

# 大鼠角膜碱烧伤后角膜淋巴管生成及 VEGF-C 和 VEGFR-3 的表达

郑彩慧<sup>1</sup>, 朱学军<sup>2</sup>, 张 声<sup>3</sup>, 周琳璞<sup>4</sup>, 徐国兴<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(363000)中国福建省漳州市,福建医科大学附属漳州市医院漳州眼科中心;<sup>2</sup>(350007)中国福建省福州市,福建医科大学附属第一医院<sup>2</sup>眼科;<sup>3</sup>病理科;<sup>4</sup>(350004)中国福建省福州市,福建医科大学电镜教研室

作者简介:郑彩慧,女,硕士,住院医师,研究方向:眼科临床。

通讯作者:朱学军,女,主任医师,研究方向:角膜病. ZXJ\_zulia@sina.com

收稿日期:2010-09-06 修回日期:2010-10-25

## Expression of VEGF-C, VEGFR-3 and lymphangion genesis in rat cornea after alkali burn

Cai-Hui Zheng<sup>1</sup>, Xue-Jun Zhu<sup>2</sup>, Sheng Zhang<sup>3</sup>, Lin-Ying Zhou<sup>4</sup>, Guo-Xing Xu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zhangzhou Eye Center, Zhangzhou Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China;<sup>2</sup>Department of Ophthalmology;<sup>3</sup>Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350007, Fujian Province, China;<sup>4</sup>Department of Electron Microscope, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian Province, China

**Correspondence to:** Xue-Jun Zhu, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350007, Fujian Province, China. ZXJ\_zulia@sina.com

Received:2010-09-06 Accepted:2010-10-25

## Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of VEGF-C, VEGFR-3 and lymphangion genesis in rat cornea after alkali burn.

• **METHODS:** The rat alkali burnt corneal model were made. The expression of VEGF-C, VEGFR-3 and lymphangion genesis labeled with LYVE-1 in rat cornea were detected by immunohistochemical assay at day 0 and day 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28 after burn. In addition, the ultrastructure of lymphangion genesis in rat cornea was observed by electron microscope.

• **RESULTS:** The expression of VEGF-C and VEGFR-3 in rat cornea were increased after alkali burn. LYVE-1 were detected in rat cornea 3 days after alkali burn.

• **CONCLUSION:** There are some new lymphangion genesis in rat cornea after alkali burn. And meanwhile, the expression of VEGF-C and VEGFR-3 in rat cornea was significantly increased.

• **KEYWORDS:** lymphatic vessels; LYVE-1; VEGFR-3;

VEGF-C; cornea; alkali burn; rat

Zheng CH, Zhu XJ, Zhang S, *et al.* Expression of VEGF-C, VEGFR-3 and lymphangion genesis in rat cornea after alkali burn.

*Int J Ophthalmol(Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(12):2246-2249

## 摘要

**目的:**研究大鼠角膜碱烧伤后角膜淋巴管生成及 VEGF-C 和 VEGFR-3 的表达。

**方法:**制作角膜碱烧伤模型,应用免疫组化方法检测正常角膜及烧伤后 1,3,5,7,14,21,28d 角膜组织中 VEGF-C 和 VEGFR-3 的表达,免疫组化 LYVE-1(淋巴管内皮特异标记物)染色观察角膜中淋巴管生成情况,电镜观察烧伤后 14d 角膜新生淋巴管状况。

