

血管抑素对角膜新生血管和 VEGF 表达的作用

曾 静, 罗殿中, 黄明汉, 邓妮妮, 党裔武

基金项目: 中国广西壮族自治区自然科学基金资助项目 (No. 0728131); 中国广西壮族自治区教育厅研究生科研创新基金资助项目 (No. 2008105981001D24)

作者单位: (530021) 中国广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院眼科

作者简介: 曾静, 女, 博士, 副主任医师, 研究方向: 眼表疾病及屈光手术。

通讯作者: 罗殿中, 男, 博士, 教授, 研究方向: 新生血管的抑制。luodianzhong@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-04-21 修回日期: 2010-05-20

Effect of angiostatin on rat corneal neovascularization and the expression of vascular endothelial growth factor

Jing Zeng, Dian-Zhong Luo, Ming-Han Huang, Ni-Ni Deng, Yi-Wu Dang

Foundation items: Natural Science Research Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, China (No. 0728131); Post-graduate Science Research Foundation of Department of Education in Guangxi Zhuang Autonomous Region, China (No. 2008105981001D24)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Dian-Zhong Luo. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. luodianzhong@yahoo.com.cn

Received: 2010-04-21 Accepted: 2010-05-20

Abstract

• **AIM:** To investigate the anti-angiogenesis effect of angiostatin (AS) on rat corneal neovascularization (CNV) and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF).

• **METHODS:** CNV models were established in 105 SD rats, which were randomly divided into normal group (5 SD rats) and experimental group (100 SD rats, induced by alkali burn): normal saline group, 1g/L dexamethasone group, and different concentration angiostatin-treated group (group AS1 10 μ g/mL and group AS2 20 μ g/mL). Slit-lamp microscope was performed and the area of CNV was calculated on 3, 7, 14, 21 day after injury. Then 5 rats were randomly sacrificed and the corneas were taken for histopathological and immunohistochemistry examination.

• **RESULTS:** The area of CNV in the AS groups was

smaller than that in the normal saline group 3 days after cautery ($P < 0.05$). The expression of VEGF had statistically significant difference between AS group and normal saline group ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** AS can effectively inhibit rat CNV after alkali burn. The mechanism probably is down-regulation of the expression of VEGF.

• **KEYWORDS:** alkali burn; corneal neovascularization; angiostatin; vascular endothelial growth factor

Zeng J, Luo DZ, Huang MH, et al. Effect of angiostatin on rat corneal neovascularization and the expression of vascular endothelial growth factor. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(6):1052-1055

摘要

目的: 探讨血管抑素 (angiostatin, AS) 对鼠碱烧伤角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 及血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达的作用, 探讨 AS 对 CNV 的作用及机制。

方法: SD 大鼠 105 只随机分为正常对照组 (5 只)、生理盐水组、地塞米松组、AS1 组、AS2 组 (各 25 只), 除正常组外, 实验各组制作左眼碱烧伤 CNV 模型, 分别予生理盐水、1g/L 地塞米松液、10 μ g/mL AS 液、20 μ g/mL AS 液点眼, 4 次/d, 于碱烧伤后 1, 3, 7, 14, 21d 运用裂隙灯、免疫组织化学方法观察新生血管长度及面积、VEGF 的表达。

结果: AS 治疗组碱烧伤后第 3d 起各时间点 CNV 面积均明显小于盐水组 ($P < 0.05$)。碱烧伤后各时间点 AS 治疗组 VEGF 表达量均明显少于盐水组 ($P < 0.05$)。

结论: AS 能显著抑制碱烧伤 CNV, 可能与其抑制 VEGF 的表达有关。

关键词: 碱烧伤; 角膜新生血管; 血管抑素; 血管内皮生长因子

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.06.010

曾静, 罗殿中, 黄明汉, 等. 血管抑素对角膜新生血管和 VEGF 表达的作用. 国际眼科杂志 2010;10(6):1052-1055

0 引言

眼碱烧伤是临床常见的致盲性眼病, 特别是中重度眼部烧伤导致的角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 可破坏角膜正常微环境, 致角膜失去透明性, 是目前难治性角膜疾病及角膜移植晚期最棘手的难题。血管抑素 (angiostatin, AS) 是近年来新发现的一种新生血管抑制剂^[1], 对新生血管有较强的抑制作用, 但其机制尚未清楚。血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor,

