

制备角膜新生血管动物模型的研究进展

王淑荣¹, 田舒慈², 刘鑫¹, 何宇茜¹, 李莹¹, 苏冠方¹, 张妍¹

基金项目: 吉林省科技厅国际合作项目 (No. 20130413025GH)
作者单位: ¹(130041) 中国吉林省长春市, 吉林大学第二医院眼科; ²(130021) 中国吉林省长春市, 吉林大学诺尔曼白求恩健康研究中心

作者简介: 王淑荣, 博士, 副主任医师, 研究方向: 眼表疾病。
通讯作者: 张妍, 博士, 主治医师, 研究方向: 眼表疾病. zhangy66@jlu.edu.cn

收稿日期: 2015-06-03 修回日期: 2015-10-22

Progress on the establishment of corneal neovascularization animal model

Shu-Rong Wang¹, Shu-Ci Tian², Xin Liu¹, Yu-Xi He¹, Ying Li¹, Guan-Fang Su¹, Yan Zhang¹

Foundation item: International Cooperation Project of Science and Technology Office of Jilin (No. 20130413025GH)

¹Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China; ²Norman Bethune Health Science Center of Jilin University, Changchun 130021, China

Correspondence to: Yan Zhang. Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China. zhangy66@jlu.edu.cn

Received: 2015-06-03 Accepted: 2015-10-22

Abstract

• Corneal neovascularization (CNV) is the extensive growth of blood vessels from conjunctiva into cornea. Abnormal angiogenesis plays an important role in the process of CNV, which may result from corneal wound and self-healing. The pathologic growth of blood vessels blocks light, promotes scar formation and causes inflammation, which impairs visual acuity. It is a sight-threatening condition that can decrease eyesight and even leads to blindness. Neovascular eye disease is one of the most common eye diseases in clinical admissions. So, further mechanistic studies are the key to the prevention and treatment of CNV. Determination on the CNV animal models is essential in eye diseases researches. Several main methods of CNV models establishment are summarized in this review.

• KEYWORDS: cornea; vascularization; model; establishment

Citation: Wang SR, Tian SR, Liu X, et al. Progress on the establishment of corneal neovascularization animal model. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(11):1892-1895

摘要

结膜中的血管过度生长并延伸入角膜形成角膜新生血管

(corneal neovascularization, CNV)。血管的异常增生通常来源于角膜受损及自我修复,这是新生血管形成的重要过程。血管的病理性增生阻碍光在眼球内的传播,促进瘢痕形成并引起炎症反应。角膜新生血管会严重影响视力,甚至导致失明。新生血管性眼病是临床上最常见的问题之一。因此进一步的角膜新生血管机制研究是防治新生血管性眼病的关键。角膜新生血管动物模型的选择对研究具有重要意义。本文主要就几种角膜新生血管模型的制备方法作一综述。

关键词: 角膜; 新生血管; 模型; 制备

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.11.14

引用: 王淑荣, 田舒慈, 刘鑫, 等. 制备角膜新生血管动物模型的研究进展. 国际眼科杂志 2015;15(11):1892-1895

0 引言

血管生成是自然生理过程,根据发生部位和时间的不同,血管形成对机体产生的影响不同。在人体大多数组织中,它参与组织细胞的生长和受损组织的修复。生理状态下,毛细血管网仅围绕角膜缘生长,不会延伸至角膜,角膜保持透明状态。在炎症、外伤、手术等不良状态下,毛细血管会侵入角膜,产生病理性CNV。其病理过程主要与作用于血管的细胞因子有关;作用于血管的细胞因子在血管形成过程中起着关键的调控作用,包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF),血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)等促进因子和基质金属蛋白(matrix metalloproteinases, MMPs),白细胞介素(IL-1)等抑制因子。血管形成过程受到许多促进因子和抑制因子的调控。在正常的生理状态下,抑制因子占优势,两种因子的浓度会达到平衡以角膜保持生理状态。当浓度平衡被打破时,促血管生长的细胞因子会促进血管内皮细胞侵入角膜,形成毛细血管^[1]。

