

· 实验研究 ·

# 血管抑素抑制大鼠角膜新生血管的研究

曾 静 黄明汉 王国华 王冬梅 胡志佳

## Inhibitory effect of angiostatin on rat corneal neovascularization

Zeng Jing, Huang Minghan, Wang Guohua, Wang Dongmei, Hu Zhijia. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

**Abstract Objective** Angiostatin is thought to be one of the most effective neovascularization inhibitors. Many researches have revealed the strong inhibiting effect on tumour neovascularization. But seldom report is published in the study of effect of angiostatin on corneal neovascularization (CNVs) owing to alkali burn. Present study was to investigate the inhibitory effect of angiostatin on corneal neovascularization caused by alkali burn. **Methods** Corneal alkali-burned model was established in 120 Wistar rats by placing the filter paper soaked 1 mol/L NaOH solution at the center of cornea. The rat models were divided into four groups at random and 30 rats for each. 2.5  $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}$  angiostatin, 5  $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}$  angiostatin, 0.1 mg/0.1 mL dexamethasone and 0.1 mL 0.9% saline solution was subconjunctivally injected respectively in different groups for 4 times during the one week duration. Corneal opacity of rats was examined and scored by slit-lamp microscope at different time points. The new blood vessel area in corneas were calculated on the formation of  $S = C/12 \times 3.1416[r^2 - (r-L)^2]$ . The pathological sections of cornea were analyzed at 1, 3, 7, 10, 14, 21 days after injection under the light electron microscope. The use of animal followed the Standard of Association for Research in Vision and Ophthalmology. **Results** The corneal opacity score in 2.5  $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}$  angiostatin, 5  $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}$  angiostatin, 0.1 mg/0.1 mL dexamethasone group was lower than that in 0.9% saline solution group at 7, 10, 14 days after cautery with statistically significant differences ( $P < 0.01$ ). On the 14th day after alkali burned, CNVs presented the densely distribution over the cornea in 0.9% saline solution group, but a fewer CNVs were seen in 5  $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}$  angiostatin group. The new blood vessels buds were seen, but fewer mature vessel formed in 5  $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}$  angiostatin group. However, a lots of mature vessels with mature erythrocytes in 0.9% saline solution group on the 14th day after alkali burned. **Conclusion** Angiostatin can effectively restrain rat corneal neovascularization after alkali burned.

**Key words** angiostatin; corneal neovascularization; alkali burn

**摘要 目的** 研究血管抑素(AS)对大鼠角膜碱烧伤后新生血管的抑制作用。 **方法** 120只Wistar大鼠制作碱烧伤角膜新生血管(CNV)模型,随机分为4组,分别为2.5  $\mu\text{g}$  AS组、5  $\mu\text{g}$  AS组、地塞米松组、生理盐水组,每组30只。分别给予2.5  $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}$  AS、5  $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}$  AS、0.1 mg/0.1 mL地塞米松、生理盐水各0.1 mL,球结膜下注射,隔日1次,共4次。在大鼠角膜碱烧伤后不同时间裂隙灯下观察大鼠角膜混浊度,计算新生血管面积,分析角膜组织病理切片。 **结果** 2.5  $\mu\text{g}$  AS组、5  $\mu\text{g}$  AS组及地塞米松组在第7、10、14天较生理盐水组角膜混浊程度轻,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 2.5  $\mu\text{g}$  AS组、5  $\mu\text{g}$  AS组及地塞米松组在碱烧伤后第3天起各时间点新生血管面积小于生理盐水组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。 **结论** AS能有效抑制大鼠角膜碱烧伤后CNV的形成。

**关键词** 血管抑素; 角膜新生血管; 碱烧伤

**分类号** R 772.2 R 988.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)06-0468-04

正常角膜透明无血管,在感染、外伤、免疫反应等病理情况下,角膜新生血管(corneal neovascularization,

CNV)生成,致角膜失去透明性,是致盲的一个重要原因,也是临床上一个棘手的难题。血管抑素(angiotatin, AS)是迄今发现的最有效的血管生成抑制剂之一<sup>[1]</sup>,研究发现其对肿瘤新生血管具有较强的抑制作用,但在抑制碱烧伤CNV方面鲜见报道。本实验观察其对碱烧伤后CNV的作用,为临床治疗CNV

