DOI:10.16016/j.1000-5404.201907085

载 IR780 靶向纳米粒体外荧光成像及光动力诱导大鼠脉络膜血管内皮细胞凋亡的研究

冉一君[1],王梦蕾[1],黎 梦[1],周希瑗[1],曹 阳[2],冉海涛[2,3] 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院:眼科[1],超声科[3];400016 重庆,重庆医科大学超声影像学研究所,超声分子影像重庆市重点实验室[2]

[摘要] **目的** 制备一种新型载 IR780 靶向血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2,VEGFR2)纳米粒(VEGFR2/IR780/PLGA-NPs),体外评价其物理性质、荧光成像能力、对大鼠脉络膜血管内皮细胞(rat choroid vascular endothelial cells,RCVECs)的寻靶能力及光动力治疗(photodynamic therapy,PDT)效果。**方法** 采用超声乳化法制备包载 IR780 的非靶向纳米粒(IR780/PLGA-NPs),运用碳二亚胺法将 VEGFR2 抗体与纳米粒相连接,最终制备出靶向纳米粒(VEGFR2/IR780/PLGA-NPs);检测其基本特性;运用 CCK-8 法检测纳米粒的细胞毒性;定量荧光和生物发光成像系统评价纳米粒的荧光成像能力;激光共聚焦与流式细胞术评价靶向组、非靶向组、抗体封闭组纳米粒体外寻靶能力;单线氧荧光探针(singlet oxygen sensor green reagent,SOSG)评估体外光动力治疗效果;流式细胞仪检测靶向激光组、非靶向激光组、单纯激光组纳米粒介导的光动力诱导 RCVECs 的凋亡比例。**结果** 成功制备出 VEGFR2/IR780/PLGA-NPs,不同显微镜下观察呈球形,大小均匀,粒径(273.23±31.55)nm;电位(-8.85±1.60)mV;IR780 包封率(87.37±2.44)%。荧光成像结果显示:纳米粒浓度越高,其荧光信号强度越强。CCK-8 法检测结果显示纳米粒没有明显的细胞毒性。流式细胞仪检测 VEGFR2 抗体已成功连接于纳米粒,其连接率为(83.60±4.79)%。激光共聚焦观察发现在靶向组中 RCVECs 周围的纳米粒明显多于非靶向组和抗体封闭组。流式细胞仪检测发现靶向组纳米粒与细胞连接率为(58.13±1.64)%,明显高于非靶向组(20.64±1.89)%和抗体封闭组(15.12±1.16)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。经过激光辐照后,随纳米粒浓度增加,体外活性氧产量逐渐增加,具备良好的 PDT 能力。流式细胞仪检测发现靶向激光组诱导 RCVECs 凋亡的比例为(82.99±0.98)%,明显高于非靶向激光组(30.75±1.81)%和单纯激光组(7.05±0.96)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。证实靶向纳米粒具备更好的 PDT 效果。**结论** 成功制备 VEGFR2/IR780/PLGA-NPs,其在体外具有良好的靶向能力,同时可用于荧光成像以及光动力治疗。

[关键词] 脉膜新生血管;PLGA 纳米粒;血管内皮细胞生长因子受体 2;荧光成像;光动力治疗
[中图法分类号] R944.9; R969.4; R977.6 [文献标志码] A

In vitro imaging of targeting fluorescent IR780 nanoparticles and their mediated photodynamics in rat choroidal endothelial cells

RAN Yijun[1], WANG Menglei[1], LI Meng[1], ZHOU Xiyuan[1], CAO Yang[2], RAN Haitao[2,3] [1]Department of Ophthalmology, [3]Department of Ultrasonography, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Chongqing Key Laboratory of Ultrasound Molecular Imaging, Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To prepare novel IR780-loaded nanoparticles targeting vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), and evaluate their physical properties, fluorescence imaging ability, targeting ability to rat choroidal vascular endothelial cells (RCVECs), and the effects of photodynamic therapy (PDT). **Methods** The non-targeting nanoparticles loaded with IR780 (IR780/PLGA-NPs) were prepared

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81630047,81501487)
[通信作者] 周希瑗,E-mail:zhouxiyuan2002@aliyun.com

