

翼状胬肉中血管内皮生长因子、内皮抑素的表达以及新生血管生成情况

彭 畅¹ 蒋正轩² 梁 坤² 陶黎明²

摘要 目的 通过研究翼状胬肉组织中新生血管数量、促进血管生成因子以及抑制血管生长因子的表达情况,探讨翼状胬肉组织中促进血管形成和抑制血管生成的情况。方法 手术获得正常的球结膜组织 35 例(对照组)及翼状胬肉组织 40 例(实验组),用免疫组化及 Western blot 的方法分别检测两组样本中新生血管密度(MVD)、血管内皮生长因子(VEGF)、内皮抑素(Endostatin)的表达情况。其中,CD31 是标记组织 MVD 的指标。结果 ① 免疫组化法结果显示:在翼状胬肉组织中 MVD 的含量明显高于正常球结膜组织;VEGF 在正常球结膜组织中仅有少量阳性表达,在翼状胬肉组织中阳性细胞明显增多,着色显著加深;翼状胬肉组织中上皮细胞基底细胞层中的 Endostatin 抗原阳性表达则明显少于正常球结膜组织。② Western blot 结果显示人正常球结膜与翼状胬肉中 VEGF 及 Endostatin 蛋白表达存在差异。翼状胬肉组织中 VEGF 蛋白/ β -actin (1.46 ± 0.59) 显著高于正常球结膜组/ β -actin (0.46 ± 0.45),差异有统计学意义 ($P < 0.05$);翼状胬肉组织中 Endostatin 蛋白/ β -actin (0.58 ± 0.11) 显著低于正常球结膜组/ β -actin (1.54 ± 0.12),差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 在翼状胬肉中发现其 MVD 及促血管生长因子的表达高于正常球结膜组织,而血管抑制因子的表达含量降低,这一血管平衡的打破可能是翼状胬肉的发病基础之一。

关键词 翼状胬肉;血管平衡;血管内皮生长因子;内皮抑素
中图分类号 R 777.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0645-04

翼状胬肉是我国常见眼表疾病之一,为睑裂部球结膜与角膜上的一种赘生组织,其侵犯角膜后日渐增大,甚至覆盖瞳孔区。该病不仅严重影响患者的外观,还可因其牵拉角膜作用而引起眼部不适及角膜散光,同时可不同程度地影响眼球运动,严重影响视力及视觉质量^[1]。目前,翼状胬肉的发病机制

尚不完全清楚。既往观点认为翼状胬肉是一种增生性、变性疾病。最近的研究^[2]表明,翼状胬肉主要表现为纤维血管组织的大量增生,且侵袭力较强,破坏了角膜缘的结构,并侵入角膜内呈进行性生长。因此,在翼状胬肉发病过程中,新生血管在其中发挥了重要的作用,抑制血管生长因子和促进血管生长因子之间的平衡打破可能是该病的主要原因之一。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是重要的血管生成素之一,而内皮抑素(Endostatin)在体外实验中被认为是具有抑制血管内皮细胞增生作用的因子^[3]。然而,这种具有血管内皮抑制剂作用的因子尚未在翼状胬肉中组织中被证实。该研究利用免疫组化及 Western blot 的方法检测翼状胬肉及正常的球结膜组织中血管相关因子及新生血管的表达差异,从而进一步探索血管相关性因素在翼状胬肉发病机制中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 标本 手术获得 40 例(男 19 例,女 21 例)翼状胬肉组织,患者平均年龄 53.2 岁;正常球结膜取自患有白内障和(或)斜视疾病,而无翼状胬肉的患者 35 例(男 13 例,女 12 例),平均年龄 65.4 岁。术前裂隙灯检查排除所有的参与者其他角膜膜性疾病,手术过程中排除由局麻药、药物或化学因素引起的的影响。研究经安徽医科大学伦理委员会批准,所有参加本研究的翼状胬肉患者和对照组患者均在知情同意的前提下签署相应知情同意书。

