

# 贝伐单抗抑制角膜新生血管的实验研究

赵峰 徐建江 郑天玉 王欣 林志荣 李纲 王文韬

## Effect of topical bevacizumab on experimental corneal neovascularization in mouse

Zhao Feng, Xu Jianjiang, Zheng Tianyu, Wang Xin, Lin Zhirong, Li Gang, Wang Wentao. Department of Ophthalmology, Eye & ENT Hospital of Fudan University, Shanghai 200031, China

**Abstract Objective** The inhibitory effects of avastin on new blood vessels in nonproliferation diabetic retinopathy, age-related macular degeneration and neovascular glaucoma have been demonstrated. But only seldom report of avastin on corneal neovascularization (CNV) was seen. Present study was to evaluate the effect of topical bevacizumab (avastin) on experimental corneal neovascularization in mice. **Methods** Thirty eyes of 30 Balb/c mice were chemically cauterized by applying a 2 mm-diameter filter paper soaked 1 mol/L NaOH solution at the central cornea for 40 s. All animals were randomly assigned to five groups, including 1 mg/mL, 3 mg/mL and 5 mg/mL bevacizumab eye drops group respectively, 1 mg/mL dexamethasone sodium phosphate eye drops group (positive control) and normal saline solution group (negative control). The drug was topically utilized twice per day. CNV was examined under the slim lamp on the 3rd, 7th and 14th day after alkali burn. Animals were killed on the 14th day after alkali burn. Area of CNV was calculated in terms of pixels on digital photographs. The use of animals followed the Regulations for the Administration of Affair Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission.

**Results** No significant difference was found in the grade of corneal injury among five groups ( $F=0.201, P=0.935$ ). The area of neovascularization at the cornea surface was  $(37.11 \pm 3.17)\%$  in 1 mg/mL bevacizumab group,  $(29.75 \pm 3.56)\%$  in 3 mg/mL bevacizumab group,  $(18.76 \pm 2.55)\%$  in 5 mg/mL bevacizumab group,  $(20.91 \pm 2.75)\%$  in dexamethasone group and  $(41.65 \pm 2.11)\%$  in normal saline group, showing a significant difference among groups ( $F=71.687, P=0.000$ ) with the further comparative decline in 5 mg/mL bevacizumab group compared with other groups ( $P<0.01$ ). **Conclusion** The topical use of bevacizumab (avastin) inhibits alkali burn-induced CNV in mice.

**Key words** bevacizumab; corneal neovascularization; ocular alkali burn

**摘要 目的** 评价贝伐单抗 (avastin) 局部应用对小鼠角膜新生血管 (CNV) 的抑制作用。 **方法** 通过碱烧伤建立 CNV 模型, 将 30 只 Balb/c 小鼠随机分成 5 组, A 组贝伐单抗 1 mg/mL 每日点眼 2 次; B 组贝伐单抗 3 mg/mL 每日点眼 2 次; C 组贝伐单抗 5 mg/mL 每日点眼 2 次; D 组 0.1% 地塞米松每日点眼 2 次; E 组生理盐水每日点眼 2 次。分别于术后 3、7、14 d 观察 CNV 情况并拍照。术后第 14 天, 处死全部小鼠, 行 CNV 内皮细胞荧光标记, 计算 CNV 所占全角膜面积的比例。 **结果** 各组 CNV 面积为 A 组  $(37.11 \pm 3.17)\%$ 、B 组  $(29.75 \pm 3.56)\%$ 、C 组  $(18.76 \pm 2.55)\%$ 、D 组  $(20.91 \pm 2.75)\%$ 、E 组  $(41.65 \pm 2.11)\%$ 。各组小鼠 CNV 面积依次为 C 组 < D 组 < B 组 < A 组 < E 组, C 组同 A、B、E 组比较差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ ), C 组与 D 组比较差异无统计学意义 ( $P=0.694$ )。 **结论** 局部应用贝伐单抗对小鼠角膜化学烧伤后的 CNV 有抑制作用。

**关键词** 贝伐单抗; 角膜新生血管; 眼部碱烧伤

**分类号** R 772.2 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)11-0983-05

角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 是与角膜炎症、外伤及免疫反应密切相关的常见病理现象。CNV 常因出血、渗出及继发纤维化等并发症发生

