

兔眼玻璃体腔注射重组人血管内皮抑制素的安全性研究

夏颖 陈放 杜伟 朱俊 贾舒雅 马海莹 解正高

扬州大学附属苏北人民医院眼科 225001

夏颖现在南京医科大学附属无锡第二医院眼科 214000

解正高现在南京大学医学院附属鼓楼医院眼科 210008

通信作者:解正高,Email:zgxie87@163.com

【摘要】 目的 评估不同质量浓度重组人血管内皮抑制素(rh-endostatin)兔眼玻璃体腔注射的安全性。

方法 取健康成年新西兰白兔 30 只,以右眼为实验眼,按照计算机数字随机分配法随机平均分为 0.125 mg rh-endostatin 组、0.250 mg rh-endostatin 组、0.500 mg rh-endostatin 组、生理盐水组和正常对照组,每组 6 只。各注射组玻璃体腔注射 100 μ l 不同剂量的 rh-endostatin 或生理盐水,正常对照组不做处理。玻璃体腔注射前,注射后 1、3、7、14、30 和 60 d,裂隙灯显微镜和间接检眼镜下分别检查术眼眼前节和眼底,测量术眼眼压;于注射前,注射后 7、30 和 60 d 分别进行兔眼光相干断层扫描(OCT)检查;于注射前,注射后 14 和 60 d 行闪光视网膜电图检查;于注射后 60 d 摘除眼球,各组取其中 3 只眼球制作石蜡切片行组织病理学观察,另取 3 只眼球,分离视网膜组织并采用透射电子显微镜观察视网膜超微结构变化。**结果** 各注射组玻璃体腔注射后各时间点眼前节、后节均未见明显改变,其中 0.125 mg rh-endostatin 组、0.500 mg rh-endostatin 组于注射后 1 d 各有 1 眼前房出现絮状渗出,分别于注射后 7 d 和 14 d 渗出完全吸收。OCT 图像显示未出现异常光反射及形态改变。观察期间,各组注射前后各时间点间眼压值、a 波振幅、b 波振幅比较,差异均无统计学意义($F_{\text{分组}} = 0.134, 0.101, 0.476, F_{\text{时间}} = 1.709, 2.479, 1.706$, 均 $P > 0.05$)。光学显微镜及透射电子显微镜检查各视视网膜未见明显异常。**结论** 兔眼玻璃体腔注射 0.125~0.500 mg rh-endostatin 是安全的。

【关键词】 血管内皮抑制素;玻璃体腔注射;眼毒性;兔

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20201104-00744

Safety of intravitreal injection of recombinant human endostatin in rabbits

Xia Ying, Chen Fang, Du Wei, Zhu Jun, Jia Shuya, Ma Haiying, Xie Zhenggao

Department of Ophthalmology, Affiliated Subei People's Hospital to Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

Xia Ying is now working at the Department of Ophthalmology, the Affiliated Wuxi No. 2 People's Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi 214000, China

Xie Zhenggao is now working at the Department of Ophthalmology, Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China

Corresponding author: Xie Zhenggao, Email: zgxie87@163.com

[Abstract] Objective To investigate and evaluate the safety of intravitreal injection of recombinant human endostatin (rh-endostatin) with different concentrations in rabbit eyes. **Methods** Thirty healthy adult New Zealand white rabbits were enrolled with the right eyes selected as experimental eyes, and were randomly divided into five groups by random distribution of computer numbers, with 6 eyes in each group. The rabbits in the normal control group were given no treatment, and the rabbits in the normal saline group, 0.125 mg rh-endostatin group, 0.250 mg rh-endostatin group and 0.500 mg rh-endostatin group were treated with 100 μ l of normal saline, 0.125 mg/100 μ l, 0.250 mg/100 μ l and 0.500 mg/100 μ l rh-endostatin according to grouping, respectively. The anterior segment and fundus of the experimental eyes were examined using slit lamp biomicroscope and indirect ophthalmoscope, and the intraocular pressure (IOP) of the experimental eyes were measured with iCARE handheld tonometer before injection and 1 day, 3, 7, 14, 30 and 60 days after injection. Optical coherence tomography (OCT) examination was performed before the intravitreal injection and 7, 30, and 60 days after injection, respectively. Flash electroretinogram was

