

· 实验研究 ·

球结膜下注射康柏西普对兔角膜新生血管和淋巴管的抑制作用

陈孝霞 李旌 辜臻晟

上海交通大学医学院附属新华医院眼科 200092

通信作者:辜臻晟, Email: guzhencheng@xinhumed.com.cn

【摘要】 目的 观察康柏西普对兔碱烧伤诱导角膜新生血管(CNV)、新生淋巴管生成的作用。方法 44 只 2~3 kg 成年雄性新西兰大白兔按照随机数字表法分为康柏西普注射组 9 只、雷珠单抗注射组 9 只、生理盐水对照组 9 只、模型对照组 9 只和正常对照组 8 只。以左眼为实验眼,采用碱烧伤方法制作炎症性 CNV 动物模型,直径 8 mm 的滤纸片浸润 1 mol/L NaOH,放至角膜中央烧灼 30 s。造模后第 1 天,康柏西普注射组球结膜下注射康柏西普 0.1 ml/1 mg,雷珠单抗注射组同法注射雷珠单抗 0.1 ml/1 mg,生理盐水对照组同法注射 0.1 ml 质量分数 0.9% NaCl 溶液,模型对照组碱烧伤后不做任何处理,正常对照组不行碱烧伤和球结膜下注射药物处理。分别于造模后第 4、7、14 和 21 天计算 CNV 面积,每组耳缘静脉空气栓塞处死一定数量动物,抽取房水,检测血管内皮生长因子(VEGF);取角膜组织行苏木精-伊红染色,进行组织病理学检查;免疫组织化学检测淋巴管内皮透明质酸受体-1(LYVE-1)含量。结果 造模后第 4 天,康柏西普注射组、雷珠单抗注射组、生理盐水对照组和模型对照组新生血管芽长入角膜边缘,角膜水肿减轻;第 7 天,康柏西普注射组、雷珠单抗注射组新生血管较生理盐水对照组、模型对照组稀疏。造模后第 4 天可见各造模组角膜上皮细胞增多,上皮层存在空泡,基质内大量炎性细胞,上皮层下可见小的血管腔。造模后第 7 天,新生血管浸润浅层基质,基质内有大量炎性细胞。造模后第 14 天,康柏西普注射组 CNV 面积为 $(15.20 \pm 9.16) \text{ mm}^2$,小于雷珠单抗注射组的 $(28.21 \pm 5.17) \text{ mm}^2$,差异有统计学意义($P < 0.05$);康柏西普注射组 VEGF 质量浓度为 $(7.75 \pm 6.56) \text{ pg/ml}$,低于雷珠单抗注射组的 $(16.98 \pm 2.17) \text{ pg/ml}$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。正常对照组角膜组织无淋巴管生长,无 LYVE-1 阳性细胞。造模后第 4 天,康柏西普注射组、雷珠单抗注射组、生理盐水对照组和模型对照组角膜组织中出现新生淋巴管,与新生血管平行生长。造模后第 7 天,康柏西普注射组、雷珠单抗注射组角膜新生淋巴管计数分别为 (4.33 ± 0.58) 个和 (4.67 ± 0.58) 个,少于生理盐水对照组的 (10.67 ± 0.58) 个和模型对照组的 (12.33 ± 0.58) 个,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 碱烧伤后早期球结膜下注射康柏西普能有效抑制 CNV、新生淋巴管,其抑制作用可能与降低 VEGF 的质量浓度密切相关。

【关键词】 角膜新生血管;角膜新生淋巴管;康柏西普;雷珠单抗;血管内皮生长因子

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20190327-00149

Inhibiting effect of subconjunctivally injected conbercept on experimental corneal neovascularization and lymphangiogenesis in rabbit

Chen Xiaoxia, Li Jing, Gu Zhencheng

Department of Ophthalmology, Xin Hua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

Corresponding author: Gu Zhencheng, Email: guzhencheng@xinhumed.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the value of conbercept in experimental corneal neovascularization (CNV) and lymphangiogenesis in rabbit model. **Methods** Forty-four adult New Zealand rabbits were randomly divided into a conbercept injected group (9 rabbits), a ranibizumab injected group (9 rabbits), a normal saline control group (9 rabbits), a model control group (9 rabbits) and a normal control group (8 rabbits) by random number table method, take the left eyes as the experimental eye. Whatman filter papers (8 mm in diameter) were soaked in 1 mol/L NaOH solution and then applied on the middle surface of the cornea for 30 seconds. On day 1st after alkali burning, the eyes in the conbercept injected group were treated with 0.1 ml/1 mg of conbercept, the eyes in the ranibizumab injected group were treated with 0.1 ml/1 mg of ranibizumab, the eyes in the normal saline control group were treated with 0.1 ml 0.9% NaCl, the eyes in the model control group just received alkali burning, and the

eyes in the normal control group received neither alkali burns nor subconjunctival injection any drugs. All rabbits were monitored daily after alkali burning. Digital pictures were taken on day 4th, 7th, 14th and 21th after modeling. Image analysis was performed on the area of neovascularization, a ascertain number of rabbits were killed respectively. Aqueous humor was collected for the concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) assay. Corneal specimens were analyzed by histopathologically and immunohistochemical staining of lymphatic endothelial cells hyaluronic acid receptor 1 (LYVE-1). The use and care of the animals complied with the Statement of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). **Results** On the 4th day after alkali burning, the neovascularization buds grew into the edge of the cornea in the conbercept injected group, the ranibizumab injected group, the normal saline control group and the model control group, and the corneal edema decreased. On day 7th, the neovascularization of the conbercept injected group and the ranibizumab injected group was less than that of the normal saline control group and the model control group; On day 4th after alkali burning, corneal epithelial cells were increased, vacuoles were found in the epithelium, a large number of inflammatory cells were found in the matrix, and small vascular lumens were seen below the epithelium. On day 7th after modeling, neovascularization infiltrated the shallow matrix with a large number of inflammatory cells. Surface areas of induced CNV in conbercept injected group were $(15.20 \pm 9.16) \text{ mm}^2$, which were significantly less than those in ranibizumab injected group $([28.21 \pm 5.17] \text{ mm}^2)$ on day 14th ($P < 0.05$). The concentration of VEGF in the conbercept injected group was $(7.75 \pm 6.56) \text{ pg/ml}$, which was significantly lower than that in the ranibizumab injected group $([16.98 \pm 2.17] \text{ pg/ml})$ on day 14th ($P < 0.05$). The normal control group had no lymphatic growth in the corneal tissue and no LYVE-1 positive particles. On day 4th after the alkali burning, corneal lymphatic vessels appeared in the corneal tissue of the conbercept injected group, the ranibizumab injected group, the normal saline control group and the model control group, which grew in parallel with the neovascularization. Lymphatic vessels counting in the conbercept injected group and ranibizumab injected group were 4.33 ± 0.58 and 4.67 ± 0.58 on day 7th and 14th, which were reduced significantly compared with normal saline control group (10.67 ± 0.58) and the model control group (12.33 ± 0.58) (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Early subconjunctival administration of conbercept may successfully inhibit alkali-induced corneal neovascularization and corneal lymphangiogenesis in alkali burning animal model. The inhibit effect is related with the reduces of VEGF levels.