by single emulsification. After anti-VEGFR2 antibodies were coupled with nanoparticle by carbodiimide, then the targeting nanoparticles (VEGFR2/IR780/PLGA-NPs) were prepared finally. CCK-8 assay was carried out to detect the cytotoxicity of nanoparticle; Quantitative fluorescence and bioluminescence imaging system was performed to evaluate the fluorescence imaging ability of the nanoparticles *in vitro*. Laser confocal and flow cytometry were employed to evaluate the connectivity and *in vitro* targeting ability of the targeted group, non-targeted group and closed receptor group. The effect of PDT was determined by singlet oxygen sensor green reagent (SOSG); Flow cytometry was applied to detect the percentage of apoptotic RCVECs in the targeted laser group, non-targeted laser group and simple laser irradiated group after nanoparticle-mediated PDT. **Results** The nanoparticles VEGFR2/IR780/PLGA-NPs were successfully prepared, and presented spherical in shape and uniform in size, in a particle size of 273.23±31.55 nm, at a potential of −8.85±1.60 mV, with an encapsulation efficiency of (87.37±2.44)% to IR780. Fluorescence imaging showed that the fluorescence signal intensity was increased with the increment of concentration of the nanoparticles. The result of CCK-8 assay indicated that there was no obvious cytotoxicity of the nanoparticles. Flow cytometry displayed that VEGFR2 antibodies were successfully attached to the nanoparticles, with a ratio of (83.60±4.79)%. Laser confocal microscopy demonstrated that there were more nanoparticles around the RCVECs in the targeted group than the other 2 groups. Flow cytometry also showed that the connectivity of nanoparticles to RCVECs was (58.13±1.64)% in the targeted group, which was significantly higher than that of the non-targeted group [(20.64±1.89)%, $P<0.05$] and the closed receptor group [(15.12±1.16)%, $P<0.05$]. After irradiated with 808 nm laser, the production of reactive oxygen species was gradually increased with the increment of nanoparticles, which means the nanoparticles having good PDT ability. Flow cytometry indicated that the apoptotic rate of RCVECs was (82.99±0.98)% in the targeted laser group, obviously higher than those of the non-targeted laser group [(30.75±1.81)%, $P<0.05$] and the simple laser irradiated group [(7.05±0.96)%, $P<0.05$], suggesting sound PDT effect of the nanoparticles. **Conclusion** The targeting nanoparticles VEGFR2/IR780/PLGA-NPs are successfully prepared. They have good targeting ability *in vitro*, and could be used for fluorescence imaging and PDT.

[**Key words**] choroidal neovascularization; PLGA nanoparticles; vascular endothelial growth factor receptor 2; fluorescence imaging; photodynamic therapy

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81630047, 81501487). Corresponding author: ZHOU Xiyuan, E-mail: zhouxiyuan2002@aliyun.com

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是年龄相关性黄斑变性等多种眼内疾病的基本病理改变[1],而年龄相关性黄斑变性更是世界卫生组织认定的3大致盲性眼病之一[2]。随着我国社会老龄化逐渐加重,CNV已成为影响我国老年人视力的重要危险因素[3]。研究表明,异常生长的CNV,由于血管结构不完整,通透性高,易引发出血,最终形成瘢痕,同时CNV常生长于黄斑,严重影响中心视力[4]。目前临床上针对CNV的常用检查方法有眼底血管造影、光学相干断层扫描等[5],而治疗方法主要为抗VEGF治疗以及光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)[6]。目前抗VEGF药物价格高昂,需每月进行玻璃体腔内注射,多次注射也增加了高眼压、玻璃体出血、眼内感染等并发症的风险[7]。光动力治疗药物价格同样昂贵,而在经过PDT治疗后,其产生的活性氧损伤CNV,诱导血管内皮细胞凋亡,启动凝血,形成血栓[8]。虽然封闭了CNV,但又使脉络膜灌注不足,最终上调VEGF的表达,继发炎症反应[9]导致CNV的复发,而且由于缺乏特异性,也会导致临近视网膜的损伤。因此治疗带来的风险与不便,以及巨大的经济负担,严重困扰着CNV患者。本实验将纳米医学与临床CNV的诊疗手段相结合,制备一种兼具成像诊断与靶向治疗的多功能纳米粒,以求提供一种更加安全高效的诊疗方案。

研究表明在CNV的发展中VEGF/VEGFR2(vascular endothelial growth factor receptor 2)信号通路起到极为关键的作用,其调节并影响新生血管的生成,同时在CNV中,VEGFR2表达也高于正常血管[10]。因此本实验选择VEGFR2作为CNV的治疗靶点。另外

IR780 碘化物是一种新型光敏剂,能在激光的辐照下具备荧光成像能力,并拥有 PDT 效果,同时具备光稳定性好、毒性低等特点[11],因此把 IR780 运用于 CNV 的成像与治疗将拥有巨大的潜力。

本实验研制新型载 IR780 靶向血管内皮生长因子受体 2 纳米粒(VEGFR2/IR780/PLGA-NPs)。通过检测其基本性质,以 RCVECs 为模型,探讨该纳米粒体外诊疗效果,为 CNV 的分子成像与靶向治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

主要试剂:羧基端乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA-COOH,济南岱罡);IR780 碘化物(Sigma 公司);二氯甲烷(成都市科隆化工);异丙醇(重庆东川化工);聚乙烯醇(PVA,Sigma 公司);EDC(Sigma 公司),NHS(Sigma 公司);MES(Sigma 公司);CCK-8 试剂盒(东仁化学有限公司);Dil(碧云天生物公司);Anti-VEGFR2(Abcam 公司),二抗 FITC 标记(博士德生物公司),RCVECs(Procell 公司);RCVECs 完全培养基(Procell 公司);单线氧荧光探针(Singlet oxygen sensor green reagent,SOSG,美国 Thermo Fisher 公司)。

主要仪器:Sonic 声振仪(Sonic),光学显微镜(Olympus IX71),透射电镜(HITACHI),扫描电镜(JEOL JSM-7800F),粒径测量仪(Malvern 公司),流式细胞仪(Beckmancoulter 公司),激光共聚焦显微镜(Nikon 公司),多功能酶标仪(Thermo 公司),808nm 近红外激光仪(西安中川光电公司),定量荧光和生物发光成像系统(IVIS lumina)。

