维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)01-0031-04

PEDF抑制大鼠角膜移植术后新生血管作用的实验研究

王巧玲,周善璧,陈 曦,张盟辉

(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)滴眼液抑制角膜移植术后角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)的作用及其可能机制。方法:建立大鼠同种异体间穿透性角膜移植模型,术后把72只大鼠随机平均分为实验组(10nM的PEDF眼液)和对照组(赋形剂滴眼液)。对术眼角膜用裂隙灯显微镜观察和照相,定量分析角膜新生血管面积,术后1w,2w,3w,1月,2月,3月,每个组随机处死6只动物,取其角膜标本进行免疫组化染色和透射电镜观察。结果:实验组角膜新生血管面积较对照组在术后1w,2w,3w,1月,2月显著减少($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:局部应用PEDF滴眼液可以抑制角膜移植术后角膜新生血管生长。

【关键词】色素上皮细胞衍生因子;角膜移植;角膜新生血管

【中国图书分类法分类号】R772 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-07-04

Experimental study on inhibitory effects of PEDF on rat corneal neovascularization after penetrating keratoplasty

WANG Qiaoling, et al

(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objectve*: To evaluate the effects of pigment epithelium derived factor(PEDF) eyedrops in inhibiting corneal neovascularization (CNV) by topical installition on the rat model undergoing penetrating keratoplasty and to investigate its possible mechanism and its clinical significance. *Methods*: Penetrating karatoplasty were proformed orthotopically from Wistar rats to SD rat' recipients. 72 SD rats were randomly assigned to two groups-experimental group and control group, after transplantation. Experimental group was treated with PEDF eyedrops and control group was treated with escipient eyedrops. CNV was observed by the slitlamp biomicroscope examination. The area of CNV was caculated quantitatively. 6 animals in both groups were killed respectively at the 1st week, 2nd week, 3rd week, 1st month, 2nd month and 3rd month postoperatively. PEDF expression was examined by immunohistochemistry and corneal untrastructural morphology was observed by TEM. *Results*: The area of CNV was decreased at 1 week, 2 weeks, 3 weeks, 1 month and 2 months postaperatively ($P<0.01$ or $P<0.05$). Significantly increased PEDF expression was also observed in the experimental group by immunohistochemistry staining, as compared with the control group. *Conclusion*: Topical application of PEDF eye drop can prevent vascular growth of corneal allografts.

【Key words】Pigment epithelium derived factor; Penetrating keratoplasty; Corneal neovascularization

近年来研究表明,PEDF具有高效广谱的抗新生血管诱导因子作用,被视为最有效的细胞内新生血管抑制因子之一[1]。我们建立大鼠穿透性角膜移植(penetrating karatoplasty, PKP)动物模型,研究局部应用PEDF对角膜移植术后CNV的抑制作用。从而为临床角膜移植术后治疗新生血管和免疫排斥反应的防治提供新的思路和依据。

作者介绍:王巧玲(1978-),女,住院医师,硕士生,主要研究方向:角膜病及眼表疾病。

基金项目:重庆市卫生局项目(编号:03-2-097)。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康清洁级SD大鼠72只为受体,Wistar大鼠36只为供体。供受体均为雌性,体重200~250g,鼠龄2~3个月。受体动物右眼接受角膜移植,供体双眼取材后处死。实验动物购自第三军医大学大坪医院动物中心。

1.2 主要试剂

重组人PEDF购自美国CHEMICON公司,使用时由重庆医科大学附属第一医院药剂科配制为浓度为10nmol/L的

维普资讯 http://www.cqvip.com

PEDF眼液。山羊抗大鼠 PEDF 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。托百士眼液由爱尔康医药有限公司提供。

