

高危角膜移植大鼠排斥反应及 VEGF-C/D 表达的研究

王启明, 赵心悦, 王 智

基金项目:湖北省科学技术厅资助项目(No. 2015CFB622)
作者单位:(430000)中国湖北省武汉市,华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科
作者简介:王启明,博士,主治医师,研究方向:眼角膜病变。
通讯作者:王启明. zrl13530912001@163.com
收稿日期:2016-04-26 修回日期:2016-09-06

Study of high-risk corneal transplantation rejection and the expression of VEGF-C/D

Qi-Ming Wang, Xin-Yue Zhao, Zhi Wang

Foundation item: Department of Science and Technology Project in Hubei Province (No. 2015CFB622)
Department of Ophthalmology, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, Hubei Province, China
Correspondence to: Qi-Ming Wang. Department of Ophthalmology, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, Hubei Province, China. zrl13530912001@163.com
Received: 2016-04-26 Accepted: 2016-09-06

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression and the significance of VEGF-C/D in rat cornea after alkali burning as well as the role of lymphangiogenesis in the high-risk corneal transplantation rejection.

• **METHODS:** The model of alkali burn corneal was made. Different times corneas were taken to electron microscope for vascularization, and examined the expression of VEGF-C/D and VEGFR-3 in 1, 3, 5, 7, 14, 28d. The other rat cornea after alkali burn were divided into four parts to penetrate keratoplasty, containing only blood vessels in the cornea (group A), angiogenesis and lymphangiogenesis (group B), lymphangiogenesis degenerating period (group C), angiogenesis degenerating period (group D). In addition, there are also normal groups (group N) to compare the RI values and survival time of corneal graft.

• **RESULTS:** Electron microscopy showed that, when the first 7d rat cornea appeared neovascularization after alkali burn, but not lymphangiogenesis. The occurrence of new blood vessels and lymphatic in 2wk. There were no obvious lymphangiogenesis in 5wk and the angiogenesis gradually subside in 8 wk. The expression of VEGF-C/D and VEGFR-3 in the corneas of rats were up-regulated in the third days after the injury, and reached its peaks at 5d. The average survival time of group N, A, B, C, D were (14.25±0.62)d, (9.35±1.02)d, (5.06±1.13)d, (8.71±0.83)d, (9.44±1.05)d after transplant cornea. Compared to the rest of the group, group B plant average survival time significantly shortened ($P<0.05$), while compared with group B, the survival time of A, C, D groups were significantly longer ($P<0.05$).

• **CONCLUSION:** VEGF-C/D and VEGFR-3 are expressed significantly after corneal alkali burn. New lymphatic vessels can accelerate high-risk corneal transplantation immune rejection.

• **KEYWORDS:** corneal transplantation; corneal neovascularization; corneal lymphangiogenesis; alkali burn; immune rejection

Citation: Wang QM, Zhao XY, Wang Z. Study of high-risk corneal transplantation rejection and the expression of VEGF-C/D. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(10):1812-1815

摘要

目的:探讨鼠角膜碱烧伤后 VEGF-C/D 的表达和意义,以及新生淋巴管在极高危角膜移植后排斥反应中的作用。

方法:制作角膜碱烧伤模型,取不同时间段角膜进行电镜观察,观察角膜血管化情况;采用免疫组织化学方法检测 1、3、5、7、14、28d 角膜组织 VEGF-C/D 及 VEGFR-3 的表达;并在角膜中仅有血管(A组),同时存在新生血管及新生淋巴管(B组),新生淋巴管消退期(C组),角膜新生血管消退期(D组)以及正常组(N组)进行穿透性角膜移植,比较不同角膜植片的排斥反应指数(rejection index, RI)值及存活时间。

结果:电镜观察发现,在碱烧伤后第7d时鼠角膜出现新生血管,未出现新生淋巴管,在碱烧伤2wk时出现新生血管的同时出现淋巴管,5wk时无明显的新生淋巴管,8wk时新生血管逐渐消退;大鼠角膜组织中 VEGF-C/D 及 VEGFR-3 的表达从第3d开始明显上升,并于第5d达到最高峰。角膜移植后 N、A、B、C、D 组的植片平均存活时间分别为 14.25±0.62、9.35±1.02、5.06±1.13、8.71±0.83、9.44±1.05d。组间比较发现,B组植片平均存活时间显著性缩短($P<0.05$),A、C、D 的存活时间均显著性延长($P<0.05$)。

