

引文格式:袁牧之,林颖,刘泉. 视网膜静脉阻塞患者血浆和泪液中血管内皮生长因子表达的研究[J]. 眼科新进展, 2016, 36(5):468-470. doi:10. 13389/j. cnki. rao. 2016. 0125

【应用研究】

视网膜静脉阻塞患者血浆和泪液中血管内皮生长因子表达的研究

袁牧之 林颖 刘泉

作者简介:袁牧之,男,汉族,广东人,1962年出生,副主任医师。联系电话:13907726772; E-mail: yuanmuzhi13@163.com

About YUAN Mu-Zhi: Male, born in 1962. Tel: 13907726772; E-mail: yuanmuzhi13@163.com

收稿日期:2015-11-06
修回日期:2016-03-01
本文编辑:付中静

作者单位:545005 广西壮族自治区柳州市,广西医科大学第四临床医学院眼视光科,柳州市工人医院眼科(袁牧之,林颖);510060 广东省广州市,中山大学中山眼科中心(刘泉)

Received date: Nov 6, 2015
Accepted date: Mar 1, 2016

From the Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University (YUAN Mu-Zhi, LIN Ying), Liuzhou 545005, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-Sen University (LIU Quan), Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Expression of VEGF in plasma and tears of patients with RVO

YUAN Mu-Zhi, LIN Ying, LIU Quan

【Key words】 retinal vein occlusion; vascular endothelial growth factor; tear; central retinal thickness

【Abstract】 Objective To observe the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in plasma and tears of patients with retinal vein occlusion (RVO). **Methods** Twenty-eight patients with confirmed RVO in our hospital were selected. The plasma and tear samples were collected and the VEGF levels were determined by enzyme linked immunosorbent assay. At 1 day, 2 weeks and 4 weeks later, the central retinal thickness (CRT) was examined by optical coherence tomography. Another 30 cases of healthy volunteers were treated as the control group. The expression of VEGF in plasma and in tears was compared between the two groups. **Results** At each time point, the VEGF levels in plasma of RVO patients were significantly higher than those in the control group (all $P < 0.05$). At 1 day, the differences in VEGF levels in tears of RVO patients between the two groups was not statistically significant ($P > 0.05$). The VEGF levels in plasma and tears of patients with RVO were weakly positively correlated ($P < 0.05$), while in the control group, the correlation was more significant ($P < 0.05$). At 2 weeks later, the CRT of the RVO group increased significantly. The differences of CRT values between 1 day and 2 weeks were significant (all $P < 0.05$), but there was no statistically significant difference between 2 weeks and 4 weeks (all $P < 0.05$). The differences between RVO group and control group at each time point were significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The VEGF levels and CRT in tears of RVO patients are significantly higher than those in healthy patients. Changes of VEGF levels in plasma and tears are consistent. Tear test as a non-intrusive detection method is of higher clinical application value in early diagnosis of RVO.

【关键词】 视网膜静脉阻塞;血管内皮生长因子;泪液;中央视网膜厚度

【摘要】 目的 观察视网膜静脉阻塞(retinal vein occlusion, RVO)患者血浆和泪液中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达情况。**方法** 选取我院确诊的28例RVO患者,收集血浆和泪液样本,通过酶联免疫吸附试验测定VEGF表达水平,在1 d、2周和4周使用光学相干断层扫描检查中央视网膜厚度(central retinal thickness, CRT),另选健康志愿者30人作为对照组,比较两组血浆和泪液中VEGF、CRT表达差异。**结果** 各时间点,RVO组血浆中VEGF表达水平显著高于对照组(均为 $P < 0.05$),1 d RVO组泪液VEGF表达水平与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。RVO组血浆和泪液中VEGF表达水平呈微弱正相关($P < 0.05$),而对对照组中这种相关性稍强($P < 0.05$)。两组2周后CRT明显增加,1 d与2周CRT值差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),2周与4周差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$),各时间段RVO组与对照组差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** RVO患者泪液中VEGF表达水平及CRT与健康人比较显著升高,血浆与泪液中VEGF表达水平的变化有一致性,泪液检测作为非侵入性的检测方式,对RVO的早期诊断有较高的临床应用价值。

视网膜静脉阻塞(retinal vein occlusion, RVO)为临床常见眼底血管疾病,主要病理表现为视网膜血液瘀滞、视网膜出血、静脉迂曲扩张等^[1],此病病因复杂,临床认为与高血压、动脉硬化、血液流变学、动脉硬化等因素有关。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)广泛分布于脑、心、肾、肝等人体众多组织及器官中,其在正常胚胎发育时广泛表达,而成年人因血管生成关闭,起到维持血管密度及血管通透性的作用,因此其表达水平较低,而视网膜病变、肿瘤、风湿性关节炎等疾病的发生可导致VEGF异常表达,对VEGF表达水平进行检测可对病情进展进行判断。早就有学者^[2]认为VEGF与缺氧关系密切,可促血管内皮细胞分裂,如患者合并糖尿病、视网膜缺血缺氧,促使眼内VEGF表达水

