

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00907

Bevacizumab(Avastin)抑制兔眼角膜新生血管的实验研究

章玉群,彭清,赵培泉*

上海交通大学医学院附属新华医院眼科,上海 200092

[摘要] **目的:**观察 Bevacizumab(Avastin) 球结膜下注射对兔眼角膜新生血管(corneal neovascularization,CNV)模型的治疗作用。**方法:**新西兰大白兔 48 只,随机分为正常对照组(A组,3只)、模型组(B组,9只)和 Bevacizumab(Avastin)治疗组(C组,36只),C组又再次分为 4 组:1 d 小剂量治疗组(C1组,9只),1 d 大剂量治疗组(C2组,9只),14 d 小剂量治疗组(C3组,9只),14 d 大剂量治疗组(C4组,9只)。B组和 C组采用角膜缝线法制备 CNV 模型,C组分别在相应时间点眼球结膜下注射 Bevacizumab(25 mg/ml),小剂量组 0.1 ml,大剂量组 0.2 ml。术后每天观察兔眼角膜 CNV 生长情况并计算其面积,且于建模后 7、14、28 d 分别拍照记录,免疫组化方法检测各组角膜组织中 VEGF 的表达情况,ELISA 法检测房水中 VEGF 含量。**结果:**CNV 生长情况:7、14、28 d C1 和 C2 组均较 B 组明显减轻($P<0.01$),28 d 时 C3、C4 组较 B 组明显减轻($P<0.01$);28 d 时 C1 组较 C3 组明显减轻($P<0.01$),C2 组较 C4 组明显减轻($P<0.01$)。角膜组织中 VEGF 表达和房水中 VEGF 含量:B 组随时间推移逐渐增高,且与 CNV 面积大小呈正相关($P<0.01$);7、14、28 d 时,C1、C2 组均低于 B 组($P<0.01$);28 d 时 C3、C4 组均低于 B 组($P<0.01$);28 d 时 C1 组低于 C3 组($P<0.01$),C2 组低于 C4 组($P<0.01$)。C1 和 C2 组之间以及 C3 和 C4 组之间在 CNV 面积、角膜和房水中 VEGF 水平方面均无显著差异。**结论:**球结膜下注射 Bevacizumab 可抑制 CNV 生长,且早期用药比晚期用药疗效更加显著,Bevacizumab 的作用可能与其下调角膜组织 VEGF 的表达及房水中的 VEGF 含量有关。

[关键词] Bevacizumab;角膜新生血管化;血管内皮生长因子;角膜;眼房水

[中图分类号] R 772.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)08-0907-06

Bevacizumab (Avastin) inhibits corneal neovascularization in rabbits

ZHANG Yu-qun,PENG Qing,ZHAO Pei-quan*

Department of Ophthalmology,Xinhua Hospital,Shanghai Jiaotong University School of Medicine,Shanghai 200092,China

[ABSTRACT] **Objective:** To evaluate the effect of subconjunctival injection of Bevacizumab (Avastin) on corneal neovascularization(CNV) in rabbits. **Methods:** Forty-eight New Zealand rabbits were randomly divided into three groups:normal control group (group A,3 rabbits),neovascularization group (group B,9 rabbits) and Bevacizumab treatment group (group C,36 rabbits). Group C was further divided into group C1 (1 day small dose group),C2 (1 day high dose group),C3 (14 days small dose group) and C4 (14 days high dose group),with 9 rabbits each group. CNV model was made by suture in group B and C. Animals in group C were injected subconjunctivally with 0.1 ml or 0.2 ml Bevacizumab(25 mg/ml) in the left eyes. The growth of CNV was observed every day after operation and the neovascularization areas calculated. Expression of VEGF in the cornea was detected by immunohistochemistry on day 7,14 and 28 after suture. VEGF content in the aqueous humor was determined by ELISA assay. **Results:** CNV growth in group C1 and C2 was inhibited significantly compared with that in group B on day 7,14 and 28 ($P<0.01$). On day 28 the growth in group C3 and C4 was significantly inhibited compared with that in group B ($P<0.01$),that in group C1 was significantly inhibited than that in group C3,and that in group C2 was significantly inhibited compared with that in group C4 ($P<0.01$). VEGF levels in the cornea and aqueous humor in group B increased as time passed by,and they were positively associated with CNV area ($P<0.01$). On day 7,14,and 28,the VEGF levels in the cornea and aqueous humor in C1 and C2 groups were significantly lower than that in group B ($P<0.01$). On day 28,those in group C3 and C4 were significantly lower than those in group B ($P<0.01$);those in group C1 were significantly lower than those in group C3 ($P<0.01$);and those in group C2 were significantly lower than those in group C4 ($P<0.01$). The CNV area and VEGF levels in the cornea and aqueous humor were similar between C1 and C2 groups and between C3 and C4 groups. **Conclusion:**