1.2 实验方法

1.2.1 VEGFR2/IR780/PLGA-NPs 的制备及其一般特性 采用超声乳化法制备纳米粒,首先将 50 mg PLGA、2 mg IR780 溶解于 2 mL 二氯甲烷,再加入 8 mL 4% PVA 溶液,用声震仪乳化(5 min,震 5 s 停 5 s)得到绿色乳浊液;加入 10 mL 2%异丙醇;将溶液用磁力搅拌器搅拌 4 h,以挥发其中的二氯甲烷,最后经双蒸水洗涤、离心,得到非靶向纳米粒:IR780/PLGA-NPs。

采用碳二亚胺法连接 VEGFR2 抗体,具体步骤如下[12]:取 200 μL IR780/PLGA-NPs(5 mg/mL),加入适量 MES 缓冲液(0.1 mol/L,pH=5),再加入适量 NHS 和 EDC,4 ℃孵育 4 h,离心洗涤。加入适量 MES 缓冲液(0.1 mol/L,pH=8),然后加入 20 μL VEGFR2 抗体(0.5 mg/mL),4 ℃孵育 4 h,离心洗涤,最终得到靶向纳米粒:VEGFR2/IR780/PLGA-NPs。

运用不同显微镜观察纳米粒的形态及结构;粒径仪检测纳米粒的粒径以及电位分布;多功能酶标仪检测纳米粒吸收光谱。

1.2.2 检测 IR780 的包封率 运用高效液相色谱法,绘制 IR780 的标准曲线,然后通过公式计算包封率[13]:IR780 包封率 = C1/C2×100%;C1 表示包载于 PLGA 纳米粒中的 IR780 含量,C2 表示 IR780 的总量。

1.2.3 细胞培养及细胞毒性实验 在 5% CO_2、37 ℃培养箱中用 RCVECs 完全培养基(10%胎牛血清、内皮细胞生长因子、M199 培养液、1%双抗)培养 RCVECs。用培养基将 VEGFR2/IR780/PLGA-NPs 稀释成不同浓度(50、125、250、375、500 μg/mL)加入到接种了 RCVECs 的 96 孔板中,孵育 24 h。采用 CCK-8 法检测其细胞毒性。

1.2.4 体外荧光成像 配置浓度为 62.5、125、250、375、500 μg/mL 纳米粒的胎牛血清重悬液,每种浓度分别取 200 μL 放置于 24 孔板中。用定量荧光和生物发光成像系统进行扫描成像。用系统自带软件测量出荧光信号强度。

1.2.5 纳米粒与 VEGFR2 抗体连接检测 将纳米粒用 Dil 染色,FITC 二抗标记 VEGFR2 抗体。激光共聚焦显微镜观察纳米粒与抗体的连接情况,流式细胞仪检测纳米粒与抗体的连接率。

1.2.6 体外寻靶实验 将 RCVECs 接种于培养皿内培养 24 h。分为 4 组:阴性组;抗体封闭组;非靶向组;靶向组。在抗体封闭组中先加入 20 μL VEGFR2 抗体,培养 2 h 后洗涤细胞,加入靶向纳米粒。非靶向组中加入非靶向纳米粒,靶向组中加入靶向纳米粒。详细实验步骤参照文献[14]。在加入相应纳米粒后,继续培养 2 h,洗涤细胞,以清除未靶向的纳米粒,最后固定细胞,用 DAPI 进行细胞核染色。激光共聚焦显微镜观察纳米粒与细胞的靶向情况,流式细胞仪检测纳米粒与细胞的连接比例。

1.2.7 纳米粒活性氧产量 用 SOSG 作为单线态氧指示剂,配置不同浓度 VEGFR2/IR780/PLGA-NPs(62.5、125、187.5、250、375、500 μg/mL),加入适量的 SOSG 甲醇溶液并充分混匀,再给予 808 nm 激光辐照(密度 50 J/cm^2,功率 600 mW/cm^2,时间 83 s)[15],其激光能量参数与目前临床上 CNV 运用 PDT 时的参数相同,然后用多功能酶标仪测量其荧光强度。

1.2.8 体外光动力治疗 将细胞培养于 24 孔板中,分为阴性对照组;单纯激光组(仅激光辐照);非靶向激光组(加入非靶向纳米粒,然后激光辐照);靶向激光组(加入靶向纳米粒,然后激光辐照)。其中,激光能量均控制为密度 50 J/cm^2,功率 600 mW/cm^2,时间 83 s。各组在加入不同纳米后与 RCVECs 孵育 2 h,

洗涤未与细胞靶向的纳米粒,然后再给予激光辐照,最后通过流式细胞仪检测各组经 PDT 后 RCVECs 的凋亡比例。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两变量之间关系采用线性相关分析,多样本均数的比较采用单因素方差分析,两组间进一步比较采用 LSD-t 检验。检验水准:$\alpha=0.05$。

