· 数据挖掘 ·

基于数据挖掘的角膜新生血管动物模型应用特点分析

赵日开, 杨卉妍, 刘莹, 蒋鑫, 苗明三*

(河南中医药大学 中医药科学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:通过总结角膜新生血管(CNV)动物模型的造模特点,为建立理想的CNV动物模型提供参考依据。方法:该文以“角膜新生血管”为主题词在中国知网、万方数据、中华医学期刊全文数据库及PubMed数据库进行检索,筛选出2013—2023年中有关CNV动物实验的相关文献,通过Excel 2021表格建立数据库,对其实验动物品系、性别、造模方法、检测指标、应用类别等内容进行整理,分析CNV动物模型的模型特点。结果:经过对比分析发现造模时的动物品系以SD大鼠(87次、29.49%),新西兰白兔(52次、17.63%)为主;动物性别推荐单一性别,目前以雄性为主;药效验证和机制研究的造模方法均以碱烧伤法居多;指标检测方式包括表观指标观察、组织病理学检测、免疫组化(IHC)、蛋白免疫印迹法(Western blot)及多种聚合酶链式反应(PCR)检测为主;检测指标包括表观指征、角膜组织病理、CNV调控相关指标等。结论:模型复制推荐碱烧伤法诱导的SD大鼠CNV模型,指标主要选择CNV的生长情况、角膜组织病理检测及血管内皮生长因子(VEGF)相关检测,依照需求增选角膜表观指征及血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR2)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、分泌蛋白Ⅲ(Scg3)等CNV调控相关基础指标。临床治疗CNV用药以抗炎药物与抗VEGF药物为主,缺乏中医药应用,模型的完善需要增加中医证候要素。

[关键词] 角膜新生血管;数据挖掘;动物模型;应用分析;中医证候要素

[中图分类号] R2-0;R33;G353.11;R246.82 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)09-0166-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20232236 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240103.1427.003>

[网络出版日期] 2024-01-04 15:20:12

Application of Animal Models of Corneal Neovascularization Based on Data Mining

ZHAO Rikai, YANG Huiyan, LIU Ying, JIANG Xin, MIAO Mingsan*

(Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine,
Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To provide a reference for the establishment of an ideal corneal neovascularization (CNV) animal model by summarizing the modeling characteristics of CNV animal models. **Method:** With "CNV" as the theme word, this paper searched the China National Knowledge Infrastructure (CNKI), Wanfang, Chinese medical journals full-text database, and PubMed database and screened out relevant literature on CNV animal experiments from 2013 to 2023. The database was established by Excel 2021, and the experimental animal strain, gender, modeling method, detection index, and application category were sorted out. The characteristics of the CNV animal model were analyzed. **Result:** After comparative analysis, it was found that the animal strains were Sprague-Dawley rats (87 times, 29.49%) and New Zealand white rabbits (52 times, 17.63%). Male animals were recommended. Most modeling methods for efficacy verification and mechanism studies were the alkali burn method. Index detection methods included apparent index observation,

[收稿日期] 2023-09-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82074038);河南省重大科技专项(221100310400);岐黄学者支持项目(国中医药人教函2022-6)

[第一作者] 赵日开,在读硕士,从事中药学研究,E-mail:2803784597@qq.com

[通信作者] *苗明三,博士,教授,从事中药药理学研究,E-mail:miaomingsan@163.com

histopathological detection, immunohistochemistry (IHC), Western blot, and various polymerase chain reaction (PCR) tests. Detection indexes included apparent indication, corneal histopathology, CNV regulation, etc. **Conclusion:** The CNV model of SD rats induced by the alkali burn method is recommended for model replication, and the indexes are mainly selected from the growth of CNV, corneal histopathological test, and vascular endothelial growth factor (VEGF)-related test. In addition, according to the demand, the corneal apparent indication and the basic indexes related to the regulation of CNV, such as vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), basic fibroblast growth factor (bFGF), and secretogranin III (Scg3) are also selected. Clinical treatment of CNV relies on anti-inflammatory drugs and anti-VEGF drugs, and there is a lack of application of traditional Chinese medicine (TCM), so the model needs to be improved by adding elements of TCM syndromes.