提供有效的方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

清洁级 Wistar 大鼠 120 只(广西医科大学实验动物中心提供),体重 180~200 g,16 周龄,雌雄兼有,眼科检查均无异常。重组人 AS Kringles 1-3(美国 GenScript 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的制备** 实验动物的使用遵照 ARVO 的标准。采用 10% 水合氯醛 0.35 mL/100 g 腹腔注射,所有实验大鼠均选择左眼为实验眼,1% 丁卡因滴眼液表面麻醉 3 次,1% 阿托品散瞳,0.25% 氯霉素滴眼液常规点眼。将统一规格直径 3.0 mm 单层圆形滤纸浸入 1 mol/L NaOH 溶液 20 s,吸干多余溶液后快速将滤纸准确贴于左眼角膜中央表面 30 s,取下滤纸后立即用生理盐水冲洗术眼 1 min,术毕涂红霉素眼膏。

**1.2.2 术后分组和治疗** 应用随机数字表法将大鼠随机分为 4 组,分别为 2.5  $\mu$ g AS 组、5  $\mu$ g AS 组、地塞米松组、生理盐水组,每组 30 只。分别给予 2.5  $\mu$ g/0.1 mL AS、5  $\mu$ g/0.1 mL AS、0.1 mg/0.1 mL 地塞米松、生理盐水各 0.1 mL,球结膜下注射,隔日 1 次,共 4 次。术毕术眼涂红霉素眼膏。

**1.2.3 角膜混浊度观察** 碱烧伤后第 1、3、7、10、14、21 天在裂隙灯显微镜下观察大鼠术眼角膜混浊情况并评分。评分标准<sup>[2]</sup>:角膜透明,无混浊(0 分);I 度混浊:角膜散在或弥漫性混浊,虹膜清晰可见(1 分);II 度混浊:半透明区易分辨,虹膜模糊不清(2 分);III 度混浊:角膜出现灰白色半透明区,虹膜纹理窥不清,瞳孔大小勉强可见(3 分);IV 度混浊:角膜不透明,虹膜无法辨认(4 分)。

**1.2.4 CNV 的定量分析** 分别在碱烧伤后第 3、7、10、14、21 天,共 5 个时间点,每组抽签法随机选取 5 只大鼠用裂隙灯显微镜观察、照相。用双角规测量并记录从角巩膜缘长出的新生血管长度,计算 CNV 的生长面积。计算面积公式依据 Robert 电脑教学模式计算<sup>[3]</sup>: $S = C/12 \times 3.1416 [r^2 - (r-L)^2]$ ,其中 C 代表角膜血管网所占的圆周数,L 代表新生血管的长度,r 代表角膜半径。

**1.2.5 病理学观察** 分别于碱烧伤术后 1、3、7、10、14、21 d 采用颈椎脱臼法处死大鼠,每次 5 只,4% 多聚

甲醛固定角膜,行苏木精-伊红染色检查,在 400 倍光学显微镜下观察角膜组织切片,分析各组角膜基质水肿、角膜基质层炎性细胞浸润情况。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计学软件进行统计学处理。4 个组的平均角膜混浊评分和新生血管面积的测定数据资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,4 个组的数据资料经 Levene 检验方差齐,各组测试指标的总体均数比较采用单因素方差分析,各组均数间两两比较采用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 角膜混浊度的变化

碱烧伤后角膜中央区有一与滤纸片等直径、界限明确的灰白色混浊区,角膜上皮层脱失、基质水肿,此后逐步加重,在第 7 天时混浊、水肿发展至高峰,第 21 天时混浊程度逐渐减轻至基本稳定。术后第 1 天,各组角膜混浊度比较,差异无统计学意义( $F = 0.0088$ ,  $P = 0.9988$ );术后第 3、7、10、14、21 天,2.5  $\mu$ g AS 组、5  $\mu$ g AS 组、地塞米松组角膜混浊度均较轻,与 PBS 组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 1)。