**结果:**角膜碱烧伤后,VEGF-C 和 VEGFR-3 的表达明显升高,烧伤后 3d,角膜中出现淋巴管。

**结论:**角膜碱烧伤后新生淋巴管生成伴 VEGF-C 和 VEGFR-3 高表达。

**关键词:**淋巴管;淋巴管内皮细胞透明质酸受体-1;血管内皮生长因子受体 3;血管内皮生长因子 C;角膜;碱烧伤;大鼠

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.12.005

郑彩慧,朱学军,张声,等.大鼠角膜碱烧伤后角膜淋巴管生成及 VEGF-C 和 VEGFR-3 的表达.国际眼科杂志 2010;10(12):2246-2249

## 0 引言

角膜碱烧伤后淋巴管生成的研究逐渐受到重视,免疫机制可能参与了角膜碱烧伤的病理过程,但迄今研究较少。VEGFR-3 和 VEGF-C 是淋巴管生成的重要因子,两者与角膜淋巴管生成的相关性研究国内未见报道。LYVE-1 是近年出现的一种新的淋巴管特异标记物<sup>[1]</sup>,我们建立角膜碱烧伤模型,利用 LYVE-1 检测角膜新生淋巴管,CD34(血管内皮特异标记物)检测角膜新生血管,并将角膜新生淋巴管与 VEGFR-3 和 VEGF-C 的表达做一相关性研究,进一步明确两者在角膜淋巴管生成中的作用,探讨角膜淋巴管生成机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康无眼病雄性 SD 大鼠 80 只,体质量 180~230g。64 只随机分为正常角膜组(0d)、碱烧伤后 1,3,5,7,14,21,28d 组,每组 8 只,右眼为碱烧伤实验眼。另 16 只随机分为正常角膜组和碱烧伤后 14d 组,每组 8 只,取角膜用于电镜观察。制备角膜 III 级烧伤程度<sup>[2]</sup>,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。山羊抗大鼠 LYVE-1 多克隆抗体、山羊抗大鼠 VEGF-C 多克隆抗体、兔抗大鼠 VEGFR-3 多克隆抗体、山羊抗大鼠 CD34 多克隆抗体,均购自 Santa cruz 公司,辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素染色试剂盒 (SP Kit,北京中杉生物技术有限公司),DAB 酶底物显色试剂盒 (迈新)。

**1.2 方法** 术后 7d 内,隔天用裂隙灯观察各组大鼠眼前段情况,行角膜荧光染色,以后每周观察一次,观察角膜血管化情况。分别于模型制作当天(0d)和模型制作后 1,3,5,7,14,21,28d,将大鼠处死后立即取出右眼球,沿透明角膜缘内 1mm 处剪下角膜置于 40g/L 中性缓冲甲醛溶液中,24h 后常规病理切片制备,行 HE 染色与免疫组织化学染色。VEGFR-3,VEGF-C,LYVE-1 和 CD34 的表达:采用常规二步法检测。光镜下观察细胞胞质内不同程度、基本均匀的棕黄色或棕褐色颗粒状反应者为染色阳性细胞。另取烧伤后 3d 的标本,石蜡连续切片。自 1~3 张分别按序行 VEGFR-3,LYVE-1 和 CD34 因子免疫组化染色,进行对比观察。每只角膜取 5 张切片,每张切片于高倍视野( $\times 400$ )下各随机采集 10 幅图像,经 Olympus 视频采集系统读取图像并存盘,应用 ImagePlus6.0 图像分析软件对图像中阳性反应细胞进行吸光度(absorbance)值分析,记录相应数据,取其平均值作为该标本结果,对结果进行统计学检验。将 LYVE-1 染色棕黄色的内皮细胞簇或内皮细胞形成的条状、隙状结构及有管腔者作为一个淋巴管计数<sup>[3]</sup>。每只角膜选 5 张 LYVE-1 免疫组化染色切片,每张切片于高倍视野( $\times 400$ )下各随机采集 10 幅图像,经 Olympus 视频采集系统读取图像并存盘,应用 ImagePlus 6.0 图象分析软件计算每个视野下的淋巴管数目,取平均值做为该观察点的微淋巴管数量。另取烧伤后 14d 组及正常角膜组大鼠各 8 只做角膜电镜观察。常规电镜标本制作,EM 208 透射电镜下观察并摄片。

统计学分析:采用 SPSS 15.0 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 检验,多组间数据的比较采用单因素方差(One-way ANOVA)分析,相关性分析采用 Speaman 相关性检验, $P < 0.05$  为有统计学意义的检验标准。

