

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2021.04.0420

· 综述 ·

新生血管性眼病实验模型的构建与评估

宦晨阳, 马立沙, 沈 炜*

海军军医大学(第二军医大学)长海医院眼科, 上海 200433

[摘要] 血管生成是一个复杂的过程, 在生长发育、组织和器官再生及许多病理改变中起着重要作用。眼部病理性的血管生成是新生血管性眼病的主要特征, 会导致患者视力下降甚至失明。因此, 新生血管性眼病的实验模型对于研究抗血管生成治疗方法至关重要。本文综述了目前常用的研究新生血管性眼病的实验模型及其量化评估方法, 分析了不同实验模型的优点和局限性, 有助于研究人员选择合适的实验模型。

[关键词] 眼疾病; 病理性新生血管化; 生物学模型; 量化评估

[中图分类号] R 77 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2021)04-0420-06

Construction and evaluation of experimental models of neovascular eye diseases

HUAN Chen-yang, MA Li-sha, SHEN Wei*

Department of Ophthalmology, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] Angiogenesis is a complex process playing important roles in growth and development, tissue and organ regeneration, and many pathological changes. Pathological angiogenesis in the eye is the main feature of neovascular eye diseases, which can lead to visual loss or even blindness. Therefore, experimental models of neovascular eye diseases are very important for the development of antiangiogenic therapy. This paper reviews the commonly used experimental models of neovascular eye diseases and their quantitative evaluation, and analyzes their advantages and limitations, helping researchers to choose the most appropriate models for their studies.

[Key words] eye diseases; pathologic neovascularization; biological models; quantitative evaluation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2021, 42(4): 420-425]

血管生成是指从已经存在的血管中生长出新的血管^[1]。血管生成是一个复杂的过程, 包括细胞外基质的降解、内皮细胞的增殖与迁移以及血管的芽生^[2]。生理性的血管生成在生长发育、创面愈合及维持器官正常功能等方面具有重要意义, 然而病理性的血管生成可导致多种疾病, 如肿瘤、视网膜病变、类风湿关节炎等^[1-2]。眼部病理性的血管生成是致盲性新生血管性眼病发生、发展过程中的一个重要特征, 常见于早产儿视网膜病变、糖尿病性视网膜病变、新生血管性年龄相关性黄斑变性、新生血管性青光眼和角膜新生血管等^[3]。在过去的 20 年里, 针对新生血管性眼病的抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor,

VEGF) 药物的兴起彻底改变了患者的治疗模式, 挽救了数百万患者的视力^[4]。新生血管性眼病实验模型的构建与评估有助于对抗血管生成疗法的进一步研究, 为患者开发新型、耐受性好且经济负担小的治疗策略。

目前新生血管性眼病实验模型主要有三大类, 即体外模型、离体模型、体内模型^[5]。完美的实验模型不仅在生理上应该是可靠的, 在技术上也应该是操作简单、成本低并易于精确量化^[4]。体内实验和体外实验均有各自的优势与局限性, 体外实验通常速度快、费用低、易量化, 便于研究孤立的血管生成步骤; 而体内实验可以更真实地模拟血管生成过程, 但其应用更加复杂、费用更高, 且因涉及多

[收稿日期] 2020-06-30 [接受日期] 2020-08-21

[基金项目] 国家自然科学基金(81700839), 中国博士后科学基金(2018M632122), 上海市晨光计划(18CG40)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81700839), China Postdoctoral Science Foundation (2018M632122), and Shanghai Chenguang Project (18CG40)。

[作者简介] 宦晨阳, 硕士生。E-mail: 1549920924@qq.com

*通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-31161999, E-mail: shenwzz@163.com

种细胞和试剂而可能会妨碍对预期效果的评估^[6]。本文对目前常用的新生血管性眼病实验模型的构建与评估方法和它们各自的优缺点进行综述,为研究人员选择合适的实验模型提供帮助。

1 新生血管性眼病体外实验模型(细胞模型)

