

苏拉明对角膜碱烧伤新生血管抑制作用的研究

马艳梅 刘晓坤 白瑜 翁夷平 赵平

Inhibitory effects of suramin on corneal neovascularization after corneal alkali burn

Ma Yanmei, Liu Xiaokun, Bai Yu, Weng Yiping, Zhao Ping. Department of Ophthalmology, Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China

Abstract Objective Corneal neovascularization is a main pathological change after corneal alkali burn. It has been determined that vascular endothelial growth factor (VEGF) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) promote the formation of new blood vessel; while suramin can arrest the expression of many cytokins and further inhibit neovascularization. This study was to investigate the influence of suramin on corneal neovascularization (CNV) after alkali burn. **Methods** The ocular alkali burn model was created by putting the filter of NaOH at the central cornea for 1 min in 36 New Zealand white rabbits. The suramin drops was topically used in 16 models 4 times per day. Chloramphenicol eye drops was used at the same way in the control group (16 rabbits). The other 16 normal New Zealand white rabbits were as blank control group. The corneal inflammation and CNV area was evaluated and calculated on the 1, 4, 7, 14 days after operation under the slit-lamp. The expressions of VEGF and IGF-I were detected by immunohistochemistry. The histological change in different groups was examined under the light and transmission electron microscope. **Results** The inflammatory reaction and cornea edema were obviously slight in suramin group compared with Chloramphenicol under the slit-lamp. The CNV area in suramin group was significantly smaller than that of Chloramphenicol group in 4, 7, 14 days after cautery ($P < 0.05 - 0.01$). The area density value of VEGF in cornea was obviously reduced in suramin group and Chloramphenicol group compared with blank control group in 1, 4, 7 days after cautery ($P < 0.05 - 0.01$), and that in suramin group was lower than Chloramphenicol group in above time points ($P < 0.01$). The area density value of IGF-I in cornea presented the similar outcome in various time after cautery. No obviously changes were found in the expressions of VEGF and IGF-I on the 14th day among 3 groups ($P > 0.05$). The abnormalities of organelle was more obvious in Chloramphenicol group than the suramin group under the transmission electron microscope. **Conclusion** Suramin inhibit the corneal neovascularization after alkali burn by decreasing the levels of VEGF and IGF-I.

Key words cornea; alkali burn; neovascularization; suramin; vascular endothelial growth factor; insulin-like growth factor-I

摘要 目的 研究苏拉明对碱烧伤角膜新生血管 (CNV) 及血管内皮生长因子 (VEGF)、胰岛素样生长因子-I (IGF-I) 的影响。**方法** 新西兰大白兔 48 只, 分为空白组、对照组、苏拉明组 3 组, 每组 16 只 (32 只眼)。对照组与治疗组制备角膜碱烧伤模型, 术后分别给予氯霉素、8 g/L 苏拉明滴眼液点眼。分别于术后第 1、4、7、14 d 观察新生血管情况, 免疫组织化学法检测 VEGF、IGF-I 的表达。**结果** 术后第 1 d 各组无新生血管生长。第 4、7、14 d, 空白组未出现新生血管, 对照组与治疗组可见 CNV, 且治疗组比对照组新生血管面积小 ($P < 0.01$)。第 1、4、7 d, 对照组与治疗组 VEGF、IGF-I 的表达均比空白组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 治疗组与对照组相比, 差异亦有统计学意义 ($P < 0.01$)。第 14 d, 3 个组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** VEGF、IGF-I 参与 CNV 形成, 苏拉明通过降低角膜上皮中二者的表达, 抑制角膜碱烧伤新生血管形成。