performed before intravitreal injection and 14 days and 60 days after injection. The rabbits were sacrificed by euthanasia at 60th day after injection. Three experimental eyes of each group were dissected and made into paraffin section, and histopathological staining was used to detect the retinal structural changes. The retinal tissue was separated from the other three study eyes in each group, and the transmission electron microscope was employed to observe the ultrastructural changes of the retina. All animal experiments were performed in adherence to the Regulations of the State and the Animal Center of Yangzhou University Medical College for the Use of Animals in Research. **Results** After intravitreal injection, no obvious anterior or posterior chamber change was observed by slit lamp microscopy in all groups at any time point. Flocculent seepage was observed in one eye of the 0.125 mg and 0.500 mg rh-endostatin group, respectively, which was then absorbed completely on the 7th and 14th day. OCT examination showed no abnormal light reflection or morphological changes in fundus of day after injection in all the groups. There was no significant difference in IOP, a-wave and b-wave amplitude among all the groups at different time points ($F_{\text{group}} = 0.134, 0.101, 0.476$; $F_{\text{time}} = 1.709, 2.479, 1.706$; all at $P > 0.05$). Neither light nor electron microscopy showed any retinal damage in any group. **Conclusions** Intravitreal injection of rh-endostatin is safe at the dosage of 0.125–0.500 mg in rabbits.

[Key words] Endostatin; Intravitreal injections; Ocular toxicity; Rabbit

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20201104-00744

增生性糖尿病视网膜病变、湿性年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉阻塞、早产儿视网膜病变等是常见的新生血管性眼病^[1]。抑制血管生成是治疗新生血管性眼病的主要方法之一,其中抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)药物临床疗效显著^[2-4]。然而,价格昂贵限制了其在临床的普及应用^[5]。血管内皮抑制素是胶原蛋白 XVIII 分子 C 端的水解片段,是迄今发现的最有效的内源性血管生成抑制因子之一^[6]。研究表明,重组人血管内皮抑制素(recombinant human endostatin, rh-endostatin)可以抑制实验动物的脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)形成,并且可以有效抑制人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)的增生、迁移、侵袭以及管腔样结构形成^[7-8]。目前, rh-endostatin 眼内应用的安全性研究尚未见报道,本研究探讨正常兔眼玻璃体腔注射不同剂量 rh-endostatin 后眼内结构和功能变化,探讨其眼内注射的安全性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取健康雄性成年新西兰白兔 30 只(由扬州大学医学院动物中心提供),质量 2.0~2.5 kg。实验严格按照国家和扬州大学医学院动物中心动物使用管理条例进行。

1.1.2 主要试剂及仪器 rh-endostatin 注射液(山东先声麦得津生物制药有限公司,批号:S20050088,规格:15 mg/3 ml);复方托吡卡胺滴眼液(日本参天制药株式会社);盐酸丙美卡因滴眼液(瑞士诺华公司)。

iCARE 手持眼压计(TA 01,芬兰 TiolatOy 公司);光相干断层扫描仪(optical coherence tomography, OCT)(Cirrus HD-OCT 4000,德国 Zeiss 公司);视觉电生理检查仪(APS-2000AER,重庆康华瑞明科技股份有限公司);光学显微镜(日本 Nikon 公司);透射电子显微镜(HT7700,日本日立公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及处理 取实验兔常规行裂隙灯显微镜、直接检眼镜检查,排除眼部疾患,均取右眼为实验眼。按照计算机数字随机分配法将实验兔随机平均分为 0.125 mg rh-endostatin 组、0.250 mg rh-endostatin 组、0.500 mg rh-endostatin 组、生理盐水组和正常对照组,每组 6 只眼。取 rh-endostatin 注射液用生理盐水分别稀释成 0.125 mg/100 μl 、0.250 mg/100 μl 和 0.500 mg/100 μl 。各药物注射组玻璃体腔分别注入 100 μl 相应质量浓度的 rh-endostatin;生理盐水组玻璃体腔注射 100 μl 生理盐水;正常对照组不予任何处理。玻璃体腔注药方法^[9-10]如下:应用质量分数 3%戊巴比妥钠按 1 ml/kg 耳缘静脉注射行全身麻醉,于注射前 30 min 复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳,盐酸丙美卡因滴眼液点眼行表面麻醉,开睑器开睑,质量分数 5%聚维酮碘冲洗结膜囊;以 1 ml 注射器连接 30 G 针头,在手术显微镜下,于颞上象限距角膜缘约 2.5 mm 处进针约 8 mm,期间避免误伤晶状体,将 rh-endostatin 或生理盐水注入玻璃体腔中央,推注完毕后拔出注射器,同时用显微镊夹持穿刺口 3 s,取 1 ml 注射器针头行前房穿刺,抽出约 0.1 ml 的房水;注射给药后常规氧氟沙星眼膏涂术眼 1 周,每日 2 次。

