

【实验研究】

角膜碱烧伤后 VEGF与新生血管渗漏性的相关性实验研究

赵伟 蒋爱华 刘祖国

Experimental study on correlation of VEGF with corneal neovascular permeability after alkali burn

ZHAO Wei, JIANG Ai-Hua, LIU Zu-Guo

【Key words】 vascular endothelial growth factor; neovascularization; permeability; rat

【Abstract】 Objective To investigate the changes of neovascular permeability, and explore the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on it after alkali burn. Methods The rat model of alkali burn induced corneal neovascularization (CNV) was constructed. Neovascular permeability was measured by Evans blue method at 1 day, 2 days, 3 days, 5 days, 7 days and 10 days after surgery, respectively. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) was evaluated using real time PCR. Normal corneas were treated as control group. Results Corneal neovascular permeability rate was $(1.14 \pm 0.17) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$, $(0.24 \pm 0.08) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$, $(0.29 \pm 0.16) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$, $(0.14 \pm 0.10) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$, $(0.09 \pm 0.06) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ and $(0.05 \pm 0.04) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ at 1 day, 2 days, 3 days, 5 days, 7 days and 10 days after surgery respectively, whereas normal control was $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$. The VEGF expression was $(7.01 \pm 1.99) \times 10^6 \text{ copy} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ RNA}$, $(1.01 \pm 0.59) \times 10^6 \text{ copy} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ RNA}$, $(2.43 \pm 0.43) \times 10^6 \text{ copy} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ RNA}$, $(0.99 \pm 0.31) \times 10^6 \text{ copy} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ RNA}$, $(0.95 \pm 0.03) \times 10^6 \text{ copy} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ RNA}$ and $(0.17 \pm 0.15) \times 10^6 \text{ copy} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ RNA}$ respectively on the above mentioned per time point. The expression of VEGF of corneas at 7 days and 10 days were decreased significantly compared with that of normal corneas, whose expression was $(1.09 \pm 0.31) \times 10^6 \text{ copy} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ($P_{7d} = 0.011$, $P_{10d} = 0.006$). The correlation coefficient between VEGF and neovascular permeability rate was 0.866 ($P < 0.01$). Conclusions VEGF plays a key role in regulating the neovascular permeability after alkali burn. Whereas at the late stage of alkali burn, it is difficult to explain the neovascular hyperpermeability with VEGF, which suggests that other factors may have effects on inhibition of neovascular permeability.

【Rec Adv Ophthalmol 2009; 29(1): 18-20】

【中图分类号】 Q959.836; R772.2 【文献标志码】 A

【文章编号】 1003-5141(2009)01-0018-03

【关键词】 血管内皮细胞生长因子; 新生血管; 渗漏性; 大鼠

【摘要】 目的 研究大鼠角膜碱烧伤后新生血管渗透率的变化并探讨血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 对渗透率的影响。方法 建立大鼠角膜碱烧伤模型, 于术后 1 d、2 d、3 d、5 d、7 d、10 d 伊文兰示踪法检测新生血管渗透率, PCR 法检测角膜组织中 VEGF-RNA 的表达。以正常大鼠角膜作为对照。结果 正常及碱烧伤后 1 d、2 d、3 d、5 d、7 d、10 d 大鼠角膜新生血管渗透率依次为 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$, $(1.14 \pm 0.17) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$, $(0.24 \pm 0.08) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$, $(0.29 \pm 0.16) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$, $(0.14 \pm 0.10) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$, $(0.09 \pm 0.06) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ 和 $(0.05 \pm 0.04) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$; 角膜组织中 VEGF-RNA 水平依次为 $(1.09 \pm 0.31) \times 10^6$ 拷贝 $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ 总 RNA, $(7.01 \pm 1.99) \times 10^6$ 拷贝 $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ 总 RNA, $(1.01 \pm 0.59) \times 10^6$ 拷贝 $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ 总 RNA, $(2.43 \pm 0.43) \times 10^6$ 拷贝 $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ 总 RNA, $(0.99 \pm 0.31) \times 10^6$ 拷贝 $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ 总 RNA, $(0.95 \pm 0.03) \times 10^6$ 拷贝 $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ 总 RNA 和 $(0.17 \pm 0.15) \times 10^6$ 拷贝 $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ 总 RNA, 其中 7 d 和 10 d 的 VEGF-RNA 低于正常水平 ($P_7 = 0.011$, $P_{10} = 0.006$)。经 Pearson 相关分析, 新生血管渗透率和 VEGF-RNA 水平呈正相关改变 ($r = 0.866$, $P < 0.01$)。结论 VEGF 在新生血管渗漏的调节机制中起着重要作用; 大鼠角膜碱烧伤后期, 新生血管渗漏性增高难以应用 VEGF 机制进行解释的现象, 提示可能存在其他的新生血管渗漏调节机制。

