

# VEGF 在 PDR 中的表达及作用的研究

朱洪丽

作者单位: (110031) 中国辽宁省沈阳市第四人民医院眼科

作者简介: 朱洪丽, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 青光眼、眼底病。

通讯作者: 朱洪丽. xinchengxuzhu@126.com

收稿日期: 2014-05-31 修回日期: 2014-11-20

## Investigation of correlations between vascular endothelial growth factor and proliferative diabetic retinopathy

Hong-Li Zhu

Department of Ophthalmology, Shenyang No. 4 People's Hospital, Shenyang 110031, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Hong-Li Zhu. Department of Ophthalmology, Shenyang No. 4 People's Hospital, Shenyang 110031, Liaoning Province, China. xinchengxuzhu@126.com

Received: 2014-05-31 Accepted: 2014-11-20

### Abstract

• **AIM:** To determine the relations between the changes of vascular endothelial growth factor (VEGF) concentration in plasma, aqueous humor and vitreous of patients with diabetic retinopathy (DR) and proliferative diabetic retinopathy (PDR), as well as to find if the condition of metabolism control of patients with DR may affect the VEGF level.

• **METHODS:** Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure the levels of VEGF concentration in plasma of non-diabetic retinopathy (NDR) patients group, background diabetic retinopathy (BDR) patients group, and proliferative diabetic retinopathy (PDR) patients group. The levels of HbA1c in plasma of patients in above three groups were measured at the same time. The VEGF concentration in aqueous humor, vitreous of PDR patients group and normal group was also measured for further comprehensive analysis. Human VEGF immunoassay Quantikine with high sensibility and quality was imported from R&D Co. LTD., USA.

• **RESULTS:** There was an increasing tendency in the VEGF concentration in aqueous humor of PDR patients group. There was no statistically significant difference as it was compared with normal group ( $P > 0.05$ ). The VEGF concentration in vitreous of PDR patients group was obviously increased, there was significant difference as it was compared with normal group ( $P < 0.01$ ). It showed an increasing tendency of VEGF concentration in turn in plasma, aqueous humor and vitreous of the 3 PDR patients selves. It showed that there was significant

difference among VEGF concentration in plasma, aqueous humor and vitreous of all the PDR patients ( $P < 0.01$ ). In normal group there was no significant difference among VEGF concentration in plasma, aqueous humor and vitreous ( $P > 0.05$ ). In normal group the VEGF concentration in plasma was the highest, but in PDR patients group the VEGF concentration in vitreous was the highest.

• **CONCLUSION:** The significantly increased VEGF concentration in eyes, especially in vitreous of PDR patients may play an important role in development and deterioration of DR. It was clear that VEGF played its normal biological functions mainly in plasma in normal human. In severe DR patients, abnormal high may come from ischemic and VEGF concentration in vitreous suggested that it hypoxic retina and there was a tendency to diffuse towards the front of eyes.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; non-diabetic retinopathy; background diabetic retinopathy; proliferative diabetic retinopathy; vascular endothelial growth factor; enzyme linked immunosorbent assay; vitreous; aqueous humor; plasma

**Citation:** Zhu HL. Investigation of correlations between vascular endothelial growth factor and proliferative diabetic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(12):2223-2225

### 摘要

**目的:** 研究增殖性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 患者血液、房水、玻璃体中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 含量的变化, 探讨 VEGF 与 PDR 的关系, 为抗 VEGF 药物治疗的给药途径及剂量等提供理论依据。

**方法:** 采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定法定量检测无糖尿病视网膜病变 (NDR) 组, 单纯性糖尿病视网膜病变 (BDR) 组, 增殖性糖尿病视网膜病变 (PDR) 组患者和正常对照组血浆中 VEGF 含量, 还检测 PDR 患者房水、玻璃体中和正常对照组房水、玻璃体中 VEGF 含量, 并进行综合分析。试剂盒购自美国 R&D 公司, 其质量和灵敏度相对较高。

