

糖皮质激素对翼状胬肉中 SDF-1 表达的影响

林舟桥, 林丹丹, 王佩飞, 陈素梅, 王 洪

作者单位: (325600) 中国浙江省乐清市人民医院眼科 温州医科大学附属乐清医院眼科

作者简介: 林舟桥, 副主任医师, 眼科主任, 研究方向: 白内障、青光眼和小儿斜弱视。

通讯作者: 林舟桥. linzhouqiao.mba72@163.com

收稿日期: 2014-02-25 修回日期: 2014-04-04

Effect of glucocorticoid on expression of stroma cell-derived factor-1 in pterygium

Zhou-Qiao Lin, Dan-Dan Lin, Pei-Fei Wang, Su-Mei Chen, Hong Wang

Department of Ophthalmology, Yueqing Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Yueqing 325600, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Zhou-Qiao Lin. Department of Ophthalmology, Yueqing Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Yueqing 325600, Zhejiang Province, China. linzhouqiao.mba72@163.com

Received: 2014-02-25 Accepted: 2014-04-04

Abstract

• AIM: To investigate the expression levels of stroma cell-derived factor-1 (SDF-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in tissue of pterygium and to evaluate the effect of glucocorticoid on the expression of SDF-1.

• METHODS: Forty - eight eyes of pterygium were recruited, and 24 of them were chosen randomly to use 0.2g/L fluorometholone eyedrops for a week before surgery. The expressions of SDF - 1 and VEGF were detected by immunohistochemistry in pterygium and normal conjunctival tissue. The software IPP was applied to the quantitative determination of the optical density of SDF-1 and VEGF.

• RESULTS: SDF-1 and VEGF only had expression or no expression in the basal layer of epithelial cells in normal conjunctiva, but expressed in the whole layer of epithelial cells and vascular endothelial cells in pterygium. Differences in expression levels between them were statistically significant. The expression of VEGF and SDF-1 in pterygium presented a significant correlation ($r=0.5235$, $P<0.01$). The expression levels of SDF-1 and VEGF in pterygium was significantly decreased after using glucocorticoid, thus there was statistic difference.

• CONCLUSION: Both SDF-1 and VEGF have important links with the development of pterygium. Glucocorticoid may inhibit neovascularization through decreasing expression levels of SDF-1 and VEGF.

• KEYWORDS: pterygium; stroma cell-derived factor-1; vascular endothelial growth factor; glucocorticoid

Citation: Lin ZQ, Lin DD, Wang PF, et al. Effect of glucocorticoid on expression of stroma cell-derived factor-1 in pterygium. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(5):825-828

摘要

目的: 研究基质细胞衍生因子-1 (stroma cell-derived factor-1, SDF-1) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在翼状胬肉组织中的表达情况, 探讨糖皮质激素应用对 SDF-1 表达的影响。

方法: 选取翼状胬肉患者 48 例, 其中随机选取 24 例患者在术前给予 0.2g/L 氟米龙眼药水点眼 1wk。采用免疫组化 SP 法, 检测翼状胬肉和正常球结膜组织中 SDF-1、VEGF 的表达。并使用 IPP 软件定量测定 SDF-1、VEGF 的光密度值。

结果: SDF-1 和 VEGF 在正常结膜组织中仅见上皮基底层细胞有阳性表达或不表达, 翼状胬肉中上皮全层细胞和血管内皮细胞均有阳性表达, 其表达水平有显著性差异。SDF-1 和 VEGF 在翼状胬肉中的表达呈显著相关性 ($r=0.5235$, $P<0.01$)。糖皮质激素应用后, SDF-1 和 VEGF 的表达水平降低, 差异有统计学意义。