[Keywords] corneal neovascularization; data mining; animal model; application analysis; traditional Chinese medicine syndrome elements

角膜新生血管(CNV)是一种严重的角膜病理改变,感染性角膜炎、免疫疾病、角膜创伤、碱损伤或隐形眼镜磨损导致的眼损伤和缺氧等会使新血管从角膜缘生长,导致新生血管形成,影响角膜的透明度,严重者可造成失明^[1-2]。每年CNV的发病人数超过140万,患者中视力受损甚至失明的比例高达57.4%^[3]。目前对于CNV的治疗集中在引起CNV的病因及生理病理过程上,已有研究证实炎症是CNV的核心机制,而传统的手术治疗如血管闭塞、眼表重建等可能会诱发手术部位炎症,因此临床中应用较多的手段是使用皮质类固醇或者其他抗炎药物^[4]。CNV的形成是由多种影响因素共同作用的结果,当前CNV治疗药物的研发多数处于仅设想或者体内体外实验研究阶段,尤其在中医药领域更是大片空白,因此建立符合临床疾病特点的CNV动物模型对研究其发生机制,探索药物治疗方式具有非常重要的意义。本文通过数据挖掘对CNV动物实验相关文献进行分析,整理各种CNV动物模型的造模方法、检测指标等内容,为建立更加理想的角膜新生血管动物模型提供文献依据。

1 资料与方法

1.1 数据来源 以“角膜新生血管”为关键词检索中国知网、万方数据及中华医学期刊全文数据库,以“corneal neovascularization”为关键词检索PubMed数据库,时间限定为2013—2023年,共检索到2 350篇期刊文献。

1.2 纳入标准 明确说明造模为CNV模型的实验研究文献,筛选造模方法完整及实验过程清晰的文章。

1.3 排除标准 排除造模方法不全的文献;排除会议、报纸、硕博士论文、综述、临床观察文献;排除单

纯体外细胞实验。

1.4 数据处理 筛选得到符合条件的实验研究文献284篇,将文献中实验动物品系、性别、造模方法、检测指标、应用类别等录入Excel 2021进行总结处理,创建CNV模型数据库。

2 结果

2.1 动物品系应用情况 将录入的284篇实验文献中实验动物分类统计,整理得出26个品系,累计频数295次。从统计结果看CNV模型动物主体为大小鼠与实验兔,其中造模使用最多的动物是SD大鼠(87次、29.49%),使用占比超过10%的有新西兰白兔(52次、17.63%)、C57BL/6小鼠(43次、14.58%)及BALB/c小鼠(37次、12.54%),详见表1。

2.2 实验动物性别分布 将284篇实验文献所涉及实验动物性别分类统计,得到性别记录共199例,其中雄性96例(48%)、雌性43例(22%)、雌雄不限35例(18%)、雌雄兼有16例(8%)、雌雄各半9例(4%),此外还有85篇文献没有记录性别使用情况,综合判断雌雄性别不是模型复制的主要影响因素。

2.3 造模方法

2.3.1 CNV造模方法分类 在全部录入的284篇文献中,共用到14种造模方法,其中碱烧伤法的使用频率最高(182次、63.64%),其次是角膜缝线法(56次、19.58%)。两种造模方法诱导的CNV模型属于炎症性模型。CNV造模方法分类见表2。

2.3.2 CNV高频造模方法 CNV造模以碱烧伤法及角膜缝线法为主,其中碱烧伤法诱导效果的影响因素主要包括氢氧化钠(NaOH)浓度、作用于角膜的位置及作用时间;角膜缝线法诱导效果的影响因素包括缝线型号选择、缝合方式、缝合技巧、缝线深

表1 角膜新生血管模型动物品系分类

Table 1 Classification of animal strains of corneal neovascular model

品系	频数/次	占比/%	品系	频数/次	占比/%
SD大鼠	87	29.49	TNF-Rp55d小鼠	1	0.34
新西兰白兔	52	17.63	TNF-RP75d小鼠	1	0.34
C57BL/6小鼠	43	14.58	Dp71-null小鼠	1	0.34
BALB/c小鼠	37	12.54	Nox57(ko)小鼠	1	0.34
Wistar大鼠	28	9.49	S69PR70(ko)小鼠	1	0.34
家兔	11	3.73	ICR小鼠	1	0.34
日本大耳兔	8	2.71	BCL-10 ^{-/-} 小鼠	1	0.34
KM小鼠	7	2.37	WT FVB小鼠	1	0.34
荷兰兔	3	1.02	Flk1:myr-mCherry小鼠	1	0.34
miR-497(KO)小鼠	2	0.68	伊朗兔	1	0.34
miR-497(TG)小鼠	2	0.68	RAP1(ko)小鼠	1	0.34
TRPV4-null(ko)小鼠	1	0.34	金吉拉杂种灰兔	1	0.34
AIP1(ko)小鼠	1	0.34	VEGFR2-luc-K1转基因荧光标记小鼠	1	0.34