内皮细胞的增殖、迁移、代谢在血管生成中起着关键作用,内皮细胞的功能研究是寻找治疗新生血管性眼病治疗靶点的重要方法^[7]。过去常用的是牛视网膜内皮细胞,现在已经逐渐被人类内皮细胞如人视网膜内皮细胞和人脐静脉内皮细胞取代^[8]。内皮细胞在组织器官中分布不均、存在表型差异,且体外无法完美复制细胞生长的微环境,因此与体内实验相比,体外实验的可信度降低^[9]。更为重要的是,在体外实验之后还应进行1次或多次体内实验以验证体外实验的结果。根据近年的文献报道,比较公认的用于新生血管性眼病体外实验模型(细胞模型)研究的常用方法有细胞增殖实验、细胞迁移实验、小管形成实验、球体出芽实验、细胞凋亡实验、细胞黏附实验等。

1.1 细胞增殖实验 细胞增殖实验能直接且准确地测量群体中活跃分裂细胞的数量,但不能评价血管生成过程中每1个关键步骤。因此体外内皮细胞增殖实验应与血管生成过程中迁移或形成阶段的其他实验联合使用,以获得足够的信息。

1.1.1 细胞计数法 测量内皮细胞增殖最简单的方法是直接计数。在这种方法中,内皮细胞于体外培养,然后用有机染料(如锥虫蓝)标记并暴露于潜在的血管生成剂^[6]。这种模拟细胞增殖的量化评估只需要1个血球计和1台光学显微镜,可通过电子粒子计数器等细胞计数设备、荧光技术试剂盒(如CyQUANT®细胞增殖分析试剂盒)和自动化平台(如平板细胞仪)提高准确性和效率^[5]。这种方法的重复性较好,缺点是体内大部分内皮细胞处于静止状态,而体外培养的细胞处于增殖状态。

1.1.2 比色法 比色法是利用细胞分裂过程中发生的自然过程,使内皮细胞暴露于细胞代谢过程中可以改变的生物分子中。由于生物分子被内皮细胞处理后代谢的副产物将被留下,副产物的数量与内皮细胞的数量成正比,可通过这些副产物的变化预测内皮细胞数量的变化。最常用的是MTT比色法,其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使

外源性MTT(分解前为黄色)还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲臜并沉积于细胞中。DMSO能溶解内皮细胞中的甲臜,然后用分光光度计检测其光密度,间接反映内皮细胞的数量^[10-11]。这种方法的灵敏度高,缺点是不能确定内皮细胞的增殖是药物血管生成的特异性作用还是由于血管生成无关的药物代谢作用引起,这种方法也不能提供药物本身的细胞毒性信息。

1.1.3 DNA合成法 与比色法类似,DNA合成法也利用内皮细胞的活性检测细胞增殖。内皮细胞的快速分裂需要母代DNA的复制,在合成子代DNA的过程中,³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)或5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)可以作为一种测量细胞增殖的方法^[12]。具有放射性的³H-TdR被纳入新合成的DNA,可通过测量新形成DNA的放射性评估新细胞的生长情况^[12]。BrdU是另一种胸腺嘧啶核苷类似物,它也能够替代胸腺嘧啶(T)渗入正在复制的DNA分子,通过基于BrdU与Apollo荧光染料的特异性反应检测DNA复制活性,检测BrdU标记便能准确地反映细胞的增殖情况^[13]。这种方法的准确性高,BrdU无放射性使得此法更加环保,缺点是检测BrdU时需要免疫组织化学技术,成本较高。

1.2 细胞迁移实验 在细胞增殖和基底膜退化后,内皮细胞从它们的起源处迁移。内皮细胞通过基底膜的运动通常被称为“出芽”,是由于其附近的化学信号促进或抑制血管生成活动而发生,本节所述的实验主要侧重暴露于某些生物分子时内皮细胞的运动。

