

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

戴鹏飞, 王峰, 郑玉萍, 权彦龙, 张菁菁

基金项目: 中国国家自然科学基金资助项目 (No. 30772598)
作者单位: (710004) 中国陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院眼科
作者简介: 戴鹏飞, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 角膜病。
通讯作者: 王峰, 男, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 角膜病. wangfengoculist@126.com
收稿日期: 2011-12-16 修回日期: 2012-01-04

Relationship between corneal neovascularization and the expression of ILK and VEGF in cornea of rats after alkaline burn

Peng-Fei Dai, Feng Wang, Yu-Ping Zheng, Yan-Long Quan, Jing-Jing Zhang

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30772598)
Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Feng Wang, Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. wangfengoculist@126.com
Received: 2011-12-16 Accepted: 2012-01-04

Abstract

• **AIM:** To investigate the relationship between corneal neovascularization (CNV) and the expression of integrin-linked kinase (ILK) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in cornea of rats after alkaline burn.
• **METHODS:** CNV model was established by alkaline cauterization of the central cornea of Sprague-Dawley (SD) rats. At the different time points, morphologic changes in CNV were observed with slit-lamp microscope, and the expression of ILK and VEGF in cornea was detected by immunohistochemical method and computer image analysis.
• **RESULTS:** ILK and VEGF were lowly expressed in epithelium of cornea in the control group, and strongly expressed in epithelium, endothelium and the endothelium cells of CNV in the experiment group ($P < 0.01$). The expression of ILK and VEGF in cornea after alkaline burn, increased within the 3rd-5th day, reached the peak within the 7th-10th day, and decreased after the 14th day. The CNV in cornea after alkaline burn was found on the 3rd day, increased on the 5th day, reached the peak of area within the 7th-10th day, and decreased after the 14th day. The expression of ILK and VEGF showed positive correlation at different time points ($r = 0.926, P < 0.01$).

And they were positively related to CNV (ILK and area of CNV, $r = 0.900, P < 0.01$; VEGF and area of CNV, $r = 0.878, P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** ILK and VEGF were expressed significantly in cornea of rats after alkaline burn. And they involved in the regulation of CNV.

• **KEYWORDS:** integrin-linked kinase; vascular endothelial growth factor; corneal neovascularization; alkaline burn; immunohistochemistry

Dai PF, Wang F, Zheng YP, et al. Relationship between corneal neovascularization and the expression of ILK and VEGF in cornea of rats after alkaline burn. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012; 12(2): 208-211

摘要

目的: 研究大鼠角膜碱烧伤后整合素连接激酶 (ILK)、血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达及其与角膜新生血管 (CNV) 的相关性。

方法: 通过碱烧伤 Sprague-Dawley (SD) 大鼠角膜制备角膜新生血管动物模型, 采用形态学方法观察碱烧伤后新生血管的生成, 免疫组织化学方法检测 ILK 及 VEGF 在碱烧伤后不同时间点的表达情况。

结果: ILK 及 VEGF 在正常大鼠角膜上皮中仅有微弱表达, 而在碱烧伤后各时间点的角膜上皮以及血管内皮中均有明显表达 ($P < 0.01$)。碱烧伤后 3 ~ 5d, 可见二者阳性表达, 且迅速增加; 7 ~ 10d, 二者表达达到高峰; 14d 以后二者表达逐渐减弱, 与形态学观察 CNV 生长过程一致。即碱烧伤后 3 ~ 5d 新生血管生长迅速, 7 ~ 10d 生长达到高峰, 14d 以后血管开始逐渐减少退化。ILK 及 VEGF 表达的变化均与 CNV 的变化呈正相关 (ILK 与 CNV 面积相关系数 $r = 0.900, P < 0.01$; VEGF 与 CNV 面积相关系数 $r = 0.878, P < 0.01$), 且二者之间也存在正相关性 ($r = 0.926, P < 0.01$)。

