

玻璃体中碱性成纤维细胞生长因子的定量^①

梁小玲 李绍珍 高汝龙 李春芳 唐仕波 谢楚芳

(中山医科大学中山眼科中心; 广州, 510060)

摘要 目的: 定量研究增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)患者玻璃体中碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的含量, 阐明bFGF在PVR中的作用和影响。方法: 双夹心酶联免疫吸附技术测定正常对照组20只眼、PVR-C组35只眼、PVR-D组26只眼和单纯玻璃体出血组25只眼患者玻璃体内bFGF含量, 以及PVR-D病人(15例)血清内bFGF含量。结果: ①玻璃体内bFGF含量: 对照组 median 5.20 ng/L, quartile 15.47 ng/L; PVR-C组 median 3.12 ng/L, quartile 10.48 ng/L; PVR-D组 median 46.56 ng/L, quartile 113.96 ng/L; 单纯玻璃体出血组 median 1.40 ng/L, quartile 6.25 ng/L; PVR-D组玻璃体内bFGF含量明显高于对照组, 也高于PVR-C组和单纯玻璃体出血组(各 $P < 0.01$); ②PVR-D组血清内bFGF含量: (18.33 ± 3.39) ng/L; PVR-D组玻璃体内bFGF含量明显高于其血清含量, $P < 0.01$; ③玻璃体内bFGF含量与裂孔面积的关系: 在PVR-D组, 裂孔大于1.5 mm × 1.5 mm组bFGF含量较高($P < 0.01$)。结论: bFGF在PVR发展中起重要作用。

关键词 玻璃体视网膜病, 增生性; 玻璃体/化学; 成纤维细胞生长因子, 碱性/分析

中图分类号 R 774.12

QUANTITATIVE STUDY OF bFGF IN VITREOUS OF PVR

Liang Xiaoling Li Shaozhen Gao Rulong Li Cunfang Tang Shibo Xie Chufang

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

Abstracts Objective: Quantitative study of basic fibroblast growth factor (bFGF) in vitreous of proliferative vitreoretinopathy (PVR), to state the result and influence of bFGF in PVR. **Method:** The high sensitive sandwich enzyme immunoassay technique (ELISA) was used to measure the level of bFGF in vitreous of normal group 20 eyes, PVR-C group 35 eyes, PVR-D group 26 eyes, vitreous hemorrhage group 25 eyes (no vascular proliferative retinopathy) and in serum of PVR-D patients (15 cases). **Results:** ① The bFGF level in vitreous: normal group median 5.20 ng/L, quartile 15.47 ng/L; PVR-C group median 3.12 ng/L, quartile 10.48 ng/L; PVR-D group median 46.56 ng/L, quartile 113.96 ng/L; and vitreous hemorrhage group median 1.40 ng/L, quartile 6.25 ng/L. The bFGF level in PVR-D group was significantly higher than that in normal group, PVR-C group and vitreous hemorrhage group ($P < 0.01$). ② bFGF level in vitreous and serum of PVR-D group: The bFGF level of serum was mean (18.33 ± 3.39) ng/L; the bFGF level of vitreous in PVR-D was significantly higher than that in serum ($P < 0.01$). ③ bFGF level in vitreous and PVR risk factor: bFGF level was significantly higher in bigger retinal break group in PVR-D group. **Conclusion:** The result implied that bFGF play an important role in PVR.

Subject headings vitreoretinopathy, proliferative; vitreous body/chemistry; fibroblast growth factor, basic/analysis

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

败的主要原因。近年的研究证实视网膜色素上皮细胞(RPE)是参与形成PVR的主要细胞^[1]。碱性

成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)在体外可刺激 RPE 的有丝分裂^[4]。眼内 bFGF 与 PVR 的关系如何目前尚未明了。为了探讨这两者之间的关系,我们定量研究了 PVR 患者玻璃体内 bFGF 的含量。