作用于血管的细胞因子的过表达与下列因素有关^[2-3]:(1)角膜水肿:角膜水肿时,角膜组织间压力减小,血管容易长入^[4]。(2)炎症反应:炎细胞的浸润导致细胞碎片形成,这些细胞碎片在新生的血管周围可见,对血管生成有促进作用^[4]。(3)缺氧:缺氧条件可刺激促血管生成的细胞因子大量表达。(4)角膜神经纤维分布:新的研究发现,角膜感觉神经与新生血管形成是互相抑制的。角膜新生血管形成与神经的损伤也可能存在联系^[5]。

角膜新生血管动物模型是通过手术、物理、化学、生物等方法,人为诱发动物角膜新生血管增生,产生类似于人类疾病的模型,是诱发性疾病动物模型。CNV模型需要具备以下特点:(1)制作简便,模型稳定;(2)实验条件

和操作简单,血管形成规则;(3)个体间差异较小;(4)其他条件容易控制。实验中应当遵守研究用动物的 Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 决议^[6]。现以家兔为实验模型,从造模方法、效果、原理、优劣几方面对几种 CNV 的动物模型制备方法作介绍。

1 诱导炎症性 CNV 模型

1.1 物理方法诱导的 CNV 模型

1.1.1 角膜缝线法 造模方法:家兔全身麻醉和眼表麻醉,显微镜下用开睑器置开眼睑,在距角膜缘 1.0mm 处进针,穿过角膜半厚度,经过 3mm 宽出针,正反两方向打结后剪掉线头^[7]。术后为预防感染,眼表滴抗生素眼液。效果:缝线后 3~8d 可见毛细血管芽由角膜缘长入,14~18d 血管生长达到高峰。新生血管在仅缝线两侧呈刷状生长,未涉及角膜整个圆周。原理:此模型主要通过角膜损伤所致炎症反应诱导新生血管。基质内缝线埋入引起了角膜缝线部位局部水肿,炎症细胞侵入^[8],此外,角膜缝线还会导致角膜上皮、基底细胞损伤而导致炎症反应。一方面,炎症反应中炎细胞会分泌促血管生长的细胞因子,促进血管生成;另一方面,角膜损伤造成的角膜微环境缺氧也会促进 VEGF 等促血管生成细胞因子的表达,从而促进血管生成^[9]。优点:缝线法诱导新生血管的方法成本低、所需实验器材简单、操作过程简单、新生血管生长比较规则、而且避免了化学诱导方法中一些化学试剂的影响^[10]。缺点:缝线成功与否受术者技巧影响较大,若缝线位于角膜基质层较深处,容易导致角膜穿孔,若缝线稍浅则容易脱线致使模型失败^[10]。应用现状:由于此模型简单易行,成本低廉,被广泛应用于新生血管的相关研究中。

1.1.2 热灼伤法 目前国内外关于角膜热灼伤后继发新生血管的动物模型的研究报道较少,角膜热灼伤后新生血管的基础研究并不深入。现今研究者多利用恒温灼伤器进行角膜热灼伤。造模方法^[11]:设定烧灼器达到预定温度。家兔进行全身麻醉和眼表麻醉。显微镜下用开睑器开睑,用棉签拭去角膜表面液体干燥角膜,探头凹面贴紧角膜中央区域烧灼,烧灼 5s 后离开,立即用大量生理盐水冲洗角膜。术后为预防感染,眼表滴抗生素眼液。效果^[11]:烧灼术后第 5~8d,可见毛细血管从角膜缘长入;在第 14d 左右,新生血管生长达到高峰。原理:热灼伤主要是通过引起角膜炎症反应来诱发 CNV。Cooper 等^[12]认为:前列腺素在血管生成过程中也发挥重要作用。角膜损伤后前列腺素高表达,启动并维持促血管生长因子,促进新生血管增殖。优点:此模型建立简单易行,所需仪器不复杂,对角膜损伤较小。缺点:此方法灼伤力度难以控制,力度过大而容易致角膜穿孔,形成瘢痕导致造模失败。应用现状:此模并不常用。国内此方面报道较少。

1.2 化学方法诱导的 CNV 模型 化学烧伤法:此方法利用碱性化学药物与直接角膜表面接触,导致角膜损伤,诱发新生血管形成。氢氧化钠是实验研究中最常用的化学药物。造模方法^[13]:家兔全身麻醉和眼表麻醉。将直径为 5mm 滤纸片在 1.0mol/L 氢氧化钠浸泡过后放置在距离角膜缘 1.5mm 的角膜表面约 30s,之后立即移除滤纸片,用大量生理盐水冲洗眼球 2min。术后为预防感染,眼表滴抗生素眼液。此外,郭立云等^[14]经实验发现,bFGF