[Key words] Corneal neovascularization; Corneal lymphangiogenesis; Conbercept; Ranibizumab; Vascular endothelial growth factor

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190327-00149

正常角膜处于无血管状态,以维持其透明性。透明角膜对维持视功能至关重要。在感染、外伤、免疫反应、移植排斥反应等病理条件下,毛细血管由角膜缘向角膜内生长,进入角膜周边部 1~2 mm 以上即为角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV)。CNV 破坏角膜正常微环境,改变了眼前节免疫赦免状态,是角膜移植排斥反应的高危因素。CNV 结构较脆弱,易渗漏,常因出血、渗出及继发纤维化等致盲。抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 药物在治疗 CNV 的动物实验以及临床研究中也取得良好的疗效^[1-2]。康柏西普由血管内皮生长因子受体 1 (vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR-1) 细胞外与 VEGF 结合的免疫球蛋白样区域 2, VEGFR-2 免疫球蛋白样区域 3、4 以及人类免疫球蛋白的 Fc 部分组合而成,能与 VEGF-A 所有亚型、VEGF-B 及胎盘生长因子高亲和力结合^[3]。康柏西普增加了 VEGFR-2 细胞外免疫球蛋白样区域 4 的表达。

VEGFR-2 细胞外免疫球蛋白样区域 4 是形成受体二聚所必需的结构,且能提高 VEGF 与受体结合的比率^[4],因此康柏西普与 VEGF 有更高的亲和力,且作用时间更长。CNV 与新生淋巴管生长既相互独立,又彼此关联。抗 VEGF 药物对 CNV 作用的相关研究较多,但其应用对新生淋巴管作用的研究甚少。本研究中采用碱烧伤法建立炎症性 CNV 动物模型,观察康柏西普对 CNV 和新生淋巴管生成的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 44 只 2~3 kg 成年雄性新西兰大白兔由新华医院动物房统一采购。健康状况良好,兔角膜正常,分笼饲养,正常饮食。实验动物的喂养和使用遵循美国视觉与眼科学研究协会制定的 ARVO 声明 (XHEC-F-2020-012)。

1.1.2 主要试剂及仪器 10 mg/0.2 ml 康柏西普 (成

都康弘公司); 10 mg/0.2 ml 雷珠单抗(瑞士诺华公司); 兔 VEGF ELISA 试剂盒(LS-F4218, 美国 Life Span Bio Sciences 公司); 鼠抗兔淋巴管内皮细胞透明质酸受体-1 (lymphatic endothelial cells hyaluronic acid receptor 1, LYVE-1) (抗体编号: 14971, 英国 Abcam 公司); 皮肤黏膜消毒液(杭州朗索医用消毒剂有限公司); 盐酸氯胺酮(宁德古田药业有限公司); 盐酸丙美卡因滴眼液(美国 Alcon 公司); 质量分数 0.5% 氧氟沙星滴眼液(日本参天制药株式会社); 质量分数 0.9% 氯化钠溶液(济宁圣鲁制药有限公司); 氢氧化钠、苏木素染色液、二甲苯、无水乙醇、一抗稀释液、二抗稀释液、羊抗鼠 IgG 单克隆抗体、PBS、牛血清白蛋白(武汉谷歌生物技术有限公司)。滤纸(苏州吴合经贸有限公司); 盖玻片(武汉谷歌生物技术有限公司); DMI-3000B 激光电子显微镜(德国 Leica 公司); 手术显微镜(日本 Opton 公司)。

1.2 方法

1.2.1 CNV 动物模型的构建

44 只成年雄性新西兰大白兔, 采用随机数字表法随机选取 36 只, 选取左眼为实验眼, 按照 1 ml/kg 的剂量耳缘静脉注射 2 g/0.1 L 盐酸氯胺酮全身麻醉后, 将已消毒的直径 8 mm 的滤纸片浸泡于 1 mol/L 氢氧化钠溶液中 10 s 后, 将滤纸片放于家兔角膜中央(距角膜缘 1~2 mm)处, 30 s 后取出滤纸片, 0.9% NaCl 溶液持续冲洗角膜及结膜囊 1 min。造模后左氧氟沙星滴眼液点眼, 每天 4 次。

1.2.2 实验分组及给药

将 36 只造模成功的新西兰大白兔采用随机数字表法分为康柏西普注射组 9 只、雷珠单抗注射组 9 只、生理盐水对照组 9 只和模型对照组 9 只, 另取 8 只未造模新西兰大白兔作为正常对照组。造模后第 1 天, 康柏西普注射组球结膜下注射康柏西普 0.1 ml, 雷珠单抗注射组球结膜下注射雷珠单抗 0.1 ml, 生理盐水对照组球结膜下注射 0.9% NaCl 溶液 0.1 ml, 模型对照组碱烧伤后不做任何处理, 正常对照组不做碱烧伤、球结膜下注射药物处理。

1.2.3 各组 CNV 观察及面积计算

造模后第 1 天起每天观察 CNV 生长情况, 于造模后第 1、4、7、14 和 21 天进行 CNV 拍照, 计算 CNV 的面积, 面积计算公式 $S=C/12 \times 3.1416 [r^2 - (r-l)^2]$, 其中 S 为面积, C 为 CNV 面积占角膜周长的钟点数, r 是角膜半径, l 为新生血管长度(以角膜缘侵入的朝向受损角膜中心生长且连续弯曲度数小的最长新生血管为准), 应用 Image Pro Plus 软件计算新生血管区域及半径。

