

VEGF 和 CCR3 在翼状胬肉组织中的表达及意义

刘 慧,张 敏

引用:刘慧,张敏. VEGF 和 CCR3 在翼状胬肉组织中的表达及意义.国际眼科杂志 2019;19(4):551-554

基金项目:襄阳市科技局市级科技计划项目(No.2015zd11)

作者单位:(441000)中国湖北省襄阳市,湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院眼科

作者简介:刘慧,湖北医药学院在读硕士研究生,研究方向:眼表疾病。

通讯作者:张敏,毕业于华中科技大学,硕士研究生导师,研究方向:眼表疾病.1025968327@qq.com

收稿日期:2018-09-05 修回日期:2019-02-28

摘要

目的:探究血管内皮生长因子(VEGF)及趋化因子受体 3(CCR3)在翼状胬肉组织中的表达及意义。

方法:纳入行翼状胬肉切除联合自体结膜瓣移植术的患者 18 例 18 眼,术中取翼状胬肉组织;行巩膜扣带环扎术的孔源性视网膜脱离患者 14 例 14 眼,术中取鼻侧球结膜组织。采用 HE 染色法观察翼状胬肉和正常结膜的组织学差异,采用免疫化学法分析 VEGF 和 CCR3 的表达水平,采用 qRT-PCR 法检测 VEGF 和 CCR3 mRNA 的表达水平。

结果:与正常结膜组织相比,翼状胬肉组织上皮层明显增厚,基质层组织排列紊乱,且 VEGF(0.69 ± 0.0875 vs 0.05 ± 0.0024)和 CCR3(0.45 ± 0.0248 vs 0.03 ± 0.0074)表达水平显著升高(均 $P < 0.01$)。翼状胬肉组织中 VEGF mRNA 表达水平约为正常结膜组织的 12 倍(12.33 ± 2.84 vs 1.00 ± 0.08),CCR3 mRNA 的表达水平约为正常结膜组织的 160 倍(159.60 ± 34.15 vs 1.00 ± 0.09)。

结论:翼状胬肉组织中 VEGF 和 CCR3 表达明显升高,提示二者可能参与翼状胬肉的发生,促进疾病的发展。

关键词:翼状胬肉;血管内皮生长因子;趋化因子受体 3;新生血管

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.4.05

Vascular endothelial growth factor and chemokine receptor-3 in the pathogenesis of pterygium

Hui Liu, Min Zhang

Foundation item: Xiangyang Municipal Science and Technology Planning Project (No.2015zd11)

Department of Ophthalmology, Xiangyang First People's Hospital Affiliated to Hubei Medical University, Xiangyang 441000, Hubei Province, China

Correspondence to: Min Zhang. Xiangyang First People's Hospital Affiliated to Hubei Medical University, Xiangyang 441000, Hubei

Province, China. 1025968327@qq.com

Received:2018-09-05 Accepted:2019-02-28

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and chemokine receptor 3 (CCR3) in pterygium.

• **METHODS:** The expression of VEGF and CCR3 were detected in 18 patients (18 eyes) with pterygium and compared with the normal conjunctiva epithelium in other 14 cases (14 eyes). The histological differences between the two groups were compared by hematoxylin and eosin (HE) staining. The expression of VEGF and CCR3 in pterygium and normal conjunctival tissues were analyzed by immunofluorescence and immunohistochemical. The mRNA expression of VEGF and CCR3 were assessed by Real-time PCR.

• **RESULTS:** Compared with normal conjunctival tissue, the epithelial layer of pterygium was obvious thickening, the stromal layer was more disordered, and the expression levels of VEGF (0.69 ± 0.0875 vs 0.05 ± 0.0024) and CCR3 (0.45 ± 0.0248 vs 0.03 ± 0.0074) were significantly elevated (all $P < 0.01$). The expression level of VEGF mRNA in pterygium was about 12 times that of normal conjunctival tissue (12.33 ± 2.84 vs 1.00 ± 0.08), and the expression level of CCR3 mRNA was about 160 times as many as conjunctival tissue (159.60 ± 34.15 vs 1.00 ± 0.09).

• **CONCLUSION:** The expression of VEGF and CCR3 in pterygium was significantly increased, suggesting that they may be involved in the occurrence of pterygium and promote the development of the disease.

