

玻璃体腔注射 Bevacizumab 对 PDR 患者增殖膜中 CTGF 及 PEDF 的影响

孙磊¹, 陶勇²

基金项目:2014 年霍英东教育基金会第十四届高等院校青年教师基金基础性研究课题(No. 141038)

作者单位:¹(450000)中国河南省郑州市,黄河水利委员会黄河中心医院眼科;²(100020)中国北京市,首都医科大学附属北京朝阳医院眼科

作者简介:孙磊,男,本科,主治医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:孙磊. s9068633@163.com

收稿日期:2017-02-28 修回日期:2017-05-12

Effects of Bevacizumab on CTGF and PEDF in proliferative membrane in patients with PDR

Lei Sun¹, Yong Tao²

Foundation item: The 14th Young Teachers Foundation for Basic Research by Fok Ying Tung Education Foundation, 2014 (No. 141038)

¹Department of Ophthalmology, the Yellow River Central Hospital of the Yellow River Water Resources Commission, Zhengzhou 450000, Henan Province, China; ²Department of Ophthalmology, Beijing Chaoyang Hospital of Capital Medical University, Beijing 100020, China

Correspondence to: Lei Sun. Department of Ophthalmology, the Yellow River Central Hospital of the Yellow River Water Resources Commission, Zhengzhou 450000, Henan Province, China. s9068633@163.com

Received:2017-02-28 Accepted:2017-05-12

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of intravitreal injection of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drug Bevacizumab on connective tissue growth factor(CTGF) and pigment epithelium derived factor (PEDF) in proliferative membranes in patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR).

• **METHODS:** From January 2015 to December 2016, 117 patients (126 eyes) with PDR were analyzed using the case-control study. The selected cases were randomly divided into two groups, respectively, Group A of 60 cases (63 eyes) and Group B of 57 cases (63 eyes). The Group A was treated with vitrectomy alone, while the Group B received intravitreal injection of 0.05mL/1.25mg bevacizumab before vitrectomy. The peeled epiretinal membranes in patients were stained and then the histopathological changes were observed for primitive cells and angiogenesis, the expression of CTGF and

PEDF were tested.

• **RESULTS:** The expression of CTGF and PEDF in the proliferative membrane of the two groups were expressed in the cytoplasm. The Group A showed positive expression in 38 cases, the positive rate was 60.3%. Compared with Group A, the positive expression rate of CTGF in Group B (92.1%) was significantly higher ($P<0.05$). The positive expression rates of PEDF in the two groups were 90.5% and 95.2% respectively, and there was no significant difference between the two groups ($P>0.05$).

• **CONCLUSION:** In patients with PDR after intravitreal injection of bevacizumab, the retinal neovascularization is significantly reduced, which is conducive to vitrectomy. The positive expression rate of CTGF significantly increased in patients with PDR after intravitreal injection of bevacizumab, but there was no significant change in the expression of PEDF in the anterior membrane.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; connective tissue growth factor; pigment epithelium derived factor

Citation: Sun L, Tao Y. Effects of Bevacizumab on CTGF and PEDF in proliferative membrane in patients with PDR. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(6):1051-1054

摘要

目的:研究增殖性糖尿病视网膜病变(PDR)玻璃体腔注射抗-VEGF 药物 bevacizumab 后对增殖膜中结缔组织生长因子(CTGF)及色素上皮衍生因子(PEDF)的影响。

方法:回顾 2015-01/2016-12 入本院行增殖性糖尿病视网膜病变治疗的患者 117 例 126 眼,采用病例对照的研究方法,将所选病例随机分为两组,分别为 A 组 60 例 63 眼和 B 组 57 例 63 眼。其中 A 组单纯进行玻璃体切割手术,B 组患者在玻璃体切割术前玻璃体腔注射 0.05mL/1.25mg bevacizumab。在手术中剥离取用两组患者的视网膜增殖膜进行染色,然后进行组织病理学观察,观察两组患者视网膜增殖膜中原始细胞和新生血管的变化,以及患者增殖膜中 CTGF 和 PEDF 因子的表达。

