文章编号:1000-5404(2005)19-1921-03

论著

血管内皮生长因子在小鼠角膜碱烧伤后修复过程中的作用

严 军,王正国,朱佩芳 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,全军交通医学研究所,全军交通医学实验室,创伤、烧伤和复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要: 目的 研究角膜碱烧伤后修复过程中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达。**方法** 在建立体内角膜碱烧伤模型的基础上,主要采用免疫组化和RT-PCR等方法以确定VEGF的表达规律。**结果** VEGF在正常角膜组织和伤后3 h几乎无表达。碱烧伤后6 h,VEGF开始有明显表达,到伤后12 h达到峰值,然后有所下降,碱烧伤后24 h和48 h表达最低,之后又有一反弹过程,在伤后96 h和192 h达到最高。表达部位主要集中在基质层。**结论** VEGF在核酸和蛋白质水平上的表达相似,其表达量随时相点的变化呈波动性趋势。体内角膜组织VEGF的表达是网络调控的结果,与眼新生血管存在着时空对应关系。进一步研究角膜创伤后VEGF对其它抑血管因子的调控作用仍是必需的。

关键词: 血管内皮生长因子; 角膜; 碱烧伤; 修复
中图法分类号: R392.11; R644; R772.2 **文献标识码**: A

Role of VEGF in corneal repair after alkali burn in mice

YAN Jun, WANG Zheng-guo, ZHU Pei-fang (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the course of corneal repair after alkali burn in mice. **Methods** The corneal alkali burn model was established *in vivo*, then immunocytochemistry (ICC) and RT-PCR were mainly performed to determine VEGF expression in different intervals. **Results** VEGF could hardly be expressed in both normal tissue and early traumatic tissue of cornea. At 6 h after alkali burn, the VEGF expression levels could be found obviously, then began to increase and reached its maxim at 12 h, then decreased to the minimum between 24 h and 48 h after injury. There existed another increasing process of VEGF expression and reached the second peak at 96 h and 192 h. The VEGF-positive reaction mainly gathered in the stroma of cornea. **Conclusion** The VEGF expression levels in nucleic acid is similar to that in protein, and VEGF expression level showed fluctuating tendency according to the changes of time interval. The result of VEGF expression reflects the network regulation *in vivo* and in a time- and space-dependent manner with ocular angiogenesis. It is still necessary to further study the role of VEGF in regulating other factors which can inhibit angiogenesis after corneal alkali burn.

Key words: vascular endothelial growth factor; cornea; alkali burn; repair

各种不同致伤因素导致角膜损伤后,其角膜修复过程常常伴随着新生血管的发生,从而导致视力受损乃至失明。作为一种特异性促进血管内皮细胞分裂、增生和提高血管通透性的可溶性糖蛋白,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在促进新生血管发生过程中发挥着关键作用。作者的前期研究也揭示,探索VEGF的作用机制对于全面掌握角膜创伤愈合过程中的网络调控是非常重要的,也有利于抑血管作用的深入研究。然而,VEGF在该过程中的表达规律还不清楚。因此,本实验以角膜碱烧伤为致伤因素,对该过程中VEGF的作用进行了体内研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂

昆明种孕小鼠8只,体质量38~45 g,由第三军医大学实验动物中心提供。兔抗鼠VEGF多克隆抗体购自武汉博士德生物

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目,G1999-054204),中国博士后科学基金资助项目(2005037165)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054204), and Postdoctoral Science Foundation of the China (2005037165)
作者简介: 严 军(1970-),男,浙江省宁波市人,博士,讲师,主要从事创伤愈合方面的研究。电话:(023)68757814
通讯作者: 王正国,电话:(023)68757864
收稿日期:2005-03-15;**修回日期**:2005-06-30

工程有限公司;SP-9000 型 ICC 染色试剂盒由北京中山生物技术有限公司提供。Tripure 裂解液由德国 Roche 公司提供;vegf 引物 1 对由上海博亚生物技术有限公司设计并合成,上、下游引物依次为:5′-ATGATAGTCTACAAAAGCACCCC-3′,5′-GATGAGGAAGGGTAAGCCACT-3′,PCR 产物长度 310 bp。MMLV 第 1 链 cDNA 合成试剂盒和 PCR 扩增盒来自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.2 角膜碱烧伤模型的构建