## 2 结果

**2.1 角膜 LYVE-1, CD34, VEGFR-3 及 VEGF-C 的表达** LYVE-1 和 CD34 分别染色于角膜基质层中不同的新生脉管管壁上,呈棕黄色或棕褐色颗粒状。连续切片对比分析显示,VEGFR-3 所表达的管壁主要为 LYVE-1 染色阳性的管壁(图 1)。正常大鼠角膜中仅角膜上皮层基底细胞胞质 VEGF-C 有弱阳性表达。角膜碱烧伤后,其表达逐渐增强,于 5d 达高峰,主要表达于角膜上皮层,基质层中浸润的炎细胞、部分基质细胞及新生脉管管壁上,烧伤后 14,21d 表达逐渐降低,至 28d 末表达弱,与正常对照组相比,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表 1,图 1)。VEGFR-3 的测定:正常大鼠角膜中仅角膜上皮层基底细胞胞质有微弱阳性表达。角膜碱烧伤后 1d,表达无明显增加,3d 起明显增加,5d 表达达高峰,以后逐渐下降,至 28d 末表达弱,但与正常对照组相比,平均吸光度值仍高于正常对照组( $P < 0.05$ ,表 1,图 1)。

表 1 大鼠角膜碱烧伤后角膜中 VEGF-C, VEGFR-3 的表达与淋巴管计数 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	VEGF-C(A)	VEGFR-3 (A)	LVC
0d	0.119 ± 0.017	0.104 ± 0.017	0
1d	0.173 ± 0.019	0.111 ± 0.010	0
3d	0.239 ± 0.019	0.238 ± 0.011	2.1 ± 0.4
5d	0.423 ± 0.018	0.427 ± 0.014	3.8 ± 0.7
7d	0.293 ± 0.017	0.305 ± 0.008	4.9 ± 0.6
14d	0.189 ± 0.018	0.225 ± 0.009	8.0 ± 0.8
21d	0.141 ± 0.011	0.174 ± 0.007	6.0 ± 0.3
28d	0.122 ± 0.003	0.118 ± 0.005	2.3 ± 0.5

**2.2 角膜中微淋巴管计数情况** 根据淋巴管特异标记物 LYVE-1 的免疫组化染色情况,正常大鼠角膜及烧伤后 1d 角膜基质层中均未检测到淋巴管;烧伤后 3d,角膜基质层中出现新生淋巴管,至烧伤后 14d,角膜中微淋巴管计数(LVC)达高峰(8.0 + 0.8),此后渐减少,至 28d 末 LVC 为 2.3 + 0.5。VEGF-C 与 LVC 相关性检验: $r_s = 0.435, P < 0.01$ ; VEGFR-3 与 LVC 相关性检验: $r_s = 0.589, P < 0.01$ ,两者的表达与角膜中 LVC 呈正相关关系(表 1)。

**2.3 透射电镜观察结果** 正常角膜基质中,胶原纤维排列整齐,无新生血管与新生淋巴管。角膜碱烧伤后 14d,透射电镜观察角膜,见角膜基质层中出现新生血管,同时出现新生淋巴管。血管内皮细胞(blood endothelial cell, BEC)胞质较丰富,细胞器多,核染色质均匀,细胞外有完整的基底膜,外周可见周细胞,管腔内常可见红细胞(图 2)。而淋巴管内皮细胞(lymphatic endothelial cell, LEC)无窗孔,外周无周细胞,基底膜不完整,不连续或缺如,细胞核较大,呈圆形或椭圆形,突向腔内,核周电子密度较高,中央区电子密度较低。在 LEC 的管腔面有伸向管腔中的胞质突起,非管腔面也有许多突起,呈指状或树根状伸向周围组织之中,这些突起常常与微细的纤维相接触,这些纤维细丝称为锚丝。透射电镜还观察到相邻 LEC 的一端压在另一端 LEC 上,呈叠瓦状,重叠部分的长度差异较大,可在 66.7 ~ 4600nm 之间;有的两连接的 LEC 之间有较大的空间,大于 30nm,呈开放连接。淋巴管的开放连接使得周围组织中的大分子物质、细胞及组织、细胞坏死的碎片可进入淋巴管腔内(图 2)。