结论:角膜碱烧伤后存在 VEGF-C/D 及 VEGFR-3 的高表达,而且新生淋巴管能加速极高危角膜移植后的免疫排斥反应。

关键词:角膜移植;新生血管;淋巴管;碱烧伤;免疫排斥
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.10.06

引用:王启明,赵心悦,王智. 高危角膜移植大鼠排斥反应及 VEGF-C/D 表达的研究. 国际眼科杂志 2016;16(10):1812-1815

0 引言

据统计,全世界因角膜病而导致双眼盲目者约1千万,我国约占盲目总人数的15.38%。角膜移植术是角膜盲的唯一复明手段。但是免疫排斥是导致植片失败的最主要原因^[1]。角膜血管化是其首要的“高危”因素,尽管术后运用各类免疫抑制类药物,仍有超过49%的角膜植片不可避免地发生了免疫排斥;而在眼化学伤类血管化的角膜上行角膜移植,其排斥率甚至高达90%^[2]。因此深入探讨高危角膜移植术后免疫排斥反应的机制,能够有效地提高其预后,具有实际的临床意义。在角膜免疫中,角膜新生血管与新生淋巴管共同构成了角膜的“免疫双臂”。然而相对于新生血管的研究,角膜新生淋巴管的研究尚属于起步阶段。目前,虽然对角膜淋巴管新生的机制尚未完全阐明,但VEGF-C/D-VEGFR3是公认的、首要的调控因子。我们在前期研究的基础之上,分别在淋巴管生长的不同时期行角膜移植,以明确淋巴管在“高危”角膜移植免疫排斥中的决定性作用,并对VEGF-C/D的表达进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料 选择健康无眼病雄性SD大鼠81只,Wistar大鼠15只作为角膜移植供体(供体眼为双眼),体质量180~230g。随机取13只SD大鼠作为正常角膜组(N组),剩余SD大鼠为碱烧伤实验组。制备角膜Ⅲ级烧伤程度,立即用100mL生理盐水冲洗角膜及结膜囊至眼表pH值接近7.0。ELISA试剂盒购于上海一研生物科技有限公司。利用抗原免疫动物获得的羊抗大鼠LYVE-1多克隆抗体、羊抗大鼠VEGFR-3多克隆抗体及羊抗大鼠VEGF多克隆抗体购自上海翔升生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 角膜碱烧伤模型的制备方法 角膜碱烧伤模型的制备方法^[3]:水合氯醛(350mg/kg)全身麻醉后,制备直径约3mm Whatman的圆形滤纸在1μmol/L的NaOH中浸透20s,取出滤纸用干燥纸片吸除多余滤液,贴于角膜中央烧灼30s。移去滤纸后立即用无菌生理盐水冲洗结膜囊,以氯霉素眼液滴眼。正常组大鼠麻醉后,用生理盐水冲洗结膜囊,氯霉素眼液滴眼。

1.2.2 电镜观察 从碱烧伤实验组中抽取30只大鼠,每组5只,于第3、7d、2、3、5、8wk取角膜做电镜观察,正常组取5只作为对照。无菌条件下距角膜缘内1mm处平行角膜缘环形剪取角膜,2.5%戊二醛磷酸缓冲液固定2h,1%锇酸固定2h,蒸馏水洗后,用50%、70%、80%、90%、100%丙酮逐级常规脱水,包埋,制超薄切片后,用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色,透射电镜下观察。