待孕鼠自然分娩。小鼠生长成熟后开始实验,使同胞小鼠遗传背景的差异降到最低。设立实验组($n=35$,共 7 组,每组 5 只系同胞小鼠)和对照组($n=5$,系同胞小鼠)。实验组动物用乙醚麻醉,圆形滤纸用 0.01 mol/L NaOH 溶液润湿后贴住动物角膜 45 s,以造成角膜碱烧伤。

1.3 免疫组化研究

实验动物在碱烧伤后 3、6、12、24、48、96 h 和 192 h 断颈处死,取角膜。4% 甲醛固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋并切片获得 4 μm 厚切片。正常组动物麻醉后用生理盐水处理角膜,处理后 192 h 取角膜,方法同实验组动物。组织切片 65 ℃ 烘烤 3 h,二甲苯脱水,逆向梯度乙醇水合,0.01 mol/L PBS 漂洗,用含 1% H_2O_2 的甲醇溶液处理以阻滞内源性过氧化物酶,浸入 0.01 mol/L 枸橼酸钠溶液(pH 6.0)中微波煮沸 3 min 以修复抗原。5% 正常山羊血清封闭 15 min,加入 VEGF 一抗(1∶50稀释)4 ℃孵育过夜。0.01 mol/L PBS 漂洗后,加入二抗 IgG/Bio,37 ℃ 30 min。漂洗后加入三抗 S-A/HRP,37 ℃ 30 min。DAB(Sigma)显色。梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后观察。

1.4 RT-PCR

分组同上。实验组动物在碱烧伤后相同时相取角膜。用 Tripure 裂解液抽提角膜组织总 RNA。紫外分光光度计检测核酸浓度,选取 $D(260)/D(280)$ 的比值在 1.8~2.0 的样品进入下一步实验。取总 RNA 1 μl、Oligo(dT) 181 μl、无 RNA 酶去离子水 10 μl,混匀后 70 ℃水浴 5 min,冰浴 30 s,加入 5×Reaction Buffer 4 μl、RNase Inhibitor(20 U/μl) 1 μl、dNTP Mix(10 mmol/L) 2 μl,混匀后 37 ℃水浴 5 min,加入 1 μl M-MuLV RT(20 U/μl),使其终体积为 20 μl。37 ℃水浴 60 min,然后 70 ℃水浴 10 min 结束反应。从而将总 RNA 逆转录为 cDNA 第 1 链。再取 cDNA 模板 0.5 μl,加入 1 对 vegf 引物各 0.5 μl、*Taq* DNA 酶 0.5 μl、10×PCR Buffer 2.5 μl、2 mmol/L dNTP 2.5 μl、25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μl,补足去离子水 16.5~25 μl 反应体系。94 ℃ 90 s 预变性,然后 94 ℃ 45 s 变性、55 ℃ 50 s 退火、72 ℃ 90 s 延伸,共 40 个循环进行 PCR 反应。接着 72 ℃ 10 min,最后 4 ℃保存。同时采用阳性对照(正常组动物 G3PDH 引物)和空白对照(正常组动物 vegf 引物)。0.8% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物表达情况。

1.5 统计学分析

利用 Tiger920 型细胞图像分析仪及配套软件(重庆大学图像图形研制中心)对免疫组化结果进行半定量分析,检测不同时相阳性表达(含正常对照)的平均光密度(average optical density, AOD),并对结果进行 t 检验($\alpha=0.05$),同时用 RT-PCR 结果加以验证。

2 结果

2.1 VEGF 的体内表达

VEGF 在正常角膜和创伤初期(6 h 以前)角膜组织中几乎无表达,但碱烧伤后 6 h 就可观察到明显的阳性表达。各时相表达部位主要集中在基质层(图 1)。创伤 6 h 后各时相的表达量各有高低。其中碱烧伤后 6 h 和 12 h 的表达量达到第 1 个峰值,其间的差异不显著($P>0.05$)。伤后 24~48 h 其表达有所降低,它们与前两个时相差异显著($P<0.05$),但二者之间无明显差别($P>0.05$)。VEGF 的表达量在伤后 96 h 和 192 h 又有明显回升($P<0.05$),达到第 2 个峰值,其中伤后 96 h VEGF 的表达量略高于伤后 192 h。见表 1。