1.2 试剂 鼠抗 VEGF、兔抗 CD31 多克隆抗体、二步法免疫组化检测试剂、DAB 试剂盒、 β -actin 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗血管 Endostatin 多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;VEGF 一抗购自美国 SANTA CRUZ 公司;Endostatin 一抗购自武汉美国 Bioworld Technology 公司;二抗购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样本分组 40 例翼状胬肉标本作为实验组,35 例正常球结膜组织作为对照组,两组均采用 Western blot 法及免疫组化法检测相关蛋白。

2014-02-17 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:1208085MH178);安徽省高校自然科学基金重点项目(编号:KJ2013A147);安徽医科大学校基金(编号:2013xkj024)

作者单位:¹安徽医科大学研究生学院,合肥 230032

²安徽医科大学第二附属医院眼科,合肥 230601

作者简介:彭 畅,女,硕士研究生;

陶黎明,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:Taolingmingchina@126.com

1.3.2 病理学检查 翼状胬肉及正常球结膜组织用10%的甲醛溶液固定,石蜡包埋,分别做常规组织切片,HE染色,镜下观察并比较各组织的病理状况。

1.3.3 免疫组化检测 VEGF、Endostatin 及 CD31 蛋白表达 翼状胬肉及正常球结膜组织分别用10%的甲醛溶液固定,石蜡包埋,标记后切片。采用二步法染色,主要步骤如下:常规脱蜡,水化组织切片;3%过氧化氢去离子水孵育5min,以阻断内源性过氧化物酶,PBS冲洗;滴加一抗4℃过夜,PBS冲洗2min,共3次;滴加通用型IgG抗体-HRP多聚体,37℃孵育20min,PBS冲洗2min,共3次;DAB显色,苏木精复染,封片观察。在光学显微镜下进行染色参数分析,量化蛋白表达并做统计。

1.3.4 Western blot 法检测 VEGF、Endostatin 蛋白表达 每组分别取约100mg组织,加入裂解液(1ml组织细胞裂解液+10μlPMSF),剪碎并研磨组织,冰上操作,持续30min,将组织研磨成匀浆。吸取组织匀浆于事先标记好的EP管中,4℃下12000r/min离心40min,取上清液进行蛋白定量。每组取50mg匀浆蛋白,加入10%或12%SDS上样缓冲液,加热后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后用5%的脱脂奶粉室温封闭30min,并分别用VEGF(1:200)或Endostatin(1:250)多克隆抗体室温孵育1h,ECL显色,扫描分析两组蛋白质表达相对含量。

1.4 统计学处理 采用SPSS 13.0统计软件进行分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示;定量资料用双侧t检验,计数资料用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 人正常球结膜与翼状胬肉组织病理学变化

HE染色显示:对照组表层上皮细胞排列整齐,基底上皮细胞边界清晰,间质少量血管;实验组上皮层增厚,表层上皮细胞排列紊乱,细胞体积增大,基底上皮边界模糊,间质中大量新生血管。见图1。

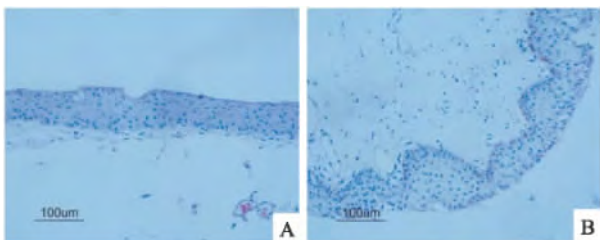


图1 人正常球结膜与翼状胬肉组织病理学观察 HE×200
A:正常球结膜组织;B:翼状胬肉组织

2.2 人正常球结膜与翼状胬肉中 VEGF、Endostatin 及 CD31 的表达差异 免疫组化结果显示:VEGF 抗原阳性表达主要位于上皮细胞基底及血管内皮细胞之中,呈棕黄色分布。正常球结膜组织中仅有少量阳性表达,几乎不可见。实验组阳性细胞明显增多,着色显著加深。见图2 A1、A2。而翼状胬肉组织中上皮细胞基底细胞层中的 Endostatin 抗原阳性表达则明显少于正常球结膜组织。见图2 B1、B2。在实验组中由 CD31 标记的新生血管为 21.19 ± 4.13 ,而对对照组为 15.12 ± 2.99 ,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图2 C1、C2。