作者简介: 赵伟, 女, 1976年4月出生, 山西人。博士, 主治医师。联系电话: 020-81330738 (O); E-mail: zhaowei7163@yahoo.com.cn

About ZHAO Wei: Female, born in April, 1976. Medical doctor. Tel: +86-20-81330738 (O); E-mail: zhaowei7163@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-09-28

修回日期: 2008-10-29

本文编辑: 徐刚珍

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助 (编号: 30225044); 广州市卫生局科学基金资助 (编号: 2008-YB-053)

作者单位: 510120 广东省广州市儿童医院眼科 (赵伟); 361005 福建省厦门市, 厦门大学眼科中心 (蒋爱华, 刘祖国)

Received date: Sep 28, 2008

Accepted date: Oct 29, 2008

Foundation item: National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No: 30225044); Science Foundation of Board of Health of Guangzhou (No: 2008-YB-053)

From the Department of Ophthalmology, Guangzhou Children's Hospital (ZHAO Wei), Guangzhou 510120, Guangdong Province, China; The Eye Institute of Xiamen University (JIANG Ai-Hua, LIU Zu-Guo), Xiamen 361005, Fujian Province, China

新生血管的出现总是伴有渗漏性增高的特点。发生于眼部的新生血管性疾病,如早产儿视网膜病变、糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑变性等,因血浆成分渗漏引起黄斑水肿,视网膜增生、出血和脱离,使其分别成为发达国家中导致幼儿、成人和老年患者视力丧失的主要原因。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种作用很强的内皮细胞有丝分裂原,在体内可促进新生血管的形成,同时它也可以引起血管渗漏性的增强,其致血管渗漏作用是组胺的5万倍^[1]。本研究拟通过大鼠角膜碱烧伤的模型,采用伊文兰示踪法检测角膜新生血管(comeal neovascularization, CNV)渗透率,实时定量PCR法检测碱烧伤后不同时间VEGF在角膜组织中的表达,以探讨碱烧伤后CNV的渗漏性和VEGF的相关关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组 健康成年SPF级SD大鼠39只,体质量160 g,雌性,裂隙灯显微镜下检查无眼前节病变。所有动物的饲养及处死均遵照视觉与眼科学协会的眼科研究实验动物管理条例进行。按照 $1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量腹腔注射氯胺酮和氯丙嗪1:1混合液,眼部滴用丁卡因麻醉。剪除第3眼睑,吸干结膜囊内多余液体, $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 250 μL 加入统一规格直径为4 mm自制的涂药器,使其达饱和状态。将涂药器置于角膜中央30 s,取下立即用30 mL无菌生理盐水冲洗角膜及结膜囊,术后氧氟沙星眼液每天3次滴眼。按角膜碱烧伤后1 d、2 d、3 d、5 d、7 d及10 d随机分成6组,每组各6只(6眼),正常大鼠角膜3只(6眼)作为对照。

