

# PDR 患者玻璃体手术前后房水中 VEGF 水平的变化

李 双,付汛安

作者单位:(430014)中国湖北省武汉市中心医院眼科

作者简介:李双,毕业于华中科技大学同济医学院,博士,主治医师,研究方向:青光眼、白内障。

通讯作者:付汛安,毕业于武汉大学医学院,硕士,主任医师,主任,研究方向:白内障、玻璃体视网膜疾病。fxyanke@sina.com

收稿日期:2012-07-30 修回日期:2012-11-21

## Alterations of the level of VEGF in the aqueous humor of PDR patients before and after vitrectomy

Shuang Li, Xun-An Fu

Department of Ophthalmology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, Hubei Province, China

**Correspondence to:** Xun-An Fu. Department of Ophthalmology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, Hubei Province, China. fxyanke@sina.com

Received:2012-07-30 Accepted:2012-11-21

### Abstract

• **AIM:** To evaluate aqueous humor level of vascular endothelial growth factor (VEGF) in proliferative diabetic retinopathy (PDR) patients before and after vitrectomy.

• **METHODS:** Aqueous humor samples were collected from 30 PDR patients before and after vitrectomy. Thirty cases of cataract patients without diabetes mellitus were chosen as a normal control group. Aqueous humor concentrations of VEGF were determined by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA).

• **RESULTS:** Aqueous humor concentrations of VEGF were significantly greater in PDR patients than in control ( $P<0.05$ ). VEGF concentrations decreased significantly in postoperative samples than that in preoperative samples ( $P<0.05$ ).

• **CONCLUSION:** VEGF actively takes part in the occurrence and development of PDR, and has a close relationship with neovascularization in the late stage of PDR.

• **KEYWORDS:** proliferative diabetic retinopathy; vascular endothelial growth factor; vitrectomy; enzyme-linked immunosorbent assay

**Citation:** Li S, Fu XA. Alterations of the level of VEGF in the

aqueous humor of PDR patients before and after vitrectomy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(12):2373-2375

### 摘要

**目的:**检测增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)患者玻璃体手术前后房水中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的浓度变化,研究 VEGF 在 PDR 发病机制中的作用。

**方法:**收集 30 例 PDR 患者玻璃体手术前后的房水标本,以 30 例无糖尿病的白内障患者作为正常对照组,用酶联免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法检测 VEGF 的浓度。

**结果:**PDR 患者与正常对照组相比,房水中 VEGF 浓度显著升高,有统计学差异( $P<0.05$ )。PDR 患者玻璃体视网膜手术后与手术前相比,房水中 VEGF 浓度显著降低,有统计学差异( $P<0.05$ )。

**结论:**VEGF 积极参与了 PDR 的发生发展,并与 PDR 后期新生血管形成有着密切的关系。

**关键词:**增殖性糖尿病视网膜病变;血管内皮生长因子;玻璃体切割术;酶联免疫吸附试验

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2012.12.40

**引用:**李双,付汛安. PDR 患者玻璃体手术前后房水中 VEGF 水平的变化. *国际眼科杂志* 2012;12(12):2373-2375

### 0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)最主要的病理改变是全身各个组织器官的微血管病变。其中,糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的一种常见而严重的并发症<sup>[1]</sup>。DR 增殖期纤维血管组织大量形成,常常导致视网膜出血、玻璃体积血及纤维增殖、牵拉性视网膜脱离<sup>[2]</sup>。细胞因子、趋化因子、炎性细胞和血管生成因子在增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)的发展过程中扮演着重要的角色。目前有大量研究显示,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与 PDR 的发生发展有着密切的关系。VEGF 是一类能够特异地作用于血管内皮细胞,通过特异性受体发挥生物学作用的血管生长调控因子。在参与新生血管生成的过程中,VEGF 对新生血管生长起促进作用。研究证实,对 PDR 患者行玻璃体切割术之前进行抗 VEGF 抗体贝伐单抗(bevacizumab)玻璃体腔注射,能抑制视网膜新生血管的生长,减少术中出血,其中的机制可能与抗 VEGF 抗体贝伐单抗抑制 VEGF 表达进而抑制新

