

# CTGF 在兔眼深层巩膜切除术中的表达

杨 颺, 归东梅, 周雅丽, 杨宏伟, 高殿文

作者单位: (110004) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院眼科

作者简介: 杨颺, 女, 博士, 讲师, 主治医师, 研究方向: 青光眼滤过性手术的临床研究。

通讯作者: 高殿文, 硕士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 青光眼. gaodw@sj-hospital. org

收稿日期: 2011-03-24 修回日期: 2011-04-06

## Expression of CTGF in rabbits deep sclerectomy surgery

Yang Yang, Dong-Mei Gui, Ya-Li Zhou, Hong-Wei Yang, Dian-Wen Gao

Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Dian-Wen Gao. Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. gaodw@sj-hospital. org  
Received: 2011-03-24 Accepted: 2011-04-06

### Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of connective tissue growth factor (CTGF) in rabbits deep sclerectomy (DS) surgery.

• **METHODS:** Human umbilical vein (HUV) was treated with freeze-drying for 6 hours and  $^{60}\text{Co}200\text{cGy}$  irradiation for 30 seconds. The samples were stored in RT. 28 rabbits were used, 24 of which were performed DS surgery in both eyes. Then one eye was randomly selected to plant HUV according to self-control rule, which composed experimental group. The other eye of the 24 rabbits composed control group. 8 rabbits were sacrificed 3, 7 and 14 days after operation, respectively. The 8 eyes of the other 4 rabbits were used as normal control. Semi-quantitative RT-PCR and immunohistochemistry were used to assess the expression of CTGF mRNA and protein of deep sclera.

• **RESULTS:** The levels of CTGFmRNA and protein expression in the normal control tissue were lower, but at day 3 they increased more quickly than the control and rapidly peaked at day 7, then decreased at day 14 ( $P < 0.01$ ); there were no significant differences at same time points between experimental group and control group ( $P > 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** These indicated that DS surgery with human freeze-dried allograft umbilical vein implant is safe and effective. It has no evident effect of anti-fiber proliferation. The mechanism for its maintenance of decompression chamber may be the result of mechanical water spreading.

• **KEYWORDS:** connective tissue growth factor; deep sclerectomy surgery; human umbilical vein; rabbit

Yang Y, Gui DM, Zhou YL, *et al.* Expression of CTGF in rabbits deep sclerectomy surgery. *Guqi Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(5):795-797

### 摘要

**目的:** 探讨结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 在兔眼深层巩膜切除术 (deep sclerectomy, DS) 中的表达。

**方法:** 制备人去内皮冻干辐照脐带静脉管 (HUV); 选取 28 只大耳白兔, 其中 24 只按自身对照原则, 双眼均行深层巩膜切除术, 随机选取一眼于术中植入 HUV, 为植入组; 另一眼不植入, 为未植入组。分别于术后 3, 7, 14d 各处死 8 只; 另 4 只 8 眼做正常对照组。应用半定量 PCR 检测兔眼深层巩膜组织中 CTGF mRNA 的表达, 免疫组织化学检测 CTGF 蛋白的表达。

**结果:** 植入组 3d 后, CTGF mRNA 和蛋白表达开始升高, 至 7d 表达水平达到峰值, 14d 时表达水平开始下降, 明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 未植入组中不同时间点表达水平变化与植入组类似。植入组与未植入组比较无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**结论:** HUV 在兔眼 DS 中没有明显的抗纤维增殖的作用, 其瘢痕增殖的过程与正常瘢痕形成的过程是一致的。其维持减压室作用机制可能是机械引流的作用结果; HUV 作为一种植入物, 并未刺激局部的瘢痕过度形成。

**关键词:** 结缔组织生长因子; 深层巩膜切除术; 人脐带静脉管; 兔

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.05.014

杨颺, 归东梅, 周雅丽, 等. CTGF 在兔眼深层巩膜切除术中的表达. 国际眼科杂志 2011;11(5):795-797

### 0 引言

深层巩膜切除术 (deep sclerectomy, DS) 的长期效果的维持取决于切除角巩膜组织后形成的“减压室”是否能长期存在。结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 可促进成纤维细胞的增殖, 在伤口愈合、瘢痕形成的过程中起重要作用。如“减压室”长期存在, 则降压作用亦可长期存在。现代 DS 开展以来, 取得了较满意的降眼压效果, 减少了传统小梁切除术的并发症, 但术后由于瘢痕化而使手术效果无法维持长久。

