【基础研究】

原肌球蛋白受体激酶 a 受体阻断剂 K252a 抑制角膜新生血管的形成的作用机制研究

凌受良，董　焱，雷曼丽，王小芳
（爱尔眼科医院角膜病科，广东深圳 512002）

摘要：目的 探讨原肌球蛋白受体激酶 a（atropomyosin receptor kinase a，TrkA）受体阻断剂 K252a 对角膜碱烧伤后的大鼠新生血管生成的抑制作用及相关机制。**方法** 选取 60 只 SD 大鼠制备角膜碱烧伤动物模型，随机均分为 A、B、C 及 D 组，分别给予 50、100 及 200 nmol/L 的 K252a 滴眼液和生理盐水滴眼，一日 2 次，连续 14 d。于碱烧伤后 D3、7 和 14，观察角膜新生血管（corneal neovascularization，CNV）生长情况；酶联免疫吸附试验法检测角膜组织中肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）-α 蛋白；免疫印迹法检测神经生长因子（nerve growth factor，NGF）/ 胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinase，ERK）/ 血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）蛋白表达水平；碱烧伤后 D14 观察各组角膜组织形态学变化。**结果** 碱烧伤后 D3、7 及 14，D 组的 CNV 长度和面积均大于其他 3 组（$P < 0.05$），D 组的 TNF-α 蛋白表达水平高于其他 3 组（$P < 0.05$）；D 组的 NGF、p-ERK 及 VEGF 蛋白表达水平均高于其他 3 组（$P < 0.05$），A ～ C 组呈剂量依赖性逐渐下降趋势。D 组大鼠角膜上皮层变薄，新生血管管腔较密集，大量炎性细胞浸润，基质层可见大量新生血管形成并充满红细胞；A ～ C 组角膜组织病理较 D 组改善，C 组优于 A 和 B 组。**结论** TrkA 受体阻断剂 K252a 可减少碱烧伤引起的 CNV 形成，降低炎症因子水平，可能与其抑制 NGF 表达及 ERK-VEGF 通路激活有关。

关键词：角膜新生血管；原肌球蛋白受体激酶 a 受体阻断剂 K252a；碱烧伤；分子机制
中图分类号：R772.2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9188（2023）04-0317-07
DOI：10.13683/j.wph.2023.04.004

Inhibitory mechanism of atropomyosin receptor kinase a receptor blocker K252a on corneal neovascularization

LING Shouliang, DONG Yan, LEI Manli, WANG Xiaofang
（*Department of Keratology, Aier Eye Hospital, Shenzhen 512002, Guangdong Province, China*）

Abstract: ***Objective*** To investigate the inhibitory effect of tropomyosin receptor kinase a（TrkA） receptor blocker K252a on corneal neovascularization in rats after alkali burn and its related mechanism. ***Methods*** Sixty SD rats were selected to establish the corneal alkali burn model. They were randomly divided into four groups, A, B, C, and D, which were given 50, 100, and 200 nmol/L K252a eye drops and physiological saline eye drops, respectively, twice a day for 14 consecutive days. Corneal neovascularization（CNV） was observed at D3, 7, and 14 after alkali burn. Tumor necrosis factor（TNF）-α in corneal tissue was detected by ELISA. The protein expression levels of nerve growth factor（NGF), extracellular signal-regulated kinase（ERK）, and vascular endothelial growth factor（VEGF) were detected by western blotting. The morphological changes of corneal tissue in each group were observed on D14 after alkali burn. ***Results*** At D3, 7, and 14 after alkali burn, the length and area of CNV in group D were larger than those in the other three groups（$P<0.05$）. The level of TNF-α protein in group D was higher than that in other three groups（$P<0.05$）. The protein expressions of NGF, p-ERK and

收稿日期：2022-01-17；**修回日期：**2023-03-24
作者简介：凌受良，副主任医师，研究方向：角膜疾病的临床治疗。
基金项目：湖南省科技创新计划项目（2017SK50906）

VEGF in group D were higher than those in the other three groups ($P<0.05$), and the group A to group C showed a dose-dependent decreasing trend. In group D, the upper corneal cortex was thinner, the lumen of neovascularization was dense, a large number of inflammatory cells were infiltrated, and a large number of neovascularization was formed and filled with red blood cells in the stroma layer. The corneal histopathology in group A to group C was better than that in group D, and group C was better than in group A and B. ***Conclusion*** TrkA receptor blocker K252a can reduce the formation of CNV and the level of inflammatory cytokines induced by alkali burn, which may be related to the inhibition of NGF expression and the activation of ERK-VEGF pathway.