VEGF)是一个有效的内源性血管生成因子,对角膜新生血管具有很强的促进作用^[2]。我们通过大鼠碱烧伤 CNV 模型,探讨 AS 对 CNV, VEGF 表达的作用及机制,结果显示 AS 能显著抑制碱烧伤 CNV,可能与其抑制 VEGF 的表达有关。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年 SD 大鼠 105 只,体质量 250 ± 20 g,雌雄兼有,由广西医科大学实验动物中心提供。实验前裂隙灯检查无眼前节病变。随机取 5 只作正常对照。其余 100 只制作碱烧伤 CNV 模型,并随机分成 4 组,每组 25 只,分别予生理盐水、1g/L 地塞米松液、10 μ g/mL AS 液、20 μ g/mL AS 液滴眼。重组人血管抑素:美国 Sigma 公司,灭菌生理盐水无菌配制成 10 μ g/mL, 20 μ g/mL 液分装,4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。兔抗 VEGF 多克隆抗体及 DAB 试剂盒:博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 碱烧伤动物模型制作 大鼠 100 只 100g/L 水合氯醛麻醉后,左眼滴 10g/L 地卡因眼液表面麻醉,10g/L 阿托品散瞳,将统一规格直径 3.0mm 单层圆形滤纸浸入 1mol/L 的 NaOH 溶液中 20s,吸干多余溶液后快速贴于角膜中央表面 40s 后取下,生理盐水冲洗 1min,随机分成 4 组,每组 25 只。分别予生理盐水、1g/L 地塞米松眼液、10 μ g/mL AS 液(AS1 组)、20 μ g/mL AS 液(AS2 组)滴眼,4 次/d 至实验结束。3g/L 氧氟沙星眼液及 10g/L 阿托品眼液点眼,3 次/d 共 1wk。

1.2.2 碱烧伤 CNV 的动态定量分析 伤后每日裂隙灯显微镜观察角膜炎症反应,CNV 长出后隔天观察,双角规测量从角膜缘长出的 CNV 长度,依据公式 $S = C / 12 \times 3.1416 [r^2 - (r-L)^2]$ 计算 CNV 面积,C 代表角膜血管网所占的圆周数,L 代表血管从角膜缘伸入角膜的长度,r 代表角膜半径。

1.2.3 角膜组织病理学及免疫组化检查 碱烧伤后 1,3,7,14,21d 各组分别取 5 只大鼠处死,取左眼角膜进行病理组织学检查。角膜标本 40g/L 甲醛固定、石蜡包埋,切片,备 HE 染色及免疫组化检测 VEGF 表达。免疫组化染色采用二步法,按照试剂盒说明进行,以生理盐水代替一抗为阴性对照。以组织内出现棕黄色颗粒为阳性判断标准,细胞膜和细胞质不染色为阴性,根据染色强度阳性分为:+(黄色)、++(棕黄色)、+++ (棕黑色)。将染色结果采用 Q-550 病理图像分析仪分析 VEGF 含量,每张切片随机取 5 个视野,10 \times 40 倍镜下作图像分析,计算 5 个视野的平均光密度(optical density, OD)。

统计学分析:资料经整理后,应用 SPSS 12.0 软件包进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 的方式表示,组间比较采用最小显著差法(LSD)单因素方差分析(ANOVA),显著性水平以双侧 $P < 0.05$ 判断。

