

血管内皮生长因子及其受体在 DR 患者玻璃体中的表达

利焕廉, 周金文, 左 炜

基金项目: 深圳市福田区卫生公益性科研项目 (No. FTWS201366)

作者单位: (518033) 中国广东省深圳市福田区人民医院眼科

作者简介: 利焕廉, 本科, 主治医师, 研究方向: 视网膜疾病。

通讯作者: 周金文, 本科, 主治医师, 研究方向: 眼科临床。

zhoujw4203@163.com

收稿日期: 2014-04-13 修回日期: 2014-07-29

Expression of vascular endothelial cell growth factor and its receptors in vitreous of patients with diabetic retinopathy

Huan-Lian Li, Jin-Wen Zhou, Wei Zuo

Foundation item: Health and Public Welfare Scientific Research Project of Futian District, Shenzhen (No. FTWS201366)

Department of Ophthalmology, Futian People's Hospital, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China

Correspondence to: Jin-Wen Zhou. Department of Ophthalmology, Futian People's Hospital, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China. zhoujw4203@163.com

Received: 2014-04-13 Accepted: 2014-07-29

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of vascular endothelial cell growth factor (VEGF) and its receptors in vitreous of patients with diabetic retinopathy (DR), and to discuss its role in the development of DR.

• **METHODS:** Selected 13 patients (16 eyes) with DR and 15 healthy people (15 eyes), the expression of VEGF and its receptors (fms-like tyrosine kinase-1, Flt-1 and kinase insert domain containing receptor, KDR) were evaluated by immunohistochemistry in vitreous. The levels of VEGF, the Flt-1 and KDR in vitreous of patients with DR were examined with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

• **RESULTS:** Immunohistochemical staining showed that the expression of VEGF, Flt-1 and KDR in vitreous vessel membrane of patients with DR was increased significantly. And the levels of VEGF, Flt-1 and KDR in vitreous of patients with DR were obviously higher than that in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** VEGF, Flt-1 and KDR were widely expressed in vitreous of patients with DR, and were positively related to micro-angiogenesis of DR patients. It proved that VEGF and its receptors played important roles in the occurrence and development of DR.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; vascular endothelial cell growth factor; Flt-1; KDR

Citation: Li HL, Zhou JW, Zuo W. Expression of vascular endothelial cell growth factor and its receptors in vitreous of patients with diabetic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(9):1587-1589

摘要

目的: 观察血管内皮生长因子 (vascular endothelial cell growth factor, VEGF) 及其受体在糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 患者玻璃体中的表达, 探讨其在 DR 发生发展中的作用。

方法: 对 13 例 16 眼 DR 患者和 15 例 15 眼健康人, 采用免疫组织化学法检测其玻璃体新生血管膜的 VEGF 及其受体 (fms-样酪氨酸激酶, Flt-1 和含激酶插入区受体, KDR) 表达情况, 同时采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 DR 患者玻璃体中 VEGF、Flt-1 和 KDR 的浓度。

结果: 免疫组织化学染色显示, DR 患者玻璃体血管膜中 VEGF、Flt-1 和 KDR 高度表达, 玻璃体中 VEGF、Flt-1 和 KDR 浓度明显高于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

结论: VEGF 及其受体 Flt-1、KDR 在 DR 患者玻璃体中高度表达, 与 DR 患者的微血管生成关系密切, 提示 VEGF 及其受体在 DR 的发生发展中起重要作用。

关键词: 糖尿病视网膜病变; 血管内皮生长因子; fms-样酪氨酸激酶; 含激酶插入区受体

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.09.07

引用: 利焕廉, 周金文, 左炜. 血管内皮生长因子及其受体在 DR 患者玻璃体中的表达. *国际眼科杂志* 2014;14(9):1587-1589

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病患者多发且较严重的并发症之一, 其病理基础为高糖诱导视网膜微血管进行性损伤^[1], 血管内皮细胞分裂增生, 促进新生血管形成, 导致不可逆的视功能损害, 甚至完全失明。近年来, 通过现代分子生物学、组织病理学及临床等不同领域的交互渗透研究发现, 视网膜新生血管的发生、发展与血管内皮生长因子 (vascular endothelial cell growth factor, VEGF) 及其受体表达密切相关^[2]。本研究采用免疫组织化学法对 VEGF 及其受体 (fms-like tyrosine kinase-1, Flt-1 和 kinase insert domain containing receptor, KDR) 在 DR 患者玻璃体中的表达情况进行了初步观察, 同时采用酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测 DR 患者玻璃体中 VEGF、Flt-1 和 KDR 水平, 以探讨 VEGF 在 DR 发病机制中的作用和意义。