Key words: corneal neovascularization; atropomyosin receptor kinase a receptor blocker K252a; Alkali burn; molecular mechanism

角膜新生血管（corneal neovascularization，CNV）不是一种独立的角膜疾病，而是一种病理改变，感染、缺氧、炎性疾病、角膜物理损伤以及化学损伤等均可引起新生血管入侵角膜[1]。目前关于CNV的病因和发病机制尚不明确，一般认为新生血管刺激因子的过度表达与抑制因子的不足是其发生的基础[2]。有研究表明，原肌球蛋白受体激酶a（atropomyosin receptor kinase a，TrkA）受体阻断剂K252a是蛋白激酶的抑制剂，其能阻断神经生长因子（nerve growth factor，NGF）与血管内皮细胞表面的高亲和TrkA结合，进而抑制新生血管刺激因子的过度表达[3]。此外，关于NGF和抗血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）促进血管生成的作用也倍受科研工作者的关注[4—6]。NGF可刺激促进内皮细胞的增殖迁移，还促进胞外基质的重塑以及加速新生血管成熟，且在一些病理条件如心血管疾病和肿瘤中同样发挥重要的促血管生长作用[7]。VEGF在CNV形成中的重要作用亦得到证实[8—9]，但有关NGF与VEGF的相互关系在角膜新生血管病变中的作用机制尚不明确。故本研究采用不同浓度的K252a滴眼，观察大鼠角膜碱烧伤后CNV的生成和抑制情况，并检测K252a对大鼠角膜组织中NGF、胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinase，ERK）以及VEGF蛋白表达的影响，进而探讨K252a抑制角膜碱烧伤后新生血管生成分子机制与ERK信号途径的关联性，为新药研发和该病治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠60只，雌雄不限，6～8周龄，体质量为200～250 g，由动物实验中心提供，SCXK（粤）2020-0055，SYXK（粤）2020-0242，实验前常规裂隙灯检查，排除眼前节病变。常规饲料分笼饲养，温度在18～25 ℃，相对湿度40%～70%，自然昼夜光线，通风良好。

1.2 仪器和试剂

妥布霉素滴眼液（8 ml∶24 mg，20190322，江苏祥瑞药业有限公司），1%戊巴比妥钠（沃凯国药集团化学试剂公司），盐酸奥布卡因滴眼液（0.5 ml∶2.0 mg，20190617，山东博士伦福瑞达制药有限公司），TrkA阻断剂K252a（美国Peprotech公司），酶联免疫吸附试验法（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（北京中杉金桥生物技术有限公司），苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色试剂（北京中杉金桥生物技术有限公司），免疫印迹NGF、VEGF、ERK、磷酸化ERK（phosphorylated ERK，p-ERK）一抗和山羊抗兔IgG二抗（cell signaling technology公司），蛋白提取试剂盒KGP2100，上海臻诺生物科技有限公司），Trizol蛋白裂解液（100 ml，LGTQ-001-X，广州蓝吉生物技术有限公司），离心机（LX-100，江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司），BCA蛋白检测试剂盒（赛默飞世尔科技），光学显微镜（CX31，上海普赫生物科技有限公司），裂隙灯显微镜数字图像处理系统

[卡尔蔡司（中国）有限公司]。

1.3 模型建立与分组

所有大鼠随机分为 A、B、C 及 D 组，每组 15 只，均建立角膜碱烧伤模型，建立模型前予所有大鼠双眼滴 3 g/L 妥布霉素滴眼液，一日 2 次，持续 3 d 后，使用裂隙灯检查双眼排除眼部病变。根据大鼠体质量使用 1% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 进行腹腔注射麻醉，4 g/L 盐酸奥布卡因滴眼液麻醉眼表。将直径 3 mm 的圆形滤纸在 1 mol/L 氢氧化钠溶液充分浸润，25 s 后取出，放在干燥的滤纸上 1 s，蘸去多余碱溶液。在手术显微镜下，将滤纸片置于大鼠角膜中央烧灼 40 s。烧灼后，用生理盐水清洁角膜和穹隆，去除残留的化学物质，角膜上皮混浊明显，基质水肿，隐约看见虹膜即为角膜碱烧伤模型建立成功。建模成功当天给予 A（50 nmol/L）、B（100 nmol/L）及 C 组（200 nmol/L）不同剂量 K252a 20 μl 滴眼干预，D 组大鼠给予生理盐水滴眼，一日 2 次，连续 14 d。

