

# 羟基磷灰石眶内植入物血管内皮细胞生长因子的表达

方 腾<sup>1</sup>, 李秋明<sup>2</sup>, 卢健香<sup>1</sup>, 舒华娥<sup>1</sup>, 刘 芳<sup>1</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(454001)中国河南省焦作市第二人民医院眼科;<sup>2</sup>(450052)中国河南省郑州市,郑州大学第一附属医院眼科  
作者简介:方腾,硕士研究生,研究方向:白内障、眼屈光学。  
通讯作者:方腾.fangteng75@126.com  
收稿日期:2010-01-21 修回日期:2010-03-11

## Expression of vascular endothelial growth factor in hydroxyapatite orbital implants

Teng Fang<sup>1</sup>, Qiu-Ming Li<sup>2</sup>, Jian-Xiang Lu<sup>1</sup>, Hua-E Shu<sup>1</sup>, Fang Liu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the Second People's Hospital of Jiaozuo, Jiaozuo 454001, Henan Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

**Correspondence to:** Teng Fang. Department of Ophthalmology, the Second People's Hospital of Jiaozuo, Jiaozuo 454001, Henan Province, China. fangteng75@126.com

Received:2010-01-21 Accepted:2010-03-11

### Abstract

• **AIM:** To investigate the relevance of formation of fibrovascularization between vascular endothelial growth factor (VEGF) and hydroxyapatite (HA) orbital implants; and the mechanism of dexamethasone suppression on fibrovascularization of HA implants.

• **METHODS:** Twenty rabbits were randomly divided into experimental group and control group with 10 in each; each group were used HA implants implanted in rabbit eyes and tobramycin eyedrop was used 4 times per day postoperatively. Peribulbar injection of dexamethasone 0.5mg was applied in the experimental group every other day 48 hours after operation to the end of the experiment, and the growth state of conjunctiva in both groups were observed. 2 HA implants from experimental group and control group respectively were extracted for testing the positive expression of VEGF by immunohistochemistry 3, 7, 14, 21, 28 days after operation.

• **RESULTS:** There was a significant correlation between HA implants fibrovascularization and the expression of VEGF. Histological examination confirmed that after 14 days, the experimental group HA significantly reduced inflammatory cell infiltration, immunohistochemistry showed that VEGF expression in the experimental group was significantly lower than that in the control group.

• **CONCLUSION:** It is closely related between HA implant fibrovascularization and inflammatory reaction; VEGF may be involved in the formation of fibrovascularization, dexamethasone may be through inhibiting the inflammatory response and VEGF expression, and thus inhibit implants of fibrovascular growth.

• **KEYWORDS:** vascular endothelial growth factor; Hydroxyapatite; orbital implants; fiber vascularization; inflammatory response

Fang T, Li QM, Lu JX, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor in hydroxyapatite orbital implants. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(4):656-658

### 摘要

**目的:**探讨血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)眶内植入物纤维血管化形成的相关性,以及地塞米松抑制羟基磷灰石植入物纤维血管化的机制。

**方法:**家兔20只随机分为实验组与对照组,每组10只;各组均采用HA植入物植入兔眼眶。术后滴妥布霉素滴眼液4次/d,实验组术后48h起隔日球周注射地塞米松0.5mg和实验结束,并观察两组的结膜生长情况;实验组与对照组分别于术后3,7,14,21,28d摘取2只HA植入物行免疫组织化学检测VEGF阳性表达情况。

**结果:**羟基磷灰石植入物纤维血管化与VEGF的表达存在显著的相关性。术后14d,实验组HA炎性细胞浸润明显减少,实验组VEGF表达明显低于对照组。

**结论:**羟基磷灰石植入物纤维血管化与炎症反应密切相关,VEGF可能参与了纤维血管化形成过程,地塞米松可能通过抑制植入物的炎症反应及VEGF的表达。

**关键词:**血管内皮细胞生长因子;羟基磷灰石;眼眶植入物;纤维血管化;炎症反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.04.014

方腾,李秋明,卢健香,等.羟基磷灰石眶内植入物血管内皮细胞生长因子的表达.国际眼科杂志2010;10(4):656-658

### 0 引言

通常行球内容物剜除术或是眼球摘除术后若要保持眼球的原有形状,防止眼窝内陷,需向眼窝内植入相应大小的义眼台,羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)义眼台植入术是较理想的眼窝重建手术,通过植入义眼台能够较好的维持正常的眼球外观。但是部分患者由于自体或异体巩膜溶解坏死、结膜切口延迟愈合,导致义眼台暴露,其根本原因与植入物纤维血管化迟缓有关。目前对于植入物暴露缺乏有效的预防方法,近年认为,新生血管的形成与炎症反应及多种细胞因子的调控密切相关。其中,血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和转化生长因子- $\beta_1$ (transforming growth factor-beta 1, TGF- $\beta_1$ )备受关注。为了进一步明确二者在羟基磷灰石植入物纤维血管化中的作用及指导术后临床用药,我们用HA植入兔眼眶建立活体兔眼模型,并设立地塞米松干扰对照,检测VEGF与羟基磷灰石植入物纤维血管化形成的相关性;同时对激素抑制羟基磷灰石植入物纤维血管化的机制作进一步探讨。