1 对象与方法

1.1 玻璃体样本

病人组,共 86 例,分成 2 组:第 1 组是裂孔源性视网膜脱离引起的增殖性玻璃体视网膜病变 PVR 组,61 例,男性 38 例,女性 23 例,年龄 12~70 岁,平均(41.1±17.6)岁,按 1983 年国际视网膜命名委员会的诊断标准进行 PVR 分类,其中 PVR-C 级(含黄斑洞 7 例,继发性黄斑前膜 2 例)35 例, PVR-D 级 26 例;第 2 组是增殖性糖尿病视网膜病变(PDR)、Eales 病、视网膜中央静脉阻塞、老年黄斑变性等引起的单纯玻璃体积血不伴视网膜脱离者 25 例,男性 13 例,女性 12 例,平均年龄(43.6±16.8)岁。所有标本均为在做经睫状体扁平部三切口玻璃体显微手术时,插入眼内注射液管而尚未注入玻璃体腔时先取出的原始玻璃体液。样本取出后离心(2 000 r/min×10 min),取上清液放-50℃冰箱保存。

对照组:20 例,为我院角膜移植供体眼球的青壮年非正常死亡者。做角膜移植时取出角膜植片后,即用 10 mL 1 次性注射器于角膜缘外 3~5 mm 处垂直眼球壁向心性穿刺入玻璃体腔,抽取出正常的玻璃体。样本取出后离心(2 000 r/min×10 min),取上清液放-50℃冰箱保存。

表 1 玻璃体中 bFGF 含量测定结果比较

Table 1 The comparison of bFGF level in vitreous (ng/L)

group	cases	concentration	median	quartile	P
control	20	0.00~33.20	5.20	15.47	
PVR-C	35	0.00~57.10	3.12	10.48	> 0.05 ¹⁾
PVR-D	26	1.70~300.20	46.56	113.96	< 0.01 ^{1), 2)}
vitreous hemorrhage	25	0.00~29.46	1.40	6.25	> 0.05 ¹⁾

1) compared with control group; 2) compared with PVR-C group and vitreous hemorrhage group

2.2 PVR-D 组患者血清与其玻璃体 bFGF 含量比较

PVR-D 组患者中,男性 11 人、女性 4 人测定了其血清内 bFGF 含量,范围 9.15~20.75 ng/L,

1.2 血清样本

均为 PVR-D 级的患者,共 15 例;男性 8 例,女性 7 例;平均年龄(44.7±17.9)岁;于患者做玻璃体手术前 1 天抽空腹血 2 mL,置于干燥试管内自然凝固后,离心(2000 r/min×10 min),吸取上面的血清,置-50℃低温冰箱保存。

1.3 实验方法

用高敏感度的“夹心法”酶联免疫吸附分析试剂盒(R & D systems, USA)检测 bFGF 含量。试剂盒内附有纯的人 bFGF 标准品。对 bFGF 特异的单克隆抗体粘附在 ELISA 检测板的微孔底面,加入样品或标准品后, bFGF 与单克隆抗体结合,再加入对 bFGF 有特异性的多克隆抗体,产生抗体-bFGF-抗体复合物,最后加入过氧化氢和四联苯胺以显色。采用 ELISA 微孔板光密度测定仪(Sigma, 960 型)测定样本处在 150 nm 光波的光密度值。用 bFGF 标准品制备 1 条浓度从 5~640 ng/L 并与其光密度值相对应的标准曲线。通过将测得的每个样品的光密度值与标准曲线相比较,计算出样品中的 bFGF 含量。

2 结果

2.1 玻璃体内 bFGF 含量比较

PVR-C 组、PVR-D 组和玻璃体出血组,各组成年、性别比较无差异, $P > 0.05$ 。正常对照组为非正常死亡尸体眼球,无法进行统计。将各组样本玻璃体内 bFGF 含量进行比较(秩和检验),结果见表 1。

平均(18.33±3.39) ng/L。PVR-D 组玻璃体内 bFGF 含量见前述。将 PVR-D 组玻璃体与血清内 bFGF 含量进行比较,两样本方差不齐,用秩和检

验,测出 $P < 0.01$,说明 PVR-D 组患者玻璃体内 bFGF 含量明显高于血清。

2.3 玻璃体内 bFGF 含量与裂孔面积的关系

由于只有 PVR-D 组玻璃体内 bFGF 含量比正常组高,故只能在该组内进行比较。裂孔面积用 mm^2 表示,1.5 mm 相当于 1 PD(视乳头直径)。经计算机的多因素逐步回归分析,结果如下:

PVR-D 组找不到裂孔共 6 例,裂孔面积 \leq

1.5 mm \times 1.5 mm 共 8 例;裂孔在 1.5 mm \times 1.5 mm \sim 3 mm \times 4.5 mm 之间共 8 例;在 3 mm \times 4.5 mm \sim 4.5 mm \times 4.5 mm 之间的 1 例, $>$ 4.5 mm \times 4.5 mm 者共 3 例。将找不到裂孔或裂孔 \leq 1.5 mm \times 1.5 mm 者合成一组共 14 例;裂孔 $>$ 1.5 mm \times 1.5 mm 以上者合成一组共 12 例,二组玻璃体内 bFGF 含量比较结果见表 2。

表 2 PVR-D 组不同裂孔面积与玻璃体 bFGF 含量比较

Table 2 The bFGF level in vitreous of different retinal breaks in PVR-D (ng/L)

retinal break	cases	bFGF concentration	median	quartile	P
$\leq 1.5 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm}$	14	1.70~155.50	14.23	55.07	
$> 1.5 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm}$	12	28.24~300.20	97.93	126.92	$< 0.01^{1)}$

1) Compared with retinal break $\leq 1.5 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm}$ group

本组患者的屈光状态、发病时间、视网膜脱离并发玻璃体出血或前段葡萄膜炎或脉络膜脱离、以往巩膜冷冻史及玻璃体手术史等 PVR 发病高危因素较分散,无法将其与玻璃体内 bFGF 含量进行比较。

3 讨论

3.1 对照组玻璃体 bFGF 含量

本实验发现正常人对照组玻璃体内含有一定量的 bFGF,但波动范围较大,从 0.00 \sim 33.20 ng/L,说明正常健康人之间玻璃体内 bFGF 的含量差异较大。Hanneken^[3] 用放射免疫方法测定玻璃体内 bFGF 含量,发现正常人测不出,但他所用的测量方法可测出的最低浓度是 0.3 $\mu\text{g/L}$,可能不够敏感;本实验所用方法可测出 0.11 ng/L bFGF 的含量,较敏感。许迅等^[4] 测量 10 例正常尸体眼玻璃体 bFGF 含量为测不出 \sim 27 ng/L,比本组低。这些结果均证实人眼内确实含有一定量的 bFGF。Noji^[5] 和 Sternfeld^[6] 分别发现鼠的 RPE 和感光细胞以及培养的人 RPE 细胞能合成和分泌 bFGF,推测正常人玻璃体中的 bFGF 来源与此有关。

3.2 不同病变组与对照组玻璃体 bFGF 含量比较

本研究表明,PVR 组内,增殖较轻的 PVR-C 组玻璃体内的 bFGF 含量与对照组无异常;增殖严重的 PVR-D 组,玻璃体内 bFGF 异常增高,这种增

高与血清 bFGF 含量无关,推测是局部产生的。提示裂孔性视网膜脱离发生后,PVR 的发生与发展与 bFGF 的产生有密切关系,bFGF 在 PVR 的发展中起重要作用。

玻璃体出血组与对照组玻璃体内 bFGF 含量无差异(表 1),提示玻璃体出血后血清来源的 bFGF 并未使玻璃体内的 bFGF 含量升高。Sivalingam^[7] 和 Borisuth^[8] 曾分别发现 PDR 患者玻璃体内 bFGF 升高,且与眼内的增殖严重程度成正比。本组玻璃体出血患者眼内增殖程度不严重,且糖尿病患者 25 例中仅占 3 例,可比性不大。