1.2.2 兔眼前后节结构检查及眼压测量 注射给药后观察实验兔的休息状态、进食、大小便等全身情况变化。分别于注射前,注射后 1、3、7、14、30 和 60 d 在裂隙灯显微镜下检查各组术眼眼前节,间接检眼镜下观察玻璃体和视网膜,应用 iCARE 手持眼压计测量眼压,每个时间点眼压测量 3 次,取平均值。分别于注射前,注射后 7、30 和 60 d 行 OCT 检查,选择兔眼视盘鼻侧下方约 1 个视盘直径处进行扫描检查。

1.2.3 闪光视网膜电图检查 分别于注射前,注射后 14 和 60 d 行闪光视网膜电图检查各组实验眼功能变化。应用复方托吡卡胺滴眼液扩瞳并暗适应至少 30 min,于全身麻醉下进行视觉电生理检查仪检查。使用动物实验专用电极,将角膜电极置于角膜表面,参考电极和接地电极分别置于面颊和额部正中皮下。采用全视野刺激球白色闪光刺激,背景无色,通频带低频为 300 Hz,高频为 0.1 Hz,刺激模式为单刺激,频率为 0.05 Hz,闪光强度为 $6.325 \times 10^{-1} \text{cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$,刺激次数为 5 次,放大倍数为 10 万倍,每次采样时间 250 ms。兔头部置于刺激球中央,记录暗适应下最大混合反应,每只动物记录稳定波形 3 次。

1.2.4 组织病理学检查 于注射给药后 60 d 检查各组实验眼视网膜结构变化,耳缘静脉注射过量戊巴比妥钠处死实验兔,迅速摘取术眼眼球。各组取 3 只眼球,剪开角膜并浸入体积分数 10% 的酸性甲醛溶液中固定 48 h,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,沿眼球矢状位行 $4 \mu\text{m}$ 厚连续切片,常规行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察视网膜结构变化。

1.2.5 透射电子显微镜下观察各组视网膜超微结构变化 于注射给药后 60 d,各组另取 3 只眼球,4 °C 条件下于体积分数 2.5% 戊二醛电子显微镜固定液中分离出后极部视网膜,所有操作在 1 min 内完成。取后极部视网膜于 4 °C 条件下 2.5% 戊二醛溶液中固定 24 h,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 漂洗 3 次,4 °C 条件下于体积分数 1% 锇酸固定液中固定 3 h,用 PBS 漂洗 3 次。梯度乙醇脱水,环氧树脂包埋。应用超薄切片机切片,切片厚度为 60~80 nm,切片行枸橼酸铅和醋酸双氧铀染色。透射电子显微镜下观察视网膜超微结构。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。本研究计量资料经 W 检验证实呈正态分布,以 $\text{mean} \pm \text{SD}$

表示,并经方差齐性检验证实方差齐,各实验组注射前后不同时间点眼压值及 a、b 波振幅值的总体差异比较均采用重复测量两因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组兔眼玻璃体腔注射前后不同时间点兔眼前后节结构改变

不同质量浓度 rh-endostatin 玻璃体腔注射后实验兔均精神良好,饮水、进食正常。注射过程中,0.500 mg rh-endostatin 组有 1 只眼发生结膜下出血,并于 14 d 时出血全部吸收。注射后 1 d,0.125 mg 组、0.500 mg 组各有 1 只眼前房出现絮状渗出物,分别在注射后 7 d 和 14 d 吸收。在观察期间,未发生感染性眼内炎、角膜损伤、白内障、玻璃体积血及视网膜脱离等并发症。OCT 检查结果显示,各组注射前后不同时间点眼底均未见明显改变(图 1)。

