

生长因子在视网膜增殖膜的表达^①

梁小玲 高汝龙 李绍珍 李永平 林健贤 唐仕波

(中山医科大学中山眼科中心; 广州, 510060)

摘要 目的: 了解血小板源性生长因子(PDGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)在视网膜增殖膜细胞的表达及其与增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)的关系。方法: 免疫组化法研究 PDGF 和 bFGF 在 20 例视网膜前膜和 1 例视网膜下膜(视网膜脱离术后继发)细胞中的表达情况。结果: ①15/21(71.4%)例标本对抗 PDGF 抗体呈阳性反应, 14/21(66.7%)例对抗 bFGF 呈阳性反应; ②Eales 病和增殖性糖尿病视网膜病引起的血管增殖性前膜(≥ 61 个细胞/视野, 1 000 \times)较 PVR 引起的非血管增殖性前膜(31~60 个细胞/视野)内细胞密度高, 黄斑前膜(≤ 30 个细胞/视野)最低。结论: PDGF 和 bFGF 在 PVR 发展过程中起重要作用; PVR 膜上增殖细胞可产生 bFGF, 它是导致严重 PVR 时玻璃体内 bFGF 含量异常升高的主要原因。

关键词 玻璃体视网膜病, 增生性; 视网膜; 血小板源生长因子/分析; 成纤维细胞生长因子, 碱性/分析; 免疫组织化学中图分类号 R 774.1

EXPRESSION OF GROWTH FACTORS IN MEMBRANES OF PROLIFERATIVE RETINOPATHY

Liang Xiaolin Gao Rulong Li Shaozhen Li Yongping Lin Jianxian Tang Shibo

(Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060)

Abstract Objective: To study the role of platelet-derived growth factor (PDGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) which play in PVR. **Methods:** Using the immunohistochemistry technique to study the expression of PDGF and bFGF in 20 epiretinal membranes and 1 subretinal membrane. **Results:** ①In 21 pieces, expressed PDGF in 15/21 (71.4%); expressed bFGF in 14/21 (66.7%); ②The cellular density was different from the different type of epiretinal membranes. The cellular density of vascular membrane induced by PDR and Eales' disease was the highest (≥ 61 cells/field, 1 000 \times); the nonvascular membranes induced by PVR or traumatic PVR were middle (31~60 cells/field); and the macular membrane was the lowest (≤ 30 cells/field). **Conclusion:** The PVR cells synthesize and secrete PDGF and bFGF, implicate that PDGF and bFGF play an important role in PVR; and prove that the increase of bFGF in PVR vitreous were caused by PVR cells locally.

Subject headings vitreoretinopathy, proliferative; retina; platelet-derived growth factor/analysis; fibroblast growth factor, basic/analysis; immunohistochemistry

增殖性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)是引起视网膜脱离手术失败的主要致盲性眼病之一。血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是体外 PVR 细胞的强力趋化和有丝分裂原^[1]。我们用免疫组化的方法研究视网膜前膜和

下膜内的细胞表达 PDGF 和 bFGF 的情况, 旨在探讨这两种生长因子在 PVR 发生和发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 视网膜前膜和下膜组织切片制备

共收集到 20 例视网膜前膜、1 例视网膜下增

增殖膜标本。均是玻璃体显微手术中取得。增殖膜来源有增殖性玻璃体视网膜病变(按 1983 年国际视网膜命名委员会的诊断标准进行分类, 其中 PVR-C 级 6 例, PVR-D 级 5 例)、外伤增殖性玻璃体视网膜病变(TPVR)2 例、黄斑前膜(PM)2 例、Eales 病引起的牵引性视网膜脱离(TRD)4 例、增殖性糖尿病视网膜病变(PDR)1 例、视网膜脱离复位术后继发视网膜下膜(SM)1 例。所有标本术后立即用组织冷冻包埋剂(美国 Miles 公司产品, 型号: OCT4583)包埋, 置 -50°C 冰箱内保存备用。将低温保存标本作连续冰冻切片, 每片厚 $6\mu\text{m}$, 切片贴于载玻片上, 室温下自然风干 4 h, 然后用无水丙酮固定 5~6 min, 风干 30 min。后用透明胶袋封装, 置 -50°C 冰箱保存。各标本切片一半用于免疫组化研究, 另一半作常规 Mayer 苏木素-伊红染色, 进行常规的细胞结构和形态分析。