1.2.4 各组房水 VEGF 质量浓度测定

造模后第 4、7、

14 和 21 天康柏西普注射组、雷珠单抗注射组、生理盐水对照组、模型对照组采用投币法随机抽取 3 只实验兔, 正常对照组抽取 2 只实验兔。1 ml 注射器透明角膜入路平行瞳孔缘刺入前房抽取前房水 100 μ l, 置于 1 ml EP 管内, -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 根据 ELISA 试剂盒说明书检测 VEGF 质量浓度。每孔加 100 μ l 稀释样本、标准液, 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h。吸除溶液, 每孔加 100 μ l 检测试剂 A, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。吸除溶液, 清洗 3 次。每孔加 100 μ l 检测试剂 B, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。吸除溶液, 清洗 5 次。每孔加 90 μ l 显色液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10~20 min。每孔加 50 μ l 终止液。立即测定波长 450 nm 处各孔吸光度(A)值, 绘制标本曲线, 得出 VEGF 的最终质量浓度。

1.2.5 各组角膜组织病理学检查

造模后 4、7 和 14 天, 康柏西普注射组、雷珠单抗注射组、生理盐水对照和模型对照组耳缘静脉推注 20 ml 空气各处死 2 只实验兔; 第 21 天康柏西普注射组、雷珠单抗注射组、生理盐水对照和模型对照组各处死 3 只实验兔。正常对照组每个时间点各处死 2 只实验兔。沿角膜缘外 1~2 mm 迅速取下角膜组织, 切取新生血管生长的组织, 放入甲醛溶液中固定, 依次经过脱水、透明、石蜡包埋、5 mm 厚连续切片, 光学显微镜下观察组织结构并拍照。每张切片高倍镜下任意选择 5 个视野, 观察炎症性细胞的分布和密度以及 CNV 管腔数量和浸润情况。

各组取角膜石蜡切片脱蜡入水, 抗原修复, PBS 漂洗, 封闭液封闭 60 min, 加鼠抗兔 LYVE-1 一抗, 完全覆盖组织, 4 $^{\circ}$ C 湿盒孵育过夜。PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 加适量羊抗鼠 IgG 二抗, 完全覆盖组织, 孵育 60 min。PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 常规显色, 充分漂洗, 苏木素复染, 乙醇分化脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。光学显微镜下观察 LYVE-1 表达情况并拍照。每个时间点选取 2 张切片, 每张切片高倍镜下任意选取 5 个视野, 计数棕色完整管腔数目, 取其平均值作为角膜新生淋巴管计数(lymphatic vessels counting, LVC)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析。CNV 面积、房水中 VEGF 质量浓度、LVC 经 W 检验证实符合正态分布, 以 mean \pm SD 表示。各组不同时间点 CNV 面积、VEGF 质量浓度、LVC 比较采用两因素方差分析, 组间多重比较采用 Tukey 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后 CNV 动态变化及分布

造模后第 1 天, 碱烧伤区域角膜组织灰白色水肿,

角巩膜缘血管扩张, 充血明显, 见少量黄色分泌物; 造模后第 4 天, 康柏西普注射组、雷珠单抗注射组、生理盐水对照组和模型对照组新生血管芽长入角膜边缘, 角膜水肿减轻; 造模后第 7 天, 新生血管呈毛刷状, 血管细, 血管末梢可及碱烧伤区边缘, 角膜水肿消退, 康柏西普注射组、雷珠单抗注射组新生血管较生理盐水对照组、模型对照组稀疏; 造模后第 14 天, CNV 长入碱烧伤区域, 康柏西普注射组新生血管较雷珠单抗注射组、生理盐水对照组、模型对照组短小; 造模后第 21 天, 各组 CNV 长入碱烧伤区域, 主干血管粗大, 分支血管细小且颜色浅(图 1)。

2.2 各组角膜组织病理学表现

正常对照组角膜组织结构清晰, 结构完整, 无血管及炎性细胞浸润(图 2)。造模后第 4 天可见各造模组角膜上皮细胞增多, 上皮层存在空泡, 基质内大量炎性细胞, 上皮层下可见小的血管腔。造模后第 7 天, 新生血管浸润浅层基质, 基质内有大量炎性细胞。造模后第 14 天, 生理盐水对照组与模型对照组基质内可见大量新生血管腔, 内含大量红细胞。造模后第 21 天, 生理盐水对照组与模型对照组碱烧伤区域角膜基质结构紊乱, 新生血管管腔集中在中