平上升,且和高亲和力受体结合,从而介导血管内皮细胞增殖,新生血管形成。另有研究检测眼内 VEGF 表达水平时发现,当患者出现糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变、视网膜中央静脉阻塞(central retinal vein occlusion, CRVO)等眼病时 VEGF 表达水平明显上升,无新生血管活动时则呈低表达^[3-4]。但是有关 RVO 泪液和血浆中 VEGF 的报道不多,尤其是采用泪液中 VEGF 表达水平的变化确定 RVO 的阶段的研究尚少,泪液的收集无创、安全,大大减少血浆和玻璃体收集的繁琐性,因此进行了本研究,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料与分组 回顾分析 2013 年至 2014 年我院门诊治疗的 RVO 患者 28 例(28 眼)的临床资料,排除有全身系统疾病和其他眼病者,年龄为(68.05±6.10)岁,男 14 例,女 14 例;15 例 CRVO 患者(男 8 例,女 7 例),13 例 BRVO 患者(男 6 例,女 7 例),选取健康志愿者 30 人 30 眼作为对照组,其中男 14 例,女 16 例,年龄(69.85±6.33)岁。两组年龄、性别比例差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 一般检查 对患者行详细的眼科检查,包括最佳矫正视力、视野检查、眼压测量、眼底镜检查、光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)检查中央视网膜厚度(central retinal thickness, CRT)及眼底荧光素血管造影检查。

1.2.2 血浆和泪液收集 泪液收集使用精度打孔器将 0.1 mm 定量分析滤纸制成 8 mm 直径的圆形滤纸片,可吸附约 10 μL 的泪液,高压消毒灭菌,用无齿镊将滤纸放入受检者眼下穹隆处中外 1/3 结膜囊处,后轻闭双眼,待滤纸湿润度饱和后小心取出,如有多余泪液使用其他滤纸刮除。后放入高压消毒的玻璃试管内冷冻保存待检。于清晨空腹抽取外周静脉血 2 mL,血浆抗凝剂采取 EDTA,离心分离后保存于 -20 ℃,备检。分别在 1 d、2 周、4 周时检测。

1.2.3 血浆 VEGF 检测 酶联免疫吸附试验对血浆 VEGF 进行检测(VEGF 试剂盒为河北博海生物工程有限公司),血浆标本、试剂盒平衡至室温 20 ℃~25 ℃,将反应板取出,取 100 μL 加入酶标板孔内,后放置反应板 37 ℃ 120 min;使用洗涤液充分洗涤酶标板 6 次,再在滤纸上印干,每孔加入一抗工作液 50 μL,反应板充分混匀后放置在 37 ℃ 下 1 h;再次洗板,每孔内加入底物工作液 100 μL,放置在阴暗处 5~10 min,温度 37 ℃;每孔加入终止液并混匀,颜色变深 30 min 后通过电脑自动计算出 OD 值,并以此绘制标准曲线,最终得到浓度值。

1.2.4 泪液 VEGF 检测 将 800 μL 生理盐水加至装有滤纸片的玻璃管内,使泪液稀释 100 倍,静置于

冷冻柜内放置过夜,次日小心取出在振荡器中振动 15 min,使滤纸片中泪液浓度及生理盐水浓度基本持平,使泪液完全洗脱,总量约 1 mL,后采取放射免疫法检测 VEGF 含量,严格按照放射免疫试剂盒说明进行操作。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 19.0 统计软件分析数据,组间比较采用 t 检验,相关性采用 Spearman 相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血浆和泪液中 VEGF 表达水平 各时间点 RVO 组血浆中 VEGF 表达水平均高于对照组(均为 $P<0.05$);而两组泪液 1 d 时 VEGF 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),余时间点差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$);RVO 组血浆和泪液中 VEGF 表达水平随时间改变,同 1 d 水平比较,2 周和 4 周 VEGF 表达水平显著升高(均为 $P<0.05$);2 周与 4 周比较差异无统计学意义($P>0.05$);各时间点对对照组血浆和泪液中 VEGF 表达水平差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$,见表 1-表 2)。

表 1 两组血浆中 VEGF 表达水平 (ρ/μg·mL⁻¹)