**结果:** PDR 组房水中 VEGF 含量有增高趋势, 但与正常对照组比较, 无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。PDR 患者玻璃体中 VEGF 含量明显增高, 与正常对照组比较差异非常显著 ( $P < 0.01$ )。PDR 组自身血浆、房水、玻璃体中 VEGF 含量比较有逐渐增高趋势, 三者之间有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。正常对照组血浆、房水、玻璃体中 VEGF 含量三者之间无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。血浆 VEGF 含量在正常对照组中最高, 而玻璃体中 VEGF 含量在 PDR 患者中最高。

**结论:** PDR 患者眼内尤其是玻璃体中 VEGF 含量大幅度增

高,可能对促进 DR 发展恶化起了关键性的作用。在正常人,VEGF 更多地存在于血浆中发挥其生物学效应。在严重 DR 患者中,玻璃体中异常地出现大量 VEGF,推测来自缺血缺氧的视网膜,并可能有向眼前段扩散的趋势。

**关键词:**糖尿病视网膜病变;无糖尿病视网膜病变;单纯性糖尿病视网膜病变;增殖性糖尿病视网膜病变;血管内皮生长因子;酶联免疫吸附试验;玻璃体;房水;血浆

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.12.32

**引用:**朱洪丽.VEGF 在 PDR 中的表达及作用的研究.国际眼科杂志 2014;14(12):2223-2225

## 0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)晚期微血管并发症的眼部表现,是一种具有特异性发生发展的眼底病变。多年来西方发达国家中因其高发病率、高致盲率而一直是医学界研究的热点。在我国随着人民生活水平的日益提高,糖尿病患者也逐渐增多,DR 发病率呈升高趋势,已成为成人主要致盲眼病之一,其确切的发病机制仍然不明。大多数学者认为主要与多元醇代谢亢进、蛋白激酶 C 活化、非酶糖化反应、氧化还原异常等有关;是在长期慢性高血糖的基础上,受全身新陈代谢、内分泌、血液等异常因素的影响而发病。其本质是高血糖状态下视网膜血管特别是毛细血管围绕视网膜组织的机能性、器质性病变导致的血管源性病变。

国内外一些学者通过实验表明,糖尿病大鼠的视网膜血管通透性大为增加,同时视网膜内 VEGF mRNA 也显著亢进。并发现在单纯性糖尿病视网膜病变(BDR)患者视网膜 VEGF 表达明显增强,在视网膜 Müller 细胞、视乳头的神经胶质细胞也有较强的表达。有学者通过检测 PDR 患者玻璃体中 VEGF 含量发现玻璃体中 VEGF 含量显著增高。根据文献现今所报道的有关 VEGF 的研究大多局限在视网膜、玻璃体。但在 VEGF 眼内表达增高的同时其血浆、房水的表达如何?其与血糖控制情况的关系如何?本课题针对上述问题选择 VEGF 为研究对象,拟通过检测血浆、房水、玻璃体中 VEGF 含量来研究 VEGF 的变化与 DR 的关系并进行分析讨论,为探讨研究 DR 的发病机制提供进一步的依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人 VEGF ELISA 试剂盒(Human VEGF Immunoassay Quantikine)购自美国 R&D 公司,灵敏度 10pg/mL,最低检测极限 0.1mL。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本分组及采集方法** 临床资料及分组:本课题所研究糖尿病患者均来自我院和外院内分泌科明确诊断为 2 型糖尿病的患者,口服降糖药或胰岛素控制血糖。收集病例标本总计 35 例,其中男 19 例,女 16 例,平均年龄 49.4 岁。根据眼底检查和 FFA 确诊,按眼底病学组制定的糖尿病视网膜病变分型分期标准进行分组。血浆标本 35 例:无糖尿病视网膜病变(NDR)11 例,男 8 例,女 3 例,平均年龄 43.5 岁;单纯性糖尿病视网膜病变(BDR)11 例,男 3 例,女 8 例,平均年龄 54.5 岁;增殖性糖尿病视网膜病变(PDR)13 例,男 8 例,女 5 例,平均年龄 46.5 岁。因对 NDR 组和 BDR 组患者不宜取房水、玻璃体标本,故只取血浆标本。以上玻璃体及房水标本均取自在我院眼科行手术治疗患者。正常对照组标本共 18 例;其中血浆