而严重影响患者视力; 同时由于 CNV 破坏了角膜正常微环境而使前房相关免疫偏离消失, 从而显著增加了角膜移植术后排斥反应的发生。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是促进 CNV 生长的关键因子之一<sup>[1]</sup>, 其单克隆抗体贝伐单抗 (avastin) 凭借其抑制肿瘤血管的作用已获 FDA 批准

用于治疗结肠直肠癌,该药玻璃体腔内注射对眼内新生血管有显著抑制作用,特别是对非增生型糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)、年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)及新生血管性青光眼的治疗取得了良好的疗效<sup>[2]</sup>。但该药尚未应用于 CNV 的预防及治疗。本研究通过建立小鼠碱烧伤 CNV 模型评价局部应用贝伐单抗对 CNV 的抑制作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物及分组

健康成年雄性 Balb/c 小鼠 30 只,体重 18~20 g。购自复旦大学医学院实验动物中心,符合国家医用动物使用标准。将小鼠按顺序进行编号并用随机数字表法随机分为 5 组,每组 6 只。实验组:A 组建立角膜碱烧伤模型后贝伐单抗 1 mg/mL 进行治疗;B 组建立角膜碱烧伤模型后贝伐单抗 3 mg/mL 进行治疗;C 组建立角膜碱烧伤模型后贝伐单抗 5 mg/mL 进行治疗。对照组:D 组建立角膜碱烧伤模型后 0.1% 地塞米松进行治疗;E 组角膜碱烧伤后生理盐水进行治疗。

### 1.2 角膜碱烧伤动物模型制备

所有小鼠建立角膜碱烧伤模型。碱烧伤前 3 d,双眼点 0.3% 妥布霉素滴眼液,每日 2 次,裂隙灯检查双眼附属器和眼前段,排除眼部病变。盐酸氯胺酮(100 mg/kg)腹腔注射诱导全身麻醉,术前倍诺喜滴眼液行眼表局部麻醉,将充分浸润 1 mol/L NaOH 溶液的圆形滤纸片(直径 2 mm)置于干燥滤纸上 1 s,蘸去多余碱溶液,显微镜下将滤纸片置于小鼠右眼角膜中央烧灼 40 s,然后用 60 mL 生理盐水冲洗 1 min,伤后 1 d 实验眼点 0.3% 妥布霉素滴眼液,每日 2 次。

### 1.3 干预方法

各组小鼠均于造模当天开始点眼。贝伐单抗无菌条件下用生理盐水分别稀释成质量浓度为 1、3、5 mg/mL 的滴眼液,4℃ 冰箱保存,分别给予 A、B、C 组小鼠进行干预治疗,每日 2 次点眼。D 组给予 0.1% 地塞米松滴眼液、E 组给予生理盐水溶液,每日 2 次点眼。

### 1.4 CNV 观察与测量

**1.4.1 裂隙灯显微镜观察** 建模后第 3、7、14 天分别用裂隙灯显微镜观察小鼠角膜 CNV 生长情况。并在 7 d 时裂隙灯下行角膜烧伤程度分级<sup>[1]</sup>,依据烧伤后角膜水疱及隆起高度,将角膜烧伤程度分为 4 级:0 级为未见水疱;1 级为轻微隆起于角膜表面的小水疱;2 级为中度隆起于角膜表面的中等大小水疱;3 级为大水疱。

**1.4.2 CD31 免疫荧光染色** 建模后第 14 天,颈椎脱

臼处死所有小鼠,取带 1 mm 宽巩膜的全角膜,于 100% 丙酮中固定 20 min, PBS 冲洗后,加入大鼠抗小鼠 CD31(1:50),兔抗大鼠 NG2(1:400),4℃ 孵育过夜。PBS 充分冲洗后,加入羊抗大鼠 IgG-FITC(1:100)和羊抗兔 IgG-Cy3(1:200)。室温孵育 20 min, PBS 冲洗后,将标本置于载玻片上,透明树脂封片。荧光显微镜下观察并拍照,用 NIH Image1.62 软件分析 CNV,计算新生血管面积百分比。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学处理。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组数据资料经 Levene 检验方差齐。5 个组角膜烧伤分级的比较、各组 CNV 百分数均值的比较均采用单因素方差分析,进一步组间的两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