## 3 讨论

角膜碱烧伤是一种复杂的眼外伤,常致角膜血管化,角膜免疫赦免状态被破坏,降低了角膜移植成功率。以往的研究多侧重于角膜新生血管,近年,随着淋巴管内皮特异标记物的发现,对角膜淋巴管的研究日渐重视。LYVE-1 即淋巴管内皮细胞透明质酸受体-1,主要表达在淋巴管内皮细胞的表面,在血管内皮细胞无表达<sup>[1]</sup>。有研究表明,在胚胎发育中 LYVE-1 和 Prox-1 等淋巴管内皮特异标记物均阴性的管腔上,血管内皮标记物 CD34 高度表达,最终发育成具有血管表型特征的脉管;而 LYVE-1 和 Prox-1 表达阳性的脉管上,CD34 表达非常低,这些脉管最终发育成淋巴管表型特征的管道<sup>[4]</sup>。我们利用此标记物检测到在烧伤后 3d,角膜基质层中出现 LYVE-1 染色阳性的管道,与 CD34 连续切片免疫组化对比分析,LYVE-1 染色阴

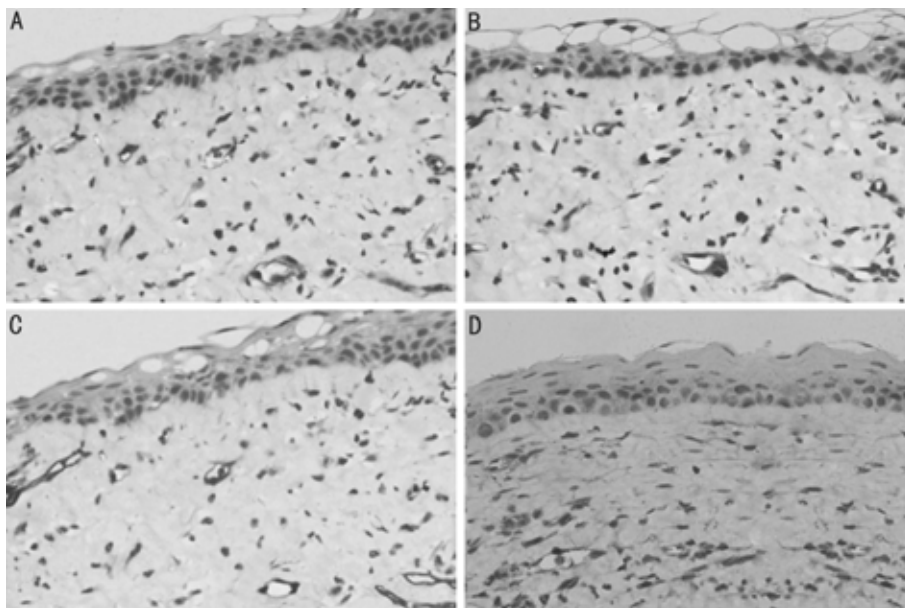


图1 角膜碱烧伤后3d VEGFR-3,LYVE-1,CD34 和 VEGF-C 的表达 (SP ×400) A: VEGFR-3;B: LYVE-1;C: CD34;D: VEGF-C。