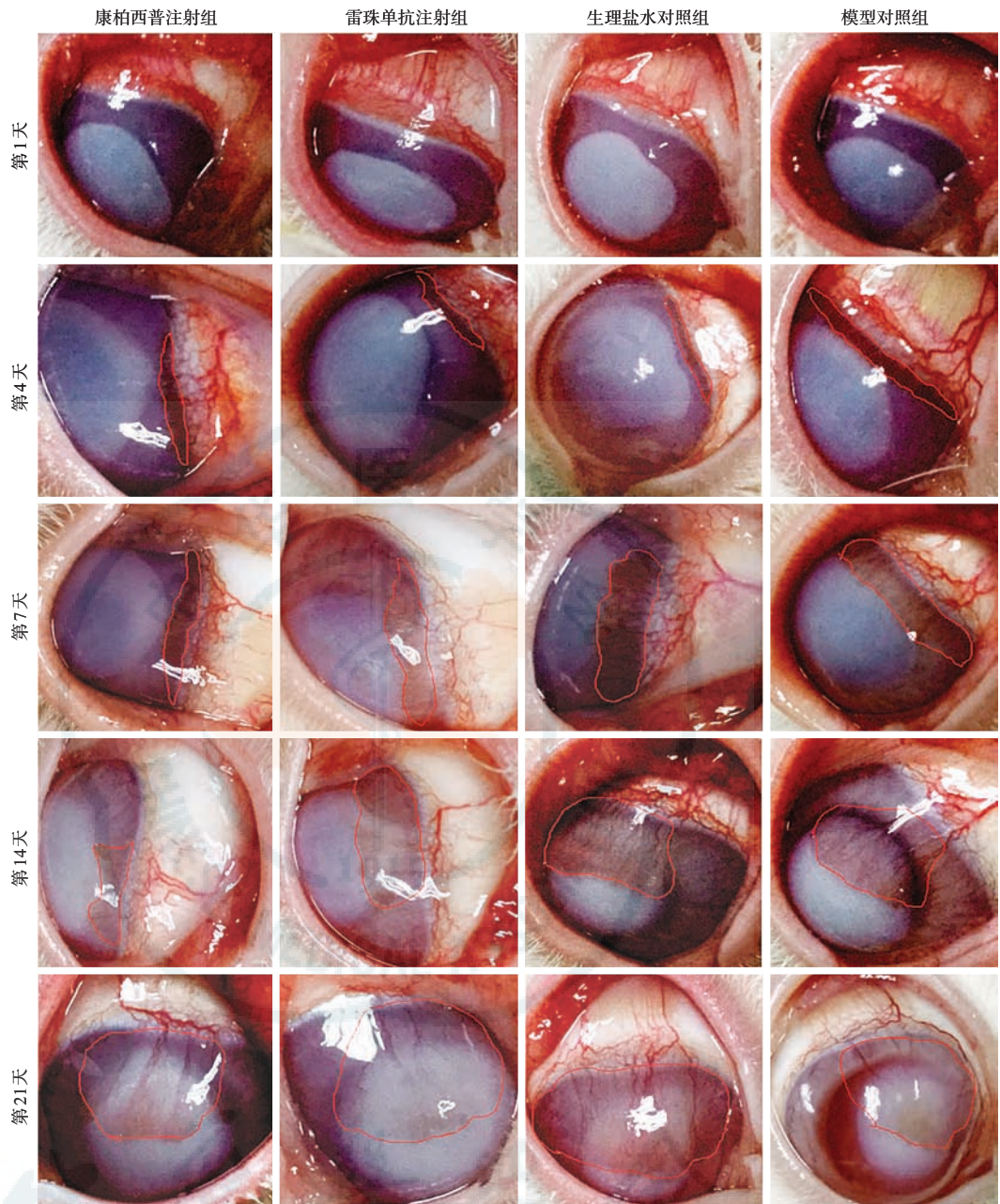


图 1 造模后不同时间点各组 CNV 生长情况 造模后第 1 天, 碱烧伤区域角膜组织灰白色水肿, 角巩膜缘血管扩张; 造模后第 4 天, 4 个组新生血管芽长入角膜边缘, 角膜水肿减轻; 造模后第 7 天, 康柏西普注射组、雷珠单抗注射组新生血管较生理盐水对照组、模型对照组稀疏; 造模后第 14 天, 康柏西普注射组新生血管较雷珠单抗注射组、生理盐水对照组、模型对照组短小; 造模后第 21 天, 各组 CNV 超过碱烧伤区域半径, 主干血管粗大, 分支血管细小且颜色浅

Figure 1 The CNV at different time points after alkali burning On the first day after alkali burning, the corneal tissue in the alkali-burned area showed gray edema, and the vessels at the corneal sclera margin were dilated. On the 4th day alkali burning, the neovascularization buds of the four groups grew into the edge of the cornea, and corneal edema decreased. On the 7th day alkali burning, neovascularization in the conbercept injected group and the ranibizumab injected group was less than that in the normal saline control group and the model control group. On the 14th day after alkali burning, the neovascularization in the conbercept injected group was shorter than that in the ranibizumab injected group, the normal saline control group and the model control group. On the 21st day alkali burning, the neovascularization in each group was larger than the radius of the alkali burn area

层基质, 数量较第 14 天减少, 康柏西普注射组与雷珠单抗注射组角膜组织结构基本趋于正常(图 3)。

2.3 不同时间点各组 CNV 面积比较

正常对照组未见 CNV。不同时间点康柏西普注



图 2 正常对照组角膜组织病理学表现 (HE, 标尺 = 50 μm) 角膜组织结构清晰, 结构完整, 无血管及炎性细胞浸润
Figure 2 Corneal histopathological findings in the normal control group (HE, bar = 50 μm) There were clear and intact corneal tissue without blood vessels and inflammatory cell infiltration

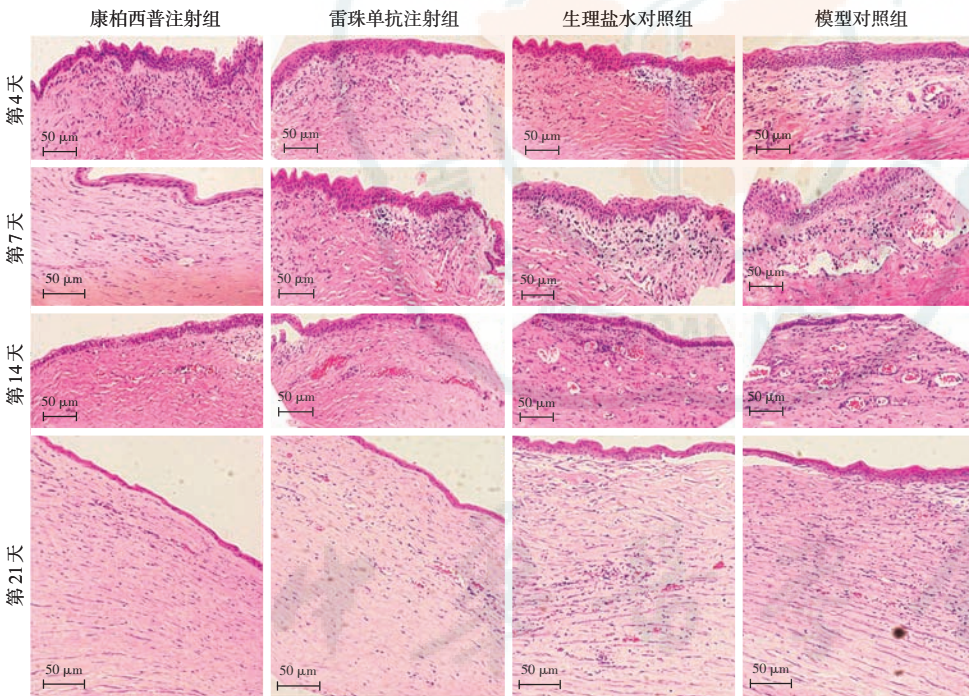


图 3 造模后不同时间点各组角膜组织病理学表现 (HE, 标尺 = 50 μm) 造模后第 4 天, 角膜上皮细胞增多, 上皮层存在空泡, 基质内大量炎性细胞浸润 上皮层下可见小的血管腔; 造模后第 7 天, 新生血管浸润浅层基质, 基质内可见大量炎性细胞; 造模后第 14 天, 生理盐水对照组与模型对照组基质内可见大量新生血管腔; 造模后第 21 天, 生理盐水对照组与模型对照组碱烧伤区域角膜基质结构紊乱, 新生血管管腔集中于中层基质, 康柏西普注射组与雷珠单抗注射组角膜组织结构基本趋于正常

