基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0152-05

PEDF 对大鼠穿透性角膜移植片 VEGF 影响的实验研究

步建平,周善壁,程 琳
(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘要】目的:探讨局部应用色素上皮细胞衍生因子(Pigment epithelium-derived factor,PEDF)滴眼液抑制大鼠穿透性角膜移植术后植片中 VEGF(Vascular endothelial growth factor,VEGF)的表达及作用机制。方法:建立 60 只 SD 大鼠(受体)和 30 只 Wistar(供体)大鼠同种异体穿透性角膜移植模型,并随机分成实验组(10 nmol/L PEDF 滴眼液)和实验对照组(赋形剂滴眼液)各 30 只;另 30 只 SD 大鼠自体穿透性角膜移植模型(赋形剂滴眼液),作为空白对照组,每只动物均行右眼手术左眼为正常对照。自术后第 1 d 起在显微镜下进行临床观察,每日 1 次。于术后 1、2、3、4、8 周 5 个时间点,每组随机处死 6 只动物,以免疫组织化学方法检测角膜移植片 PEDF 和 VEGF 的表达水平;透射电镜观察超微结构变化。结果:实验组在术后 2、3、4、8 周 VEGF 的表达水平显著低于实验对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:局部应用 PEDF 滴眼液可以降低穿透性角膜移植植片中 VEGF 的表达,延长大鼠穿透性角膜移植片的存活时间。

【关键词】色素上皮细胞衍生因子;免疫排斥反应;内皮细胞生长因子;角膜新生血管
【中国图书分类法分类号】R772.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-29

Experimental study of the effects of PEDF on penetrating corneal graft of VEGF in rats

BU Jian-ping, et al
(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objectives*: To evaluate the effects of PEDF eyedrops on the corneal allograft rejection by topical installition in the rats model of penetrating keratoplasty, and to investigate its possible mechansism and its correlation factor. *Methods*: Penetrating keratoplasty(PKP) was proformed orthotopically in wistar rats and SD rat recipients. 60 SD rats were randomly assigned to two groups; experimental group and experimental control group after PKP. 30 SD rats underwent auto penetrating keratoplasty(blank control group). The experimental group was treated with PEDF eyedrops, while the blank control group and experimental control group were treated with escipient eyedrops. All animals' survival time was recored and compared by the biomicroscope examination. 6 animals in three groups were killed respectively at the 1st week, 2nd week, 3rd week, 4th week and 5th week postoperatively. Corneal ultrastuctural morphology was observed by TEM. PEDF and VEGF expression was examined by immunohistochemistry. *Results*: Expression level of VEGF of experimental control group was higher than that of experimental group($P<0.05$ or $P<0.01$). *Conclusion*: PEDF eyedrops can depress expression of VEGF in corneal allografts. Topical application of PEDF eyedrops can prolong suivival time of the allografts.

【Key words】Pigment epithelium-derived factor; Graft rejection; Vascular endothelial growth factor; Corneal neovascularization

研究证明,色素上皮细胞衍生因子(Pigment epithelium-derived factor,PEDF)和血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)是目前发现作用最强的角膜新生血管(Corneal neovascularization,CNV)形成抑制因子和促进因子之一。因此检测角膜移植术后局部应用 PEDF 引起的 VEGF 含量变化对于探讨角膜移植免疫排斥反应有极为重要的作用,并为研究和开发 PEDF 滴眼液,使其成为抑制眼新生血管有效的药物提供新的思路。

作者介绍:步建平(1979-),女,硕士,
研究方向:眼表面疾病和角膜病(现在北京大兴区人民医院眼科工作)。
通讯作者:周善壁,男,主任医师,E-mail: zhoushanbi@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市卫生局资助项目(03-2-097)。

1 材料和方法

1.1 实验对象

清洁级成年雌性 SD 大鼠(受体)90 只,Wistar(供体)大鼠 30 只,体重 200~250 g,鼠龄 2~3 月(重庆医科大学实验动

物中心提供），实验期间由重庆医科大学附属第一医院实验动物中心饲养（饲养条件：清洁、通风、温度及湿度恒定、混合饲料单独笼养）。

1.2 主要实验材料

重组人 PEDF 购自武汉博士德生物工程有限公司，使用时由重庆医科大学附属第一医院药剂科配制成浓度为 10 nmol/L PEDF 滴眼液[1]，置 4℃冰箱保存备用。兔抗大鼠 PEDF 多克隆抗体与兔抗 VEGF 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 制作穿透性角膜移植模型