1.2 裂隙灯观察 分别于术后1 d、2 d、3 d、5 d、7 d、10 d,用裂隙灯显微镜观察大鼠角膜、结膜及前房情况,伴有前房出血的眼除外。每次均测量自角膜缘长出的新生血管长度和钟点数。计算CNV生长面积 $A^{[2]}$, $A = \sum_{i=1}^n 3.1416 \times C_i \times [R^2 - (R-L)^2] / 12$,其中 C 为CNV累及角膜的圆周钟点数, L 为CNV从角膜缘伸入角膜的长度, R 为角膜半径,本实验中随机选取10只大鼠检测角膜直径为7 mm,故 R 值为3.5 mm。

1.3 伊文兰示踪 将SD大鼠用氯胺酮和氯丙嗪1:1混合液按 $1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量行腹腔麻醉。30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的伊文兰溶液按2.5 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量经股静脉注射。2 h后剪开大鼠胸腔,PBS 60 mL经左心室灌注,压力为16 kPa。取出眼球,沿角膜缘全周剪下透明角膜,置入装有150 μL 甲酰胺的试管中,70 $^\circ\text{C}$ 水浴锅内温育18 h。离心后取100 μL 上清液,应用分光光度计检测630 nm光密度值。根据标准曲线和方程计算样品的伊文兰浓度,结果以 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 表示。用CNV面积校正伊文兰浓度,即为新生血管渗透率,

以 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$ 表示。

1.4 实时定量PCR检测角膜组织中VEGF-RNA的表达 分别于碱烧伤后1 d、2 d、3 d、5 d、7 d、10 d处死6只SD大鼠,另外取3只未手术大鼠(6只角膜)作为正常对照。沿角膜缘剪下透明角膜,置于-80 $^\circ\text{C}$ 冰箱内保存。Trizol一步法提取角膜组织中总RNA,每种样品在紫外分光光度计上测定波长为260 nm时的吸光度值进行RNA样品鉴定。按公式:浓度($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)= OD_{260} \times 稀释倍数 $\times 0.04$ 计算RNA浓度。采用20 μL 逆转录反应体系,反应条件为37 $^\circ\text{C}$ 1 h,95 $^\circ\text{C}$ 3 s,50 μL 荧光定量PCR反应体系,反应条件为93 $^\circ\text{C}$ 2 min,93 $^\circ\text{C}$ 45 s,55 $^\circ\text{C}$ 1 min,共40个循环。VEGF引物和探针设计所用软件为Primer express 2.0软件,序列如下:上游引物:5'-TCC TGT GTG CCC CTA ATG C-3',下游引物:5'-ACG CAC TCC AGG GCT TCA T-3',探针:5'-FAM-TGT GCG GGC TGC TGC AAT-TAMRA-3'。反应结束后,由电脑自动分析并计算结果。结果按 $B = \text{拷贝数} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ cDNA进行分析。考虑到各个样本总RNA浓度的差异,最终结果按下列公式换算: $A(\text{拷贝数} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{总RNA}) = B(\text{拷贝数} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{cDNA}) \div \text{OD}_{260} \times 5/6$ 。

1.5 统计学分析 采用SPSS 11.0软件进行统计学分析。实验结果以均数 \pm 标准差表示,对伊文兰渗透率和VEGF-RNA表达采用Pearson相关分析,VEGF-RNA在不同时间点的表达采用One-way ANOVA检验。以 $P < 0.05$ 为差异为统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠CNV的生长情况 碱烧伤后1 d角膜缘血管环扩张充血;碱烧伤后2 d,充血的血管环向透明角膜方向延长,CNV面积为 $(13.90 \pm 2.09)\text{mm}^2$;碱烧伤后3 d新生血管芽呈毛刷状自角膜缘血管网伸出长入透明角膜区,CNV面积为 $(19.19 \pm 2.42)\text{mm}^2$;碱烧伤后5 d,CNV面积增长最快,为 $(27.08 \pm 4.67)\text{mm}^2$,新生血管主干和分支形成树枝状结构;烧伤后7 d,CNV继续延长,面积最大,为 $(27.76 \pm 7.76)\text{mm}^2$,部分血管末端形成吻合,其后CNV面积逐渐减少;碱烧伤后10 d面积为 $(23.32 \pm 10.97)\text{mm}^2$,新生血管交织呈网状,主干纤细、分支稀疏,新生血管逐渐消退。