1.2.3 VEGF-C/D和VEGFR-3表达 从碱烧伤实验组抽取18只(36眼),分成6组,每组3只(6眼),分别于第1、3、5、7、14、21、28d按上述方法去角膜组织后,用10%中性福尔马林液中固定24h,常规逐级脱水,用二甲苯透明,浸蜡后包埋;正常组取3只作为对照。采用免疫组织化学染色法。免疫组织化学染色:石蜡切片进行脱蜡和水化及阻断后,用免疫试剂盒进行检测,具体操作步骤依照试剂盒说明。光镜下表现为细胞质内表现出基本均匀的棕黄色或棕褐色颗粒状反应为阳性表达。VEGF-C/D、VEGFR-3表达采用常规二步法检测,免疫组织化学计算机图像分析,方法为:每个角膜取5张切片,显微镜下低倍视野寻找染色清晰、背景良好的区域,每张切片于在×400下各随

机采集10幅图像并采用ImageProPlus6图像分析软件分析,计算5张切片的平均光密度,以此作为阳性细胞的平均光密度。

1.2.4 穿透性角膜移植的方法^[4-5] 受体大鼠于术前用水合氯醛(350mg/kg)全身麻醉后,用10g/L阿托品眼水散瞳,手术显微镜下严格无菌操作。首先于供体角膜中央区钻取直径为3mm植片,置于Optisol液中备用。用直径3mm环钻钻取受体大鼠中央区角膜后,制备植床,将供体角膜植片置于植床。以10-0尼龙丝线间断缝合8针,线结暴露不包埋。术后用妥布霉素滴眼液滴眼。

1.2.5 角膜移植后观察病理变化 从烧伤实验组中抽取20只大鼠,每组5只,于角膜碱烧伤后仅出现新生血管(A组),角膜新生血管及新生淋巴管达到高峰(B组),角膜新生淋巴管消退期(C组)及角膜新生血管消退期(D组)进行穿透性角膜移植。正常组取5只为对照(N组)。钻取角膜组织后,于10%中性福尔马林液中固定24h,制备角膜蜡块后,作4μm厚连续切片,梯度酒精脱水,伊红及苏木素染色,显微镜下观察角膜组织中的细胞浸润、新生血管及组织水肿的情况。

1.2.6 角膜移植后观察指标 术后每天在裂隙灯显微镜下观察术眼角膜。参照Holland等^[6]制定的标准,以混浊、水肿和新生血管3项指标进行评分。混浊指标:0分为完全透明,1分为植片轻度混浊,2分为混浊较重,虹膜纹理模糊可见,3为虹膜血管窥不清,但瞳孔轮廓可见;4分为瞳孔轮廓不清。水肿指标:0分为无水肿,1分为中度水肿,2分为伴有植片增厚的显著水肿。新生血管评分:1分为新生血管在任何象限伸入达到植片半径的25%以内;2分为新生血管达到植片半径的50%以内;3分为新生血管达到植片半径的75%以内;4分为新生血管达到植片中央。3项评分之和定为当日的排斥反应指数(RI)。当RI≥5时或混浊一项达到3分时视为排斥反应发生。

统计学分析:采用SPSS 17.0统计软件做统计处理。各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数的比较采用Game-Howell III检验,多组间数据的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),相关性分析采用Spearman相关性检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 碱烧伤后电镜检测 正常对照组大鼠所取的角膜组织内未发现血管和淋巴管,在碱烧伤第7d时基质层出现新生血管,但未出现新生淋巴管,而在碱烧伤2wk基质层出现新生血管的同时出现新生淋巴管。新生血管细胞外有完整的基底膜,外周常可见周细胞。管腔内常可见红细胞;而淋巴管无周细胞,基底膜不完整,管腔内无红细胞。3wk时新生血管与新生淋巴管同时达到高峰,但新生淋巴管角较新生血管早发生退化,5wk时已无明显的新生淋巴管,8wk时新生血管逐渐消退(图1)。

2.2 角膜VEGF-C/D和VEGFR-3的表达 免疫组织化学显示正常对照组大鼠角膜仅有极弱的VEGF-C/D的阳性表达。角膜碱烧伤后,其表达开始逐渐增强。第3d角膜基质层有明显的VEGF-C/D的阳性表达,在第5d时达到高峰,主要表达于角膜的上皮层,表达的阳性颗粒多位于浸润的炎细胞及管腔周围,烧伤后14、21d表达逐渐降低,到28d末时表达极弱,与正常对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。正常大鼠角膜中VEGFR-3表达极