手术方法参照 Williams 和 Coster[2]方法。供体提供双眼角膜，受体均选择右眼手术。供体术前用 10%水合氯醛 3 ml/kg 腹腔内注射加眼局部 0.4%倍乐喜麻醉，并以 1%阿托品和 0.5%托品酰胺滴眼液散瞳，常规消毒，手术显微镜下无菌操作。先于供体角膜钻取直径为 3.5 mm 植片（弯维纳斯剪协助完成），置培养皿中（玻璃酸钠注射液保护）备用。于受体右眼，用直径为 3.25 mm 的环钻制受体植床（弯维纳斯剪协助完成），植床植片间用 10-0 无损伤缝线间断缝合 8 针；自体移植组用 3.5 mm环钻钻取植片后旋转约 180° 原位缝合 8 针。线结暴露不包埋，注射平衡液形成前房。术毕结膜囊内涂红霉素眼膏。术后不拆线。

1.4 实验动物分组及术后用药

60 只同种异体穿透性角膜移植的 SD 大鼠随机分成实验组、实验对照组各 30 只，30 只自体穿透性角膜移植的 SD 大鼠为空白对照组，未手术眼为正常对照。手术后空白对照组和实验对照组用托百士眼液加赋形剂滴眼液点眼，用药 1 周；实验组用托百士眼液加 10 nmol/L 的 PEDF 眼液点眼。3 次 /d，1~2 滴 / 次，用药至取标本。于术后 1、2、3、4、8 周 5 个时间点，每组随机处死 6 只动物。

1.5 角膜新生血管的动态定量分析

术后每天显微镜观察、照相并计算角膜新生血管面积（A），按 Robert 电脑数学模型公式：$A=C/12\times3.1416[r^2-(r-l)^2]$，其中 C 为角膜新生血管宽度的圆周钟点数，r 为角膜半径，l 为角膜新生血管长度，每次测量以长入角膜新生血管的垂直长度为准。

1.6 免疫组化染色及计算机图像分析

每组分别在手术后不同时间点（术后 1、2、3、4、8 周）随机抽取并处死 6 只大鼠，取其完整角膜（连角膜缘），一分为二，一半用 2.5%戊二醛溶液固定；一半置于 4%多聚甲醛溶液固定，常规石腊包埋，切片（5 μm）备用，采用 SABC 染色法。每个标本取 5 张切片，每张切片随机取 3 个视野（400 倍）做图像分析，计算 5 张切片的平均光密度，以此作为阳性细胞的平均光密度，用（$\bar{x}\pm s$）表示。

1.7 电镜标本的制作与观察

把经 2.5%戊二醛溶液固定的一半角膜片，再经 1%饿酸固定，乙醇梯度脱水，浸透，环氧树脂包埋，在超薄切片机下切成约 $1\times1\times1mm^3$ 切片后染色，将切片浸入醋酸双氧铀中，蒸馏水漂洗 3 次后浸于铅染液，透射电镜观察并照相。

1.8 统计学处理

计量资料以均数标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用成组设计两样本均数的 t 检验；所有数据均应用医学统计软件 SPSSl3.0 处理。$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 临床观察

所有大鼠中，有 5 只发生麻醉意外死亡，4 只术后发生前房出血，3 只发生白内障，2 只发生感染，以上大鼠被剔除，放弃继续观察，并及时补充实验动物。

2.2 角膜植片存活情况

实验组术后 7~43 d 出现免疫排斥反应，20~26 d 达高峰，实验对照组术后 6~23 d 出现免疫排斥反应，11~16 d 达高峰。由表 1 可见，实验组存活时间较实验对照组均明显延长（$P<0.01$）。空白对照组由于没有发生免疫排斥反应，故存活时间满观察期。结果表明，PEDF 对大鼠角膜移植免疫排斥反应具有明显免疫抑制作用，能显著延长角膜植片存活时间。