生血管形成有关<sup>[3,4]</sup>。为了探讨 VEGF 在 PDR 发病机制中的作用,我们收集了 PDR 患者玻璃体切割手术前后的房水标本,利用酶联免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法对 VEGF 的浓度进行了检测,结合临床研究,探讨玻璃体切割术对房水中 VEGF 水平的影响。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 本研究通过了武汉市中心医院伦理委员会同意。根据糖尿病 ETDRS 分类标准将患者进行分级。选取 PDR 患者 30 例作为实验组,选用 30 例 30 眼年龄相匹配的无糖尿病的白内障患者作为正常对照组,男 16 眼,女 14 眼,年龄 40 ~ 75 岁。所有受试者签署知情同意书。PDR 患者 30 例 30 眼,年龄 38 ~ 73 (平均 52) 岁,男 18 眼,女 12 眼。糖化血红蛋白 HbA1c 平均值 8.0% (5.8% ~ 9.9%)。糖尿病平均患病时间为 12a。眼部排除标准:有眼内手术、激光光凝、葡萄膜炎、眼部外伤史者。系统性疾病排除标准为:有缺血性脑血管疾病、缺血性心血管疾病、肝功能异常和肾功能异常者。对所有受试者进行详细的常规眼科检查,包括视力、眼压、裂隙灯检查和扩瞳眼底检查。所有入选的 PDR 患者在标准经睫状体平坦部三通道下行常规玻璃体切割术(pars plana vitrectomy, PPV),术中进行眼内视网膜激光光凝,如发现有新生血管,进行新生血管膜切除。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本采集** 正常对照组在行白内障手术时采集房水,PDR 患者在行玻璃体切割手术时和手术后 3d 分别采集房水。开睑后,以 1:2000 的庆大霉素生理盐水冲洗结膜囊。以无菌 1mL 一次性塑料 TB 针管接 9 号针头,于角膜缘内 1mm 作前房穿刺,在 2 ~ 5s 内从中央瞳孔区抽吸获得房水 0.2mL,抽吸时注意不要触及虹膜、晶状体及角膜内皮。将样本置入 0.5mL Eppendorf 管,放入液氮中,然后存放于 -75℃ 冰箱中储存。

**1.2.2 标本检测** 将房水标本室温下解冻,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法测定标本中的 VEGF 的浓度,检测试剂盒由美国 R&D 公司提供。检测步骤均参照试剂盒测试步骤进行。最终反应板用酶标仪 450nm 波长检测光学密度(ABS),读取 OD 值。根据各种细胞因子的标准品校正曲线得出待检样品的细胞因子质量浓度(pg/mL)。

统计学分析:采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计学处理,所有数据用均数±标准差表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,手术前后的组内比较用配对 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

正常对照组房水 VEGF 浓度为  $83.23 \pm 15.54$  pg/mL, PDR 患者手术前房水中 VEGF 浓度为  $152.41 \pm 35.32$  pg/mL,两者差异有显著性( $P < 0.05$ )。PDR 患者行玻璃体视网膜手术后房水中 VEGF 浓度为  $101.25 \pm 11.56$  pg/mL,与手术前相比,房水中 VEGF 浓度显著降低,有统计学差异( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

DR 的病理特征是血-视网膜屏障(blood-retinal barrier, BRB)的破坏和新生血管的形成,其进展过程与多种血管源性细胞因子和炎症趋化因子表达不平衡有关。VEGF 是一种多功能细胞因子,广泛分布于人和动物体内的脑、肾、肝、眼等多种组织。在生理状态下,VEGF 在眼部呈低表达状态。VEGF 过度表达将促进血管的增殖,玻璃体和视网膜局部高水平的 VEGF 作为一种内皮细胞特异的血管生成与渗漏因子,能增加血管渗透性,直接刺激血管内皮细胞生长和血管生成。体内和体外实验均证实缺氧能诱导 VEGF 的表达,破坏血-视网膜屏障,介导缺血缺氧导致的视网膜新生血管形成<sup>[5]</sup>。也有研究证实,糖尿病患者玻璃体和血清中 VEGF 水平明显升高<sup>[6]</sup>。

色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)是一种眼内主要的抑制新生血管生成的细胞因子,是 VEGF 强大的对抗因子。在糖尿病合并症中具有抑制血管新生、抗炎、抗氧化和神经营养及神经保护作用<sup>[7,8]</sup>。它能抑制视网膜血管内皮细胞生长和迁移,能抑制缺血诱导的视网膜血管新生,对视网膜的机械损伤、光损伤和缺血性损伤有促进修复的作用。大量研究表明,PDR 新生血管形成与血管生成因子和抑制因子之间的平衡改变有关,其中,VEGF 和 PEDF 的不平衡是重要的因素,VEGF 水平升高的同时伴随 PEDF 水平降低。房水代谢与血液循环相通,眼内组织产生的各种细胞因子可通过多种途径进入前房,房水中细胞因子的浓度变化可在一定程度上反映它们在眼内组织的表达状况。本研究结果表明,PDR 组房水 VEGF 含量均比对照组的高,差异有统计学意义,和 Noma 等的报道结果基本一致<sup>[9,10]</sup>。