2 结果

2.1 角膜新生血管生长情况 碱烧伤后第 3d 起盐水组可见 CNV 生长,地塞米松组及 AS1, AS2 组无明显血管;7d 至 14d,各组 CNV 生长速度加快,盐水组 CNV 粗大,越过瞳孔,布满角膜;地塞米松组及 AS1, AS2 组 CNV 较稀疏,部分达碱烧伤区,未见越过瞳孔;碱烧伤后 21d,盐水组 CNV 略消退,但仍占据角膜大部分,地塞米松组及 AS1, AS2 组 CNV 消退明显,碱烧伤后各时间点地塞米松组及

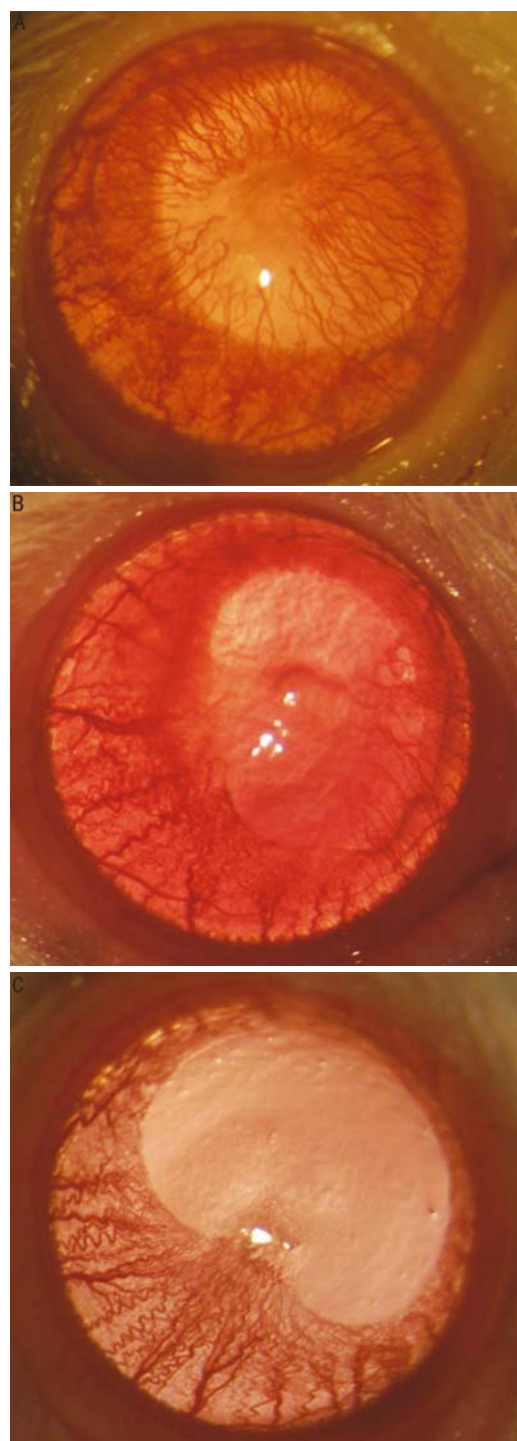


图 1 角膜碱烧伤后 14d CNV 生长情况 A:盐水组,角膜水肿消退,CNV 密集生长,跨越瞳孔区;B:地塞米松组,角膜中央上皮水肿糜烂,CNV 变得致密,长入角膜烧伤区;C:AS2 组,角膜透明,CNV 稀疏。

AS1, AS2 组 CNV 面积均较盐水组少($P < 0.05$),AS2 组碱烧伤 7d 后各时间点新生血管面积均较地塞米松组减少($P < 0.05$,表 1)。

2.2 角膜组织病理学检查 碱烧伤后 1d,盐水组角膜上皮脱落,角膜大量中性粒细胞浸润;而地塞米松组、AS1 组、AS2 组角膜上皮 1~2 层,炎症细胞较少。烧伤后 3d,盐水组角膜上皮不完整,角膜基质水肿明显,可见大量中性粒细胞浸润,出现新生血管芽,新生血管周围有炎症细胞聚集;地塞米松组、AS1, AS2 组角膜上皮欠完整,少量炎症细胞浸润,地塞米松组可见细小新生血管芽,而 AS1, AS2 组