本实验通过建立兔眼 DS 的模型, 分别运用免疫组织化学和半定量逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 的方法, 观察术后不同时间点手术区组织中 CTGF mRNA 和蛋白表达水平, 进一步了解 CTGF 在青光眼滤过术后瘢痕形成过程中的作用, 并观察去内皮冻干辐照人脐带静脉管植入后对手术区瘢痕形成的影响, 探讨其安全性和组织相容性, 观察其在深层巩膜切除术后维持减压室存在的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 纯种健康成年大耳白兔 28 只,雌雄不限,体重 2.5~4.5kg,由中国医科大学实验动物中心提供。实验前检查双眼,除外眼部疾患。严格遵守无特殊病原体动物级大鼠喂养条件。实验动物及实验所用条件符合国家科学技术委员会的《实验动物管理条例》。

### 1.2 方法

**1.2.1 人去内皮冻干辐照脐带静脉管的制备及保存** 采用正常足月分娩的新生儿脐带,于生后无菌采取。去内皮细胞:新鲜脐静脉,长约 20cm,管径约 0.5cm,用 37℃ 肝素生理盐水冲净管腔内血液 3 遍,然后注入 2.5g/L 胰蛋白酶充盈脐静脉,两端用血管夹夹闭,置入 37℃ 温箱中消化 30min;反复 3 次,完全消化掉内皮细胞。人脐带静脉管(HUV)制备:小心分离脐带静脉管,制作的脐带静脉管内径 2.0mm,外径 3.5mm。冻干辐照:然后将去内皮的脐静脉置入-80℃ 速冻 24h,-70℃ 5μHg 冷冻干燥 6h,然后封装于双层塑料袋中,Co200cGy 辐照 30s,室温下保存备用。

**1.2.2 动物模型的制备** 家兔 24 只按自身对照原则,每家兔双眼均行深层巩膜切除术,随机选取 1 眼于术中植入 HUV,为植入组;另 1 眼不植入,为未植入组。分别于术后 3,7,14d 各处死 8 只家兔;另 4 只家兔 8 眼做正常对照组。裂隙灯显微镜检查兔眼前段;手术前 3d 用 2.5g/L 氯霉素滴眼液,4 次/d 滴眼;手术当日以 100g/L 水合氯醛 3mL/kg ip,完全麻醉后,用倍诺喜点眼 3 次行眼表麻醉,用 Tono-pen II 型笔式眼压计测量 3 次,取平均值作为当日的测量眼压。将保存在双层真空包装袋中的 HUV 放入生理盐水(NS)中复苏,大约 30min。结膜瓣、浅层巩膜瓣的制作:制作以上方穹隆为基底的结膜瓣,充分分离球结膜及结膜下组织,暴露巩膜,烧灼止血;做以角膜缘为基底,约 4mm×5mm 大小、1/3 巩膜厚度的舌形表层巩膜瓣,向前分离至透明角膜内 1~2mm。深层角巩膜瓣的切除:在浅层巩膜瓣下的巩膜床中,作三角形深层巩膜切除,后部仅保留一薄层巩膜组织于脉络膜上,向前切除角膜基质直到后弹力膜。此时可见房水通过小梁—后弹力膜渗出。实验眼植入 HUV:将长约 2mm 的脐带静脉管管腔垂直于角膜缘方向置于实验眼深层薄层巩膜床表面,位置尽量靠前,用 9-0 尼龙线将其固定于巩膜床上;对照眼不植入脐带静脉管;松弛间断缝合浅层巩膜瓣共 4 针,间断缝合球筋膜囊和结膜;结膜下注射庆大霉素和地塞米松的混合液,术毕。各组的动物处死后立即摘除双眼球,置入 0℃ NS 中,沿睫状体平坦部冠状面切开眼球,弃去眼前节,放射状剪除非手术区组织,保留手术区巩膜组织。取一半固定于 100mL/L 中性福尔马林溶液中固定 8~24h,行低温石蜡包埋(低于 60℃),制成蜡块,置-20℃ 冰箱干燥保存,待切片及免疫组织化学染色。另一半迅速置于液氮罐内冰冻,以进行 RNA 和蛋白质的抽提。