1 材料和方法

1.1 材料 选取 2011-07/2013-06 在我院眼科进行手术的 DR 患者 13 例 16 眼, 所有患者均为 2 型糖尿病, 符合国际糖尿病协会及 WHO 制定的 DR 诊断标准^[3]。其中男 5 例 6 眼, 女 8 例 10 眼; 年龄 34 ~ 75 (平均 54.8 ± 15.2) 岁; 所有患者术前和术后均行视力、眼压、裂隙灯、直接(间接)

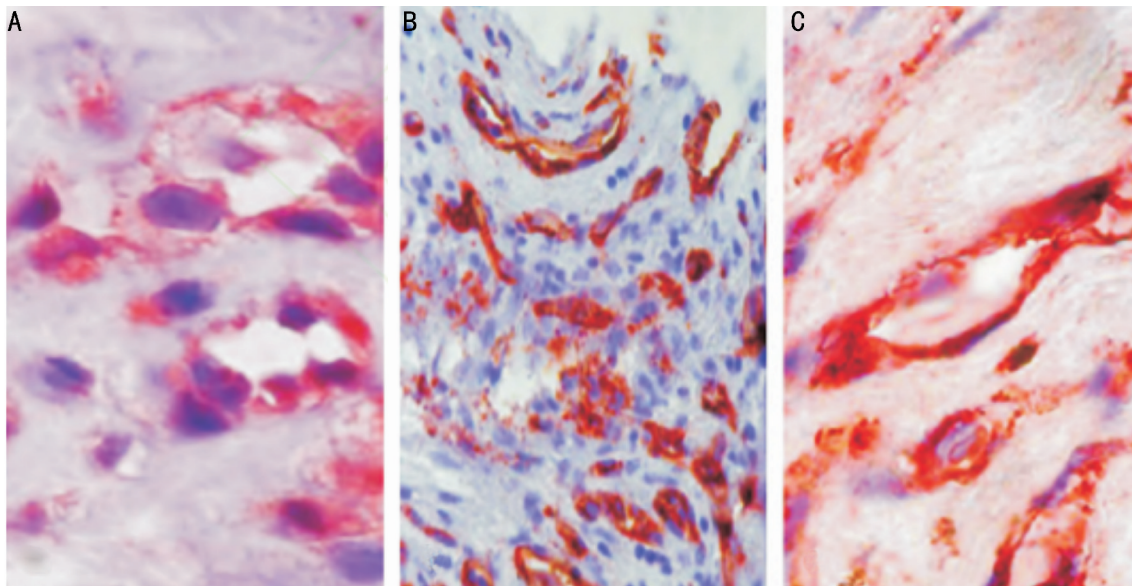


图1 DR患者玻璃体血管膜中 VEGF、Flt-1 和 KDR 的表达(SP×400) A:VEGF 表达;B:Flt-1 表达;C:KDR 表达。

检眼镜、OCT、荧光素眼底血管造影等检查;并排除有激光光凝治疗史者。另设 15 例 15 眼(均为健康人意外死亡后 6h 内的角膜移植供体眼)作为对照组。DR 患者知情同意后行标准三切口玻璃体切割术,行玻璃体切割手术过程中,用剥膜钩剥离新生血管膜并用膜镊取出,立即放入多聚甲醛(40g/L)中固定,4℃冰箱保存备用。在关闭灌注的情况下用玻璃体切割头进入玻璃体腔中央,抽取玻璃体 0.2mL,放入 0.5mL 无菌 Eppendorff 离心管中。对照组取出角膜后,用剥膜钩剥离新生血管膜并用膜镊取出放入多聚甲醛(40g/L)中固定。然后用无菌注射器抽取正常玻璃体 0.2mL,置于 0.5mL 无菌 Eppendorff 离心管中。所有玻璃体样本均以 1500r/min 离心 10min,去除沉淀后放入 -70℃ 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 将手术取出的血管膜标本常规脱水、透明、石蜡包埋、3~4μm 厚连续切片,摊片、烤片。采用免疫组织化学 SP 法染色,SP 9000 免疫组化检测试剂盒、DAB 显色试剂盒均购于北京中杉金桥生物有限公司。具体步骤为:高温抗原修复后,加正常血清封闭组织内非特异抗原,分别加入一抗(均为兔抗人多克隆抗体,1:100 稀释,美国 Santa Cruz 公司)温育 1h,4℃ 过夜, PBS 冲洗 3 次;再加入二抗温育 30min, PBS 冲洗 3 次;再加入三抗温育 30min, PBS 冲洗 3 次;DAB 显色剂显色,苏木精复染,脱水,透明,中性树脂封片。对照组以 PBS 代替一抗作为阴性对照。VEGF、Flt-1、KDR 染色结果以新生血管内皮细胞内出现棕黄色颗粒为阳性。

1.2.2 ELISA 检测 使用人 VEGF、Flt-1、KDR ELISA 试剂盒(敏感度<20ng/L,武汉博士德生物技术公司提供),严格按说明书操作,在美国 Metretech 960 型酶标仪上测定光密度值,并计算对应浓度,各样本均测 2 次,取平均值作为结果进行统计学分析。