标本 8 例;取自来我科行眼肌矫正术的健康人,其中男 6 例,女 2 例,平均年龄 17 岁;房水标本 4 例:取自来我科行老年性白内障手术患者,除老年性白内障外无全身其他疾病,男 1 例,女 3 例,平均年龄 62.2 岁;玻璃体标本 6 例:取自本院角膜移植供体眼。

**1.2.2 双抗体夹心酶联免疫吸附试验检测 VEGF** 应用定量的双抗体夹心酶联免疫检测法。抗人 VEGF 单抗包被于酶标板上,人标本中的 VEGF 会与单抗结合。加入生物素化的抗人 VEGF(二抗),它将与结合在单抗上的人 VEGF 结合而形成免疫复合物,未结合的将被洗去。辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 将与二抗的生物素结合,多余的物质会被洗掉。加入 TMB 显色。人 VEGF 的浓度与 OD(450nm)成正比。

统计学分析:实验结果用 SAS 9.1 软件包进行统计,实验结果用均数和标准差表示。因实验数据呈非正态分布,方差不齐,故组间比较采用秩和检验,相关分析采用直线相关分析, $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组血浆中 VEGF 含量的比较** NDR 组和 BDR 组及 PDR 组含量分别为  $34.47 \pm 17.67$ ,  $53.93 \pm 30.86$ ,  $53.36 \pm 32.87$  pg/mL,各病变组分别与正常对照组( $178.30 \pm 101.37$  pg/mL)比较,含量均显著降低,差异显著( $P < 0.01$ )。BDR 组血浆中 VEGF 含量与 PDR 组血浆中 VEGF 含量比较无显著性差异( $P > 0.05$ )。

**2.2 PDR 组与正常对照组玻璃体中 VEGF 含量的比较** PDR 组玻璃体中 VEGF 含量为  $592.48 \pm 420.27$  pg/mL,正常对照组玻璃体中 VEGF 含量为  $131.30 \pm 112.15$  pg/mL,两组比较差异显著( $P < 0.01$ )。

**2.3 PDR 组与正常对照组房水中 VEGF 含量的比较** PDR 组房水中 VEGF 含量为  $184.86 \pm 126.08$  pg/mL,正常对照组房水中 VEGF 含量为  $90.06 \pm 58.32$  pg/mL,两组比较无显著性差异( $P > 0.05$ )。

**2.4 PDR 组和正常对照组血浆、房水、玻璃体中 VEGF 含量的比较** PDR 组血浆、房水、玻璃体三者 VEGF 含量有显著性差异( $P < 0.01$ ),其中血浆与玻璃体 VEGF 含量比较有显著性差异( $P < 0.01$ );但血浆与房水、房水与玻璃体 VEGF 含量比较均无显著性差异( $P > 0.05$ )。正常对照组血浆、房水、玻璃体三者 VEGF 含量无显著性差异( $P > 0.05$ )。综观 VEGF 在 PDR 患者与正常对照组血浆、房水、玻璃体中的分布可发现,PDR 患者玻璃体中 VEGF 含量最高,而正常对照组血浆中 VEGF 含量最高。

**2.5 三病例组 VEGF 含量与性别和年龄及病程的相关分析** PDR 组玻璃体中 VEGF 含量与性别、年龄、病程无相关关系;PDR 患者房水中 VEGF 含量与性别、年龄、病程亦无相关关系。NDR 组和 BDR 组及 PDR 组患者血浆中 VEGF 含量与性别、年龄、病程均无相关关系。

## 3 讨论

二十世纪末,分子生物学有了突飞猛进的发展。发现许多新生血管因子与 DR 有关,如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)、成纤维细胞生长因子(basisfibroblast growth factor, bFGF)、胰岛素样生长因子(insulin like growthfactor, IGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等。其中 VEGF 由于其特殊作用受到人们的重视,在各个领域研究的均很多,在眼科领域被认为是寻找了半个世纪的“视网膜因子”。