表 1 实验组和对照组大鼠角膜植片存活时间（$\bar{x}\pm s$，d）

组别	动物眼数	角膜植片存活时间（d）
实验对照组	30	11.1 ± 1.25*
空白对照组	30	25.2 ± 18.9*
实验组	30	22.2 ± 1.97*

注：* 两两比较，$P<0.01$

2.3 定量分析 CNV

实验对照组术后 4~6 d 出现新生血管，并很快进入植片周边，4 周时几乎所有术眼全角膜新生血管化。而实验组一般术后 6~8 d 出现，生长速度较慢，血管稀疏，4 周左右新生血管则开始退化。空白对照组术后 1 周出现新生血管，3 周血管开始萎缩，4 周时大部分已经萎缩。

2.4 VEGF 动态变化

VEGF 在大鼠完整的角膜上皮层、内皮层均有基本表达（见图 1）；在病变角膜 VEGF 主要表达于侵润的炎症细胞，在胞浆中染成棕黄色，着色的深浅表示阳性程度（见图 2~10）。

本实验结果显示术后 1 周 3 组均较未手术眼的 VEGF 表达升高，但无统计学意义（$P>0.05$）；术后



图 1　正常大鼠角膜 VEGF 免疫组化染色（上皮层内皮层有基本表达）SABC ×200

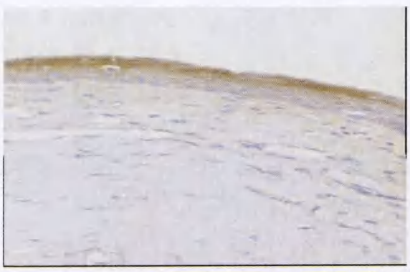


图 2　空白对照组术后 2 周 VEGF 免疫组化染色（胞浆无棕黄色染色）SABC ×200

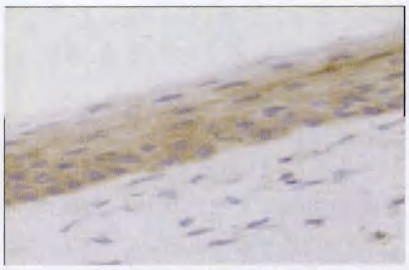


图 3　实验组术后 2 周 VEGF 免疫组化染色　SABC ×400

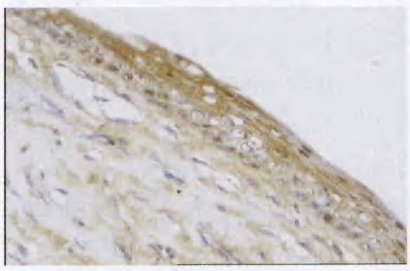


图 4 实验对照组术后 2 周 VEGF 免疫组化染色（侵润炎症细胞胞浆染成棕黄色）SABC ×400

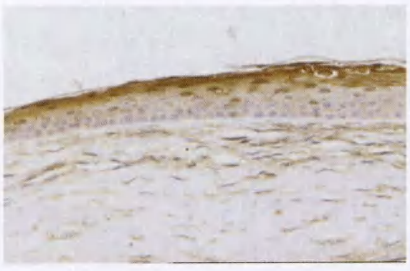


图 5　实验组术后 3 周 VEGF 免疫组化染色

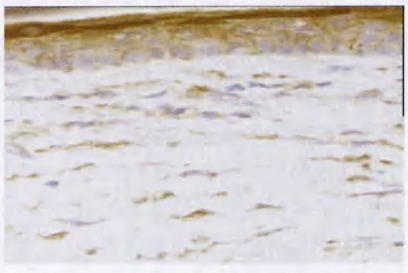


图 6　实验对照组术后 3 周 VEGF 免疫组化染色　SABC ×200

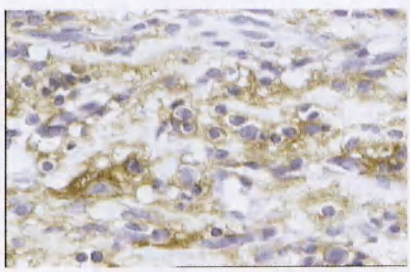


图 7 实验组术后 4 周 VEGF 免疫组化染色　SABC ×400

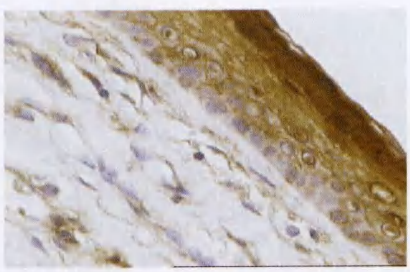


图 8　实验对照组术后 4 周 VEGF 免疫组化染色　SABC ×400



图 9　实验组术后 8 周 VEGF 免疫组化染色　SABC ×200