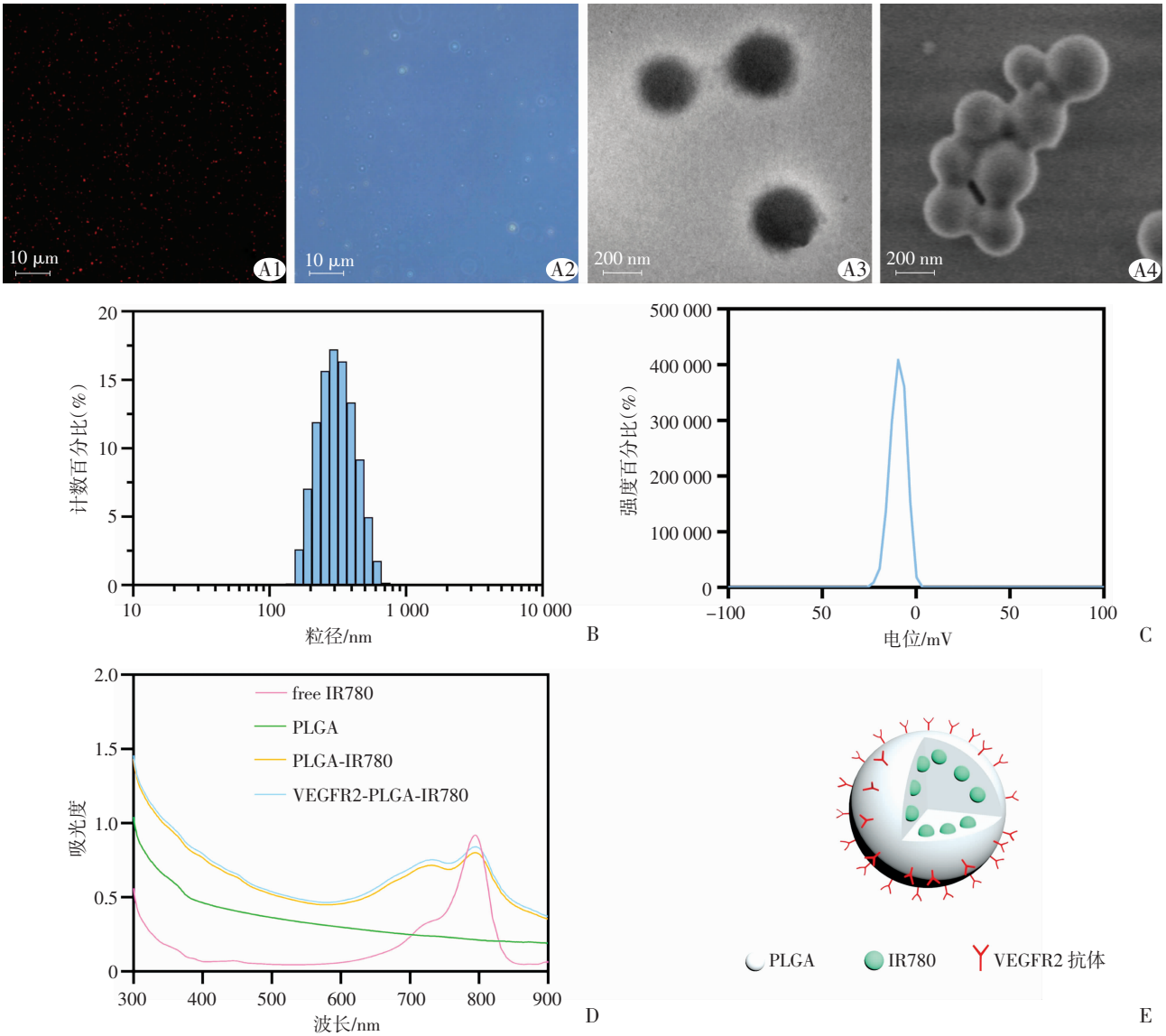
2 结果

2.1 VEGFR2/IR780/PLGA-NPs 的基本性质

成功制备出 VEGFR2/IR780/PLGA-NPs,不同显微镜下观察发现纳米粒粒径均匀,与粒径测量结果一致(图 1A)。紫外吸收光谱可见 VEGFR2/IR780/PLGA-NPs 在 780 nm 处出现最大吸收峰(图 1B),以上结果表明 IR780 成功包载于 PLGA 中。纳米粒粒径为(273.23±31.55)nm(图 1C),分散性好(PdI:0.087),纳米粒电位为(-8.85±1.60)mV(图 1D),纳米粒的结构示意图见图 1E。

2.2 IR780 的包封率

通过高效液相色谱法检测靶向纳米粒中 IR780 浓度,标准曲线回归方程为:$y=22\ 572x+275\ 936$,$R^2=0.997\ 4$。最后计算 IR780 的包封率为(87.37±2.44)%。



A1:激光共聚焦显微镜观察;A2:普通光学显微镜观察;A3:透射电子显微镜观察;A4:扫描电子显微镜观察;B:紫外吸收光谱分析;C:纳米粒粒径分布;D:纳米粒电位分布;E:纳米粒的结构示意图

图 1 VEGFR2/IR780/PLGA-NPs 基本性质的检测结果

2.3 细胞毒性实验

RCVECs 在加入不同浓度的 VEGFR2/IR780/PLGA-NPs(50、125、250、375、500 μg/mL)继续孵育 24 h 后,CCK-8 检测 RCVECs 存活率分别为(91.78±1.79)%、(91.37±1.23)%、(89.25±1.96)%、(88.89±2.04)%、(88.74±2.30)%,各组间差异无统计学意义,说明 VEGFR2/IR780/PLGA-NPs 没有明显的细胞毒性。