**1.2.3 CTGF mRNA 表达水平的检测** 使用美国 Gibco 公司 Trizol 试剂常规方法提取各组总 RNA,并应用美国 Promega 公司反转录试剂盒合成 cDNA。以 β-actin 为内参,进行 PCR 扩增。β-actin 及 CTGF 引物序列见表 1,上述引物均由上海生工生物工程公司合成。PCR 反应条件:95℃ 变性 5min,94℃ 变性 40s,60℃ 退火 40s,72℃ 延伸 60s,共 32 个循环,72℃ 延伸 10min。扩增产物进行 15g/L 琼脂糖凝胶电泳,应用 UVIpro 凝胶图像分析系统观察并摄像,并用 Fluorchem V2.0 软件进行扫描分析,以 CTGF

表 1 目的基因及内参照基因的 PCR 引物序列及产物

基因	引物序列	产物长度 (bp)
β-actin	上游引物:5'-CGC GAC CTC ACC GAC TAC-3'	210
	下游引物:5'-ATT GCC AAT GGG TGA TAC CT-3'	
CTGF	上游引物:5'-GCA CAA GGG ACT CTT CTG TGA-3'	384
	下游引物:5'-GTG GTC TGG ACC AGG CAG T-3'	

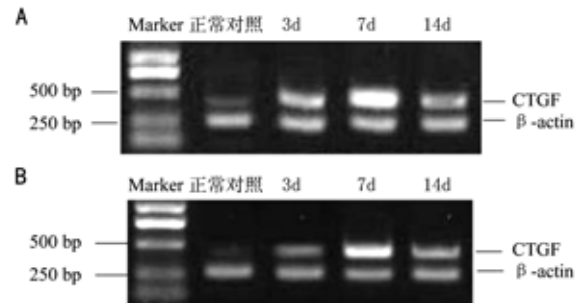


图 1 植入组不同时间巩膜组织 CTGFmRNA 的表达 A:植入组;B:未植入组。

表 2 不同时间点巩膜 CTGFmRNA 的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

术后	CTGF/β-actin	
	未植入组	植入组
3d	0.863 ± 0.129	0.933 ± 0.112 <sup>a</sup>
7d	1.646 ± 0.167	1.598 ± 0.177 <sup>a</sup>
14d	0.845 ± 0.127	0.951 ± 0.141 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P > 0.05 vs 同时间点未植入组。

条带的吸光度(A)值与 β-actin 条带 A 值的比值作为目的基因 mRNA 的相对表达量。

**1.2.4 免疫组织化学检测** 以兔抗鼠 CTGF 蛋白抗体,羊抗兔 IgG 作为二抗。SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司提供),具体方法参照试剂盒说明书。结果判定:阳性细胞为胞质或胞核内有黄色或棕黄色颗粒沉积。每张切片分别选取 5 个不连续的高倍视野,采用 Olympus/BX51/EvolutionMP5.0 摄像系统采集图像后转入 MetaMorph 显微图像分析系统,测定阳性细胞的积分吸光度(integrated absorbency, IA)进行数据分析,判定阳性细胞的表达强度。

统计学分析:数据均以均数 ± 标准差表示,两组均数间的比较用 SPSS 12.0 软件进行中 t-test 分析,P < 0.05 为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CTGF mRNA 表达** CTGF mRNA 在正常巩膜中有低水平的表达(0.173 ± 0.026),植入组术后 3d,表达明显上升,到 7d 时达到高峰,随后有所下降,但仍明显高于正常对照组的表达水平,差异有统计学意义(P < 0.01)。未植入组术后 3d,表达明显上升,到 7d 时达到高峰,随后下降,但仍明显高于正常对照组的表达水平,差异有统计学意义(P < 0.01),两组间各时间点无统计学意义(P > 0.05,图 1,表 2)。

**2.2 CTGF 蛋白的表达** CTGF 蛋白表达水平变化与 mRNA 变化趋势一致,在正常组表达低(16.93 ± 2.33)。植入组和未植入组 3d 后,表达开始升高,至 7d 表达水平达到峰值,14d 时 CTGF 表达水平开始下降。各时间点植入组与未植入组之间无统计学差异(P > 0.05),但植入组与未植入组分别同正常对照组比较,均有明显差异(P < 0.01,表 3)。