结论: SDF-1、VEGF 与翼状胬肉的发生发展存在着重要的联系, 糖皮质激素可能通过减少 SDF-1 和 VEGF 的表达来抑制新生血管的形成。

关键词: 翼状胬肉; 基质细胞衍生因子-1; 血管内皮生长因子; 糖皮质激素

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.05.10

引用: 林舟桥, 林丹丹, 王佩飞, 等. 糖皮质激素对翼状胬肉中 SDF-1 表达的影响. *国际眼科杂志* 2014;14(5):825-828

0 引言

翼状胬肉是一种常见的结膜变性疾病, 我国南方地区年龄超过 50 岁人群的翼状胬肉发病率高达 33.01%^[1]。活动期的胬肉组织常充血发炎, 给工作和生活带来许多麻烦。胬肉组织充血严重时局部应用皮质类固醇眼药水可以减轻炎症及充血。

翼状胬肉的发病机制尚未十分清楚, 目前提出的发病机制包括紫外线的生物学效应、免疫学说、成纤维细胞转化、角膜缘干细胞移行学说、细胞凋亡等^[2]。近来研究表明, 翼状胬肉的发生发展与新生血管有关^[3]。在胬肉组织中血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达量明显增加^[4]。VEGF 可能通过增加血管壁的通透性、促进血管内皮细胞迁移的作用参与翼状胬肉的形成和发展^[5]。近几年来, 研究发现基质细胞衍生因子-1 (SDF-1) 通过与特异性受体趋化因子受体结合, 趋化 CD34⁺ 细胞增殖并诱导血管生成, 从而参与了许多血管新生性疾病的发病过程^[6]。但是 SDF-1 在翼状胬肉发病机制方面的探讨鲜见报导, 翼状胬肉患者胬肉组织中存在明显的血管增生, 考虑 SDF-1 可能也参与翼状胬肉新生血管的形成过程。