和碱烧伤联合应用诱导新生血管,既可以增加并且维持角膜新生血管,又降低了烧伤的强度,一定程度上降低了溶解、脱出等并发症发生的风险,提高了模型制作的成功率。效果:术后第 3d,可见兔角膜缘处毛细血管网扩张,毛细血管芽呈刷状快速生长,延伸深入角膜。第 7d,新生血管达到生长高峰。原理:碱性物质主要是通过引起角膜炎症反应来诱发新生血管,浸润的炎细胞可以表达 VEGF,促进新生血管形成。碱进入细胞后可引起细胞膜结构的破坏和眼部血栓形成,组织缺血缺氧。新生血管形成的免疫机制在近年来被广泛认可:碱性物质进入细胞会破坏细胞结构使角膜蛋白变性成为抗原而刺激机体免疫反应。创伤角膜还会刺激组织产生血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)等趋化性细胞因子,引起多核中性粒细胞趋化进入角膜,淋巴因子如 TNF- α 等表达也参与引发并维持角膜炎症反应^[15]。优点:此模型很好地模拟了临床上人角膜碱烧伤疾病的病理过程。而且此模型一般不会引起角膜穿孔,不会影响新生血管的测定,角膜组织可以更好的保存,有利于免疫荧光中着色,而且此造模方法成本低,操作容易^[16]。应用现状:碱烧伤法诱导角膜新生血管是最常用的造模方法,广泛应用于角膜新生血管的相关研究。

2 角膜层间植入诱导剂模型

角膜层间植入诱导剂模型多用于鉴定血管形成过程中的刺激因子,或用于研究血管生成或抑制剂,新生血管可以量化^[17]。建立的基本方法为:手术做一角膜切口,将含有能够刺激血管增殖的诱导剂埋置于角膜层间以诱导 CNV 形成。常用诱导剂有 VEGF, bFGF, 白细胞介素-1(IL-1), 内毒素, 二氧化硅等。

2.1 VEGF 缓释药丸诱导法 造模方法^[18]:制备 VEGF 缓释药丸:准备可溶于任何缓冲溶液的同型 VEGF165 (165 个氨基酸)的聚合物,每粒包含 5 μ g。VEGF 因子的植入和缓释需要 VEGF 保持在半固体状态。准备 VEGF 和其它实验用品。利用硫糖铝制备 VEGF 缓释药丸,每粒包含大约 100ng 或 200ng VEGF。无菌条件下将 VEGF 缓释药丸植入角膜层间。效果^[19]:24h 后角膜出现轻微水肿。植入 200ng VEGF 的角膜术后 2d 出现边缘血管扩张。第 3d,边缘血管延伸入角膜,在之后 2d 内,新生血管延伸至药丸处,第 6d 新生血管侵占药丸。第 7d,血管生长趋于稳定。植入较小剂量 VEGF (100ng) 的新生血管反应程度较小。此外,自第 7d 起在植入 200ng 角膜中出现轻微间质水肿和组织出血现象,但是这种现象并没有出现在小剂量 VEGF 处理的角膜。原理:VEGF 是一种多肽细胞因子,是调控 CNV 形成的最重要因子,是血管形成的“调控中心”^[19]。有研究表明,VEGF 通过作用于以下几个步骤促进血管生成:原始血管中蛋白质的水解,内皮细胞的增殖和迁移,毛细血管的形成^[18]。VEGF 可以直接作用于内皮细胞,与血管内皮细胞上的特异性受体结合而激活细胞内酪氨酸激酶和下游细胞的信号级联而促进血管内皮细胞增殖、迁移^[20]。优点:VEGF 是刺激新生血管形成的直接因素,可以避免炎症刺激等其他因素的影响。

2.2 bFGF 缓释药丸诱导法 造模方法^[21]:首先制备 bFGF 缓释药丸:显微镜下将医用明胶海绵片剪成 1mm \times 1mm \times 0.5mm 的小片,浸入 4 $^{\circ}$ C PBS 缓冲液过夜后,用无菌滤纸将水份吸干。于明胶海绵小片上滴加 1 μ L