[收稿日期] 2009-04-02 **[接受日期]** 2009-07-08

[基金项目] 上海市重点学科建设项目(S30205). Supported by Shanghai Leading Academic Discipline Project(S30205).

[作者简介] 章玉群,硕士,主治医师. E-mail:zhangyuqun1@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-65790000,E-mail:zhaopeiquan@126.com

Subconjunctival administration of Bevacizumab can effectively inhibit corneal neovascularization in experimental CNV model, and early administration has a better outcome than late administration. Bevacizumab may exert its effect by down-regulating VEGF in cornea and aqueous humor.

[KEY WORDS] bevacizumab; corneal neovascularization; vascular endothelial growth factor; cornea; aqueous humor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(8): 907-912]

角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 是目前全球范围内主要的致盲眼病之一, 也是角膜移植排斥反应发生的高危因素。CNV 与感染、外伤、角膜移植以及配戴角膜接触镜等因素有关。许多生长因子参与了血管生成的生理调节, 其中血管内皮生长因子 (VEGF) 是一种具有特异性促进血管内皮细胞分裂的因子, 在新生血管的形成过程中发挥中心作用, 其表达受炎性物质调节。实验证实, 兔角膜植入 VEGF 缓释剂可以促进 CNV 的形成^[1]; 在实验性新生血管模型中, 发现角膜 VEGF mRNA 和蛋白的表达水平增加, 而且 VEGF 受体的表达水平也增加^[2-5]。而抗 VEGF 多克隆抗体^[2] 或 VEGF 拮抗剂以及抗 VEGF 或其受体的小干扰 RNA 可以抑制动物 CNV^[6-9] 的形成。

Bevacizumab (Avastin) 生物制剂是一种重组的抗 VEGF 人源化单克隆抗体, 可以同所有已知 VEGF 异构体结合, 并通过抑制其生物学活性间接阻断 VEGF 和其受体的结合而阻止血管渗漏和新生血管的形成, 近 2 年来被眼科专家尝试用于治疗眼内新生血管疾病, 短期已经显示出较好的安全性和疗效^[10-13]。Bevacizumab 对于眼新生血管性疾病治疗效果明显, 但有临床数据证明 Bevacizumab 作用时间短, 故其抑制新生血管的持续时间和用药的间隔时间有待进一步研究。

本研究通过角膜缝线法制备兔角膜 CNV 模型, 缝线后 1 d 和 14 d 球结膜下分别注射不同剂量 Bevacizumab, 观察 CNV 生长情况, 检测角膜组织及房水中 VEGF 表达情况, 旨在研究 Bevacizumab 球结膜下注射用药对实验性兔角膜缝线新生血管模型的治疗作用, 以及不同剂量和时机干预对角膜 VEGF 的表达和 CNV 的抑制情况, 为临床治疗 CNV 提供理论依据和新的思路。

1 材料和方法

1.1 试剂 小鼠抗兔 VEGF 单克隆抗体购自美国 R&D 公司, 生物素标记山羊抗小鼠 IgG 免疫组化染色试剂盒与浓缩型 DAB 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司。Bevacizumab 购自美国 GENE-TECH 公司 (批号 B9003B01), 浓度为 25 mg/ml。

1.2 动物及分组 成年新西兰大白兔 48 只, 体质

量 2~3 kg, 购自上海松联实验动物养殖场, 生产许可证 SCXK (沪 2007-0011), 使用许可证 SYXK (沪 2008-0052)。雌雄不限, 健康状况良好, 用裂隙灯显微镜检查兔眼角膜正常。随机分为 3 组: 正常对照组 (组 A) 3 只, 模型组 (组 B) 9 只, 治疗组 (组 C) 36 只。治疗组再次分为 1 d 小剂量组 (C1)、1 d 大剂量组 (C2) 各 9 只, 14 d 小剂量组 (C3)、14 d 大剂量组 (C4) 各 9 只。

