

# VEGF 和 PEDF 在糖尿病大鼠视网膜脉络膜中的表达

李琳<sup>1</sup>, 周希媛<sup>2</sup>, 罗霖茵<sup>3</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(400061) 中国重庆市, 武警重庆总队医院眼科;  
<sup>2</sup>(400010) 中国重庆市, 重庆医科大学附属第二医院眼科;  
<sup>3</sup>(400013) 中国重庆市中山医院眼科

作者简介:李琳, 毕业于重庆医科大学, 硕士, 主治医师, 研究方向:眼底病。

通讯作者:周希媛, 毕业于第三军医大学, 教授, 主任, 硕士生导师, 研究方向:眼底病. zhousiyuan2002@yahoo.com

收稿日期:2013-05-06 修回日期:2013-08-18

## VEGF and PEDF expressions in retina and choroid of diabetic rats

Lin Li<sup>1</sup>, Xi-Yuan Zhou<sup>2</sup>, Ji-Han Luo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the Chongqing General Troop of Armed Police Hospital, Chongqing 400061, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing 400013, China

**Correspondence to:** Xi-Yuan Zhou. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China. zhousiyuan2002@yahoo.com

Received:2013-05-06 Accepted:2013-08-18

### Abstract

• **AIM:** To investigate the expressions time and the position of VEGF and PEDF in the retina and choroid of diabetic rats and compare them with the expressions in the normal rats.

• **METHODS:** Healthy male Wistar rats were selected and randomly divided into diabetic group and normal group (M0). Type 1 diabetes rat model was induced by being injected of large-dose streptozotocinum (STZ) into abdominal cavity. The retina and choroid of rats was obtained to detect the VEGF and PEDF expressions by immunohistochemistry at 1<sup>st</sup> (M1), 2<sup>nd</sup> (M2), 3<sup>rd</sup> (M3), 5<sup>th</sup> (M5) month after diabetes induction.

• **RESULTS:** VEGF expression in retina and choroid of rats had no obvious difference between M1 and M0. M2 VEGF expression in choroid was positive (33.3%), while in retina was not significantly different with M0. M3 VEGF expression in choroid was positive (55.6%), and in inner nuclear layer and ganglion cells layer of retina was positive (33.3%). M5 VEGF expression in choroid was and the whole retina positive (88.9%). PEDF expression in retina of rats had no obvious difference between normal group and M1, M2 group, and there was no PEDF expression detected in choroid of all the

groups. In M3 and M5 group, PEDF expression in retina was lower than M0, the expression gradually weakened with the extension of the course ( $P < 0.05$ ), and there was also no PEDF expression detected in choroid of all the groups. The ratio of VEGF/PEDF gradually increased with the extended duration of diabetes, and there was significant difference compared with M0 ( $P < 0.01$ )

• **CONCLUSION:** The expression of VEGF and PEDF in retina of rats was related with the diabetes course, VEGF expression in retina and choroid was increased, while PEDF expression was gradually decreased in the course. There was no PEDF expression in choroid, it might be because the experimental model was not in proliferative stage.

• **KEYWORDS:** vascular endothelial growth factor; pigment epithelium-derived factor; diabetic retinopathy; immunohistochemistry

**Citation:** Li L, Zhou XY, Luo JH. VEGF and PEDF expressions in retina and choroid of diabetic rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(9):1754-1757

### 摘要

**目的:** 通过免疫组织化学法比较正常大鼠及糖尿病大鼠视网膜、脉络膜组织中 VEGF 和 PEDF 的表达情况及相互关系。

**方法:** 选取健康雄性 Wistar 大鼠, 随机分成糖尿病组和正常对照组 (M0), 用链脲佐菌素大剂量一次性腹腔注射诱导 1 型糖尿病模型。成模后大鼠随机平均分成 1mo (M1), 2mo (M2), 3mo (M3) 及 5mo (M5) 组, 免疫组织化学法检测 VEGF 和 PEDF 在各组大鼠视网膜及脉络膜的表达。