1.3 手术方法

手术方法参照 Williams 和 Coster 方法[2]。供体提供双眼角膜,受体均选择右眼手术。供体、受体术前 20min 以 1%阿托品滴眼液和 0.5%托品酰胺滴眼液散瞳,10%水合氯醛 3ml/kg 腹腔内注射麻醉加眼局部 0.4%倍乐喜表面麻醉后,术前消毒,常规无菌操作,在手术显微镜下进行。首先于供体角膜钻取直径为 3.5mm 植片,置于培养皿中并用粘弹剂保护植片备用。于受体右眼,用直径为 3.0mm 的环钻钻受体植床,植床植片间用 10/0 无损伤缝线作间断缝合 8 针。线结暴露不包埋。然后前房注射平衡液以形成前房。术毕散瞳,结膜下注射庆大霉素 0.1ml,结膜囊内涂红霉素眼膏。5/0 丝线缝合睑缘 1 针,并于术后第 1 天拆除。术后不拆线。

1.4 实验动物分组及术后用药

72 只术后的 SD 大鼠随机分成对照组和实验组 2 组,每组 36 只。手术后 1w,2w,3w,1 月,2 月,3 月,每个组随机处死 6 只动物。手术后对照组和实验组均用托百士眼液,4 次 / 天,2 滴 / 次,用药 1w;对照组用赋形剂滴眼液,实验组用 10nmol/l 的 PEDF 眼液滴眼,4 次 / 天,2 滴 / 次,用药至取标本。

1.5 定量分析 CNV

术后每天用裂隙灯显微镜观察、照相。并计算角膜新生血管面积 (A),按 Robert 电脑数学模型公式:$A = C/12 \times 3.1416[r^2 - (r-1)^2]$,其中 C 为角膜新生血管网宽度的圆周钟点数,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[3]。

1.6 免疫组化染色及图像分析检测

每组各时间段随机抽取并处死 6 只动物,取其完整角膜(连角膜缘),置于 4%多聚甲醛溶液固定,常规石腊包埋,切成 5μm 切片。采用 SABC 法染色。免疫组化计算机图像分析由重庆医科大学超微病理计算机分析中心提供。方法如下:每组取 5 张切片,每张切片随机取 3~5 个视野(400 倍)做图像分析,计算 5 张切片的平均光密度,以此作为此组的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

分别将角膜移植术后 1w、2w、3w、1 月、2 月、3 月的实验组和对照组的大鼠角膜随机取 2 只,把每个角膜片的一半(另一半 4%多聚甲醛溶液固定,常规石腊包埋备用)切成 1mm × 1mm × 1mm 大小,立即放入 2.5%戊二醛溶液固定送检,再经 1%的锇酸固定,乙醇梯度脱水,浸透,环氧树脂包埋,在超薄切片机下切片后染色,将切片浸入醋酸双氧铀中,蒸馏水漂洗三次后浸泡于铅染液,透射电镜下观察并照相。

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。$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 CNV 生长动态观察

对照组新生血管一般术后 4~6 天出现,并很快进入植片周边,1 个月时所有鼠眼全角膜新生血管。而实验组一般术后 6~8 天出现,生长速度较慢,血管稀疏,1 个月左右部分新生血管则开始退化。

2.2 定量分析 CNV

对照组和实验组在术后 1w、2w、3w、1 月及 2 月时,新生血管面积比较,经统计学分析差异有高度显著性($P<0.01$ 或 $P<0.05$);但 3 月时差异无显著性,这是新生血管退化的结果(见表 1)。

表 1 角膜移植术后各组新生血管生长面积($\bar{x}\pm s$,mm²)

术后天数	对照组	实验组	P
1w	11.213 ± 0.446	6.029 ± 0.312	< 0.01
2w	31.521 ± 0.986	13.014 ± 0.441	< 0.01
3w	35.462 ± 0.598	20.125 ± 0.798	< 0.01
1月	38.484 ± 1.023	23.765 ± 0.498	< 0.01
2月	21.815 ± 0.812	15.687 ± 0.668	< 0.05
3月	13.292 ± 0.623	10.534 ± 0.521	> 0.05

