

Expression of VEGF in Primary Pterygium and Its Clinical Significance

Huaiyun Jin, Jianfeng Wang*

Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui
Email: 491804214@qq.com, *7852978@qq.com

Received: Mar. 15th, 2017; accepted: Mar. 27th, 2017; published: Mar. 31st, 2017

Abstract

Objective: To detect the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in different parts of primary pterygium (head, neck and body) and normal conjunctiva, to explore its clinical significance in the mechanism of primary pterygium. **Methods:** Thirty-five pterygium tissue specimens and five normal conjunctival specimens were obtained during the surgery. The pterygium tissues were divided into three parts according to head, neck and body. The expressions of VEGF mRNA were detected by Real-time PCR. The differences of VEGF expression among different specimens were analysed and compared. **Results:** The expression of VEGF mRNA was detected in all parts of pterygium and normal conjunctiva, and the expression level of VEGF increased gradually from pterygium head to body. The expression of VEGF in pterygium body was significantly higher than that in the head and neck ($P < 0.001$), and also higher than that in normal conjunctiva ($P < 0.05$). There was no significant difference of VEGF expressions among head, neck and normal conjunctiva ($P > 0.05$). **Conclusion:** The expression levels of VEGF in pterygium increased gradually from head to body, and the expression of VEGF in pterygium body was significantly higher than that in normal conjunctiva. VEGF was over expressed in pterygium body. Maybe VEGF plays an important role in the occurrence and development of primary pterygium.

Keywords

Pterygium, VEGF, Real-Time PCR

VEGF在原发性翼状胬肉组织中的表达及临床意义

靳怀运, 王剑锋*

蚌埠医学院第一附属医院眼科, 安徽 蚌埠

*通讯作者。

摘要

目的: 通过检测血管内皮生长因子(VEGF)在原发性翼状胬肉组织不同部位(头、颈、体)及正常结膜的表达, 分析VEGF表达规律, 探讨翼状胬肉病理机制及VEGF在翼状胬肉发生、生长过程中的作用。**方法:** 收集在我科进行手术的初发性翼状胬肉组织35例, 术中将翼状胬肉组织按头、颈、体分为3部分, 并随机取5例患眼颞上方正常球结膜作对照。采用实时荧光定量PCR技术(RT-PCR)检测VEGF mRNA在各样本中的表达水平, 比较VEGF mRNA在翼状胬肉和正常结膜组织中表达的差异, 并比较分析VEGF mRNA在翼状胬肉不同部位的表达水平差异。**结果:** 1、在翼状胬肉各部位及正常球结膜中均存在VEGF的表达, 且表达量自胬肉头部至体部呈逐渐升高趋势。2、VEGF在翼状胬肉体部的表达量明显高于头部和颈部, 表达的差异均具有显著的统计学意义($P < 0.001$)。3、翼状胬肉体部VEGF的表达较正常结膜明显增高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。头部、颈部与正常结膜三者之间的表达差异无明显统计学意义($P > 0.05$)。**结论:** VEGF在翼状胬肉各部位的表达量自头部至体部呈逐渐升高趋势, 且体部表达量较正常结膜明显升高, VEGF在翼状胬肉体部呈过度表达状态, 表明VEGF在翼状胬肉发生、发展过程中发挥重要作用。

关键词

翼状胬肉, 血管内皮生长因子, 实时荧光定量PCR

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

翼状胬肉是一种常见的眼表疾病, 由于其确切的发病和术后复发机制仍不是很清楚。目前其治疗方法主要为手术治疗, 且术后复发率较高, 故其病因和复发机制的研究仍是目前研究的热点方向, 期望寻找到降低发病和减少复发的新方法。研究表明, 翼状胬肉的病理组织学改变主要是纤维组织增殖和新生血管的增生。VEGF被认为是目前已发现的功能最强的新生血管形成促进因子, 既往研究表明 VEGF 在翼状胬肉组织中总体表达增高[1] [2]。本研究采用 RT-PCR 技术检测 35 例原发性翼状胬肉头、颈、体不同部位和 5 例正常球结膜组织标本中 VEGF mRNA 的表达水平, 分析 VEGF 在原发性翼状胬肉中的表达规律, 进一步探讨 VEGF 在翼状胬肉发病机制中的作用, 为寻找新的治疗方法提供理论依据。