**结果:** M1 大鼠 VEGF 在视网膜及脉络膜的表达均与 M0 无明显差别; M2 大鼠 VEGF 在脉络膜有阳性表达 (33.3%), 在视网膜的表达与 M0 无明显差别; M3 大鼠 VEGF 在脉络膜有阳性表达 (55.6%), 在视网膜的表达与 M0 比较有明显差别 (33.3%); M5 大鼠 VEGF 在视网膜及脉络膜阳性表达 (88.9%); M1 和 M2 大鼠视网膜 PEDF 表达与 M0 比较无明显差别, 各组脉络膜均无 PEDF 表达; M3 和 M5 大鼠视网膜 PEDF 表达均较 M0 减弱, 且随病程延长表达逐渐减弱 ( $P < 0.05$ ), 各组脉络膜均无 PEDF 表达; 随着糖尿病病程延长, VEGF/PEDF 比值逐渐增大, 与 M0 相比有显著统计学差异 ( $P < 0.01$ )。

**结论:** 随着糖尿病病程的延长, VEGF 在视网膜及脉络膜的表达均逐渐增强, 而 PEDF 与之相反, 在视网膜的表达逐渐减弱, 且 VEGF/PEDF 比值逐渐增大, 提示 VEGF 和 PEDF 均与糖尿病病程密切相关。

**关键词:** 血管内皮生长因子; 色素上皮衍生因子; 糖尿病视网膜病变; 免疫组织化学

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.09.04

引用:李琳,周希瓊,罗霁菌.VEGF和PEDF在糖尿病大鼠视网膜脉络膜中的表达.国际眼科杂志2013;13(9):1754-1757

## 0 引言

眼底新生血管的形成是一个复杂的生物学过程,其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)在血管的形成中起重要的作用。目前学者们对VEGF和PEDF在糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)中的作用进行了研究<sup>[1]</sup>,发现VEGF的表达增高,而PEDF的表达降低,表明二者表达的失衡可能是DR新生血管形成的主要原因之一。本研究观测VEGF和PEDF在实验性糖尿病大鼠视网膜和脉络膜的表达情况,旨在从分子水平研究VEGF和PEDF在DR病程中的变化水平及其对病程的作用,从而对预防和治疗DR提供新的途径,为临床治疗DR提供一定的理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 实验动物为封闭群雄性Wistar大鼠45只(重庆医科大学动物实验室提供),质量180~280g,全部动物均适应性饲养3d,饲料为重庆医科大学动物中心提供的大鼠标准饲料。即用型SABC免疫组织化学染色试剂盒,购于武汉博士德生物工程有限公司;兔抗大鼠VEGF多克隆抗体,武汉博士德生物技术有限公司;山羊抗小鼠PEDF单克隆抗体,天津灏洋生物技术有限公司;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, Sigma公司);ONE TOUCH血糖仪(中国强生有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 糖尿病动物模型的建立** 链脲佐菌素溶于0.05mol/L柠檬酸缓冲液(pH=4.5),浓度12.5g/L,按60mg/kg体质量一次性腹腔注射,24~48h后用ONE TOUCH血糖仪测血糖,用强生尿糖试纸测尿糖浓度,血糖浓度达16.65mmol/L,尿糖达3+~4+即为建模成功<sup>[1,2]</sup>。成模后每周测1次定性尿糖、体质量、24h尿量和饮水量,每月检测1次血糖。成模鼠随机分成糖尿病1mo组M1,2mo组M2,3mo组M3,5mo组M5,每组各10只大鼠。设正常对照组(M0)大鼠5只,腹腔注射0.05mol/L柠檬酸缓冲液(pH=4.5)。

**1.2.2 取材和固定及石蜡切片制作** 分别于1,2,3,5mo麻醉处死实验组大鼠10只及对照组大鼠1只,处死后立即取出眼球,固定于Verhoeff液中,48h后常规石蜡包埋,连续6 $\mu$ m切片用于免疫组织化学染色。

**1.2.3 免疫组化染色检测各病程糖尿病大鼠视网膜和脉络膜VEGF及PEDF的表达** 操作步骤具体如下:(1)脱蜡和水化;(2)30mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+蒸馏水(1:10)混合,滴加在切片上,室温静置10min;(3)抗原修复;(4)滴加50mL/L BSA封闭液;(5)滴加一抗兔抗大鼠VEGF多克隆抗体或山羊抗小鼠PEDF单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C过夜;(6)滴加生物素化山羊抗小鼠IgG;(7)滴加试剂SABC;(8)DAB显色;(9)苏木精复染,脱水,透明,封片,镜检。阴性对照组以正常小牛血清代替一抗,其余步骤同上。