1.2.1 细胞划痕实验 细胞划痕实验是一种测定细胞迁移运动和修复能力的简捷方法。在细胞划痕实验中,内皮细胞在体外培养皿或平板中生长,直到细胞贴壁形成一个融合的单层。然后用微量枪头或其他硬物在细胞生长的中央区域划线,去除中央部分的细胞,再继续培养细胞至实验设定的时间,观察周边细胞是否生长至中央划痕区。细胞移动的距离、速度及移动面积等数据均可定量评估^[6,14]。这种方法相对简单,缺点是常需加入一些特定的生物分子抑制其他细胞的增殖,此外由于细胞贴壁状态的不一致及数据本身难以精确测量导致实验结果的重复性较差。

1.2.2 Transwell迁移实验 Transwell迁移实验原

理是将 Transwell 小室放入培养板中,小室内称上室,培养板内称下室,上室内盛装上层培养液,下室内盛装下层培养液,上下层培养液以过滤器相隔。上室包含内皮细胞,下室包含用于检测血管生成效应的生物分子,中央过滤器可促进细胞在2个腔室之间的迁移。过滤器滤过孔直径约3~8 μm ,在24 h内,内皮细胞会在化学刺激下发生迁移,染色后可以计数通过过滤器的细胞数量^[15-16]。这种方法的实验速度快,对化学浓度的变化敏感,缺点是涂有基质蛋白的过滤器通常比较昂贵,而且检测系统维护困难。

1.2.3 吞噬运动轨迹测定实验 内皮细胞的迁移可以用吞噬运动的轨迹进行定量,其原理是内皮细胞被镀在金纳米颗粒覆盖的基底上,化学刺激会促进或阻碍细胞的运动。由于金纳米颗粒的高通透性和滞留效应,内皮细胞的运动将迫使胶体金被移到一边或被细胞吸收,因此通过评估基底上的空白空间可以推测内皮细胞迁移的方向和数量。一般来说,吞噬运动轨迹测定是一种快速、定量、简便的细胞运动测定方法,缺点是胶体金基质不能准确模拟细胞外环境^[17-18]。

1.3 小管形成实验 小管形成实验是研究血管生成过程的常用方法,其原理是体外培养的内皮细胞置于细胞外基质凝胶,在细胞因子和其他生长因子的作用下,以基质凝胶为底物的内皮细胞形成小管,培养一定时间后可以用立体显微镜结合软件统计分析内皮细胞形成管腔网络的分枝点数量、网络总长度等血管生成特性指标^[19-20]。这种方法的细胞培养周期短、条件稳定且易于定量分析,缺点是成胶体系的构建较为复杂,三维空间中分析小管形成相对耗时。

1.4 球体出芽实验 球体出芽实验是评估胶原基质中内皮细胞的出芽倾向,其原理是通过在悬吊液滴中培养内皮细胞获得内皮球体,在生成球体后将它们嵌入到含有内皮生长因子或特定类型细胞的胶原基质中。促血管生成因子或共培养细胞的作用可以通过量化内皮球上形成的血管芽数量进行评估^[21]。这种方法比较简单,血管芽具有血管内皮尖端细胞的多种形态特征,缺点是对培养条件要求较高。

1.5 细胞凋亡实验 在体内,内皮细胞的凋亡与新生血管的形成相互对立,血管生成抑制剂可以促

进内皮细胞凋亡^[22],因此可以通过测定内皮细胞的凋亡评价特定生物分子的抗新生血管作用。

1.5.1 Annexin V 实验 评价内皮细胞凋亡有多种方法,最常用的方法是基于膜的改变,即利用 Annexin V 凋亡检测试剂盒进行细胞凋亡评价。在正常细胞中,磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)只分布在细胞膜脂质双层的内侧,在细胞发生凋亡早期PS由脂膜内侧翻向外侧。Annexin V 作为一种磷脂结合蛋白,与PS有高度亲和力,经荧光标记后可用于流式细胞术检测暴露的PS^[23]。这种方法的灵敏度高,可检测单个凋亡细胞,缺点是很难区分凋亡细胞和坏死细胞^[24]。