正常情况下 VEGF 具有促进内皮细胞增殖、增加血管通透性、诱导血管生成等多种生理功能,这对出生早期动物生长和存活以及成年动物维持血管的正常生理活动均极为重要。在病理情况下 VEGF 对肿瘤生长、转移和炎症反应以及新生血管的形成过程均起作用,特别是在新生血管性疾病中,因而也是糖尿病视网膜病变研究中的热点。

**3.1 VEGF 的意义** 实验表明在有糖尿病视网膜病变,即使在单纯期,VEGF 在眼内表达也是增加的<sup>[1,2]</sup>。由此可见 VEGF 在糖尿病视网膜病变发展中,尤其在新生血管形成中是与其关系极为密切的一个因子<sup>[3]</sup>,VEGF 不仅参与了新生血管的整个过程,还参与了 DR 病变的整个过程<sup>[4]</sup>。黄斑水肿是糖尿病视力下降的主要原因,这与 VEGF 引起视网膜血管通透性亢进,血-视网膜屏障被破坏有关。高木均通过对黄斑下的硬性渗出进行免疫组化检测发现 VEGF 在硬性渗出的巨噬细胞、色素上皮细胞和细胞间质中显著增加。这说明黄斑水肿的发生与持续的原因与 VEGF 有关<sup>[5]</sup>。为抗 VEGF 药物治疗糖性黄斑水肿提供了理论依据<sup>[6]</sup>。

**3.2 糖尿病视网膜病变患者血浆中的 VEGF** 在正常人血浆中存在一定浓度的 VEGF,这对维持成人血管正常形态和功能有重要作用。当血浆中正常量的 VEGF 减少时,这种维持血管正常形态和功能的作用也受到损害,并直接损害毛细血管内皮细胞功能,导致微血管病变。从本实验结果中可以发现糖尿病患者血浆中 VEGF 含量较正常对照组明显降低。这个结果与以往文献报道相一致<sup>[7-9]</sup>。另外,还有学者实验发现患糖尿病小鼠伤口部位 VEGF mRNA 表达水平明显降低,说明 VEGF 缺乏<sup>[10,11]</sup>。实验表明:在糖尿病早期阶段即无糖尿病视网膜病变时,和在糖尿病中晚期阶段即单纯型、增殖性糖尿病视网膜病变时,血浆 VEGF 含量均无明显变化。而且本实验结果还表明玻璃体中 VEGF 的变化与血浆中 VEGF 的变化不同步,提示糖尿病视网膜病变本身的进展恶化受血浆中 VEGF 的直接影响不大。故抗 VEGF 药物治疗不采用静脉给药<sup>[6]</sup>。

也有意见不一的报道,国内黄厚斌检测 DR 患者血浆中 VEGF,结果为 VEGF 在对照组、无视网膜病变组、背景型 DR 组中逐渐升高,而增殖性糖尿病视网膜病变组却降低。实验结果的不同可能与病例选择标准、检测方法、试剂盒灵敏度有关。

**3.3 增殖性糖尿病视网膜病变房水中的 VEGF** 本实验研究结果发现,正常人房水中 VEGF 含量显著低于正常人血浆中 VEGF 含量,说明正常人房水中也存在一定浓度的 VEGF,但含量极低。若接近血浆中的含量,则提示为异常现象。我们发现增殖性糖尿病视网膜病变患者的房水中 VEGF 含量比正常对照组含量明显增高,几乎是其的 2 倍,与正常人血浆含量接近。虽然在统计学上无显著性差异,这可能与样本例数较少有关。因取房水标本较其他标本困难更大些,有待于今后进一步研究中加以完善。

本实验所收集到的病例均未发现虹膜红变。虹膜红变一般出现极晚,发生在较长病程的视网膜新生血管、玻璃体出血之后,是增殖性糖尿病视网膜病变晚期的表现之一,往往发展为顽固的新生血管性青光眼,是导致糖尿病患者致盲的原因之一。因而玻璃体腔注射抗 VEGF 药物,设法减少玻璃体中的 VEGF 含量,也降低了房水中的含量,可避免虹膜红变,新生血管性青光眼的发生。