• **KEYWORDS:** pterygium; vascular endothelial growth factor; chemokine receptor 3; neovascularization

Citation: Liu H, Zhang M. Vascular endothelial growth factor and chemokine receptor-3 in the pathogenesis of pterygium. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2019;19(4):551-554

0 引言

翼状胬肉是一种常见的眼表疾病,因其形状酷似昆虫翅膀而得名。主要表现为鼻侧或颞侧球结膜及结膜下纤维血管组织增生,向角膜表面进行性生长,大多发生在鼻侧。翼状胬肉的生长除了影响美观外,在侵及角膜表面和视轴区后,还可能会引起散光,影响视力。多数研究表明,翼状胬肉的发生是在环境因素的影响下,多种因子共同作用的综合性结果,其中新生血管在其发生、发展过程中起到了重要作用^[1-4]。研究发现,翼状胬肉组织中的微血管密度明显高于正常结膜组织^[5-6]。血管内皮生长因子(VEGF)是产生新生血管作用最强的一种细胞因子,主要由成纤维细胞产生,是一种糖基化分泌性多肽因子,其与

相应受体结合后可通过调控各种信号通路,诱导新生血管形成,引起细胞增殖,内皮迁移,增加管壁通透性。趋化因子受体3(CCR3)是趋化因子CC类受体,是由各种细胞产生的一种单链的小分子蛋白质家族,通过与G蛋白偶联受体结合而发挥生物学效应,主要表达于嗜酸粒细胞、嗜碱粒细胞、Th2细胞等。本研究主要探究VEGF及CCR3在翼状胬肉组织中的表达及意义。

1 对象和方法

1.1 对象 收集2018-01/06于我院住院的翼状胬肉患者18例18眼为试验组,其中男10例,女8例,平均年龄 56.3 ± 9.0 岁。纳入标准:(1)初发翼状胬肉;(2)翼状胬肉组织侵入角膜缘 $\geq 3\text{mm}$ 。排除标准:(1)术前检查有眼部炎症疾病,既往有眼部手术史者;(2)术前1mo接受免疫抑制剂药物及抗凝药物治疗者;(3)2型糖尿病患者。选取同期行巩膜扣带环扎术的孔源性视网膜脱离患者14例14眼为对照组,其中男7例,女7例,平均年龄 53.8 ± 11.6 岁。对照组患者排除标准同试验组。两组患者性别构成比、年龄差异无统计学意义($\chi^2=0.098, P=1.000; t=0.700, P=0.489$)。本研究经本院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 取材 试验组患者行翼状胬肉切除联合自体结膜瓣移植术,术中取翼状胬肉组织;对照组患者行巩膜扣带环扎术,术中取鼻侧球结膜组织。组织取下后立即剪碎,一部分经固定液固定后行HE染色观察翼状胬肉与正常结膜组织的差异,一部分立即用液氮低温处理后置于 -80°C 冰箱保存,用于检测VEGF和CCR3的表达水平。

1.2.2 主要试剂与仪器 兔抗VEGF多克隆抗体(美国Santa Cruz公司),鼠抗CCR3多克隆抗体、HRP标记兔抗鼠抗体、HRP标记羊抗兔抗体(美国KPL公司),CY3标记羊抗兔抗体、CY3标记羊抗鼠抗体(美国Jackson公司),免疫组织化学染色试剂盒、DAB显色剂(丹麦DAKO公司K5007),Trizol试剂(Invitrogen, 15596-026),反转录试剂盒(日本TaKaRa公司,RR047A),荧光定量试剂盒(日本TaKaRa公司,RR420A);石蜡切片机(上海徕卡仪器有限公司, RM2016),PCR仪(杭州博日科技, TC-XP),荧光定量PCR仪(Life technologies公司, Step One™ Real-Time PCR System)。

1.2.3 HE染色 样本组织固定于4%多聚甲醛24h以上,常规脱水、包埋制石蜡切片。切片经二甲苯I 20min-二甲苯II 20min-无水乙醇I 10min-无水乙醇II 10min-95%乙醇5min-90%乙醇5min-80%乙醇5min-70%乙醇5min-蒸馏水洗脱蜡至水。苏木素染细胞核8min,自来水洗,1%盐酸-乙醇分化数秒,自来水洗,0.6%氨水返蓝,流水冲洗。伊红染细胞质3min。然后将切片依次放入95%乙醇I 5min-95%乙醇II 5min-无水乙醇I 5min-无水乙醇II 5min-二甲苯I 5min-二甲苯II 5min中脱水透明,晾干后中性树脂封片。显微镜下观察拍片。

