

增生性玻璃体视网膜疾病眼内液血管内皮生长因子的表达

韩金栋 颜华

【摘要】目的 观察增生性玻璃体视网膜疾病患者眼内液(房水、玻璃体)中血管内皮生长因子(VEGF)含量的变化规律,探讨 VEGF 在增生性玻璃体视网膜疾病发展变化中的作用。**方法** 采用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)定量检测增生性玻璃体视网膜病变(PVR)、视网膜静脉阻塞(RVO)、增生性糖尿病视网膜病变(PDR)、新生血管性青光眼(NVG)患者组及正常对照组房水、玻璃体 VEGF 含量。

结果 PVR、RVO、PDR、NVG 患者组房水及玻璃体 VEGF 含量均高于正常对照组,其差异均有统计学意义($P < 0.05$); NVG、PDR、RVO、PVR 患者组房水及玻璃体 VEGF 含量依次降低,其差异有统计学意义($P < 0.05$); PVR、RVO、PDR、NVG 患者组和正常对照组玻璃体 VEGF 含量均高于房水 VEGF 含量,其差异有统计学意义($P < 0.05$); PVR 患者病史与房水、玻璃体 VEGF 含量呈负相关(r 分别为 -0.819 、 -0.823 , $P < 0.05$); RVO 患者病史与房水、玻璃体 VEGF 含量呈正相关(r 分别为 0.913 、 0.929 , $P < 0.05$); PDR 患者玻璃体积血时间与房水、玻璃体 VEGF 含量呈正相关(r 分别为 0.905 、 0.920 , $P < 0.05$)。

结论 增生性玻璃体视网膜疾病患者房水及玻璃体 VEGF 含量明显增高,VEGF 可能在增生性玻璃体视网膜疾病发展变化中起着重要的作用。

【关键词】 玻璃体视网膜病,增生性; 内皮,血管; 内皮生长因子; 眼房水/化学; 酶联免疫吸附测定法

中图分类号:R774.6 R466.9

Expression of vascular endothelial growth factor in aqueous humor and vitreous body of eyes with proliferative vitreo-retinal diseases HAN Jin-dong, YAN Hua. Department of Ophthalmology, General Hospital of Tianjin University of Medical Sciences, Tianjin 300052, China

Corresponding author: YAN Hua, Email: phuyan2000@yahoo.com

【Abstract】Objective To observe the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in aqueous humor and vitreous body in eyes with proliferative vitreo-retinal diseases, and to investigate the role of VEGF plays in the pathogenesis of proliferative vitreo-retinal diseases. **Methods** The concentration of VEGF in aqueous humor and vitreous body in eyes with proliferative vitreoretinopathy (PVR), retinal vein occlusion (RVO), proliferative diabetic retinopathy (PDR), and neovascular glaucoma (NVG) were measured by double antibodies sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The concentration of VEGF in aqueous humor and vitreous body in eyes with PVR, RVO, PDR and NVG were obviously higher than that in the control group ($P < 0.05$), respectively. Among all of the diseases, the concentration of VEGF in aqueous humor and vitreous body decreased orderly in NVG, PDR, RVO and PVR ($P < 0.05$). The concentration of VEGF in vitreous body in eyes with PVR, RVO, PDR and in the control group were much higher than that in aqueous humor in corresponding groups ($P < 0.05$). There was a negative correlation between the disease history and content of VEGF in aqueous humor and vitreous body in patients with PVR ($r = -0.819$, -0.823 ; $P < 0.05$). The disease history positively correlated with the concentration of VEGF in aqueous humor and vitreous body in patients with RVO ($r = 0.913$, 0.929 ; $P < 0.05$), and the time of vitreous hemorrhage positively correlated with the concentration of VEGF in aqueous humor and vitreous body in patients with PDR ($r = 0.905$, 0.920 ; $P < 0.05$). **Conclusion** The concentration of VEGF in aqueous humor and vitreous body in patients with proliferative vitreo-retinal diseases significantly increases, and VEGF may play an important role in the pathogenesis of proliferative vitreo-retinal diseases.