Figure 3 Histopathological findings of cornea after alkali burning at various time points among different groups (HE, bar = 50 μm) On the 4th day after alkali burning, corneal epithelial cells were increased, vacuoles were found in the epithelium, a large number of inflammatory cells were found in the matrix, and small vascular lumen were seen below the epithelium; On the 7th day after alkali burning, new blood vessels infiltrated the shallow matrix, which contained a large number of inflammatory cells; On the 14th day after alkali burning, there were a large number of new blood vessels in the matrix of normal saline control group and model group; On the 21th day after alkali burning, corneal stromal structure disorder in the alkali-burned area was found in the saline control group and model control group, and the neovascularization lumen was concentrated in the middle stroma. The corneal tissue structure of the conbercept injected group and the ranibizumab injected group was basically normal

射组、雷珠单抗注射组、生理盐水对照组、模型对照组和正常对照组 CNV 面积总体比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 17.400, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 6.654, P < 0.01$)。造模后第 7 天, 康柏西普注射组、雷珠单抗注射组 CNV 面积小于生理盐水对照组和模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 造模后第 14 天, 康柏西普注射组 CNV 面积小于雷珠单抗注射组、生理盐水对照组和模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 雷珠单抗注射组新生血管面积小于生理盐水对照组和模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 1)。

2.4 造模后不同时间点各组 VEGF 质量浓度比较

不同时间点康柏西普注射组、雷珠单抗注射组、生理盐水对照组、模型对照组和正常对照组 VEGF 质量浓度总体比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 18.652, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 20.638, P < 0.01$)。造模后第 4 天, 康柏西普注射组、雷珠单抗注射组、生理盐水对照组和模型对照组 VEGF 质量浓度均高于正常对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 造模后第 7 天, 康柏西普注射组和雷珠单抗注射组房水 VEGF 质量浓度低于生理盐水对照组和模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 造模后第 14 天, 康柏西普注射组房水 VEGF 质量浓度低于雷珠单抗注射组、生理盐水对照组和模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 造模后第 21 天, 康柏西普注射组和雷珠单抗注射组房水 VEGF 质量浓度低于生理盐水对照组和模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

2.5 造模后不同时间点各组角膜组织 LYVE-1 表达比较

正常对照组角膜组织无淋巴管生长, 无 LYVE-1 阳性颗粒 (图 4)。造模后第 4 天, 康柏西普注射组、雷珠单抗注射组、生理盐水对照组和模型对照组角膜组织中出

表 1 造模后不同时间点各组 CNV 面积比较 (mean±SD, mm²)
Table 1 Comparison of CNV area among different groups at various time points after modeling (mean±SD, mm²)

组别	样本量	造模后不同时间点 CNV 面积			
		第 4 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
康柏西普注射组	3	3.94±5.24	7.50±4.66 ^{ab}	15.20±9.16 ^{abc}	27.98± 6.54
雷珠单抗注射组	3	3.65±2.43	7.01±2.87 ^{ab}	28.21±5.17 ^{ab}	53.53±16.09
生理盐水对照组	3	4.23±4.05	22.61±5.95	43.63±8.58	61.49±28.46
模型对照组	3	4.88±1.41	23.86±6.60	46.84±3.04	70.64± 7.79

注: $F_{\text{分组}} = 17.400, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 6.654, P < 0.01$. 与各自时间点模型对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与各自时间点生理盐水对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与各自时间点雷珠单抗注射组比较, ^c $P < 0.05$ (两因素方差分析, Tukey 检验) CNV: 角膜新生血管

Note: $F_{\text{group}} = 17.400, P < 0.01; F_{\text{time}} = 6.654, P < 0.01$. Compared with the model control group at the respective time points, ^a $P < 0.05$; compared with the normal saline control group at the respective time points, ^b $P < 0.05$; compared with the ranibizumab group at the respective time points, ^c $P < 0.05$ (two-way ANOVA, Tukey test) CNV: corneal neovascularization

表 2 造模后不同时间点各组房水中 VEGF 质量浓度比较 (mean±SD, pg/ml)
Table 2 Comparison of VEGF concentration in the aqueous humor among different groups at various time points after modeling (mean±SD, pg/ml)

组别	样本量	造模后不同时间点房水中 VEGF 质量浓度			
		第 4 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
康柏西普注射组	3	14.95±0.41 ^a	13.20±2.78 ^{ab}	7.75±6.56 ^{bc}	10.13± 0.86 ^b
雷珠单抗注射组	3	16.56±1.39 ^a	13.50±4.08 ^{ab}	16.98±2.17 ^a	16.29± 3.57 ^a
生理盐水对照组	3	16.65±9.25 ^a	19.66±3.45 ^a	23.12±5.96 ^a	26.27± 0.73 ^a
模型对照组	3	13.18±2.61 ^a	18.30±1.97 ^a	22.01±7.07 ^a	29.09±10.19 ^a
正常对照组	2	3.47±0.40	3.47±0.40	3.47±0.40	3.47± 0.40

注: $F_{\text{分组}} = 18.652, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 20.638, P < 0.01$. 与各自时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与各自时间点生理盐水对照组比较, ^b $P < 0.05$; 与各自时间点雷珠单抗注射组比较, ^c $P < 0.05$ (两因素方差分析, Tukey 检验) VEGF: 血管内皮生长因子

Note: $F_{\text{group}} = 18.652, P < 0.01; F_{\text{time}} = 20.638, P < 0.01$. Compared with the normal control group at each time point, ^a $P < 0.05$; compared with the normal saline control group at each time point, ^b $P < 0.05$; compared with the ranibizumab injection group at each time point, ^c $P < 0.05$ (two-way ANOVA, Tukey test) VEGF: vascular endothelial growth factor

