

# 缺氧性视网膜病变患者血及玻璃体中 NO 和 VEGF 浓度的变化

张琼<sup>1</sup>, 张士胜<sup>2</sup>, 闫焱<sup>1</sup>, 姚燕鸿<sup>1</sup>, 沈奎<sup>1</sup>, 周颖明<sup>1</sup>, 朱彩虹<sup>1</sup>, 徐建敏<sup>1</sup>

基金项目: 中国上海市重点学科建设项目 (No. S30205); 中国上海市科委基础重点项目 (No. 08JC1415600); 中国上海市卫生局基金项目 (No. 2007013)

作者单位: <sup>1</sup>(200025) 中国上海市, 上海交通大学医学院附属瑞金医院眼科; <sup>2</sup>(200025) 中国上海市, 上海瑞视眼科

作者简介: 张琼, 女, 博士, 副主任医师, 研究方向: 眼底激光、玻璃体视网膜病变。

通讯作者: 徐建敏, 女, 副主任医师, 研究方向: 玻璃体视网膜病变. xujianmin0919@yahoo. cn

收稿日期: 2010-03-12 修回日期: 2010-07-21

## Nitric oxide and VEGF expression in the ischemic-hypoxic retinopathy

Qiong Zhang<sup>1</sup>, Shi-Sheng Zhang<sup>2</sup>, Yan Yan<sup>1</sup>, Yan-Hong Yao<sup>1</sup>, Xi Shen<sup>1</sup>, Ying-Ming Zhou<sup>1</sup>, Cai-Hong Zhu<sup>1</sup>, Jian-Min Xu<sup>1</sup>

**Foundaion items:** Key Subject Programs of Shanghai China (No. S30205); Key Programs of Science and Technology Commission Foundation of Shanghai, China (No. 08JC1415600); Foundation Programs of Shanghai Health Bureau, China (No. 2007013)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Ruijin Hospital of Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; <sup>2</sup>New Vision Eye Clinic, Shanghai 200025, China

**Correspondence to:** Jian-Min Xu. Department of Ophthalmology, Ruijin Hospital of Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China. xujianmin0919@yahoo. cn

Received: 2010-03-12 Accepted: 2010-07-21

## Abstract

• **AIM:** To evaluate the expressions of nitric oxide (NO) and VEGF in vitreous humor and blood samples in patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR) and in patients with branch retinal vein occlusion (BRVO) and to compare the levels with those of controls.

• **METHODS:** NO concentrations were determined using the Greiss reaction in plasma and vitreous humor samples. VEGF levels were assayed by ELISA. The patients in the studies were divided into four groups: 16 patients with PDR, 5 patients with BRVO, 11 patients with rhegmatogenous retinal detachment and 10 patients with macular hole.

• **RESULTS:** The vitreous fluid levels of NO were significantly higher in patients with PDR than those in other three groups (15.2, 4.6-50.9 μmol/L, all  $P < 0.01$ ). The concentration of VEGF were significantly higher in patients with PDR and BRVO than other two groups ( $P = 0.0008$ , 1507.2, 50.7-3722.0 mg/L; 838.8, 212.7-850.6 mg/L respec-

tively), but highest in PDR ( $P = 0.001$ ). There was no significance with NO and VEGF in serum in four groups. There was no correlation with that of NO and VEGF in four groups whatever in vitreous or plasma.

• **CONCLUSION:** The results suggest that higher levels of NO and VEGF may be related to the angiogenesis in DR.

• **KEYWORDS:** nitric oxide; VEGF; vitreous

Zhang Q, Zhang SS, Yan Y, et al. Nitric oxide and VEGF expression in the ischemic-hypoxic retinopathy. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(8):1485-1487

## 摘要

**目的:** 检测一氧化氮 (nitric oxide, NO) 在缺氧性视网膜病变患者的玻璃体和血中的浓度变化, 并与血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 相比较, 从而阐明两者的关系。

**方法:** 增生性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 16 例, 视网膜分支静脉阻塞 5 例, 孔源性视网膜脱离 11 例和黄斑裂孔 10 例。抽取患者血液, 并于玻璃体切除手术中抽取玻璃体。Griess 反应检测 NO 的浓度, ELISA 检测 VEGF 的浓度。

**结果:** 玻璃体中 NO 浓度在 PDR 组中明显升高 (15.2, 4.6 ~ 50.9 μmol/L), 与其他 3 组相比具有统计学意义 ( $P = 0.0046$ ); 血液中的 NO 浓度在 4 组中无明显差异。玻璃体中的 VEGF 浓度在 PDR (1507.2, 50.7 ~ 3722.0 mg/L) 和 BRVO (838.8, 212.7 ~ 850.6 mg/L) 组中均明显升高, 与其他两组相比具有统计学意义 ( $P = 0.0008$ ), 而 PDR 组又高于 BRVO 组 ( $P = 0.001$ ); 各组病例血液中 VEGF 浓度无明显差异 ( $P = 0.76$ )。4 组病例中, NO 和 VEGF 间均未见相关性。