2.4 体外荧光成像

随着 VEGFR2/IR780/PLGA-NPs 浓度增加,荧光强度逐渐增强(图 2)。表明纳米粒具备良好的荧光成像能力。

2.5 纳米粒与 VEGFR2 抗体的连接率

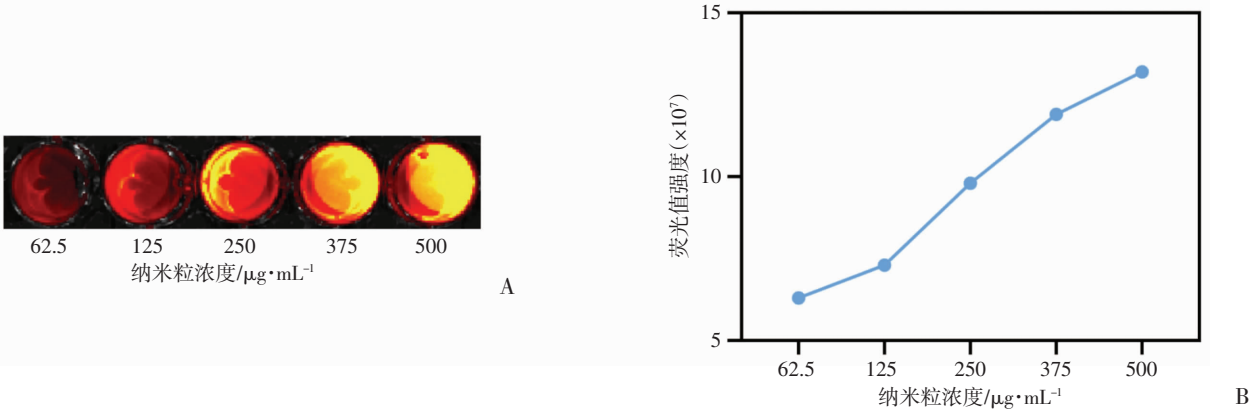
激光共聚焦显微镜显示,红色荧光为 Dil 染色的纳米粒,绿色荧光为 FITC 二抗标记的 VEGFR2 抗体,黄色为两者在融合通道内的显示,表明 VEGFR2 抗体已成功与纳米粒连接(图 3)。流式细胞仪检测纳米粒与 VEGFR2 抗体的连接率为(83.60±4.79)%。

2.6 体外寻靶实验

激光共聚焦显微镜观察(图 4A),在靶向组中细胞膜周围出现大量纳米粒,而在抗体封闭组、非靶向组中仅出现少量纳米粒。流式细胞仪检测抗体封闭组、非靶向组、靶向组中,纳米粒与 RCVECs 连接率分别为(15.12±1.16)%、(20.64±1.89)%、(58.13±1.64)%(图 4B),各组间差异有统计学意义($P<0.05$);靶向组分别与非靶向组、抗体封闭组比较,差异有统计学意义($P<0.05$,图 4C)。流式细胞仪检测结果与共聚焦显微镜观察的结果一致。

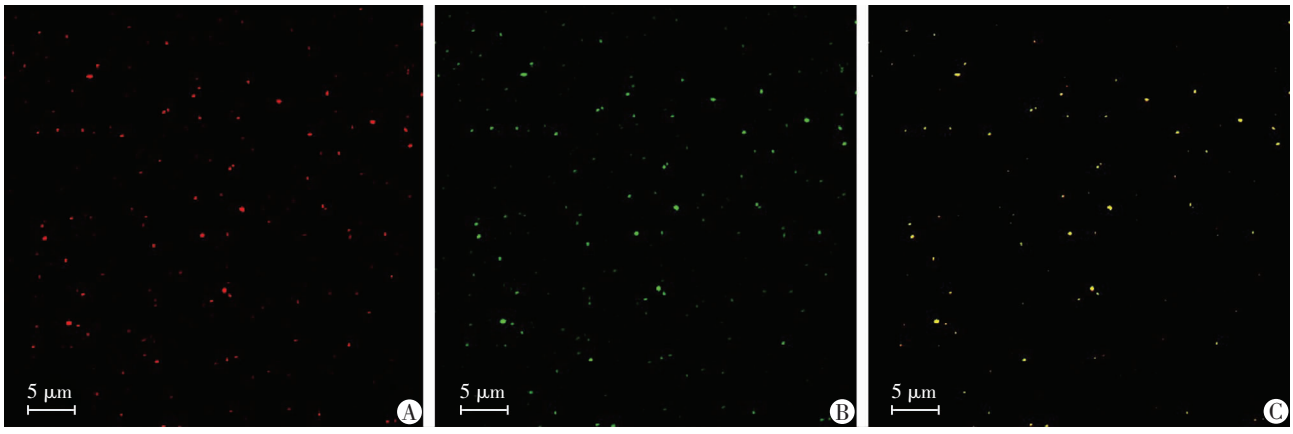
2.7 纳米粒活性氧产量

在 808 nm 激光辐照下(密度 50 J/cm^2,功率 600 mW/cm^2,时间 83 s),随着纳米粒浓度的增加,SOSG 荧光强度逐渐增强,产生的单线态氧逐渐增多(图 5)。证明纳米粒具备优良的 PDT 效果。