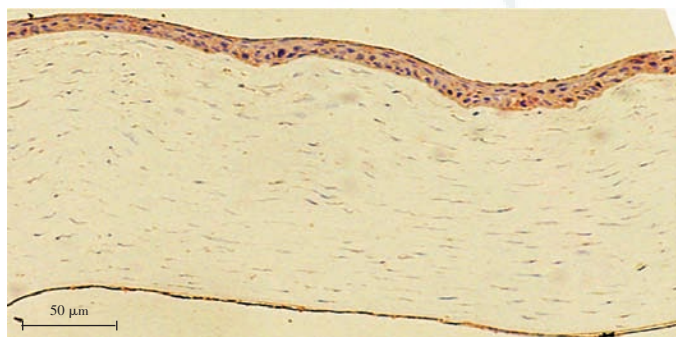


图 4 正常对照组 LYVE-1 免疫组织化学表现 (DAB, 标尺 = 50 μm) 角膜组织层次清晰, 基质内无 LYVE-1 阳性细胞

Figure 4 Immunolocalization of cornea LYVE-1 in the normal control group (DAB, bar = 50 μm) Corneal tissue showed clear corneal layers, and there was no LYVE-1 positive cells in corneal matrix

现新生淋巴管, 与新生血管平行生长; 造模后第 7 天, LVC 增加; 造模后第 14 天, LVC 达高峰; 造模后第 21 天, LVC 减少, 淋巴管腔增粗 (图 5)。

造模后第 7 天, 康柏西普注射组和雷珠单抗注射组 LVC 小于生理盐水对照组和模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 造模后第 14 天, 康柏西普注射组和雷珠单抗注射组 LVC 小于生理盐水对照组和模型对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。康柏西普注射组与雷珠单抗注射组、生理盐水对照组与模型对照组 LVC 比较, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 3)。

3 讨论

CNV 和新生淋巴管在角膜以及眼部的生理及病理过程中发挥重要作用。生理状态下角膜无血管和淋巴管, 保持角膜的透明性及相对免疫豁免状态。病理状态下 CNV 向反应区域输送炎症因子, 导致炎症瀑布反应, 新生淋巴管输送抗原到达淋巴结, 引起抗原抗体反应, 产生的抗体到达炎症反应区域, 促进炎症反应。此外, 新生淋巴管又能降低局部炎症细胞的渗透, 降低局部炎症反应, 促进伤口愈合^[5]。在角膜移植过程中新生淋巴管主导免疫排斥, 降低移植成功率。

研究表明, 靶向 VEGF 药物能有效抑制新生血管生长, 且安全性较好, 其作用机制与 VEGF 质量浓度降低有关^[6-9]。本研究中发现, 球结膜下注射康柏西普或雷珠单抗均能有效减少 CNV 的面积, 本研究中检测房水 VEGF 质量浓度, 因为房水中 VEGF 质量浓度低于碱烧伤角膜组织中 VEGF 质量浓度^[10], 故所测得的 VEGF 质量浓度较低。

CNV 肉眼可见, 活体易于比较血管生长的变化, 应用角膜组织中小血小板内皮细胞黏附分子 CD-31 对血管内皮细胞进行标记可间接反映 CNV 的生长情况; 而淋巴管肉眼不可见, 所以对角膜新生淋巴管的研究滞后于 CNV。随着淋巴管标志物 LYVE-1 和 VEGFR-3 的出现, 角膜新生淋巴管的研究飞速发展。本研究中引入淋巴管的特异标志物来检测碱烧伤动物模型中角膜组织内新生淋巴管的生长趋势^[11]。