1.3 模型制作 选择左眼为实验眼, 术前 30 g/L 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 耳缘静脉注射麻醉, 5 g/L 丁卡因滴眼液点左眼 2 次后, 棉签吸除结膜囊液体。术前常规消毒, 无菌操作。手术由同一位有经验的医师在显微镜 (TakaGi SEIKO, OM-10) 下进行, 左眼置开睑器, 冲洗结膜囊, 用 6-0 尼龙手术缝线, 距 3、6、9、12 点位角巩膜缘 1 mm 处分别作 4 针间断板层缝线, 深度约 2/3 角膜厚度, 缝线穿过角膜基质层的长度约 3.0 mm, 在角膜表面留线头长约 1.0 mm。针避免进入前房, 术毕用氧氟沙星眼水、眼膏预防感染。术后每日检查缝线有无脱落, 若有脱落, 及时补缝。同一位点缝线脱落 2 次以上则剔除分析。角膜缝线后 24 h 起, 由同一位医师每天用显微镜观察 CNV 生长情况, 至各组出现 CNV 后改为隔日观察, 术后 7、14、28 d 均测量自角膜缘长出的 CNV 长度和累及的圆周钟点数 (显微镜下用钢尺和圆规测量)。应用 Robert 计算机数学模型公式^[14] 计算角膜 CNV 面积: $A = C/12 \times 3.14 \times [r^2 - (r-l)^2]$, 其中 C 为 CNV 累及角膜的圆周钟点数, l 即所取的血管长度, 兔角膜半径 $r = 7$ mm。CNV 总面积等于 4 个象限面积之和。分别于第 7、14、28 天记录 CNV 长度并画图计算面积。同时拍照记录 (CANON, power shot A60) 以作对照。治疗组中, C1 和 C2 组在角膜缝线后 1 d、C3 和 C4 组在角膜缝线后 14 d 结膜下分别注射 0.1 和 0.2 ml Bevacizumab (25 mg/ml), 模型组 (B 组) 在角膜缝线后 14 d 结膜下注射平衡盐溶液 0.2 ml。注射时 4 点位和 10 点位距角膜缘 2 mm 各注射一半剂量。

1.4 检测指标 角膜缝线后第 7、14、28 天分别用空气栓塞法处死各组实验兔, 立即用无菌注射器分别自左眼角膜缘 9 点位做前房穿刺, 抽取房水约 0.2 ml, 以测定房水 VEGF 含量; 取新生血管生长侧角

膜组织,切成 $2\text{ mm} \times 4\text{ mm}$,用 40 g/L 甲醛溶液固定,行 H-E 及免疫组织化学染色。

1.5 免疫组织化学方法检测角膜组织中 VEGF 的表达 标本常规逐级脱水、透明、石蜡包埋,垂直于角膜表面连续 $4\text{ }\mu\text{m}$ 切片 3 张,脱蜡、水化,每组中取一张常规行 H-E 染色观察角膜形态学变化。角膜 VEGF 免疫组化染色按试剂盒说明书进行,显微镜观察。以组织内出现棕黄色颗粒为阳性判断标准。每次染色时均用 PBS 代替一抗作为阴性对照,阳性对照为已知有 VEGF 蛋白表达的星形细胞瘤细胞。按照染色程度的深浅分为 5 级^[15]: -, 细胞核和细胞间质不着色; +, 标本内绝大多数细胞可疑阳性,少部分细胞($<10\%$)可辨别为阳性; ++, 标本内大部分阳性细胞呈清楚可辨的棕黄色,但未达到+++级那么鲜艳; +++, 细胞染色典型,呈鲜艳的棕色; ++++, 超过 10% 阳性细胞染色成棕黑色。随机选择视野拍照记录。

1.6 ELISA 方法检测房水内 VEGF 表达 房水标本用兔 VEGF ELISA 试剂盒检测其中 VEGF 蛋白的含量变化,具体操作按试剂盒说明书进行。根据不同浓度标准品所测的光密度(D_{450})值绘制标准曲线,在标准曲线上以标本的 D_{450} 值查出 VEGF 含量,单位为 pg/ml 。