表2 CNV造模方法分类

Table 2 Classification of CNV molding methods

分类	方法	频数/次	频率/%
物理方法诱导	角膜缝线法	56	19.58
	热烧伤	6	2.10
	激光诱导	1	0.35
	紫外线(UVB)照射	1	0.35
	角膜清创术	1	0.35
化学方法诱导	碱烧伤	182	63.64
	硝酸银/钾烧伤	23	8.03
	百草枯烧伤	2	0.70
	硫芥子气(SM)烧伤	1	0.35
	酸烧伤	1	0.35
免疫原性	角膜移植术	2	0.70
角膜囊袋法	微囊袋植入法	8	2.80
其他方法	角膜注射单纯疱疹病毒	1	0.35
	角膜注射金黄色葡萄球菌	1	0.35

度及跨度、线头长短等^[5]。从统计数据来看,碱烧伤法使用1 mol·L⁻¹ NaOH的频率最高,作用部位以角膜中央为主,大小鼠高频灼烧时长是40、30 s,实验兔高频灼烧时长是30 s,具体统计数据见增强出版附加材料。角膜缝线法影响因素多,受实验动物品系影响大,造模手术操作细节实例见表3。

2.4 检测指标 将录入的284篇文献中的全部指标依据检测方法分类统计,其中同一组织被不同方法检测不同指标,如角膜组织既检测病理又做免疫组化,需分别统计^[12];若同一组织被相同方法同时

检测多个指标,则归纳于一类^[13],如酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测房水中血管内皮生长因子(VEGF)、骨桥蛋白(OPN)活性蛋白含量,统归于生化指标,同一实验只记录1次。统计结果表明,284篇实验文献包含15种指标类型,累计频数713次,应用较多的是CNV生长情况(201次)、角膜组织病理学检测(127次)、免疫组化(IHC)(88次)等。现筛选出频数≥2次的检测方法,总计有9种,具体检测指标分布情况见表4。

2.5 模型应用分析 现阶段CNV模型主要应用于药效验证及机制研究2个方向,录入的284篇实验文献中,含有机制研究内容的有190篇,包含药效验证的有178篇,还有14篇主题为模型构建,CNV模型实际研究中的应用占比见增强出版附加材料。从图中可以直观的看出,无论是用于药效验证还是在机制研究中,碱烧伤法诱导的CNV模型使用频率远远超出其他方法。

3 结果与分析

角膜新生血管是严重的角膜病理改变,中医“五轮学说”中角膜是黑睛,CNV可归属于中医“混睛障”范畴。该病首载于《审视瑶函》^[14]“此症谓漫珠,皆一色之障,世之患者最多,有赤白二症,赤者嫌其多赤脉,白者畏其光滑”,《医宗金鉴·眼科心法要诀》中认为本病由“肝脏毒风与瘀血上凝所致”,黑睛属肝,肝胆热毒炽盛,上攻黑睛,故黑睛深层混浊,肿胀增厚,白睛混赤;因热致瘀,火郁经脉,新生赤脉进入黑睛,形成翳障^[15]。中医治疗CNV以“明

表3 角膜缝线法诱导CNV模型实际手术操作举例

Table 3 Examples of actual surgical procedures of corneal suture induced CNV model

实验动物	缝线型号	进针位置及方向	缝合操作	缝合深度
C57BL/6小鼠 ^[6]	11-0尼龙缝线	外点在角膜边缘,内点在角膜中心,与角膜缘等距	中央角膜用直径为2 mm的环钻标记,并将3条11-0尼龙缝线放置在基质内位置	角膜基质层
KM小鼠 ^[7]	11-0尼龙缝线	角膜缘与角膜中心之间的中点进针,近角膜缘处出针	间断缝合3针,两针间隔120度	角膜基质下
新西兰白兔 ^[8]	8-0尼龙缝线	距角膜缘2.0 mm	2点钟位、4点钟位、6点钟位、8点钟位、10点钟位和12点钟位处“8字”缝合	角膜基质浅层
家兔 ^[9]	8-0尼龙缝线	距角膜上缘2.0 mm	1点钟位、11点钟位、12点钟位处间断缝合3针	1/2~2/3角膜厚度
SD大鼠 ^[10]	10-0号尼龙缝线	距角膜缘略小于1.0 mm处(圆规定位)向瞳孔中心方向进针	3点钟位、6点钟位、9点钟位、12点钟位处间断缝合4针	角膜基质层
SD大鼠 ^[11]	10-0号尼龙缝线	距离瞳孔中心1.5 mm处向角膜缘方向进针	1点、11点、12点钟位处间断缝合3针	角膜基质层