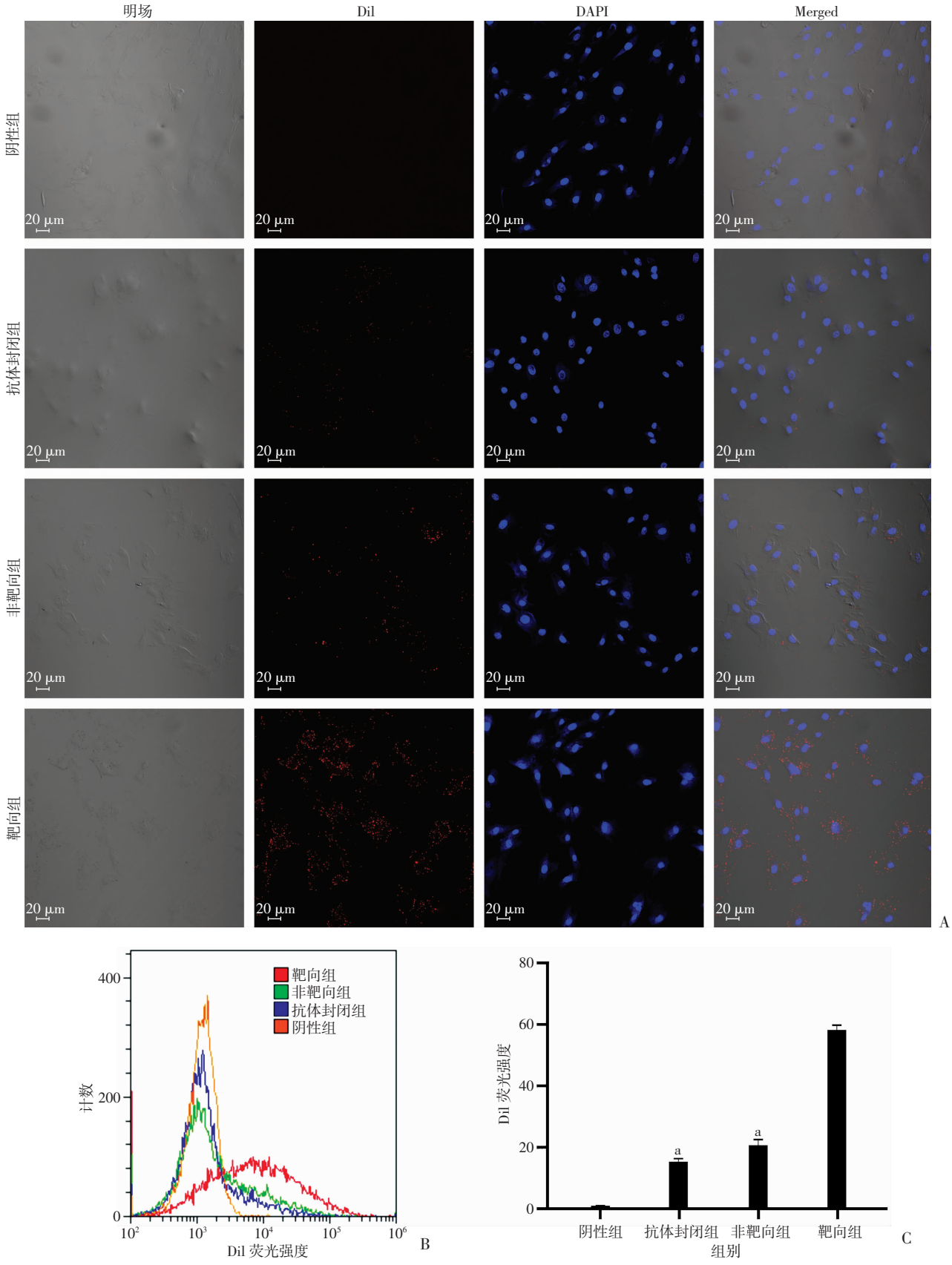
A:不同浓度纳米粒体外荧光成像;B:不同浓度纳米粒体外荧光成像定量分析

图 2 不同浓度纳米粒体外荧光成像及定量分析



A:Dil 标记的纳米粒;B:FITC 二抗标记的 VEGFR2 抗体;C:两者融合通道

图 3 激光共聚焦显微镜观察纳米粒和 VEGFR2 抗体的连接情况



A:激光共聚焦显微镜下观察　明场显示细胞膜;红色荧光为 Dil 标记的纳米粒;蓝色荧光为经 DAPI 染色的细胞核;Merged 为融合图像;B、C:流式细胞仪检测纳米粒与 RCVECs 的连接情况　a:$P<0.05$,与靶向组比较

图 4　激光共聚焦及流式细胞仪评价纳米粒与 RCVECs 结合情况

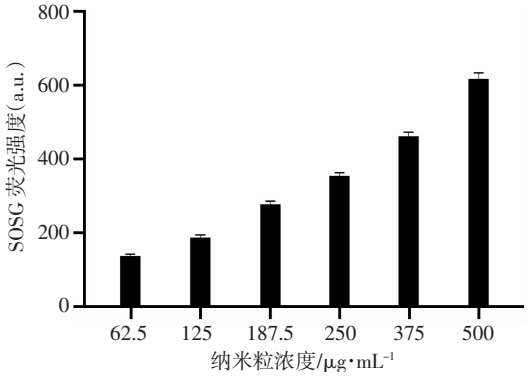
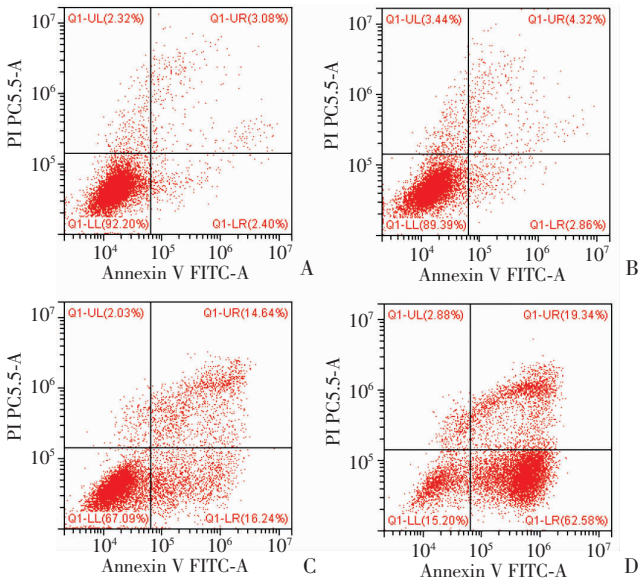