统计学分析:数据采用统计学软件 SPSS 17.0 进行处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 两组患者玻璃体内 VEGF、Flt-1 和 KDR 浓度比较

		($\bar{x} \pm s$, ng/mL)		
组别	眼数	VEGF	Flt-1	KDR
DR 组	16	0.538±0.102	5.489±1.526	1.382±0.403
对照组	15	0.427±0.094	4.335±1.409	0.846±0.468
<i>t</i>		3.14	2.18	3.42
<i>P</i>		<0.01	<0.05	<0.01

2 结果

2.1 DR 患者玻璃体血管膜中 VEGF、Flt-1 和 KDR 的表达 免疫组织化学图片见图 1, VEGF 表达部位位于血管内皮细胞的细胞浆和细胞膜,间质部分亦有少量弱阳性表达(图 1A); Flt-1 和 KDR 表达部位位于整个血管内皮细胞(图 1B, C)。

2.2 两组患者玻璃体内 VEGF、Flt-1 和 KDR 浓度比较 对照组玻璃体内 VEGF、Flt-1 和 KDR 浓度分别为 0.427±0.094, 4.335±1.409ng/mL 和 0.846±0.468ng/mL; 而 DR 组患者玻璃体内三者浓度分别为 0.538±0.102, 5.489±1.526ng/mL 和 1.382±0.403ng/mL。DR 组患者玻璃体内 VEGF 及其受体浓度明显高于对照组,经统计学处理差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表 1)。

3 讨论

3.1 VEGF 及其受体的生物结构特点 VEGF 是一种二聚体糖蛋白,因其具有促进血管内皮细胞有丝分裂作用和较强的血管渗透作用而被命名,是一种高度特异的血管生成因子和最具选择性的内皮细胞促有丝分裂因子,可参与多种生理性或病理性新生血管形成过程。其基因定位于 6p21,长 14kb,相对分子质量 45×10^3 ,由 7 个内含子和 8 个外显子构成,通过与高亲和力的特异性受体结合而发挥生物学效应^[4]。fms-样酪氨酸激酶(Flt-1)和含激酶插入区受体(KDR)是 VEGF 两大类受体^[5],二者结构相似,均属于酪氨酸激酶类,但生物学活性有所差异。Flt-1 由视网膜血管周细胞分泌,参与血管生成过程中新毛细血管装配和内皮细胞的排列,不引起内皮细胞分裂增殖;KDR 由