表1 碱烧伤后各组 CNV 面积 ($\bar{x} \pm s, \text{mm}^2$)

组别	CNV 面积			
	3d	7d	14d	21d
盐水组	12.16 ± 1.38	21.88 ± 2.57	28.88 ± 4.00	23.64 ± 3.22
地塞米松组	7.64 ± 1.08 ^a	14.88 ± 1.61 ^a	16.44 ± 1.81 ^a	14.84 ± 1.96 ^a
AS1 组	6.66 ± 1.06 ^a	12.50 ± 1.66 ^{a,c}	14.40 ± 1.33 ^a	12.52 ± 1.06 ^a
AS2 组	6.18 ± 0.70 ^a	10.64 ± 1.32 ^{a,c}	12.06 ± 0.79 ^{a,c,e}	10.54 ± 1.23 ^{a,c}

^a $P < 0.05$ vs 盐水组; ^c $P < 0.05$ vs 地塞米松组; ^e $P < 0.05$ vs AS1 组。

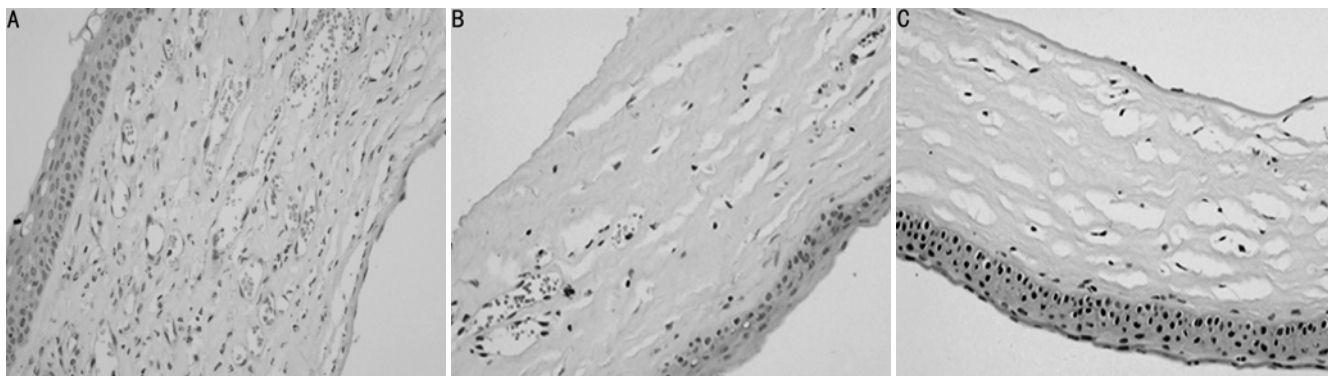


图2 角膜碱烧伤后 14d 组织病理学检查(HE × 40) A: 盐水组,角膜上皮 3~4 层,基质层水肿,胶原排列紊乱,较多炎症细胞浸润,大量新生血管;B: 地塞米松组,角膜上皮 2~3 层,基质层水肿,纤维排列欠规则,少许炎症细胞,新生血管较少;C: AS2 组,角膜上皮 4~5 层,基质层轻度水肿,很少炎症细胞,新生血管较少。

表2 碱烧伤后不同时间各组角膜 VEGF 平均 OD 值 $\bar{x} \pm s$

组别	1d	3d	7d	14d	21d
盐水组	0.31 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.80 ± 0.07	0.44 ± 0.05	0.30 ± 0.03
地塞米松组	0.20 ± 0.02 ^a	0.26 ± 0.02 ^a	0.44 ± 0.03 ^a	0.25 ± 0.02 ^a	0.17 ± 0.02 ^a
AS1 组	0.17 ± 0.02 ^a	0.23 ± 0.02 ^a	0.34 ± 0.02 ^a	0.22 ± 0.03 ^a	0.15 ± 0.02 ^a
AS2 组	0.12 ± 0.01 ^{a,c,e}	0.18 ± 0.01 ^{a,c,e}	0.27 ± 0.03 ^{a,c,e}	0.19 ± 0.02 ^{a,c}	0.12 ± 0.01 ^{a,c}