图 5 不同浓度纳米粒经激光辐照后 SOSG 荧光强度

2.8 体外光动力治疗

流式细胞仪检测阴性对照组、单纯激光组、非靶向激光组和靶向激光组的细胞凋亡比例分别为(6.06±1.06)%、(7.05±0.96)%、(30.75±1.81)%、(82.99±0.98)%(图 6)。其中阴性对照组、单纯激光组凋亡率均较低,差异无统计学意义,证明 RCVECs 细胞状态良好,单纯激光没有明显的细胞毒性。非靶向激光与单纯激光组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。证明仅少量纳米粒即具备 PDT 效果。靶向激光组与非靶向激光组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。由于靶向组纳米粒与 RCVECs 结合更多,因此经过 PDT 后,诱导凋亡的比例也更高。



A:阴性对照组;B:单纯激光组;C:非靶向激光组;D:靶向激光组

图 6 流式细胞仪检测体外 PDT 后 RCVECs 凋亡情况

3 讨论

针对目前 CNV 的治疗方案,在进行抗 VEGF 治疗时,需要向玻璃体腔内注射药物,这也增加了其他眼内并发症的风险。在进行 PDT 时,则通过静脉注射药物,由于其药物缺乏对 CNV 的特异性,因此用量大,不良反应多,同时治疗中还易对临近的视网膜造成损伤。目前临床上引入了联合治疗的概念[16],即联合抗 VEGF 治疗与 PDT,以求达到更佳的治疗效果。而针对 CNV 的诊断,眼底血管造影是 CNV 临床上最常用的检查方法,通过静脉注射造影剂,然后运用眼底血管成像仪对血管进行荧光成像。近年来,纳米材料与技术在医学中广泛运用,把纳米医学与临床 CNV 的诊疗手段相结合,将为 CNV 的成像诊断、药物输送和靶向治疗开辟新的思路。

本研究应用生物相容性良好的 PLGA 作为载体,通过超声乳化法包裹光敏剂 IR780,采用碳二亚胺法连接 VEGFR2 抗体与纳米粒,成功制备了具备靶向光动力治疗及荧光分子显像的多功能纳米粒。对纳米粒进行物理性质检测,显微镜下观察呈球形,大小均一,粒径较小,分散良好,CCK-8 检测结果显示纳米粒无明显细胞毒性。体外荧光成像实验显示,纳米粒具备良好的荧光成像能力。由于 IR780 与眼底血管造影剂吲哚菁绿拥有相同的吸收峰,均为 780 nm[17],因此现有眼底血管成像仪即可运用于纳米粒的荧光成像。流式细胞仪检测发现 VEGFR2 抗体和纳米粒连接率高。体外寻靶实验观察到,靶向组中 RCVECs 周围的纳米粒明显多于非靶向组和抗体封闭组,是因为 RCVECs 高表达 VEGFR2,靶向纳米粒通过该信号通路与 RCVECs 特异性结合。同时纳米粒上连接的 VEGFR2 抗体还可以阻断 VEGF 与 VEGFR2 结合,抑制该信号通路,减少抗 VEGF 治疗的次数,达到联合治疗的效果。已有研究表明 VEGFR2 抗体[18]及 VEGFR2 抑制剂均可抑制 CNV 的生长[19]。在激光辐照下,纳米粒产生活性氧,具备良好的 PDT 效果。而靶向激光组诱导 RCVECs 凋亡的比例明显高于非靶向激光组,是由于靶向纳米粒与 RCVECs 结合更多,经过 PDT 后,诱导凋亡的比例也更高。因此靶向纳米粒可提高 PDT 治疗效果,同时减少药物用量,降低对临近视网膜的损伤。

综上所述,本研究结合纳米医学以及目前眼科 CNV 的诊疗方案,成功构建了诊疗一体化的多功能纳米粒,实现了荧光分子显像与 VEGFR2 靶向光动力治疗。为建立一种高效、安全的 CNV 分子成像与靶向治疗方式提供新的思路,并为进一步体内实验奠定基础。

参考文献:

[1] WONG T, CHAKRAVARTHY U, KLEIN R, *et al*. The natural history and prognosis of neovascular age-related macular

degeneration[J]. Ophthalmology, 2008, 115(1): 116-126. e1. DOI:10.1016/j.ophtha.2007.03.008.

[2] SEDDON J M, CHEN C A. The epidemiology of age-related macular degeneration[J]. Int Ophthalmol Clin, 2004, 44(4): 17-39.