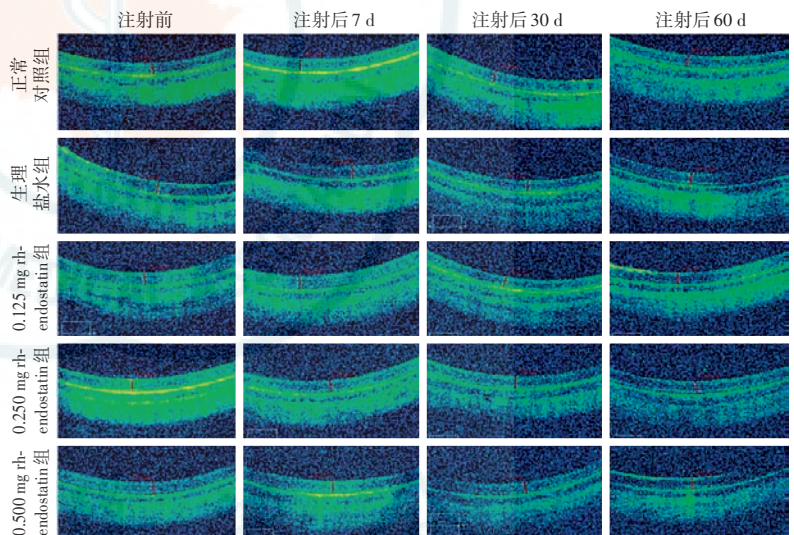


图 1 各组兔眼玻璃体腔注射前后不同时间点眼底 OCT 图像 各组不同时间点眼底均未见异常 rh-endostatin;重组人血管内皮抑制素

Figure 1 Fundus OCT images of rabbits eyes among different groups at different time points before and after intravitreal injection No abnormal fundus was observed at different time points in any group rh-endostatin;recombinant human endostatin

2.2 各组玻璃体腔注射前后不同时间点眼压变化

各组玻璃体腔注射前后不同时间点眼压值比较,差异均无统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 0.134, P = 0.969; F_{\text{时间}} = 1.709, P = 0.157$);不同时间和分组之间不存在明显交互作用 ($F_{\text{交互作用}} = 1.097, P = 0.369$) (表 1)。

2.3 各组玻璃体腔注射前后不同时间点实验眼功能变化

闪光视网膜电图检查结果显示,各组间 a、b 波振幅值总体比较,差异均无统计学意义 (a 波: $F_{\text{分组}} =$

0.101, $P=0.981$; b 波: $F_{\text{分组}}=0.476, P=0.753$); 玻璃体腔注射前后各时间点间 a、b 波振幅值比较, 差异均无统计学意义 (a 波: $F_{\text{时间}}=2.479, P=0.095$; b 波: $F_{\text{时间}}=1.706, P=0.201$); 不同时间和分组之间不存在明显交互作用 (a 波: $F_{\text{交互作用}}=0.875, P=0.545$; b 波: $F_{\text{交互作用}}=0.245, P=0.960$) (表 2)。

表 1 各组兔眼玻璃体腔注射前后不同时间点眼压值比较 (mean±SD, mmHg)
Table 1 Comparison of intraocular pressure among different groups at different time points before and after intravitreal injection (mean±SD, mmHg)

组别	眼数	不同时间点眼压值						
		注射前	注射后 1 d	注射后 3 d	注射后 7 d	注射后 14 d	注射后 30 d	注射后 60 d
正常对照组	6	8.23±0.75	8.16±0.89	8.42±0.86	8.38±0.75	8.59±0.93	8.83±0.97	8.51±0.71
生理盐水组	6	8.11±1.13	8.19±1.28	7.96±0.93	8.01±1.21	8.32±0.76	8.25±1.12	8.41±1.04
0.125 mg rh-endostatin 组	6	8.22±0.91	7.99±0.90	7.88±1.12	8.19±1.21	8.09±0.96	8.25±1.12	8.31±1.07
0.250 mg rh-endostatin 组	6	8.52±1.18	8.61±0.91	8.00±1.51	8.21±1.12	8.36±1.28	8.36±1.19	8.15±1.40
0.500 mg rh-endostatin 组	6	8.25±1.34	7.85±1.37	8.04±1.24	8.13±1.29	8.03±1.07	8.03±1.54	8.01±1.56

注: $F_{\text{分组}}=0.134, P=0.969$; $F_{\text{时间}}=1.709, P=0.157$; $F_{\text{交互作用}}=1.097, P=0.369$ (重复测量两因素方差分析) 1 mmHg=0.133 kPa; rh-endostatin: 重组人血管内皮抑制素

Note: $F_{\text{group}}=0.134, P=0.969$; $F_{\text{time}}=1.709, P=0.157$; $F_{\text{interaction}}=1.097, P=0.369$ (Two way repeated measures ANOVA) 1 mmHg=0.133 kPa; rh-endostatin: recombinant human endostatin

表 2 各组兔眼玻璃体腔注射前后不同时间点 a、b 波振幅比较 (mean±SD, μV)
Table 2 Comparison of a wave and b wave amplitudes among different groups at different time points before and after intravitreal injection (mean±SD, μV)