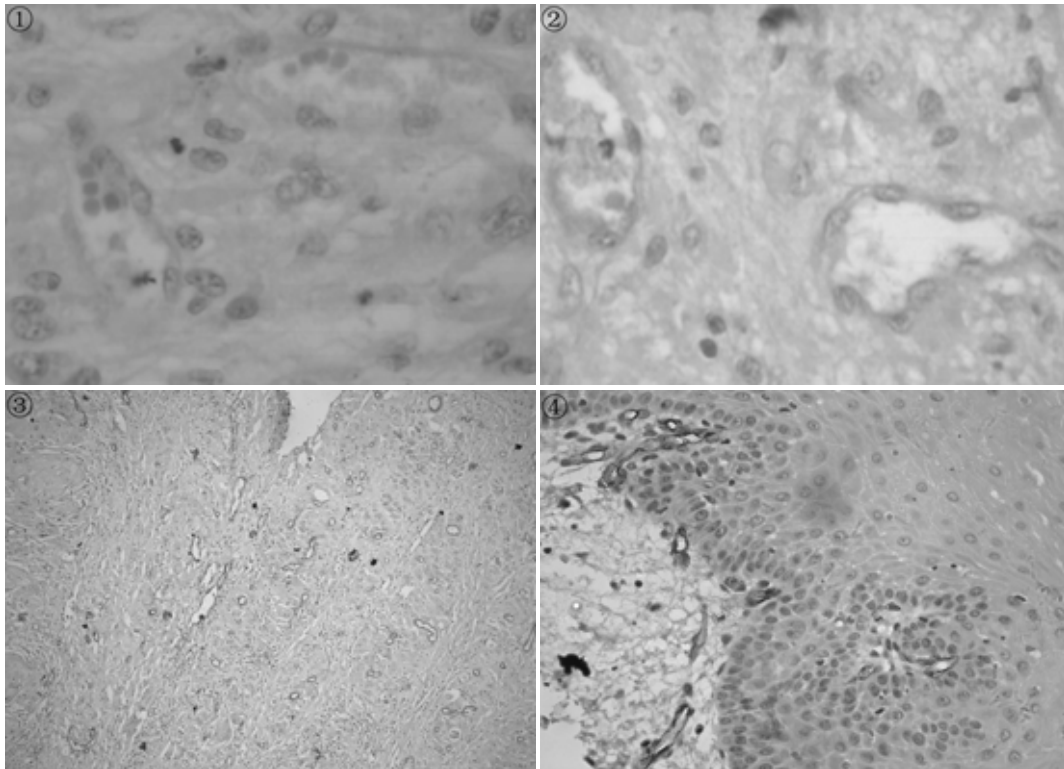


图1 新生血管腔伴少量炎性细胞。  
图3 VEGF 阳性表达基质纤维。

图2 新生血管腔。  
图4 新生血管内皮细胞。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 成年健康家兔 20 只(郑州实验动物中心提供), 体质量 2.10~2.72kg, 雌雄不限, 实验前用裂隙灯显微镜检查双眼无疾病。随机分为实验组与对照组, 每组 10 只; 各组均采用 HA 植入物植入兔眼眶。术后滴妥布霉素滴眼液和球周注射地塞米松针的为实验组, 术后滴妥布霉素滴眼液的为对照组。采用国产(北京金点睛科技有限公司, 博奥普 4000 型)天然羟基磷灰石义眼台, 眼台直径为 22mm、孔径为 200 $\mu$ m, 质量 4~5g。将其在生理盐水中浸泡 5min 后, 从中央切成鼻侧和颞侧两半, 分别小心用手术刀片将其加工制作成两个直径为 7~9mm 的球形 HA, 经高温消毒备用。兔抗血管内皮生长因子多克隆抗体(000279-R1, 北京赛驰生物科技有限公司提供); 妥布霉素滴眼液。手术均由同一实验者完成。用氯丙嗪 25mg/kg 和氯胺酮 50mg/kg 将兔全身麻醉。常规消毒铺巾, 开睑器开睑; 沿角膜缘环形剪开球结膜, 分离筋膜囊, 暴露眼外肌, 将眼外肌分离并做预置缝线后剪断肌肉, 剪断视神经后将眼球完整摘除, 用纱布块置于眼窝内压迫止血约 3min, 将用塑料薄膜包裹的 HA 植入肌锥内; 眼外肌对合缝合后, 用 5/0 丝线间断缝合筋膜囊和结膜。结膜囊置凡士林纱条, 1/0 缝线缝合上、下睑。术后 48h 拆除兔上、下睑缝线, 取出结膜囊凡士林纱条, 术后两组滴妥布霉素滴眼液 4 次/d, 此外实验组自术后 48h 起隔日球周注射地塞米松针 0.5mg 和至实验结束, 并观察两组的结膜生长情况。