2.3 角膜 PEDF 表达水平

PEDF 在大鼠正常角膜的角膜上皮、内皮都有表达,基质层染色为阴性。术后不同时期上皮与内皮表达均呈阳性,基质层浸润的炎性细胞胞浆和部分新生血管内皮细胞也有表达。术后早期对照组和实验组表达均呈增强趋势,但两组对比没有明显的统计学差异($P>0.05$),在约 3w 时对照组表达开始呈下降趋势,实验组保持较强表达一段时间后也开始下降。在 2w、3w、1 月及 2 月实验组 PEDF 的表达高于对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);3 个月时,两组 PEDF 表达差别无明显统计学差异(详见表 2)。结果显示,角膜移植早期 PEDF 表达可呈一定程度增强趋势,随后呈下降趋势。

2.4 角膜超微结构的改变

术后 1 周时,对照组可见小的新生血管及大量的中性粒细胞及淋巴细胞等浸润,实验组也可见较小的新生血管及相对少量的炎细胞浸润;术后 2w 时,对照组角膜上皮细胞增生,基质中可见大量的

维普资讯 http://www.cqvip.com

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

术后时间	对照组	实验组	$P^{\blacktriangle}$
0	0.179 ± 0.007	0.176 ± 0.008	> 0.05
1w	0.226 ± 0.011*	0.231 ± 0.013*	> 0.05
2w	0.288 ± 0.021**	0.342 ± 0.025**	< 0.05
3w	0.306 ± 0.019**	0.386 ± 0.029**	< 0.05
1月	0.277 ± 0.020**	0.402 ± 0.032**	< 0.01
2月	0.211 ± 0.033*	0.303 ± 0.041**	< 0.01
3月	0.182 ± 0.009	0.194 ± 0.022	> 0.05

注：与术日比较 *P<0.05 **P<0.01 $P^{\blacktriangle}$实验组与对照组比较

淋巴细胞浸润及新生血管内皮完整、充血，实验组可见角膜上皮细胞正常，基质中仅有少量淋巴细胞浸润，新生血管充血不明显（见图 1、2）；术后 3 周时，对照组新生血管充血明显、大量的淋巴细胞浸润、基质中大量成纤维细胞增生、板层细胞排列不规则，实验组相对少量的淋巴细胞浸润和成纤维细胞增生；术后 1 月时，对照组可见新生血管内皮细胞幼稚、核大、胞浆丰富和部分标本可见基质崩解，实验组角膜新生血管内皮细胞变性、炎症反应减轻（见图 3、4）。在术后 2 月和 3 月时，两组可见较少的淋巴细胞浸润，对照组胶原纤维排列紊乱但实验组胶原纤维整齐（图 5、6）。结果表明，PEDF 可减轻炎症反应，抑制新生血管生成。



图 1 对照组术后 2w TEM×2900
新生血管内皮细胞幼稚、核大、胞浆丰富、血管充血

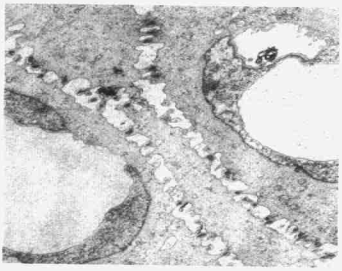


图 2 实验组术后 2w TEM×4200
新生血管内皮细胞髓样体样结构，血管充血不明显



图 3 对照组术后 1 月 TEM×2100
新生血管内皮细胞幼稚、核大、胞浆丰富、血管充血

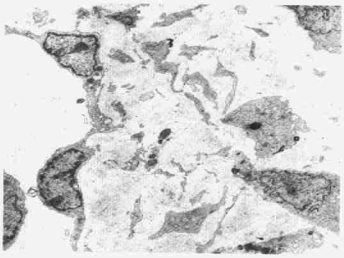


图 4 实验组术后 1 月 TEM×1850
新生血管内皮细胞变性，血管无充血

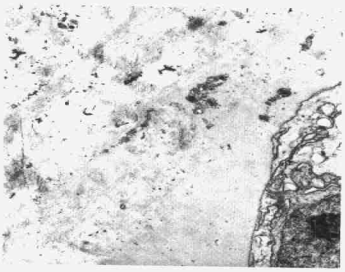


图 5 对照组术后 3 月 TEM×4200
基质胶原纤维排列紊乱

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 6 实验组术后 3 月 TEM×2100
基质胶原纤维较整齐