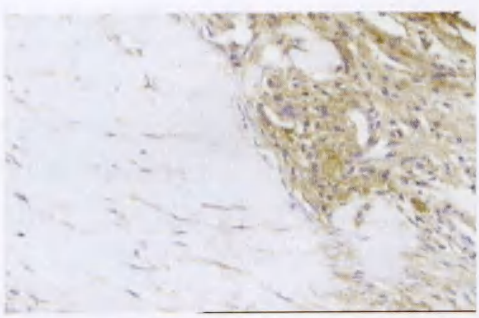


图 10　实验对照组术后 8 周 VEGF 免疫组化染色 SABC ×200

2 周各组 VEGF 光密度值进一步增高，实验对照组、空白对照组均较实验组表达高，且统计学有显著性差异（$P<0.01$），实验对照组、空白对照组之间无统计学差异（$P>0.05$）；术后 3 周实验对照组表达最强，光密度值达最高峰，与实验组和空白对照组比较统计学有显著性差异（$P<0.01$），空白对照组和实验组比较无统计学差异（$P>0.05$）；术后 4 周和 8 周各组光密度值均开始下降，但实验组和空白对照组下降较快，实验对照组下降较慢，实验对照组与实验组和空白对照组比较统计学有显著性差异（$P<0.01$），空白对照组和实验组比较无统计学差异（$P>0.05$）。结果显示，同种异体穿透性角膜移植术后实验对照组 VEGF 在 3 周时平均光密度值达高峰，随后逐渐下降，而局部应用 PEDF 可抑制 VEGF 的表达，高峰降低且持续时间缩短（见表 2）。

2.5　电镜改变

术后 1 周，实验对照组可见胞浆内线粒体增多和肿胀，实验组相对较轻（见图 11、12）；术后 2 周，实验对照组角膜正常细胞超微结构不明显，胶原微纤维平行排列规律性消失，实验组角膜上皮层良好，微纤维排列规则（见图 13、14）；术后 3 周，实验对照组见残留的内质网扩张及糖原堆积，微纤维排列不

规则；实验组则相对较少（见图 15、16）；术后 4 周，实验对照组可见新生血管内皮细胞幼稚、核大胞浆丰富；实验组内皮细胞变性（见图 17、18）；术后 8 周，实验对照组和实验组可见较少的炎性细胞，实验对照组胶原纤维排列紊乱，实验组排列较整齐（见图 19、20）。

表 2　术后不同阶段 VEGF 阳性平均光密度的变化（$\bar{x} \pm s$）

术后时间	实验对照组	空白对照组	实验组
未手术眼	0.166 ± 0.006	0.165 ± 0.015	0.167 ± 0.004
术后 1 周	0.248 ± 0.013	0.247 ± 0.021	0.246 ± 0.011
术后 2 周	0.338 ± 0.015*	0.336 ± 0.012*	0.278 ± 0.015
术后 3 周	0.469 ± 0.026*	0.301 ± 0.008*	0.316 ± 0.020
术后 4 周	0.318 ± 0.032	0.224 ± 0.014*	0.259 ± 0.023
术后 8 周	0.287 ± 0.037	0.187 ± 0.013*	0.201 ± 0.008