1.7 统计学处理 实验数据用 SPSS 15.0 统计软件行方差分析、相关性分析和 Wilcoxon 秩和检验,以 $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 CNV 生长情况 缝线后最早 2 d 可见角膜缘血管环充血扩张,CNV 芽呈毛刷状长入透明的角膜,整齐而密集;4~14 d 血管生长最为旺盛,其中 7~14 d 为一个生长高峰,新生血管密集,管径粗大,色鲜红;14 d 以后血管继续生长但速度逐渐缓慢,28 d 时 CNV 较粗大,交织成网。治疗组中,C1 和 C2 组 CNV 出现较晚,7 d 后出现 CNV,稀疏、短小、生长缓慢,在相应时间点(即建模后 7、14、28 d)CNV 面积明显小于 B 组($P < 0.01$)。C1 和 C2 组 CNV 出现时间和面积在不同时刻点无显著差异。C3 和 C4 组在缝线后 28 d(即用药后 14 d)CNV 管径明显变细,变稀疏,颜色变浅,面积减退($20 \pm 5.5\%$),C3 和 C4 组 CNV 面积明显小于 B 组($P < 0.01$)。28 d 时 C1 组 CNV 面积明显小于 C3 组($P < 0.01$),C2 组明显小于 C4 组($P < 0.01$),C3 和 C4 组 CNV 面积在各时刻点无明显差异(图 1,表 1)。

2.2 角膜组织中 VEGF 的表达 正常兔角膜上皮层、基质层和内皮层有 VEGF 的弱阳性表达。B 组缝线后 7、14 d,VEGF 的阳性表达增强,其主要定位于角

膜上皮细胞、基质纤维细胞、角膜内皮细胞、浸润的炎症细胞和新生的血管内皮细胞胞质内,CNV 管腔结构较大、较密集。C1 和 C2 组角膜炎症反应相对较轻,CNV 管腔较细、较稀疏,角膜上皮细胞、基质层细胞、内皮细胞、炎症细胞和新生血管内皮细胞中也存在 VEGF 的表达,但它们的表达程度明显受到抑制(表 2)。角膜缝线后 7、14、28 d C1 和 C2 组与 B 组角膜组织中 VEGF 表达的阳性率均存在显著性差异($P < 0.05$),而 C1 和 C2 组 VEGF 表达无明显差异。C3 和 C4 组缝线后 28 d(即用药后 14 d)角膜各层 VEGF 表达明显减少,CNV 管腔变细、变稀疏,与 B 组间角膜组织中 VEGF 表达的阳性率存在显著性差异($P = 0.034$),而 C3 和 C4 组之间无明显差异。28 d 时 C1 组 VEGF 的阳性表达率低于 C3 组($P = 0.025$),C2 组 VEGF 的阳性表达率低于 C4 组($P = 0.034$)。Spearman 相关分析发现,角膜组织 VEGF 表达和 CNV 面积存在显著相关性($r = 0.923, P < 0.01$)。