结论: 大鼠角膜碱烧伤后 ILK 及 VEGF 均有明显表达, 二者作为重要的调控子共同参与了 CNV 的形成过程。

关键词: 整合素连接激酶; 血管内皮生长因子; 角膜新生血管; 碱烧伤; 免疫组织化学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.02.05

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

0 引言

角膜是最重要的屈光介质, 正常角膜组织处于无血管状态, 以保持角膜的透明性。在如感染、外伤、免疫反应和其它病理情况下, 角膜缘血管网形成的毛细血管逐渐进入

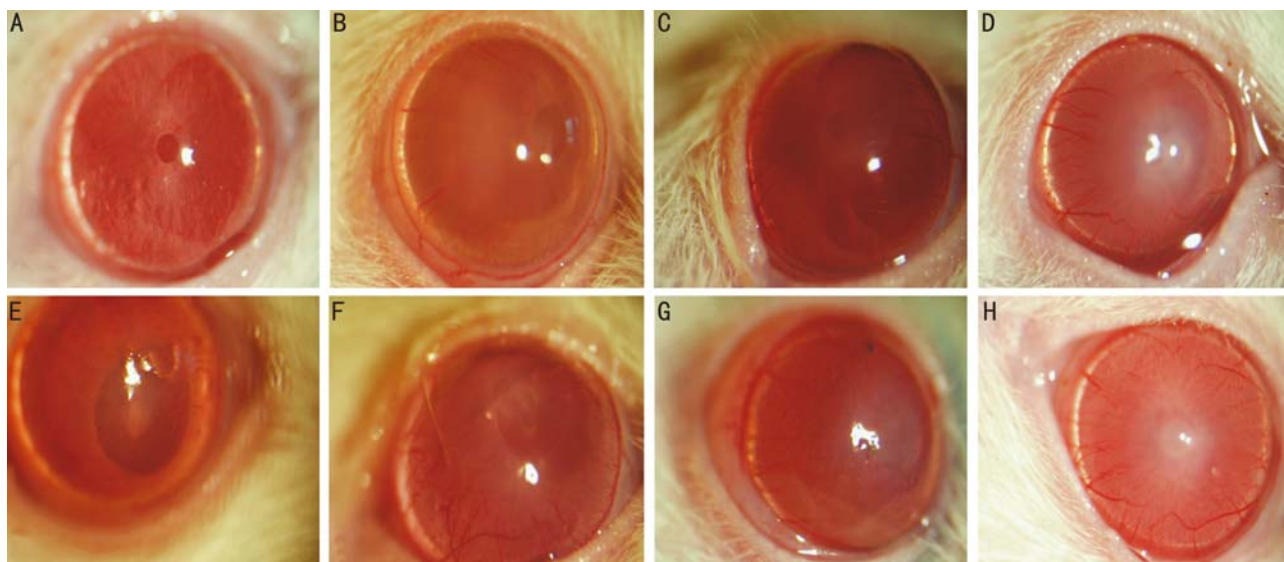


图1 各组大鼠角膜眼前段照相结果(×25) A:对照组;B:碱烧伤后3d;C:碱烧伤后5d;D:碱烧伤后7d;E:碱烧伤后10d;F:碱烧伤后14d;G:碱烧伤后21d;H:碱烧伤后28d。

角膜内而形成角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV)。尽管 CNV 对角膜创伤的修复有一定的积极作用^[1],但它同时破坏了角膜正常微环境,使眼前节相关免疫赦免偏离消失,增加了免疫反应性角膜病变的复发频率,并且严重影响角膜移植手术的成功率^[2],可使视力进一步下降甚至失明。CNV 的病因及发病机制目前尚未阐明,其中牵涉的分子机制和信号调控十分复杂。近来有研究表明,整合素连接激酶 (integrin-linked kinase, ILK) 作为 PI3K 信号通路的关键环节参与了血管新生的多个重要步骤,调控包括血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在内的多种细胞因子,具有显著的促进血管发育、血管形态发生和新生血管形成的作用^[3,4],但其与 CNV 是否有关尚未见报道。我们通过碱烧伤 Sprague-Dawley (SD) 大鼠角膜制备 CNV 动物模型,采用形态学方法观察伤后新生血管的生成,免疫组织化学方法检测 ILK 及 VEGF 在碱烧伤后不同时间点的表达情况,研究 ILK 和 VEGF 二者之间及其与 CNV 的相关性,以探讨 ILK 在角膜新生血管性疾病中可能的作用,期望可以为角膜新生血管性疾病提供新的研究思路和治疗策略。