注：* 两两比较，$P<0.01$

3　讨　论

本实验免疫组化及 TEM 结果表明局部应用 PEDF 滴眼液可以降低穿透性角膜移植片组织中 VEGF 表达，延长大鼠穿透性角膜移植片存活时间。生理状态下，PEDF 和 VEGF 之间存在一种平衡，阻止新生血管形成。我们推测 PEDF 抑制血管生成可能机制是通过 Fas 和 FasL 介导的细胞凋亡起作用，它能辨别新形成的血管内皮细胞也是通过 Fas 与 FasL，就如同免疫系统通过凋亡的方式消除不需要的淋巴细胞那样[3]。

凋亡诱导基因 Fas 与 FasL(Fas ligand)，简称 Fas-FasL 系统，以其介导细胞凋亡的功能在多种病理生理的过程中发挥重要作用[4]。Fas 又名 Apo-1 及 CD95，系属于肿瘤坏死因子家族成员。FasL 为 Fas 抗原分

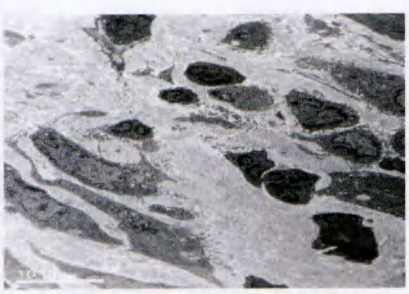


图 11 实验对照组术后 1 周，胞浆线粒体增多、肿胀（TEM×2000）

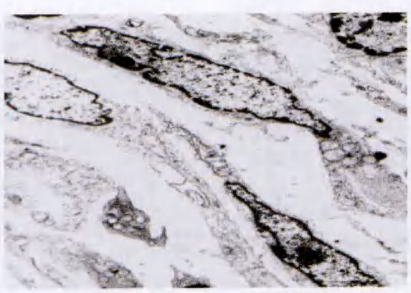


图 12　实验组术后 1 周，胞浆线粒体肿胀不明显（TEM×2 900）



图 13　实验对照组术后 2 周，血管充血明（TEM×8 000）



图 14 实验组术后 2 周，内皮细胞变性（TEM×4 000）

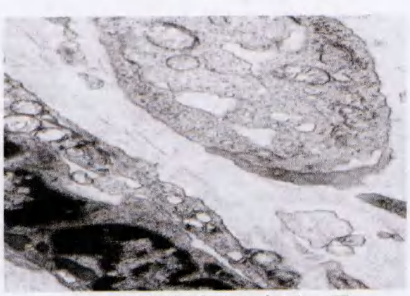


图 15　实验对照组术后 3 周（TEM×2 900）

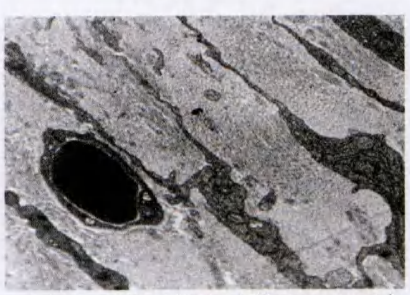


图 16　实验组术后 3 周（TEM×8 000）



图 17　实验对照组术后 4 周（TEM×8 000）

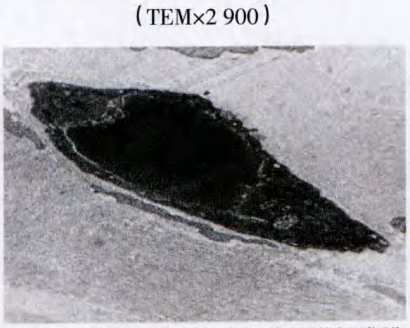


图 18　实验组术后 4 周，胶原微纤维排列整齐（TEM×6 000）



图 19　实验对照组术后 8 周，胶原微纤维排列紊乱（TEM×8 000）



图 20 实验组术后 8 周（TEM×2 900）

子配体，两者结合可诱导凋亡。Mori 等[5]研究结果也证实了这点，他们通过 PEDF 基因转移的腺病毒载体对光感受器上表达 VEGF 转基因小鼠建立的新生血管效应进行了研究，结果显示 PEDF 是通过促进新生血管内皮细胞凋亡而引起新生血管退化，从而达到抑制新生血管形成的作用。由 VEGF 等新生血管诱导剂所诱导产生的新生血管内皮细胞与正常内皮细胞不同，该内皮细胞膜上有较多 Fas 受体表达，易产生 PEDF 引起的凋亡反应。在正常角膜中 PEDF 含量较高，而 VEGF 含量较低；在新生血管化的角膜 PEDF 含量较低，而 VEGF 含量较高；有人研究人羊膜中 PEDF 表达情况，发现羊膜中含有较高浓度的 PEDF，人羊膜中的可溶性蛋白可抑制人脐静脉内皮细胞和牛视网膜毛细血管内皮细胞增殖，促进牛角膜上皮细胞增殖。

我们分析结果：实验对照组术后 1 周，PEDF 逐渐上调，但不如促血管因子如 VEGF 上升速度快，导致 CNV 显著发生，术后 2 周 PEDF 表达处于峰值促进新生血管内皮凋亡引起血管退化，而实验组术后给予外源性 PEDF 后其表达持续时间延长，这就为治疗角膜新生血管提供了一个可能方向。结果显示，同种异体穿透性角膜移植术后实验对照组 VEGF 在 3 周时平均光密度值达高峰，随后逐渐下降，而局部应用 PEDF 可抑制 VEGF 的表达，高峰降低且持续时间缩短。

通过本实验的研究结果显示在角膜穿透性移植术后局部应用外源 PEDF 后角膜 VEGF 表达降低。该研究结果也提示可通过外源性应用 PEDF 达到补充内源性 PEDF 不足的目的，外源性 PEDF 可抑制角膜新生血管的增生；PEDF 抑制穿透性角膜移植引起的角膜炎性反应，使 VEGF 的表达减低。