时间	RVO 组	对照组	P
1 d	100.11±38.00	94.00±40.30	<0.05
2 周	120.00±46.90	94.20±42.30	<0.05
4 周	124.21±34.87	93.30±40.90	<0.05

表 2 两组泪液中 VEGF 表达水平 (ρ/μg·mL⁻¹)

时间	RVO 组	对照组	P
1 d	0.54±0.48	0.39±0.28	>0.05
2 周	0.91±0.76	0.34±0.30	<0.05
4 周	0.90±0.49	0.35±0.24	<0.05

2.2 两组 CRT 变化 两组 2 周后 CRT 明显增加,1 d 与 2 周 CRT 值差异有统计学意义(均为 $P<0.05$),2 周与 4 周差异无统计学意义($P>0.05$)。各时间点 RVO 组较对照组显著升高(均为 $P<0.05$,见表 3)。1 d 时血浆中 VEGF 表达水平与泪液中 VEGF 表达水平相关,血浆 VEGF 表达水平越高则泪液 VEGF 表达水平越高,对照组中较 RVO 组中相关性稍强($r=0.29, P<0.05$; $r=0.22, P<0.05$)。

表 3 两组 CRT 变化 (L/μm)

组别	1 d	2 周	4 周
RVO 组	416.56±89.01	502.23±87.00	510.25±100.22
对照组	180.20±24.70	201.33±25.02	195.31±21.65
P	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

VEGF 血浆水平升高与病理学有关^[5],包括心力衰竭、动脉硬化、心脏疾病及缺血性脑卒中,也与关节炎及恶性肿瘤等病变有关。有研究显示,糖尿病伴视网膜病患者血浆中 HbA1c、VEGF 表达水平显著高于未患糖尿病伴视网膜病变患者;有学者发现糖尿病黄斑水肿患者玻璃体中 VEGF 表达水平显著高

于非糖尿病患者或糖尿病非视网膜病变患者^[6-7]。在眼科疾病研究中,已有报告显示泪液 VEGF 表达水平在角膜新生血管化及屈光手术后升高。

视网膜发生缺氧、缺血等病理改变后可导致 VEGF 等细胞因子大量释放,生长因子可作用于血管内皮细胞,使血管内皮细胞基底膜降解加快,并且参与血管内皮细胞的迁徙、趋化、分裂及增生。VEGF 为促血管内皮细胞分裂的有丝分裂原,属促新生血管生成因子,其表达水平与眼内新生血管存在相关性,主要可观察视网膜血管的新生情况^[8]。NOMURA 等^[9]研究证实,正常情况下视网膜内皮细胞、视网膜色素上皮细胞及周细胞内均有低表达的 VEGF,主要用于保持眼内血管稳定,但其水平较血浆内明显降低,这与本研究中两组血浆 VEGF 表达高于泪液 VEGF 表达的结果吻合,当视网膜出现缺血、缺氧后患者 VEGF mRNA 表达上升,且其蛋白水平提高,VEGF 通过自分泌及旁分泌直接作用于 VEGF 受体,从而出现新生血管,这表示 VEGF 表达上升在 RVO 视网膜新生血管的发生中扮演重要角色^[10],本研究显示随时间延长,RVO 患者血浆与泪液中 VEGF 表达水平升高,同时 RVO 患者血浆与泪液 VEGF 表达水平有相关性说明血浆与泪液 VEGF 表达水平变化存在一致性,亦证实血浆与泪液 VEGF 存在互相作用,但血浆和泪液中 VEGF 表达的因果关系尚未明确,仍需今后大样本量的研究。

有研究表明 RVO 患者眼房水和玻璃体中 VEGF 表达水平升高^[11],已有学者发现 BRVO 和 CRVO 玻璃体 VEGF 表达水平升高,提示与黄斑水肿有关^[12]。研究发现,缺血性 BRVO/CRVO 患者玻璃体中 VEGF 表达水平较非缺血性患者高,并指出表达水平与黄斑水肿程度相关;房水中 VEGF 表达水平升高与 RVO 有关^[13];另有研究发现 CRVO 房水 VEGF 表达水平与虹膜新生血管化有关^[14]。本研究的目的在于探讨 RVO 患者泪液中 VEGF 表达水平,在所有检测时间点(1 d、2 周、4 周)RVO 患者的血浆和泪液中 VEGF 表达水平较对照组升高。我们发现,1 d 时 RVO 血浆中 VEGF 水平与对照组相比较,且差异非常显著,但 RVO 组和对照组泪液 VEGF 表达水平无显著差异,这表示 RVO 患者血浆 VEGF 异常改变的时间可能早于泪液 VEGF 的改变时间,但因为 RVO 组和对照组泪液 VEGF 表达水平不可能合理地比较,特别是考虑到样本大小对结果的影响,因此仍无法说明 RVO 患者泪液 VEGF 异常时间晚于血浆 VEGF 异常时间的具体原因。研究结果与其他研究发现的房水 VEGF 表达水平与 RVO 相关性的结果相似^[15],张楠等^[16]发现房水和玻璃体 VEGF 表达水