1.4 标本采集

于碱烧伤后 D3、7，每组随机选取 5 只大鼠通过颈椎脱臼处死，摘取角膜组织，−80 ℃冻存，用于后续试验；碱烧伤后 D14，按上述操作处死各组剩余大鼠，摘取角膜组织，沿血管生长大致均分为 2 份，1 份固定于 4% 多聚甲醛溶液中用于 HE 染色，1 份冻存用于后续试验。

1.5 观察指标

1.5.1 碱烧伤后各组大鼠角膜情况

分别于碱烧伤后 D3、7、14，腹腔注射氯胺酮与氯丙嗪（1 ∶ 1）混合液诱导麻醉，裂隙灯下观察 4 组所有大鼠角膜上皮缺损和角膜新生血管情况等，并测量 CNV 长度。参照文献 [10] 方法，计算 CNV 面积（A），$A = C/12 \times 3.1416[R^2 - (R - I)^2]$，C 为 CNA 累及角膜的时钟点数，I 为 CNA 从角膜缘深入角膜的长度，R 为角膜半径。

1.5.2 碱烧伤后各组大鼠角膜病理组织变化

取碱烧伤后 D14，固定于 4% 多聚甲醛溶液中的角膜组织用梯度酒精（75% ～ 100%）进行组织脱水，用二甲苯透明结束后，包埋成蜡块后切成厚度为 5 μm 的均匀薄片，按 HE 染色试剂盒进行染色、脱水、透明封片等操作，静置 12 h 后，水平放在光学显微镜下观察各组大鼠角膜病理组织变化。

1.5.3 ELISA 检测角膜组织中肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）-α 蛋白含量

取碱烧伤后 D3、7 及 14 的大鼠角膜组织匀浆处理，使用蛋白提取试剂盒提取组织总蛋白，根据 ELISA 试剂盒测定角膜组织中 TNF-α 蛋白含量，严格按照操作试剂盒说明书进行检测。

1.5.4 免疫印迹法检测角膜组织中 NGF/ERK/VEGF 蛋白相对表达

取碱烧伤后 D3、7 及 14 的大鼠角膜组织处理，采用 Trizol 法提取组织总蛋白，用 BCA 试剂盒检测样品蛋白浓度。将蛋白样品加入上样缓冲液，混匀后煮沸 10 min，恢复至室温后离心，配置 8% 分离胶，在分离胶上面距顶端 3 cm 处加入浓缩胶，加入上述蛋白样品后，进行凝胶电泳，结束后转至硝酸纤维素膜，脱脂奶粉室温封闭 2 h，加入 NGF/ERK/VEGF 蛋白一抗 4 ℃孵育过夜，洗膜后加入山羊抗兔 IgG 二抗，室温孵育 2 h，PBST 漂洗 3 次后采用化学发光法进行显色，并用 Image-J 软件分析各组蛋白相对表达。

1.6 统计学方法

采用 SPSS20.0 处理数据，计量资料结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，检验水准 $\alpha = 0.05$；组间两两比较采用 *LSD* 检验，检验水准 $\alpha = 0.008\,3$。

2 结果

2.1 碱烧伤后各组大鼠角膜情况

碱烧伤后 D3，A ～ C 组大鼠角巩膜缘血管扩张，未见明显新生血管生长；D 组角膜浅基质层轻中度混浊，可见新生血管出芽，由周边角膜缘向角膜中间蔓延，血管生长致密，相互交叉成网。

碱烧伤后 D7，A ～ C 组大鼠新生血管管径细小，多集中于角膜缘且生长缓慢；C 组较 A、B 组新生血

管少；D 组水肿明显，新生血管生长旺盛，血管显著变长、变粗，并在顶端出现分叉，虹膜上遍布呈刷状的血管。

碱烧伤后 D14，A ～ C 组大鼠血管床附近细小血管基本退化，分布局限且稀疏；C 组新生血管的生长范围、数量及长度均较 A、B 组轻；D 组 CNV 呈垂柳状全部长入碱烧伤瘢，粗大致密，全角膜呈白色混浊，见图 1。