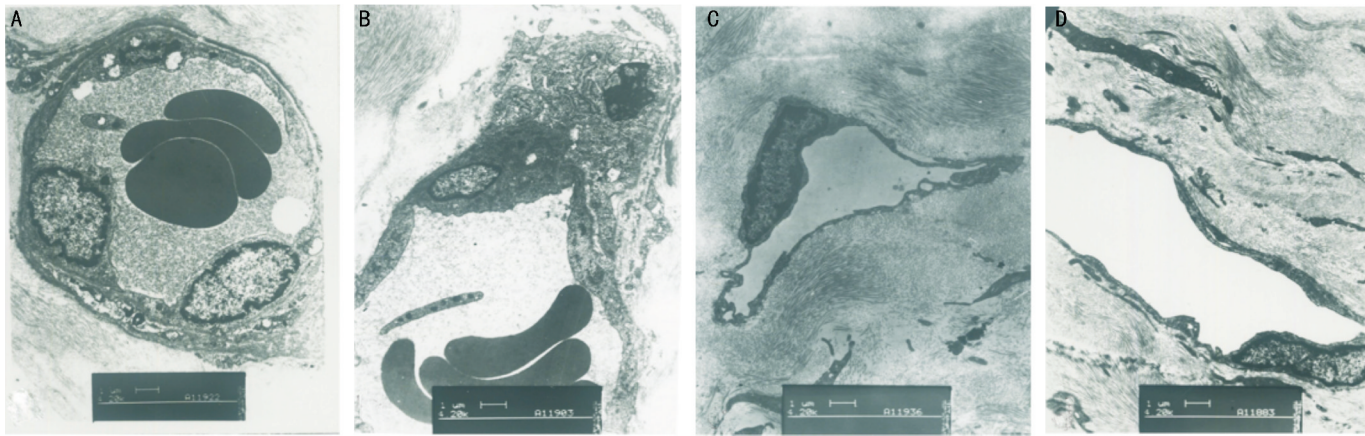


图1 大鼠角膜碱烧伤2wk电镜检测 A,B:血管可见管腔内有红细胞;C,D:淋巴管(C图可见淋巴细胞内皮核)。

其微弱,3d时开始明显增加,5d表达达高峰,此后表达开始逐渐下降,至28d未表达极弱。但与正常对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$,表1,图2,3)。

2.3 角膜排斥反应的显微镜检测 本实验在正常组(N组),角膜碱烧伤后1wk(仅出现新生血管,A组),3wk(角膜新生血管及新生淋巴管达到高峰,B组),5wk(角膜新生淋巴管消退期,C组)及8wk(角膜新生血管消退期,D组)进行穿透性角膜移植。角膜移植后均出现过混浊、水肿,几天后开始透明,可能为手术创伤所致。角膜移植后7d,N组植片中仅有少量炎症细胞浸润,但植片透明,瞳孔清晰可见。A组植片有一定数量炎症细胞浸润,上皮层水肿,轻度混浊,RI为 1.32 ± 0.45 ;B组植片中大量的炎症细胞浸润,基质层有水肿,大量的角膜新生血管侵入植片,新生血管累及角膜的3~4个象限,部分血管生长已达瞳孔中央,RI为 7.52 ± 0.61 。C组和D组植片中有一定数量的炎症细胞浸润,角膜新生血管侵及植片的1~2个象限,RI分别为 4.32 ± 0.1 和 3.21 ± 0.35 。各组之间比较,N组角膜中血管的生长速度及密度最低,而B组最高。N组的存活时间为 14.25 ± 0.62 d,与N组相比,A组(9.35 ± 1.02 d)、B组(5.06 ± 1.13 d)、C组(8.71 ± 0.83 d)、D组(9.44 ± 1.05 d)均显著性缩短($P < 0.05$),与B组相比,A、C、D的存活时间均显著性延长($P < 0.05$)。对各组的存活率进行比较,可知A、C、D三组植片的存活率与B组比较均较高,差异有统计学意义($P < 0.05$),A、C、D组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$,图4,5)。