1 材料和方法

1.1 材料 取 48 只标准化清洁级健康成年 SD 大鼠 (西安交通大学医学院动物中心提供),雌雄不限,体质量 190 ~ 210g,裂隙灯显微镜检查无眼病,分为空白对照组和实验组,空白对照组 6 只,根据碱烧伤后 3,5,7,10,14,21,28d 将实验组随机分成 7 组,每组 6 只,右眼为实验眼。实验过程中,动物处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准^[5]。兔抗大鼠 ILK、VEGF 多克隆抗体,SP 试剂盒及浓缩型 DAB 试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司。Whatman 3# 滤纸购自 Sigma 公司。

1.2 方法 水合氯醛 100g/L 以 3mL/kg 通过 ip 进行 SD 大鼠全身麻醉,盐酸丙美卡因滴眼液眼表面麻醉。将直径 3mm 的圆形滤纸片浸泡于浓度 1mol/L 的氢氧化钠溶液中 20s 后,置于干燥滤纸上 1s 蘸去多余的碱液,均匀贴在右眼角膜中央表面,保持 40s 后,迅速用生理盐水连续冲洗 1min,对照组用生理盐水代替氢氧化钠处理,余同实验组,常规喂养^[6],术后给予氯霉素眼药水点右眼,3 次/d。

1.2.1 形态学观察 用裂隙灯分别观察碱烧伤后 3,5,7,10,14,21,28d 时相应实验组及 10d 时空白对照组大鼠 CNV 生长情况,同时行眼前段照相。记录 CNV 长度 (以连续且弯曲度小、并与角膜缘切线垂直的新生血管长度为准) 并计算面积。CNV 面积计算公式: $A = C/12 \times 3.1416 [r^2 - (r-l)^2]$ ^[7],其中 C 为 CNV 累及角膜的圆周钟点数, l 为角膜缘伸入角膜的长度, r 为角膜半径 3mm。

1.2.2 标本制备 分别于大鼠碱烧伤后 3,5,7,10,14,21,28d 时过量麻醉处死相应实验组大鼠,于 10d 时处死空白对照组大鼠,迅速取右眼完整角膜后用 150mL/L 中性甲醛溶液固定 24h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,4 μ m 连续切片,行免疫组织化学染色。

1.2.3 免疫组织化学检测大鼠角膜碱烧伤后 ILK 和 VEGF 的表达 石蜡切片常规脱蜡至水,30mL/L 过氧化氢室温孵育,抗原修复,正常山羊血清封闭,分别滴加 1:100 稀释的一抗 (兔抗大鼠 ILK、VEGF 多克隆抗体),4 $^{\circ}$ C 过夜,滴加生物素标记的二抗工作液,滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液,DAB 显色,苏木素复染、透明、脱水、封片,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,其它条件均相同。每组各取 6 张分别检测 ILK 及 VEGF 的切片,显微镜下低倍视野寻找染色清晰、背景良好的区域,在 $\times 400$ 倍视野下随机选择 3 个视野照相 (Olympus BX61, Japan)。采用 Image ProPlus6 图像分析软件 (Media Cybernetics, USA) 分析每张照片中角膜组织区域的积分光密度 (IOD) 及面积 (area),记录后计算平均光密度值 (IOD/area)。