2.2 碱烧伤后各组大鼠 CNV 长度及面积比较

碱烧伤后 D3、7 及 14，A ～ C 组大鼠的 CNV 长度均小于 D 组；碱烧伤后 D3，C 组大鼠的 CNV 长度均小于其他各组；碱烧伤后 D7 和 D14，C 组大鼠的 CNV 长度均小于 A 组，差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。

碱烧伤后 D3，C 组大鼠的 CNV 面积小于其他各组；碱烧伤后 D7 和 D14，A ～ C 组的 CNV 面积均小于 D 组，且 C 组的 CNV 面积小于 A 组，差异均有统计学意义（$P < 0.05$）；其余时间各组之间的 CNV 长度及面积均无统计学差异（$P > 0.05$），见表 1。

2.3 碱烧伤后 D14 各组大鼠角膜病理组织变化

碱烧伤后 D14，A 组可见角膜基质增厚，结构紊乱，新生血管管腔较密集，管腔内可见红细胞附着，炎性细胞浸润；B 组可见角膜基质层结构较整齐，仍见少量新生血管芽，上皮层炎性细胞浸润；C 组可见角膜基质层结构整齐，无明显新生血管生成，上皮层少量炎性细胞浸润；D 组可见角膜上皮层变薄，大量炎性细胞浸润，基质层可见大量新生血管形成并充满红细胞，见图 2。

2.4 ELISA 法测定角膜组织中 TNF-α 蛋白含量

碱烧伤后 D3、7 及 14，D 组角膜组织中 TNF-α 蛋白表达水平均高于 A ～ C 组，差异均有统计学意义（$P < 0.05$）；C 组角膜中 TNF-α 蛋白表达水平低于 A 组，差异有统计学意义（$P < 0.05$）；碱烧伤后 D14，B 组角膜中 TNF-α 蛋白表达水平低于 A 组，差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。见表 2。

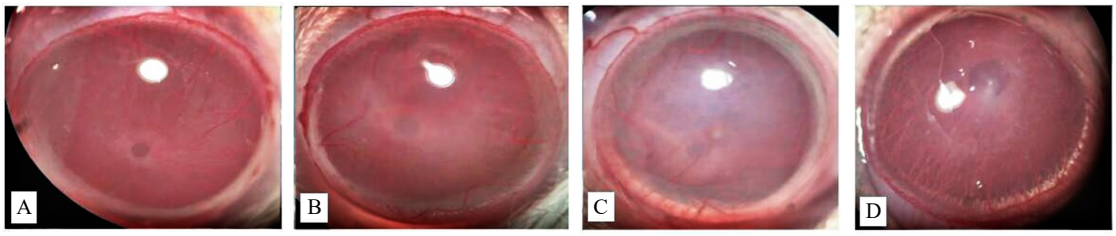


图 1 碱烧伤后 D14 各组大鼠 CNV 情况

Figure 1 CNV of each group at 14 days after alkali burn

表 1 碱烧伤后不同时间各组大鼠 CNV 长度及面积比较（$n = 15$）

Table 1 Comparison of the length and area of CNV in each group at different time after alkali burn ($n=15$)

项目		A组	B组	C组	D组	F值	P值
CNV长度/mm	D3	1.0±0.1*	0.9±0.1*	0.7±0.1*#△	1.2±0.2	37.143	＜0.001
	D7	1.2±0.2*	1.1±0.2*	0.9±0.2*#	1.5±0.3	17.857	＜0.001
	D14	1.5±0.2*	1.3±0.3*	1.1±0.2*#	2.1±0.5	26.667	＜0.001
CNV面积/mm^2	D3	15.7±2.1	15.0±2.2	11.5±1.6*#△	16.9±1.8	21.458	＜0.001
	D7	17.2±1.9*	16.4±1.7*	14.8±2.3*#	21.0±2.7	21.751	＜0.001
	D14	20.3±2.8*	18.6±2.5*	16.1±2.0*#	23.2±3.9	16.030	＜0.001

注：与 D 组比较，*$P < 0.008\ 3$；与 A 组比较，#$P < 0.008\ 3$；与 B 组比较，△$P < 0.008\ 3$。

Note: *vs* group D, *$P < 0.008\ 3$; *vs* group A, #$P < 0.008\ 3$; *vs* group B, △$P < 0.008\ 3$.