3 讨论

角膜碱烧伤是一种常见的眼科疾病,常能引起角膜上皮缺损、基质炎性细胞浸润、水肿、混浊,致角膜血管化,破坏角膜免疫赦免状态,还降低了其后角膜移植的成功率^[7]。之前的研究多侧重于角膜新生血管,近年来对角膜淋巴管的研究逐渐重视。研究表明 VEGF-C/D 及 VEGFR-3 是调控淋巴管新生的重要信号途径之一。VEGF-C/D 是 VEGF 家族成员之一,是特异性的淋巴管生长因子,能够选择性地促进淋巴管增生,增强淋巴管的通透性^[8]。VEGFR-3 是 VEGF-C/D 的配体之一,研究表明其能维持淋巴管系统的稳定。VEGFR-3 与 VEGF-C/D 结合后通过 MAPK 途径引起淋巴管的内皮细胞增殖以及分化等一系列生物学行为的发生^[9]。

本实验大鼠角膜碱烧伤后 VEGF-C/D 及 VEGFR-3 在角膜中有一个动态的过程,第3d角膜基质层有明显的

表1 大鼠角膜碱烧伤后角膜中 VEGF-C/D 和 VEGFR-3 的表达

时间	VEGF-C/D	VEGFR-3
0d	0.087 ± 0.012	0.081 ± 0.013
1d	0.165 ± 0.014	0.122 ± 0.017
3d	0.241 ± 0.011	0.235 ± 0.011
5d	0.416 ± 0.019	0.411 ± 0.013
7d	0.287 ± 0.008	0.291 ± 0.019
14d	0.179 ± 0.015	0.194 ± 0.014
21d	0.136 ± 0.011	0.145 ± 0.010
28d	0.115 ± 0.006	0.108 ± 0.005