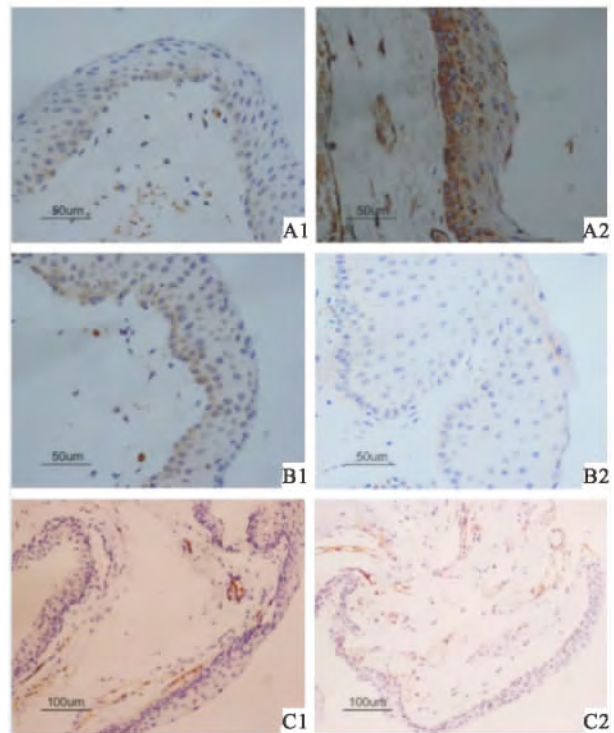


图2 人正常球结膜与翼状胬肉中 VEGF、Endostatin 及 CD31 的表达
A: VEGF 的表达×400;B:Endostatin 的表达×400;C: CD31 的表达×200;1:对照组;2:实验组

2.3 人正常球结膜与翼状胬肉中 VEGF 及 Endostatin 蛋白表达变化

Western blot 结果显示:实验组 VEGF 蛋白(1.46 ± 0.59)显著高于对照组(0.46 ± 0.45),差异有统计学意义($F = 6.554.72, P < 0.05$)。实验组 Endostatin 蛋白(0.58 ± 0.11)显著低于对照组(1.54 ± 0.12),差异有统计学意义($F = 6.352.37, P < 0.05$)。见图3。

3 讨论

翼状胬肉是眼科常见的慢性炎症性病变,被认为是一种因角膜缘干细胞受损,病变的结膜组织不

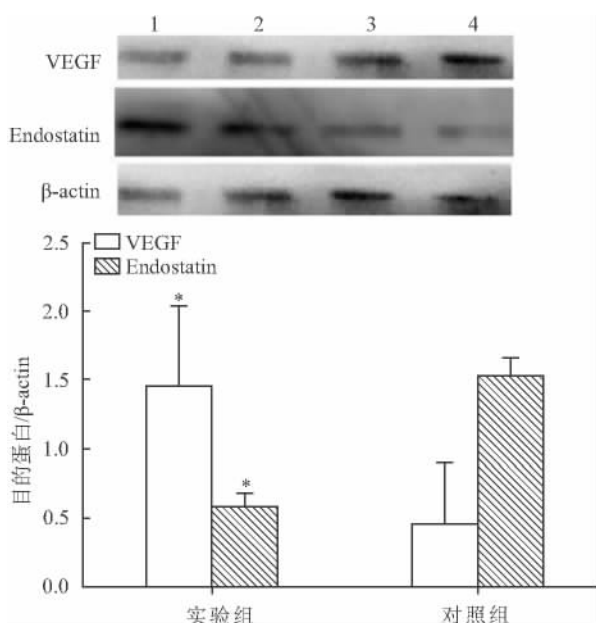


图3 正常球结膜与翼状胬肉中 VEGF 及 Endostatin 蛋白的表达

1,2:对照组;3,4:实验组;与对照组同一蛋白比较:* $P < 0.05$

断生长,最终侵入角膜,其主要表现为慢性充血及向结膜浸润性生长。目前临床主要治疗方式为翼状胬肉切除术,术后复发率较高^[4]。目前研究^[5]显示,新生血管在翼状胬肉中发挥重要作用,翼状胬肉中大量 VEGF 及新生血管的表达表明新生血管的发生是翼状胬肉形成的重要机制。另一方面,具有抑制血管内皮细胞增生作用的因子,如 Endostatin 蛋白的表达却很少在翼状胬肉组织及正常球结膜组织之间做比较,因此该研究进一步验证血管平衡的改变在翼状胬肉发病机制中发挥的作用。