2.2 大鼠CNV渗透率的动态改变 正常角膜无伊文兰渗漏,碱烧伤后1 d渗透率显著增高,并达到峰值 $(1.14 \pm 0.17)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$;碱烧伤后2 d渗透率迅速下降为 $(0.24 \pm 0.08)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$;3 d轻微回升为 $(0.29 \pm 0.16)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$;以后随时间延长,伊文兰渗透率逐渐下降,5 d为 $(0.14 \pm 0.10)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$,7 d为 $(0.09 \pm 0.06)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$,10 d为 $(0.05 \pm 0.04)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$ 。

2.3 碱烧伤后大鼠角膜中VEGF的表达 正常大鼠角膜组织中有少量的VEGF表达,为 $(1.09 \pm$

0.31) ×10⁶ 拷贝 · μg⁻¹总 RNA。碱烧伤后 1 d,角膜组织中 VEGF表达达到高峰,为 (7.01 ±1.99) ×10⁶ 拷贝 · μg⁻¹总 RNA,是正常角膜的 6.4倍;2 d时迅速下降至接近正常水平,为 (1.01 ±0.59) ×10⁶ 拷贝 · μg⁻¹总 RNA;3 d VEGF表达回升,为 (2.43 ±0.43) ×10⁶ 拷贝 · μg⁻¹总 RNA,是正常角膜的 2.2倍;5 d VEGF表达再次下降至正常水平,为 (0.99 ±1.31) ×10⁶ 拷贝 · μg⁻¹总 RNA;以后 VEGF表达继续降低,7 d为 (0.95 ±0.03) ×10⁶ 拷贝 · μg⁻¹总 RNA,10 d为 (0.17 ±0.15) ×10⁶ 拷贝 · μg⁻¹总 RNA。经单因素方差分析碱烧伤后 1 d与 3 d大鼠角膜 VEGF表达高于正常角膜 ($P_1 = 0.014 < 0.05$; $P_3 = 0.003 < 0.05$),碱烧伤后 7 d与 10 d大鼠角膜 VEGF表达低于正常角膜 ($P_7 = 0.011 < 0.05$; $P_{10} = 0.006 < 0.05$)。

在 Pearson相关分析中,大鼠角膜碱烧伤后新生血管渗透率与角膜组织中 VEGF-RNA 表达呈正相关改变 ($r = 0.866, P < 0.01$)。

3 讨论

为探讨角膜碱烧伤后新生血管渗漏与 VEGF是否具有相关性,本实验采用伊文兰示踪法检测 CNV在碱烧伤后不同时间的渗透率,实时定量 PCR法检测 VEGF在角膜组织中的表达,并对 2组数据进行统计学分析。结果显示:新生血管渗透率也在角膜碱烧伤后升高,并于 1 d达到高峰,以后随时间的延长逐渐下降,通过对 2者进行相关分析发现呈显著正相关改变。该结果与以往对血管渗漏性的研究报道一致^[3]。此外,动物实验证实应用 VEGF受体阻断剂或抑制 VEGF-VEGFR 途径下游某些激酶活性都可有效地降低血管渗漏现象^[4-5]。由此,我们有理由认为,VEGF是引起大鼠角膜碱烧伤后新生血管渗漏性增高的主要因素之一。VEGF影响血管渗漏性的作用机制可能通过以下方面来实现:诱导内皮细胞胞浆中窗孔形成,促使小分子溶质穿透^[6];使细胞膜内陷形成囊泡,并互相融合从管腔膜延伸至基底膜,使生物大分子漏出^[7-8];通过 VEGFR-2途径阻断缝隙连接中信号的传递,破坏内皮细胞间紧密连接等方式增强血管渗漏^[9]。