关键词 角膜; 碱烧伤; 新生血管; 苏拉明; 血管内皮生长因子; 胰岛素样生长因子-I

分类号 R 772.2 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)04-0285-04

易诱导 CNV 生成^[1]。本实验拟将苏拉明用于角膜碱烧伤新生血管模型,观察新生血管情况,并对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、胰岛素样生长因子-I(insulin-like growth factor-I, IGF-I)的表达进行分析,旨在研究二者与角膜碱烧伤后新生血管的关系,并探讨苏拉明对新生血管的抑制作用,以期为今后治疗 CNV 提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 选用新西兰大白兔 48 只,体重 2.0~2.5 kg,雌雄不限(河北医科大学动物实验室提供)。将实验动物分为空白组、对照组、苏拉明组,每组 16 只(32 只眼)。实验前裂隙灯显微镜检查双眼无眼前节病变。

1.1.2 主要试剂 苏拉明(美国 Sigma 公司);鼠抗兔单克隆抗体 VEGF、IGF-I(北京中山生物技术有限公司);羊抗鼠 IgG 多克隆抗体(武汉博士德公司)。

1.2 实验方 法

1.2.1 制备角膜碱烧伤模型 对照组与苏拉明组制备角膜碱烧伤模型。氯胺酮(50 mg/kg)和异丙嗪(25 mg/kg)(1:1 比例混合)肌内注射麻醉,1.0% 丁卡因点眼表面麻醉。开睑器开睑,棉签拭去眼表多余水分,将直径为 8.0 mm 的单层滤纸片浸泡在 1 mol/L NaOH 溶液中达饱和状态,吸水纸吸去多余溶液,置于兔双眼角膜中央 1 min,50 mL 生理盐水充分冲洗眼表及结膜囊。

1.2.2 用药方 法 苏拉明组自手术当日起给予 8 g/L 苏拉明滴眼液点眼,每日 4 次,每次 1 滴。对照组给予氯霉素滴眼液点眼,每日 4 次,每次 1 滴,至处死前。

1.2.3 CNV 的观察、测量及面积计算 用裂隙灯显微镜术后第 1、4、7、14 d 观察 CNV,并测量长度。每次测量以连续弯曲度小、朝向角膜混浊中心生长的最长血管垂直长度为准。计算 CNV 面积 $S = C/12 \times 3.14 \times [r^2 - (r-l)^2]$,C 为新生血管累及角膜的圆周钟点,r 为角膜半径,l 为新生血管从角膜缘长入角膜的长度。

1.2.4 苏木精-伊红染色、免疫组织化学染色 各组分别于烧伤后第 1、4、7、14 d 随机空气栓塞处死 4 只白兔,迅速摘除双侧眼球,剪下带 1 mm 宽巩膜的角膜,每个角膜 1/2 固定于 4% 多聚甲醛溶液中,置于 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)缓冲液中浸泡 12 h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,常规 5 μm 厚石蜡切片。连续取 3 张相邻切片,分别用于苏木精-伊红染色和 VEGF、IGF-I 免疫组织化学染色。计算机图像分析仪采集图像,Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统对阳性反应

部位进行面密度分析,以阳性细胞染色的平均面密度值表示抗原表达量。

1.2.5 透射电镜样品制备 剩余 1/2 角膜切成 1 mm³ 固定于 4% 戊二醛磷酸缓冲液,0.01 mol/L PBS 充分冲洗,1% 四氧化锇固定 2 h,0.01 mol/L PBS 再次冲洗,梯度乙醇脱水。100% 乙醇与丙酮 1:1 混合液浸泡 15 min,纯丙酮浸泡 30 min,丙酮与树脂 1:1 及 1:3 混合液各浸泡 15 min,纯树脂浸透。环氧树脂 812、815 包埋。瑞典 LKB 8800 型超薄切片机 50 nm 厚切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重电子染色。日立 H600 型透射电镜观察照相,加速电压为 80 000 V。

1.3 统计学方 法

采用 SPSS 12.0 统计学软件进行统计学分析。各种测试指标数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,苏拉明组和对照组 CNV 面积的比较采用独立样本的 t 检验,不同时间点苏拉明组、对照组和空白组 VEGF 与 IGF-I 半定量测定结果的总体比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 裂隙灯显微镜观察