本研究通过临床手术获得翼状胬肉及正常球结膜组织,分为实验组及对照组。HE 染色显示,与对照组相比,实验组上皮层增厚,上皮细胞排列紊乱,细胞体积有增大趋势,上皮基部呈不规则样改变,组织间质中新生血管数量增加。这些病理改变可能与翼状胬肉发病中增殖与凋亡的平衡被打破有关^[6];但增殖及凋亡因素不能完全解释该病的发生。随后的研究^[4]显示,翼状胬肉组织中血管的异常表达可能是该病的重要发生机制之一。在新生血管的发生过程中,有两种因素参与其中。一方面,组织中促进血管生长因子的增加有关,如 VEGF^[7]、成纤维细胞生长因子^[8]等,其中来源于角膜成纤维细胞的 VEGF,能够促进组织毛细血管群的形成,目前被认为是新生血管生成的最重要的生长因子之一^[9]。另一方面,Endostatin 作为胶原 X、VIII 的羧基末端片段,是目前发现的一种强有力的血管抑制因

子,能特异性抑制血管内皮细胞增生,从而抑制血管新生。其表达情况存在于正常的皮肤组织中,而较少存在于血管丰富的异常组织中^[10]。而在人类正常球结膜组织中及翼状胬肉组织中,这一蛋白从未被检测。

免疫组化法结果显示对照组球结膜组织上皮细胞及血管间质细胞中 VEGF 表达较少,胞质淡染,而上皮基底细胞中 Endostatin 着色显著加深,阳性表达明显高于实验组。然而,人类翼状胬肉组织上皮细胞及血管内皮细胞中 VEGF 着色较深,而表达 Endostatin 蛋白的细胞数较少,且胞质色淡。这一结果表明,翼状胬肉中的血管平衡被打破,导致血管大量增生,最终引起疾病。Western blot 结果均与上述一致,进一步证实了这一结论。此外,实验组与对照组中 MVD 的表达同样存在差异,表明可能由于血管平衡被打破,促进血管增加的因子增多,而抑制血管增加的因子减少,导致翼状胬肉中新生血管数量明显提高。因此,翼状胬肉可能是由于血管失衡—VEGF 表达增加,而 Endostatin 表达降低,最终导致了翼状胬肉的发生。这一结果将为抗血管治疗人类翼状胬肉这一眼表常见疾病提供了新的理论依据。

参考文献

- [1] 李淑琳. 翼状胬肉发病机制的研究进展[J]. 眼科研究, 2009, 27(3): 248-52.
- [2] Bradley J C, Yang W, Bradley R H, et al. The science of pterygia [J]. Br J Ophthalmol, 2010, 94(7): 815-20.
- [3] Bai Y J, Huang L Z, Zhou A Y, et al. Antiangiogenesis effects of endostatin in retinal neovascularization [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2013, 29(7): 619-26.
- [4] 宋寅伟. 翼状胬肉新生血管形成机制及其治疗的研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(2): 172-5.
- [5] Todani A, Melki S A. Pterygium: current concepts in pathogenesis and treatment [J]. Int Ophthalmol Clin, 2009, 49(1): 21-30.
- [6] Liang K, Jiang Z, Ding B Q, et al. Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in pterygia and normal conjunctiva [J]. Mol Vis, 2011, 17: 1687-93.
- [7] 周舟, 李瑞庄, 庞燕华, 等. SDF-1 与 VEGF 在翼状胬肉中的表达及意义[J]. 山东医学, 2011, 32(9): 1154-7.
- [8] 桑爱民, 陆宏. 翼状胬肉 bFGF TNF- α p53 表达的研究[J]. 中国实用眼科杂志, 2010, 28(10): 1136-9.
- [9] Liang K, Jiang Z, Zhao B, et al. The expression of vascular endothelial growth factor in mast cells promotes the neovascularisation of human pterygia [J]. Br J Ophthalmol, 2012, 96(9): 1246-51.
- [10] Mogili N S, Krishnaswamy V R, Jayaraman M, et al. Altered angiogenic balance in keloids: a key to therapeutic intervention [J]. Transl Res, 2012, 159(3): 182-9.