[3] 王皓,周希瑗,刘苏,等.重庆市农村地区50岁及以上土家族人群年龄相关性黄斑变性的流行病学调查[J].中华眼科医学杂志(电子版),2018,8(4):157-162. DOI:10.3877/cma.j.issn.2095-2007.2018.01.003.
WANG H, ZHOU X Y, LIU S, *et al*. Epidemiological investigation of age-related macular degeneration of over 50 years old Tuijia ethnic group in Chongqing rural district[J]. Chin J Ophthalmol, 2018, 8(4):157-162. DOI:10.3877/cma.j.issn.2095-2007.2018.01.003.

[4] NOWAK J Z. AMD: the retinal disease with an unprecised etiopathogenesis: in search of effective therapeutics[J]. Acta Pol Pharm, 2014, 71(6): 900-916.

[5] 火成栋, 张文芳, 杨义, 等. 眼科辅助检查在年龄相关性黄斑变性中的应用[J]. 国际眼科杂志, 2018, 18(1): 84-88. DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.1.19.
HUO C D, ZHANG W F, YANG Y, *et al*. Application of ophthalmic methods in age-related macular degeneration[J]. Int Eye Sci, 2018, 18(1): 84-88. DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.1.19.

[6] ISHIKAWA M, JIN D, SAWADA Y, *et al*. Future therapies of wet age-related macular degeneration[J]. J Ophthalmol, 2015, 2015: 138070. DOI:10.1155/2015/138070.

[7] 张卯年.关注抗血管内皮生长因子药物治疗眼部新生血管疾病的潜在风险[J].中华眼底病杂志,2010,26(1):2-5. DOI:10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2010.01.01.
ZHANG M N. Pay attention to the potential risks of anti-vascular endothelial growth factor therapy for neovascular disease[J]. Chin J Ocular Fundus Dis,2010,26(1): 2-5. DOI:10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2010.01.01.

[8] JOSEFSEN L B, BOYLE R W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers[J]. Metol Based Drugs, 2008, 2008: 1-23. DOI: 10.1155/2008/276109.

[9] SMRETSCHNIG E, HAGEN S, GLITTENBERG C, *et al*. Intravitreal anti-vascular endothelial growth factor combined with half-fluence photodynamic therapy for choroidal neovascularization in chronic central serous chorioretinopathy[J]. Eye (Lond), 2016, 30(6): 805-811. DOI:10.1038/eye.2016.41.

[10] WITMER A N, VRENSEN G F, VAN NOORDEN C J, *et al*. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease[J]. Prog Retin Eye Res, 2003, 22(1): 1-29.

[11] ZHANG L, WANG D, YANG K, *et al*. Mitochondria-targeted artificial "Nano-RBCs" for amplified synergistic cancer phototherapy by a single NIR irradiation[J]. Adv Sci (Weinh), 2018, 5(8): 1800049. DOI: 10.1002/advs.201800049.

[12] CHEN Y L, LIU F Q, GUO Y, *et al*. PA/US dual-modality imaging to guide VEGFR-2 targeted photothermal therapy using ZnPc-/PFH-loaded polymeric nanoparticles[J]. Biomater Sci, 2018, 6(8): 2130-2143. DOI: 10.1039/c8bm00213d.

[13] HUANG J, LIU F Q, HAN X X, *et al*. Nanosonosensitizers for highly efficient sonodynamic cancer theranostics[J]. Theranostics,2018,8(22):6178-6194. DOI:10.7150/thno.29569.

[14] CHEN Q W, WEN J, LI H J, *et al*. Recent advances in different modal imaging-guided photothermal therapy[J]. Biomaterials,2016,106:144-166. DOI:10.1016/j.biomaterials.2016.08.022.

[15] 胡军平, 杨华, 李国栋, 等. 光动力疗法联合玻璃体内注射雷珠单抗治疗湿性年龄相关性黄斑变性后黄斑区中心视野的改变[J]. 眼科新进展, 2015, 35(11): 1039-1043. DOI:10.13389/j.cnki.rao.2015.0284.
HU J P, YANG H, LI G D, *et al*. Macular visual field changes after combined photodynamic therapy and intravitreal injection of ranibizumab for neovacular age-related macular degeneration[J]. Recent Adv Ophthalmol, 2015, 35(11): 1039-1043. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2015.0284.

[16] TOZER K, ROLLER A B, CHONG L P, *et al*. Combination therapy for neovascular age-related macular degeneration refractory to anti-vascular endothelial growth factor agents[J]. Ophthalmology,2013,120(10):2029-2034. DOI:10.1016/j.ophtha.2013.03.016.

[17] YUAN A, QIU X F, TANG X L, *et al*. Self-assembled PEG-IR-780-C13 micelle as a targeting, safe and highly-effective photothermal agent for *in vivo* imaging and cancer therapy[J]. Biomaterials, 2015, 51: 184-193. DOI:10.1016/j.biomaterials.2015.01.069.

[18] KIM J, KIM T E, KIM J A, *et al*. Intravitreal tanibirumab, a fully human monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor 2, partially suppresses and regresses laser-induced choroidal neovascularization in a rat model[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2014, 30(10): 847-853. DOI:10.1089/jop.2014.0021.

[19] KANG S, PARK K C, YANG K J, *et al*. Effect of cediranib, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase, in a mouse model of choroidal neovascularization[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2013, 41(1): 63-72. DOI:10.1111/j.1442-9071.2012.02813.x.

(**收稿**:2019-07-11;**修回**:2019-08-26)

(编辑 张 维)