**1.2.4 电子计算机图像测定** 采用北航病理图像分析系统,视觉图像分析。测定各病程糖尿病大鼠视网膜和脉络膜阳性染色密度。结果判定标准:阳性细胞为胞浆呈

黄色。免疫组织化学计算机图像分析方法如下:选取制作优良的各时间段VEGF及PEDF免疫组化染色切片各20张,在每张切片随机选取10个高倍视野进行图像分析,各组所选取部位相同。采用北航CM-2000生物医学图像分析系统(重庆医科大学电镜室提供)测定其染色的平均灰度值。光密度值越大,染色越深,反映细胞内蛋白免疫活性(表达量)越高。

统计学分析:处理数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 免疫组化法观察VEGF和PEDF在糖尿病大鼠视网膜及脉络膜中表达及定位** 正常对照组(M0)的VEGF阳性反应在M0大鼠视网膜分布于内核层及神经节细胞层,脉络膜均无VEGF蛋白质的阳性表达。而PEDF阳性反应在M0大鼠视网膜分布于内核层及神经节细胞层、视网膜色素上皮层,脉络膜均无PEDF蛋白质的阳性表达。糖尿病1mo组(M1)和糖尿病2mo组(M2)的视网膜VEGF蛋白质的阳性表达与M0组比较无差别,M1组脉络膜无VEGF蛋白质的阳性表达,而M2组脉络膜有VEGF蛋白质的阳性表达33.3%;两组视网膜PEDF蛋白质的阳性表达与M0组比较无差别,脉络膜无PEDF蛋白质的阳性表达(图1,2)。

糖尿病3mo组(M3)视网膜VEGF蛋白质的阳性表达33.3%(3/9),分布于内核层及神经节细胞层,表达增强,偶见毛细血管的阳性表达。脉络膜VEGF蛋白质的阳性表达55.6%(5/9)。而视网膜PEDF蛋白质的阳性表达分布于内核层及神经节细胞层,胞核未显色,表达较M0有所减弱。脉络膜仍无PEDF蛋白质的阳性表达。

糖尿病5mo组(M5)的视网膜VEGF蛋白质的阳性表达88.9%(8/9)更加明显,视网膜全层均有VEGF蛋白质阳性表达,并且脉络膜VEGF蛋白质的阳性表达88.9%(8/9)。而视网膜PEDF蛋白质的阳性表达分布于神经节细胞层,表达较M0减弱。脉络膜无PEDF蛋白质的阳性表达。

## 2.2 免疫组织化学染色结果计算机图像统计学分析

**2.2.1 正常组和不同病程糖尿病大鼠视网膜及脉络膜中VEGF及PEDF阳性染色密度分析** M1与M0视网膜VEGF阳性染色面密度比较无差异,脉络膜均无VEGF阳性表达;M2,M3,M5与M0比较,视网膜、脉络膜VEGF阳性染色面密度随病程逐渐增强,有统计学差异( $P<0.05$ )。M1,M2与M0视网膜PEDF阳性染色面密度比较无差异,M3,M5与M0比较视网膜PEDF阳性染色面密度随病程逐渐降低,有统计学差异( $P<0.05$ ),各组脉络膜均无PEDF阳性表达(表1,2;图3,4)。

**2.2.2 正常组与不同病程糖尿病组大鼠视网膜中VEGF/PEDF阳性染色密度比值的统计分析** 将VEGF与PEDF阳性染色密度的比值进行统计分析,结果发现M1与M2的VEGF/PEDF比值与M0相比无统计学差异,随着糖尿病进程的进一步发展,VEGF/PEDF比值逐渐增大,与M0相比均有显著统计学差异( $P<0.01$ ,表3,图5)。