与此同时,本研究还发现:自大鼠角膜碱烧伤后 5 d起,VEGF表达已恢复正常水平,此后 VEGF继续下降并低于正常水平,而新生血管渗透率仍高于烧伤前。一项通过对兔脑池内注射灭活肺炎球菌诱发脑膜炎的实验也显示^[10]:虽然脑脊液内 VEGF含量的升高与脑组织含水量呈正相关改变,但用 VEGF

中和抗体阻断其活性后,脑水肿程度未减轻,血脑屏障功能的破坏未得到改善。对该现象的解释有以下几种可能:大鼠角膜碱烧伤后除 VEGF外尚有其他炎症因子(如:TNF-,NO,MMP等)参与新生血管渗漏的调节;新生血管的成熟程度、周细胞与血管内皮细胞的相互作用影响着渗漏性的变化^[11]。

综上所述,本研究通过建立碱烧伤诱导的大鼠 CNV模型,并检测碱烧伤后 CNV渗透率和 VEGF在角膜组织中的表达,发现新生血管的屏障功能随时间延长逐渐完善,VEGF在新生血管渗漏的调节机制中起着重要作用。VEGF可能成为治疗新生血管渗漏性增高的靶点,通过阻断 VEGF的合成及其生物学活性,达到治疗新生血管渗漏的目的;另外,在角膜碱烧伤后期,新生血管渗漏难以应用 VEGF机制进行解释的现象,为进一步探讨调节新生血管渗漏的其他机制提供了理论依据。

参考文献

- 1 Senger DR, Connolly DT, van de Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor secreted vascular permeability factor[J]. Cancer Res 1990; 50(6): 1774-1778
- 2 D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91(9): 4082-4085.
- 3 Hoang BH, Dyke JP, Koutcher JA, Huvos AG, Mizobuchi H, Mazza BA, et al VEGF expression in osteosarcoma correlates with vascular permeability by dynamic MRI[J]. Clin Orthop Relat Res 2004; (426): 32-38
- 4 Paul R, Zhang ZG, Eliceiri BP, Jiang Q, Boccia AD, Zhang RL, et al Src deficiency or blockade of src activity in mice provides cerebral protection following stroke[J]. Nat Med 2001; 7(2): 222-227.
- 5 许庆文.可溶性 Flt-1抑制实验性糖尿病大鼠的视网膜血管渗漏[J].眼科新进展 Yanke Xinzhan 2001; 21(3): 149-152
- 6 Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor[J]. J Cell Sci 1995; 108(Pt 6): 2369-2379.
- 7 Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro[J]. J Cell Biol 1998; 140(4): 947-959.
- 8 Chen J, Braet F, Brodsky S, Weinstein T, Romanov V, Noiri E, et al VEGF-induced mobilization of caveolae and increase in permeability of endothelial cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol 2002; 282(5): C1053-1063.
- 9 Suarez S, Ballmer-Hofer K. VEGF transiently disrupts gap junctional communication in endothelial cells[J]. J Cell Sci 2001; 114(Pt 6): 1229-1235.
- 10 van der Flier M, Coenjaerts FE, Mwinzi PN, Rijkers E, Ruyken M, Scharringa J, et al Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor(VEGF) fails to attenuate vascular permeability and brain edema in experimental pneumococcal meningitis[J]. J Neuroimmunol 2005; 160(1-2): 170-177.
- 11 Zhao W, Jiang AH, Li CY, Yang WZ, Xu CC, Liu ZG. Pericytes are correlated with the permeability of rat corneal neovascular vessels induced by alkali burn[J]. Chin Med J (Engl) 2007; 120(4): 274-279.