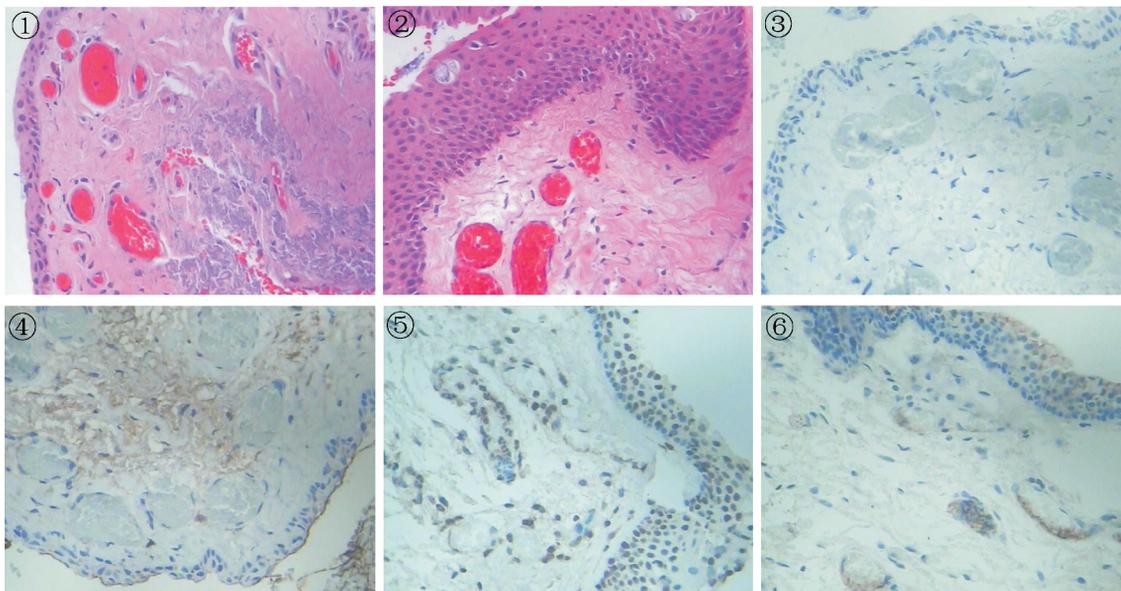


图1 正常结膜组织 HE 染色($\times 400$)。

图3 SDF-1 在正常结膜中的表达($\times 400$)。

图5 SDF-1 在翼状胬肉组织中的表达($\times 400$)。

图2 翼状胬肉 HE 染色($\times 400$)。

图4 VEGF 在正常结膜中的表达($\times 400$)。

图6 VEGF 在翼状胬肉中表达($\times 400$)。

本研究利用免疫组化染色以及 IPP 软件,检测翼状胬肉组织中 SDF-1 和 VEGF 的表达水平,探讨 SDF-1 和 VEGF 在翼状胬肉发生发展中的作用以及糖皮质激素减轻翼状胬肉炎症的机制。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2013-06/12 至我院眼科门诊就诊的翼状胬肉患者 48 例作为研究对象,其中男 23 例,女 25 例,年龄 38~72(平均 52.7 \pm 9.4)岁,选择标准:在鼻侧睑裂部增生的三角形纤维血管组织,其尖端指向角膜中央并侵入角膜缘内 ≥ 3 mm,排除既往有翼状胬肉切除术史,排除眼外伤、葡萄膜炎、青光眼及眼底疾病史,排除其他眼部手术史,并同意参与本试验。由同一名医生诊断并行翼状胬肉切除联合干细胞移植术。术前随机选取 24 例翼状胬肉患者为治疗组,术前给予 0.2g/L 氟米龙眼药水滴眼,3 次/d,1~2 滴/次,应用 1wk 后再行手术治疗;其余 24 例翼状胬肉患者为非治疗组。选取其同期正常球结膜组织 24 例为对照组,标本来自翼状胬肉患者术中移植的上方球结膜瓣组织。

1.2 方法 研究材料:抗 VEGF 单克隆抗体由北京中衫金桥生物公司提供,兔抗人 SDF-1 单克隆抗体由上海博迈生物公司提供,SABC 试剂盒由上海博正生物公司提供。

SP 免疫组化方法,检测治疗组、非治疗组翼状胬肉以及正常组结膜中 VEGF 和 SDF-1 的表达量。每例患者在翼状胬肉切除术后取胬肉体部组织,将标本用 40g/L 甲醛溶液固定,行常规石蜡包埋,连续切片,作 HE 染色供组织学诊断及免疫组化染色。常规石蜡切片逐级脱蜡水化后,高压加热抗原热修复 5~8min,3% 甲醇中室温浸泡 10min,继而用 PBS 冲洗,加第一抗体(抗 VEGF 单克隆抗体、兔抗人 SDF-1 单克隆抗体),湿盒内 4 $^{\circ}$ C 孵育后再加生物素标记的二抗,PBS 洗后 DAB 显色,苏木素轻度复染,中性树脂胶封片,观测结果。用已知的 SDF-1 和 VEGF 阳性表达组织切片作为阳性对照;阴性对照选用 0.01mol/L PBS 缓冲液代替一抗。置于低倍镜下了解组

织大体结构组成后,将切片放在高倍镜(400 倍)下、随机选取 5 个视野观察标本的组织切片的 HE 染色,记录各组每个视野中的炎性细胞数,并取平均值。在免疫组化染色图像中,标本的上皮细胞以及血管内皮细胞出现棕黄色颗粒为阳性表达,采用 image-pro plus 图像分析软件测量随机 5 个视野的光密度值,并取平均值,所得值为该区域的光密度值。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,SDF-1 和 VEGF 在翼状胬肉(治疗组、非治疗组)和正常结膜中的表达比较采用单因素方差分析,两组间比较用 *t* 检验。SDF-1 和 VEGF 在翼状胬肉组织中表达的相关性分析采用 Spearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 翼状胬肉组织病理学特征 显微镜下,正常结膜组织可见上皮层和基质层,基质层血管较疏松,有散在的毛细血管和少量的成纤维细胞(图 1)。翼状胬肉组织的上皮层鳞状上皮增生明显,基质层有较多纤维组织和新生血管组织,伴有较多炎性细胞的浸润,部分切片中还可看到嗜碱性物质和变性物质的存在(图 2)。正常结膜组织和胬肉组织在高倍镜下的炎性细胞数见表 1。三组的炎性细胞数差异有统计学意义($F = 175.35, P < 0.01$)。翼状胬肉组织中的炎性细胞数较正常结膜组织多。通过对比治疗组和非治疗组,发现治疗组的炎性细胞数低于非治疗组($t = 26.73, P < 0.01$),且氟米龙眼药水应用后的翼状胬肉组织其上皮层增生厚度小,基质层的毛细血管组织排列紊乱的程度较非治疗组轻。