表4 检测指标分类及分布

Table 4 Classification and distribution of test indicators

检测手段	检测指标	频数/次
CNV生长情况观察	CNV长度、CNV面积计算	201
角膜组织病理学检测	苏木素-伊红(HE)染色观察各组角膜组织形态学变化	127
免疫组化(IHC)	VEGF、血小板-内皮细胞黏附分子31(CD31)、血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR2)、基质金属蛋白酶-2/9(MMP-2、MMP-9)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)、促红细胞生成素(EPO)等蛋白表达	88
蛋白免疫印迹法	Raf/MEK/细胞外调节蛋白激酶(ERK)等通路相关因子表达;Raf蛋白激酶、ERK1、ERK2、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK);角膜组织中血管内皮生长因子VEGFA/VEGFB、趋化因子受体CXCR4、神经生长因子(NGF)、分泌粒蛋白Ⅲ(Scg3)、MMP-9、血管内皮细胞生长因子受体Flk-1/VEGFR2等蛋白表达	73
生化指标	血液中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、VEGF含量;房水中VEGF、OPN、TNF- α 等含量;角膜组织中碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、VEGF、TNF- α 、白细胞介素-10(IL-10)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、转化生长因子- β_1 亚型(TGF- β_1)等蛋白表达	50
免疫荧光(IF)	新生血管侵入面积;全角膜铺片免疫荧光检测CD31、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、磷酸化(p)-ERK1/2、p-p38 MAPK表达	47
角膜表现情况观察	水肿、浑浊程度,炎症反应,角膜上皮愈合情况	46
实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)	角膜组织中VEGF、CXCR4、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、精氨酸酶-1(Arg-1)、血管内皮生长因子受体Flt-1/Flk-1/VEGFR2、血小板反应蛋白-1(TSP-1)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)等mRNA表达	43
逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)	角膜组织中PI3K/Akt/mTOR信号通路因子mRNA表达:4EBP1/P70S6K、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt);色素上皮衍生因子(PEDF)、VEGF、EPO、MMP-2等mRNA表达	38

目退翳”为主,现代医学治疗以药物、手术及基因疗法为主。CNV的发生发展机制尚不明确,因此需要进一步的动物实验研究筛选治疗药物并探究疾病发生机制及药物作用机制。

3.1 模型动物选择 大小鼠与实验兔是目前CNV模型实验动物的主体,应用多,模型稳定,重复性好;实验兔的角膜比鼠类厚,同时体型、眼球较大更便于手术操作及观察,但是经济成本高;大小鼠的优势在于繁殖时间短、经济成本低,可以大量购入同时进行多个方向的研究;依统计数据实验动物性别不是主要的模型复制影响因素,但是为减轻人工饲养成本,推荐单一性别的实验动物。从统计数

据、经济成本、手术操作难易程度综合考虑,首要推荐SD大鼠作为CNV模型的实验动物。若需要做一些较高难度操作,或者对角膜表现指征观察的要求较高,则推荐新西兰兔。

3.2 造模方法选择 目前应用最多的CNV造模方法是碱烧伤法,碱烧伤角膜组织早期以局部强烈的炎症为特征,过度的炎症细胞激活、聚集、浸润和细胞因子表达,调控CNV生成。碱烧伤法的优势在于操作简便,造模成功率高,模型一致性好,同时模型不会引起角膜穿孔,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^[16]。角膜缝线法诱导CNV同样属于炎症性模型。

缝线早期炎症因子释放,促进花生四烯酸代谢、内皮细胞有丝分裂,VEGF表达增加,加速CNV形成^[17]。与碱烧伤法相比,角膜缝线法的优势在于新生血管沿缝线两侧呈局限性生长,未累及角膜其他时钟方位;或沿缝合方向垂直角膜缘呈束状或丛状

向心性生长,形态较规则,便于观察和测量^[5,18]。但是角膜缝线法各手术环节影响因素较多,造模效果受施术者缝合技巧熟练度影响,因此在实际使用频率上不如碱烧伤法。综上得出CNV模型推荐复制方法见表5。