表 1 大鼠角膜碱烧伤后各组的角膜混浊情况( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 The corneal opacity after alkali burned( $\bar{x} \pm s$ )

| Group                   | Score of corneal neovascularization in different time |                              |                              |                              |                              |                              |
|-------------------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                         | 1 d   | 3 d                          | 7 d                          | 10 d                         | 14 d                         | 21 d                         |
| 2.5 $\mu$ g angiostatin | 1.56 $\pm$ 0.52                                       | 1.91 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup> | 3.01 $\pm$ 0.64 <sup>b</sup> | 2.70 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup> | 2.30 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup> | 2.10 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup> |
| 5.0 $\mu$ g angiostatin | 1.59 $\pm$ 0.47                                       | 1.69 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup> | 2.68 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup> | 2.27 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup> | 1.81 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup> | 1.67 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup> |
| Dexamethasone           | 1.58 $\pm$ 0.59                                       | 2.09 $\pm$ 0.36              | 3.15 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup> | 2.97 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup> | 2.65 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup> | 2.43 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup> |
| 0.9% saline solution    | 1.61 $\pm$ 0.38                                       | 2.47 $\pm$ 0.32              | 3.86 $\pm$ 0.47              | 3.62 $\pm$ 0.40              | 3.50 $\pm$ 0.50              | 3.30 $\pm$ 0.61              |
| F                       | 0.008   | 3.266                        | 4.727                        | 1.080                        | 11.020                       | 9.432                        |
| P                       | 0.998   | 0.048                        | 0.015                        | 0.000                        | 0.000                        | 0.000                        |

<sup>b</sup> $P < 0.05$  vs respective 0.9% saline solution group(One-way ANOVA,SNK-q test)

### 2.2 CNV 生长面积的变化

碱烧伤后第 1 天,裂隙灯显微镜下见各组大鼠均无 CNV 生长。术后第 3 天,生理盐水组角膜缘处新生血管数量较多,由角膜缘逐渐向角膜中央生长;而 2.5  $\mu$ g AS 组、5  $\mu$ g AS 组角巩膜缘处少量毛细血管扩张,均未见明显新生血管芽。术后第 7 天,生理盐水组 CNV 从周边向中央延伸。术后第 10 天,CNV 生长达到高峰,而 2.5  $\mu$ g AS 组、5  $\mu$ g AS 组角膜缘处可见正在生长的血管芽,未见成熟血管。术后第 14 天,生理盐水组角膜基质层内可见大量成熟新生血管,部分新生血管已达角膜中央(图 1,2),此后 CNV 基本稳定,

术后第 21 天时部分细小的血管已有消退。治疗组与对照组比较,新生血管出现迟,形成数量少。4 个组在碱烧伤后第 3 天起各时间点新生血管面积差异有统计学意义 ( $F = 350.1225, P < 0.01$ ), 2.5  $\mu\text{g}$  AS 组、5  $\mu\text{g}$  AS 组与地塞米松组比较,差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (表 2),说明 AS 对 CNV 的抑制作用较地塞米松强。

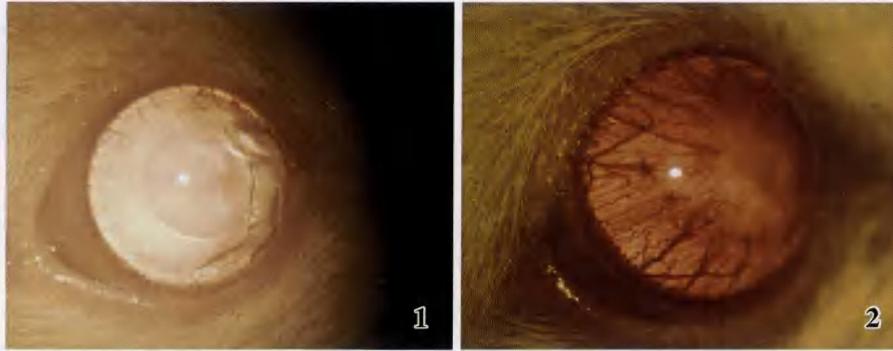


图 1 碱烧伤后 14 d 角膜新生血管情况 B 组角膜 CNV 短小,位于角膜缘 图 2 碱烧伤后 14 d 角膜新生血管情况 D 组角膜 CNV 粗大密集,布满角膜  
Fig. 1 On the 14th day after alkali burned, small CNVs were seen in the periphery of cornea in 5.0  $\mu\text{g}$  angiostatin group Fig. 2 On the 14th day after alkali burned, CNVs presented the dense distribution over the cornea in 0.9% saline solution group