**3.4 增殖性糖尿病视网膜病变玻璃体中的 VEGF** 本实验检测了 13 例增殖性糖尿病视网膜病变患者玻璃体中

VEGF 含量,发现显著高于正常对照组,几乎是正常对照组 5 倍。这说明在眼局部产生的 VEGF 可能是促进新生血管形成,促进增殖性糖尿病视网膜病变发生发展的重要因素。可以看出在正常对照组中血浆、房水、玻璃体三者 VEGF 含量无显著性差异。但血浆 VEGF 含量最高。在 PDR 组中血浆、房水、玻璃体三者 VEGF 含量有非常显著性差异。玻璃体中含量极高,是房水的 3 倍,血浆的 11 倍。PDR 患者玻璃体中 VEGF 含量远远高于房水和血浆中 VEGF 含量。显然 PDR 患者眼内 VEGF 含量是大大增高的,而血浆中含量是明显降低的。进一步显示 VEGF 发挥促进新生血管生长作用主要在眼局部,尤其在视网膜、玻璃体内。

进一步分析研究可见血浆 VEGF 与玻璃体 VEGF 并无相关关系,这提示我们检测血浆 VEGF 含量并不能反映判断玻璃体中 VEGF 含量的变化,也使我们相信,眼内 VEGF 增高的来源可能是由缺血缺氧的视网膜分泌产生,而非来自血浆向玻璃体的转移。当然 VEGF 产生的确切机制尚有待于更深入的研究。

总之,VEGF 的表达与眼部新生血管形成有着密切的时空对应关系,VEGF 及其受体一直是近几十年眼部新生血管研究的中心环节。抗 VEGF 治疗作为一种特异性和靶向性强的治疗手段,无疑为眼部新生血管性疾病的治疗提供了一条新途径。未来的临床试验也将评估联合应用抗 VEGF 治疗药物的可能性,以期降低药物剂量、延长药物作用时间并减少毒副作用。VEGF 拮抗类药物能有效地抑制眼内新生血管形成,但其安全性、远期并发症还需要进一步大样本、长期的临床研究来验证。

#### 参考文献

- 1 佐藤浩章. 糖尿病视网膜病的发病机制与治疗. 日本医学介绍 2003;24(9):414
- 2 Qaum T, Xu Q, Joussen AM, et al. VEGF-initiated blood-retinal barrier break down in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(10):2408-2413
- 3 Takagi H, King GL, Robinson GS, et al. Adenosinemedi at eshyoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:2165-2176
- 4 Caldwell RB, Bartoli M, Bartoli M, et al. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev* 2003;19(6):442-455
- 5 Ogata N, Tombran-Tink J, Nishikawa M, et al. Pigment epithelium-derived factor in the vitreous is low in diabetic retinopathy and high in rhexmatogenous retinal detachment. *Am J Ophthalmol* 2001;132:378-382
- 6 朱洪丽. 血管内皮细胞生长因子-(VEGF)与增殖型糖尿病视网膜病变相关性的研究. 中国医科大学 2009
- 7 Malone JI, Morrison AD, Pavan P, et al. Prevalence and significance of retinopathy in subjects with diabetes of than 5years duration screened for the diabetes control and complication trial. *Diabetes Care* 2001;24:522-526
- 8 Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: on ceregarde dasaspecific and giogenic factor, now implicated in neuro protection. *Bioessays* 2004;26(9):943-954
- 9 YuYS, Heo JH, Hwang SW, et al. Effect of the absence of heat shock protein 70.1 (hsp70.1) on retinal photo receptors innormal and mice. *Korean J Ophthalmol* 2001;15:67-73
- 10 Luty GA, McCleod DS, Merge SC, et al. Localization of vascular endothelial growth factor in human retina and choroids. *Arch Ophthalmol* 1996;114(8):791-795
- 11 Iked AN, Adach IM, Taki T, et al. Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1999;79(3):1553-1563