视网膜内皮细胞分泌,参与内皮细胞的增殖、分化与迁移,同时可抑制内皮细胞凋亡。

3.2 DR 患者 VEGF 及其受体表达的变化 众多研究证实,DR 患者 VEGF 及其受体表达增加。徐威等^[6]对 65 例糖尿病患者进行血浆 VEGF 水平的检测,并与 35 名健康人作比较,结果发现 DR 患者血浆 VEGF 水平明显高于健康对照组。Agrawal 等^[7]用斑点杂交、免疫组织化学、免疫沉淀和免疫印迹技术研究糖尿病大鼠视网膜 VEGF mRNA 和蛋白表达的丰度及分布。结果表明,病程 6mo 的糖尿病动物血管壁、内核层、外丛状层 VEGF 表达上调,VEGF mRNA 水平较对照组显著升高,Flt-1 和 KDR 表达也明显上调。本研究中免疫组织化学结果显示 DR 患者玻璃体血管膜中 VEGF、Flt-1 和 KDR 高度表达,玻璃体中 VEGF、Flt-1 和 KDR 浓度明显高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),这与苏钰等^[8]的研究结果相一致。

3.3 DR 患者 VEGF 及其受体表达变化的相关机制 DR 患者长期处于高血糖和代谢紊乱状态,促使血管障碍,血液凝固系统亢进,纤溶系统功能低下,毛细血管阻塞,加之红细胞携氧能力下降,造成视网膜组织慢性缺血缺氧^[9]。缺氧是刺激视网膜血管内皮细胞 VEGF mRNA 表达的最强因素^[10],大量表达的 VEGF 破坏了血-视网膜屏障,使视网膜血管通透性增加,渗出增加,渗出液进入玻璃体,玻璃体内 VEGF 含量明显增加,VEGF 作用于内皮细胞上的 KDR 和 Flt-1 受体,使细胞内蛋白酪氨酸磷酸化,进一步刺激视网膜内皮细胞增殖,诱导视网膜新生血管形成,加重病情。

综上所述,DR 患者玻璃体中 VEGF 及其受体高度表达,可以通过定期监测 VEGF 水平来了解糖尿病微血管病变的发生及发展程度,为 DR 的早期诊断、病情判断提供

依据。同时可以利用 VEGF 抑制剂或受体拮抗剂来延缓 DR 病变的发生、发展,为 DR 的防治提供一个新途径。

参考文献

- 1 杨宏伟,黄永刚,陈晓隆,等.血清高迁移率族蛋白 B1 在糖尿病视网膜病变患者中的表达水平和临床意义.中国医科大学学报 2012;41(12):1127-1129
- 2 Javanmard SH, Hasanpour Z, Abbaspoor Z, et al. Aqueous concentrations of VEGF and soluble VEGF receptor - 1 in diabetic retinopathy patients. *J Res Med Sci* 2012;17(12):1124-1127
- 3 Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T, et al. Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium - derived factor and Vascularendothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2002;134: 348-353
- 4 Sonoda S, Sakamoto T, Shirasawa M, et al. Correlation Between Reflectivity of Subretinal Fluid in OCT Images and Concentration of Intravitreal VEGF in Eyes With Diabetic Macular Edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(8): 5367-5374
- 5 赵绮,刘林峰,李广帅,等.非黑色素性皮肤癌组织中血管内皮生长因子及其受体 1 和受体 2 的表达.郑州大学学报(医学版) 2012;47(2): 215-218
- 6 徐威,蔡应木,王彩霞.监测血浆血管内皮生长因子水平对早期诊断糖尿病视网膜病变的意义.广东医学 2012;33(12): 1802-1803
- 7 Agrawal SS, Naqvi S, Gupta SK, et al. Prevention and management of diabetic retinopathy in STZ diabetic rats by *Tinospora cordifolia* and its molecular mechanisms. *Food Chem Toxicol* 2012;50(9): 3126-3132
- 8 苏钰,陈长征,李璐,等.增生型糖尿病视网膜病变患者玻璃体血管内皮生长因子其受体浓度检测.中华眼底病杂志 2012;28(3): 289-290
- 9 黎铎,胡竹林.血管内皮细胞生长因子在糖尿病性视网膜病变进展中的作用.国际眼科杂志 2008;8(5): 990-993
- 10 Carter JG, Cherry J, Williams K, et al. Splicing factor polymorphisms, the control of VEGF isoforms and association with angiogenic eye disease. *Curr Eye Res* 2011;36(4): 328-335