4 15:CXCR5 16:GAPDH 17:空白对照

## 3 讨论

角膜新生血管模型是研究角膜以及眼部其他部位新生血管病理过程以及发病因素的重要工具<sup>[6,9]</sup>。角膜新生血管的形成涉及角膜新生血管内皮细胞的分化、增生、迁移以及管腔形成等过程<sup>[10]</sup>,因此,角膜新生血管内皮细胞是在血管形成过程中发挥主要作用。目前少有对此细胞进行体外研究,可能与角膜新生血管内皮细胞分离纯化困难以及培养条件要求相对苛刻等因素有关。本研究中构建了小鼠碱烧伤角膜新生血管模型,采用角膜组织块培养法分离纯化血管内皮细胞,并摸索出细胞培养的适宜条件。

研究表明,角膜碱烧伤后 2 周新生血管形成最为旺盛,此时血管内皮细胞处于增生最活跃、生长最旺盛的时期<sup>[11]</sup>,理论上分选出的细胞存活率高,因此本研究选取造模后 2 周的角膜组织进行分离培养。而碱烧伤后 3~4 周,角膜组织新生血管逐渐退化,血管内皮细胞明显减少,凋亡细胞数目也相对增加,不利于新生血管内皮细胞的生长。细胞培养发现,血管内皮细胞状态饱满、透亮,死亡细胞较少。由于角膜基质胶质成分较多,细胞难以脱离组织形成单个细胞,因此在细胞与组织分离的实验中,我们选用对基质敏感而对细胞损伤较小的胶原酶 D 进行消化,对消化时间和消化

条件进行优化,充分保证了消化效率以及细胞的存活率,有利于后续的纯化实验。在细胞分选纯化实验过程中,我们选用抗小鼠 CD31 抗体包被的磁珠进行阳性选择。细胞培养后发现磁珠对细胞损伤作用不明显,细胞培养 24 h 后,磁珠与细胞完全脱离,更换培养基时可将其清除。细胞培养是实验过程中关键的步骤。我们对培养条件进行了多次摸索和改进,明确了培养角膜新生血管内皮细胞最佳的培养条件。细胞需要生长在明胶包被的培养皿中,培养基中添加一定浓度的内皮细胞生长因子、纤连蛋白、肝素以及小鼠重组 IFN- $\gamma$  蛋白,培养温度保持在 33  $^{\circ}\text{C}$  左右,并对培养基更换时间也进行严格的控制,从而最终保证新生血管内皮细胞稳定的生长以及传代。获得的细胞能够稳定传代达 2~3 代,基本满足体外研究的要求。由于新生血管内皮细胞不属于干细胞,细胞生长 2~3 代后其生长速度以及增生能力受到明显抑制。为进一步验证分离培养细胞的特异性,鉴于培养的细胞数目有限,不宜采用流式细胞技术方法,本研究中改用细胞甩片结合细胞免疫组织化学法,通过抗小鼠 CD31 抗体标记以及 DAB 显色等步骤检测细胞表面 CD31 分子的表达。细胞免疫组织化学法证实了培养的细胞表达 CD31 分子,其为血管内皮细胞。

趋化因子可通过与受体结合来调控血管内皮细胞的生物学功能,在新生血管发生及发展过程中发挥重要的作用。本研究结果发现,分离纯化的新生血管内皮细胞不同程度地表达 *CCR1*、*CCR2*、*CCR3*、*CCR4*、*CXCR3*、*CCR6*、*CCR10*、*CX3CR1*、*CCR5* 和 *CCR8*。该结果为后续研究其对内皮细胞的作用提供参考。

总之,本研究中成功分离、纯化并培养角膜新生血管组织来源的血管内皮细胞,并对其趋化因子受体的表达进行基因水平的检测,为研究血管内皮细胞的生物学功能以及进一步揭示新生血管性眼病的发病机制奠定了一定的基础。

## 参考文献

[1] Sheibani N, Frazier WA. Thrombospondin-1, PECAM-1, and regulation

of angiogenesis[J]. *Histol Histopathol*, 1999, 14(1): 285-294.

- [2] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis [J]. *Nat Med*, 2000, 6(4): 389-395. DOI: 10. 1038/74651.
- [3] Peng G, Ren Y, Sun X, et al. Inhibition of farnesyltransferase reduces angiogenesis by interrupting endothelial cell migration [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(10): 1374-1382. DOI: 10. 1016/j. bcp. 2012. 02. 008.
- [4] 陆培荣, 李龙标, 张学光. 小鼠角膜碱烧伤后前炎症因子、趋化因子及其受体的表达[J]. *眼科研究*, 2007, 25(4): 256-260.  
Lu PR, Li LB, Zhang XG. Expression of proinflammatory cytokine, chemokine and its receptor in mouse cornea after alkali injury[J]. *Chin Ophthalmol Res*, 2007, 25(4): 256-260.
- [5] Su X, Sorenson CM, Sheibani N. Isolation and characterization of murine retinal endothelial cells[J]. *Mol Vis*, 2003, 9: 171-178.
- [6] Liu G, Lu P, Li L, et al. Critical role of SDF-1 $\alpha$ -induced progenitor cell recruitment and macrophage VEGF production in the experimental corneal neovascularization[J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 2129-2138.
- [7] 刘高勤, 吴敬, 陈志刚, 等. ADP-核糖基化因子抑制剂在实验性碱烧伤诱导角膜新生血管中的作用及其机制[J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(2): 101-106. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 02. 002.  
Liu GQ, Wu J, Chen ZG, et al. The effect of ADP-ribosylation factor antagonist on alkali-burn induced corneal neovascularization[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(2): 101-106.
- [8] 刘高勤, 陈源, 陈磊, 等. 一氧化氮合成酶及其抑制剂在碱烧伤诱导的角膜新生血管中的作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2013, 31(10): 908-913. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 10. 002.  
Liu GQ, Chen Y, Chen L, et al. The effects of nitric oxide synthase and its antagonist on alkali burn-induced corneal neovascularization [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2013, 31(10): 908-913.
- [9] 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.
- [10] Lu P, Li L, Zhang X, et al. Enhanced experimental corneal neovascularization along with aberrant angiogenic factor expression in the absence of IL-1 receptor antagonist [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(10): 4761-4768. DOI: 10. 1167/iovs. 08-2732.
- [11] Koika V, Zhou Z, Vasileiadis I, et al. PKG-I inhibition attenuates vascular endothelial growth factor-stimulated angiogenesis [J]. *Vascular Pharmacol*, 2010, 53(5-6): 215-222. DOI: 10. 1016/j. vph. 2010. 08. 004.

(收稿日期: 2015-08-29)

(本文编辑: 尹卫靖 张宇)

读者 · 作者 · 编者

## 本刊对来稿中组织病理学彩色图片及电子显微镜图片中标尺的要求

如果作者稿件中包含有组织病理图、免疫荧光染色图、免疫组织化学图、电子显微镜图片,为了反映组织标本大小的最精确尺度,请在电子版图片的左下方附注标尺。

(本刊编辑部)