2.2 SDF-1、VEGF 在翼状胬肉中的表达及糖皮质激素的影响 通过免疫组化方法,可以观察到 SDF-1、VEGF 蛋白在正常结膜中仅见上皮基底细胞有少量阳性表达或不表达(图 3,4),而在翼状胬肉组织的全层上皮细胞以及血管内皮细胞内均出现 SDF-1 和 VEGF 阳性染色的棕黄色颗粒(图 5,6)。

表1 翼状胬肉和正常结膜组织中 SDF-1、VEGF 的表达及炎

性细胞数	$(\bar{x} \pm s, \text{个})$		
组别	SDF-1	VEGF	炎性细胞数
治疗组	0.1093±0.0004	0.1107±0.0006	43.20±7.13
非治疗组	0.1698±0.0006 ^b	0.1607±0.0007 ^b	79.86±13.81 ^b
对照组	0.0702±0.0012	0.0693±0.086	18.02±10.06
<i>F</i>	50.381	250.221	175.35

^b $P < 0.01$ vs 治疗组。

检测 SDF-1 和 VEGF 在胬肉组织和正常结膜组织中阳性区域的光密度值可以定性地了解其差异。SDF-1、VEGF 在胬肉和正常结膜组织中阳性表达区域的平均光密度值见表 1。SDF-1 和 VEGF 在三组间的数值差异均具有统计学意义 ($F = 50.381, P < 0.01; F = 250.221, P < 0.01$)。SDF-1 和 VEGF 在正常结膜组织中表达量较少, 胬肉组织中, 两者表达量明显高于正常结膜组织。氟米龙应用后翼状胬肉组织中的 SDF-1 和 VEGF 的表达低于非治疗组 ($P < 0.01, P < 0.01$)。可见氟米龙的应用对于胬肉组织中 SDF-1 和 VEGF 的表达有一定的抑制作用。非治疗组中 SDF-1 与 VEGF 的表达相关性经 Spearson 相关分析, 两者呈正相关 ($r = 0.5235, P < 0.01$)。

3 讨论

翼状胬肉以角结膜上皮层的过度增长为特征, 通常位于双眼鼻侧, 胬肉组织呈向心性侵入角膜表层, 引起鳞状上皮化和杯状细胞增生, 同时可伴有 Bowman's 层的破坏^[7]。通过病理形态学观察, 正常结膜组织结构简单, 基质层细胞数量较少, 翼状胬肉中的炎性细胞数则明显增多, 成纤维细胞增殖活跃, 且新生血管丰富。最近的研究显示翼状胬肉是一种与紫外线照射有关的纤维血管增殖性疾病。紫外线照射的增加会引起 Bowman's 膜的生物学发生改变, 产生刺激翼状胬肉生长的免疫因子, 最具有代表性的就是血管内皮生长因子, VEGF 可以导致大量血管组织和纤维细胞的增生和退变^[8]。这都间接说明了翼状胬肉的发生发展和新生血管的形成有着重要的联系。

VEGF 作为血管生成因子大家族的一员, 生理状态下, 可以在眼部呈低表达状态, 它的存在有助于维持血管的完整, 然而过度表达将促进血管的增殖^[9]。本研究中, 观察到 VEGF 在正常结膜中仅在上皮基底层细胞有少量阳性表达或不表达, 而在翼状胬肉组织中的表达量明显高于正常结膜组织, 特别是在上皮细胞和血管内皮细胞中的表达, 这与近来的研究结果相符合^[10]。表明了翼状胬肉的血管增殖与 VEGF 的高表达密切相关, VEGF 的促新生血管生成可能参与了翼状胬肉形成的过程。在结膜下注射 VEGF 抑制剂贝伐单抗能有效抑制翼状胬肉的纤维血管增生^[11]。