## 3 讨论

VEGF是目前文献上公认的最强的促血管生长因子<sup>[3]</sup>,视网膜色素上皮细胞、神经节细胞、胶质细胞、Müller

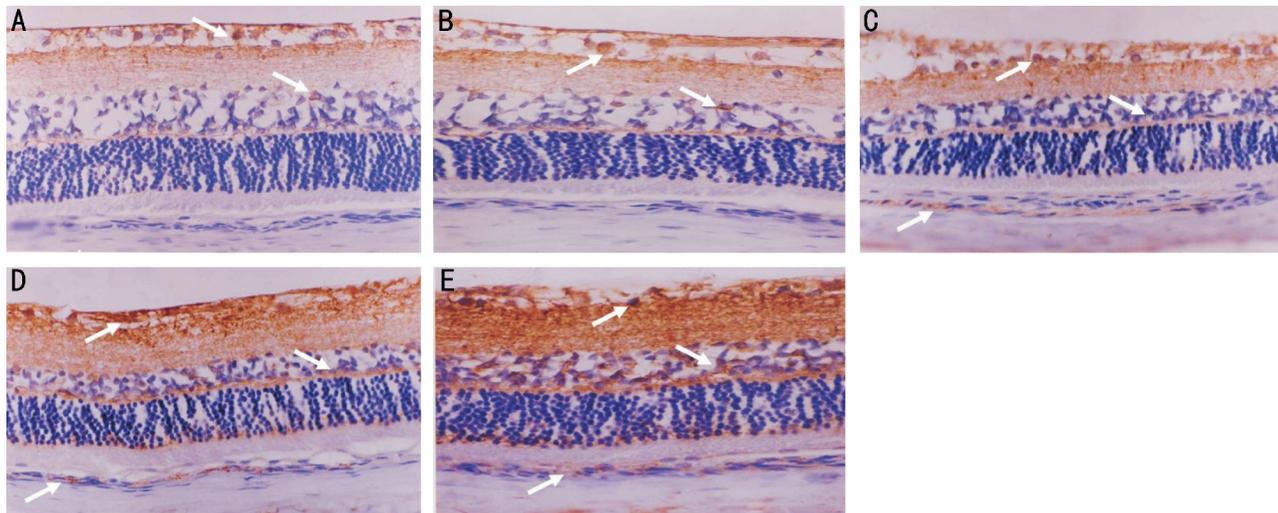


图1 不同病程糖尿病大鼠视网膜及脉络膜中 VEGF 的表达及定位 (SABC×400) A:正常对照组;B:糖尿病 1mo 组;C:糖尿病 2mo 组;D:糖尿病 3mo 组;E:糖尿病 5mo 组。

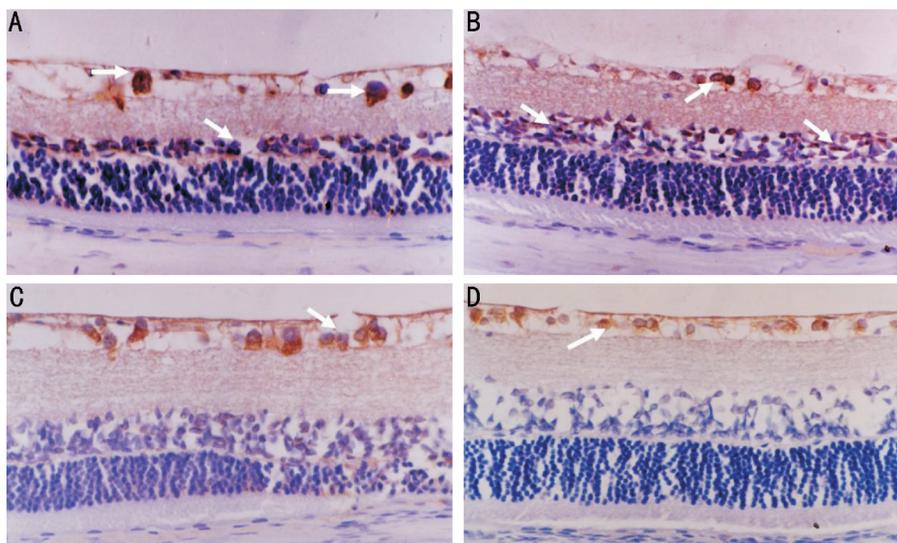


图2 不同病程糖尿病大鼠视网膜及脉络膜中 PEDF 的表达及定位 (SABC×400) A:正常对照组;B:糖尿病 1mo 组;C:糖尿病 3mo 组;D:糖尿病 5mo 组。

表1 正常对照组与不同病程糖尿病组大鼠视网膜及脉络膜中 VEGF 阳性染色密度  $\bar{x} \pm s$

组织		1mo	2mo	3mo	5mo
视网膜	正常对照组	11.9±0.86	11.7±0.88	12.0±0.98	10.9±1.86
	实验组	11.1±0.86	11.4±0.69	25.0±1.16 <sup>a,c</sup>	44.8±1.21 <sup>b,d</sup>
脉络膜	正常对照组	0	0	0	0
	实验组	0	8.57±0.57	15.9±0.92 <sup>a,c</sup>	38.1±1.66 <sup>b,d</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 糖尿病 2mo 组。