建模后第 7 天,裂隙灯下观察各组实验小鼠角膜烧伤分级均  $\geq 1$  级。各组小鼠角膜烧伤分级均数为:A 组(2.2  $\pm$  0.8)、B 组(2.2  $\pm$  0.8)、C 组(1.8  $\pm$  0.8)、D 组(2.0  $\pm$  0.6)、E 组(2.0  $\pm$  0.7),各组差异无统计学意义( $F = 0.201, P = 0.935$ )(表 1)。建模后第 3、7、14 天,裂隙灯显微镜观察各组小鼠均无角膜穿孔,前房积血情况发生。碱烧伤后 3 d,各组均开始有 CNV 长入,A 组与 E 组的 CNV 长入角膜烧灼区,CNV 粗而密集;B 组的 CNV 较短,血管未到达烧灼区,末梢血管有交联;C 组与 D 组仅见 CNV 芽长出且血管芽细小稀疏色淡;A、B、C、E 组角膜水肿明显,无法窥清瞳孔,中央角膜上皮缺损区较大,角膜溃疡深达前基质层,D 组角膜混浊水肿较轻,隐约可见瞳孔,但角膜上皮缺损区大,角膜溃疡明显,达前基质层。

表 1 各组小鼠的角膜烧伤程度与 CNV 面积百分比的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of corneal injury grade and percentage of neovascular area in different groups( $\bar{x} \pm s$ )

Group	Corneal burning grade	CNV area percentage(%)
1 mg/mL bevacizumab	2.167 $\pm$ 0.307	37.056 67 $\pm$ 1.294 17°
3 mg/mL bevacizumab	2.167 $\pm$ 0.307	29.750 50 $\pm$ 1.452 61°
5 mg/mL bevacizumab	1.833 $\pm$ 0.307	18.755 83 $\pm$ 1.039 48
Dexamethasone	2.000 $\pm$ 0.365	20.910 33 $\pm$ 1.123 94°
Normal saline	2.000 $\pm$ 0.258	41.654 17 $\pm$ 0.861 35
<i>F</i>	0.201	71.687
<i>P</i>	0.935	0.000

°  $P < 0.01$  vs respective 5 mg/mL bevacizumab group (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

碱烧伤后 7 d, A 组与 E 组的 CNV 生长达高峰, 血管粗大密集, 交织成网; B、C、D 组的 CNV 增长较缓慢, 血管稀疏且较细。

碱烧伤后 14 d, A 组与 E 组的 CNV 达角膜中央, 血管密集粗大; B 组与 D 组的 CNV 细小, 周边大部分 CNV 退化, 留有粗大血管; C 组角膜水肿明显, 血管多数尚未达角膜中央, 周边部分细小 CNV 有所退化, 血管细小、色淡、稀疏。除 D 组外, 其余各组角膜上皮已

修复, 角膜表面光滑, D 组部分中央角膜变薄(图 5)。

各组 CNV 面积百分比: A 组( $37.11 \pm 3.17$ )%、B 组( $29.75 \pm 3.56$ )%、C 组( $18.76 \pm 2.55$ )%、D 组( $20.91 \pm 2.75$ )%、E 组( $41.65 \pm 2.11$ )%。各组小鼠 CNV 面积大小依次为 C 组 < D 组 < B 组 < A 组 < E 组(图 6, 7); C 组与 A、B、E 组差异均有统计学意义( $t = -11.025, -6.155, -16.962; P < 0.01$ ), C 组与 D 组比较差异无统计学意义( $t = -1.407, P = 0.190$ )(表 1)。



图 1 1 mg/mL bevacizumab 组小鼠碱烧伤后 CNV A:造模后 3 d B:造模后 7 d C:造模后 14 d  
Fig. 1 The CNV after alkali burn in 1 mg/mL bevacizumab group A:3 days after burn B:7 days after burn C:14 days after burn