3 讨 论

本实验 CNV 定量分析及 TEM 结果表明,PEDF 能显著的抑制大鼠穿透性角膜移植术后新生血管的生成。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的。Mori 等[4]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 的转基因小鼠的已经建立的新生血管的效应进行了研究。结果显示 PEDF 是通过促进新生血管内皮细胞的凋亡而引起新生血管的退化,从而达到抑制新生血管形成的作用。

Fas 是肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族成员,是一个跨膜受体,可与跨膜蛋白 FasL 结合,激活 caspase 依赖的凋亡联级反应[5],从而导致细胞凋亡。研究表明,PEDF 能诱导内皮细胞 Fas 的表达,但 PEDF 起作用需依赖两个因素:(1) 内皮细胞上必须有 Fas 受体的表达;(2)细胞内表达生存信号的蛋白如:Bcl-2、survivin 的局部浓度不能过高,不足以对抗 Fas 诱导的凋亡反应。即新生血管的生长或消退取决于 PEDF 激发的 Fas-FasL 活化所产生的凋亡信号与新生血管诱导剂所产生的抗凋亡信号之间的力量对比[6]。因此,本实验免疫组化染色 PEDF 在术后早期对照组和实验组表达虽均呈增强趋势,但 VEGF 等促新生血管生成的作用还是高于 PEDF 抑制生成的作用,故朝新生血管生成方向发展,当抑制因素起主要作用时新生血管则向萎缩方向发展。实验组保持较强表达一段时间后也开始下降。在术后 2w、3w、1 月、2 月时,实验组 PEDF 的表达高于对照组,因而实验组抑制新生血管生成作用较强,CNV 也低于对照组。

总之,PEDF 能有效的降低角膜移植术后新生血管生成的作用,但对于其治疗的最佳剂量、浓度、长期应用的毒副作用本课题将进一步研究,对其作用的具体机理还需进一步的探讨。

参 考 文 献

[1] Karakousis PC, John SK, Behling KC, et al. Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues [J]. Mol Vis, 2001;7: 154-163.

[2] Williams KA, Coster DJ. Penetrating corneal transplantation in the inbed ratza new model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985; 26(1):23-30.

[3] 高晓晖,楼月芳,奚寿增,等.软骨源抑制因子抑制角膜新生血管的实验研究[J].中华眼科杂志,1999;35(1):22-24.

[4] 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.

[5] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor[J]. Science, 1995; 267(5203):1449-1456.

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

(上接第 30 页)

Independent of Metalloproteinase Inhibition[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002;43(18): 2753-2761.

[6] 甘 霖,李生伟,龚建平,等.同系与异系移植 MMPS、TIMPS 表达的比较实验研究[J].中国现代普通外科进展,2005; 8(4):209-211.

[7] 彭东涛,苟 欣,何梓铭.膀胱癌组织中 MMP9、MMP2 与 PCNA 及临床指标的研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2003;28 (4):467-469.

[8] Bond M, Murphy G, Bennett MR, et al. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Induces a Fas-associated Death Domain-dependent Type II Apoptotic Pathway[J]. Biol. Chem, 2002; 277(3):13787-13795.

[9] 李生伟,甘 霖,龚建平,等. TIMP-3 质粒-脂质复合体防止慢性排斥移植物动脉硬化的实验研究 [J]. 中国现代普通外科进展, 2005;8(3): 164-168.