经典观点认为, VEGF 通过与 VEGFR-2 结合主要促进新生血管的生长, VEGF 与 VEGFR-3 结合促进新

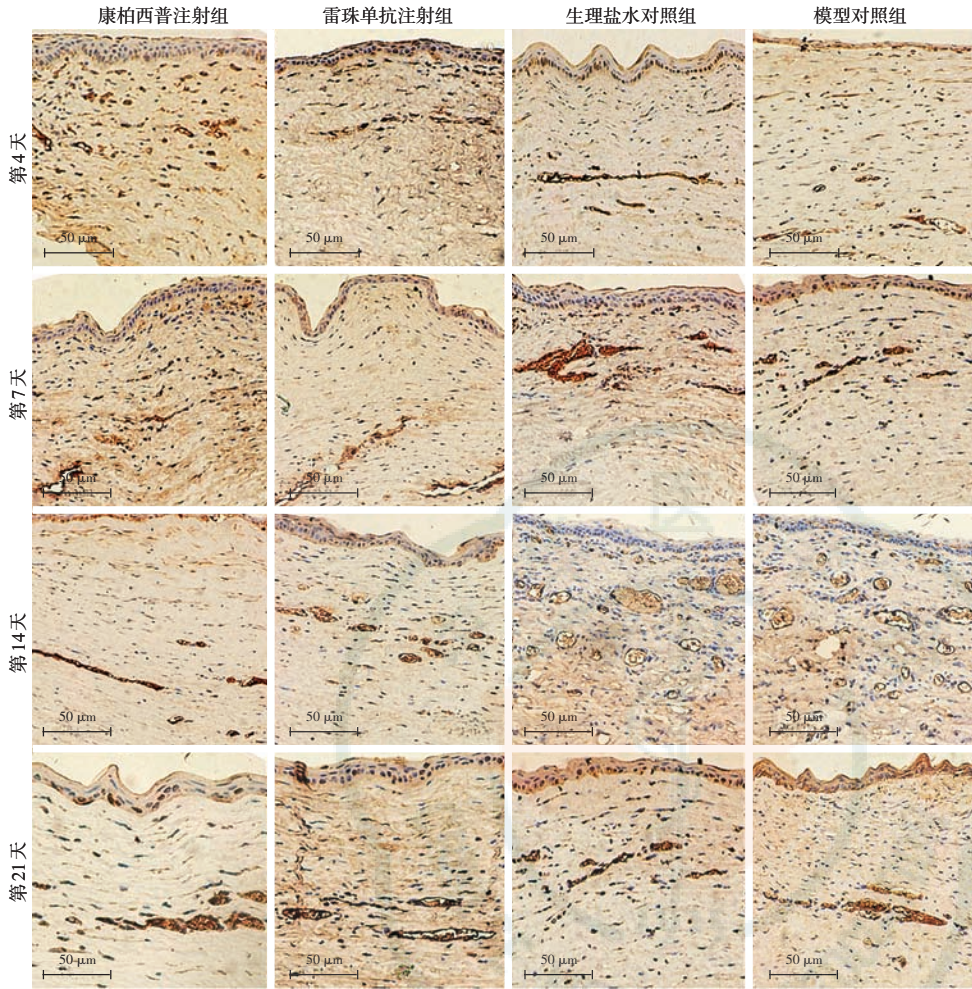


图 5 造模后各组兔眼角膜组织中 LYVE-1 表达及分布 (DAB ×100, 标尺 = 50 μm) 造模后第 4 天, 各组角膜组织中出现 LYVE-1 阳性标记的淋巴管; 造模后第 7 天, 各组角膜组织 LYVE-1 阳性表达增加; 造模后第 14 天 LYVE-1 阳性表达达到高峰; 造模后第 21 天, 各组角膜组织 LYVE-1 阳性表达降低

Figure 5 Immunolocalization of LYVE-1 of cornea after alkali burning at different time points (DAB ×100, bar = 50 μm) LYVE-1 positive lymphatic vessels appeared in the corneal tissues of each group on the 4th day after alkali burning; LYVE-1 positive expression increased in the corneal tissues of each group on the 7th day and peaked on the 14th day; LYVE-1 positive expression decreased in the corneal tissues of each group on the 21th day

表 3 不同时间点各组兔眼角膜组织中 LVC 比较 (mean±SD)
Table 3 Comparison of LVC among different groups at various time points (mean±SD)

组别	样本量	不同时间点角膜组织中 LVC			
		第 4 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
康柏西普注射组	10	3.33±0.58	4.33±0.58 ^{ab}	7.00±1.00 ^{ab}	4.33±0.57
雷珠单抗注射组	10	3.33±0.58	4.67±0.58 ^{ab}	6.33±0.57 ^{ab}	5.00±1.00
生理盐水对照组	10	3.67±0.58	10.67±0.58	13.67±2.89	6.00±2.00
模型对照组	10	3.33±0.58	12.33±0.58	16.67±1.15	6.00±2.00

注: $F_{\text{分组}} = 20.412, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 18.813, P = 0.000$. 与各自时间点模型对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与各自时间点生理盐水对照组比较, ^b $P < 0.05$ (两因素方差分析, Tukey 检验) LVC: 新生淋巴管计数

Note: $F_{\text{group}} = 20.412, P = 0.000; F_{\text{time}} = 18.813, P = 0.000$. Compared with the model control group at each time point, ^a $P < 0.05$; compared with the normal saline control group at each time point, ^b $P < 0.05$ (two-way ANOVA, Tukey test) LVC: lymphatic vessels counting

生淋巴管的生长。在对 CNV 和角膜新生淋巴管的研究中发现, 巨噬细胞系统使 VEGF 与 VEGFR 的作用更加复杂^[12]。角膜组织中 VEGFR-3 的特异性配体促进角膜新生淋巴管的生长, 也能激活巨噬细胞系统, 被激活的巨噬细胞系统可分泌 VEGF-A, 促进 CNV 生长^[13]。研究显示, VEGF-A 可以趋化巨噬细胞, 聚集的巨噬细胞可分泌 VEGF-C 和 VEGF-D, 促进角膜新生淋巴管生长^[14]。研究发现, 雷珠单抗也有抑制角膜新生淋巴管的作用^[15]。本研究中发现碱烧伤后角膜新生淋巴管与 CNV 平行生长, 碱烧伤后第 4 天角膜组织已有新生淋巴管生长, 碱烧伤后第 14 天 LVC 达高峰, 第 21 天新生淋巴管开始消退, LVC 减少。碱烧伤诱导 CNV 模型动物早期 (碱烧伤后第 1 天) 球结膜下注射康柏西普、雷珠单抗均能在一定程度上有效抑制角膜新生淋巴管生长。

本研究结果显示, 早期应用 (碱烧伤术后第 1 天球结膜下注射) 康柏西普与雷珠单抗, 对 CNV 均具有抑制作用, 但 2 种靶向 VEGF 药物都不能完全消除 CNV 和新生淋巴管的生长。我们之所以选择碱烧伤术后第 1 天应用康柏西普, 是因为早期应用贝伐单抗和雷珠单抗能取得较好的抑制 CNV 的效果^[10,16]。Azar^[17] 研究指出, 在角膜损伤愈合过程中, 早期应用抗 VEGF 药物在角膜组织中可得到抗 VEGF 药物高质量浓度聚集。在这一时期, 角膜基质细胞增生, 转化为成纤维细胞, 向角膜损伤区域移动、聚集, 同时分泌大量 VEGF 等生长因子^[18]。小血管或血管少的 CNV 患者应用贝伐单抗后新生血管的萎缩尤为显著, 但作用时间短暂^[19-20]。早期结膜下注射贝伐单抗、雷珠单抗能显著抑制

CNV, 而晚期 CNV 被周细胞及平滑肌覆盖成为成熟血管, 结膜下注射贝伐单抗失去了抑制 CNV 的作用^[10,21]。

雷珠单抗、贝伐单抗和哌加他尼在抑制 CNV 方面各有优劣。1 mg/0.1 ml 雷珠单抗能够有效抑制 CNV^[22-24], 本研究选取 1 mg/0.1 ml 雷珠单抗作为阳性对照组。本研究中还发现碱烧伤后第 1 天, 球结膜下注射 1 次康柏西普或雷珠单抗, 其降低 VEGF 质量浓度的作用可维持 21 d, 与以往研究结果一致^[10]。