组别	眼数	不同时间点 a 波振幅			不同时间点 b 波振幅		
		注射前	注射后 14 d	注射后 60 d	注射前	注射后 14 d	注射后 60 d
正常对照组	6	4.66±1.34	4.75±1.31	4.66±1.20	55.33±9.70	56.06±10.40	55.58±9.81
生理盐水组	6	4.53±1.21	4.80±1.08	5.16±1.50	55.22±8.29	56.33±9.37	54.70±7.21
0.125 mg rh-endostatin 组	6	5.07±0.69	4.95±1.13	5.28±1.04	54.05±9.11	55.13±10.40	55.30±10.69
0.250 mg rh-endostatin 组	6	4.95±1.74	5.11±1.40	5.10±1.47	58.74±9.36	61.51±8.16	59.62±11.00
0.500 mg rh-endostatin 组	6	4.97±0.82	5.03±1.28	5.07±0.99	52.64±7.46	53.75±5.33	53.41±9.71

注: a 波: $F_{\text{分组}}=0.101, P=0.981$; $F_{\text{时间}}=2.479, P=0.095$; $F_{\text{交互作用}}=0.875, P=0.545$; b 波: $F_{\text{分组}}=0.476, P=0.753$; $F_{\text{时间}}=1.706, P=0.201$; $F_{\text{交互作用}}=0.245, P=0.960$ (重复测量两因素方差分析) rh-endostatin: 重组人血管内皮抑制素

Note: a wave: $F_{\text{group}}=0.101, P=0.981$; $F_{\text{time}}=2.479, P=0.095$; $F_{\text{interaction}}=0.875, P=0.545$; b wave: $F_{\text{group}}=0.476, P=0.753$; $F_{\text{time}}=1.706, P=0.201$, $F_{\text{interaction}}=0.245, P=0.960$ (Two way repeated measures ANOVA) rh-endostatin: recombinant human endostatin

2.4 各组玻璃体腔注射后 60 d 组织病理学变化

玻璃体腔注射后 60 d, 各组眼球组织病理学检查均未见明显结构异常, 视网膜各层组织清晰可见 (图 2)。

2.5 各组玻璃体腔注射后 60 d 视网膜超微结构变化

透射电子显微镜检查结果显示, 各组视网膜内核层、外核层细胞核完整, 染色质弥散分布, 无空泡样改变, 光感受器内、外节结构未见异常, 外节膜盘排列整齐, 结构清晰 (图 3)。

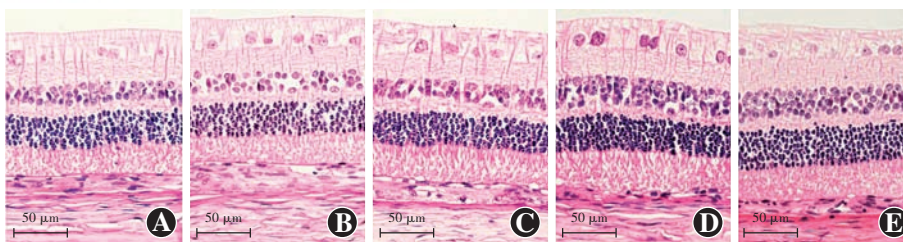


图 2 各组玻璃体腔注射后 60 d 眼球组织病理学观察 (HE ×400, 标尺 = 50 μm) 各组视网膜各层组织清晰可见, 未见明显结构异常 A: 正常对照组 B: 生理盐水组 C: 0.125 mg rh-endostatin 组 D: 0.250 mg rh-endostatin 组 E: 0.500 mg rh-endostatin 组

Figure 2 Histopathological observation of eyeballs at 60 days after intravitreal injection in each group (HE ×400, scale bar = 50 μm) All layers of retina in each group were clearly visible without obvious structural abnormality A: normal control group B: normal saline group C: 0.125 mg rh-endostatin group D: 0.250 mg rh-endostatin group E: 0.500 mg rh-endostatin group