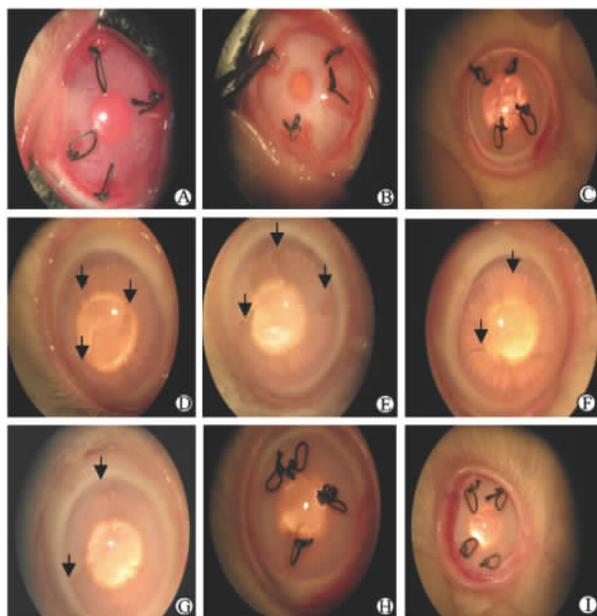


图 1 角膜新生血管形态学特征

Fig 1 CNV morphological characteristics

In group B (control group), corneal limbus congested at 7 d; CNV buds were short(A); CNV became wide and massed at 14 d(B); and CNV congested weakly at 28 d, but connected in web(C). In group C1 and C2 (1 d therapy group) there was no CNV at 7 d, and the CNV was thin at 14 d(D: C1 group; E: C2 group) and 28 d(F: C1 group; G: C2 group). In group C3 and C4 (14 d therapy group), CNV weakened at 28 d (H: C3 group; I: C4 group). Arrows showed the weak CNV that could hardly be detected

2.3 房水中 VEGF 的表达 正常兔眼房水中有一定量的 VEGF 存在(表 2)。B 组术后房水中 VEGF 含量逐渐增高。7、14、28 d C1 和 C2 组房水中 VEGF 含量

均明显低于B组,差异具有显著性($P < 0.01$)。C1和C2组间无差异。缝线后28 d(即用药后14 d)C3和C4组房水中 VEGF 含量低于B组($P < 0.01$),C3和C4组间无差异。28 d C1组房水中 VEGF 含量低于C3组($P = 0.009$),C2组房水中 VEGF 含量低于C4

组($P = 0.006$)。Pearson 相关分析提示,房水中 VEGF 的浓度与 CNV 的面积明显正相关($r = 0.885$, $P < 0.01$)。Spearman 相关分析发现,角膜组织和房水中 VEGF 表达存在显著相关性($r = 0.953$, $P < 0.01$)。

表 1 各组角膜 CNV 面积及其所占角膜百分比
Tab 1 CNV areas and their proportion to corneal surface

Group	n	7 d after operation		14 d after operation		28 d after operation	
		Area A/mm ²	Proportion (%)	Area A/mm ²	Proportion (%)	Area A/mm ²	Proportion (%)
		($\bar{x} \pm s$)					
A	3	0	0	0	0	0	0
B	9	19.882 ± 2.301	12.92 ± 1.49	34.801 ± 3.006	22.61 ± 1.95	36.306 ± 4.393	23.58 ± 2.85
C							
C1	9	1.317 ± 0.689 * △△	8.55 ± 4.47 * △△	15.810 ± 3.964 * △△	10.27 ± 2.58 * △△	15.930 ± 3.898 * △△	10.35 ± 2.53 * △△
C2	9	1.382 ± 0.700 * ▲▲	8.98 ± 4.55 * ▲▲	14.312 ± 2.830 * ▲▲	9.30 ± 1.84 * ▲▲	15.281 ± 4.229 * ▲▲	9.93 ± 2.75 * ▲▲
C3	9	19.963 ± 2.463	13.04 ± 1.68	35.405 ± 4.011	23.02 ± 2.02	28.662 ± 3.479 **	18.62 ± 2.26 **
C4	9	18.997 ± 3.511	12.51 ± 1.62	34.213 ± 3.202	21.92 ± 2.11	27.761 ± 3.345 **	18.03 ± 2.17 **

** $P < 0.01$ vs group B; △△ $P < 0.01$ vs group C3; ▲▲ $P < 0.01$ vs group C4

表 2 兔角膜全层和房水中 VEGF 的表达
Tab 2 Expression of VEGF in cornea and aqueous humor in rabbits

Group	Cornea			n	Aqueous [$\rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$, $\bar{x} \pm s$]		
	7 d	14 d	28 d		7 d after operation	14 d after operation	28 d after operation
A	--+	--+	--+	3	40.382 ± 6.859	40.382 ± 6.859	40.382 ± 6.859
B	‡‡‡	‡‡‡	‡‡‡	9	101.206 ± 20.011	194.080 ± 29.497	176.104 ± 24.311
C							
C1	+	+	+	9	45.150 ± 15.094 * △△	72.449 ± 15.487 * △△	66.428 ± 5.986 * △△
C2	+	+	+	9	51.469 ± 6.244 * ▲▲	75.425 ± 7.641 * ▲▲	63.268 ± 12.517 * ▲▲
C3	‡‡‡	‡‡‡	‡‡	9	101.206 ± 20.011	194.080 ± 29.497	98.679 ± 8.317 **
C4	‡‡‡	‡‡‡	‡‡	9	101.206 ± 20.011	194.080 ± 29.497	97.513 ± 7.027 **