术后对照组与苏拉明组各烧伤区角膜水肿混浊。对照组第 1 d 结膜充血明显,角膜缘处血管充盈,炎症反应明显;第 3 d 角膜缘处出现新生血管芽,并向角膜中央迅速生长;第 7 d 新生血管达烧伤区,角膜水肿混浊;第 14 d 新生血管管径减小,蔓延面积增加,密集分布,角膜水肿稍减轻。苏拉明组第 1 d 结膜中度充血,角膜缘处血管稍充盈,炎症反应较轻;第 3 d 角膜缘处部分区域有新生血管芽,生长较快;第 7 d 新生血管达烧伤区边缘,角膜水肿稍减轻;第 14 d 新生血管管径减小,面积增加,分布疏松,角膜水肿明显好转。空白组未见改变。

2.2 CNV 面积

术后第 1 d 各组均无新生血管生长。第 4、7、14 d,空白组未出现新生血管,对照组与苏拉明组均有 CNV 生长,苏拉明组 CNV 面积较对照组减少,差异有统计学意义(P < 0.01)(表 1)。

表 1 角膜碱烧伤后 CNV 面积比较($\bar{x} \pm s, \text{mm}^2$)
Table 1 Comparison of area of CNV in various time after cautery ($\bar{x} \pm s, \text{mm}^2$)

Group	Area of CNV in different time		
	4th day	7th day	14th day
Chloramphenicol	20.56 ± 1.69	37.79 ± 1.47	51.05 ± 1.56
Suramin	13.53 ± 1.51	30.02 ± 1.41	36.28 ± 1.72
t	8.753	10.815	18.010
P	0.000	0.000	0.000

(Student's t test)

2.3 角膜组织 VEGF 与 IGF- I 的免疫组织化学分析

2.3.1 角膜 VEGF 的表达 空白组 VEGF 表达无变化。对照组与苏拉明组术后第 1 d 角膜缘处炎症细胞明显浸润,上皮层 VEGF 表达增强(图 1)。第 1、4、7 d,对照组与苏拉明组 VEGF 表达较空白组均增强($P < 0.01$),但苏拉明组较对照组减少($P < 0.01$)。第 14 d,3 个组间差异无统计学意义(表 2)。

表 2 角膜碱烧伤后不同时期 VEGF 面密度值比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of area density value of VEGF in cornea in various time after cautery ($\bar{x} \pm s$)

Group	Area density value of VEGF in different time			
	1st day	4th day	7th day	14th day
Blank control	0.1541 ± 0.0060	0.1534 ± 0.0077	0.1562 ± 0.0079	0.1545 ± 0.0074
Chloramphenicol	0.2335 ± 0.0098 ^c	0.3176 ± 0.0129 ^c	0.2494 ± 0.0157 ^c	0.1600 ± 0.0107
Suramin	0.2102 ± 0.0108 ^{bf}	0.2542 ± 0.0119 ^{cf}	0.1941 ± 0.0148 ^{cf}	0.1562 ± 0.0107
F	277.740	447.096	162.053	0.664
P	0.000	0.000	0.000	0.525

^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs respective blank control group, ^f $P < 0.01$ vs respective Chloramphenicol group (One-way ANOVA, LSD-t test)



图 1 角膜碱烧伤后第 4 d VEGF 免疫组织化学表达($\times 400$) VEGF 在对照组及苏拉明组角膜上皮层明显表达,对照组明显,苏拉明组稍低 A:空白组 B:对照组 C:苏拉明组
Fig. 1 Immunostaining of the cornea for VEGF on the 4th day ($\times 400$) The VEGF has a strongest expression in corneal epithelium in control group and then the suramin group, and a weaker expression of VEGF is seen in blank group A:blank group B:Chloramphenicol group C:suramin group