【Key words】 Vitreoretinopathy, proliferative; Endothelium, vascular; Endothelial growth factor; Aqueous humor/chemistry; Enzyme-linked immunosorbent assay

网膜下新生血管膜等所有眼内过度增生性的病变^[1]。目前认为这些疾病的发生是由炎症、损伤、缺血产生的过度修复而引起,多种生长因子在其发生发展中起关键作用,尤其是血管内皮生长因子(VEGF)在增生性玻璃体视网膜疾病发病过程中起着重要的作用^[2,3]。我们对一组增生性玻璃体视网膜疾病患者以及正常对照者房水及玻璃体中 VEGF 含量进行检测,并对其变化规律进行分析,以探讨 VEGF 在增生性玻璃体视网膜疾病发展中的作用。

1 对象和方法

2004 年 1 月至 2005 年 6 月在天津大学总医院眼科就诊并确诊为增生性玻璃体视网膜疾病的患者 54 例 55 只眼作为患者组。其中,男 26 例,女 28 例。年龄 15~80 岁,平均年龄 52 岁。所有患者均进行裂隙灯显微镜、间接检眼镜及 B 型超声等检查,并按照各种疾病诊断标准进行分组。PVR 患者 15 例 15 只眼,其中,外伤性 PVR 8 例,孔源性视网膜脱离 PVR 7 例。患者有眼部外伤或眼前闪光感、固定暗影遮挡、视物模糊等眼病史 7~60 d,平均病史 31 d。经检查并按照 1983 年国际视网膜学会制订 PVR 分级标准进行分级^[4],其中 B 级 6 例, C 级 9 例。RVO 患者 10 例 10 只眼,其中视网膜中央静脉阻塞(CRVO)3 例,视网膜分支静脉阻塞(BRVO)7 例。患者有视物不见、眼前黑影飘动等眼病史 3~18 个月,平均病史 7 个月。检查发现玻璃体积血 7 例,玻璃体积血伴纤维血管增生膜 3 例,均为手术中确立诊断。PDR 患者 21 例 22 只眼,均按照 1984 年我国眼底病学组制订的糖尿病视网膜病变分期标准进行分期^[5]。患者有糖尿病病史 2~18 年,平均糖尿病病史 11 年,视物模糊、视物不见、眼前黑影飘动等眼病史 2~24 个月,平均眼病史 7 个月。检查发现玻璃体积血 9 例,玻璃体积血伴纤维血管增生膜 8 例,伴牵引性视网膜脱离 5 例。NVG 患者 8 例 8 只眼,其中 CRVO 3 例, PDR 5 例。患者有视物模糊伴眼胀、眼痛等眼病史 1~2 个月,平均病史 1.5 个月。检查发现均有患虹膜表面新生血管,非接触式眼压计检查眼压均大于 40 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)。非疾病意外突然死亡的健康成年人 8 例 8 只眼作为正常对照组。其中,男 5 例,女 3 例,年龄 24~65 岁,平均年龄 43 岁,均在死亡后 4 h 以内取房水及玻璃体标本进行检测。

所有患者均接受标准三切口玻璃体切割手术。穿刺前房并抽取房水 0.1 ml,作为房水标本;未打开灌注管开关前,直接截取中央部玻璃体 0.2 ml,作为玻璃体标本。将标本移至已消毒的 effendorf 管中,置于

-20℃冰箱保存。采用晶美生物有限公司的进口分装人 VEGF 双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)成套试剂盒(灵敏度 15 pg/ml),奥地利 SPECTRA-III 型酶标仪,将-20℃保存的玻璃体和房水标本置于室温下进行检测。将酶标板各孔依次编号,各孔中加入 100 μl/孔不同浓度标准品及样本,用封板胶纸封住反应孔,37℃孵箱孵育 90 min。洗板 5 次。加入 100 μl/孔生物素化抗体工作液,用封板胶纸封住反应孔,37℃孵箱孵育 60 min。洗板 5 次。加入 100 μl/孔酶结合物工作液,用封板胶纸封住反应孔,37℃孵箱孵育 3 min。洗板 5 次。加入底物显色剂 100 μl/孔,37℃避光孵育 20 min。加入终止液 100 μl/孔,混匀。立即用酶标仪在波长 450 nm 条件下测定各孔的吸光度(A)值[旧称光密度(OD)]。根据不同浓度标准品所测的 A 值绘制标准曲线。根据各标本的 A 值,在标准曲线上查出其 VEGF 含量。

采用 SPSS12.0 For Windows 统计软件,对增生性玻璃体视网膜疾病患者及正常对照者房水和玻璃体 VEGF 含量行秩和检验,对 PVR、RVO 患者病史及 PDR 患者玻璃体积血时间与房水和玻璃体 VEGF 含量行直线相关分析。