统计学分析:所有数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计处理,对所测定结果进行正态性及方差齐性检验。组间比较用单因素方差分析;两变量相关关系使用直线相关分析,以 Pearson 相关系数 r 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CNV 形态学特征 对照组可见角膜透明,角膜缘血管网呈环状围绕角膜一周,未伸入透明角膜 (图 1A)。碱烧伤后 3d 时,可见眼部睫状充血,角膜水肿,碱烧伤斑明显,角膜缘处有新生血管芽呈刷状长入透明角膜,角膜缘血管扩张充血明显 (图 1B);5d 时,可见新生血管进

表1 各组大鼠 CNV 面积和 ILK 及 VEGF 平均光密度值

分组	CNV 面积 (mm ²)	平均光密度值	
		ILK	VEGF
对照组 ^b	0	0.0122 ± 0.0013	0.0111 ± 0.0019
碱烧伤后			
3d	15.35 ± 0.89	0.0413 ± 0.0046	0.036 ± 0.0029
5d	20.22 ± 0.86	0.0731 ± 0.0041	0.061 ± 0.0032
7d	36.38 ± 1.02	0.0919 ± 0.0043	0.082 ± 0.0069
10d	36.95 ± 0.99	0.0881 ± 0.0058	0.071 ± 0.0042
14d	29.63 ± 0.91	0.0749 ± 0.0033	0.058 ± 0.0025
21d	21.23 ± 1.12	0.0586 ± 0.0023	0.041 ± 0.0021
28d	16.85 ± 0.98	0.0378 ± 0.0032	0.032 ± 0.0028

^bP < 0.01 vs 各实验组。

一步生成、进展,角巩膜缘处新生血管变长,顶端已出现分叉(图1C);7d时,新生血管生长旺盛,均匀致密,已部分侵入碱烧伤斑,其顶端分叉更加明显(图1D);10d时,新生血管致密呈网状,粗大,多数生长至角膜中央区(图1E);14d时,新生血管仍较多较粗,但趋于消退(图1F);21和28d时,新生血管变得稀疏,分支亦减少,管腔萎缩(图1G,H)。CNV 的面积结果见表1。

2.2 大鼠角膜碱烧伤后 ILK 和 VEGF 的表达 ILK 及 VEGF 主要表达在 SD 大鼠角膜上皮细胞、角膜内皮细胞及新生血管内皮细胞的胞膜和胞浆中,棕黄色或棕褐色颗粒为阳性信号。空白对照组大鼠角膜上皮有 ILK 及 VEGF 微弱阳性表达;碱烧伤后 3d 时,CNV 形成,可见 ILK 和 VEGF 表达,呈棕黄色染色颗粒,定位于角膜上皮、内皮层细胞及新生血管内皮细胞;5d 时,ILK 和 VEGF 表达进一步增强;7~10d 时,ILK 和 VEGF 表达达到高峰,呈棕褐色染色颗粒,主要定位于角膜上皮、内皮全层及角膜基质内新生血管内皮细胞,同时角膜基质内可见大量炎性细胞浸润;14~21d 时,随着新生血管的消退,ILK 和 VEGF 表达也逐渐减弱;28d 时,ILK 和 VEGF 的表达水平明显降低(图2)。通过 Image ProPlus6 图像分析软件分析各组中角膜组织区域平均光密度值(表1)和动态变化趋势(图3)。各组 ILK 和 VEGF 的表达与空白对照组比较,其差异均有统计学意义(P < 0.01)。ILK 与 VEGF 的表达呈正相关(r = 0.926, P < 0.01)。ILK 及 VEGF 的表达均与 CNV 的变化呈正相关(ILK 与 CNV 面积相关系数 r = 0.900, P < 0.01; VEGF 与 CNV 面积相关系数 r = 0.878, P < 0.01)。

3 讨论

本实验中我们采用 1mol/L 氢氧化钠造成 SD 大鼠角膜碱烧伤,制作 CNV 模型。此模型逼真地再现了角膜碱烧伤的病理状态,诱导产生的 CNV 范围较广,血管退化速度较慢,适合于要求产生大量 CNV 或比较长期的观察与 CNV 相关的细胞因子的动物实验,是研究炎症性 CNV 发生机制的重要手段。