表 2 大鼠角膜碱烧伤后不同时间点新生血管的面积 ( $\bar{x} \pm s, \text{mm}^2$ )  
Table 2 CNV area after alkali burned at different days ( $\bar{x} \pm s, \text{mm}^2$ )

| Group                         | Area of CNV in different time |                              |                             |                             |                             |
|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                               | 3 d                           | 7 d                          | 10 d                        | 14 d                        | 21 d                        |
| 2.5 $\mu\text{g}$ angiostatin | 8.64 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>   | 16.9 $\pm$ 1.2 <sup>ef</sup> | 25.8 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup> | 22.4 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup> | 19.8 $\pm$ 1.0 <sup>c</sup> |
| 5.0 $\mu\text{g}$ angiostatin | 5.37 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>   | 14.6 $\pm$ 0.9 <sup>c</sup>  | 21.2 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup> | 18.7 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup> | 14.3 $\pm$ 0.9 <sup>c</sup> |
| Dexamethasone                 | 9.20 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>   | 20.0 $\pm$ 1.0 <sup>ef</sup> | 29.2 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup> | 24.8 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup> | 22.4 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup> |
| 0.9% saline solution          | 20.80 $\pm$ 1.2               | 26.2 $\pm$ 1.3               | 43.8 $\pm$ 1.0              | 38.7 $\pm$ 1.5              | 32.5 $\pm$ 1.0              |
| F                             | 350.122                       | 102.414                      | 546.515                     | 408.005                     | 379.709                     |
| P                             | <0.01                         | <0.01                        | <0.01                       | <0.01                       | <0.01                       |

<sup>c</sup> $P < 0.01$  vs respective 0.9% saline solution group, <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs respective 5.0  $\mu\text{g}$  angiostatin group (One-way ANOVA, SNK-q test)

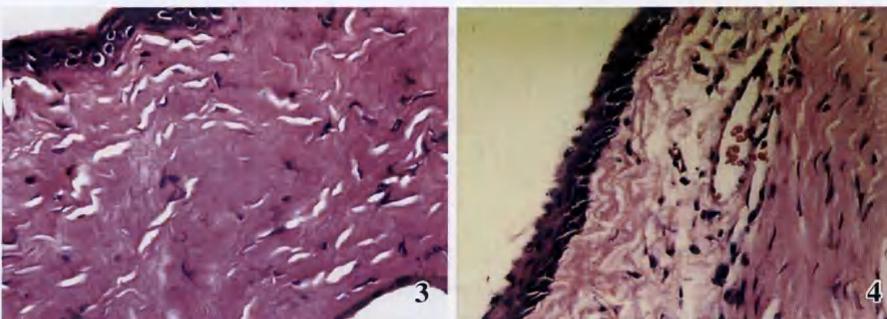


图 3 碱烧伤后 14 d 角膜新生血管情况 5  $\mu\text{g}$  AS 组角膜未见成熟血管 (HE  $\times$  400)  
图 4 碱烧伤后 14 d 角膜新生血管情况 生理盐水组角膜可见成熟新生血管,内有成熟红细胞 (HE  $\times$  400)  
Fig. 3 The vessels buds were seen, but mature blood vessel was not yet viewed in the cornea of 5.0  $\mu\text{g}$  angiostatin group on the 14th day after alkali burned (HE  $\times$  400) Fig. 4 There were mature blood vessels with mature erythrocytes in 0.9% saline solution group on the 14th day after alkali burned (HE  $\times$  400)