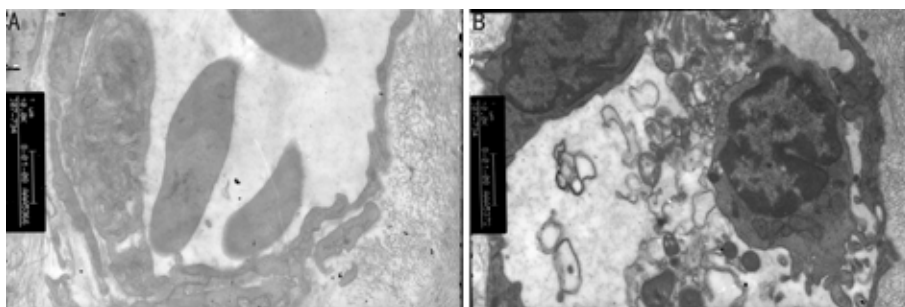


图2 大鼠角膜新生血管和淋巴管 (TEM ×10000) A: 新生血管; B: 新生淋巴管。

性的脉管高表达 CD34,而 LYVE-1 染色阳性的脉管 CD34 表达很低,这与 Wigle 等<sup>[4]</sup>的研究结果一致,表明此时,角膜基质层中除了出现新生血管外,还出现了新生淋巴管。并且我们在研究中,在透明角膜缘内 1mm 处取材,避开了角膜缘的脉管成分,更好的观察所取的标本是否存在新生的血管及淋巴管。在角膜碱烧伤后 14d,透射电镜观察到角膜基质层中出现了不同于血管的具有淋巴管结构特征的管道,进一步证实了,在角膜碱烧伤后角膜血管化的同时出现了角膜新生淋巴管。VEGF-C/VEGFR-3 信号是调控淋巴管新生的重要信号途径之一。VEGF-C 是 VEGF 家族成员之一,是一个特异性的淋巴管生长因子,它可以选择性地促进淋巴管增生,增强淋巴管的通透性,近年来已越来越被人们所重视。VEGFR-3 即 Flt4,是 VEGF-C 的配体之一,是高度糖基化的细胞表面 III 类酪氨酸激酶受体,VEGFR-3 信号途径在胚胎淋巴系统发育和成人淋巴管再生方面具有重要作用。利用转基因技术使小鼠皮肤成纤维细胞表达可溶性 VEGFR-3 免疫球蛋白融合蛋白以竞争性结合 VEGF-C 会导致小鼠的淋巴管发育障碍而血管发育不受影响。同时已经存在的淋巴管会出现退缩,可能是淋巴管内皮细胞发生凋亡所致,因此 VEGFR-3 也能够维持淋巴管系统的稳定。我们中我们发现,大鼠角膜碱烧伤后,VEGF-C 在角膜中出现一个动态表达过程,同时伴随有角膜淋巴管的新生。VEGF-C 的表达与 LVC 的相关性分析表明,二者之间存在正相关性。VEGFR-3 作为 VEGF-C 的

配体,在碱烧伤后的角膜中亦出现一个动态表达过程。VEGFR-3 在正常大鼠角膜中仅角膜上皮层基底细胞胞质有微弱阳性表达,基质层中无表达。角膜碱烧伤后 3d 起即明显增加,5d 表达达到高峰。连续切片对比分析显示 VEGFR-3 所表达的管壁主要为 LYVE-1 染色阳性的管壁,部分新生血管壁上亦有 VEGFR-3 的表达,这种 VEGFR-3 在血管表达的情况,Enholm 等通过实验证明是 VEGF-C 作用的结果,认为这种表达可能表明在成体,淋巴管生成的途径不仅由淋巴管发芽,也可以是由血管发芽。另一方面,多个实验发现 VEGFR-3 表达的增高与 VEGF-C 有关。作为淋巴管内皮细胞的调节因子,VEGF-C 的表达增高,例如肿瘤、炎症等病理状态下的增高,导致了 VEGFR-3 的表达增高,引起内皮细胞的增殖等效应。我们也发现,角膜碱烧伤后,角膜出现炎症反应,基质层中浸润的炎性细胞表达 VEGF-C,角膜基质层中 VEGFR-3 表达的增高在 VEGF-C 表达增高之后。同时,我们的研究也发现淋巴管计数高峰在 VEGFR-3 表达高峰之后,VEGFR-3 的表达与 LVC 的相关性分析表明,二者之间存在显著正相关性( $r_s = 0.589, P < 0.01$ )。

我们的结果显示,VEGF-C 与 VEGFR-3 在碱烧伤后角膜上的高表达,有可能是角膜碱烧伤后角膜淋巴管生成的重要原因之一。Kubo 等<sup>[5]</sup>将 VEGF-C 缓释体置于角膜基质层,结果发现 VEGF-C 诱发了角膜新生淋巴管,说明角膜局部 VEGF-C 的增高可以诱发角膜淋巴管生成。我们