角膜新生血管化是一个复杂的病理过程,涉及血浆蛋白的渗出、角膜细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解、内皮细胞的移动增殖及毛细血管生成^[8]。目前对 CNV 调控机制的研究多集中于 VEGF 上,因为 VEGF 是目前公认的功能最强的新生血管形成促进因子,角膜内 VEGF 的表达增高,可直接诱发 CNV 的形成^[9]。但是 VEGF 的来源和表达水平本身也都受到其它多种因素的调控^[10]。在调节角膜血管生成的众多因子中,有促进因

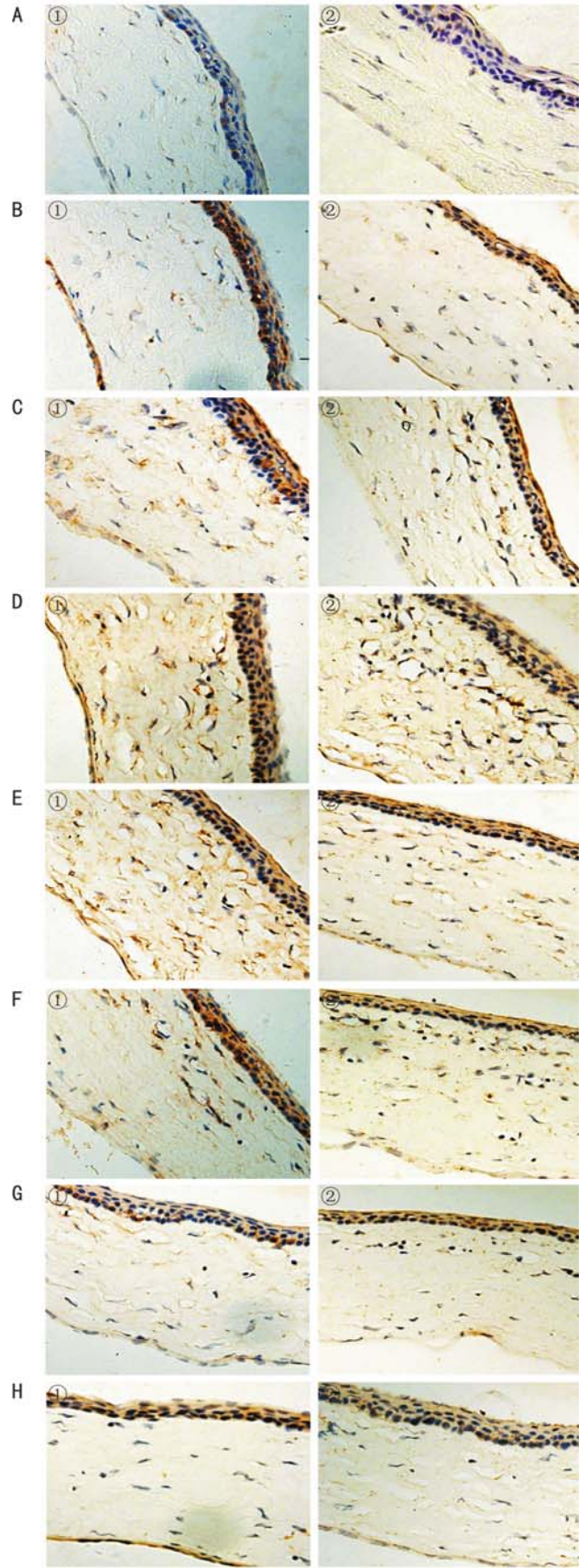


图2 碱烧伤后不同时间点,角膜组织免疫组织化学染色结果(×400) A:对照组①ILK;②VEGF;B:碱烧伤后 3d①ILK;②VEGF;C:碱烧伤后 5d①ILK;②VEGF;D:碱烧伤后 7d①ILK;②VEGF;E:碱烧伤后 10d①ILK;②VEGF;F:碱烧伤后 14d①ILK;②VEGF;G:碱烧伤后 21d①ILK;②VEGF;H:碱烧伤后 28d①ILK;②VEGF。