1.2 检测用单克隆抗体

抗血小板源性生长因子抗体, 稀释度为 1:10; 抗碱性成纤维细胞生长因子抗体, 稀释度为 1:20, 皆为兔抗人 IgG, 特异地与组织或细胞中的 PDGF 或 bFGF 结合, 由美国 R & D Systems 公司提供。

1.3 免疫组化染色

应用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶(SP)技术进行免疫组织化学染色, 试剂是美国 Bioech Inc. Carifornia Maxin 的产品。方法是: 冰冻切片用 0.15 mol/L PBS 液复水; 过氧化酶阻断剂 $50\mu\text{L}$ /片孵育 10 min; $\varphi = 10\%$ 的非免疫阻断血清 $50\mu\text{L}$ /片孵育 10 min, 以阻断和防止非特异性或背景染色; 分别用各特异性单克隆抗体(第一抗体) $50\mu\text{L}$ /片孵育 90 min, 生物素标记的第二抗体 $50\mu\text{L}$ /片孵育 20 min; 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶溶液 $50\mu\text{L}$ /片孵育 20 min; 新鲜配制的 DAB 液 $100\mu\text{L}$ /片, 再用 Mayer 苏木素复染 10 min, 风干后用中性树胶封片。

肺腺癌组织为阳性对照, 处理及染色方法同上。阴性对照设两种, 一是取人类角膜移植后供体眼的神经视网膜, 作冰冻切片及免疫组化染色同上; 二是被查标本, 方法同上, 但特异性单克隆抗体(即第一抗体)用 PBS 缓冲液代替。

1.4 光镜下细胞密度的计算

为了便于评价切片的细胞含量, 每一切片随机选择 3 个视野, 在显微镜下($\times 1000$)数出每个视野所含的阳性细胞数, 总和后取平均数, 分为 4 级:

- ① ≤ 30 个细胞/视野为(+);
 - ②31~60 个细胞/视野为(++);
 - ③61~90 个细胞/视野为(+++);
 - ④ ≥ 91 个细胞/视野为(++++);
- 以此作为标准计算增殖膜的细胞密度。

2 结果

2.1 视网膜前膜和下膜的光镜观察结果

在 HE 染色的切片上可见多种排列不规则的细胞和细胞间质成分。细胞形状不规则, 有的呈梭形, 核扁长; 有的呈椭圆形, 胞体较梭形细胞小; 有的呈圆形且体积较小, 核深蓝; 还有不少散在或簇状分布的、胞体较大、形状不规则、胞浆及胞核表面含丰富色素颗粒的细胞。这些细胞形态与常规光镜下所见的成纤维细胞、神经胶质细胞、色素上皮细胞和巨噬细胞的形态相近。细胞间质呈淡红色, 密度不均, 每个标本的细胞和细胞间质比例不同, 视网膜下膜的结构与前膜有所不同, 在标本的一侧含有较多细胞, 另一侧未见细胞成分, 均为血块组织, 标本内所见细胞形态与前膜相似。

PVR 组病人无论 C 或 D 级, 包括外伤性 PVR 者, 其增殖膜标本中的细胞密度集中在 31~60 个细胞/视野($1000\times$)附近; 原发和继发性黄斑前膜内细胞含量在 30 个细胞/视野($1000\times$)以下, 密度最低; Eales 病和 PDR 所引起的血管增殖性视网膜前膜, 细胞密度在 ≥ 61 个细胞/视野($1000\times$), 密度最高; 视网膜下膜细胞为 31~60 个细胞/视野, 中等密度(表 1)。

表 1 不同疾病增殖膜中细胞密度比较

Table 1 The comparison of cellular density in different membranes

Diagnosis	cases	cellular density ¹⁾			
		+	++	+++	++++
PVR-C	6	1	5	0	0
PVR-D	5	0	5	0	0
TPVR	2	0	2	0	0
PM	2	2	0	0	0
TRD	4	0	1	2	1
PDR	1	0	0	1	0
SM	1	0	1	0	0