(500ng/ μ L PBS) bFGF,完全吸收后将小片置于超净台内干燥 48 h。取出将此小丸浸入 20g/L 琼脂糖溶液包裹后置于超净台内干燥 48h。无菌条件下将 bFGF 药丸植入角膜层间。效果:手术后 1~4d,可见局部角膜轻度水肿,毛细血管芽自角膜缘长出,血管成束向植入物方向延伸,血管生长范围较小且管径较细。此后,角膜新生血管逐渐融合,管径变粗,向角膜中心延伸并逐渐包裹药丸。7~10d 血管生长达到高峰,角膜基质明显充血,血管密集,管径粗大,完全包裹植入物。14d 以后新生血开始消退^[21]。原理:bFGF 可以促进内皮细胞的增殖、分化和迁移,通过刺激内皮细胞的有丝分裂而刺激血管形成。此外 bFGF 通过对有丝分裂的影响和与一种有丝分裂无关的类激素活动的影响增加毛细血管生成,引起角膜新生血管^[22]。bFGF 诱发内皮细胞产生大量的尿激酶型纤溶酶激活物(urokinase type plasminogen activator, u-PA)在早期血管生成起作用,产生有活性的纤维蛋白溶酶,激活胶原酶溶解血管边缘的胶原蛋白,促进内皮细胞增殖分化,迁移至三维的胶原基质,诱导血管形成^[23-25]。此外, Yang 等^[26]发现 bFGF 对新血管形成的影响与积极的线性关系相关剂量。优点:bFGF 是血管生成的直接促进因子,能够刺激血管内皮细胞分裂,可排除炎症等间接的新生血管刺激因素,有利于新生血管抑制剂的疗效评价。缺点:该模型制作操作复杂,影响因素多。

2.3 内毒素缓释聚合物诱导法 这种方法是通过在角膜层间植入内毒素缓释聚合物诱导新生血管形成。内毒素是革兰阴性细菌的细胞壁的组成部分,其化学本质为脂多糖。这是研究血管生成抑制剂的可靠模型。造模方法^[27-28]:制备内毒素药丸:制备分别含缓释聚合内毒素 15%、30%、40% 的药丸,乙烯醋酸乙烯酯共聚物珠用高纯度乙醇冲洗达到分光光度纯度,室温条件下,将内毒素药丸溶解于二氯甲烷中至浓度 10%。将模具放在干冰上预冷却,在工作表面一面覆盖玻璃板,防止内毒素在模具中浓缩,用无菌玻璃管取内毒素-Elvax 聚合。固体放置于-20℃条件下 24h 完成聚合,自然挥发 48h 蒸发残余溶剂。聚合物颗粒切成种 1mg 药丸,植入之前用紫外线照射消毒。无菌条件下将内毒素药丸角膜层间。效果^[29]:结果显示,植入含 15% 内毒素的角膜产生轻微的角膜水肿,术后只持续 3~4d。更高水平的内毒素(30%和 40%)诱导良好的新生血管反应并在 24h 内伴随严重的角膜水肿。组织学检查角膜,植入含 15% 内毒素药丸的一组显示,植入后 16d 新生血管从角膜边缘长入角膜囊袋。内毒素诱导 CNV 对局部内毒素有依赖性,对内毒素浓度的严格控制可以诱导不同程度的模型适应研究需求。内毒素浓度过高会导致基质混浊,血管生长过密且容易相互吻合,影响血管的定量测定。但是如果内毒素浓度过低,新生血管数量过少,难以达到模型要求^[28]。优点:内毒素诱导的 CNV 动物模型的优点为诱导的新生血管范围仅占角膜整个圆周的 10%~20%,便于进行动态定量测定,并且术者可以通过控制植入缓释内毒素聚合物的浓度诱导出重度、中度、轻度 CNV 模型,适应不同研究需要^[29]。缺点:操作复杂,影响因素多,手术创伤本身即可引起 CNV 形成,影响实验结果的判定。