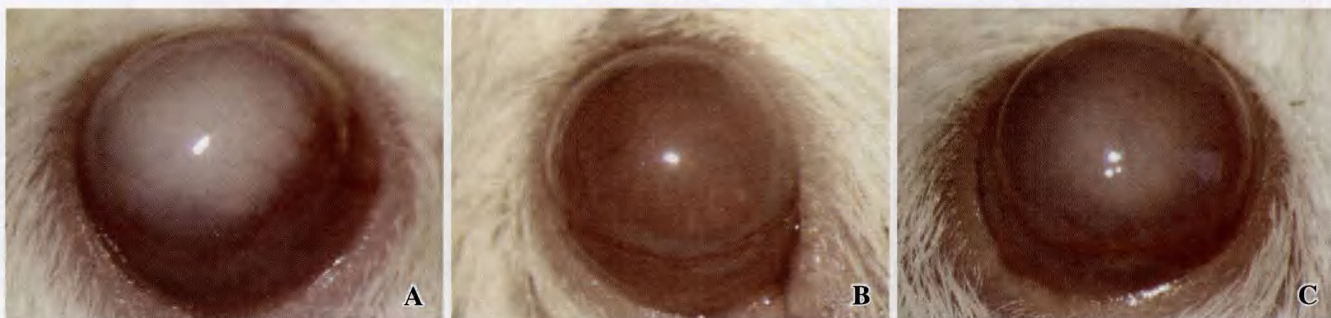


图 2 3 mg/mL bevacizumab 组小鼠碱烧伤后 CNV A:造模后 3 d B:造模后 7 d C:造模后 14 d  
Fig. 2 The CNV after alkali burn in 3 mg/mL bevacizumab group A:3 days after burn B:7 days after burn C:14 days after burn



图 3 5 mg/mL bevacizumab 组小鼠碱烧伤后 CNV A:造模后 3 d B:造模后 7 d C:造模后 14 d  
Fig. 3 The CNV after alkali burn in 5 mg/mL bevacizumab group A:3 days after burn B:7 days after burn C:14 days after burn





图4 0.1%地塞米松滴眼组小鼠碱烧伤后 CNV A:造模后3 d B:造模后7 d C:造模后14 d  
 Fig.4 The CNV after alkali burn in 0.1% dexamethasone group A:3 days after burn B:7 days after burn C:14 days after burn



图5 生理盐水滴眼组小鼠碱烧伤后 CNV A:造模后3 d B:造模后7 d C:造模后14 d  
 Fig.5 The CNV after alkali burn in normal saline solution group A:3 days after burn B:7 days after burn C:14 days after burn

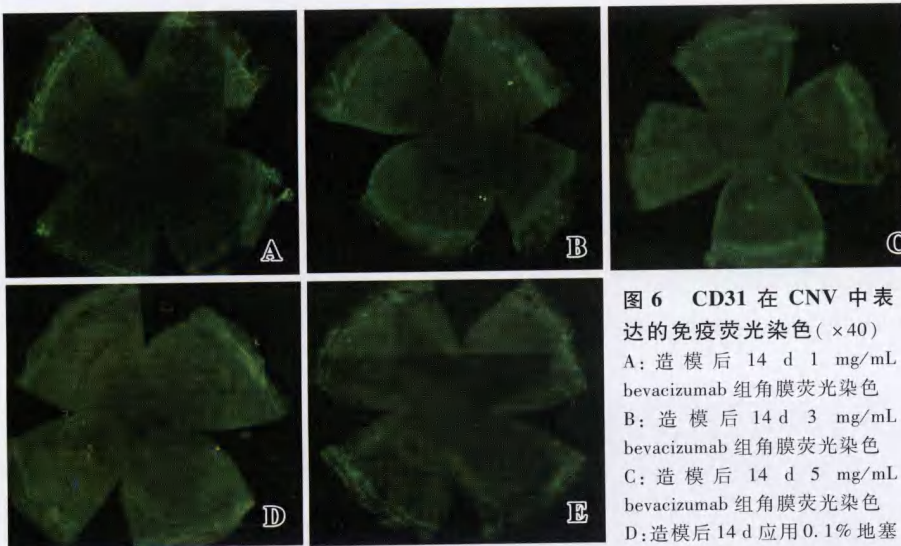


图6 CD31在CNV中表达的免疫荧光染色(×40)  
 A:造模后14 d 1 mg/mL bevacizumab 组角膜荧光染色  
 B:造模后14 d 3 mg/mL bevacizumab 组角膜荧光染色  
 C:造模后14 d 5 mg/mL bevacizumab 组角膜荧光染色  
 D:造模后14 d 应用0.1%地塞米松组角膜荧光染色 E:造