1.5.2 TUNEL (TdT-mediated dUTP nick-end labeling) 实验 DNA片段化是细胞凋亡的典型特征,TUNEL实验的原理是在基因组DNA发生断裂时,暴露的DNA 3'-OH可以在末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)的催化下加上荧光素标记的脱氧尿嘧啶核苷三磷酸(2'-deoxyuridine-5'-triphosphated, dUTP),从而可以通过荧光显微镜或流式细胞仪进行细胞凋亡检测^[24]。这种方法的灵敏度高、快速且方法简单,缺点是会受到来自坏死细胞和DNA修复或基因转录细胞的假阳性影响。

1.5.3 Caspase 活性检测实验 Caspase全称为含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶,是一组存在于细胞质中具有类似结构的蛋白酶。一旦信号转导途径被激活,Caspase被活化,随后发生凋亡蛋白酶的级联反应,降解细胞内的重要蛋白质,最终导致细胞不可逆地走向凋亡。Caspase的活化可通过蛋白质印迹法、免疫沉淀、免疫组织化学染色等方法检测^[25]。这种方法的实验速度快,节省时间,可对凋亡细胞进行一致的定量,缺点是特异性较低。

1.6 细胞黏附实验 细胞黏附性是维持组织结构稳定的基本条件,对细胞的增殖、分化有重要影响,在血管生成过程中,细胞需要黏附形成新的毛细血管。其原理是内皮细胞被放置在含有纤维连接蛋白膜的孔中,使细胞黏附,培养一段时间后,用磷酸盐缓冲液清洗以消除没有黏附的细胞。通过测量细胞活性、荧光标记强度或显微镜计数对孔内残留的内皮细胞进行定量分析^[26-27]。这种方法可以研究细胞黏附分子对血管生成的影响,缺点是不能排除细胞与细胞之间黏附对细胞与基质之间黏附的影响。

2 新生血管性眼病离体实验模型(组织模型)

离体视网膜新生血管模型又叫离体视网膜移植模型, 通过从1只动物的眼睛获取多个视网膜碎片以减少实验所需动物的数量。其原理是将从小鼠分离的视网膜碎片植入含有 VEGF 的三维纤维蛋白凝胶中, 3~4 d 后视网膜新生血管芽会长入纤维蛋白凝胶, 荧光显微镜下可观察到血管芽的数量、分布、形态等^[8]。这种方法的优点是在分离后的一定时间内, 视网膜组织能够在模拟环境中保持体内部分功能, 实验结果直观、可信度高, 缺点是相关实验操作复杂, 离体培养的成活率难以保证^[28]。

3 新生血管性眼病体内实验模型(动物模型)

体外和离体血管生成实验适用于对潜在的抗血管生成分子进行快速和经济有效的筛选, 体内实验主要用于体外实验结果的进一步验证和关键机制的分析, 是眼部抗血管生成疗法临床前验证的金标准。

3.1 氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)动物模型 OIR 模型已在猫、小鼠、大鼠、家兔、犬和斑马鱼等动物上建立, 对视网膜新生血管发生机制和治疗的研究起到了重要作用^[29]。其主要原理是高氧暴露抑制了视网膜正常血管的生长, 引起视网膜出现氧供应不足的无灌注区, 诱发新生血管因子的释放, 形成病理性新生血管, 一系列的异常均严重影响了视网膜的发育和功能, 最终导致视网膜病变^[30]。这种方法的优点是新生血管容易诱导, 并且易于对新生血管面积进行定量分析, 缺点是多数 OIR 动物模型采用的高氧体积分数与临床应用并不完全符合。

3.2 脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)动物模型 理想的 CNV 实验模型必须稳定、高效和具有可复制性, 并表现出与人类 CNV 病变相似的病理特征。激光诱导的 CNV 模型是使用最广泛的模型之一, 其主要原理是利用激光光凝损伤外层视网膜, 破坏 Bruch 膜, 导致 CNV 的形成, 并渗透到视网膜下空间^[31], 可通过荧光造影、病理组织切片、免疫组织化学、透射电镜观察评价 CNV 的发生率。此种模型建立相对较快, 重复性好, 缺点是每种激光应用的技术差异导致病变的大小在动物之间甚至在同1只眼睛内常表现出较大的