2 结果

患者组房水、玻璃体 VEGF 含量均高于正常对照组,差异有统计学意义(P<0.05); NVG、RVO、PDR、PVR 组房水、玻璃体 VEGF 含量依次降低,组间比较差异有统计学意义(P<0.05); RVO 组和 PDR 组房水、玻璃体 VEGF 含量差异无统计学意义(P>0.05)(表 1)。PVR、RVO、PDR、NVG 组和正常对照组玻璃体 VEGF 含量高于房水 VEGF 含量,其差异有统计学意义(P<0.05)(表 1)。

PVR 患者病史与房水、玻璃体 VEGF 含量呈负

表 1 患者组与对照组房水、玻璃体 VEGF 含量比较(̄x±s)(pg/ml)

组别	眼数(只)	VEGF 含量		P 值
		房水	玻璃体	
PVR 组	15	314.35±129.32 [△]	422.80±187.92 [▲]	<0.05
RVO 组	10	473.60±223.54 [☆]	965.75±520.34 [*]	<0.05
PDR 组	22	529.26±371.66 [◇]	1182.15±957.53 [◆]	<0.05
NVG 组	8	3887.36±241.10 [▽]	>4 500 [▼]	<0.05
对照组	8	75.50±7.45 [*]	144.70±18.38 ^{**}	<0.05

各组间房水 VEGF 含量比较:与 * 比较,△P<0.05,☆P<0.05,◇P<0.05,▽P<0.05;与▲比较,☆P<0.05,◇P<0.05,▽P<0.05;与*比较,◇P>0.05,▽P<0.05;与◇比较,▽P<0.05。各组间玻璃体 VEGF 含量比较:与 ** 比较,▲P<0.05,☆P<0.05,◆P<0.05,▼P<0.05;与▲比较,☆P<0.05,◆P<0.05,▼P<0.05;与*比较,◆P>0.05,▼P<0.05;与◆比较,▼P<0.05。

相关(r 分别为 -0.819 、 -0.823 , P 均 <0.05) (图 1); RVO 患者病史与房水、玻璃体 VEGF 含量呈正相关(r 分别为 0.913 、 0.929 , P 均 <0.05); PDR 患者玻璃体积血时间与房水、玻璃体 VEGF 含量呈正相关(r 分别为 0.905 、 0.920 , P 均 <0.05) (图 2)。

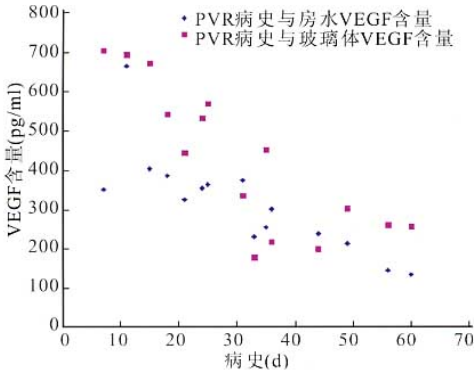


图 1 PVR 患者病史与房水、玻璃体 VEGF 含量的关系
Fig. 1 Relationships between the disease history and concentration of VEGF in aqueous humor and vitreous body in patients with PVR

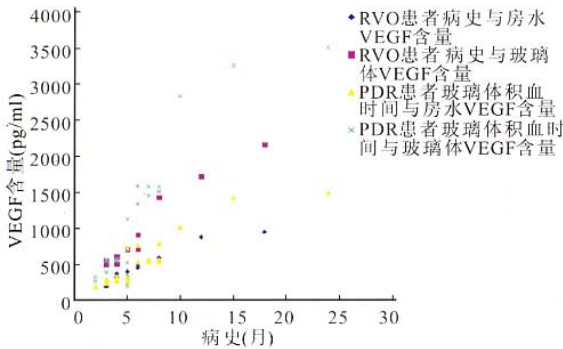


图 2 RVO 患者病史、PDR 患者玻璃体积血时间与房水、玻璃体 VEGF 含量的关系
Fig. 2 Relationships among the disease history in patients with RVO, time of vitreous hemorrhage in patients with PDR, and concentration of VEGF in aqueous humor and vitreous body

3 讨论

增生性玻璃体视网膜疾病与血小板源性生长因子(PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、肿瘤坏死因子(TNF)、转化生长因子(TGF- β)、胰岛素样生长因子(IGF)等许多生长因子有关,其中 VEGF 被认为是相关的可能性最大的眼内新生血管生长因子^[6]。增生性玻璃体视网膜疾病患者眼内液中 VEGF 含量不仅增高,而且与其发展变化的程度密切相关^[7]。我们采用灵敏度、特异性较高的进口分装人 VEGF 双抗体夹心 ELISA 成套试剂盒,ELISA 法检测了一组增生性