3 免疫原性 CNV 模型

免疫原性家兔 CNV 模型的制作包括异种或同种异体角膜移植、角膜基质内注射牛蛋白(BA)等方法。同种

异体角膜移植诱导免疫原性 CNV 模型。造模方法^[30]:在实验动物家兔中随机抽取一部分作为供体,另一部分作为受体。取下供体眼球,剪下角膜用环钻切割后制成植片。麻醉受体兔,用 7.25mm 环钻切割受体角膜制作受体植床。对称地缝合植片与植床,共计 12~16 针。术后为预防感染,眼表滴抗生素眼液。效果^[30]:术后可观察到毛细血管芽自角膜缘向透明角膜长入,向植片中央生长并逐渐包绕植片,植片发生水肿,最后植片植床产生排斥反应,植片的平均存活时间为 11.0 \pm 1.5d。原理:当同种异体角膜进入机体时,会被受体免疫系统识别而成为抗原刺激产生机体液免疫反应,形成免疫复合物并沉积于毛细血管基底膜和角膜组织中,由此激活补体,趋化单核巨噬细胞系统浸润,诱导血管生成^[31]。优点:该模型 CNV 发生机制与人角膜移植术后排斥反应而诱发 CNV 的机制一致,与人类疾病病程非常相近,是研究人角膜移植术后排斥反应机制、发病原因、及治疗的理想模型。缺点:操作复杂,手术技术要求较高,干扰因素较多,供体受体发生免疫排斥的程度差异较大。应用现状:此方法多应用于免疫排斥反应的调控机制及治疗方法的研究中^[32-33]。

4 其他家兔 CNV 模型

能够诱导 CNV 增生的原因多种多样,目前也已经培育出多种动物模型用于研究引起某疾病的原因。除以上 CNV 模型的获得方式以外,还有一些不常用的造模方式,如对家兔角膜上皮机械刮除、角膜基质中肿瘤组织植入术、机械造瓣等方法用于制作动物 CNV 模型^[34]。与上述模型相比较来看,这些模型基本上均有更加明显的缺点,如造模后反应一致性较差,基线难于控制在同一水平线,定量分析比较困难等^[35-36]。

以上几种 CNV 造模方法各有利弊,其中角膜缝线法和碱烧伤法成本较低、操作简单,是目前实验研究中最为广泛应用的两种;角膜层间植入诱导剂模型主要应用于血管形成过程中对特定刺激因子的研究;免疫原性 CNV 模型主要用于角膜移植后发生免疫排斥的研究。CNV 动物模型的研究是人类新生血管性眼病疾病研究的基础,目前来看现有的实验模型已能够大致复制出各种引起 CNV 的主要因素,满足研究需要,模拟出临床上人类 CNV 的疾病表现。

参考文献

- 1 McNatt LG, Weimer L, Yanni J, et al. Angiostatic activity of steroids in the chick embryo CAM and rabbit cornea models of neovascularization. *J Ocul Pharmacol Ther* 1999;15(5):413-423
- 2 Sivak JM, Ostriker AC, Woolfenden A, et al. Pharmacologic uncoupling of angiogenesis and inflammation during initiation of pathological corneal neovascularization. *J Biol Chem* 2011;286(52):44965-44975
- 3 Sener E, Yuksel N, Yildiz DK, et al. The impact of subconjunctivally injected EGF and VEGF inhibitors on experimental corneal neovascularization in rat model. *Curr Eye Res* 2011;36(11):1005-1013
- 4 Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006;104:264-302
- 5 Ferrari G, Hajrasouliha AR, Sadrai Z, et al. Nerves and neovessels inhibit each other in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis* 2013;54(1):813-820
- 6 Connors MS, Stoltz RA, Webb SC. A closed eye contact lens model of

corneal inflammation. Part 1: Increased synthesis of cytochrome P450 arachidonic acid metabolites. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(5):828-840

7 Park JH, Joo CK, Chung SK, *et al.* Comparative study of tacrolimus and bevacizumab on corneal neovascularization in rabbits. *Cornea* 2015;34(4):449-455

8 王军花,高桂平.角膜新生血管的发生与治疗.中国组织工程研究与临床康复 2010;14(33):6223-6225

9 程光辉,姜威,朱雅琪,等.白介素-1受体拮抗剂抑制角膜新生血管及血管内皮生长因子表达的研究.氨基酸和生物资源 2014;36(1):32-35

10 唐维强,柳林,李静,等.角膜缝线诱导建立大鼠角膜新生血管模型.国际眼科杂志 2004;4(5):820-823

11 贾雍,蒋华,王永强.恒温下兔角膜热烧伤后继发新生血管建模初步研究.国际眼科杂志 2014;14(7):1193-1196

12 Cooper CA, Bergamini MV, Leopold IH. Use of flurbiprofen to inhibit corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1980;98(6):1102-1105