**1.2 方法** 术后 3, 7, 14, 21, 28d 摘取 2 只 HA 植入物, 将植入物切成鼻侧和颞侧两半, 将颞侧半置于 40g/L 的甲醛液中固定, 脱钙, 石蜡包埋、切片、HE 和免疫组织化学染色。

**1.2.1 植入物纤维血管化** 纤维血管化的程度由病理科

医生进行判定, 采用半定量方法计算纤维血管长入的情况, 光镜下测定每个 HA 植入物标本的 3:00, 6:00, 9:00, 12:00 方位的纤维血管长度, 即纤维血管自 HA 植入物表面长入球内的距离, 取其 4 个数值的平均值, 进行分级。HA 植入物纤维血管化的分级: 0 级为 HA 植入物球内无纤维血管长入, 1 级为纤维血管长度  $\leq 1.4$ mm, 2 级为纤维血管长度 1.5~2.8mm; 3 级为纤维血管长度 2.9~4.2mm, 4 级为纤维血管长度 4.3~5.6mm, 5 级为纤维血管长度  $\geq 5.7$ mm。

**1.2.2 VEGF 的表达** 标本连续 4 $\mu$ m 切片 3 张, 脱蜡、水化, 各组每个标本中均取 1 张 HE 染色以肯定免疫组织化学所见到的形态学结果, 其余 2 张切片行免疫组织化学染色, 步骤按试剂盒说明书进行, 所有切片一次性完成。以组织内出现棕黄色颗粒为阳性判断标准, 按照染色程度的深浅可分为 5 级<sup>[1]</sup>: 0 级(-) 为细胞核和细胞间质不着色; 1 级(+) 为标本内绝大多数细胞可疑阳性, 少数细胞 (<10%) 可辨别为阳性; 2 级(++) 为标本内大部分阳性细胞呈清楚可辨的棕黄色, 但未达到 3 级; 3 级(+++) 为细胞染色典型, 呈鲜艳的棕色; 4 级(++++) 为超过 10% 阳性细胞染色成棕黑色。

统计学分析: 经 SPSS 13.0 统计学软件处理, 采用相关性分析和 *t* 检验, 取  $\alpha = 0.05$  进行统计学分析。

## 2 结果

**2.1 HA 植入物纤维血管 VEGF 表达** 实验组与对照组术后 3 和 7d 二者在表达的部位和强度上具有一定的相似性, 对照组 14 及 21d 的 VEGF 阳性表达逐渐增强(+++), 可见密集的新生血管管腔形成, 同时可见大量浸润的炎性细胞(图 1, 2), VEGF 阳性表达主要定位于基质纤维细胞、浸润的炎性细胞和新生的血管内皮细胞胞质量内(图 3, 4)。但 28d 时对照组 VEGF 阳性表达明显减弱

表1 HA纤维血管组织长度和VEGF表达

分组	3d	7d	14d	21d	28d
对照组	0(+)	0.17(++)	0.89(++++)	2.31(++++)	2.89(++++)
实验组	0(+)	0.21(++)	0.33(+) <sup>a</sup>	1.35(+) <sup>a</sup>	1.76(++)

$t = 7.35, ^a P < 0.05$  vs对照组。

而炎症细胞浸润也明显减少。实验组7d时HA植入物纤维血管组织中少量炎症细胞浸润,VEGF表达与对照组相似(++);但在14,21d和28d炎症细胞浸润明显减少,VEGF染色呈(+);未发现明显成熟的新生血管生长。