### 2.3 角膜组织病理学的改变

生理盐水组在碱烧伤后 2 周内角膜上皮不同程度脱落,周边角膜上皮基底细胞形成很多空泡,角膜组织水肿明显,基质板层结构疏松,可见大量炎性细胞浸润,角膜基质前 2/3 细胞浸润最明显。2.5  $\mu\text{g}$  AS 组、5  $\mu\text{g}$  AS 组碱烧伤后第 1 周角膜组织水肿不明显,炎性细胞浸润较少,主要集中于前基质层,基质板层排列有序,2 周时炎性细胞浸润明显减少。术后第 7 天,生理盐水组新生血管从周边向中央延伸至大部分角膜基质层,浅基质层内已见较多新生血管,单层内皮细胞围绕形成毛细血管腔,管腔内可见大量红细胞;2.5  $\mu\text{g}$  AS 组、5  $\mu\text{g}$  AS 组、地塞米松组角膜缘处均可见正在生长的血管芽,未见成熟血管。术后第 14 天,生理盐水组角膜基质层内可见大量成熟新生血管,管壁由单层平滑肌构成,管腔粗大,内有成熟红细胞,部分新生血管已达角膜中央 (图 3, 4)。

### 3 讨论

CNV 是角膜病致盲的重要原因,引起 CNV 的原因主要有佩戴角膜接触镜、眼外伤特别是碱烧伤等。CNV 不仅使角膜透明度下降,影响视力,也是角膜移植术后发生排斥反应的高危因素,是临床棘手的难题。研究 CNV 的发病机制及其抑制剂,对防治 CNV,提高角膜移植的成功率具有重要的临床意义。近年来一类基底膜来源的血管生成抑制因子,如 AS<sup>[1]</sup>、内皮抑素<sup>[4]</sup>等在动物实验中显示可抑制血管形成,且大剂量时未发现明显的不良反应,具有良好的应用前景。

AS 是 1994 年由 O' Reilly 等<sup>[1]</sup>在 Lewis 肺癌小鼠的血清和尿液中分离出来的相对分子质量为 38 000 的蛋白,具有较强的血管生成抑制作用,是迄今发现的最有效的血管生成抑制剂之一。近几年 AS 在治疗眼部新生血管疾病方面有很大的进展。Lai 等<sup>[5]</sup>将腺相关病毒重组的 AS 注射于氮激光诱导的脉络膜新生血管模型

鼠的视网膜下,证实了 AS 治疗脉络膜新生血管的可行性。Meneses 等<sup>[6]</sup>将 AS 皮下注射于增生型糖尿病视网膜病变模型鼠,证实 AS 对视网膜新生血管形成具有强大的抑制作用。Murata 等<sup>[7]</sup>采用 AS 滴眼液治疗碱性成纤维细胞生长因子诱导的 CNV,结果显示 CNV 生长受抑制。本研究发现 AS 结膜下注射对鼠碱烧伤后 CNV 有明显的抑制作用,且抑制程度与剂量呈正相关,5 μg/0.1 mL AS 对 CNV 的抑制作用较地塞米松强。

目前,AS 抑制新生血管的作用机制尚不清楚。Veitonmaki 等<sup>[8]</sup>报道,AS 可能通过 3 种信号传导途径使细胞凋亡:(1)通过 p53、Bax 和 tBid 基因的活化介导更多的细胞色素 C 进入细胞质,导致细胞凋亡;(2)通过 Fas mRNA 的上调、细胞型 Fas 相关死亡域样白介素-1β 转换酶抑制蛋白的下调和半胱天冬氨酸酶的活化,通过 Fas 途径介导细胞凋亡;(3)通过 ATP 触发的凋亡途径。Tarui 等<sup>[9]</sup>研究发现,纤溶酶原通过 K 结构域结合到整和素 αVβ<sub>3</sub>,从而刺激血管内皮细胞迁移,AS 也能通过 K 结构域与整和素 αVβ<sub>3</sub> 结合,从而竞争性抑制纤溶酶原的作用。Moser 等<sup>[10]</sup>证明,AS 的结合位点是血管内皮细胞表面的 ATP 合酶,实验表明 AS 与 ATP 合酶的 α 亚单位、β 亚单位的抗体有相同的作用,提示抑制 ATP 合酶可能是 AS 的作用靶点之一。