1.2.4 免疫荧光染色 固定组织后,予石蜡包埋切片,经脱蜡后置于含抗原修复缓冲液的修复盒中于微波炉内进行抗原修复。中火至沸后断电间隔10min,中低火至沸,自然冷却后将切片置于PBS缓冲液中,晃动洗涤。3%BSA封片,滴加一抗(VEGF抗体、CCR3抗体;1:100),平放于湿盒内4℃孵育过夜。切片置于PBS缓冲液中,晃动洗涤。滴加二抗(CY3标记相应二抗,1:50),避光室温孵

育,晃动洗涤。DAPI染液复染细胞核,晃动洗涤,抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜下观察并采集图像。实验重复3次。

1.2.5 免疫组织化学染色 石蜡切片脱蜡至水,抗原修复,滴加10%兔血清封片,滴加一抗(VEGF抗体、CCR3抗体,1:100),切片平放于湿盒内4℃孵育过夜。滴加二抗(HRP标记相应二抗,1:50),室温孵育50min。DAB显色,自来水冲洗切片终止显色。苏木素复染后梯度浓度乙醇脱水透明,将切片从二甲苯中拿出来晾干,中性树脂封片。至显微镜下观察,每张切片随机挑选200倍视野进行拍照。应用Image-Pro Plus 6.0软件选取相同的棕黄色作为判断所有照片阳性的统一标准,分析累积光密度值(IOD),并计算平均光密度值(mean density)。实验重复3次。

1.2.6 qRT-PCR检测 采用Trizol法提取总RNA,根据试剂盒说明书操作步骤合成cDNA,检测VEGF和CCR3 mRNA的表达。VEGF引物序列:上游引物5'-TGCCACTGAGGAGTCCAAC-3';下游引物5'-TGTTCCCGAAACGCTGAG-3';CCR3上游引物5'-GTGTTCACTGTGGCCTCTT-3';下游引物5'-GTGACGAGGAAGAGCAGGTC-3';内参GAPDH引物序列:上游引物5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3',下游引物5'-AGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。总反应体系为15 μL ,反应条件为95℃预变性10min,95℃15s,60℃60s共40个循环,60℃~95℃做溶解曲线,每20s升温1℃,每个样品均设3个复孔。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目标基因的相对表达量。实验重复3次。

统计学分析:采用SPSS 23.0统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组之间比较采用独立样本 t 检验。计数资料采用率表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 翼状胬肉与正常结膜的组织学差异 HE染色结果显示,正常结膜组织可见上皮层和基质层,基质层组织疏松,仅见散在少量毛细血管(图1A);翼状胬肉组织上皮层明显增厚,有多层细胞,基质层组织结构紧密,排列紊乱,其中可见大量毛细血管及纤维组织,且血管管径较小,管壁不完整,管腔形态不均匀,提示可能为功能不良的新生血管(图1B)。

2.2 VEGF和CCR3在翼状胬肉和正常结膜组织中的表达 免疫荧光染色结果显示,多数正常结膜组织中几乎检测不到VEGF和CCR3的表达,而翼状胬肉组织中两者表达均较高(图2)。试验组18眼中,VEGF阳性表达13眼(72%),CCR3阳性表达11眼(61%)。对照组14眼中,VEGF阳性表达4眼(28%),CCR3阳性表达2眼(14%)。两组患者VEGF和CCR3阳性表达率差异均有统计学意义($\chi^2=6.026, 7.158, P=0.031, 0.012$)。

免疫组织化学染色结果显示,翼状胬肉组织中VEGF和CCR3阳性光密度值均较对照组高(图3)。试验组VEGF和CCR3(0.69 ± 0.0875 和 0.45 ± 0.0248)表达水平显著高于对照组(0.05 ± 0.0024 和 0.03 ± 0.0074),差异均有统计学意义($t=12.822, 28.618$,均 $P<0.001$)。