差异^[29]。

3.3 角膜新生血管模型 角膜是少数在正常情况下完全没有血管的组织之一, 为评价各种因素的促血管生成和抗血管生成潜能提供了1个独特的系统^[32]。

3.3.1 碱烧伤模型 碱烧伤角膜新生血管模型已广泛应用于大鼠、小鼠和兔^[33]。其主要原理是用浸润 NaOH 的滤纸片烧灼角膜(通常为 10~30 s), 然后用无菌生理盐水强烈清洗; 新生血管从角膜缘向碱烧伤部位生长, 通常可在碱烧伤后 7~14 d 进行评估^[34], 血管生长的程度可以通过角膜上的血管面积来量化。这种方法操作简单, 与临床的相关性强, 缺点是碱烧伤后角膜组织的广泛损伤可能会引发干扰血管生成的过程, 如伤口愈合、上皮增生和炎症^[30]。

3.3.2 缝合损伤模型 缝线植入是另一种诱导角膜新生血管形成的损伤模型^[35]。其主要原理是在距角膜缘 1.5 mm 的角膜基质中植入1条或多条尼龙缝线, 这些尼龙线结未被掩埋, 丝线留在角膜基质中并导致炎症和形成新生血管^[32]。角膜新生血管通常在术后 7~14 d 进行评估, 新生血管从角膜缘向缝合处生长^[36]。缝合损伤模型与碱烧伤模型的血管生长相似, 但角膜淋巴管生成在缝合损伤模型中更为明显, 这可能是淋巴管生成研究的一个优势^[37], 缺点是可能引起炎症反应, 干扰血管生成。

3.3.3 角膜微囊模型 利用角膜微囊模型可以确定各种生长因子、细胞和组织在血管生成过程中的作用。其基本原理是将血管生成诱导剂(生长因子、细胞悬液、肿瘤组织)诱导到显微镜下制作的角膜基质微囊中, 使角膜缘血管系统的新生血管向内生长^[35,38], 可通过荧光染色法量化血管穿透面积、血管生长速度等。这种方法的优点是相对炎症反应小和角膜水肿轻, 缺点是反应变异性较大^[35]。

4 结 语

新生血管性眼病是造成视力损害的主要原因。尽管每种新生血管性眼病实验模型都有其独特的特点、优势及局限性, 但这些模型共同充当了探索眼部病理性血管生成的实验工具, 极大地促进了对抗血管生成疗法的研究。为了更好地理解特定药物、化合物、生物制剂或试验材料的抗血管生成作用, 进行多种体外实验是先决条件, 同时应该开展多种体内实验来验证体外实验结果。此外, 微流体

技术是血管生成的一种有效的生物学研究方法,对眼部新生血管的基础研究有着重要意义,为抗血管生成疗法的研究提供了新的重要技术补充^[39-40]。

[参 考 文 献]