表2 正常对照组与不同病程糖尿病组大鼠视网膜中 PEDF 阳性染色密度  $\bar{x} \pm s$

分组	1mo	2mo	3mo	5mo
正常对照组	19.36±1.21	21.55±0.98	18.88±1.32	20.87±1.00
实验组	21.32±1.32	22.88±0.98	16.47±0.89 <sup>a</sup>	12.33±0.97 <sup>a</sup>

注: <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常对照组。

表3 正常对照组与不同病程糖尿病组大鼠视网膜中 VEGF/PEDF 阳性染色密度比值  $\bar{x} \pm s$

分组	1mo	2mo	3mo	5mo
正常对照组	0.62±0.06	0.54±0.05	0.64±0.07	0.52±0.08
实验组	0.53±0.10	0.51±0.10	1.52±0.13 <sup>b</sup>	3.77±0.36 <sup>b</sup>

注: <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组。

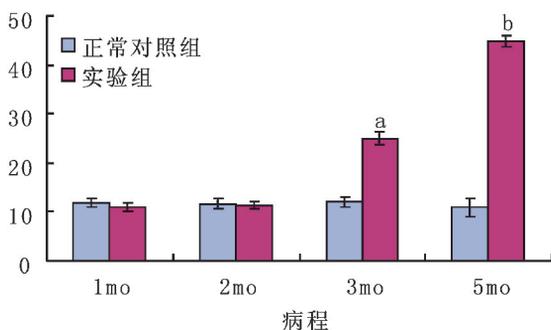


图3 正常对照组与不同病程糖尿病组大鼠视网膜及脉络膜中 VEGF 阳性染色密度 <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组。

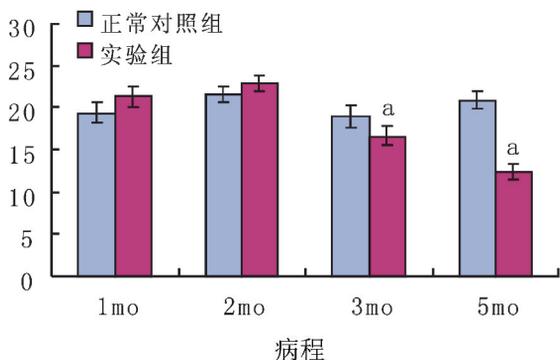


图4 正常对照组与不同病程糖尿病组大鼠视网膜中 PEDF 阳性染色密度 <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常对照组。

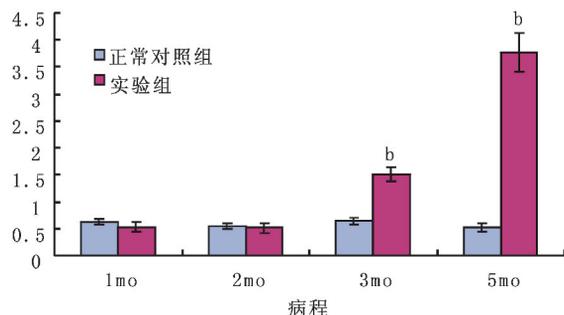


图5 正常对照组与不同病程糖尿病大鼠视网膜中 VEGF/PEDF 阳性染色密度比值 注: <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组。

细胞、血管内皮细胞能够产生 VEGF, 其受体主要分布于血管内皮细胞。在正常生理状况下其表达量很少, 而在胚胎时期、炎症、肿瘤、糖尿病等病理状况下, 产生高表达。VEGF 可以增加微血管的通透性、增加组织因子和某些蛋白酶的生成; 可直接作用于血管内皮细胞, 促进血管内皮细胞增殖、迁移, 从而诱导血管新生。而 PEDF 是目前发现最重要的新生血管抑制因子<sup>[3]</sup>, 眼内 PEDF 主要由 RPE 细胞产生, 分布于角膜上皮细胞、角膜内皮细胞、晶状体上皮细胞、睫状体上皮细胞、神经节细胞、感光细胞和视网膜色素上皮细胞。其在生理性和病理性的眼底新生血管生成过程中起着重要作用, 作用机制主要包括: 在早期 DR 病程中 PEDF 通过抑制 NADPH 氧化酶来发挥抗氧化及保护作用<sup>[4]</sup>; 通过上调 FasL, 选择性促进活化的血管内皮细胞凋亡<sup>[5]</sup>; 在体外抑制 AGE<sub>s</sub> 诱导的内皮细胞损伤, 同时在小鼠体内抑制 AGE 诱导的视网膜血管增生<sup>[6]</sup>; 通过抑制成纤维母细胞生长因子 (FGF) 对内皮细胞的修复, 从而抑制血管新生<sup>[7]</sup> 等。