模后14 d 应用生理盐水组角膜荧光染色  
 Fig.6 The expression of CD31 in CNV (×40) A: Immunofluorescence staining in 1 mg/mL bevacizumab group in 14 days after experiment B: Immunofluorescence staining in 3 mg/mL bevacizumab group in 14 days after experiment C: Immunofluorescence staining in 5 mg/mL bevacizumab group in 14 days after experiment D: Immunofluorescence staining in 0.1% dexamethasone group group in 14 days after experiment E: Immunofluorescence staining in normal saline solution group in 14 days after experiment

### 3 讨论

CNV 是多种眼表疾病如化学伤、热烧伤、感染性

角膜病、角膜变性及严重干眼症的共同病理特征。大量的 CNV 不仅可降低角膜透明性严重影响视力,也是角膜移植术后排斥反应的高危因素。寻找安全、有效的 CNV 治疗措施是近年来研究的热点。临床上主要通过局部或全身应用激素抑制炎症反应,间接抑制血管刺激因子的表达,从而减少新生血管的生成。但其效果并不理想,且有增加感染和导致角膜溶解的风险。目前,几种以重要促血管生长因子 VEGF 为靶点的新型抗 CNV 药物已进行了少量动物实验,包括用重组腺病毒介导的 VEGF 反义核苷酸 (rAAV-a VEGF165) 抑制 VEGF 生成<sup>[2]</sup>,或用质粒转导的“胞内受体 (intraceptors)”中和细胞生成的 VEGF 从而减少其释放<sup>[3]</sup>。这些

干预措施虽在动物实验中有效抑制 CNV,但均未经过临床试验,对人体的安全性和有效性不能确定,且制剂

制作过程繁复,存在提纯精度不足和产量的限制,临床应用尚需长期、大量的实践和检验。

贝伐单抗则是通过美国食品药品监督管理局(FDA)审批上市的治疗药物,其在抑制肿瘤新生血管的全身用药和抑制眼底新生血管的局部用药中均显示出安全性和有效性。该药是将鼠 VEGF 单克隆抗体的抗原互补决定区架构于人 IgG 框架中的重组人源性 VEGF 单克隆抗体,可与其所有异构体发生高亲和力结合并阻止其结合于血管内皮受体,从而阻断其发挥促血管生成作用<sup>[4-7]</sup>。近期 Bock 等<sup>[8]</sup>通过建立小鼠 CNV 模型观察到,5 mg/mL 贝伐单抗滴眼液应用 5 d 后 CNV 较生理盐水对照组减少了 20% ( $P < 0.01$ ),使该药的抗 CNV 作用初步得到肯定,但该药物理想的治疗质量浓度、其与常规治疗效果的异同尚未确定。

本研究发现各实验组 CNV 均少于空白对照组,证实局部应用贝伐单抗能够抑制 CNV 生长。且其对 CNV 的抑制作用是剂量依赖型的,碱烧伤后局部应用高质量浓度的贝伐单抗能够有效抑制新生血管形成。Manzano 等<sup>[9]</sup>报道局部应用 4 mg/mL 的贝伐单抗能有效抑制小鼠的 CNV,治疗组的 CNV 较对照组减少 40%。但局部应用贝伐单抗不能完全抑制 CNV,因为除了 VEGF 以外,还有其他因子参与新生血管的形成<sup>[10]</sup>,仅仅抑制单一因子不能完全抑制新生血管生长。但是,将贝伐单抗与一些常规的治疗方法结合,可抑制 CNV,提高患者的视力预后。