** $P < 0.01$ vs group B; △△ $P < 0.01$ vs group C3; ▲▲ $P < 0.01$ vs group C4

3 讨论

正常人或动物角膜透明无血管,CNV是与角膜炎症密切相关的常见病理现象。VEGF在CNV的形成过程中起着中心调控作用,抑制VEGF是治疗眼部新生血管的希望^[16]。本研究采用角膜缝线造成兔角膜炎症,从而诱发CNV。该模型本质上属于物理方法造成炎症性CNV动物模型,是研究炎症性CNV的调控机制,探索和评价其防治方法的理想模型。Philipp等^[17]研究显示,炎症时VEGF在角膜上皮、基质和内皮层中均有表达,尤其在角膜缘血管和基质层新生血管内皮中有高表达。因此,我们采用球结膜下注射以使药物能更好到达角膜缘血管内皮细胞,而且球结膜下注射简单易行,并发症少。

本研究结果显示:在正常兔角膜组织上皮细胞和内皮细胞胞质内均存在VEGF的弱阳性表达,其中以上皮细胞表达最明显,而角膜又得以维持透明

状态,提示正常角膜中可能存在某些抗血管形成因子中和了VEGF的诱发血管生成的作用^[18]。角膜缝线后,房水中VEGF蛋白的表达逐渐增高,并与角膜中VEGF的表达及CNV的面积显著正相关。VEGF在7~14 d增长较快,此后增加趋势明显缓和,与同期炎症细胞浸润及CNV生长情况基本一致。早期(缝线后1 d)使用Bevacizumab球结膜下注射疗效显著,用药后7 d几乎未见角膜新生血管生长,可能的原因是缝线后1 d使用Bevacizumab,及时地降低了VEGF的水平,而球结膜下注射使药物极易到达角膜炎症区。对Bevacizumab玻璃体腔注射的药物代谢动力学研究认为,房水中Bevacizumab的药物半衰期($t_{1/2}$)为4.88 d,第1天的早期用药可以在角膜基质损伤修复的阶段达到最大药物浓度^[19]。然而早期治疗组随访14 d时发现了少量的新生血管。可能的原因是Bevacizumab结膜下注射弥散和吸收后只抑制了部分VEGF的活性,另外

可能有不被 Bevacizumab 抑制的其他因子也参与了血管的生成。我们因此设想可以设计新的实验方案,就是在第7天第2次结膜下注射(考虑到 Bevacizumab 的药代动力学^[19]),希望可以进一步抑制新生血管组织的形成。

对晚期(缝线后14 d)治疗组的研究发现,Bevacizumab 对已生成的血管作用甚微,无论是血管长度还是血管的管径,能肯定的是 Bevacizumab 对新生的小血管作用明显。所以,晚治组在用药后虽然血管面积减少了(20±5.5)%,却主要是新生的小血管的退缩。因此我们推测 Bevacizumab 对正在长的血管和(或)刚长的新生血管有抑制作用,但对已经长成的血管作用不明显。

Manazano 等^[20]给予小鼠局部点用 Bevacizumab 眼水(4 mg/ml,2次/d),7 d后角膜新生血管面积扩展到38.2%,与之相比,本实验采用 Bevacizumab 结膜下注射早治组显示了更有效的新生血管抑制作用,7 d角膜新生血管面积几乎为0。这也许是结膜下注射用药浓度较高(25 mg/ml)、药量较大(0.1、0.2 ml)的缘故。本研究发现0.1 ml和0.2 ml结膜下注射对CNV的抑制效果无显著差异,考虑到药物可能的毒性,故我们推荐0.1 ml注射。

总而言之,本研究证实结膜下注射 Bevacizumab 治疗兔实验性角膜新生血管模型是有效的,1 d治疗组显示了显著的血管抑制作用,而14 d治疗组也有一定的血管回退作用。角膜没有发现不良反应,结膜下注射越早,效果越好越快。最近,Bevacizumab 有应用于临床的报道,有局部点药^[21],也有结膜下注射^[22],尽管没有完全抑制CNV,在这些病例中角膜新生血管显著减少,这使得初期的短期随访效果鼓舞人心。但结膜下注射 Bevacizumab 后药物的吸收及其后在角膜中的浓度还没有测量资料,需要进一步的药代动力学研究。我们需要更大规模的临床研究以得出最理想的药物浓度和应用时间,以得到最好的临床效果。