13 Kuerten D, Johnen S, Harmening N, *et al.* Transplantation of PEDF-transfected pigment epithelial cells inhibits corneal neovascularization in a rabbit model. *Gradfes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015;253(7):1061-1069

14 郭立云,张洁莹,孙恒,等.碱性成纤维细胞生长因子对碱性烧伤兔眼角膜新生血管的影响.山东医药 2014;(54):7-9

15 幸正茂.角膜碱烧伤的免疫学机制研究进展.眼科研究 2010;28(8):796-800

16 Giacomini C, Ferrari G, Bignami F. Alkali burn versus suture-induced corneal neovascularization in C57BL/6 mice: an overview of two common animal models of corneal. *Exp Eye Res* 2014;121:1-4

17 Birsner AE, Benny O, D'Amato RJ. The Corneal Micropocket Assay: A Model of Angiogenesis in the Mouse Eye. *J Vis Exp* 2014;16(90)

18 Coman L, Coman OA, Păunescu H, *et al.* VEGF-induced corneal neovascularisation in a rabbit experimental model. *Rom J Morphol Embryol* 2010;51(2):327-336

19 赵伟,凌士琦,刘祖国.大鼠角膜微囊袋植入微粒体诱导新生血管模型的研究.实用医师杂志 2007;14(25):3425-3427

20 毛旖旎,胡雁,候胜平,等.大鼠角膜缘新生血管微小RNA与VEGF相关性分析.重庆大学学报 2014;39(8):1090-1094

21 丁怡,张明昌. CD105 和血管内皮生长因子在大鼠角膜新生血管中的表达.华中科技大学学报(医学版)2010;39(2):222-224

22 Bremnes RM, Camps C, Sirera R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines

VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 2006;51(2):143-158

23 Hecquet C, Morisset S, Lorans G, *et al.* Effects of acidic and basic fibroblast growth factors on the proliferation of rabbit corneal cells. *Curr Eye Res* 1990;9(5):429-433

24 李群秀,刘学政,张克俭,等.视网膜细胞联合 bFGF 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经样细胞的分化.中华眼视光学与视觉科学杂志 2010;12(2):122-123

25 吴伟.重组人表皮生长因子与碱性成纤维生长因子促进角膜上皮损伤修复及血管新生.广州:南方医科大学 2012

26 Yang CF, Yasulawa T, Kinura H, *et al.* Experimental corneal neovascularization by basic fibroblast growth factor incorporated into gelatin hydrogel. *Ophthalm icRes* 2000;32(1):19-24

27 Li WW, Grayson G, Flolman J, *et al.* Sustained-release endotoxin. A model for inducing corneal neovascularizatSustained-release endotoxin. A model for inducing corneal neovascularizationion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32(11):2906-2911

28 金玲,蔡郑东,楼月芳.内毒素诱导兔角膜新生血管模型实验研究.眼科研究 1998;16(2):85-86

29 张黎,胡艳华.新角膜囊袋法诱生的兔角膜新生血管模型.眼科新进展 2006;26(5):354-356

30 Damms T, Ross JR, Duplessie MD. Intracorneal bovine albumin: an immunologic model of corneal angiogenesis. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;235(10):460-666

31 张玉光,韩旭光,王巧玲,等. Avastin 抑制兔角膜移植术后角膜新生血管的实验研究.山东大学学报 2015;52(1):47-51

32 Regenfuss B, Bock F, Parthasarathy A, *et al.* Corneal angiogenesis from bedside to bench and back: a tribute to Judah Folkman. *Lymphat Res Biol* 2008;6(3-4):191-201

33 Shi W, Liu J, Li M, *et al.* Expression of MMP, HPSE, and FAP in stroma promoted corneal neovascularization induced by different etiological factors. *Curr Eye Res* 2010;35(11):967-977

34 Amano S, Rohan R, Kuroki M. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(1):18-22

35 Regenfuss B, Bock F, Parthasarathy A, *et al.* Corneal angiogenesis from bedside to bench and back: a tribute to Judah Folkman. *Lymphat Res Biol* 2008;6(3-4):191-201

36 Shi W, Liu J, Li M, *et al.* Expression of MMP, HPSE, and FAP in stroma promoted corneal neovascularization induced by different etiological factors. *Curr Eye Res* 2010;35(11):967-977