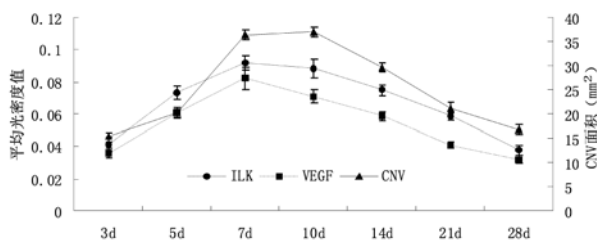


图3 碱烧伤后不同时间点 ILK 和 VEGF 表达及 CNV 面积动态变化趋势。

子(如 VEGF, 转化生长因子- β 、血小板源性生长因子、金属基质蛋白酶等), 也有抑制因子(如内皮抑素、血管抑素等)^[11], 这些因子的功能交叉重叠, 通常具有连锁反应, 但同时还有既相互促进又相互制约的关系, 非常复杂。如果能寻找到一个包括 VEGF 和其它生长因子在内的共同调控机制并加以干预, 便能从根本上抑制多种生长因子的表达, 那么抗血管新生的治疗无疑将更加高效。

通过文献回顾, 我们认为 ILK 可能是 CNV 形成中的重要调控信号。ILK 是 Hannigan 等^[12] 于 1996 年在酵母菌双杂合筛选系统中以 $\beta 1$ 整合素胞浆区尾部结构域作为诱饵发现的一种丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶。它广泛表达于黏着斑中, 是 PI3K 信号传导通路的重要成员, 位于 PI3K 下游, 在发起细胞基质之间的相互作用和调节如生长、增殖、存活、分化、迁移、侵袭和血管生成等的生物化学信号传导中发挥着重要作用^[13]。目前国内外已有学者关注 ILK 在血管形成中的作用, 但多集中在胚胎期血管形成以及肿瘤新生血管形成等方面。已有研究表明, ILK 参与调控与 CNV 形成相关的多种病理变化, 包括启动 VEGF 的转录和表达、促进细胞的增殖、促进细胞外基质的降解、增加细胞的移动性等, 具有显著地促进血管发育、血管形态发生和新生血管形成的作用。如: 活化的 ILK 可以通过激活 PKB/AKT-473 丝氨酸使 mTOR/FRAP-2448 磷酸化水平增高, 促进 HIF-1 α 产生, 从而启动 VEGF 的表达^[14]; ILK 活化后使 GSK-3 磷酸化失活, 随之失去了磷酸化 AP-1 的能力, 被脱磷酸化的 AP-1 恢复了与启动子结合的能力, 进而启动 VEGF 的转录^[13]; ILK 活化后, 通过磷酸化 PKB/AKT 进一步激活下游 IKK3, 使 I κ B 磷酸化降解, 释放出的 NF- κ B 进入细胞核内, 从而与相应的启动子结合启动 VEGF 的转录^[15]; VEGF 亦可刺激 PI3K 磷酸化, 从而可以激活 ILK, 进一步通过激活下游信号发挥 VEGF 促进细胞分裂、增殖以及诱导细胞迁移和促进血管腔形成的生物学功效等^[16]。在眼科学领域中, 有研究发现 ILK 参与调控视网膜新生血管的形成^[17], 但 ILK 与 CNV 是否有关尚未见报道。因此, 我们选取 ILK 作为研究对象, 以探讨其在 CNV 形成中可能的作用。