qRT-PCR检测结果显示,试验组VEGF mRNA表达水平约为对照组的12倍(12.33 ± 2.84 vs 1.00 ± 0.08),

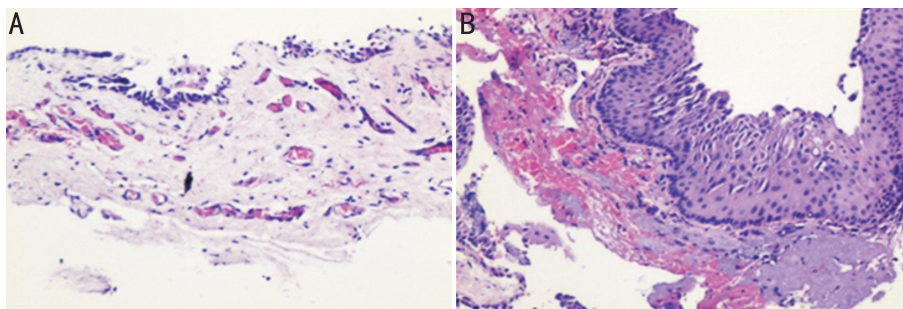


图1 HE染色观察翼状胬肉与正常结膜组织形态($\times 200$) A:正常结膜组织镜下可见单层上皮,基质层疏松,少量散在毛细血管;B:翼状胬肉组织镜下可见上皮增厚,多层细胞,基质层排列紊乱,有大量毛细血管及纤维组织。

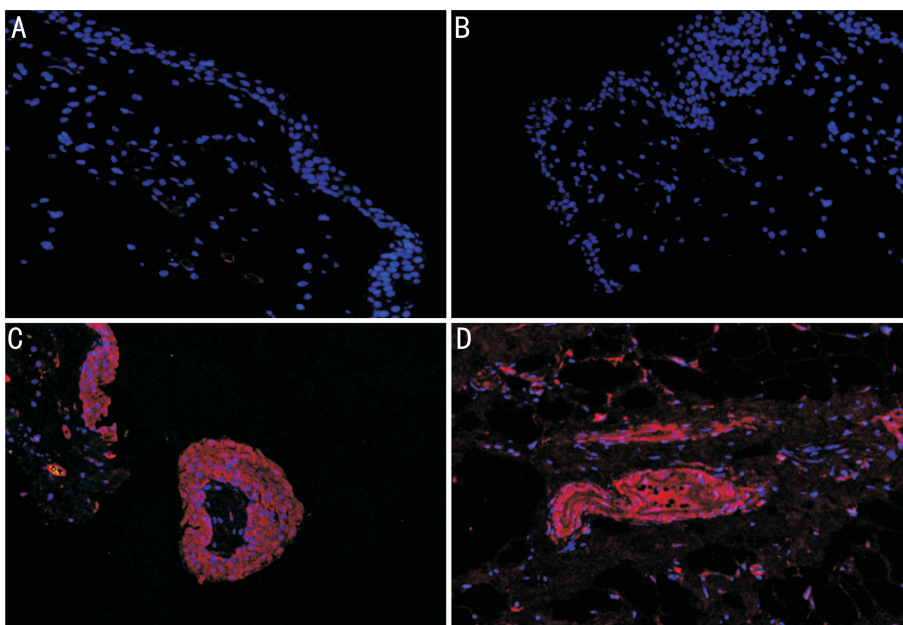


图2 免疫荧光染色检测 VEGF 和 CCR3 的表达($\times 200$) A:正常结膜组织 VEGF 表达;B:正常结膜组织 CCR3 表达;C:翼状胬肉组织 VEGF 表达;D:翼状胬肉组织 CCR3 表达。蓝色表示细胞核,红色表示 VEGF/CCR3 表达阳性。