图 2 角膜碱烧伤后第 4 d IGF- I 免疫组织化学表达($\times 400$) IGF- I 在对照组及苏拉明组角膜上皮层明显表达,对照组明显,苏拉明组稍低 A:空白组 B:对照组 C:苏拉明组
Fig. 2 Immunostaining of the cornea for IGF- I on the 4th day ($\times 400$) The expression of IGF- I in corneal epithelium shows the higher intensity in Chloramphenicol group and suramin group and then the blank group A:blank group B:Chloramphenicol group C:suramin group

2.3.2 角膜 IGF- I 的表达 空白组 IGF- I 表达无变化。对照组与苏拉明组术后第 1 d 角膜上皮层 IGF- I 表达开始增强(图 2)。第 1、4、7 d,对照组与苏拉明组 IGF- I 表达较空白组均增强($P < 0.01$),但苏拉明组较对照组减少($P < 0.01$);第 14 d,3 个组间差异无统

计学意义(表 3)。

表 3 角膜碱烧伤后不同时期 IGF- I 面密度值比较($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of area density value of IGF- I in cornea in various time after cautery ($\bar{x} \pm s$)

Group	Area density value of IGF- I in different time			
	1st day	4th day	7th day	14th day
Blank control	0.1750 ± 0.0138	0.1718 ± 0.0115	0.1719 ± 0.0143	0.1763 ± 0.0159
Chloramphenicol	0.2460 ± 0.0115 ^c	0.3532 ± 0.0119 ^c	0.2725 ± 0.0136 ^c	0.1830 ± 0.0131
Suramin	0.2006 ± 0.0150 ^{cf}	0.2938 ± 0.0127 ^{cf}	0.2128 ± 0.0148 ^{cf}	0.1759 ± 0.0130
F	56.280	471.297	100.813	0.651
P	0.000	0.000	0.000	0.532

^c $P < 0.01$ vs respective blank control group, ^f $P < 0.01$ vs respective Chloramphenicol group (One-way ANOVA, LSD-t test)

2.4 透射电镜观察

空白组可见角膜上皮层游离面微绒毛较多,细胞间隙可,细胞间桥粒、半桥粒连接多,核旁细胞质内线粒体正常,粗面内质网无扩张及脱颗粒现象,细胞器数量多。对照组可见角膜上皮层游离面微绒毛明显减少,细胞间隙明显增宽,细胞间桥粒、半桥粒连接明显减少,细胞质内可见大量椭圆形大小不等的空泡,核旁细胞质内线粒体大部分嵴和膜融合或消失,粗面内质网显著扩张,脱颗粒现象明显,核旁细胞质水肿,细胞器明显减少。苏拉明组可见角膜上皮层游离面微绒毛稍减少,细胞间隙增宽,细胞间桥粒、半桥粒连接稍减少,细胞质内散在空泡,核旁细胞质内线粒体部分嵴和膜融合或消失,粗面内质网扩张,有脱颗粒现象,核旁细胞质轻度水肿,细胞器稍减少(图 3)。

空白组可见角膜上皮层游离面微绒毛较多,细胞间隙可,细胞间桥粒、半桥粒连接多,核旁细胞质内线粒体正常,粗面内质网无扩张及脱颗粒现象,细胞器数量多。对照组可见角膜上皮层游离面微绒毛明显减少,细胞间隙明显增宽,细胞间桥粒、半桥粒连接明显减少,细胞质内可见大量椭圆形大小不等的空泡,核旁细胞质内线粒体大部分嵴和膜融合或消失,粗面内质网显著扩张,脱颗粒现象明显,核旁细胞质水肿,细胞器明显减少。苏拉明组可见角膜上皮层游离面微绒毛稍减少,细胞间隙增宽,细胞间桥粒、半桥粒连接稍减少,细胞质内散在空泡,核旁细胞质内线粒体部分嵴和膜融合或消失,粗面内质网扩张,有脱颗粒现象,核旁细胞质轻度水肿,细胞器稍减少(图 3)。