3.4 外源性应用 PEDF 补充 PEDF 的意义

CNV 是导致角膜移植术后发生免疫排斥反应的最重要因素之一，正常情况下角膜之所以无血管，PEDF 这种抗血管物质起了很大作用，它是目前最有效的血管增生抑制剂之一[6]，成为治疗血管增生性疾病的候选药物。现在用于治疗年龄相关性黄斑变性中的新生血管形成已经进入期临床试验[7]，但用于角膜新生血管的研究还未开展。我们的研究结果也证实了这一点，而且外源性的局部应用 PEDF 可以补充内源性的不足，降低新生血管化的水平，有抑制角膜纤维增殖和新生血管增生作用，为角膜新生血管性疾病提供新的简便的潜在治疗方法，将为PEDF 在角膜移植术中的应用提供理论依据，对该领域的深入研究具有非常大的临床指导意义。但是对治疗是否有剂量依赖性以及长期应用的效果尚在进一步探讨中。

参 考 文 献

[1] 王巧玲，周善璧，陈 曦，等. PEDF 抑制大鼠角膜移植术后新生血管作用的实验研究[J]. 重庆医科大学学报，2006，31(1)：31-34.

[2] Williams K A,Coster D J. Penetrating corneal transplantation in the inbred rat: a new model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci，1985，26(1)：23-30.

[3] Volpert O V,Zaichuk T,Zhou W,et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor[J]. Nat Med，2002，8(4)：349-357.

[4] Song J H,Bellail A,Tse M C,et al. Human astrocytes are resistant to Fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptsis-inducing ligand-Induced apoptosis[J]. J Neurosci，2006，26(12)：3299-3308.

[5] Mori K,Gehlbach P,Ando A,et al. Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium-derived factor[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci，2002，43(7)：2428-2434.

[6] Ogata N,Tombran-Tink J,Nishikawa M,et al. Pigment epithelium-derived factor in the vitreous is low in diabetic retinopathy and high in rhegmatogenous retinal detachment[J]. Am J Ophthalmol，2001，132(3)：378-382.

[7] Rasmussen H,Chu K W,Campochiaro P,et al. Clinical protocol. An open-label,phase1,singleadministration,dose-escalationstudyofADGVPEDF. 11D(ADPEDF) in neovascular age-related macular degeneration (AMD)[J]. Hum Gene Ther，2001，12(16)：2029-2032.

（责任编辑：冉明会）