1.1. 材料与方法

1) 临床资料 共收集 2015 年 10 月至 2016 年 3 月在我科行翼状胬肉切除手术的原发性翼状胬肉组织标本 35 例(35 眼), 患者年龄 40~70 岁, 并收集术眼颞上方正常球结膜标本 5 例(5 眼)作对照。病例排除、纳入标准: 翼状胬肉生长于鼻侧并长入角膜缘内 2 mm 以上, 眼部及周围无明显炎症病变及新生血管性疾病, 既往无角结膜外伤史及手术史等引起继发性翼状胬肉的因素。翼状胬肉组织术中按解剖位置分头、颈、体三部分, 所有组织均用无液氮型 RNA 保存液-20℃低温保存。

2) 主要试剂 无液氮 RNA 样品储存液(上海捷瑞生物工程有限公司), Trizol 总 RNA 提取试剂盒(上

海生工生物工程有限公司), 反转录试剂盒(普洛麦格北京生物技术有限公司), RT-PCR 检测试剂盒(大连宝生物工程有限公司)。

1.2. 实验方法

1) RNA 提取及逆转录 采用常规 Trizol 提取总 RNA, 得到的总 RNA 提取液经微量分光光度计检测波长 260 nm 及 280 nm 的吸光值, 浓度及纯度均符合逆转录要求, 随即被逆转录成第一链 cDNA。逆转录反应条件如下(20 μ L 反应体系): 总 RNA 2 μ g 与 Random Primer (10 μ mol/L) 1 μ L 和 RNase free dH₂O 共 11 μ L 混匀, 65 $^{\circ}$ C 热激 5 min, 立刻放于冰上 3 min。然后依次添加 10 mM dNTP Mixture 1 μ L, MgCl₂ 2 μ L, M-MLV 1 μ L, 5 \times M-MLV Buffer 4 μ L, RNase Inhibitor 1 μ L, 混匀, 离心, 放入 42 $^{\circ}$ C 水浴中反应 1 h, 95 $^{\circ}$ C 灭活 5min。-20 $^{\circ}$ C 冷冻备用。

2) mRNA 表达检测 采用实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-PCR)技术, 反应体系为 SYBR Green I 法 20 μ L 反应体系: 上下游引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, 2 \times SYBR Premix EX-Taq Mix 10 μ L, cDNA 模板 2 μ L 和 RNase free dH₂O 7.2 μ L 共 20 μ L。反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s、61 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 共 40 个循环, 最后产物经溶解曲线分析(95 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 30 s), 实验重复 3 次。VEGF 引物序列: 上游引物为 5'-GCAGAATCATCACGAAGTGG-3', 下游引物为 5'-ATCAGGGGCACACAGGAT-3', 扩增 141bp。内参照引物为 human GAPDH, 上游引物: 5'-AATCCCATCACCATCTTCCA-3', 下游引物: 5'-AAATGAGCCCCAGCCTTCT-3', 扩增 122 bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

3) 实验数据处理及分析 采用 SPSS 17.0 统计分析软件包进行数据分析处理。VEGF mRNA 在翼状胬肉不同部位及正常球结膜组织之间的表达差异采用多个样本均数的方差分析, 组间比较用 LSD-t 检验法, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2. 实验结果

1) VEGF mRNA 在翼状胬肉各部位及正常球结膜中均有表达, 且自翼状胬肉头部、颈部至体部表达量呈逐渐增高趋势(见表 1)。

2) VEGF mRNA 在翼状胬肉体部的表达量明显高于头部和颈部, 表达的差异均具有显著的统计学意义($P < 0.001$)。

3) 翼状胬肉体部 VEGF 的表达较正常结膜明显增高, 差异具有显著统计学意义($P < 0.01$)。但头部、颈部与正常结膜三者之间的表达差异无明显统计学意义($P > 0.05$)。

Table 1. Comparison of expression levels in different parts of pterygium and normal conjunctiva in VEGF mRNA ($\bar{x} \pm s$)