表5 CNV模型推荐复制方法

Table 5 Recommended replication methods for CNV model

造模方法	实验动物	操作方法	术后处理
碱烧伤法	SD大鼠	用1%戊巴比妥钠以45 mg·kg ⁻¹ 剂量腹腔麻醉(其他麻醉亦可),实验眼滴0.4%盐酸奥布卡因滴眼液表面麻醉。将直径3 mm的滤纸浸于1 mol·L ⁻¹ 的氢氧化钠溶液中充分浸润,置于干燥滤纸上蘸去多余的碱液,均匀贴于眼角膜中央40 s后弃去滤纸,立即用生理盐水冲洗被烧伤角膜表面及结膜囊1 min	术后给予左氧氟沙星滴眼液滴眼3次/d(或抗生素眼膏),连续3 d,防止感染
	新西兰兔	将实验兔置于固定架固定,采用盐酸氯胺酮注射液(25 mg·kg ⁻¹)与盐酸异丙嗪注射液(25 mg·kg ⁻¹)按1:1的比例混合后,以2 mL·kg ⁻¹ 体质量剂量对实验兔进行全身麻醉(其他麻醉亦可),0.4%盐酸奥布卡因滴眼液眼球表面麻醉。待兔呼吸平稳后,将直径6 mm的滤纸浸于1 mol·L ⁻¹ 的氢氧化钠溶液中充分浸润,置于干燥滤纸上蘸去多余的碱液,均匀贴于兔眼角膜中央30 s后弃去滤纸,立即用生理盐水冲洗被烧伤角膜表面及结膜囊1 min	
角膜缝线法	SD大鼠	用1%戊巴比妥钠腹腔注射诱导全身麻醉(其他麻醉亦可),实验眼滴0.4%盐酸奥布卡因滴眼液角膜表面麻醉。无菌操作,在手术显微镜下用10-0号尼龙线铲针穿过角膜基质层间断缝合4针(3点、6点、9点、12点4个钟点位置),自距离角膜缘2.0 mm(圆规定位)向瞳孔中心方向进针	术后给予左氧氟沙星滴眼液滴眼3次/d(或抗生素眼膏),连续3 d。同时检查(手电筒照射)缝线有无脱落,若有脱落,及时原位或原进针点旁补缝,同一位点缝线2次以上脱落则剔除分析
	新西兰兔	将实验兔置于固定架固定,采用盐酸氯胺酮注射液(25 mg·kg ⁻¹)与盐酸异丙嗪注射液(25 mg·kg ⁻¹)按1:1的比例混合后,以2 mL·kg ⁻¹ 体质量剂量对实验兔进行全身麻醉(其他麻醉亦可),0.4%盐酸奥布卡因滴眼液眼球表面麻醉。无菌操作,在手术显微镜下置开睑器,冲洗结膜囊,8-0尼龙缝线,距角膜缘2 mm处作3针间断板层缝线(分别于11点、12点、1点3个钟点位置),针脚深度约1/2~2/3角膜厚度,线节暴露出	

3.3 模型指标的建立 模型指标的选择建立在实验研究内容的基础上。统计发现,CNV模型主要应用于药效验证与机制研究2部分。单纯的CNV药效验证,通过表观指征、角膜组织病理即可直观的判断出受试药物是否有效。表观指征以CNV生长情况为主,包括CNV长度测量及面积计算。炎症是CNV的核心机制^[19-20],因此也可以选择加入角膜水肿、浑浊程度,炎症指数等炎症相关表观指标。组织病理检测是疾病诊断的金指标。部分药效实验会加入血清、房水生化指标,如血液IL-6、TNF- α 、VEGF含量和房水VEGF、OPN含量等来辅助判断。

作用机制一般在药效验证基础上增加生化检测、免疫组化、Western blot及各种PCR检测方法测定相关蛋白及mRNA表达来完善研究内容。将CNV数据库中重复出现的蛋白、生物因子、mRNA指标总结分析,可分为3部分。第一部分指标基于新生血管形成调控相关的各个环节,包括内皮细胞渗透性增加、血管基底膜和ECM崩解、内皮细胞出

芽、内皮细胞增殖等^[21],这部分指标也是CNV机制研究的基础指标。角膜血管生成是由于缺氧或炎症细胞释放促血管生成因子,例如bFGF、VEGF和其他几种趋化因子^[3]。VEGF是血管生成的主要调节因子,在血管新生中起着举足轻重的作用,是CNV实验研究中的黄金指标^[21],VEGFR2被认为是主要的VEGF受体,介导VEGF对血管内皮细胞的增殖作用,研究表明,VEGF/VEGFR2信号通路是角膜新生血管形成的关键^[22]。血管生长因子Scg3和VEGF作用相似,也参与诱导CNV形成,Scg3抗体可以抑制角膜碱烧伤后的炎症反应,从而抑制CNV的生成^[23-25]。抗血管生成因子PEDF与VEGF之间动态平衡失调,是新生血管初生的重要原因^[26]。MMP-2、MMP-9通过参与IV型胶原的降解,易化血管内皮细胞的迁移,是新生血管形成的一个重要环节^[27],而MMP-2及MMP-9的表达与炎症细胞聚集相关^[28-29]。IL-6和TNF- α 是促炎因子,在角膜炎期间过度表达,会诱导血管生成^[21]。iNOS是NO合成

的关键酶,在角膜上皮和内皮中含量丰富,在炎症、外伤等刺激下,iNOS mRNA 翻译产生 NO 促进 CNV 生成^[30]。CD31 特异性表达于血管内皮细胞中,相对于其他内皮细胞标记,CD31 更能精确反映血管数量^[31]。基于纳米技术的新型眼纳米系统(ONS),例如脂质体,纳米颗粒(NPs),聚合物胶束,纳米乳液/微乳液,树枝状聚合物等,以上述调控指标为基础,研究优化眼渗透和生物利用率且药物保留时间较长的纳米载体,这是当前 CNV 治疗最热门的研究领域^[32]。