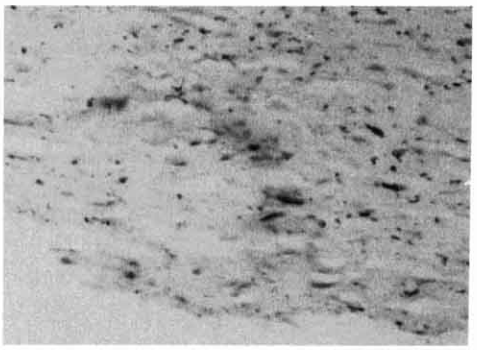


图 1 体内研究中小鼠角膜 VEGF(碱烧伤后 12 h)免疫组化 (S-P×200)

Fig 1 VEGF in mouse cornea at 12 h after alkali burn *in vivo* (S-P×200)

表 1 小鼠角膜碱烧伤后 VEGF 的表达分析

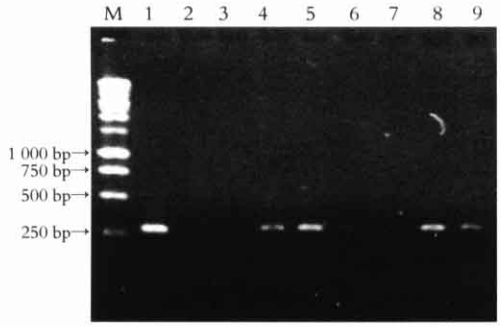
Tab 1 Expression of VEGF in mouse cornea after alkali burn *in vivo*

Group	AOD of VEGF
Control	0.13±0.04
Postburn 3 h	0.16±0.05
Postburn 6 h	0.87±0.18[a]
Postburn 12 h	0.95±0.22[a]
Postburn 24 h	0.62±0.16[a,b,c]
Postburn 48 h	0.56±0.16[a,b,c]
Postburn 96 h	1.02±0.27[a,d,e]
Postburn 192 h	0.97±0.26[a,d,e]

a: $P<0.05$, *vs* control; b: $P<0.05$, *vs* 6 h; c: $P<0.05$, *vs* 12 h; d: $P<0.05$, *vs* 24 h; e: $P<0.05$, *vs* 48 h

2.2 vegf 的体内表达

vegf 的表达规律与 VEGF 在体内研究中基本一致,但各时相点表达量的差异明显高于免疫组化过程中 VEGF 的表达。角膜正常组织中的 G3PDH 有明显表达,说明 RT-PCR 系统正常。但 vegf 在正常角膜组织中和伤后 3 h 的表达呈阴性。其后 vegf 呈不同程度的阳性表达,其中伤后 6、12、96 h 和伤后 192 h 的表达较高,又以伤后 12 h 和伤后 96 h 为最高;伤后 24 h 和伤后 48 h 的表达较低。整个表达图谱呈明显的波动趋势(图 2)。



M: Marker(1kb DNA ladder); 1: G3PDH; 2 - 9: Control, postburn 3, 6, 12, 24, 48, 96 h and postburn 192 h

图 2　体内研究中碱烧伤后不同时相小鼠角膜 vegf RT-PCR

Fig 2　Expression of vegf in different intervals after corneal alkali burn in mice *in vivo*

3　讨论

血管发生是在创伤愈合阶段影响一系列生理和病理进程的关键因素，应激条件下机体许多代谢状态的改变都可能与新生血管的形成有关[1]。在该过程中，VEGF 是目前发现的诸多促血管因素中作用最强的生长因子之一。研究表明，VEGF 是一类在机体中广泛存在的具有高度生物活性的外分泌型蛋白，其分子是由 2 个相同的多肽链通过二硫键构成的二聚体，总蛋白分子质量为 34 000 ~ 46 000，它可以与 Flt-1 或 KDR 两种受体的特异性结合，使受体酪氨酸残基发生磷酸化反应，引起细胞内许多酶促反应，促进内皮细胞增殖，从而诱导血管形成[2]。