- [1] POTENTE M, CARMELIET P. The link between angiogenesis and endothelial metabolism[J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 43-66.
- [2] USUI Y, WESTENSKOW P D, MURINELLO S, DORRELL M I, SCHEPPKE L, BUCHER F, et al. Angiogenesis and eye disease[J]. *Annu Rev Vis Sci*, 2015, 1: 155-184.
- [3] AL-LATAYFEH M, SILVA P S, SUN J K, AIELLO L P. Antiangiogenic therapy for ischemic retinopathies[J/OL]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2: a006411. DOI: 10.1101/cshperspect.a006411.
- [4] CAMPBELL M, DOYLE S L. Current perspectives on established and novel therapies for pathological neovascularization in retinal disease[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 164: 321-325.
- [5] NOWAK-SLIWINSKA P, ALITALO K, ALLEN E, ANISIMOV A, APLIN A C, AUERBACH R, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays[J]. *Angiogenesis*, 2018, 21: 425-532.
- [6] GOODWIN A M. *In vitro* assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents[J]. *Microvasc Res*, 2007, 74: 172-183.
- [7] LI X, SUN X, CARMELIET P. Hallmarks of endothelial cell metabolism in health and disease[J]. *Cell Metab*, 2019, 30: 414-433.
- [8] MOLEIRO A F, CONCEIÇÃO G, LEITE-MOREIRA A F, ROCHA-SOUSA A. A critical analysis of the available *in vitro* and *ex vivo* methods to study retinal angiogenesis[J/OL]. *J Ophthalmol*, 2017, 2017: 3034953. DOI: 10.1155/2017/3034953.
- [9] EBERT L M, TAN L Y, JOHAN M Z, MIN K K, COCKSHELL M P, PARHAM K A, et al. A non-canonical role for desmoglein-2 in endothelial cells: implications for neoangiogenesis[J]. *Angiogenesis*, 2016, 19: 463-486.
- [10] LI X, HUANG C, SUI C L, LIANG C M, QI G Y, REN Q Y, et al. Formononetin, J1 and J2 have different effects on endothelial cells via EWSAT1-TRAF6 and its downstream pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24: 875-885.
- [11] ZHANG C, ZHONG B, YANG S, PAN L, YU S, LI Z, et al. Synthesis and biological evaluation of thiabendazole derivatives as anti-angiogenesis and vascular disrupting agents[J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23: 3774-3780.
- [12] STATON C A, STRIBBLING S M, TAZZYMAN S, HUGHES R, BROWN N J, LEWIS C E. Current methods for assaying angiogenesis *in vitro* and *in vivo*[J]. *Int J Exp Pathol*, 2004, 85: 233-248.
- [13] LI X, DARZYNKIEWICZ Z. Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation[J]. *Cell Prolif*, 1995, 28: 571-579.
- [14] CHEN X Y, LI H, LUO H J, LIN Z X, LUO W H. Synthesis and evaluation of pyridoxal hydrazone and acylhydrazone compounds as potential angiogenesis inhibitors[J]. *Pharmacology*, 2019, 104: 244-257.
- [15] QIN W, ZHANG L, LI Z, XIAO D, ZHANG Y, YANG H, et al. SIRT6-mediated transcriptional suppression of MALAT1 is a key mechanism for endothelial to mesenchymal transition[J]. *Int J Cardiol*, 2019, 295: 7-13.
- [16] SENGER D R, PERRUZZI C A, STREIT M, KOTELIANSKY V E, DE FOUGEROLLES A R, DETMAR M. The $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$ integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2002, 160: 195-204.
- [17] NOGALSKI M T, CHAN G C, STEVENSON E V, COLLINS-MCMILLEN D K, YUROCHKO A D. A quantitative evaluation of cell migration by the phagokinetic track motility assay[J/OL]. *J Vis Exp*, 2012: e4165. DOI:10.3791/4165.
- [18] ZUO Y, LV Y, QIAN X, WANG S, CHEN Z, JIANG Q, et al. Inhibition of *HHIP* promoter methylation suppresses human gastric cancer cell proliferation and migration[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45: 1840-1850.
- [19] ARNAOUTOVA I, KLEINMAN H K. *In vitro* angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract[J]. *Nat Protoc*, 2010, 5: 628-635.
- [20] TONG H, LI T, QIU W H, ZHU Z C. Claudin-1 silencing increases sensitivity of liver cancer HepG2 cells to 5-fluorouracil by inhibiting autophagy[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18: 5709-5716.
- [21] ZAHRA F T, CHOLEVA E, SAJIB M S, PAPADIMITRIOU E, MIKELIS C M. *In vitro* spheroid sprouting assay of angiogenesis[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1952: 211-218.
- [22] DIMMELER S, ZEIHNER A M. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression[J]. *Circ Res*, 2000, 87: 434-439.
- [23] VERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINGSPERGER C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V [J]. *J Immunol Methods*, 1995, 184: 39-51.