^a $P < 0.05$ vs 盐水组; ^c $P < 0.05$ vs 地塞米松组; ^e $P < 0.05$ vs AS1 组。

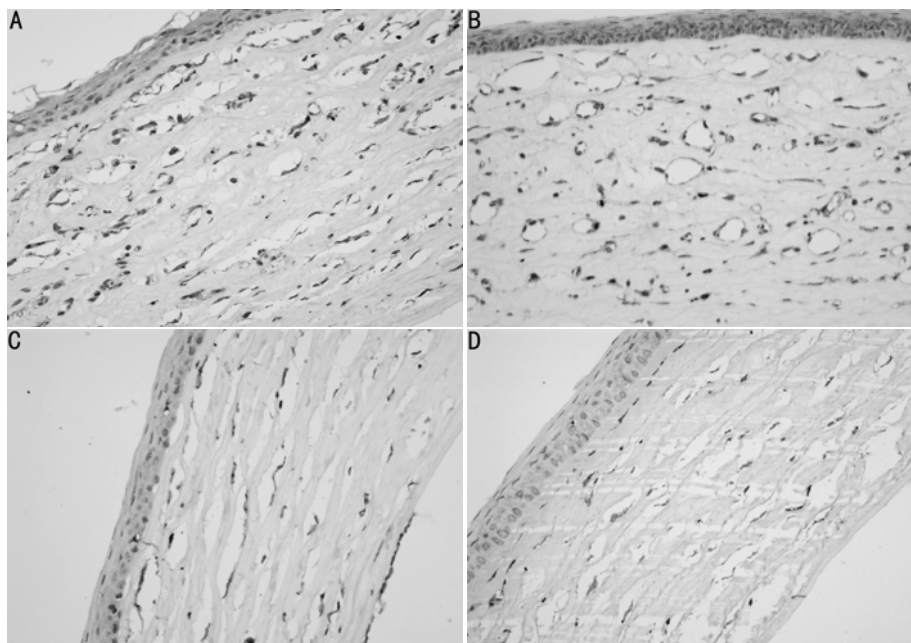


图3 碱烧伤后 7d VEGF 免疫组织化学染色(× 40) A: 盐水组;B: 地塞米松组;C: AS1 组;D: AS2 组。

很少见新生血管。碱烧伤后第 7~14d,盐水组角膜有 1~2 层上皮细胞,成纤维细胞增生显著,仍可见炎症细胞浸润,较多新生血管,少数血管呈较成熟状态,血管腔较大,管腔内充满红细胞;而 AS1 组,AS2 组角膜上皮有 2~3 层细

胞,炎症细胞少,新生血管明显少于盐水组(图 2A-C)。碱烧伤后 21d,盐水组角膜上皮完整,炎症细胞浸润较少,新生血管数量减少;地塞米松组角膜上皮脱落,可见溃疡,炎症细胞稍多,AS1 组、AS2 组角膜上皮完整,很少炎症细胞

浸润。

2.3 免疫组化检测 VEGF 表达结果 VEGF 主要表达于细胞膜和细胞质,碱烧伤后 1~3d,各组可见 VEGF 在炎症细胞胞质表达,盐水组 + ~ + +,地塞米松组、AS1 组、AS2 组呈 +;碱烧伤后 7d,各组 VEGF 表达均达高峰,盐水组可见较多炎症细胞浸润及大量 CNV,VEGF 表达呈 + + +,地塞米松组呈 + + ~ + + +、AS1 组、AS2 组呈 + + (图 3A-D);碱烧伤后 14d 各组 VEGF 表达有所下降,盐水组呈 + +,地塞米松组、AS1 组、AS2 组血管内皮细胞阳性染色,呈 + ~ + +;碱烧伤后 21d,各组 VEGF 表达明显减弱,碱烧伤后各时间点 AS 治疗组 VEGF 表达量均低于盐水组。将染色结果采用德国 Leica 公司 Q-550 病理图像分析仪分析 VEGF 含量,以平均光密度 (optical density, OD) 值表示,结果显示 AS 治疗组与盐水组有显著性统计学差异 ($P < 0.05$, 表 2)。