正常组织中血管的稳态是由相互制约的调节系统: 新生血管促进剂和抑制剂系统来调控的, 二者之间的平衡对新生血管的调节十分重要。Ogata 等<sup>[8]</sup> 检测增殖型糖尿病视网膜病患者玻璃体内 PEDF 和 VEGF 的分布情况, 发现 PEDF 的表达降低而 VEGF 的表达升高, 表明 PEDF 的表达降低而 VEGF 的表达升高可能是糖尿病视网膜病变新生血管形成的主要原因。Ren 等<sup>[9]</sup> 发现 PEDF 与整联蛋白结合后能释放蛋白酪氨酸磷酸酶, 阻止 VEGF 受体磷酸化, 从而阻断此信号的传导通路, 减少了 VEGF 引起的

血管内皮细胞的增殖和移动。吴晋晖等<sup>[10]</sup> 研究结果与我们类似<sup>[11]</sup>, 证明 VEGF 在糖尿病大鼠视网膜的表达加强, 而 PEDF 减弱, 表明二者平衡的打破可能是糖尿病视网膜病变新生血管形成的主要原因。在本文中我们不但探讨了 VEGF 和 PEDF 两者分别在不同病程糖尿病大鼠视网膜脉络膜中的变化情况, 而且还分析了 VEGF/PEDF 比值在糖尿病病程中的变化规律。结果显示 VEGF 在视网膜脉络膜中的表达水平随病程的发展逐渐增强; 而 PEDF 与之相反, 在视网膜的表达逐渐减弱, 在脉络膜中却未被检测到阳性表达, VEGF/PEDF 两者的比值也随病程的发展而逐渐增加, 以上结果进一步表明由于缺乏或减少 PEDF 的拮抗从而导致了 VEGF 的过度表达。

实验中正常大鼠和糖尿病大鼠的脉络膜均无 PEDF 阳性表达, 推测原因: 一方面是由于脉络膜主要由血管构成, 目前还没有血管内皮细胞能分泌 PEDF 的报道; 另一方面, DR 按病变严重程度分为非增生期 (BDR) 和增生期 (PDR), 有报道半乳糖狗的动物模型在饲养 8a 才发生 PDR<sup>[9]</sup>, STZ 大鼠饲养到 12mo 也还未见 PDR 的改变<sup>[10]</sup>。由此可见, 5mo 的糖尿病大鼠尚无病理性新生血管的形成, 故本实验 PEDF 在脉络膜的表达与正常大鼠无差别, 也间接证明 PEDF 在破坏新形成的血管但不损害已存在的血管方面具有选择性。

#### 参考文献

- 李明新. 早期大鼠实验性糖尿病视网膜病变模型的建立及观察. 徐州医学院学报 2005;25(5):436-440
- 江志坚, 董健鸿, 王惠英, 等. 链脲佐菌素诱导建立 Sprague-Dawley 大鼠糖尿病视网膜病变模型的评价. 上海医学 2010;33(1):85-86
- 步建平, 周善璧, 程琳. PEDF 对大鼠穿透性角膜移植片 VEGF 影响的实验研究. 重庆医科大学学报 2009;34(2):152-156
- Yoshida Y, Yamagishi S, Matsui T, et al. Protective role of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in early phase of experimental diabetic retinopathy diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2009;25(7):678-686
- Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, et al. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(5):2593-2597
- Naamura K, Yamagishi S, Matsui T, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits neointimal hyperplasia after vascular injury by blocking NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation. *Am J Pathol* 2007;170(6):2159-2170
- Hutchings H, Maitre-Boube M, Tambrarr-Tink J, et al. Pigment epithelium-derived factor exerts opposite effects on endothelial cells of different phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294(4):764-769
- Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T. Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2002;134(3):348-353
- Ren JG, Jie C, Talbot C. How PEDF prevents angiogenesis a hypothesized pathway. *Med Hypotheses* 2005;64(1):74-78
- 吴晋晖, 高玉, 柳林. 不同病程糖尿病大鼠视网膜 VEGF 和 PEDF 表达的动态变化. 眼科新进展 2010;30(9):809-814
- 周希瓊, 李琳, 江雪丰, 等. 血管内皮生长因子在糖尿病大鼠脉络膜视网膜的表达. 第三军医大学学报 2007;29(1):47-50