结果:在对两组患者 CTGF、PEDF 因子表达进行观察发现,两组患者视网膜增殖膜中的 CTGF 和 PEDF 都在细胞质内表达。其中 A 组呈现出 38 眼阳性表达,阳性表达率为 60.3%,相比于 A 组而言,B 组的 CTGF 的阳性表达率 92.1% 明显更高,两组差异有统计学意义($P<0.05$)。而两组的 PEDF 阳性表达率分别为 90.5% 和 95.2%,差异无统计学意义($P>0.05$)。

结论:PDR 患者在玻璃体腔注射抗 VEGF 药物

bevacizumab后,视网膜的新生血管明显减少,有利于玻璃体切割手术的进行。且PDR患者玻璃体腔注射 bevacizumab后,CTGF的阳性表达率明显增高,而PEDF因子在前膜上的表达则没有明显的变化。

关键词:糖尿病视网膜病变;结缔组织生长因子;色素上皮衍生因子

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.6.10

引用:孙磊,陶勇.玻璃体腔注射 Bevacizumab对PDR患者增殖膜中CTGF及PEDF的影响.国际眼科杂志2017;17(6):1051-1054

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的常见并发症之一,是糖尿病导致内分泌及血液系统损坏和代谢紊乱在视网膜上的反应,具有高发病率和致盲率。其发病的基础是长期慢性高血糖症,同时代谢、内分泌和血液因素促使其发生并发展。随着我国人民生活水平的不断提高,糖尿病在我国已成为多发病,DR患者也在不断增加,已成为糖尿病患者致盲的首要原因^[1-2]。因此,寻求治愈DR的有效疗法已成为医学界迫切解决的课题。全视网膜光凝和玻璃体切割术是目前治疗增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)的常用手段,但是患者致盲的危险性依然很大。目前有很多文献报道, bevacizumab(贝伐单抗)在治疗PDR的临床实践中显示出了显著的辅助功能。大量实践证明,在PDR患者进行玻璃体切割术前,向其玻璃体腔注射 bevacizumab可以减少新生血管的活动,从而减少出血,提高手术的成功率。同时大量文献证明,很多生长因子在PDR的发生和发展中起到了重要的作用,其中结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)和色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)均和PDR有着密切关联^[3]。但是目前医学界对玻璃体切割术前注射 bevacizumab治疗PDR的方法的研究并没有完备,为了探究和寻求治疗PDR的有效疗法,特设立此项研究。

1 对象和方法

1.1 对象 回顾2015-01/2016-12到本院行增殖性糖尿病视网膜病变治疗的患者117例126眼,其中1型糖尿病患者30例33眼,2型糖尿病患者87例93眼,两组患者的PDR程度基本在同一水平,差异不具有统计学意义。其中男63例67眼,女54例59眼,年龄29~67(平均53.4±7.9)岁,血糖水平平均值为9.08±3.16mmol/L。将选取的PDR患者按照手术方式分为两组,单纯进行玻璃体切割术的患者为A组(60例63眼),其中男31例31眼,女29例32眼,年龄30~62(平均47.3±10.2)岁,血糖水平平均为9.01±3.17mmol/L。先进行玻璃体腔注射 bevacizumab再行玻璃体切割术的患者为B组(57例63眼),其中男32例36眼,女25例27眼,年龄31~66(平均51.3±11.2)岁,血糖水平平均值为9.11±3.14mmol/L。两组患者术前的视网膜状态无明显差异,且部分患者伴有玻璃体积血,并无视网膜脱落现象。本次研究已经伦理委员会同意,且在患者及其家属知情同意下完成。试验试剂: bevacizumab,美国Genentech公司生产;PEDF一抗及二抗(货号ANT-230,稀释比例1:50,二抗标记物为