3 讨论

CNV 与角膜化学伤、角膜炎症及角膜移植排斥反应密切相关,CNV 引起的角膜病变是目前难治性角膜疾病及角膜移植晚期最棘手的难题。CNV 形成机制目前尚未完全阐明,许多因素参与 CNV 形成过程。VEGF 是一个有效的内源性角膜血管生长因子,对角膜新生血管具有很强的促进作用,Philipp 等^[2]发现,角膜受伤时角膜中 VEGF 的超常表达,160ng VEGF 即可诱导家鼠角膜新生血管,抑制 VEGF 可以显著降低新生血管的形成。周炼红等^[3]亦报道碱烧伤后大鼠角膜 VEGF 的表达水平与 CNV 的形成相关。

我们发现 VEGF 在正常角膜仅有微弱表达,主要表达于角膜上皮,碱烧伤后各组 VEGF 表达均增强,但 AS 治疗组明显低于盐水组。碱烧伤早期,VEGF 在角膜缘表达增加,随时间推移 VEGF 表达逐渐增强,主要表达于角膜上皮细胞、浸润的炎症细胞和新生血管内皮细胞胞质内。各组 VEGF 表达于 7~14d 达高峰,与此同时,各组 CNV 生

长速度最快,此后 VEGF 表达逐渐减弱,CNV 生长速度变慢,VEGF 表达与 CNV 增殖平行。AS 是迄今发现的最有效的血管生成抑制剂之一^[1],研究发现 AS 对 CNV 有较强的抑制作用^[4]。AS 抑制 CNV 的机制尚不清楚,以往的文献多着重研究其对血管内皮细胞的作用^[5],鲜见 AS 对 VEGF 作用的研究,我们的实验结果发现 AS 治疗组碱烧伤后各时间点 VEGF 表达较盐水组低 ($P < 0.05$)。说明 AS 抑制了 VEGF 表达,AS 治疗组 CNV 面积较盐水组减少 ($P < 0.05$),提示 AS 能通过抑制 VEGF 表达抑制碱烧伤 CNV 的生长。同时在碱烧伤早期,AS 治疗组角膜炎症反应及炎症细胞浸润较少,作用与地塞米松相当,晚期 AS 治疗组角膜透明,地塞米松组角膜出现溃疡,说明 AS 治疗碱烧伤 CNV 具有较好的效果,同时能抑制角膜炎症反应,优于地塞米松。目前 AS 已在美国进行临床 I 期实验,未显示剂量限制性毒性^[6],不会诱发免疫反应,具有较好的临床应用前景。

参考文献

- 1 O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994;79(21):315-328
- 2 Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(9):2514-2522
- 3 周炼红,邢怡桥,张云成. 角膜碱烧伤后 VEGF 的表达与新生血管的关系. *眼科新进展* 2005;25(4):315-317
- 4 曾静,黄明汉,王国华,等. 血管抑素抑制大鼠角膜新生血管的研究. *眼科研究* 2009;27(6):468-471
- 5 Veitonmaki N, Cao R, Wu LH, et al. Endothelial cell surface ATP synthase-triggered caspase-apoptotic pathway is essential for k1-5-induced antiangiogenesis. *Cancer Res* 2004;64(10):3679-3686
- 6 Tandle A, Blazer DG 3 Yd, Libutti SK. Anti-angiogenic gene therapy of cancer: recent developments. *J Transl Med* 2004;2(1):22-42