3 讨论

CNV 是与角膜的外伤、炎症、移植免疫排斥反应密切相关的一种病理现象^[2],可破坏角膜正常微环境,使其丧失透明性,影响其在视觉成像中的作用,而成为常见的致盲眼病之一。其中碱烧伤引起的新生血

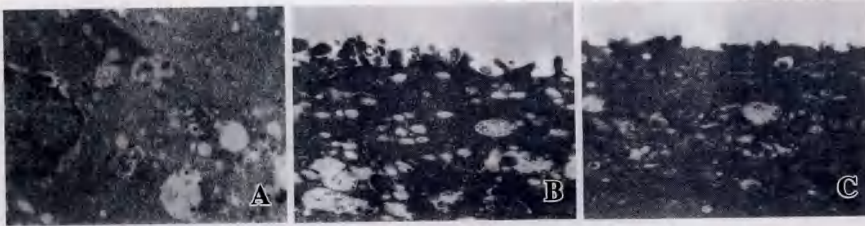


图3 透射电镜观察($\times 20\ 000$) A:空白组 B:对照组 C:苏拉明组
Fig.3 The ultrastructure examination of the corneal epithelium($\times 20\ 000$) The structure of corneal epithelial cells are almost normal in blank group, and the mild changes of cellular organs are seen in suramin group, and these alterations are more severe in Chloramphenicol group A: blank group B:Chloramphenicol group C:suramin group

管与视力丧失的关系最为密切。

刘祖国等^[3]认为 CNV 的形成是损伤后新生血管形成因子与新生血管抑制因子平衡失调的结果。VEGF 是目前确定的一种最直接的眼球内新生血管形成因子。它通过内皮细胞表面的 2 个酪氨酸受体 Fit-1 和 Flk-1 发挥生物学效应^[4]。角膜受伤后 VEGF 的大量表达使血管内皮细胞分裂、增生和迁移,毛细血管基底膜发生降解,形成新生血管腔^[5]。本实验 VEGF 变化过程与角膜碱烧伤后新生血管增生的形态学过程相一致。后者分为 3 个时期:碱烧伤后 48 h 内为非增生期,出现角膜水肿和混浊但无 CNV;第 3~4 d 为血管增生期,新生血管长入角膜,速度快;第 7 d 后为血管退行期,CNV 逐渐退行吸收^[6]。

IGF 是一类既有促细胞分化和增生活性,又有胰岛素样作用的多肽。IGF-I 能使毛细血管内皮细胞及周细胞合成 DNA 的能力增加,并对内皮细胞有明显的趋化作用,使其释放纤维蛋白溶酶原激活剂,促进新生血管形成^[7]。本实验 IGF-I 变化与 VEGF 相一致,亦与角膜碱烧伤后新生血管增生相关^[8]。此变化可能是由于上皮细胞 IGF-I 通过 PB-kinase 通路上调 HIF-1 α 水平,纤维原细胞 IGF-I 则是通过 MAP-kinase、MEK-1 通路上调 HIF-1 α 水平。而 HIF-1 是 VEGF 基因上游的重要表达调控因子,不仅可促进 VEGF 的转录,还可增加 VEGF mRNA 的稳定性,使 IGF-I 发挥促进新生血管生长的作用。

苏拉明,学名聚硫砒萘基脒,是一种对称的多磺酸基萘基脒药物,于 1917 年发现并应用于治疗非洲锥虫病及丝虫病,后用于治疗肿瘤与艾滋病,其药物作用机制主要有以下几点:(1)抑制生长因子诱导的钙离子内流;(2)抑制 GTP 酶的活性;(3)抑制蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的作用;(4)抑制生长因子与受体结合,减少生长因子的表达,并能干扰对细胞增生起关键作用的生长因子的自分泌和旁分泌,进而阻止多种生长因子刺激的细胞增生^[9]。