- [24] ELMORE S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35: 495-516.
- [25] ARCHANA M, BASTIAN, YOGESH T L, KUMARASWAMY K L. Various methods available for detection of apoptotic cells: a review[J]. *Indian J Cancer*, 2013, 50: 274-283.
- [26] REZZOLA S, DAL MONTE M, BELLERI M, BUGATTI A, CHIODELLI P, CORSINI M, et al. Therapeutic potential of anti-angiogenic multitarget N, O-sulfated *E. coli* K5 polysaccharide in diabetic retinopathy[J]. *Diabetes*, 2015, 64: 2581-2592.
- [27] FROMM S, CUNNINGHAM C C, DUNNE M R, VEALE D J, FEARON U, WADE S M. Enhanced angiogenic function in response to fibroblasts from psoriatic arthritis synovium compared to rheumatoid arthritis[J/OL]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21: 297. DOI: 10.1186/s13075-019-2088-3.
- [28] STRYKER Z I, RAJABI M, DAVIS P J, MOUSA S A. Evaluation of angiogenesis assays[J/OL]. *Biomedicines*, 2019, 7: 37. DOI:10.3390/biomedicines7020037.
- [29] LIU C H, WANG Z X, SUN Y, CHEN J. Animal models of ocular angiogenesis: from development to pathologies[J]. *FASEB J*, 2017, 31: 4665-4681.
- [30] CHENG G M, TIAN K L, ZHANG L, YANG N, XING Y Q, HE T. *SI0044* gene silencing in oxygen-induced ischemic retinopathy inhibits retinal neovascularization via down-regulation of CREB expression[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2016, 254: 97-108.
- [31] MONTEZUMA S R, VAVVAS D, MILLER J W. Review of the ocular angiogenesis animal models[J]. *Semin Ophthalmol*, 2009, 24: 52-61.
- [32] BOCK F, MARUYAMA K, REGENFUSS B, HOS D, STEVEN P, HEINDL L M, et al. Novel anti(lymph) angiogenic treatment strategies for corneal and ocular surface diseases[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2013, 34: 89-124.
- [33] ORMEROD L D, ABELSON M B, KENYON K R. Standard models of corneal injury using alkali-immersed filter discs[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1989, 30: 2148-2153.
- [34] HAHN N, DIETZ C T, KÜHL S, VOSSMERBAEUMER U, KROLL J. KLEIP deficiency in mice causes progressive corneal neovascular dystrophy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53: 3260-3268.
- [35] GIMBRONE M A, COTRAN R S, LEAPMAN S B, FOLKMAN J. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1974, 52: 413-427.
- [36] KITAMURA T, ASAI N, ENOMOTO A, MAEDA K, KATO T, ISHIDA M, et al. Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10: 329-337.
- [37] GIACOMINI C, FERRARI G, BIGNAMI F, RAMA P. Alkali burn versus suture-induced corneal neovascularization in C57BL/6 mice: an overview of two common animal models of corneal neovascularization[J]. *Exp Eye Res*, 2014, 121: 1-4.
- [38] RASHMI K C, ATREYA H S, HARSHA RAJ M, SALIMATH B P, APARNA H S. A pyrrole-based natural small molecule mitigates HSP90 expression in MDA-MB-231 cells and inhibits tumor angiogenesis in mice by inactivating HSF-1[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2017, 22: 751-766.
- [39] KO J, LEE Y, LEE S, LEE S R, JEON N L. Human ocular angiogenesis-inspired vascular models on an injection-molded microfluidic chip[J/OL]. *Adv Healthc Mater*, 2019, 8: e1900328. DOI: 10.1002/adhm.201900328.
- [40] KUZMIC N, MOORE T, DEVADAS D, YOUNG E W K. Modelling of endothelial cell migration and angiogenesis in microfluidic cell culture systems[J]. *Biomech Model Mechanobiol*, 2019, 18: 717-731.

[本文编辑] 商素芳