荧光基因),北京中杉金桥公司生产;CTGF一抗及二抗(货号WLI5823,稀释比例1:50,二抗标记物为荧光基因),美国Abcam公司生产;PV9000试剂盒,北京中杉金桥公司生产。试验仪器:Olympus数码相机(日本);Leica EG 1150石蜡包埋机(德国);自动控温干燥箱(北京);Olympus BX51光学显微镜(日本)。

1.2 方法

1.2.1 试验方法 将患者按照手术方式分为A、B两组, A组患者(63眼)单纯进行玻璃体切割术, B组患者(63眼)于玻璃体切割术前7d进行玻璃体腔注射0.05mL/1.25mg bevacizumab。在手术时,剥离取用两组患者几乎同样大小的视网膜增殖膜,其中每位患者剥取4个样本,共504份,每位患者的血管和细胞数目取该患者4个样本观察数据的平均值。染色之后进行组织病理学检查。利用光镜观察两组患者视网膜增殖膜中原始细胞和新生血管的前后变化,统计其前后的细胞和血管数量。然后采用免疫组化技术检测增殖膜样本中CTGF和PEDF因子的表达,即利用免疫组织化学SP染色法。具体操作如下:(1)将B组患者的增殖膜组织切片放进烤箱中烘烤1h,然后利用蒸馏水冲洗,以PBS浸洗6min。(2)利用20g/L枸橼酸盐溶液在100℃下修复15min,再用30g/L双氧水溶液孵育10min。(3)将切片平均分为两组,一组滴加稀释比例为1:50的CTGF一抗稀释液,另一组滴加稀释比例为1:50的PEDF一抗稀释液,再用PBS浸洗6min。(4)分别滴加CTGF二抗和PEDF二抗,苏木精复染细胞核,流水冲洗6min后用盐酸酒精进行分色。(5)对切片进行梯度酒精脱水2min,二甲苯透明30min后,用中性树胶封片。然后在光学显微镜的200、400、500倍光镜下,对每张切片进行观察(图1~3),随机选取4个视野对细胞和血管进行计数。

1.2.2 结果判定标准 免疫组化技术检测判定中,细胞质中出现棕褐色颗粒定义为阳性。在光镜10个高倍视野下(×400),视野中阳性细胞≥5个,即判定为阳性。另外阳性的分级为:(-)无阳性细胞或阳性细胞占总细胞数的0~10%;(+)阳性细胞占总数的10%~<30%;(++)阳性细胞占总数的30%~<50%;(+++)阳性细胞占总数的比例≥50%^[4]。

疗效标准:参考《临床研究指导标准原则》^[5]的相关内容,其中临床缓解:主要症状基本消失,主要化验指标恢复正常;显效:主要症状好转,主要化验指标趋于正常;有效:主要症状有所缓解,主要化验指标数值有所下降;无效:未达到以上标准的效果且有加重。有效率=(临床缓解眼数+显效眼数+有效眼数)/总眼数×100%。

统计学分析:采用SPSS20.0统计软件对数据进行分析。计量资料使用 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用独立样本 t 检验,计数资料使用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CTGF因子在两组样本膜中的表达 CTGF的阳性表达定位在细胞质内,多围绕着新生血管呈局灶性分布。在B组患者的视网膜中有58眼阳性表达,且阳性表达率约为92.1%。而A组中呈现出38眼阳性表达,且阳性表达率为60.3%,可见B组的CTGF阳性表达率明显高于A组,两组阳性表达率的差异有统计学意义($\chi^2=9.211, P<0.05$),见表1。