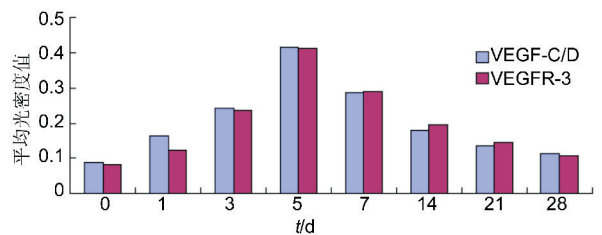


图2 碱烧伤后不同时间点 VEGF-C/D 和 VEGFR-3 表达的动态变化。

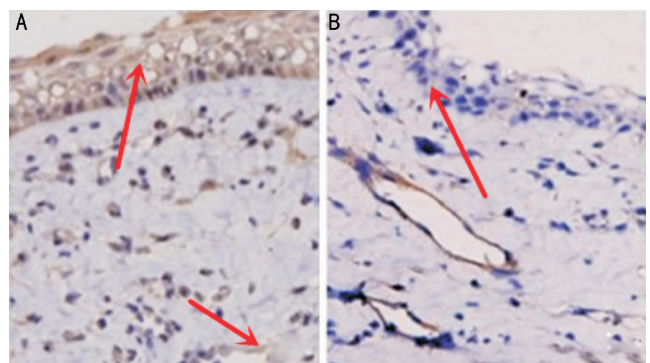


图3 角膜碱烧伤3d后 VEGF-C/D(A)和 VEGFR-3(B)的表达 A:VEGF-C/D;B:VEGFR-3。

阳性表达,在第5d时达到高峰,还伴随着淋巴管的生成,则表明 VEGF-C/D 与 VEGFR-3 有可能是角膜碱烧伤后淋巴管生成的重要原因之一。

免疫排斥反应是角膜移植失败的主要原因。正常角膜中没有血管以及淋巴管,因此能维持角膜处于相对的免疫赦免状态^[10]。然而,血管化角膜中存在着新生淋巴

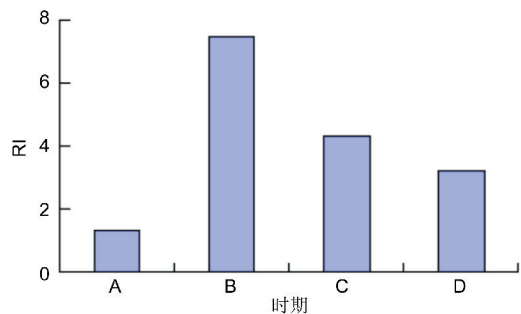


图4 角膜植片不同时期的RI变化曲线 A:烧伤后1wk;B:烧伤后3wk;C:烧伤后5wk;D:烧伤后8wk。

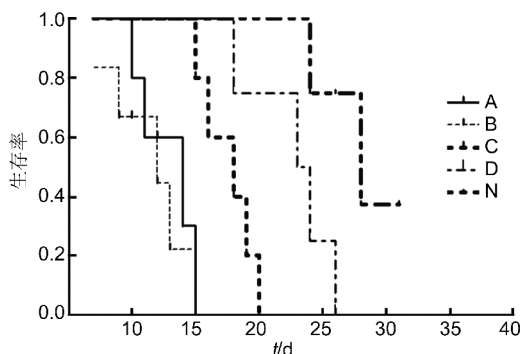


图5 各组大鼠的角膜植片存活曲线。

管,这意味着在血管化角膜中进行角膜移植能够诱发免疫排斥反应。

我们发现在碱烧伤第7d时基质层出现新生血管,但未出现新生淋巴管,而在碱烧伤2wk基质层出现新生血管的同时出现新生淋巴管,3wk时新生血管与新生淋巴管同时达到高峰,5wk时已无明显的新生淋巴管,8wk时新生血管逐渐消退。说明新生淋巴管和血管的生长并不完全平行而出现了“分离生长”^[11]。因此在角膜的不同时期进行角膜移植,发现B组植片存活时间显著缩短,说明角膜新生血管及淋巴管在高危角膜移植的免疫排斥反应中起

重要作用。而A、C、D三组植片之间无统计学意义,说明相比较新生血管而言,新生淋巴管在角膜移植反应中所起的作用更为显著。

总之,本研究观察了角膜碱烧伤后新生血管及淋巴管的情况,并对VEGF-C/D及VEGFR-3的表达进行了初步探讨,而且对高危角膜移植中淋巴管的作用进行了研究,为角膜移植免疫排斥反应提供一个新的研究思路。

参考文献

- 凌士奇,黎韦华,林浩添,等.角膜新生淋巴管和新生血管在高危角膜移植免疫排斥中的作用比较.中华显微外科杂志 2011;34(6):482-484
- Vladimir Lamm V, Hidetaka Hara H, Alex Mammen A, et al. Corneal blindness and xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2014; 21(2):99-114
- 顾宏卫,胡楠.大鼠角膜碱烧伤模型制备方法的研究.国际眼科杂志 2013;13(6):1093-1095
- 高华,王晔,谢立信.穿透性角膜移植术后慢性失功移植片的免疫学研究.眼科 2009;18(3):245-247
- 蔡剑秋,徐栩,陈长曦,等.高危角膜移植排斥动物模型建立的评价和显微手术技巧.中华显微外科杂志 2007;30(1):52-54
- 郑艳华. TLR2单克隆抗体影响大鼠角膜移植排斥反应的实验研究.南方医科大学 2015
- 戴鹏飞,王峰,郑玉萍,等.大鼠角膜碱烧伤后ILK和VEGF的表达与角膜新生血管的相关性研究.国际眼科杂志 2012;12(2):208-211
- Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* 2010;465(7297):483-486
- 陶绍霖,谭群友. VEGF-C/VEGF-D-VEGFR-3信号通路在淋巴管生成及肺癌淋巴转移中作用机制的研究进展.中华临床医师杂志(电子版) 2011;5(3):233-236
- 唐先玲,刘平.角膜新生淋巴管的分子免疫学研究进展.眼科新进展 2010;30(4):393-396
- Shintaro N, Souska Z, Yasuaki H, et al. Blood vessel endothelial VEGFR-2 delays lymphangiogenesis: an endogenous trapping mechanism links lymph- and angiogenesis. *Blood* 2011;117(3):1081-1090