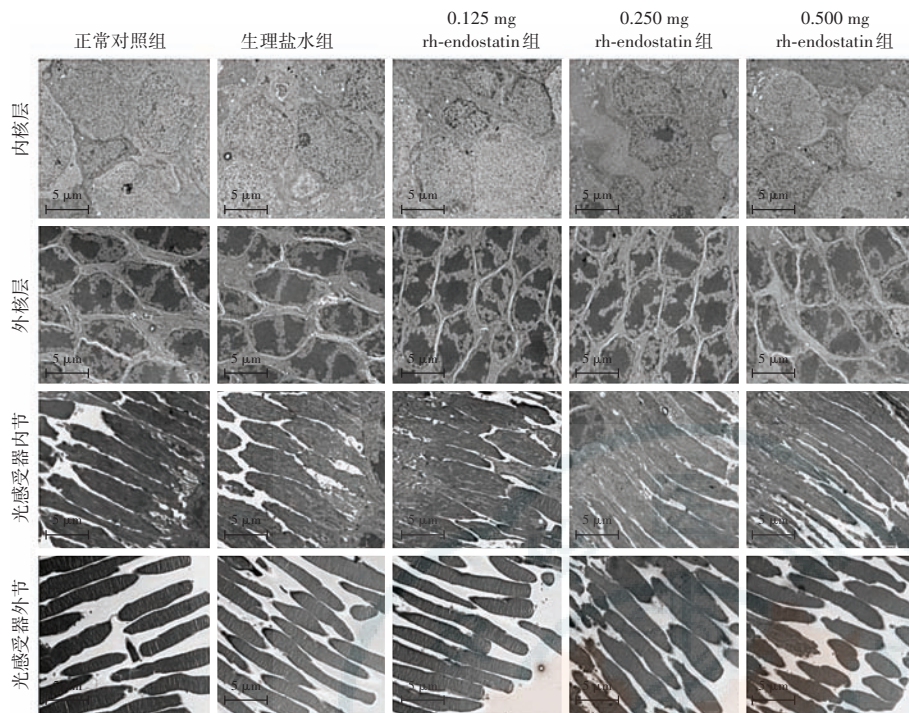


图 3 各组玻璃体腔注射后 60 d 视网膜透射电子显微镜检查 ($\times 1\,200$, 标尺 = $5\ \mu\text{m}$) 各组视网膜内核层、外核层, 光感受器内节、外节细胞结构均正常 rh-endostatin: 重组人血管内皮抑制素
Figure 3 Transmission electron microscopy detection of retina at 60 days after intravitreal injection in each group ($\times 1\,200$, scale bar = $5\ \mu\text{m}$) The cells in the inner and outer nuclear layers, the inner and outer segments of photoreceptors of retina were normal rh-endostatin: recombinant human endostatin

3 讨论

新生血管生成受多种因子的调控, 其中 VEGF 是重要的细胞因子^[9-11], 抗 VEGF 治疗是抗新生血管生成的主要方法。然而, 部分患者对抗 VEGF 药物无反应, 给药后视力不提高, 甚至再次出现眼内新生血管^[12]; 另有研究显示, 病理性新生血管形成过程涉及除 VEGF 之外的其他细胞因子^[13]。因此, 有必要研究其他作用机制的药物。rh-endostatin 作为一种内源性血管生成抑制剂, 目前主要用于临床非小细胞肺癌的治疗, 其主要作用机制是抑制肿瘤新生血管的生成。rh-endostatin 可以直接作用于肿瘤周边的毛细血管内皮细胞, 而对正常细胞无影响; 同时也参与调控 VEGF 的表达和多种蛋白水解酶的活动, 间接抑制病理性新生血管形成^[14]。此外, rh-endostatin 在中国已实现大批量生产, 具有极大的价格优势。

目前已有研究将 rh-endostatin 用于新生血管性眼病的治疗。有研究发现玻璃体腔注射血管内皮抑制素可以有效抑制高氧诱导的小鼠视网膜新生血管形成和 HUVEC 的增生^[15-16]。静脉注射腺病毒载体提高血液中内皮抑制素浓度同样可以抑制激光诱导的 CNV, 并

且血管内皮抑制素浓度与 CNV 面积呈负相关^[17]。Bai 等^[18]发现内皮抑制素可以抑制体外培养的 HUVEC 增生、迁移、管腔形成及 VEGF 的分泌, 并可诱导细胞凋亡; 低氧诱导视网膜病变模型鼠玻璃体腔注射内皮抑制素可以使视网膜无灌注区面积由 30% 降至 23%, 同时 VEGF 水平下调。Campochiaro 等^[19]将表达内皮抑制素和血管抑制素的病毒载体注射至年龄相关黄斑变性患者的视网膜下, 发现注射后病灶荧光素渗漏减轻。以上结果提示内皮抑制素对新生血管性眼病具有一定的治疗作用。