表 1. VEGF mRNA 在翼状胬肉各部位及正常球结膜中的表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

部位	n	VEGF mRNA
正常结膜	5	1.18323 \pm 0.702762
胬肉头部	15	0.99526 \pm 0.525440
胬肉颈部	15	1.38062 \pm 0.715145
胬肉体部	15	2.41824 \pm 0.906681 $_{\Delta}^*$
F	-	10.651
P	-	<0.001

注: 与正常结膜比较 $^{\circ}$ $P < 0.01$; 与头、颈部比较 $_{\Delta}$ $P < 0.001$ 。

3. 讨论

翼状胬肉是一种向角膜表面生长的与球结膜相连的纤维血管样组织, 多生长于鼻侧睑裂区, 临床上典型的翼状胬肉可分为头、颈、体 3 部分。翼状胬肉的存在不仅影响眼部美观, 而且会引起角膜散光导致视力和视觉质量下降, 若胬肉遮挡视轴, 会严重影响患者的视力。目前翼状胬肉的确切病因与发病机制尚未完全弄清, 流行病学显示与环境因素密切相关, 其他因素包括 P53 基因突变、DNA 氧化损伤、细胞增殖和迁移、新生血管形成、遗传因素及病毒感染等被认为与翼状胬肉的发生有关[3]。处于进展期的翼状胬肉外观上充血肥厚, 这一临床表现也提示我们翼状胬肉的增生可能与新生血管形成增多有关, 而 VEGF 的过度表达是新生血管形成的重要直接因素之一, 因此有关翼状胬肉中 VEGF 的表达规律的研究成为目前翼状胬肉病理机制研究的热点方向。有研究者在对手术切除的胬肉标本进行微血管密度 (microvessel density, MVD) 和 VEGF 的研究发现, 翼状胬肉组织较正常球结膜组织的 MVD 和 VEGF 显著增高, 两者的高表达呈正相关, 提示了翼状胬肉组织具有异常的血管活性, 具有很强的血管形成能力, 表明新生血管的形成与翼状胬肉发生发展存在重要关系[4]。

VEGF 是一种特异性血管内皮细胞结合生长因子, 是目前认为功能最强的促新生血管生成因子。当组织缺血、缺氧时可刺激 VEGF 的产生, 从而促进血管内皮细胞分裂增殖、迁移, 增加毛细血管通透性, 诱导新生血管形成。VEGF 与多种眼部新生血管性疾病的发生及进展密切相关, 如新生血管性青光眼、脉络膜新生血管、增殖性糖尿病视网膜病变等, 相关临床与基础研究是目前研究的热点。既往学者对 VEGF 在翼状胬肉发生、发展中的作用进行了大量研究, 研究表明 VEGF 在翼状胬肉组织中的总体表达量比正常结膜组织中明显增高, 且与多种细胞因子的高表达呈正相关, 包括 Survivin、缺氧诱导因子-1、环氧合酶 2、组织因子等[5] [6] [7] [8], 提示它们相互协同共同参与了翼状胬肉的发生、发展。

在本实验研究中, 将翼状胬肉组织按解剖部位分为头、颈、体 3 部分进行检测, 采用 RT-PCR 法检测翼状胬肉组织各部位及正常球结膜组织中 VEGF mRNA 的表达情况。主要结果显示: 1. 在翼状胬肉和正常结膜中均存在 VEGF 的表达, 且自胬肉头部、颈部至体部 VEGF 表达量呈逐渐增高趋势。2. 翼状胬肉体部 VEGF 的表达比头、颈部明显增高($P < 0.001$), 且比正常结膜的表达也明显增高($P < 0.05$)。而头部、颈部及正常结膜三者之间 VEGF 的表达差异无明显统计学意义($P > 0.05$)。本实验结果进一步证实了既往实验得到的在翼状胬肉组织中 VEGF 表达量增高这一结果, 肯定了 VEGF 的高表达及新生血管形成在翼状胬肉发生、发展过程中发挥重要作用的结论。同时本实验在设计上首次把翼状胬肉分头、颈、体三部分进行研究, 进一步分析比较了翼状胬肉不同部位之间及与正常结膜之间 VEGF 表达的差异, 得到翼状胬肉体部比头、颈部表达量明显增高这一新结论。根据实验结果, 作者认为 VEGF 在翼状胬肉的体部存在过度表达状态, 提示 VEGF 在原发性翼状胬肉的发生、发展过程中发挥重要作用。推测翼状胬肉增生始于体部, 新生血管首先在翼状胬肉体部形成, 为细胞的分裂增殖提供营养, 体部过度增生的纤维组织及新生血管逐渐向角膜爬行, 从而导致翼状胬肉的发生与发展。