1) cellular density (cells per field $1000\times$): + ≤ 30 ; ++ 31~60; +++ 61~90; ++++ ≥ 91

2.2 免疫组化染色结果

2.2.1 对照组 正常神经视网膜组织对3种单克隆抗体染色均为阴性,不加第一抗体染色的标本切片也为阴性,说明无非特异性染色存在。阳性对照组肺腺癌组织切片中,细胞核大小不一,核异型明显,部分细胞胞膜及胞浆表达PDGF和bFGF。

2.2.2 PDGF和bFGF在视网膜前膜和下膜中的表达 21例视网膜增殖膜中,15例对抗PDGF抗体呈阳性反应;14例对抗bFGF抗体呈阳性反应。在阳性标本中,PDGF和bFGF不规则地在整个前膜标本中表达,尤其集中在细胞密度高的细胞间质区域(图1,2)。部分含丰富色素的细胞、梭形或圆形细胞的胞浆内出现阳性染色。视网膜下膜其细胞丰富侧部分细胞胞浆呈阳性反应,细胞间质内未见表达。

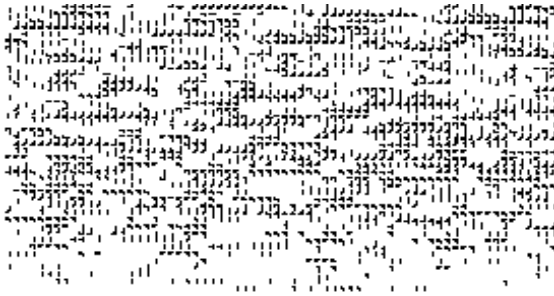


图1 PDGF阳性视网膜增殖膜

Fig. 1 PDGF positive proliferative retinal membrane



图2 bFGF阳性视网膜增殖膜

Fig. 2 bFGF positive proliferative retinal membrane

2.3 视网膜增殖膜中细胞密度与PDGF和bFGF表达的关系

当细胞密度 ≤ 30 个/视野时,PDGF的表达率为0/3、bFGF的表达率为1/3;细胞密度为31~60个/视野时,PDGF的表达率为11/14,bFGF的表达率为9/14;细胞密度 ≥ 61 个/视野时,PDGF和bFGF的表达率达到3/3。(表2)

表2 视网膜增殖膜中细胞密度与PDGF和bFGF表达的关系

Table 2 The relationship between cellular density and expression of PDGF, bFGF (n/1)

Cells/field	grade	cases	express PDGF	express bFGF
≤ 30	+	3	0	1
31~60	++	14	11	9
61~90	+++	3	3	3
> 90	++++	1	1	1

3 讨论

3.1 PVR膜上细胞

本实验对人PVR视网膜前膜和下膜进行光镜观察,发现切片内含有形态上与以往报道的视网膜色素上皮细胞(RPE)、成纤维细胞、神经胶质细胞和巨噬细胞等相似的细胞。为进一步确证形成PVR的细胞类型应与电镜或免疫组化结合,但在这方面原已有大量证据确凿的研究结果^[2,3],证实这四类细胞参与了PVR的形成。本研究发现PVR引起的非血管性视网膜增殖膜内所含的细胞密度低于PDR、Eales病和视网膜中央静脉阻塞等引起的血管性视网膜增殖膜,提示PVR的治疗不能单纯依靠抑制细胞的增殖。

3.2 PVR膜上PDGF和bFGF的表达及意义

本结果表明,大部分视网膜增殖膜的细胞均表达PDGF和bFGF,提示膜内细胞有能力合成PDGF和bFGF;细胞外基质中也发现PDGF和bFGF,尤其集中在细胞密度高的区域内,提示基质内的生长因子可能由增殖细胞旁或自分泌产生。Vinores^[4]和Robbins^[5]用免疫组化研究发现正常视网膜血管细胞可表达PDGF;Noji^[6]曾作免疫组化研究bFGF在正常鼠视网膜中的表达情况,发现鼠视网膜中的RPE细胞和感光细胞有bFGF表达,并显示bFGF大多贮存在RPE细胞层和感光细胞层之间。但本实验未在正常人的神经视网膜中发现有表达PDGF和bFGF的细胞,可能与视网膜的来源不同有关,也可能与其含量少或取视网膜标本时因子受破坏或丢失有关,因为本实验仅取神经视网膜部分,神经视网膜与色素上皮层分离后,在低温冰箱中保存或冰冻切片时,因子均有受破坏