重度溃疡性结肠炎糖皮质激素治疗反应及其影响因素分析

刘敏纹 韩 玮 梅 俏 刘晓昌 胡 静 许建明

摘要 目的 分析重度溃疡性结肠炎(SUC)糖皮质激素治疗反应及其可能的影响因素。方法 收集113例SUC患者的病例资料,根据SUC患者对糖皮质激素治疗的反应,将患者分为完全缓解组、部分缓解组和无效组。比较3组患者一般资料、病变部位、临床表现、实验室检查结果、内镜形态学特征及治疗转归,分析SUC糖皮质激素治疗反应及其可能的影响因素。结果 在113例SUC患者中,85%(96/113)的患者使用静脉糖皮质激素治疗,治疗第5~7天进行评估,完全缓解组、部分缓解组及无效组各占32.3%、26.0%、41.7%。部分缓解组和无效组患者一部分可通过延长糖皮质激素治疗的时间获得缓解,但转换治疗和手术风险增加。与完全缓解组比较,部分缓解组入院时腹泻次数 ≥ 10 次/d、既往有重症发作、激素治疗第3天仍有明显血便所占比例较高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。无效组入院时腹泻次数 ≥ 10 次/d、既往有重症发作、治疗第3天大便次数 > 6 次、激素治疗第3天仍有明显血便、严重低蛋白血症(< 25 g/L)

所占比例及激素治疗前3d大便次数明显高于完全缓解组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与完全缓解组比较,部分缓解组及无效组内镜下严重病变发生率高,其中深凿样溃疡所占比例差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 部分缓解组和无效组患者部分可通过延长糖皮质激素治疗时间获得缓解,但将增加转换治疗和手术风险;结合临床、实验室、内镜形态学指标,可早期预测静脉糖皮质激素治疗反应。

关键词 溃疡性结肠炎;糖皮质激素类;疗效;内镜

中图分类号 R 574.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0648-05

重度溃疡性结肠炎(severe ulcerative colitis, SUC)起病急,病情重,进展快,常常需要糖皮质激素诱导缓解,但仍有15%~57%的患者达不到临床缓解^[1]。如何评估SUC患者病情严重程度并预测糖皮质激素治疗效果是临床实践关注的问题,但有关临床研究报道较少。该研究拟总结分析安徽医科大学第一附属医院113例SUC患者临床、实验室、内镜形态学特征及治疗转归,分析糖皮质激素治疗反应及可能的影响因素。

2013-12-10 接收

作者单位:安徽医科大学第一附属医院消化内科,合肥 230022

作者简介:刘敏纹,女,硕士研究生;

许建明,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-

mail: xujm1017@163.com

Expressions of vascular endothelial growth factor, endostatin and microvessel density in pterygia tissues

Peng Chang¹, Jiang Zhengxuan², Liang Kun², et al

(¹Dept of Graduate School, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the angiogenic imbalance in pterygium tissues of Chinese patients. **Methods**

Forty pterygia and thirty-five normal bulbar conjunctivas were obtained. Proangiogenic and antiangiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and endostatin were tested by immunohistochemical and western-blot. And microvessel density (MVD) was evaluated with immunoassaying for CD31. **Results** Our study revealed that the positive rate of VEGF significantly increased in the pterygium samples compared to the normal conjunctiva samples. Immunohistochemical staining of pterygium tissues indicated less intense staining of endostatin in pterygium comparing normal bulbar conjunctivas. And microvessel density was higher in the pterygium tissues than normal conjunctiva. **Conclusion** The finding of high levels of proangiogenic factors and low levels of antiangiogenic factors in pterygia confirm that both proangiogenic and antiangiogenic factors are known to play an important role in human pterygium pathogenesis.

Key words angiogenic balance; pterygia; vascular endothelial growth factor; endostatin