SDF-1 是新近发现的一种趋化因子, 主要在骨髓基质细胞中表达, 能够介导 CD34⁺ 造血干细胞和骨髓前体细胞趋化^[6]。近年大量研究表明, SDF-1 和其特异性受体 CXCR4 广泛参与体内各种炎症以及与新生血管形成有关的疾病。本研究中, 免疫组化结果显示在正常结膜组织中 SDF-1 仅在上皮基底层细胞有少量阳性表达或不表达, 而在胬肉组织的全层上皮细胞以及血管内皮细胞内均出现阳性染色的棕黄色颗粒, 其表达量明显高于正常结膜组

织, 差异有统计学意义。SDF-1 在翼状胬肉中的表达水平明显升高则提示了其可能与胬肉的发展过程存在重要的联系。高表达的 SDF-1 可能通过趋化造血干细胞, 募集诱导血管新生从而促进了翼状胬肉的血管增殖。VEGF 和 SDF-1 都是诱导血管生成的重要因子, 在促进新生血管的生成中, 两者可能存在着相互作用的关系。本研究中对翼状胬肉组织中 SDF-1 和 VEGF 的表达量做 Spearson 相关性分析时显示两者呈正相关 ($r = 0.5235, P < 0.01$)。有研究认为^[12] 内皮细胞上的 SDF-1 与受体 CXCR4 相互作用, 通过诱导内皮细胞 VEGF 的过表达来促进血管新生。因而可推测: 在翼状胬肉的发生过程中, SDF-1 与 VEGF 两者相互影响, 互相加强各自的生物学功能, 从而促进翼状胬肉的血管增生。

糖皮质激素具有抗炎、抗免疫、抗毒素、抗休克等药理作用, 其中抗炎和抗免疫作用与抑制新生血管生成有着密切关系。其抗炎和抗免疫的作用主要通过减轻充血、降低毛细血管的通透性、抑制炎性细胞的迁移以及阻止炎性介质的释放, 并且可通过改变细胞外机制的降解等多种途径来抑制新生血管形成^[13]。在细胞分子学层面, 糖皮质激素的作用是通过与其特异性受体相结合, 作用于靶基因 DNA 上特异性的反应元件, 通过改变靶基因的转录水平而对靶细胞产生诱导或者抑制效应来实现的。糖皮质激素作为抑制新生血管的药物已广泛应用于眼部疾病。局部应用可治疗和控制黄斑水肿、糖尿病视网膜病变、中央静脉阻塞、脉络膜视网膜新生血管等。新生血管的生成是个复杂的过程, 它由基底膜的降解, 内皮细胞活化、增殖、迁移, 血管管腔形成等多个步骤有序协调完成, 在此过程中, 有血管新生刺激因素, 如 VEGF 的参与。Edelman 等^[14] 观察到糖皮质激素能够减少 VEGF 的表达, 促使脉络膜新生血管消退。大量动物试验表明曲安奈德可下调炎症标记物、VEGF 和内皮细胞的 MMPs 活性等作用^[15]。Ozaki 等^[16] 发现地塞米松可以下调兔眼在缺氧状态下 VEGF-2 受体 mRNA 的表达, 从而阻断糖尿病视网膜血管病变。Kompella 等^[17] 利用细胞生存活力测定等方法, 检测到布德松能有效地抑制人 ARPE-19 细胞株 RPE 细胞的 VEGFmRNA 的表达, 从而降低 VEGF 的分泌。对于眼部糖皮质激素应用对 SDF-1 表达的影响尚未见报道。本研究中, 可观察到, 治疗组中 SDF-1 和 VEGF 的表达均低于非治疗组, 氟米龙应用后, SDF-1、VEGF 的表达量下降。结合前人的研究, 我们推测, 糖皮质激素有可能作用于胬肉组织中的 SDF-1 和 VEGF 相关受体, 下调 SDF-1、VEGF 的表达量, 从而抑制新生血管的生成, 延缓翼状胬肉的发生发展。目前糖皮质激素的给药方式主要通过眼表滴剂、结膜下注射、和玻璃体腔内注射等方式, 长效缓释剂等新的给药方式仍处于研发和临床试验中, 在糖皮质激素的应用同时, 还要注意白内障、高眼压、视网膜坏死等并发症的发生。