本实验建立兔角膜碱烧伤后的新生血管模型,加以苏拉明干预,通过观察证实了苏拉明具有抑制 VEGF 与 IGF-I 的作用,从而对 CNV 起抑制作用。苏拉明抑制 VEGF 表达,主要是抑制其与 KDR 结合,机制可能是苏拉明封闭了 KDR 胞外类免疫球蛋白插入区,抑制了 VEGF 诱发的 KDR 酪氨酸激酶磷酸化,从而阻抑了通过 KDR 的信号传导途径^[10]。苏拉明对 CNV 的抑制作用也可能与减轻氧自由基的损伤有关,相关机制有:(1)抑制 Ca^{2+} 内流,目前认为胞浆和线粒体钙超载可以促发脂质过氧化损伤,脂质过氧化损伤又促进钙超载。苏拉明对 Na^+/K^+ 、 Ca^{2+} 、 H^+ -ATP 酶,以及补体系统有抑制作用,能降低新生血管细胞内钙浓度,从而减弱细胞内钙超载所致脂质过氧化损伤;(2)抑制 GTP 酶活性,抑制活化信号在细胞内传导、巨噬细胞移行及氧自由基释放;(3)抑制 PKC,减少脂质过氧化及氧自由基生成,使血管活性物质生成减少,有利于抑制 CNV;(4)抑制炎性介质的合成与释放,减少氧自由基生成,PKC 及其他炎性介质和血管内膜细胞损害均可活化血小板,释放氧自由基而损伤角膜。

苏拉明对 CNV 的抑制作用也可能与减轻氧自由基的损伤有关,相关机制有:(1)抑制 Ca^{2+} 内流,目前认为胞浆和线粒体钙超载可以促发脂质过氧化损伤,脂质过氧化损伤又促进钙超载。苏拉明对 Na^+/K^+ 、 Ca^{2+} 、 H^+ -ATP 酶,以及补体系统有抑制作用,能降低新生血管细胞内钙浓度,从而减弱细胞内钙超载所致脂质过氧化损伤;(2)抑制 GTP 酶活性,抑制活化信号在细胞内传导、巨噬细胞移行及氧自由基释放;(3)抑制 PKC,减少脂质过氧化及氧自由基生成,使血管活性物质生成减少,有利于抑制 CNV;(4)抑制炎性介质的合成与释放,减少氧自由基生成,PKC 及其他炎性介质和血管内膜细胞损害均可活化血小板,释放氧自由基而损伤角膜。

参考文献

- 徐锦堂,孙秉基,方海洲.眼表疾病的基础理论与临床[M].天津:天津科技出版社,2002:371-385
- Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review[J]. *Surv Ophthalmol*, 1998, 43: 245-269
- 刘祖国.眼表疾病学[M].北京:人民卫生出版社,2003:171-179
- Philip W. Vascular endothelial growth factor in normal human corneal epithelium; Detection and physiological importance[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(3): 2514-2520
- Amano S, Rohan R, Kuroki M, et al. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound and inflammation related corneal neovascularization[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998, 39(5): 18-22
- Edelman JL, Castro MR, Wen Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression of blood vessels in the rat cornea[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40: 1112-1123
- Laron Z. IGF-I and insulin as growth hormones[J]. *Novartis Found Symp*, 2004, 262: 56-77
- Jiang CQ, Fan LF, Liu ZS, et al. Expression levels and significance of hypoxia inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in human colorectal adenocarcinoma[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2004, 117(10): 1541-1546
- Zumkeller W, Schofield PN. Growth factors, cytokines and soluble forms of receptor molecules in cancer patients[J]. *Anticancer Res*, 1995, 15: 344-348
- 李俊明,马业新.苏拉明对兔髂动脉血管成形术后内膜增殖的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2002, 11(1): 23-28

(收稿:2008-07-12 修回:2009-02-25)

(本文编辑:王莉红)