玻璃体视网膜疾病患者眼内液中 VEGF 含量,该方法快速准确、操作简单、易于重复。通过比较 PVR、RVO、PDR、NVG 等 4 种增生性玻璃体视网膜疾病患者及正常对照者眼内液 VEGF 含量,初步发现增生性玻璃体视网膜疾病患者眼内液 VEGF 含量异常。

房水和玻璃体中 VEGF 的来源目前尚无定论。比较一致的看法是,在结膜、虹膜、脉络膜及视网膜等含有血管结构的正常眼组织中,有低水平 VEGF 的分泌,其作用为参与生理过程的血管形成,维持血管内皮细胞活性,而房水、玻璃体中异常增高的 VEGF 主要来源于视网膜组织。Miller 等^[8]研究猴 RVO 模型发现,房水中 VEGF 升高,而血清中未检测出 VEGF,因此认为房水中 VEGF 来源于缺血视网膜释放到玻璃体中的 VEGF,而不可能来源于血液。本研究结果同样显示各组患眼玻璃体 VEGF 含量明显高于房水含量,差异有统计学意义,提示房水和玻璃体中 VEGF 可能来源于视网膜组织。

以往研究认为 VEGF 只是在视网膜缺血性病变中才呈高水平表达,而近年研究表明在 PVR 的玻璃体增生膜及视网膜前膜中同样有 VEGF 受体 mRNA 的表达^[9]。研究发现 PVR 患者视网膜色素上皮(RPE)细胞、神经胶质细胞等能通过自分泌和副分泌方式分泌 VEGF,且在這些细胞中有 VEGF 受体的表达,随着病史延长,VEGF 与其受体结合能引起 RPE 细胞、神经胶质细胞的移行、分裂和增生,房水及玻璃体中 VEGF 含量也随之减少^[10]。本研究结果同样显示 PVR 患者房水、玻璃体 VEGF 含量明显高于正常对照组,并且随着病史延长,房水及玻璃体中 VEGF 含量逐渐减少,提示在 PVR 确实存在 VEGF 的异常分泌,VEGF 可能参与了 PVR 的发生和发展。

视网膜缺血性病变包括 RVO 和 PDR 等疾病,部分患者晚期表现为 NVG。缺血视网膜可产生一种可溶性的血管生长因子,诱导视网膜和虹膜产生新生血管^[11]。随着视网膜缺血性病变病史延长,RPE、神经节细胞和神经胶质细胞等合成、分泌 VEGF 的量逐渐增加,玻璃体及房水中 VEGF 的浓度越来越高,当房水中 VEGF 超过一定浓度时,虹膜、房角出现新生血管化,导致 NVG 形成^[12]。本研究结果显示视网膜缺血性病变患者房水和玻璃体 VEGF 含量明显高于正常对照组及 PVR 患者,并且随着病史延长,房水及玻璃体中 VEGF 含量逐渐增多,提示 VEGF 可能在视网膜缺血性病变发展中起重要作用。因此对于视网膜缺血性病变应早期诊断,早期治疗。本研究结果显示在视网膜缺血性病变中,NVG 患者房水和玻璃体 VEGF 含量

最高;而 PDR 患者房水和玻璃体 VEGF 含量高于 RVO 患者,提示 PDR 患者较 RVO 患者可能更易发生 NVG,这对于预防 NVG 发生有一定指导意义。此外,本研究结果中 PDR 与 RVO 患者房水和玻璃体 VRGF 含量差异无统计学意义,考虑可能与本研究样本量较少有关,今后将增加样本量进一步研究。