**结论:** NO 和 VEGF 在 PDR 组的玻璃体中均明显升高, 表明二者参与了糖尿病视网膜新生血管生成的过程。

**关键词:** 一氧化氮; 血管内皮生长因子; 玻璃体

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.08.010

张琼, 张士胜, 闫焱, 等. 缺氧性视网膜病变患者血及玻璃体中 NO 和 VEGF 浓度的变化. 国际眼科杂志 2010;10(8):1485-1487

## 0 引言

随着人民生活水平的提高、饮食结构的改变以及早产儿成活率的提高, 缺氧性视网膜病变, 如糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变、视网膜静脉阻塞等一些原本不重视的眼底疾病已逐渐成为人们致盲的主要原因。缺氧性视网膜病变的共同病理改变表现为新生血管形成及血管过度增生。研究表明, 在新生血管生成过程中, 有诸多细胞因子参与其中。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一种高度特异性血管内皮细胞有丝分裂素, 它是目前公认与新生血管过度增生相关的重

要因子。一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种重要的信使分子和生物活性物质,参与调节机体一系列生理活动<sup>[1]</sup>。有研究表明,在血管生成过程中,NO也参与了这个过程,并且和VEGF是起到相辅相成的作用。我们检测在缺氧性视网膜病变的患者眼中VEGF和NO浓度的变化,从而进一步证实NO和VEGF促新生血管生成的作用。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 2008-05/2009-10行玻璃体切除手术42例患者,其中增生性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)16例;视网膜分支静脉阻塞(branch retinal vein occlusion, BRVO)伴玻璃体出血5例;孔源性视网膜脱离11例;黄斑裂孔10例。患者既往均无手术史、外伤史。玻璃体出血的时间均在3mo以上。其中PDR患者仅有玻璃体出血而无视网膜脱离。BRVO者也是单纯玻璃体出血的患者。所有患者术前空腹抽取静脉血,随即在4℃下离心(15 000r/min)5min,提取上清液,置-80℃低温冰箱保存。患者在行玻璃体手术前,抽取术眼的未稀释的玻璃体液体1mL,随即离心15 000r/min,5min,提取上清液,置-80℃低温冰箱保存。

**1.2 方法** 用Griess法测定标本中NO的含量。采用双抗体夹心ELISA法检测样本中的VEGF的浓度。样本中的VEGF与酶标板上的抗人VEGF单抗结合,再与结合有生物素的抗人VEGF抗体结合,经辣根过氧化物酶标记的Streptavidin与生物素结合,与酶底物反应染色,在450nm测定与VEGF浓度相对应的A值。以标准品的A值画出标准曲线,根据样品A值在该曲线图上查出相应的VEGF含量。

统计学分析:采用SPSS 10.0统计分析软件进行多样本均数方差分析及两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

### 2 结果

**2.1 NO浓度** 玻璃体中NO浓度在PDR组中明显升高(15.2, 4.6~50.9 $\mu\text{mol/L}$ ),与其他3组相比具有统计学意义( $F = 5.13, P = 0.0046$ );血液中的NO浓度在四组中无明显差异( $F = 1.13, P = 0.35$ )。

**2.2 VEGF浓度** 玻璃体中的VEGF浓度在PDR(1507.2, 50.7~3722.0mg/L)和BRVO(838.8, 212.7~850.6mg/L)组中均明显升高,与其他两组相比具有统计学意义( $F = 6.84, P = 0.0008$ ),而PDR组又高于BRVO组( $t = 3.92, P = 0.001$ );各组病例血液中VEGF浓度无明显差异( $F = 0.38, P = 0.76$ )。在各组病例中,NO和VEGF均没有发现其相关性。

### 3 讨论

NO是一种半衰期仅为数秒钟的自由气体,作为一种重要的信使分子和生物活性物质,NO参与调节机体的一系列生理活动,其中还涉及新生血管生成等病理过程<sup>[1]</sup>。已有研究表明NO在血管生成中起着促进或抑制作用。我们采用Griess法检测了糖尿病视网膜病变等患者玻璃体和血清中NO的浓度。结果显示在血清中NO的浓度在四组中无明显差别( $F = 1.13, P = 0.35$ )。而在玻璃体中在PDR组中明显升高,与其它3组相比有临床意义( $F = 5.13, P = 0.0046$ )。因此证实了NO在糖尿病视网膜病变中新生血管形成过程中起着促血管的作用。这与Hernández的研究结果相同<sup>[2]</sup>。视网膜分支静脉阻塞也是一种缺氧性视网膜病变,而我们没有检测到NO的浓度明显升高,可能是由于临床标本量太少,所以没有检测到。在血液中4组NO的浓度没有明显差异,提示玻璃体中