第二部分基于新型抗 VEGF 药物开发的研究中抑制 VEGF 信号通路的各个步骤^[33]。研究发现 CXCR7 能促进 IL-8、VEGF 等促血管生成因子的表达^[34]。CXCL12/CXCR4 通路可协同 VEGF-A/VEGFR-1 通路调节角膜新生血管生成^[5]。ERK1/2 和 p38 是 VEGF 信号转导的 2 个主要下游蛋白^[35],研究发现双氢青蒿素(DHA)可以降低 ERK1/2、p38 的磷酸化,进而抑制 CNV 形成^[36]。第三部分基于基因的抗血管生成治疗策略^[37]。MiR-200b 可通过调控 PIK3CA/Akt 通路抑制大鼠角膜血管新生^[8];miR-322(424)-5P 可能通过激活 VEGF 及 Raf/MEK/ERK 通路促进角膜新生血管的形成^[38]。miR-497 可抑制碱烧伤诱导的角膜炎症反应,通过靶向 STAT3 抑制炎症信号通路的激活,进而抑制 CNV 的发生和发展^[39]。基因疗法还包括通过 siRNA 下调或降解 mRNA 的新策略,如 siVEGFA 沉默 VEGFA 表达来抑制 CNV^[40]。这两部分同样属于当前 CNV 现代临床研究的主流发展方向。

3.4 CNV 模型与中医药证候评价 当前 CNV 模型的造模方法属于现代医学疾病动物模型的范畴,用于中医药的药效机制研究,尚缺乏中医临床证候的部分。中医理论中,肝开窍于目,角膜为黑睛,在脏属肝,碱烧伤、角膜缝线法等造模方法构建的炎症性 CNV 模型,其表现出的局部充血、浸润、浑浊等炎症表现及实验动物表现的烦躁、不安等症候群,可归属于肝火上炎证范畴。当前临床上用中药复方或者单味中药直接治疗 CNV 的报道很少,明确报道的动物实验研究仅有中药复方葛根退赤汤与中药密蒙花。葛根退赤汤以“清热抑木”法起到清热退赤、活血明目的作用;密蒙花味甘,性微寒,归肝经,有清热泻火、明目退翳的功效,研究发现二者可通过抑制 VEGFA 的表达,进而抑制由碱烧伤法构建的大小鼠 CNV 模型新生血管的生成^[41-42]。从葛根退赤汤及密蒙花的主治功效上分析可以佐证碱烧

伤法构建的 CNV 模型属于肝火上炎证。其他造模方法的中医药证候评价还需要通过中医四诊“望、闻、问、切”综合判断,即在动物模型复制中“望”实验动物毛发色泽、稀疏程度,反应敏捷度、舌下络脉等指标;“闻”实验动物叫声是否孱弱、狂躁,大小便及自身气味是否异常等指标;“问”是对动物进行观察,如对患处的舔舐;“切”对应实验动物脉搏、心率、体治疗、腹围等指标^[43]。

4 结论与展望

炎症是 CNV 的核心机制,碱烧伤法与角膜缝线法诱导的炎症性 CNV 模型能够满足当前大部分的科研需求。综合统计数据,优先推荐碱烧伤法诱导的 SD 大鼠 CNV 模型,如果对于角膜临床观察要求较高则可以选择角膜缝线法及新西兰兔。指标的选择需要依据研究方向:CNV 的生长情况、角膜组织病理检测及 VEGF 为首选指标,推荐全部选取;VEGFR2、FGF-2、Scg3、PEDF、CD31 等新生血管调控相关指标为重要指标,根据前期实验或假设猜想优先选取;其余指标择需选取。指标检测方法包括 ELISA、IHC、Western blot、RT-PCR、Real-time PCR 等。

《银海精微》^[44]记载密蒙花“味甘入肝经。去目中赤脉眵泪,能明目”,表明密蒙花的抗血管生成作用;《本草纲目》^[45]记载杏仁“同古钱埋之,化水,点目中赤脉”;《本草汇言》^[46]记载“用白豆仁……目中赤脉白翳,不因于暴病寒风,而因于久眼血虚血热者,皆不可犯”,说明白豆蔻可治疗血虚血热型新生血管;《得配本草》^[47]记载玄精石“得生甘草,治目中赤脉”;《原机启微》^[48]记载处方龙脑黄连膏,主治“目中赤脉如火,溜热炙人,眼眶破烂,畏日羞明,眵多眵燥”。这些单味中药或中药复方配伍,说明中医药对 CNV 有着直观的治疗作用。黑睛属肝,凡清肝、疏肝、平肝之药皆可退翳。除上述古籍记载对 CNV 有治疗效果的单药或处方外,还有许多从药性分析上判断对 CNV 有效的中药,如鲜车前草,性味甘寒,可入肝经,《普济方》^[49]记载“用车前草自然汁,调朴硝末,卧时涂眼胞上,明早水洗去”可治一切眼疾。综上说明中医药在 CNV 的治疗方面有着巨大的发展潜力和发展空间,因此探索构建中医药病证结合的动物模型也是目前 CNV 模型发展的重要方向。动物模型的发展完善一定是以服务临床为导向的,能够稳定复制与人 CNV 临床疾病特点相符的角膜新生血管模型是研究的最终目的。