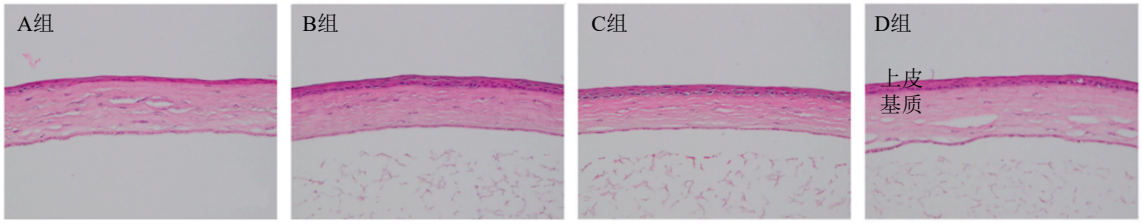


图 2　碱烧伤后 D14 各组大鼠角膜组织染色结果（HE×400）
Figure 2　Staining results of corneal tissue in each group D14 after alkali burn（HE×400）

表 2　碱烧伤后不同时间各组大鼠角膜组织中 TNF-α 蛋白含量（μg/g，n = 5）
Table 2　different time after alkali burn each rat corneal tissue TNF- protein content（μg/g，n=5）

时间	A组	B组	C组	D组	F值	P值
D3	60.4±4.3*	58.7±5.1*	53.9±4.8*#	70.2±4.6	10.906	<0.001
D7	55.7±3.2*	50.4±4.0*	49.8±3.5*#	61.3±3.4	11.511	<0.001
D14	42.7±3.1*	35.6±2.9*#	33.1±2.3*#	51.2±2.8	42.378	<0.001

注：与 D 组比较，*P < 0.008 3；与 A 组比较，#P < 0.008 3。
Note: *vs* group D, *P < 0.008 3; *vs* group A, #P < 0.008 3.

2.5　角膜组织中 NGF/ERK/VEGF 蛋白相对表达

与 D 组比较，NGF、p-ERK 和 VEGF 蛋白表达水平均高于 A-C 组，差异均有统计学意义（P < 0.05），但 ERK 蛋白表达水平在各组大鼠角膜组织中无明显变化；A-C 组中 NGF、p-ERK 和 VEGF 蛋白表达水平均呈下降趋势，差异均有统计学意义（P < 0.05）。见图 3、4。

3　讨论

角膜的透明及无血管状态是保持最佳视觉所必需的生理基础。感染、化学及机械损伤等因素均会导致角膜发生病理性改变，毛细血管从角膜缘入侵进而形成 CNV，降低角膜透明度并影响视力[11]。全球约有 140 万 / 年角膜疾病患者发生新生血管，其中约 12% 的患者丧失视力[10]。寻求有效防治 CNV 的药物并了解其作用机制，是眼科学者一直关注的

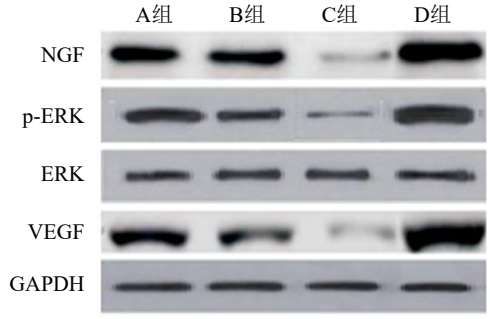
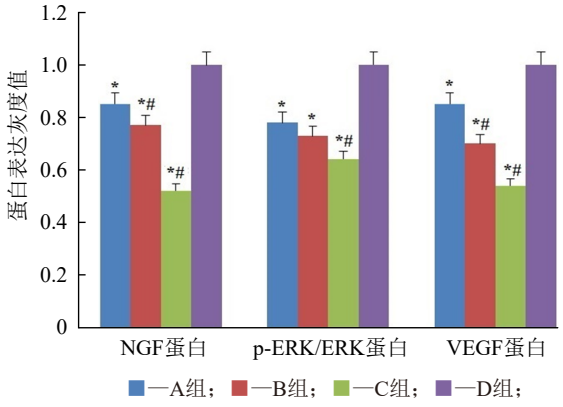


图 3　免疫印迹实验检测角膜组织中 NGF/ERK/VEGF 蛋白表达的条带图
Figure 3　Strip pattern of protein expression of NGF/ERK/VEGF in corneal tissue was detected by western blotting



注：与 D 组比较，*P < 0.008 3；与 A 组比较，#P < 0.008 3。
Note: *vs* group D, *P < 0.008 3; *vs* group A, #P < 0.008 3.