NO并不是来源于血中NO的弥散。NO合成需要一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化。现已知至少有3种独立基因编码的NOS催化NO合成。神经元型NOS(nNOS)和内皮型NOS(eNOS)是结构型NOS(constitutive NOS),主要参与神经介质传导和调节血管张力等过程<sup>[3]</sup>;诱导型NOS(iNOS)主要表达于细胞因子或内毒素激活的巨噬细胞,所催化产生的NO是炎症和感染过程中重要的调节因子和效应物质<sup>[4]</sup>。在眼科领域,研究已经证明,内源性NO不仅是眼循环中有力的血管扩张剂,而且是内毒素诱导的前葡萄膜炎的重要媒介物,并与青光眼的发病机制有一定关系。iNOS在健康的组织内一般不表达或呈低表达,只有当机体出现病理情况下才大量表达。关于iNOS在血管形成方面的作用说法不一。iNOS抑制血管形成,而有的报道结果相反<sup>[5,6]</sup>。Hattenbach等<sup>[7]</sup>在老年性黄斑变性的患者中发现iNOS在脉络膜新生血管形成中具有举足轻重的地位。我们先前研究在OIR模型中也发现iNOS在缺氧2h时表达尤为明显,6h时开始下降,24h时回到接近正常水平。这提示了在缺氧早期,iNOS与VEGF一样立即出现明显的表达上调,是嗣后启动视网膜新生血管生成的早期分子事件,一定程度地促进了新生血管形成。并且通过运用抑制剂,进一步证明了iNOS作为促新生血管因子在视网膜新生血管中发挥作用<sup>[8]</sup>。由于在玻璃体中无法检测到iNOS的浓度,只能间接检测NO的浓度来证实其在视网膜新生血管形成中的作用。

VEGF是公认的促血管生成因子。我们发现,各组病例血液中VEGF浓度无明显差异( $P = 0.76$ )。玻璃体中的VEGF浓度在PDR组(1507.2mg/L)和BRVO(838.8mg/L)组中均明显升高,与其他两组相比具有统计学意义( $P = 0.0008$ )。提示了在缺氧性视网膜病变中VEGF的确是起到了促血管生成的作用。有很多研究也证实了这个结果<sup>[2,9]</sup>。我们的结果进一步显示,在PDR组中VEGF的浓度明显高于BRVO组的浓度( $P = 0.001$ )。这有可能有几种原因:(1)BRVO组的样本量太少;(2)VEGF在促新生血管形成中的作用大于NO的作用。这还需要进一步实验来证实。

在血管形成中NO和VEGF是密切相关的<sup>[10]</sup>。一方面,NO可以调节VEGF的合成;NO对VEGF的调节取决于NO产生数量的多少,少量的NO通过PI3K-Akt通路上调VEGF的表达,其间也要通过HIF-1和/或HO-1调节通路;而大量的NO则抑制VEGF的表达,但具体机制尚不明。另一方面,VEGF可以介导NO的合成:VEGF通过CaM-Akt通路迅速合成NO;而NO延迟合成主要是通过PKC的激活。但是我们的研究结果未找到VEGF和NO有联系。这有可能和NO的样本量较少有关或者是VEGF主要在玻璃体内合成有关。我们的研究结果证实,NO和VEGF在缺氧性视网膜病变患者的玻璃体中均明显升高,尤其在糖尿病视网膜病变中,提示了两者参与了视网膜新生血管形成的过程。

### 参考文献

- 1 Wilkinson-Berka JL. Vasoactive factors and diabetic retinopathy: vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2 and nitric oxide. *Curr Pharm Des* 2004;10(27):3331-3348
- 2 Hernández C, Lecube A, Segura RM, et al. Nitric oxide and vascular endothelial growth factor concentrations are increased but not related in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabet Med* 2002;19:655-660