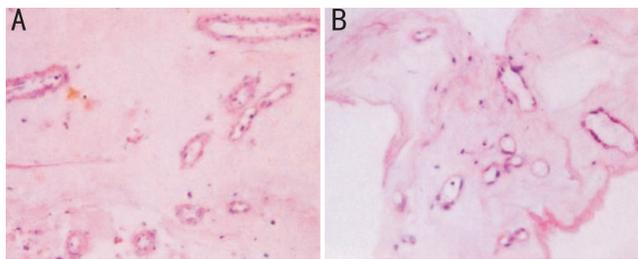


图1 两组患者新生血管情况(HE×200) A组:单纯进行玻璃体切割术的患者;B组:先进行玻璃体腔注射 Bevacizumab,再行玻璃体切割术的患者。

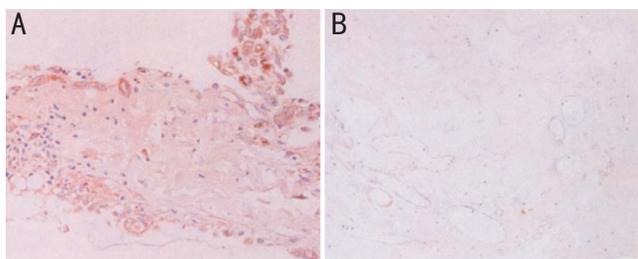


图2 两组 CTGF 因子的表达(HE×400) A组:单纯进行玻璃体切割术的患者;B组:先进行玻璃体腔注射 Bevacizumab,再行玻璃体切割术的患者。

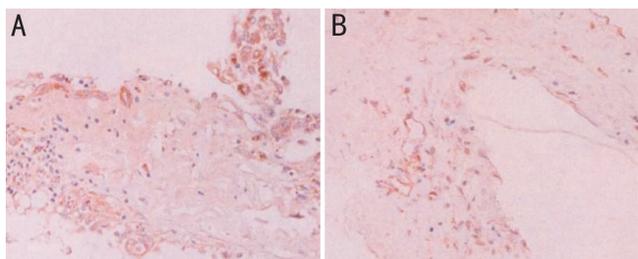


图3 两组患者 PEDF 因子的表达(HE×500) A组:单纯进行玻璃体切割术的患者;B组:先进行玻璃体腔注射 Bevacizumab,再行玻璃体切割术的患者。

表1 CTGF 在两组样本膜中的表达

组别	眼数	表达结果(眼)				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
A组	63	25	14	9	15	60.3
B组	63	5	9	18	31	92.1

注:A组:单纯进行玻璃体切割术的患者;B组:先进行玻璃体腔注射 bevacizumab,再行玻璃体切割术的患者。

2.2 PEDF 因子在两组样本膜中的表达 观察发现, PEDF 的阳性表达主要呈现在细胞外基质和围绕新生血管的纤维组织中,而在新生血管内皮细胞中几乎不表达。结果可见 B 组的阳性表达率和 A 组的差异均不明显,两组的差异无统计学意义($\chi^2 = 3.184, P > 0.05$),见表 2。

2.3 视网膜前膜的组织病理学检查 对两组患者视网膜前膜的病理学检查显示, A 组患者的血管内皮细胞数目为 73.87 ± 15.39 个,原始组织细胞数目为 25.23 ± 4.76 个,新生血管数目为 8.32 ± 2.30 个; B 组患者的血管内皮细胞为 26.11 ± 4.34 个,原始组织细胞数目为 18.34 ± 3.58 个,新生血管数目为 3.56 ± 1.18 个。可见 A 组的血管内皮细胞、原始组织细胞和新生血管数目均高于 B 组,差异具有统计学意义($t = 4.564, 2.647, 7.532; P = 0.001, 0.004, 0.001$)。

表2 PEDF 在两组样本膜上的表达

组别	眼数	表达结果(眼)				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
A组	63	6	15	24	18	90.5
B组	63	3	8	24	28	95.2