3.3 视网膜裂孔面积与玻璃体内 bFGF 含量的关系

本研究表明 PVR-D 组,视网膜裂孔 $>$ 1.5 mm \times 1.5 mm 以上者,bFGF 含量比裂孔 \leq 1.5 mm \times 1.5 mm 者明显升高,提示裂孔面积可间接影响 PVR 患者玻璃体内 bFGF 的含量。以往的研究发现^[9],视网膜的牵拉性马蹄孔尤其面积 $>$ 3 mm^2 以上者,易发展为 PVR。Machemer 认为^[10]。视网膜大的裂孔形成后,显露在玻璃体内的 RPE 细胞及其他细胞增多,迁移进入玻璃体和视网膜表面的细胞增多,导致 PVR 加重。由此推测,严重 PVR 患者玻璃体内异常升高的 bFGF,可能与这些细胞有关。Sternfeld^[6] 发现培养的人 RPE 细胞能合成和分泌 bFGF。人体内参与形成 PVR 的细胞是否有这种能力?我们将在第二部分的工作中开展这方面的研究。

参 考 文 献

- 1 Schwartz D, Zenaida C, de La Cruz W R, *et al.*. Proliferative vitreoretinopathy: Ultrastructural study of 20 retrolental membranes removed by vitreous surgery. *Retina*, 1988, 8: 275
- 2 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
- 3 Hanneken A, de Juan E Jr, Luttly G A, *et al.*. Altered distribution of basic fibroblast growth factor in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*, 1991, 109: 115
- 4 许 迅, 何志平. 冷凝术后视网膜下液中 bFGF 含量和细胞学分析. *中华眼底病杂志*, 1995, 11: 175
- 5 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
- 6 Sternfeld M D, Roberson J E, Shipley G D, *et al.*. Cultured human retinal pigment epithelial cells express basic fibroblast growth factor and its receptor. *Curr Eye Res*, 1989, 8: 1029
- 7 Sivalingam A, Kenney J, Brown G C, *et al.*. Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*, 1990, 108: 869
- 8 Borisuth N S, Tripathi R C, Tripathi B J, *et al.*. Quantification of TGF-, EGF and bFGF in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991, 32: 1028
- 9 Kampik A, Michels R G, Kenyon K R, *et al.*. Epiretinal and vitreous membranes comparative study of 56 cases. *Arch Ophthalmol*, 1981, 99: 1445
- 10 Machemer R, Laqua H. Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferative proliferation). *Am J Ophthalmol*, 1975, 80: 1

(1997 - 12 - 29 收稿 1998 - 04 - 03 修回)

简 讯

疟疾疫苗研究又迈进充满希望的一步 ——博士后刘彦文研究报告通过评议

日前博士后刘彦文研究报告, 以起点高、手段先进、数据可靠、属国内同类研究领先水平的评议结论通过评议专家组的评议。

据世界卫生组织(WHO)1996年报告, 全球每年疟疾发病人数约3~5亿, 其中150~270万人死亡, 疟疾被列为全球优先控制的6种传染病的第1位。疟疾疫苗的研制一直是近年国内外的研究热点, 因为疟原虫的生活史复杂, 为疫苗的研制带来了困难, 科学家们在为之努力奋斗, 但至今仍未研究出价格低廉、安全高效的疟疾疫苗。疟疾疫苗的研制, 成为疟疾防治工作中极有潜力的研究课题。

刘彦文博士朝着这个方向努力, 已迈进了充满希望的一步。刘博士在站期间在寄生虫教研室余新炳教授指导下开展了“恶性疟原虫海南分离株 Fcc1/HN 环子孢子蛋白在 HeLa 细胞中的高效表达及 DNA 免疫”的研究。该研究采用 PCR 方法从恶性疟原虫海南分离株 Fcc1/HN 基因组 DNA 中成功地扩增出环子孢子蛋白基因(CSP 基因)片段, 并将其定向克隆到真核表达载体 pCDNA₃ 中, 成功地建立了 pCDNA₃-CSP 重组质粒, 在 HeLa 细胞中表达, 表达量高达 15.77%, 将重组质粒 pCDNA₃-CSP 直接免疫 BALB/C 小鼠后, 小鼠产生了抗 CSP 的特异性抗体, 诱导产生的抗体滴度 1:1280, 小鼠 T 细胞和 NK 细胞活性增加, CD8⁺ 亚群比例升高。结果表明, pCDNA₃-CSP 直接免疫可诱导小鼠产生特异性和非特异性的体液和细胞免疫, 这一研究为恶性疟原虫环子孢子 DNA 疫苗研制提供了科学依据。

(冯世容)