[参考文献]

- [1] Phillips G D, Stone A M, Jones B D, Schultz J C, Whitehead R A, Knighton D R. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea[J]. *In Vivo*, 1994, 8: 961-965.
- [2] Amano S, Rohan R, Kuroki M, Tolentino M, Adamis A P. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound-and inflammation-related corneal neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39: 18-22.
- [3] Kvant A, Sarman S, Fagerholm P, Seregard S, Steen B. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization[J]. *Exp Eye Res*, 2000, 70: 419-428.
- [4] Gan L, Fagerholm P, Palmblad J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in the regulation of corneal neovascularization and wound healing[J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2004, 82: 557-563.
- [5] Edelman J L, Castro M R, Wen Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression of blood vessels in the rat cornea[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40: 1112-1123.
- [6] Hos D, Bock F, Dietrich T, Onderka J, Kruse F E, Thierauch K H, et al. Inflammatory corneal (lymph) angiogenesis is blocked by VEGFR-tyrosine kinase inhibitor ZK 261991, resulting in improved graft survival after corneal transplantation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49: 1836-1842.
- [7] Kim B, Tang Q, Biswas P S, Xu J, Schifflers R M, Xie F Y, et al. Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes[J]. *Am J Pathol*, 2004, 165: 2177-2185.
- [8] Zheng M, Schwarz M A, Lee S, Kumaraguru U, Rouse B T. Control of stromal keratitis by inhibition of neovascularisation [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159: 1021-1029.
- [9] Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, Kim R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration[J]. *Retina*, 2006, 26: 859-870.
- [10] Kahook M Y, Schuman J S, Noecker R J. Intravitreal Bevacizumab in a patient with neovascular glaucoma[J]. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*, 2006, 37: 144-146.
- [11] Avery R L, Pieramici D J, Rabena M D, Castellarin A A, Nasir M A, Giust M J. Intravitreal Bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration[J]. *Ophthalmology*, 2006, 113: 363-372.
- [12] Davidorf F H, Mouser J G, Derick R J. Rapid improvement of rubeosis iridis from a single Bevacizumab (Avastin) injection [J]. *Retina*, 2006, 26: 354-356.
- [13] Dastjerdi M H, Al-Arfaj K M, Nallasamy N, Hamrah P, Jurkunas U V, Pineda R 2nd. Topical Bevacizumab in the treatment of corneal neovascularization: results of a prospective, open-label, noncomparative study[J]. *Arch Ophthalmol*, 2009, 127: 381-389.
- [14] D'Amato R J, Loughnan M S, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 4082-4085.
- [15] 韩静, 闫小龙, 韩泉洪, 惠延年, 王雨生, 马吉献. 兔角膜碱烧伤后角膜和房水中 VEGF 的表达[J]. *眼科新进展*, 2006, 26: 103-104.
- [16] Hosseini H, Nejabat M. A potential therapeutic strategy for inhibition of corneal neovascularization with new anti-VEGF agents[J]. *Med Hypotheses*, 2007, 68: 799-801.
- [17] Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41: 2514-2522.
- [18] Ma D H, Tsai R J, Chu W K, Kao C H, Chen J K. Inhibition of vascular endothelial cell morphogenesis in cultures by limbal epithelial cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40: 1822-1828.
- [19] Bakri S J, Snyder M R, Reid J M, Pulido J S, Singh R J. Pharmacokinetics of intravitreal Bevacizumab (Avastin) [J]. *Ophthalmology*, 2007, 114: 855-859.
- [20] Manzano R P, Peyman G A, Khan P, Carvounis P E, Kivilcim

- M, Ren M, et al. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by Bevacizumab (Avastin)[J]. Br J Ophthalmol, 2007, 91:804-807.
- [21] DeStafeno J J, Kim T. Topical bevacizumab therapy for corneal neovascularization[J]. Arch Ophthalmol, 2007, 125:834-836.
- [22] Erdurmus M, Totan Y. Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2007, 245:1577-1579.

[本文编辑] 孙 岩