注:A组:单纯进行玻璃体切割术的患者;B组:先进行玻璃体腔注射 Bevacizumab,再行玻璃体切割术的患者。

表3 两组患者临床疗效的比较

组别	眼数	临床缓解	显效	有效	无效	有效率(%)
A组	63	14	16	15	18	71.4
B组	63	20	22	16	5	92.1

注:A组:单纯进行玻璃体切割术的患者;B组:先进行玻璃体腔注射 Bevacizumab,再行玻璃体切割术的患者。

2.4 两组患者临床疗效的比较 两组患者在进行分别治疗后,临床疗效呈现出了显著的差异, B 组的治疗有效率 92.1% 明显高于 A 组的 71.4%, 差异有统计学意义($\chi^2 = 4.381, P < 0.05$, 表 3)。这表明玻璃体切割术前玻璃体腔注射 bevacizumab 对 PDR 患者的治疗具有显著的疗效。

3 讨论

DR 是导致失明的一种常见且严重的眼底病变,可分为非增生型和增生型,其中 PDR 致盲的危险性更高^[6]。PDR 患者分布广泛,且发病率较高。因其对视力功能会造成不可逆转的损害,常会给患者的工作和生活带来极大的困扰^[7-8]。在各种 DM 患者里,DR 的患病率为 24% ~ 70%,已成为糖尿病患者致盲的首要原因。PDR 的病理机制大致就是因为眼内新生血管形成,且随之相伴的渗血和增生破坏了眼的结构和功能,从而造成了视力障碍。因此血管刺激因素和抑制因素的失衡是 PDR 发生发展的根源。而 PDR 患者致盲则是因为玻璃体内新生血管的生成,使视网膜形成增生膜导致玻璃体积血。大量文献报告显示,抗 VEGF 药物贝伐单抗可以起到明显的抑制作用,会使新生血管减少,从而辅助并提高玻璃体切割术的成功率。Bevacizumab 是一种单克隆全长抗体,可以通过和 VEGF 的异构体及活性降解物结合的作用,重组人的 VEGF。它能阻止 VEGF 和其他受体的结合,抑制其生物活性,从而减少了新生血管的生成^[9-10]。目前的临床实践中,当 DR 进入增生前期和增生期时,视网膜光凝和玻璃体切割手术成为常用的治疗手段。其中全视网膜光凝是目前治疗增生期 DR 的最主要方法。已有大量学者的研究表明,一些生长因子在 PDR 的发生发展中起到了很大的作用, PEDF 是一种典型的血管抑制因子,而 CTGF 则是眼内一种重要的促纤维因子,两种因子都和 PDR 的生长和发展有着密切的联系^[11-12]。CTGF 广泛存在于人体的各组织器官,根据部位的不同,其所表现的作用也不同。CTGF 的主要作用表现为促进细胞的有丝分裂及增生,另外还可以调节生成细胞,促使细胞凋亡等作用,但一般 CTGF 的表达很低,高表达则可能说明与抗 VEGF 后的增殖有关,这对注射后手术时间选择有重要的指导作用^[13-15]。但是具体的关系和机制尚无权威的论断,可是目前 PDR 的高发病率和高致盲率严重地威胁到了人类的生命和身体健康,因此对 PDR 的发生机制及诊断治疗的研究已成为临床急需解决的重大课题。

本项试验就立足于探究这些生长因子对治疗 PDR 的可能机制,采用病例对照法,两组患者在接受分别治疗后,对其相关指标及疗效进行观察研究。结果表明 B 组的 CTGF 阳性表达率明显高于 A 组,而两组的 PEDF 阳性表达差异则无统计学意义,且 B 组的新生血管数目显著少于 A 组,差异具有统计学意义。同时两组患者的术后疗效对比表明,B 组的治疗有效率 92.1% 明显高于 A 组的 71.4%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。可见玻璃体切割术前玻璃体腔注射 bevacizumab 对 PDR 患者的治疗具有显著的疗效。可是在临床的具体操作时,我们发现 B 组患者在玻璃体腔注射 bevacizumab 后,新生血管确实大量减少,可是视网膜增殖膜有增加的趋势,也确实给手术带来了诸多不便。根据我们的推断,由于 CTGF 是眼中一种重要的促纤维因子,当 B 组患者的 CTGF 表达率更高的情况下,CTGF 极有可能促使了眼部细胞的有丝分裂和增生,从而导致了视网膜增殖膜的增加。因为目前没有直接的实验依据,其机制还有待于我们的进一步探究。