已经证实,玻璃体切割术有利于氧气在玻璃体腔的重新分布,可以减轻视网膜缺氧程度<sup>[11]</sup>。成功的玻璃体手术能抑制 DR 视网膜新生血管的生长<sup>[12]</sup>。视网膜激光光凝可以作用于视网膜尤其是视网膜色素上皮,降低新生血管活性,通过触发一些新生血管形成相关机制抑制血管发生。PDR 患者进行视网膜激光光凝能使新生血管活性降低,使玻璃体腔内 VEGF 水平下降, PEDF 水平升高<sup>[13-15]</sup>。视网膜激光光凝封闭无灌注区和新生血管能破坏视网膜光感受器,减少外层视网膜的氧耗,从而增加视网膜内层细胞的氧供,这些均能导致眼内 VEGF 水平降低<sup>[16]</sup>。本研究发现,PDR 组患者手术后房水 VEGF 含量相比手术前明显降低。我们推测,除了全视网膜激光光凝,玻璃体切割术切除玻璃体及视网膜增殖膜均能改善视网膜的缺氧状态,进而影响 VEGF 的表达。

总之,本研究显示,VEGF 作为一种主要的新生血管生长细胞因子,在 PDR 患者房水中的表达水平升高。玻璃体切割术和视网膜激光光凝能在一定程度上影响 VEGF 水平的表达。VEGF 与 PDR 的发生发展关系密切,对房水中 VEGF 的检测有助于揭示 DR 的形成机制,阻止 VEGF 等血管源性细胞因子的过度表达可能是 DR 预防和治疗的新途径。

## 参考文献

- 1 Kim SJ, Kim S, Park J, *et al.* Differential expression of vitreous proteins in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 2006;31(3):231–240
- 2 Kohno R, Hata Y, Mochizuki Y, *et al.* Histopathology of neovascular tissue from eyes with proliferative diabetic retinopathy after intravitreal bevacizumab injection. *Am J Ophthalmol* 2010; 150(2):223–229
- 3 Forooghian F, Kertes PJ, Eng KT, *et al.* Alterations in the intraocular cytokine milieu after intravitreal bevacizumab. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 1(5):2388–2392
- 4 Van Geest RJ, Lesnik–Oberstein SY, Tan HS, *et al.* A shift in the balance of vascular endothelial growth factor and connective tissue growth factor by bevacizumab causes the angioblastic switch in proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2012; 96(4):587–590
- 5 Lu M, Kuroki M, Amano S, *et al.* Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest* 1998; 101(6):1219–1224
- 6 Petrovic MG, Korosec P, Kosnik M, *et al.* Local and genetic determinants of vascular endothelial growth factor expression in advanced proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2008; 14:1382–1387
- 7 Jenkins AJ, Zhang SX, Rowley KG, *et al.* Increased serum pigment epithelium–derived factor is associated with microvascular complications, vascular stiffness and inflammation in Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2007; 24(12):1345–1351
- 8 Zhang SX, Wang JJ, Gao G, *et al.* Pigment epithelium–derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor. *FASEB J* 2006; 20(2):323–325
- 9 Noma H, Funatsu H, Yamashita H, *et al.* Regulation of angiogenesis in diabetic retinopathy: possible balance between vascular endothelial growth factor and endostatin. *Arch Ophthalmol* 2002;120(8):1075–1080
- 10 Endo M, Yanagisawa K, Tsuchida K, *et al.* Increased levels of vascular endothelial growth factor and advanced glycation end products in aqueous humor of patients with diabetic retinopathy. *Horm Metab Res* 2001; 33(5):317–322
- 11 Barton KA, Shui YB, Petrash JM, *et al.* Comment on: the Stokes–Einstein equation and the physiological effects of vitreous surgery. *Acta Ophthalmol Scand* 2007; 85(3):339–340
- 12 Laatikainen L, Summanen P. Long–term visual results of vitreous surgery in diabetic eye disease. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1989; 67(1):21–29
- 13 Spranger J, Hammes H–P, Preissner KT, *et al.* Release of the angiogenesis inhibitor angiostatin in patients with proliferative diabetic retinopathy: association with retinal photocoagulation. *Diabetologia* 2000;43(11):1404–1407
- 14 Spranger J, Osterhoff M, Reimann M, *et al.* Loss of the antiangiogenic pigment epithelium – derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes* 2001; 50(12):2641–2645
- 15 Kimoto K, Kubota T. Anti–VEGF agents for ocular angiogenesis and vascular permeability. *J Ophthalmol* 2012;2012:852183
- 16 Stefánsson E. Ocular oxygenation and the treatment of diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol* 2006;51(4):364–380