或丢失的可能。本实验所用的特异性单克隆抗体效价较低, 敏感性不够可能也与此有关。因此, 本实验检测出PVR膜上细胞表达PDGF和bFGF, 反映其含量是较高的。本实验与Vinores和Robbins的研究结果均证实PVR膜上细胞在局部合成和分泌PDGF, 提示PDGF和bFGF在PVR的发展过程中起重要作用。

我们以前的研究^[7]曾发现: 严重PVR患者玻璃体内bFGF的含量异常升高, 且高于自身的血浆含量, 提示是局部形成的。本结果进一步证实PVR膜上细胞局部产生的bFGF是导致严重PVR时玻璃体内bFGF升高的主要原因。

本研究发现, 视网膜增殖膜内的细胞密度与PDGF和bFGF的阳性表达率成正相关, 提示这两种生长因子与PVR有十分密切的关系。推测PVR膜上细胞通过合成和分泌PDGF, 使增殖膜局部产生高浓度的PDGF, 刺激细胞自身有丝分裂, 刺激成纤维细胞合成和分泌胶原及刺激细胞引起的胶原收缩^[1,6,7], 推动PVR发展; PDGF和bFGF的作用相似。

参 考 文 献

1 Leschey K H, Hackett S F, Singer J H, *et al*. Growth

factor responsiveness of human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1990, 30: 839

2 Schwartz, D, Delacruz Z C, Green W R. Proliferative vitreoretinopathy: ultrastructural study of 20 vitreoretinal membranes removed by vitreous surgery. *Retina*, 1988, 8: 275

3 栾 洁, 王文吉, 陈荣家, 等. 视网膜前膜细胞成分的电镜观察. *中华眼底病杂志*, 1995, 11(3): 209

4 Vnores S A, Henderer J D, Mahlow J, *et al*. Isoforms of platelet-derived growth factor and its receptors in epithelial cells. *Exp Eye Res*, 1995, 60: 607

5 Robbins S G, Mixon R N, Wilson D J, *et al*. Platelet-derived growth factor ligands and receptors immunolocalized in proliferative retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35: 3649

6 Noji S, Matsuo T, Koyama E, *et al*. Expression pattern of acidic and basic fibroblast growth factor genes in adult rat eyes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 168: 343

7 梁小玲, 李绍珍, 高汝龙, 等. 玻璃体中碱性成纤维细胞生长因子的定量研究. *中山医科大学学报*, 1998, 19(3): 183

(1998-03-06 收稿 1998-05-06 修回)

·新成果·

大脑皮层的不同部位对体感皮层慢痛反应的调制作用

课题负责人 冯鉴强

(中山医科大学生理教研室; 广州, 510089)

该研究应用自行改良的极化电流阻滞技术、侧脑室注射、微电泳和辣根过氧化物酶示踪等多种先进技术, 逐步深入地研究了大脑皮层的不同部位对体感皮层慢痛反应——包括: ① C类纤维皮层诱发电位(C-CEP), ② 细胞单位放电(C-CED)——的调制作用及其机理。首次证实C类神经纤维传入在大脑皮层SI区不仅诱发C-CEP, 而且诱发C-CED, 它们能反映体感皮层慢痛反应, 提出大脑皮层参与慢痛产生的新观点。发现电刺激大脑皮层联合区对慢痛反应有明显的抑制作用, 提出了联合皮层参与慢痛调制的新见解; 发现刺激大脑皮层体感II区对慢痛反应有易化和抑制双重调制作用, 为阐明体感II区在痛调制中的作用提供了新依据。本成果对深入阐明镇痛原理, 指导临床建立新的止痛方法有重要的意义和价值。1997年获广东省自然科学三等奖。

(陈丽芳)