综上所述, 康柏西普早期球结膜下注射能有效抑制碱烧伤诱导 CNV 以及角膜新生淋巴管生长。本研究尚存在不足之处, 缺乏糖皮质激素类药物对照实验组; 碱烧伤后引起的角膜水肿、不透明性是导致观察数据发生偏移的重要因素; 免疫组织化学无表达以及低表达的现象与角膜组织样本取样位置不准确有关; 由于分组较多, 各组实验动物数量较少, 后续需要增加实验动物数量。为了提高治疗的有效性, 联合用药、1 次高剂量注射以及多次注射有可能成为治疗 CNV、角膜新生淋巴管更好的选择^[25], 康柏西普的有效性和作用强度与药物浓度以及用药时间间隔和追加方案相互间的关系有待进一步研究阐明。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Stevenson W, Cheng SF, Dastjerdi MH, et al. Corneal neovascularization and the utility of topical VEGF inhibition; ranibizumab (Lucentis) vs bevacizumab (Avastin) [J]. *Ocul Surf*, 2012, 10(2): 67-83. DOI: 10.1016/j.jtos.2012.01.005.
- [2] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors [J]. *FASEB J*, 1999, 13(1): 9-22.
- [3] Li T, Hu A, Li S, et al. KH906, a recombinant human VEGF receptor fusion protein, is a new effective topical treatment for corneal neovascularization [J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 797-803.
- [4] Zhang M, Zhang J, Yan M, et al. A phase 1 study of KH902, a vascular endothelial growth factor receptor decoy, for exudative age-related macular degeneration [J]. *Ophthalmology*, 2011, 118(4): 672-678. DOI: 10.1016/j.ophtha.2010.08.008.
- [5] Aebischer D, Iolyeva M, Halin C. The inflammatory response of lymphatic endothelium [J]. *Angiogenesis*, 2014, 17(2): 383-393. DOI: 10.1007/s10456-013-9404-3.
- [6] Zhou AY, Bai YJ, Zhao M, et al. KH902, a recombinant human VEGF receptor fusion protein, reduced the level of placental growth factor in alkali burn induced-corneal neovascularization [J]. *Ophthalmic Res*, 2013, 50(3): 180-186. DOI: 10.1159/000353437.
- [7] Roshandel D, Eslani M, Baradaran-Rafii A, et al. Current and emerging therapies for corneal neovascularization [J]. *Ocul Surf*, 2018, 16(4): 398-414. DOI: 10.1016/j.jtos.2018.06.004.
- [8] Merz PR, Röckel N, Ballikaya S, et al. Effects of ranibizumab (Lucentis®) and bevacizumab (Avastin®) on human corneal endothelial cells [J]. *BMC Ophthalmol*, 2018, 18(1): 316-322. DOI: 10.1186/s12886-018-0978-9.
- [9] 李宇, 邓应平, 张明, 等. KH902 抑制大鼠角膜新生血管的实验研究 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2013, 44(1): 64-67.
Li Y, Deng YP, Zhang M, et al. An experimental study on inhibition effects of KH902 on rat corneal neovascularization [J]. *J Sichuan Univ (Med Sci Ed)*, 2013, 44(1): 64-67.
- [10] Liarakos VS, Papaconstantinou D, Vergados I, et al. The effect of subconjunctival ranibizumab on corneal and anterior segment neovascularization: study on an animal model [J]. *Eur J Ophthalmol*, 2014, 24(3): 299-308. DOI: 10.5301/ejo.5000391.
- [11] 刘法, 刘平. 角膜新生淋巴管的作用研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(9): 852-854. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.09.018.
Liu F, Liu P. Current study on function of corneal lymphangiogenesis [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(9): 852-854. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.09.018.
- [12] Bock F, Maruyama K, Regenfuss B, et al. Novel anti(lymph) angiogenic treatment strategies for corneal and ocular surface diseases [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2013, 34: 89-124. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.01.001.
- [13] Chung ES, Chauhan SK, Jin Y, et al. Contribution of macrophages to angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor receptor-3-specific ligands [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(5): 1984-1992. DOI: 10.2353/ajpath.2009.080515.
- [14] Cursiefen C, Chen L, Borges LP, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(7): 1040-1050. DOI: 10.1172/JCI20465.
- [15] Bucher F, Parthasarathy A, Bergua A, et al. Topical Ranibizumab inhibits inflammatory corneal hem- and lymphangiogenesis [J]. *Acta Ophthalmol*, 2014, 92(2): 143-148. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2012.02525.x.
- [16] Papathanassiou M, Theodossiadis PG, Liarakos VS, et al. Inhibition of corneal neovascularization by subconjunctival bevacizumab in an animal model [J]. *Am J Ophthalmol*, 2008, 145(3): 424-431. DOI: 10.1016/j.ajo.2007.11.003.
- [17] Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis) [J]. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 2006, 104: 264-302.
- [18] 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.
- [19] Awadein A. subconjunctival bevacizumab for vascularized rejected corneal grafts [J]. *J Cataract Refract surg*, 2007, 33(11): 1991-1993. DOI: 10.1016/j.jcrs.2007.07.012.
- [20] You IC, Kag IS, Lee SH, et al. Therapeutic effect of subconjunctival injection of bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization [J]. *Acta Ophthalmol*, 2009, 87(6): 653-658. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2008.01399.x.
- [21] 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 [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94205 [2019-03-12]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0094205>. DOI: 10.1371/journal.pone.0094205.
- [22] Sener E, Yuksel N, Yildiz DK, et al. The impact of subconjunctivally injected EGF and VEGF inhibitors on experimental corneal neovascularization in rat model [J]. *Curr Eye Res*, 2011, 36(11): 1005-1013. DOI: 10.3109/02713683.2011.601840.
- [23] Dursun A, Arici MK, Dursun F, et al. Comparison of the effects of bevacizumab and ranibizumab injection on corneal angiogenesis in an alkali burn induced model [J]. *Int J Ophthalmol*, 2012, 5(4): 448-451. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2012.04.08.
- [24] Akar EE, Oner V, Küçükerdönmez C, et al. Comparison of subconjunctivally injected bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib for inhibition of corneal neovascularization in a rat model [J]. *Int J Ophthalmol*, 2013, 6(2): 136-140. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2013.02.05.
- [25] Ulas B, Altan-Yaycioglu R, Bal N. Comparison of the inhibitory effect of different doses of subconjunctival bevacizumab application in an experimental model of corneal neovascularization [J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11(7): 1090-1095. DOI: 10.18240/ijo.2018.07.03.

(收稿日期: 2019-11-05 修回日期: 2020-05-25)

(本文编辑: 杜娟)