4 参考文献

- Martini B. Proliferative vitreo-retinal disorders: experimental models in vivo and in vitro. *Acta Ophthalmol*, 1992(Suppl):1-63.
- Funatsu H, Yamashita H, Nakanishi Y, et al. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*, 2002, 86:311-315.
- 杨萍,张惠蓉. 视网膜静脉阻塞和 Eales 病患者玻璃体内皮生长因子含量测定. *中华眼底病杂志*, 1997, 13:171-173.
- The Retina Society Terminology Committee. The classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology*, 1983, 90:121.
- 中华医学分会眼科学会眼底病学组. 糖尿病视网膜病变分期标准. *眼底病*, 1985, 1:42.
- Pe'er J, Shweiki D, Itin A, et al. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Lab Invest*, 1995, 72: 638-645.
- 祝敏燕,韩丽荣. 糖尿病视网膜病变血浆与眼内液血管内皮生长因子的相关研究. *中华眼底病杂志*, 2004, 20:343-345.
- Miller JW, Adamis AP, Shima DT, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol*, 1994, 145:574-584.
- Chen YS, Hackett SF, Schoenfeld CL, et al. Localisation of vascular endothelial growth factor and its receptors to cells of vascular and avascular epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol*, 1997, 81:919-926.
- Schneberger SA, Hjelmeland LM, Tucker RP, et al. Vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 5 are colocalized in vascular and avascular epiretinal membranes. *Am J Ophthalmol*, 1997, 124:447-454.
- Nowak JZ, Wiktorowska-Owczarek A. Neovascularization in ocular tissues: mechanisms and role of proangiogenic and antiangiogenic factors. *Klin Oczna*, 2004, 106:90-97.
- 董白霞,高福祿,庞晓静. 糖尿病小鼠血管内皮生长因子表达与血糖、病程的关系. *中华眼底病杂志*, 2000, 16:182-183.

(收稿日期:2005-11-14)

(本文编辑:唐健)

· 消息 ·

《中华眼底病杂志》2007 年征订通知

《中华眼底病杂志》是中华医学会系列杂志,由中国科学技术协会主管,中华医学会主办,四川大学华西医院承办。《中华眼底病杂志》为眼科中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊,并被美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》以及中国科学引文数据库等多家国内外文摘杂志和数据库收录。主要通过论著、论著摘要、病例报告、临床病例讨论、讲座、综述、国内外学术动态等形式全面反映我国眼科领域内视网膜、葡萄膜、玻璃体、视神经疾病以及与全身病相关的眼底病等专业领先科研成果和临床诊疗经验以及国外研究进展,以广大眼科医师为主要读者对象,为培养眼底病医学专业人才、促进我国眼底病医学的普及与提高、促进国内外眼底病学术交流服务。

本刊为双月刊,2007 年每期增加为 72 页,大 16 开,全铜版纸印刷,彩色、黑白图片均随文编排。单月 25 日出版。邮发代号 62-73,定价:每期 10.00 元,全年 6 期 60.00 元。热忱欢迎广大读者在当地邮局订阅;未能在邮局订阅者,可直接汇款到编辑部订购,免收邮寄费。邮购汇款至:四川省成都市国学巷 37 号;中华眼底病杂志编辑部收。邮政编码:610041。请正楷写清楚订阅人的地址(省、市、县、街道号、邮政编码)和姓名,以免误寄。

编辑部电话:028-85422535,传真:028-85577707, Email:cjoofd@yahoo.com.cn;cjoofd@mail.sc.cninfo.net.

本刊编辑部

《中国眼耳鼻喉科杂志》2007 征订启事

《中国眼耳鼻喉科杂志》是由教育部主管,复旦大学、复旦大学附属眼耳鼻喉科医院主办,编委会出版的全国性专业学术期刊。国内统一刊号 CN31-1875/R,国际刊号 ISSN 1671-2420。本刊面向全体眼科、耳鼻喉科医学工作者。宗旨在于促进国内外眼、耳鼻喉科领域内重要科研成果的交流,加快技术与信息的传播,为临床工作者总结经验、提高业务水平提供学术园地。本刊编辑委员会汇集了眼科和耳鼻喉科国内权威专家 126 人,由耳鼻喉科著名专家王正敏院士和眼科著名专家王文吉教授等领衔主编。

本刊除基础研究、临床研究、临床交流、病例报告、综述、调查研究等常规栏目外,设有玻璃体视网膜手术、国际交流、学科前沿、教育园地、专家笔谈、我如何做等深受眼科和耳鼻喉科颈外科临床医师欢迎的临床特色栏目。同时设立研究生论文专栏为研究生基础研究提供了快速通道,基层医院之窗为基层医疗单位临床医师提供了交流经验的论坛。

《中国眼耳鼻喉科杂志》为双月刊,国际 A4 开本,全铜版纸印刷,每期 68 页,定价 7.00 元。如过期漏订,可通过邮局汇款直接向本刊编辑部补订或补购,不收邮寄费。本刊地址:上海市汾阳路 83 号,复旦大学附属眼耳鼻喉科医院内。邮政编码:200031,联系人:徐斌靓,电话:021-64377134 转 211、221 或 012-64376491。传真:021-64376491,Email:eentm@sina.com

《中国眼耳鼻喉科杂志》编辑部