研究翼状胬肉的发病机制是为了寻找新的、更好的治疗方法, 翼状胬肉目前主要的治疗方法是手术治疗, 但具有较高的术后复发率。抗 VEGF 药物已广泛应用于眼科临床治疗新生血管性眼病, 且已取得明显的治疗效果。研究显示 VEGF 在原发性翼状胬肉中呈高表达, 这一结论为抗 VEGF 治疗在翼状胬肉治疗中的应用提供了理论依据。翼状胬肉的抗 VEGF 治疗目前仍处于研究阶段, 现有研究结果显示结膜下注射小剂量抗 VEGF 药物是安全的, 无明显不良反应及副作用, 但对抑制翼状胬肉发展及减少术后复发无明显统计学意义[9] [10]。抗 VEGF 治疗的作用仍需长期大量研究加以证实及明确, 进一步研究如何有效调控 VEGF 的表达和抗 VEGF 药物的选择及用法、用量, 将对翼状胬肉的预防、治疗及防止术后复发具有重要意义。

参考文献 (References)

- [1] Gharaee, H., Shayegan, M.R., Khakzad, M.R., *et al.* (2014) The Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Pterygium Tissue of Atopic Patients. *International Ophthalmology*, **34**, 1175-1181. <https://doi.org/10.1007/s10792-013-9876-6>
- [2] Peng, M.L., Tsai, Y.Y., Tung, J.N., *et al.* (2014) Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphism and Protein Expression in the Pathogenesis of Pterygium. *British Journal of Ophthalmology*, **98**, 556-561. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2013-303436>
- [3] Liu, T., Liu, Y.W.Y., Xie, L., *et al.* (2013) Progress in the Pathogenesis of Pterygium. *Current Eye Research*, **38**, 1191-1197. <https://doi.org/10.3109/02713683.2013.823212>
- [4] Zhang, J, Zhang, M., Li, X., *et al.* (2011) Correlation of Vascular Endothelial Growth Factor and CD105-Microvascular Density in Primary Pterygium. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*, **31**, 560-564. <https://doi.org/10.1007/s11596-011-0490-4>
- [5] 魏进芬, 李瑞庄, 柯毅, 等. VEGF 与 Survivin mRNA 在翼状胬肉中的表达[J]. 广东医学, 2010, 31(12): 1579-1581.
- [6] 李明渊, 唐仁泓. HIF-1 与 VEGF 在翼状胬肉中的表达及意义[J]. 眼科研究, 2009, 27(3): 214-217.
- [7] Park, C.Y., Choi, J.S., Lee, S.J., *et al.* (2011) Cyclooxygenase-2-Expressing Macrophages in Human Pterygium Co-Express Vascular Endothelial Growth Factor. *Molecular Vision*, **17**, 3468-3480.
- [8] Ando, R., Kase, S., Ohashi, T., *et al.* (2011) Tissue Factor Expression in Human Pterygium. *Molecular Vision*, **17**, 63-69.
- [9] Razeghinejad, M.R. and Banifatemi, M. (2014) Subconjunctival Bevacizumab for Primary Pterygium Excision; a Randomized Clinical Trial. *Journal of Ophthalmic and Vision Research*, **9**, 22-30.
- [10] Mandalos, A., Tsakpinis, D., Karayannopoulou, G., *et al.* (2010) The Effect of Subconjunctival Ranibizumab on Primary Pterygium: A Pilot Study. *Cornea*, **29**, 1373-1379. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3181d927b9>

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjo@hanspub.org