本文通过对 CNV 实验研究文献学习整理,总结

了当前CNV模型的应用特点,旨在为完善CNV模型进而推动临床CNV发展提供文献依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] AL-DEBASI T, AL-BEKAIRY A, AL-KATHERI A, et al. Topical versus subconjunctival anti-vascular endothelial growth factor therapy (bevacizumab, ranibizumab and aflibercept) for treatment of corneal neovascularization [J]. *Saudi J Ophthalmol*, 2017, 31(2):99-105.
- [2] CHANG J H, GARG N K, LUNDE E, et al. Corneal neovascularization: An anti-vegf therapy review [J]. *Surv Ophthalmol*, 2012, 57(5):415-429.
- [3] CHEN M, BAO L, ZHAO M, et al. Progress in research on the role of fgf in the formation and treatment of corneal neovascularization [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:111.
- [4] SHARIF Z, SHARIF W. Corneal neovascularization: Updates on pathophysiology, investigations & management [J]. *Rom J Ophthalmol*, 2019, 63(1):15-22.
- [5] 杜立群,孙嘉璋,米丰花,等. 缝线法构建兔角膜新生血管模型[J]. *解剖学报*, 2021, 52(4):657-661.
- [6] DU L L, LIU P. CXCL12/CXCR4 axis regulates neovascularization and lymphangiogenesis in sutured corneas in mice [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(6):4987-4994.
- [7] 杜玲玲,杜海涛,刘平. CXCL12/CXCR4轴调节小鼠角膜新生血管的实验研究[J]. *眼科*, 2018, 27(6):414-418.
- [8] 吴伟,李朝阳,王智崇,等. 小牛血去蛋白提取物与重组人表皮生长因子促进兔角膜上皮损伤愈合和血管新生[J]. *眼科新进展*, 2014, 34(5):401-404.
- [9] 石蕊,薛雨顺,杨乐,等. 地塞米松对兔角膜新生血管组织中IL-1 β 及TNF- α 表达的影响[J]. *国际眼科杂志*, 2014, 14(9):1574-1577.
- [10] 李雪,曹浪,甘敏,等. MiR-200b通过调控PIK3CA/Akt通路抑制大鼠角膜血管新生[J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(4):407-413.
- [11] 张帆,吴京,陈林江,等. 雷珠单抗对角膜新生血管的抑制作用以及对血管生成相关miRNAs表达的影响[J]. *眼科新进展*, 2020, 40(11):1010-1014.
- [12] 葛君玺,秦格,谢逸轩,等. 基于数据挖掘的慢性萎缩性胃炎动物模型应用分析[J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34(6):818-823.
- [13] 王萍,方晓艳,苗明三. 基于数据挖掘的便秘动物模型应用分析[J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(7):49-54.
- [14] 傅仁宇. 审视瑶函[M]. 上海:上海卫生出版社, 1958:296.
- [15] 彭清华,谢学军,肖家翔,等. 中医眼科学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2016:266.
- [16] 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[J]. *国际眼科杂志*, 2015, 15(11):1892-1895.
- [17] LIU X, WANG S, WANG X, et al. Recent drug therapies for corneal neovascularization [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2017, 90(5):653-664.
- [18] 周小军. DATS对缝线诱导的大鼠角膜新生血管的影响及机制研究[J]. *国际眼科杂志*, 2017, 17(11):2015-2018.
- [19] SU W, SUN S, TIAN B, et al. Efficacious, safe, and stable inhibition of corneal neovascularization by AAV-vectored anti-VEGF therapeutics [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 22:107-121.
- [20] WOLF M, CLAY S M, ZHENG S, et al. MMP12 Inhibits corneal neovascularization and inflammation through regulation of CCL2 [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):11579.
- [21] 钟一声,朱益华,王方,等. 新生血管性眼病[M]. 北京:人民军医出版社, 2006:458.
- [22] YI K, YANG Y, YUAN Y, et al. Impaired autophagy causes severe corneal neovascularization [J]. *Cells*, 2022, 11(23):3895.
- [23] OHNO-MATSUI K, MORITA I, TOMBRAN-TINK J, et al. Novel mechanism for age-related macular degeneration: An equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF [J]. *J Cell Physiol*, 2001, 189(3):323-333.
- [24] LI W, WEBSTER K A, LEBLANC M E, et al. Secretogranin III: A diabetic retinopathy-selective angiogenic factor [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(4):635-647.
- [25] ZHONG W, MONTANA M, SANTOSA S M, et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis in corneal transplantation-A review [J]. *Surv Ophthalmol*, 2018, 63(4):453-479.
- [26] 靳荷,杨彬彬,蒋冬冬,等. 分泌粒蛋白III(Scg3)抗体对角膜新生血管的抑制作用[J]. *眼科新进展*, 2022, 42(9):680-684.
- [27] MATSUI T, NISHINO Y, MAEDA S, et al. PEDF-derived peptide inhibits corneal angiogenesis by suppressing VEGF expression [J]. *Microvasc Res*, 2012, 84(1):105-108.
- [28] ZHAO J X, YANG L P, WANG Y F, et al.

- Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in rat brain after implantation of 9L rat glioma cells [J]. *Eur J Neurol*, 2007, 14(5): 510-516.
- [29] 范瑞明, 祁学章, 龚磊, 等. Celecoxib对糖尿病大鼠缺血再灌注脑组织 ICAM-1 和 MMP9 表达及神经功能的影响 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2012, 29(7): 589-592.
- [30] SAMOLOV B, STEEN B, SEREGARD S, et al. Delayed inflammation-associated corneal neovascularization in MMP-2-deficient mice [J]. *Exp Eye Res*, 2005, 80(2): 159-166.
- [31] CASSINI-VIEIRA P, ARAÚJO F A, DA COSTA DIAS F L, et al. iNOS activity modulates inflammation, angiogenesis, and tissue fibrosis in polyether-polyurethane synthetic implants [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 138461.
- [32] 徐家窃, 刘红山, 郑海生, 等. 双氢青蒿素通过 ERK12 和 p38 途径抑制缝合诱导的大鼠角膜新生血管形成 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(4): 916-919.
- [33] ZHANG C, YIN Y, ZHAO J, et al. An update on novel ocular nanosystems with possible benefits in the treatment of corneal neovascularization [J]. *Int J Nanomedicine*, 2022, 17: 4911-4931.
- [34] KLETTNER A, ROIDER J. Treating age-related macular degeneration-interaction of VEGF-antagonists with their target [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2009, 9(9): 1127-1135.
- [35] 沈旻倩, 袁非, 靳婧, 等. CXCR7 在碱烧伤小鼠角膜组织中的表达 [J]. *中国临床医学*, 2013, 20(4): 465-468.
- [36] ROUSSEAU S, HOULE F, KOTANIDES H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) -driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(14): 10661-10672.
- [37] TORRECILLA J, DEL POZO-RODRÍGUEZ A, VICENTE-PASCUAL M, et al. Targeting corneal inflammation by gene therapy: Emerging strategies for keratitis [J]. *Exp Eye Res*, 2018, 176: 130-140.
- [38] 曹浪, 李雪, 周善璧, 等. miRNA-424(322)-5p 通过激活 Raf/MEK/ERK 通路促进大鼠角膜新生血管形成 [J]. *第三军医大学学报*, 2021, 43(17): 1650-1657.
- [39] 王杨, 杨燕宁, 潘玉苗, 等. MiR-497 对角膜新生血管的抑制作用及其靶向 STAT3 调控机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2023, 41(3): 206-216.
- [40] CAO X, WANG C, DENG Z, et al. Efficient ocular delivery of siRNA via pH-sensitive vehicles for corneal neovascularization inhibition [J]. *Int J Pharm X*, 2023, 5: 100183.
- [41] 庄家圆, 王方, 邓杰, 等. 葛根退赤汤对碱烧伤诱导 SD 大鼠角膜新生血管的抑制作用 [J]. *中国医药科学*, 2021, 11(1): 38-42.
- [42] 沈志华, 左志琴, 刘军. 密蒙花对小鼠碱烧伤角膜新生血管内皮生长因子表达的影响 [J]. *中国中医眼科杂志*, 2016, 26(3): 161-165.
- [43] 苗明三, 马林纳, 彭孟凡, 等. 中医药动物模型研究现状 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(1): 141-146.
- [44] 孙思邈. 银海精微中医眼科 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1956: 27.
- [45] 李时珍. 本草纲目 [M]. 汕头: 汕头大学出版社, 2018: 554.
- [46] 倪朱谟, 郑金生, 甄雪燕, 等. 本草汇言 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2005: 783.
- [47] 严洁, 施雯, 洪炜. 得配本草 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997: 12.
- [48] 倪维德, 吴少祯. 原机启微 [M]. 北京: 中国医药科学技术出版社, 2021: 11.
- [49] 朱橐. 普济方 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1960.

[责任编辑 孙丛丛]