平与 CRVO 和 BRVO CRT 增加有关。我们发现 CRT 在 2 周时达到最高水平,之后变化不大,1 例患者的 CRT 随着 3 次随访持续增加,该患者很可能是疾病发作后立即参与了研究。

总之,我们检测到 RVO 患者血浆和泪液(除 1 d 外)VEGF 表达水平与对照组相比显著升高,随着泪液 VEGF 表达水平升高,我们发现黄斑有相同的改变(视网膜增厚),即 CRT 逐渐增加。泪液检测作为非侵入性的检测方式,对 RVO 的早期诊断有较高的临床应用价值。该研究为无创方法分析 RVO 泪液 VEGF,且操作比较简单,然而,样本相对较小,下一步将进行大样本的、随访时间较长的深入研究。

参考文献

- [1] 孙晓东,宫媛媛,汪枫桦. 慎重应用抗新生血管药物治疗视网膜静脉阻塞继发的黄斑水肿[J]. 中华眼科杂志,2010,46(2):100-102.
- [2] 李蓉,汪恕萍. 生长因子与糖尿病视网膜病变[J]. 中国糖尿病杂志,1999,7(2):103.
- [3] FERRARA N. The biology of vascular endothelial growth factor[J]. *Endocr Rev*,1997,18(1):4-25.
- [4] 卢海,张惠蓉. 兔视网膜静脉阻塞视网膜新生血管组织中血管内皮生长因子 mRNA 的表达[J]. 中华眼底病杂志,2001,17(1):5-7.
- [5] 王志超,邱玉琴,徐伟立,周辉,杨晓峰,李索林. 化疗对切除困难小兒实体肿瘤血管生成的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(6):474-477.
- [6] 夏蔚,夏静,张晓峰,钟蕾,孙正太,王英明,等. FK506 对高糖培养视网膜 Müller 细胞血管内皮生长因子表达的抑制作用[J]. 中华实验眼科杂志,2014,32(11):998-1003.
- [7] CUI JZ, KIMURA H, SPEE C, THUMANN G, HINTON SR, RYAN SJ. Natural history of choroidal neovascularization induced by vascular endothelial growth factor in the primate[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*,2000,238(4):326-333.
- [8] 李小璐,陈男雄,马雅玲. 枸杞多糖对糖尿病大鼠视网膜病理改变及其 VEGF 表达的影响[J]. 中华实验眼科杂志,2014,32(4):334-339.
- [9] NOMURA M, YAMAGISHI S, HARADA S, HAYASHI Y, YAMASHIMA T, YAMASHITA J, et al. Possible participation of antocyanine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes[J]. *J Biol Chem*,1995,270(47):28316-28324.
- [10] FELTGEN N, PIELEN A. Retinal vein occlusion; therapy of retinal vein occlusion[J]. *Ophthalmologe*,2015,112(8):695-704.
- [11] GENEVOIS O, PAQUES M, SIMONUTTI M, SERCOMBE R, SEYLAZ J, GAUDRIC A, et al. Microvascular remodeling after occlusion-recanalization of a branch retinal vein in rats[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2004,45(2):594-600.
- [12] ARROYO JG, DASTGHEIB K, HATEHELL DL. Antithrombotic effect of ticlopidine in an experimental model of retinal vein occlusion[J]. *Jpn J Ophthalmol*,2001,45(4):359-362.
- [13] 林莉,陈松. 玻璃体腔注射抗血管内皮生长因子单克隆抗体 ranibizumab 治疗视网膜静脉阻塞黄斑水肿的研究现状[J]. 中华眼底病杂志,2013,29(6):637-640.
- [14] 黄厚斌,张卯年. 抗 VEGF 药物治疗视网膜静脉阻塞黄斑水肿的疗效及安全性评价[J]. 眼科新进展,2013,33(1):1-4.
- [15] 沈霄,常青. 视网膜静脉阻塞抗血管内皮生长因子治疗研究进展[J]. 中华眼底病杂志,2013,29(6):634-637.
- [16] 张楠,吴烈,桑子瑾. RVO 伴发新生血管性眼病的发病机制及治疗进展[J]. 中国中医眼科杂志,2012,22(6):450-455.