目前临床上常用糖皮质激素治疗 CNV。本次实验选用地塞米松作为阳性对照,A 组、B 组抑制新生血管的效果弱于 D 组( $P < 0.01$ ),C 组与 D 组比较差异无统计学意义( $P = 0.694$ )。但糖皮质激素可能延缓角膜上皮的修复,导致溃疡形成,甚至角膜穿孔<sup>[11-13]</sup>。本研究发现局部应用地塞米松的角膜上皮修复不理想,溃疡难以愈合,并且可导致青光眼<sup>[14]</sup>、白内障<sup>[15]</sup>等并发症的风险。而本研究中未观察到贝伐单抗的局部并发症,各治疗组的病理结果也未发现角膜组织学改变。其眼角结膜的不良反应仍有待进一步研究。此外,贝伐单抗与常规的治疗方法结合的疗效有待进一步观察。

本研究结果显示,高质量浓度的贝伐单抗局部应用能够有效抑制小鼠 CNV。但局部应用高质量浓度贝伐单抗组的小鼠较其他各组有明显的角膜混浊,推测其可能的原因:(1)生理盐水稀释贝伐单抗制成滴

眼液,可能该滴眼液渗透压较低,造成角膜水肿。(2)贝伐单抗本身是否对角膜有不良反应,局部应用造成角膜组织水肿,其可能原因有待于进一步研究。

## 参考文献

- 1 Mahoney JM, Waterbury LD. Drug effects on the neovascularization response to silver nitrate cauterization of the rat cornea [J]. *Curr Eye Res*, 1985, 4: 531 - 535
- 2 Im SA, Gomez-Manzano C, Fueyo J, et al. Antiangiogenesis treatment for gliomas transfer of antisense vascular endothelial growth factor inhibits tumor growth in vivo [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(4): 895 - 900
- 3 Singh N, Amin S, Richter E, et al. Flt-1 intraceptors inhibit hypoxia-induced VEGF expression in vitro and corneal neovascularization in vivo [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(5): 1647 - 1652
- 4 Rosenfeld PJ, Schwartz SD, Blumenkranz MS, et al. Maximum tolerated dose of a humanized anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment for treating neovascular age-related macular degeneration [J]. *Ophthalmology*, 2005, 112: 1048 - 1053
- 5 Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, et al. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: Twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study [J]. *Ophthalmology*, 2005, 112: 1035 - 1047
- 6 Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration [J]. *Ophthalm Surg Lasers Imaging*, 2005, 36: 331 - 335
- 7 Nguyen QD, Shah S, Tatlipinar S, et al. Bevacizumab suppresses choroidal neovascularization caused by pathological myopia [J]. *Br J Ophthalmol*, 2005, 89: 1368 - 1370
- 8 Bock F, Onderka J, Dietrich T, et al. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48: 2545 - 2552
- 9 Manzano R, Peyman G, Khan P, et al. Inhibition of experimental corneal neovascularization by bevacizumab (Avastin) [J]. *Br J Ophthalmol*, 2007, 91: 804 - 807
- 10 Ma DH, Chen JK, Zhang F, et al. Regulation of corneal angiogenesis in limbal stem cell deficiency [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2006, 25: 563 - 590
- 11 Morad Y, Banin E, Averbukhe E, et al. Treatment of ocular tissues exposed to nitrogen mustard: beneficial effect of zinc desferrioxamine combined with steroids [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 1640 - 1646
- 12 Chung JH, Kang YG, Kim HJ. Effect of 0.1% dexamethasone on epithelial healing in experimental corneal alkali wounds: morphological changes during the repair process [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1998, 236: 537 - 545
- 13 戴超, 卞修武, 史景泉. 诺帝抑制糖尿病大鼠视网膜 VEGF 和 iNOS 的表达及意义 [J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27: 1232 - 1235
- 14 叶天才. 重视对糖皮质激素性青光眼的防治 [J]. *中华眼科杂志*, 2001, 37: 401 - 403
- 15 严洪, 刘兵, 俞兰. 糖皮质激素对  $\alpha$ -晶状体蛋白分子伴侣功能的影响 [J]. *眼科研究*, 2005, 23: 37 - 39

(收稿:2008-12-06 修回:2009-09-25)

(本文编辑:尹卫靖)