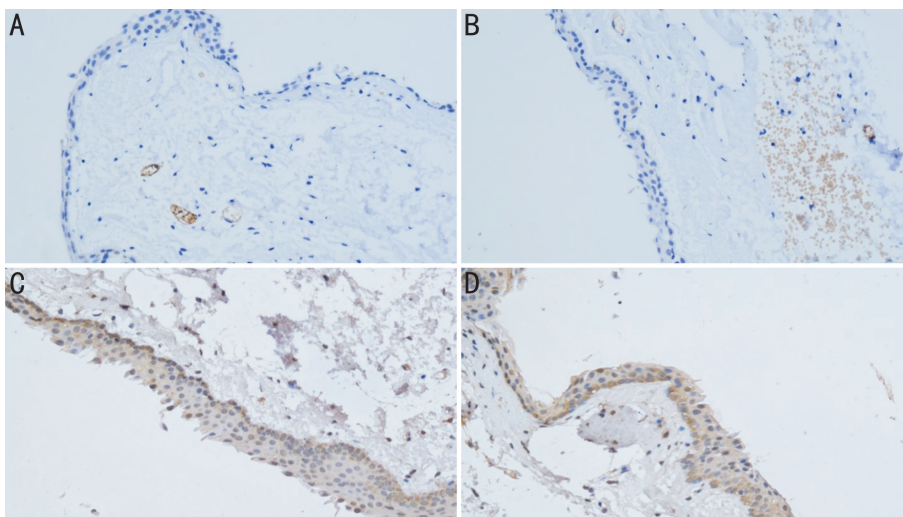


图3 免疫组织化学染色检测 VEGF 和 CCR3 的表达($\times 200$) A:正常结膜组织 VEGF 表达;B:正常结膜组织 CCR3 表达;C:翼状胬肉组织 VEGF 表达;D:翼状胬肉组织 CCR3 表达。

CCR3 mRNA 的表达水平约为对照组的 160 倍 (159.60 ± 34.15 vs 1.00 ± 0.09), 差异均有统计学意义 ($t = 14.86$ 、 17.31 , 均 $P < 0.01$)。

3 讨论

翼状胬肉是眼球表面的一种慢性、炎症性疾病,其具体的发病机制尚不完全明确。目前研究认为,翼状胬肉主要是在环境因素的作用下,由多种细胞因子共同参与的增

殖性疾病,即眼表在局部缺氧和长期慢性炎症刺激下,引起全身及局部趋化因子聚集,导致翼状胬肉的发生发展,而新生血管在其发生发展过程中发挥重要作用^[7-10]。本研究通过组织学分析发现,翼状胬肉组织中上皮增生及血管化程度较正常结膜组织显著。另有研究发现,翼状胬肉组织中上皮细胞及血管内皮细胞中 VEGF 表达远远高于正常球结膜组织,免疫应答反应也较高^[11],且在翼状胬肉

患者中,VEGF在特应性患者中的表达较非特应性患者高^[12]。翼状胬肉患者结膜下注射抗VEGF药物贝伐单抗1wk时症状明显好转^[13]。本研究亦发现,翼状胬肉和正常结膜组织中VEGF的表达水平有显著差异,表明VEGF在翼状胬肉的发生发展中起重要作用。推测可将抗VEGF药物作为治疗翼状胬肉的药理学方法或辅助手术用药。CCR3是趋化因子CC类受体,可使细胞发生迁移、活化效应,促进趋化因子反应。研究发现,CCR3可能在新生血管性年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)等脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)性疾病中发挥作用^[14-16]。赫雪飞^[17]研究发现,在碱烧伤诱导的小鼠角膜新生血管(CRNV)模型中早期运用CCR3拮抗剂能抑制CRNV形成,提示CCR3可能参与CRNV的形成。本研究结果表明,CCR3在翼状胬肉组织中的表达水平显著高于正常结膜组织,提示CCR3可能是参与翼状胬肉发生发展的一个重要因子,其具体作用机制可能与新生血管发生及促进炎症因子的表达有关,但仍需进一步研究证实。多项研究显示,CCR3在小鼠视网膜新生血管中呈高表达,且抗CCR3治疗可以抑制视网膜新生血管的形成^[18-19]。Nagai等发现CCR3与CNV的发生发展相关,并且在鼠和灵长类动物1眼行玻璃体腔内注射抗CCR3药物,另1眼的受累程度明显减轻,提示抗CCR3药物在抗新生血管方面有着重要价值^[20-21]。推测CCR3拮抗剂的应用可能成为翼状胬肉的另一药物治疗方案。

研究发现,CCR3和VEGF信号通路在引起CNV的过程中存在交叉影响,CCR3被配体激活后可引起血管内皮生长因子受体(VEGFR)磷酸化,从而促进脉络膜内皮细胞(CEC)迁移和Rac1活化,引起新生血管的产生^[22]。本研究发现翼状胬肉组织中VEGF和CCR3的表达均显著升高,提示二者在新生血管形成过程中可能发挥协同作用,即在环境及局部炎症因素刺激下,CCR3被配体激活后可能上调VEGF表达水平,引起一系列生物学效应,但具体机制尚待进一步研究证实。

综上所述,与正常结膜组织相比,翼状胬肉组织中VEGF和CCR3表达均增高,提示VEGF和CCR3可能共同参与翼状胬肉的发病过程,联合抗VEGF及抗CCR3治疗可作为翼状胬肉切除手术的辅助治疗方法。