综上所述,当 PDR 患者在玻璃体腔注射 bevacizumab 后再进行玻璃体切割术,其视网膜增殖膜的血管内皮细胞、原始组织细胞和新生血管数目均有所减少,这有利于手术的效果,并大大提高了手术成功率。同时患者增殖膜中 CTGF 的阳性表达明显增高,但 PEDF 的表达没有明显差异。表明抗 VEGF 药物 bevacizumab 对患者增殖膜中的 PEDF 无明显影响,但却可以令 CTGF 的阳性表达增高。总之,玻璃体腔注射抗 VEGF 药物 bevacizumab 可显著改善患者的病情,且有利于提高玻璃体切割术的成功率和效果。

参考文献

1 单俊杰,袁志兰,曹国平.玻璃体腔注射贝伐单抗 Bevacizumab 后糖尿病视网膜患者血清中 VEGF 含量的变化研究.临床眼科杂志 2015;17(4):333-335

- 2 许菲,邢怡桥,陈长征,等.贝伐单抗辅助玻璃体切除术治疗增生性糖尿病视网膜病变.武汉大学学报医学版 2016;31(1):107-110
- 3 胡博杰,曾勃,刘新玲,等. Bevacizumab 玻璃体腔注射后糖尿病视网膜病变增生膜中细胞因子的变化.中华实验眼科杂志 2015;31(1):55-59
- 4 刘身文,秦波,郭慧,等.增生性糖尿病视网膜病变玻璃体切除术前不同时期注射贝伐单抗的临床观察.国际眼科杂志 2015;15(7):1408-1410
- 5 王小敏,陈悦.增殖性糖尿病性视网膜病变患者血清及玻璃体中 PEDF 和 Ang II 的表达.郑州大学学报(医学版) 2014;13(1):129-131
- 6 惠延年,王琳,王英,等.增殖性糖尿病视网膜病变的玻璃体手术和光凝治疗.眼科学报 2015;12(4):241-244
- 7 彭超,王立,陈惠莉,等.玻璃体切除治疗增生性糖尿病视网膜病变.国际眼科杂志 2015;15(10):2122-2123
- 8 Chen YS. Correlation in the expression of PEDF, VEGF and CTGF in patients with fatty liver. *J Modern Laboratory Med* 2015;3(10):45-56
- 9 Haurigot V, Villacampa P, Ribera A, et al. Long-term retinal PEDF overexpression prevents neovascularization in a murine adult model of retinopathy. *Plos One* 2015; 7(7):115-120
- 10 Markowska AI, Cao Z, Panjwani N. Glycobiology of ocular angiogenesis. *Glycobiology* 2015;24(12):1275-1282
- 11 Finger PT. Anti-VEGF Bevacizumab for radiation optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* 2016;143(2):335-338
- 12 Manzoni M, Rovati B, Delfanti S, et al. Correlation of immunological effects of anti-VEGF therapy with progression-free survival of advanced colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2015;12(2):12-30
- 13 Chuang LH, Wang NK, Chen YP, et al. Mature vessel occlusion after anti-VEGF treatment in a retinal arteriovenous malformation. *BMC Ophthalmol* 2014;13(1):60-65
- 14 Yang L, He CH, Liu WX, et al. Relationship between VEGF and PEDF gene polymorphisms and proliferative diabetic retinopathy. *J Chronic Diseases* 2014;5(1):8-12
- 15 Geest RJV. The role of CTGF in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res* 2015;133(7):37-48