CNV 的形成是目前致盲的主要眼病之一,本实验证实 AS 能有效地抑制大鼠角膜碱烧伤后 CNV 的形成,作用强于地塞米松。但是 AS 的研究目前仍处于动物实验阶段,在给药途径、药物剂量、作用机制等方

面尚存在许多问题,我们将进一步研究其对 CNV 作用的机制。

## 参考文献

- 1 O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma[J]. Cell, 1994, 79(21): 315 - 328
- 2 叶纹,沈玺,钟一声. 兔角膜重度碱烧伤后羊膜移植的疗效观察[J]. 眼科新进展, 2002, 22(4): 81 - 84
- 3 D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 4082 - 4085
- 4 冯怡,冯玉梅,朱旭东,等. 重组人内皮抑素滴眼液抑制小鼠角膜新生血管形成的研究[J]. 眼科研究, 2005, 23(1): 12 - 15
- 5 Lai CC, Wu WC, Chen SL, et al. Suppression of choroidal neovascularization by adeno-associated virus vector expressing angiostatin [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(10): 2401 - 2407
- 6 Meneses PI, Hajjar KA, Berns KI, et al. Recombinant angiostatin prevents retinal neovascularization in a murine proliferative retinopathy model[J]. Gene Therap, 2001, 8(8): 646 - 648
- 7 Murata M, Nakagawa M, Takahashi S. Inhibitory effects of plasminogen fragment on experimentally induced neovascularization of rat corneas[J]. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol, 1997, 235(9): 584 - 586
- 8 Veitonmaki N, Cao R, Wu LH, et al. Endothelial cell surface ATP synthase-triggered caspase-apoptotic pathway is essential for k1-5-induced antiangiogenesis[J]. Cancer Res, 2004, 64(10): 3679 - 3686
- 9 Tarui T, Majumdar M, Miles LA, et al. Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin[J]. J Biol Chem, 2002, 277(37): 33564 - 33570
- 10 Moser TL, Kenan DJ, Ashley TA, et al. Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(12): 6656 - 6661

(收稿:2008-08-12 修回:2009-04-09)

(本文编辑:刘 艳)

读者·作者·编者

## 本刊对中英文摘要的写作要求

论著正文前附 300 字内的中文摘要,包括目的、方法、结果、结论四要素,关键词 3~8 个;英文摘要应比中文摘要详细,300 个实词左右。英文摘要的目的部分应概括写出本研究的研究背景和目的;方法部分应写明研究对象的数目、来源、分组情况及所用的研究方法和工具;结果部分应包括研究结果的主要形态学改变、染色的具体形态和具体数据。英文摘要的方法和结果部分内容的描述应用一般过去时态。英文关键词 3~8 个,应与中文关键词一致。

综述的中英文摘要不用四要素的写法,可写成指示性文摘,亦给出中英文关键词各 3~8 个;摘要用第三人称撰写,不用“本文”、“作者”等作主语。

## 本刊对统计学符号的要求

统计学符号参照 GB3358-82《统计学名词及符号》的有关规定书写,例如:(1)样本的算术平均数用英文小写  $\bar{x}$  表示,不用 X 及 Mean 或 M(中位数仍用 M);(2)标准差用英文小写  $s$ ,不用 SD;(3)标准误用英文小写  $s\bar{x}$ ,不用 SE 及 SEM;(4) $t$  检验用英文小写  $t$ ;(5) $F$  检验用英文大写  $F$ ;(6)卡方检验用希腊文小写  $\chi^2$ ;(7)相关系数用英文小写  $r$ ;(8)自由度用希腊文小写  $\nu$ (纽);(9)样本数用英文小写  $n$ ;(10)概率用英文大写  $P$ ( $P$  值前应给出统计量值,如  $t$  值,  $\chi^2$  值,  $q$  值等)。以上符号均用斜体。

(本刊编辑部)