目前, 临床上 rh-endostatin 通过静脉给药, 在 rh-endostatin 联合一些标准化疗方案治疗恶性肿瘤的研究中, 联合用药并没有增加治疗相关的严重不良反应, 主要不良反应为血液和胃肠道毒性, 而患者的

总缓解率、无进展生存率等指标均有不同程度提高^[20-21]。此外, Huang 等^[22]向小鼠腹腔内注射或者持续泵入 rh-endostatin 后 1 周, 小鼠心脏、肺脏、肾脏组织及组织中微血管密度均未出现明显异常, 但持续泵入 rh-endostatin 有损伤内皮细胞的可能。新生血管性眼病的治疗主要是玻璃体腔局部给药, 因此出现全身并发症的风险极低。目前, 玻璃体腔注射内皮抑制素的安全性尚未见报道。本实验通过对玻璃体腔注射 0.125~0.500 mg rh-endostatin 实验兔进行 60 d 的观察, 并未发现眼压升高或视网膜结构与功能的明显损伤, 提示兔眼玻璃体腔注射 0.125~0.500 mg rh-endostatin 是安全的。此外, 本研究与文献^[23-24]均使用相同的眼压计测量眼压值, 测量结果均低于实验兔的实际眼压, 推测其可能与研究中所使用的眼压计原理相关。

本研究结果表明兔眼玻璃体腔注射 0.125~0.500 mg rh-endostatin 是安全的, 为其在抗新生血管性疾病治疗方面的应用提供了实验依据。未来仍需对其在眼内的半衰期及代谢动力学进行研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Penn JS, Madan A, Caldwell RB, et al. Vascular endothelial growth