**2.2 HA植入物纤维血管化的长度和VEGF表达** HA植入物纤维血管化的长度和VEGF表达见表1。

### 3 讨论

新生血管的形成是一个相当复杂的过程,关于眶内植入物纤维血管化形成的具体机制目前尚不十分清楚,但在新生血管形成的众多学说中,多数学者倾向于细胞因子学说,即认为新生血管刺激因子的过度表达或抑制因子的不足是新生血管发生的基础<sup>[2]</sup>。其中血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)被认为具有促进血管内皮细胞增生和血管渗透的作用<sup>[3]</sup>,是血管形成的中心调节者,在新生血管的形成过程中起重要作用。近年研究发现,转化生长因子- $\beta_1$  (transforming growth factor-beta 1, TGF- $\beta_1$ )与肿瘤血管的形成密切相关<sup>[4]</sup>,这可能与其和VEGF的相互作用有关,在眼科领域,仅发现其与视网膜、脉络膜新生血管的形成显著相关,有关TGF- $\beta_1$ 在眼部新生血管发生中的作用报道很少。血液循环中含有的内皮祖细胞(EPC)参与形成新的血管并存在于血管新生活跃的部位<sup>[5]</sup>。EPC是通过一些因子如MCP21, TGF- $\beta_2$ , VEGF和PIGF由骨髓动员出来的,表达多种不同的内皮细胞表面标记物,包括血小板内皮细胞黏附分子21,血管性假血友病因子(vWF)及VEGF受体<sup>[6]</sup>。在生理性血管新生期间如女性的生殖周期,在病理性血管新生期如心肌缺血期间,EPCs参与了血管的形成。然而,从骨髓动员的EPCs进入血管壁并穿越不同区间成为成熟ECs的能力尚值得怀疑<sup>[7]</sup>。本研究表明,术后3d,在对照组与实验组HA眶内植入物纤维血管组织上皮细胞、基质纤维细胞和内皮细胞胞质内均有VEGF的弱阳性表达(+)。在术后7d,阳性表达有所增强(++),二者的表达在部位和强度上呈现一定的相似性,但与对照组相比,实验组的炎性细胞明显较少;提示VEGF可能是启动新生血管增生的效应因子之一,并且这种作用可能与炎症细胞的浸润密切相关;对照组14d及21d的VEGF阳性表达逐渐增强(++++) ,可见密集的新生血管管腔形成,同时可见大量浸润的炎性细胞,VEGF阳性表达主要定位于基质

纤维细胞、浸润的炎性细胞和新的血管内皮细胞胞质内。但28d时对照组VEGF阳性表达明显减弱而炎症细胞浸润也明显减少;在实验组,14d,21d和28d炎症细胞浸润明显减少,VEGF染色呈+级;未发现明显成熟的新生血管生长。

糖皮质激素是多年来抑制新生血管的经典药物,表现出强大的应用前景。研究表明,地塞米松可能是通过稳定多形核白细胞的细胞膜和溶酶体膜减少炎症介质的释放,从而抑制炎症反应及下调某些细胞因子的表达,从而进一步抑制新生血管形成。我们的研究表明,VEGF大量表达于各种炎症细胞的胞质内,且与炎症反应密切相关。采用地塞米松结膜下注射后,发现炎症反应与VEGF的表达同步下降,同时新生血管出现的天数后移,生长速度变慢,两组在新生血管的VEGF表达之间的差异具有统计学意义( $t = 7.35, P < 0.05$ )。由此提示,地塞米松抑制新生血管生长的作用可能与其抑制炎症反应及下调的VEGF表达相关。

### 参考文献

- 1 韩静,闫小龙,韩泉洪,等. 兔角膜碱烧伤后角膜和房水中VEGF的表达. *眼科新进展* 2006;26(2):103-104
- 2 Brogi E, Wu T, Namiki A, et al. Indirect angiogenic cytokines up-regulate VEGF and b-FGF gene expression in vascular smooth muscle cells whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 2004;90(2):649-652
- 3 Shen WY, Lai CM, Lai YK, et al. Practical considerations of recombinant adeno-associated virus mediated gene transfer for treatment of retinal degenerations. *J Gene Med* 2003;5(7):576-587
- 4 Hisatomi IT, Sakamoto T, Yamanaka I, et al. Photocoagulation induced retinal gliosis is inhibited by systemically expressed soluble TGF $\beta_2$  betare-2 receptor type II via adenovirus mediated gene transfer. *Lab Invest* 2002;82(7):863-870
- 5 Siegfried G, Basak A, Cromlish JA, et al. The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF2C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 2003;111(11):1723-1732
- 6 Ishii H, Yazawa T, Sato H, et al. Enhancement of pleural dissemination and lymphnode metastasis of intrathoracic lung cancer cells by vascular endothelial growth factors (VEGFs). *Lung Cancer* 2004;45(3):325-337
- 7 Yang JC, Haworth L, Sherry RM, et al. A randomized trial of bevacizumab, an antivascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *New Engl J Med* 2003;349(5):427-443