表3 不同时间点巩膜 CTGF 蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

术后	CTGF	
	未植入组	植入组
3d	23.65 ± 2.98	23.31 ± 3.34 <sup>a</sup>
7d	40.79 ± 4.43	40.03 ± 4.43 <sup>a</sup>
14d	31.02 ± 4.23	29.22 ± 3.89 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>  $P > 0.05$  vs 同时时间点未植入组。

### 3 讨论

CTGF 是一种多功能的细胞因子,由 1991 年 Bradham 等在筛选人类脐静脉内皮细胞 cDNA (互补脱氧核糖核酸)文库时首次发现<sup>[1]</sup>,是一种具有多种生理功能的细胞因子,属于即刻早期基因家族(CCN1-6)成员。它是转化生长因子(transforming growth factor, TGF- $\beta$ )的下游作用因子,在创伤修复、组织纤维化进程中起重要作用。

CTGF 作为一种分泌型多肽,具有多种生物学功能,如刺激多种细胞增生、细胞黏附和趋化性,诱导血管生成,促进细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分产生,抑制其降解,导致 ECM 的聚积及结构改建等<sup>[2]</sup>。CTGF 广泛存在于人类多种组织器官中,多种细胞均可表达 CTGF<sup>[3]</sup>,在多种组织器官的发生、发展、组织损伤修复以及恶性肿瘤的发展、转移中起着不可忽视的作用。在糖尿病视网膜病变中也有 CTGF 表达<sup>[4]</sup>。

青光眼手术失败的主要原因是巩膜切口和滤泡纤维增生瘢痕化,阻碍了房水外流。Esson 等通过建立兔青光眼滤过手术模型,研究 CTGF 在滤过泡瘢痕化中的作用<sup>[5]</sup>。研究发现,滤过泡组织中存在 CTGF 的高表达,术后 5d 时表达量最高,提示抑制 CTGF 的合成可以减少青光眼滤过泡的失败比率。有学者研究,在人小梁网细胞中,CTGF 可以诱导 ECM 沉积<sup>[6]</sup>。

既往滤过性手术失败的青光眼再次手术<sup>[7,8]</sup>,其成功率约 40%。新生血管性青光眼有 89% 归于失败,无晶状体青光眼手术成功率为 39%,而青少年性的青光眼的手术成功率为 50%。分析原因,均为各种因素导致术后滤

过道成纤维细胞过度繁殖,胶原纤维合成,分泌活跃,致使滤过道瘢痕形成,导致滤过道阻塞。

本实验中,在 DS 术后各时间点 CTGF 在蛋白和基因水平的变化趋势是一致的。通过观察本实验的实验组和对照组,发现并没有因为植入经去内皮、冻干、辐照后的 HUV 而减少局部瘢痕的形成,也未刺激局部的瘢痕过度形成。在我们以前的研究中观察到 HUV 在兔眼 DS 中维持减压室的作用机制可能是机械引流的作用结果。我们观察了 14d 以内的组织学、蛋白水平以及分子水平的变化,可能还需要更长期的观察,并查找新的因子或者其它检测手段以及实验方法来反应 DS 中的这个病理过程。

#### 参考文献

- 1 Park KH, Cozier F, Ong OC, et al. Induction of heat shock protein 72 protects retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(7):1522-1530
- 2 Fan WH, Karnovsky MJ. Increased MMP-2 expression in connective tissue growth factor over-expression vascular smooth muscle cell. *J Biol Chem* 2002;277(12):9800-9805
- 3 Peroal B. NOV( nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues. *Mol Pathol* 2001;54(2):57-79
- 4 Kuiper EJ, Van Nieuwenhoven FA, de Smet MD, et al. The angi-fibrotic switch of VEGF and CTGF in proliferative diabetic retinopathy. *PLoS One* 2008;3(7):e2675
- 5 Petzelt C, Blom P, Schmehl W, et al. Xenon prevents cellular damage in differentiated PC-12 cells exposed to hypoxia. *BMC Neurosci* 2004; 5:55
- 6 Junglas B, Yu AH, Welge-Lüssen U, et al. Connective tissue growth factor induces extracellular matrix deposition in human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 2009;88(6):1065-1075
- 7 Bang R, Biburger M, Neuhuber WL, et al. Neurokinin-1 receptor antagonists protect mice from CD95 and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptotic liver damage. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;308(3): 1174-1180
- 8 Nguyen C, Boldea RC, Roy S, et al. Outflow mechanisms after deep sclerectomy with two different designs of collagen implant in an animal model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244(12):1659-1667