3 Montgomery HJ, Bartlett R, Perdicakis B, et al. Activation of constitutive nitric oxide synthases by oxidized calmodulin mutants. *Biochemistry* 2003;42(25): 7759-7768  
4 Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004;75(6):639-653  
5 He T, Xing YQ, Zhao XH, et al. Interaction between iNOS and COX-2 in hypoxia-induced retinal neovascularization in mice. *Arch Med Res* 2007; 38: 807-815  
6 He T, Zhao XH, Xing YQ. Inducible nitric oxide synthase mediates hypoxia-induced hypoxia-inducible factor-1 alpha activation and vascular endothelial growth factor expression in oxygen-induced retinopathy. *Pathobiology* 2007; 74:336-343  
7 Hattenbach LO, Falk B, Nummerger F, et al. Detection of inducible

nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in choroidal neovascular membranes. *Ophthalmologica* 2002;216(3):209-214  
8 Zhang Q, Zhang JF, Guan Y, et al. Suppression of retinal neovascularization by the iNOS inhibitor aminoguanidine in mice of oxygen-induced retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247(7): 919-927  
9 Yokoi M, Yamagishi S, Takeuchi M, et al. Elevations of AGE and Vascular Endothelial growth factor with decreased total antioxidant status in the vitreous fluid of diabetic patients with retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2005;89:673-675  
10 Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Bioch Polon* 2003;50(1): 49-59

· 病例报告 ·

## 颈动脉海绵窦瘘误诊结膜炎 1 例

李金颖

作者单位:(157000)中国黑龙江省牡丹江市,牡丹江医学院附属医院眼病中心

作者简介:李金颖,女,硕士,副主任医师,副教授。

通讯作者:李金颖. lijinying@sogou.com

收稿日期:2010-03-22 修回日期:2010-05-10

李金颖. 颈动脉海绵窦瘘误诊结膜炎 1 例. 国际眼科杂志 2010; 10(8):1487

### 0 引言

颈动脉海绵窦瘘(carotid-cavernous sinus fistula, CCF)是颈内动脉、颈外动脉以及这两条动脉的任何分支与海绵窦直接、间接交通。本病常因眼结膜充血、眼球前突而首诊于眼科,由于部分医生经验不足而误诊其他疾病,现报道 1 例 CCF 误诊结膜炎。

### 1 病例报告

患者,女,42岁,主诉:右眼红 1a;既往史:无明确外伤史;现病史:患者 1a 前无诱因右眼红,曾于当地医院多次诊断“结膜炎”,并给予抗生素和激素类眼药水,反复治疗效果不明显。检查:右眼 0.8(不能矫正),左眼 1.0,眼压:右眼 24mmHg,左眼 19mmHg(1mmHg=0.133kPa),右眼球结膜充血,结膜下血管怒张弯曲,呈螺旋状,颜色鲜艳,角膜光泽,前房中深,瞳孔 3mm×3mm 大小,晶状体透明,眼底视盘界清,静脉扩张;左眼前后节无明显异常;双眼位

正,各方向运动自如;眼 CT 提示:右眼眼上静脉明显扩张,于眶尖呈管状高密度影。最后确诊:右颈动脉海绵窦瘘。转入外科行可脱球囊栓塞术。

### 2 讨论

海绵窦是由管腔大小不等的静脉组成静脉丛,眼上静脉、眼下静脉、碟顶窦静脉、外侧裂静脉和基底静脉汇入其中,引流至岩上窦和岩下窦,颈动脉从中通过,这是体内唯一动脉通过静脉的结构。当外伤或自发性原因形成 CCF,即颈动脉的血流入海绵窦,使窦内压力升高逆流回眼上静脉,就会出现以下临床表现:(1)球结膜血管扩张充血。(2)搏动性眼球突出及血管杂音。(3)眼底静脉增粗,个别病例眼球运动受限。此病的结膜充血以角膜缘为中心,向外呈放射状或螺旋状排列,且血管怒张颜色鲜艳,应注意和结膜炎、眶蜂窝织炎、甲状腺相关眼病鉴别。影像表现<sup>[1]</sup>:CT:眼上静脉不同程度扩张,于眶尖呈一管状高密度影,如同本例;MRI:扫描基本同 CT,增粗眼上静脉和海绵窦无信号;彩色超声多普勒(CDI):眼上静脉反向动脉化血流频谱;数字减影血管造影(DSA):动脉期可显示扩大的眼上静脉和海绵窦。值得一提眼 B 型超声检查特征性改变<sup>[2]</sup>:眼上静脉为圆形或椭圆形回声区,内界为弱或无回声,边界清晰,而且其无创伤性、价格低廉,因此可作为本病首选的影像学检查。

目前对 CCF 多采用介入方法治疗,从股动脉插管,在 X 线监视下经动脉或眼上静脉将可脱球囊、弹簧圈;线段等注入至海绵窦,使之阻塞瘘口,其治愈率高,并发症少。

### 参考文献

- 1 盛迅伦,孟瑞华,庄文娟. 眼科复杂疑难病症诊治精粹. 北京:人民军医出版社 2004:233-238
- 2 黄永志,孟丹,邓杰. 外伤性颈动脉-海绵窦漏 4 例超声特征. 国际眼科杂志 2009;9(9):1833-1834