综上所述, SDF-1 与 VEGF 可能通过促新生血管形成参与了翼状胬肉的发生发展的过程, 且两者相互影响, 糖皮质激素可以通过减少 SDF-1 和 VEGF 的表达来抑制新生血管的形成, 从而减轻翼状胬肉的炎症, 其通过新的剂型和给药方式来延缓翼状胬肉的发展以及减少术后复发需要进一步的研究。

参考文献

1 Wu K, He M, Xu J, et al. Pterygium in aged population in Doumen County. *China Eye Science* 2002;18(3):181-184
 2 郑根主,郑琦,许燕红. 翼状胬肉发病机制和治疗的研究进展. *河北医药* 2011;33(14):2195-2198
 3 代震宇,李立. 角膜新生血管治疗的研究进展. *国际眼科杂志* 2006;6(4):844-847
 4 Pent I, Jin D, Rafii S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol* 2007;28(7):299-307
 5 Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol* 2005;128(3):303-309
 6 尹扬光,黄岚,赵晓辉,等. SDF-1 对小鼠骨髓源性内皮祖细胞数量及功能的影响. *心血管康复医学杂志* 2006;15(5):427-434
 7 Coroneo MT, Di Girolamo N, Wakefield D. The pathogenesis of pterygia. *Curr Opin Ophthalmol* 1999;10(4):282-288
 8 Lee DY, Cho HJ, Kim JT, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase in pterygia. *Cornea* 2001;20(7):738-742
 9 张雁冰,成霄黎. 血管内皮生长因子与糖尿病视网膜病变的研究进展. *山西医药杂志* 2006;8(35):714-717

10 李明渊,唐仁泓. HIF-1 与 VEGF 在翼状胬肉中的表达及意义. *眼科研究* 2009;27(3):214-217
 11 Di Girolacaro N, Coroneo MT, Walcefield D. Active matrilysin (MMY-71) in human pterygia: potential role in angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(9):1963-1968
 12 Salvucci O, Yao L, Villalba S, et al. Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood* 2002;99(8):2703-2711
 13 张军军,刘宜. 曲安奈德玻璃体腔内注射疗法的研究现状. *中华眼底病杂志* 2005;21(4):203-204
 14 Edelman JL, Castro MR, Wen Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression of blood vessels in the rat cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(6):1112-1123
 15 许建华,刘哲丽,李若溪,等. 曲安奈德和血管内皮生长因子在幼鼠增生性视网膜病变中的作用. *国际眼科杂志* 2006;6(3):587-590
 16 Ozaki NK, Beharry KD, Nishihara KC, et al. Regulation of retinal vascular endothelial growth factor and receptors in rabbits exposed to hyperoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(5):1546-1557
 17 Kompella UB, Bandi N, Ayalasonmayajula SP. Subconjunctival nano and microparticles sustain retinal delivery of budesonide, a corticosteroid capable of inhibiting VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(3):1192-1201

2014 国内主要眼科会议一览

会议名称	地点	时间	网址
第十四届全国角膜及眼表疾病学术大会 暨第六届全国角膜屈光学术大会	上海	4.24-4.27	http://tougao.sd-eh.com/html/news/25.html
第十六届全国白内障与人工晶状体学术会议	天津	6.19-6.22	http://www.eye-zju.com/news_disp.php?id=1281
2014 全国斜视与小儿眼科学国际高峰论坛	南宁	6.13-6.15	http://www.cjo-eye.com/index.php?c=defaults&m=news&id=354
第十九次全国眼科学术大会 第十七届亚非眼科会议	西安	9.17-9.21	http://www.aaco2014china.org/

注:具体会议时间及安排以主办方通知为主。