利用淋巴管内皮特异标记物的免疫组化检测及透射电镜观察,证实角膜碱烧伤后角膜血管化的同时出现角膜新生淋巴管,角膜淋巴管的发现有助于解释角膜碱烧伤后免疫赦免状态被破坏的原因。正常角膜仅在角膜缘处有血管及淋巴管,其余部位无血管,也无淋巴管。角膜中血管的缺如在一定程度上阻止了免疫细胞对角膜抗原的识别,限制了血源性免疫效应细胞和分子进入角膜组织;角膜淋巴管的缺如使抗原物质进入房水而非区域淋巴结,从而引起免疫耐受。角膜碱烧伤后,角膜新生血管提供了效应细胞进入角膜发生免疫攻击的通路,是角膜免疫的传出弧;而淋巴管加速携带抗原的 APC 细胞运输至引流区淋巴结,在淋巴结处诱发免疫应答,是移植排斥反应发生的传入弧。相对于传出弧而言,角膜局部淋巴引流-传入弧起着同样或更为重要的作用<sup>[6]</sup>。有研究发现,碱烧伤后,T 淋巴细胞、活化的巨噬细胞等抗原提呈细胞数量显著增加,并随烧伤的病理过程呈动态表现<sup>[7]</sup>。我们观察到,角膜中淋巴管内皮细胞之间缺乏紧密连接,更多的表现为重叠连接与开放连接。重叠连接在周围组织炎症水肿时,通过锚丝的调节作用,重叠连接出现开放,与开放连接相似,使得微环境中的大分子物质及细胞进入淋巴管,随淋巴液的引流到达局部淋巴结。电镜中同时发现了具有淋巴管结构特征的管道内出现单核细胞,说明角膜淋巴管确有携带抗原和 APCs(抗原提呈细胞)从角膜到达局部淋巴结的功能。然而,正如角膜新生血管受多种因子调节一样,角膜淋巴管的生成有可能也受多因子的调节,存在一个促生成与抑制的平衡,这种平衡的存在或破坏影响着角膜淋巴管的生成或消退。我们发现,在角膜碱烧伤后 28d,角膜中 VEGF-C 与 VEGFR-3 的表达都很弱时,角膜基质层中仍可

观察到淋巴管(尽管淋巴管的计数已减少),此时,角膜烧伤后的炎症已基本控制,上皮有所修复,角膜新生血管亦有所减少,是否在其后角膜新生淋巴管将进一步消退,或维持一段时间?是否存在其它的调节因子影响角膜淋巴管的生成?值得进一步观察研究。同时,角膜淋巴管在角膜移植免疫排斥方面的确切作用也有待于进一步的探索与研究。

#### 参考文献

- 1 Akishima Y, Ito K, Zhang L, *et al.* Immunohistochemical detection of human small lymphatic vessels under normal and pathological conditions using the LYVE-1 antibody. *Virchows Arch* 2004;444(2):153-157
- 2 邱培瑾. 大鼠角膜碱烧伤后碱性成纤维细胞生长因子在角膜中的表达及意义. *眼科研究* 2002;20(2):101-104
- 3 Fujimoto A, Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, *et al.* Significance of lymphatic invasion on regional lymph node metastasis in early gastric cancer using LYVE-1 immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol* 2007;127(1):82-88
- 4 Wigle JT, Harvey N, Detmar M, *et al.* An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J* 2002;21(7):1505-1513
- 5 Kubo H, Cao R, Brakenhielm E, *et al.* Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(13):8868-8873
- 6 Cursiefen C, Chen L, Dana MR, *et al.* Corneal lymphangiogenesis: evidence, mechanisms, and implications for corneal transplant immunology. *Cornea* 2003;22(3):273-281
- 7 刘春民,徐锦堂,赵松滨. 角膜碱烧伤后集体巨噬细胞和淋巴细胞功能变化. *国际眼科杂志* 2002;2(4):31-33