在眼部创伤后新生血管的形成过程中，血管基底膜上的酶首先出现降解，然后内皮细胞发生趋化和迁移，内皮细胞出现有丝分裂并与周围细胞相互作用，从而导致血管管腔的形成[3]。VEGF 就是通过强烈影响内皮细胞而在血管发生中起主导作用的。然而，由于机体内部存在网络调控的原因，VEGF 的表达也要受到体内许多因子的影响，并非单因子作用的结果。例如：PAF 就能通过上调 VEGF 的表达而诱导角膜新生血管化[4]。而 Varela 等[5]的研究也发现，在角膜损伤后表达上调的除了 VEGF 外，还有 FGF、IGF-1、PAI-1、PAI-2A 等多种因子。

本研究结果既体现了 VEGF 在创伤愈合中的普遍作用，也显示了它在角膜碱烧伤愈合过程中的特有规律。VEGF 在核酸和蛋白质水平上的表达比较相似，并随时相点的变化呈波动性趋势。VEGF 的阳性表达是在碱烧伤后 6 h 开始的，到伤后 12 h 达到一个峰值，经历了伤后 24 h 和伤后 48 h 的低表达后，在伤后 96 h 和伤后 192 h 又有明显上升，开始形成另一个峰值。这种表达规律是可以得到较合理的解释的。

结合前期研究工作特别是笔者对血小板反应蛋白 2(thrombospondin 2, TSP2)在角膜碱烧伤后创伤愈合过程中的作用研究可以发现，碱烧伤后 24 h 左右是体内出现修复过程的重要阶段，也是各种因子和血管发生变化较为显著的时刻[6,7]。VEGF 在正常组织和创伤初期的组织中没有或几乎没有表达，这与角膜组织本身无血管和创伤后血管发生有渐进性的结论是一致的。同时，这也可能是以 TSP2 为代表的一类抑血管物质在碱烧伤早期的表达有关。随着修复过程的进行，血管发生趋势增强，VEGF 表达迅速升高，这也可以从同时间段 TSP2 的降低中得到解释。至于 VEGF 在随后的时相点降低的现象，可能与血管发生达到一定阶段有关。但是，由于碱烧伤具有作用时间长、病理过程复杂的特点，其持续性伤害又可能导致新一轮的修复过程，也就可能导致新生血管的生成，因此，在伤后 96 h 和伤后 192 h 又出现了 VEGF 表达的反弹现象。

上述结果提示，在角膜碱烧伤后修复过程中，新生血管的发生是促血管因子与抑血管因子共同作用的结果。机体角膜组织 VEGF 的表达是网络调控的结果，与眼新生血管存在着时空对应关系。同时，VEGF 与抑血管因子表达的时相差异也为进一步研究抑制角膜血管化等后续工作提供了理论基础和实验支持。然而，VEGF 与其它抑血管因子如 TSP2 的具体调控关系等问题还有待于进一步研究。

参考文献：

[1] Da Costa Pinto F A, Malucelli B E. Inflammatory infiltrate, VEGF and FGF-2 contents during corneal angiogenesis in STZ-diabetic rats[J]. Angiogenesis, 2002, 5(1 - 2): 67 - 74.

[2] 王建华，尹庆水，黄清春，等. 血管内皮生长因子促血管形成作用及其调控[J]. 第二军医大学学报，2004，25(2)：210 - 212.

[3] 李景恒. 眼部新生血管性疾病研究进展及中医药防治对策[J]. 广州中医药大学学报，2004，21(1)：77 - 80.

[4] Ma X, Ottino P, Bazan H E, *et al*. Platelet-activating factor (PAF) induces corneal neovascularization and upregulates VEGF expression in endothelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(9): 2915 - 2921.

[5] Varela J C, Goldstein M H, Baker H V, *et al*. Microarray analysis of gene expression patterns during healing of rat corneas after excimer laser photorefractive keratectomy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(6): 1772 - 1782.

[6] Yan J, Yang T, Li G P, *et al*. Changes of uPA and uPA-R expression in the cornea after alkali burn[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2004, 37(1 - 2): 49 - 52.

[7] Yan J, Yang T, Zeng Y J, *et al*. The function of tPA and PAI-2 in the course of corneal repair after alkali burn[J]. Cell Biology International, 2004, 28(8 - 9): s11.

（编辑　汪勤俭）