图 4　各组角膜组织中 NGF/ERK/VEGF 蛋白表达灰度值
Figure 4　Grayscale values of NGF/ERK/VEGF protein expression in corneal tissues of each group

热点。研究表明，K252a 与 TrkA 特异性结合后阻断 NGF 与 TrkA 受体的结合，使细胞内信号传导途径无法启动从而抑制神经生长因子促进视网膜血管内皮细胞的增殖能力[12]。Retamales 等[13]研究表明，NGF 通过其内皮细胞上的 TrkA 受体和间接诱导血管内皮生长因子的表达，促进血管生成。Romero 等[14]对上皮性卵巢癌研究，结果显示，恶性肿瘤细胞通过自分泌 NGF 促进 TrkA 受体磷酸化后，其 VEGF 表达上调，且 VEGF 与 TrkA 明显共表达，提示 NGF 不仅作为直接的生血管因子还可活化 TrkA 受体上调 VEGF 表达后促进肿瘤血管生成。VEGF 是目前已知功能最强的新生血管形成促进因子，正常角膜组织中仅有微量 VEGF 表达，当角膜受到炎症或创伤后，VEGF 的表达量显著增加[15]。此外，有研究显示，CNV 的形成与 VEGF 的过度表达密切相关，角膜损伤所致 CNV 与 VEGF 的表达呈正相关[16]。本研究通过在使用不同浓度的 K252a 后，大鼠模型的 CNV 出现不同程度的抑制，且 K252a 随着浓度的升高，其抗新生血管生成的作用逐渐增强。

TNF-α 是参与炎症、免疫及肿瘤进展等关键细胞因子，既往研究表明，在动物试验中，通过玻璃体腔注射或角膜内植入病理浓度的 TNF-α 可诱导碱烧伤 CNV 的形成[17]。本研究结果表明，K252a 可能通过滴眼降低眼内 TNF-α 蛋白水平来抑制碱烧伤产生的角膜新生血管。另近年较多研究报道，NGF 能够作用于血管内皮细胞促进新生血管形成，指出血管内皮细胞在产生、释放 NGF 的同时可表达 NGF 的高亲和受体 TrkA 及低亲和 P75 神经营养因子受体，NGF 需先与细胞表面 TrkA 受体结合，然后启动细胞内信号转导途径才能促进血管内皮细胞的增殖[15,18]。有研究显示，在各种不同组织中，NGF 可能通过活化 TrkA 受体促进血管内皮细胞增殖，发挥较强的促血管生成效应[19]。VEGF 是强血管生长因子，可增强血管渗透性和蛋白酶的活性，促进新生血管形成[20]。此外，ERK 是细胞外信号调节激酶，其激活后进入胞核可促进部分基因的转录表达，调控细胞增殖，且能够降低 VEGF、基质金属蛋白酶 9 表达及其信号传导，有效抑制血管的侵袭生长[21]。研究证实，VEGF 与其受体 2 结合，激活 ERK，可刺激血管内皮细胞增殖，促进血管生长[22]。本研究通过 K252a 处理的 A ～ C 组角膜组织中 NGF，p-ERK 和 VEGF 蛋白表达水平较 D 组明显降低，可能是 K252a 特异性结合 TrkA，抑制 NGF 表达，进而通过抑制血管内皮细胞增殖来抑制角膜新生血管生成；也可能是 K252a 通过减少 VEGF 的合成分泌，抑制 ERK-VEGF 通路激活，抑制角膜新生血管生成。本研究还存在一定的局限性，TrkA 受体阻断剂 K252a 在细胞试验中抑制血管生成的效果是否与体内试验一致，干预 TrkA 位点通过调控 NGF 及 ERK-VEGF 通路抑制角膜新生血管生成的机制，后期仍需更深入的研究行进一步的验证阐明。

4 结论

综上所述，TrkA 受体阻断剂 K252a 可以减少碱烧伤引起的 CNV 形成，降低炎症因子水平，其可能的作用机制与 K252a 抑制 NGF 及 TrkA/ERK/VEGF 通路激活有关，为新药研发和临床防治 CNV 提供了新的思路。

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] Han KY, Tran JA, Chang JH, *et al*. Potential role of corneal epithelial cell-derived exosomes in corneal wound healing and neovascularization[J]. Sci Rep, 2017, 7: 40548.