本研究结果显示, ILK 及 VEGF 在正常大鼠角膜上皮中仅有微弱阳性表达, 而在碱烧伤后各时间点的角膜上皮以及血管内皮中均有明显表达($P < 0.01$)。碱烧伤后 3 ~ 5d, 可见二者表达, 且迅速增加; 7 ~ 10d, 二者表达达到高峰; 14d 以后二者表达逐渐减弱, 与形态学观察 CNV 生长过程一致。即碱烧伤后 3 ~ 5d 新生血管生长迅速, 7 ~ 10d 生长达到高峰, 14d 以后血管开始逐渐减少退化。ILK 及 VEGF 表达的变化均与 CNV 的变化呈正相关(ILK 与 CNV 面积相关系数 $r = 0.900, P < 0.01$; VEGF 与 CNV 面积相关系数 $r = 0.878, P < 0.01$), 且二者之间也存在正相关性($r = 0.926, P < 0.01$)。这提示在 CNV 模型中 ILK 及 VEGF

之间可能存在一定的协同关系。本研究亦发现: ILK 及 VEGF 的表达高峰出现得较 CNV 生成高峰早, 这与滕旭等^[18] 对大鼠角膜烧伤后 VEGFmRNA 水平的研究基本一致。提示 ILK 及 VEGF 可能协同激活角膜缘血管的生长因子受体, 导致血管内皮细胞增殖。

综上所述, 我们认为 ILK 及 VEGF 作为重要的调控子共同参与了 CNV 的形成过程, 从理论上推断, ILK 可以作为新的防治 CNV 的有效靶点。调节和抑制 ILK 的活性以预防和逆转 CNV, 不但对 CNV 发病机制和药物靶点的确定具有重要的意义, 而且对于以 CNV 为主要表现的疾病(如病毒性角膜炎、外伤、角膜移植术后等)也可以提供新的研究思路和治疗策略。

参考文献

- Streilein JW, Bradley D, Sano Y, et al. Immunosuppressive properties of tissues obtained from eyes with experimentally manipulated corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(2):413-424
- Dana MR, Streilein JW. Loss and restoration of immune privilege in eyes with corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(12):2485-2494
- Friedrich EB, Liu E, Sinha S, et al. Integrin-linked kinase regulates endothelial cell survival and vascular development. *Mol Cell Biol* 2004;24(18):8134-8144
- Vouret-Craviari V, Boulter E, Grall D, et al. ILK is required for the assembly of matrix-forming adhesions and capillary morphogenesis in endothelial cells. *J Cell Sci* 2004;117:4559-4569
- 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30
- 颜世龙, 梁丹, 林妙丽, 等. 碱烧伤大鼠角膜新生血管模型的初步探索. *眼科学报* 2005;21(4):165-172
- D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(9):4082-4085
- Beebe DC. Maintaining transparency: a review of the developmental physiology and pathophysiology of two avascular tissues. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19(2):125-133
- 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
- Castellani ML, Galzio RJ, Felaco P. VEGF, substance P and stress, new aspects: a revisited study. *J Biol Regul Homeost Agents* 2010;24(3):229-237
- Qazi Y, Maddula S, Ambati BK. Mediators of ocular angiogenesis. *J Genet* 2009;88(4):495-515
- Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, et al. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new $\beta 1$ -integrin-linked protein kinase. *Nature* 1996;379(6560):91-96
- McDonald PC, Fielding AB, Dedhar S. Integrin-linked kinase-essential roles in physiology and cancer biology. *J Cell Sci* 2008;121:3121-3132
- Zhou H, Chiles K, Feldser D. Modulation of hypoxiainduciblefactor 1 alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000;60(6):1541-1545
- Tan CA, Mui A, Dedhar S. Integrin-linked kinase regulates inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in an NF-kappa B-dependent manner. *J Biol Chem* 2002;277:3109-3116
- Tan C, Cruet-Hennequart S, Troussard A. Regulation of tumor angiogenesis by integrin-linked kinase. *Cancer Cell* 2004;5(1):79-90
- 邹贺, 黎晓新, 于文贞, 等. 整合连接激酶在血管内皮生长因子诱导视网膜新生血管形成的信号传导通路中的作用. *中华眼底病杂志* 2008;24(6):431-435
- 滕旭, 孙旭光, 王智群. 大鼠角膜烧伤后新生血管基因治疗的研究. *眼科研究* 2002;20(5):416-418