参考文献

- 1 Chui J, Di Girolamo N, Wakefield D, et al. The pathogenesis of pterygium: current concepts and their therapeutic implications. *Ocul Surf* 2008;6(1):24-43
- 2 Detorakis ET, Zaravinos A, Spandidos DA. Growth factor expression in ophthalmic pterygia and normal conjunctiva. *Int J Mol Med* 2010;25(4):513-516
- 3 郝尚臣. 人翼状胬肉中细胞因子及其受体的改变. *眼科新进展* 2009;29(6):425-427
- 4 郑兰育. 复发性翼状胬肉中VEGF表达情况的临床研究. *中国医学创新* 2016;13(30):39-42

- 5 Bianchi E, Scarinci F, Grande C, et al. Immunohistochemical Profile and VEGF, TGF- β and PGE₂ in human pterygium and normal conjunctiva: experimental study and review of the literature. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012;25(3):607-615
- 6 Talghini S, Shenasi A. Concomitant examination of inflammation and angiogenesis in the pathogenesis of primary moderate pterygium in a well-designed case-control study. *Pak J Biol Sci* 2013;16(19):1046-1050
- 7 黄丽娜, 姚晓明. 翼状胬肉成纤维细胞中COX-2的表达及其抑制剂的实验研究. *国际眼科杂志* 2006;6(1):5-8
- 8 Cárdenas-Cantú E, Zavala J, Valenzuela J, et al. Molecular Basis of Pterygium Development. *Semin Ophthalmol* 2014;31(6):567-583
- 9 Poenaru Sava MG, Raica ML, Cimpean AM, et al. VEGF mRNA assessment in human pterygium: a new 'Scope' for a future hope. *Ophthalmic Res* 2014;52(3):130-135
- 10 Wang Y, Lin J, Chen L, et al. Expression of Peroxiredoxin 2 and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Pterygium. *Cornea* 2017;36(7):841-844
- 11 Zhang J, Zhang M, Li X, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor and CD105-microvascular density in primary pterygium. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2011;31(4):560-564
- 12 Gharaee H, Shayegan MR, Khakzad MR, et al. The expression of vascular endothelial growth factor in pterygium tissue of atopic patients. *Int Ophthalmol* 2014;34(6):1175-1181
- 13 Mak RK, Chan TC, Marcet MM, et al. Use of anti-vascular endothelial growth factor in the management of pterygium. *Acta Ophthalmol* 2017;95(1):20-27
- 14 吴宪巍, 刘哲丽. CCR3在湿性年龄相关性黄斑变性中的研究进展. *国际眼科杂志* 2014;14(3):457-459
- 15 Gumus K, Karakucuk S, Mirza GE, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor receptor 2 in pterygia may have a predictive value for a higher postoperative recurrence rate. *Br J Ophthalmol* 2014;98(6):796-800
- 16 Hirahara S, Nozaki M, Ohbayashi M, et al. Suppression of Retinal Neovascularization by Anti-CCR3 Treatment in an Oxygen-Induced Retinopathy Model in Mice. *Ophthalmic Res* 2017;58(1):56-66
- 17 赫雪飞. CCR3拮抗剂在实验性角膜新生血管发生过程中的作用和机制. 苏州大学 2013
- 18 Zhou WJ, Liu GQ, Li LB, et al. Inhibitory effect of CCR3 signal on alkali-induced corneal neovascularization. *Int J Ophthalmol* 2012;5(3):251-257
- 19 Krizova D, Vokrojova M, Liehneova K, et al. Treatment of Corneal Neovascularization Using Anti-VEGF Bevacizumab. *J Ophthalmol* 2014;2014:178132
- 20 Nagai N, Ju M, Izuminagai K, et al. Novel CCR3 Antagonists Are Effective Mono- and Combination Inhibitors of Choroidal Neovascular Growth and Vascular Permeability. *Am J Pathol* 2015;185(9):2534-2549
- 21 Lee JK, Song YS, Ha HS, et al. Endothelial progenitor cells in pterygium pathogenesis. *Eye(Lond)* 2007;21(9):1186-1193
- 22 Wang H, Wittchen ES, Jiang Y, et al. Upregulation of CCR3 by age-related stresses promotes choroidal endothelial cell migration via VEGF-dependent and -independent signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(11):8271-8277