[3] Lecht S, Arien-Zakay H, Kohan M, *et al*. Angiostatic effects of K252a, a Trk inhibitor, in murine brain capillary endothelial cells[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 339(2): 201-213.

[4] Wheeler E F, Bothwell M. Spatiotemporal patterns of expression of NGF and the low-affinity NGF receptor in rat embryos suggest functional roles in tissue morphogenesis and myogenesis[J]. J Neurosci, 1992, 12(3): 930-945.

[5] Park MJ, Kwak HJ, Lee HC, *et al*. Nerve growth factor

induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and AP-2 transcription factor[J]. J Biol Chem, 2007, 282(42): 30485-30496.

[6] Loges S, Mazzone M, Hohensinner P, *et al*. Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited[J]. Cancer Cell, 2009, 15(3): 167-170.

[7] Li X, Li F, Ling L, *et al*. Intranasal administration of nerve growth factor promotes angiogenesis via activation of PI3K/Akt signaling following cerebral infarction in rats[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(11): 3481-3492.

[8] Altan S, Sağsöz H, Oğurtan Z. Topical dimethyl sulfoxide inhibits corneal neovascularization and stimulates corneal repair in rabbits following acid burn[J]. Biotech Histochem, 2017, 92(8): 619-636.

[9] 张慧, 单伟. 阿柏西普对碱烧伤大鼠角膜新生血管的抑制作用[J]. 眼科新进展, 2020, 40(2): 120-124.

[10] D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, *et al*. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(9): 4082-4085.

[11] 张海萍, 迟玮, 华夏. 角膜新生血管的治疗进展[J]. 国际眼科纵览, 2019, 43(5): 5.

[12] Cakmak H, Gokmen E, Bozkurt G, *et al*. Effects of sunitinib and bevacizumab on VEGF and miRNA levels on corneal neovascularization[J]. Cutan Ocul Toxicol, 2018, 37(2): 191-195.

[13] Retamales-Ortega R, Oróstica L, Vera C, *et al*. Role of nerve growth factorNGF) and miRNAs in epithelial ovarian cancer[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): 507.

[14] Romero C, Lobos L, Hurtado I, *et al*. PO-321 microRNA-145 and COX2 levels are regulated by nerve growth factor(NGF) in epithelial ovarian cancer[C]. Abstracts of the 25th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, Amsterdam, The Netherlands, 2018.

[15] 王丁丁, 于强, 陈子林, 等. 神经生长因子对人视网膜血管内皮细胞的影响[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2010, 31(1): 45-49.

[16] 陈文君, 杜艳, 张杰. VEGF抑制剂不同给药方案对角膜新生血管患者眼压、病变面积及安全性的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(1): 51-54.

[17] 吕航, 王启常, 唐罗生. 神经生长因子玻璃体腔注射对早期糖尿病大鼠视网膜神经节细胞的保护作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(6): 425-431.

[18] Lazarovici P, Lahiani A, Gincberg G, *et al*. Nerve growth factor-induced angiogenesis: 1. endothelial cell tube formation assay[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1727: 239-250.

[19] Ahluwalia A, Jones MK, Hoa N, *et al*. Reduced NGF in gastric endothelial cells is one of the main causes of impaired angiogenesis in aging gastric mucosa[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2018, 6(2): 199-213.

[20] Loges S, Mazzone M, Hohensinner P, *et al*. Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited[J]. Cancer Cell, 2009, 15(3): 167-170.

[21] 宋宇可, 叶利群, 黄钟威, 等. 滋肾活血方联合低分子肝素对血管内皮细胞VEGF、VEGFR-2、ERK和血管生成的影响[J]. 中国现代医生, 2022, 60(3): 59-62.

[22] 张雨婷, 汪亦君, 夏沛, 等. CRIM1通过激活ERK1/2-VEGF信号通路促进子宫颈鳞状细胞癌微血管生成[J]. 临床与实验病理学杂志, 2020, 36(4): 379-384.

（编辑：沈佳婕）