- factor in eye disease[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2008, 27(4): 331-371. DOI:10.1016/j.preteyeres.2008.05.001.
- [2] Yamashiro K, Mori K, Honda S, et al. A prospective multicenter study on genome wide associations to ranibizumab treatment outcome for age-related macular degeneration [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9196 [2020-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28835685/>. DOI:10.1038/s41598-017-09632-0.
- [3] Stewart MW. A review of ranibizumab for the treatment of diabetic retinopathy[J]. *Ophthalmol Ther*, 2017, 6(1): 33-47. DOI:10.1007/s40123-017-0083-9.
- [4] Vander Veen DK, Cataltepe SU. Anti-vascular endothelial growth factor intravitreal therapy for retinopathy of prematurity[J]. *Semin Perinatol*, 2019, 43(6): 375-380. DOI:10.1053/j.semperi.2019.05.011.
- [5] Raftery J, Clegg A, Jones J, et al. Ranibizumab (Lucentis) versus bevacizumab (Avastin): modelling cost effectiveness[J]. *Br J Ophthalmol*, 2007, 91(9): 1244-1246. DOI:10.1136/bjo.2007.116616.
- [6] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285. DOI:10.1016/S0092-8674(00)81848-6.
- [7] Xu X, Mao W, Chen Q, et al. Endostar, a modified recombinant human endostatin, suppresses angiogenesis through inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107463 [2019-11-15]. <https://doi.org/10.371/journal.pone.0107463>. DOI:10.1371/journal.pone.0107463.
- [8] Marneros AG, She H, Zambarkji H, et al. Endogenous endostatin inhibits choroidal neovascularization [J]. *FASEB J*, 2007, 21(14): 3809-3818. DOI:10.1096/fj.07-8422com.
- [9] Ye Z, Ji YL, Ma X, et al. Pharmacokinetics and distributions of bevacizumab by intravitreal injection of bevacizumab-PLGA microspheres in rabbits[J]. *Int J Ophthalmol*, 2015, 8(4): 653-658. DOI:10.3980/j.issn.2222-3959.2015.04.02.
- [10] Ye YF, Gao YF, Xie HT, et al. Pharmacokinetics and retinal toxicity of various doses of intravitreal triamcinolone acetonide in rabbits[J]. *Mol Vis*, 2014, 20: 629-636.
- [11] Uccelli A, Wolff T, Valente P, et al. Vascular endothelial growth factor biology for regenerative angiogenesis [J/OL]. *Swiss Med Wkly*, 2019, 149: w20011 [2019-11-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30685867/>. DOI:10.4414/sm.w.2019.20011.
- [12] Ventrice P, Leporini C, Aloe JF, et al. Anti-vascular endothelial growth factor drugs safety and efficacy in ophthalmic diseases [J]. *J Pharmacol Pharmacother*, 2013, 4(Suppl 1): S38-S42. DOI:10.4103/0976-500X.120947.
- [13] Hajrasouliha AR, Jiang G, Lu Q, et al. Exosomes from retinal astrocytes contain antiangiogenic components that inhibit laser-induced choroidal neovascularization [J/OL]. *J Biol Chem*, 2013, 288(39): 28058-28067 [2019-12-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23926109/>. DOI:10.1074/jbc.M113.470765.
- [14] Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy—endostatin and its mechanisms of action [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(5): 594-607. DOI:10.1016/j.yexcr.2005.11.015.
- [15] 杨芬, 张美霞, 张军军, 等. 内皮抑素对培养的血管内皮细胞增殖的影响 [J]. *国际眼科杂志*, 2008, 8(12): 2411-2413.
- Yang D, Zhang MX, Zhang JJ, et al. Effects of endostatin on the proliferation of vascular endothelial cells cultured in different conditions [J]. *Int J Ophthalmol*, 2008, 8(12): 2411-2413.
- [16] 张美霞, 张军军, 严密. 内皮抑素抑制氧致视网膜病变小鼠新生血管形成的实验研究 [J]. *中华眼底病杂志*, 2005, 21(5): 314-317. DOI:10.3760/j.issn.1005-1015.2005.05.013.
- Zhang MX, Zhang JJ, Yan M. Inhibitory effects of endostatin on oxygen-induced retinal neovascularization in rats with retinopathy [J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2005, 21(5): 314-317. DOI:10.3760/j.issn.1005-1015.2005.05.013.
- [17] Mori K, Ando A, Gehlbach P, et al. Inhibition of choroidal neovascularization by intravenous injection of adenoviral vectors expressing secreted endostatin [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(1): 313-320. DOI:10.1016/S0002-9440(10)61697-5.
- [18] Bai YJ, Huang LZ, Zhou AY, et al. Antiangiogenesis effects of endostatin in retinal neovascularization [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2013, 29(7): 619-626. DOI:10.1089/jop.2012.0225.
- [19] Campochiaro PA, Lauer AK, Sohn EH, et al. Lentiviral vector gene transfer of endostatin/angiostatin for macular degeneration (GEM) study [J]. *Hum Gene Ther*, 2017, 28(1): 99-111. DOI:10.1089/hum.2016.117.
- [20] Huang W, Liu J, Wu F, et al. The efficacy and safety of endostar combined with taxane-based regimens for HER-2-negative metastatic breast cancer patients [J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(21): 31501-31507 [2019-12-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27129172/>. DOI:10.18632/oncotarget.8967.
- [21] Hu W, Fang J, Nie J, et al. Efficacy and safety of extended use of platinum-based doublet chemotherapy plus endostatin in patients with advanced nonsmall cell lung cancer [J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(28): e4183 [2020-01-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27428214/>. DOI:10.1097/MD.0000000000004183.
- [22] Huang R, Zhan Q, Zhou X, et al. Continuous administration of recombinant human endostatin (Endostar): a pre-clinical safety study [J]. *Exp Ther Med*, 2012, 3(6): 1018-1022. DOI:10.3892/etm.2012.534.
- [23] Chiang B, Kim YC, Edelhauser HF, et al. Circumferential flow of particles in the suprachoroidal space is impeded by the posterior ciliary arteries [J]. *Exp Eye Res*, 2016, 145: 424-431. DOI:10.1016/j.exer.2016.03.008.
- [24] Rauck BM, Friberg TR, Medina Mendez CA, et al. Biocompatible reverse thermal gel sustains the release of intravitreal bevacizumab *in vivo* [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(1): 469-476. DOI:10.1167/iovs.13-13120.

(收稿日期:2020-11-04 修回日期:2020-12-13)

(本文编辑:张宇)

读者·作者·编者

本刊对基金项目的证明和著录要求

文稿所涉及的课题如为国家、部、省、市级等基金资助项目,请分别用中英文表述并分别列于文章中英文摘要关键词之下,“基金项目:”进行标识,并注明基金项目名称,并在圆括号内注明项目编号。基金项目名称应按国家有关部门规定的正式名称填写,多个基金资助的项目请全部列出,按资助机构的等级顺序排列,并以“;”隔开。如:基金项目:国家自然科学基金项目(30271269);国家重点基础研究发展规划(973计划)(2013CB532002);Fund program:National Natural Science Foundation of China(30271269);National Key Basic Research Program of China(973 Program)(2013CB532002)。获得基金项目资助的论文投稿时请提供基金项目资助证明的复印件或扫描后发至编辑部信箱。

(本刊编辑部)