

小鼠视网膜血管内皮细胞生长因子与视网膜新生血管的相关性研究

胡金芳, 邸志权, 霍璇, 申秀萍

天津药物研究院 天津市新药安全评价研究中心, 天津 300193

摘要: **目的** 研究氧诱导视网膜新生血管小鼠模型中视网膜血管内皮细胞生长因子(VEGF)与视网膜新生血管的相关性。**方法** 通过建立氧诱导视网膜新生血管小鼠模型, 分别于12、14、17、21 d龄随机抽取2组幼鼠各6只, 一侧眼球测定视网膜VEGF水平, 另一侧眼球进行视网膜铺片、ADP酶染色, 考察其相关性。**结果** 模型组小鼠左眼球ADP酶染色结果显示, 模型组12 d龄小鼠血管迂曲、扩张、变形, 随时间延长血管变形加重, 17 d时最严重, 且视乳头周围出现大片无灌注区, 视网膜周边可见大量新生血管生成, 到21 d时模型开始恢复。视网膜VEGF测定结果显示, 12 d龄模型小鼠VEGF开始升高, 17 d达峰值, 以后下降。**结论** 视网膜VEGF变化和视网膜血管形态具有很好的正相关性, 17 d时新生血管形成最多。

关键词: 氧; ADP酶染色; 血管内皮细胞生长因子(VEGF); 视网膜新生血管

中图分类号: R988.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)04-0250-03

Correlation between retinal vascular endothelial growth factor and retinal neovascularization in mice

HU Jin-fang, DI Zhi-quan, HUO Xuan, SHEN Xiu-ping

Tianjin Centre for Drug Safety Assessment and Research, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To study the correlation between retinal vascular endothelial growth factor (VEGF) level and retinal neovascularization in oxygen-induced retinal neovascularization model of mice. **Methods** The oxygen-induced retinal neovascularization model of mice was established and two groups of six mice for each group were randomly selected at 12, 14, 17, and 21 d age, respectively. The retinal VEGF in one side of the eyeballs was detected, the retinal sect serial sections and ADPase staining were carried out in the other side of the eyeballs, and the relevance was studied. **Results** In the model group, ADPase staining showed a pattern of pathological retinal neovascularization such as tortuous, dilated, and deformed blood vessels at 12 d age, and the deformation was aggravated with time. The most serious deformation was at 17 d age, and there were large nonperfused areas around discus opticus. A large number of new blood vessels were generated visibly in the peripheral retinal areas and the model began to recover at 21 d age. The retinal VEGF levels started to increase at 12 d age, reached the peak at 17 d age, and declined after that. **Conclusion** The retinal VEGF levels and the retinal vascular morphology have a positive correlation and neovascularization is the most serious at 17 d age.

Key words: oxygen; ADPase staining; vascular endothelial growth factor (VEGF); retinal neovascularization

血管内皮细胞生长因子(VEGF)是一种主要刺激血管内皮细胞增殖和新生血管形成的细胞因子, 在视网膜新生血管生成过程中起着“扳机”样作用^[1-3], 本实验利用VEGF在氧诱导视网膜新生血管小鼠模型中的变化反映新生血管的发生发展过程, 研究视网膜VEGF水平变化与视网膜血管形态的相关性, 为后期该类疾病的研究奠定基础。

1 材料

1.1 试剂和动物^[4]

小鼠VEGF, 批号278834, R&D systems; Tris, 批号20070611, 天津市博迪化工有限公司生产; 马来酸, 批号20061226, 天津市光复精细化工研究所生产; NaOH, 批号20100801, 天津市凯信化学工业有限公司生产; 硝酸铅, 批号20110104, 天津市光复精细化工研究所生产; ADP Na₂, 批号A2754,

收稿日期: 2012-05-02

作者简介: 胡金芳(1980—), 女, 助理研究员, 主要从事药理、毒理学研究。Tel: (022)84845247 E-mail: hujf@tjpr.com

Sigma 公司生产;氯化镁,批号 20080920,天津市光复精细化工研究所生产。

C₅₇BL/6J 乳鼠 (SPF 级),北京华阜康生物科技股份有限公司,生产许可证 SCXK(京)2009-0004,动物质量合格证号 0209896, 0212225。饲养在有中央空调的观察室(津实设施准第 012 号,符合屏障级标准)中,小鼠饲料为天津市华荣实验动物科技有限公司提供,饮纯净水。

1.2 仪器

Olympus BH-2 普通光学显微镜,日本 Olympus 公司;Olympus DP71 病理显微摄影,日本 Olympus 光学工业株式会社。

2 方法

2.1 视网膜新生血管小鼠模型的建立^[4]

取 4 窝 24 只 C₅₇BL/6J 幼鼠,2 d 龄时合笼饲养,7 d 龄时由 2 只母鼠和幼鼠进入氧箱,另 2 只母鼠放在正常室内空气中饲养。饲养期间氧气的流量控制为 0.50~0.75 L/min,容器内氧气体积浓度为 (75±2)%,每天打开氧箱更换垫料、加食、换水、替换母鼠。用测氧仪间断监测容器内的氧浓度,每天 4~6 次,室温控制在 (23±2)℃,在此高氧环境中饲养 5 d,5 d 后(即 12 d 龄)将幼鼠放回正常空气环境中,以诱导小鼠视网膜新生血管产生,由

4 只母鼠共同喂养。对照组:2 窝 12 只幼鼠在正常空气环境下生长,室温控制在 (23±2)℃。

2.2 取材

分别于 12、14、17、21 d 龄随机抽取模型组幼鼠各 6 只,于 12、17 d 龄随机抽取对照组幼鼠各 6 只,摘取眼球,左眼球置于 4% 的多聚甲醛中固定,4℃ 保存,进行视网膜铺片、ADP 酶染色,右侧眼球置于 -20℃ 中保存,用于测定视网膜 VEGF 含量变化,考察其相关性。

2.3 右眼球 VEGF 测定

将左眼球用生理盐水制成 5% 组织匀浆液,用 R&D systems 生产的小鼠 VEGF ELISA 试剂盒测定组织中 VEGF 水平。

3 结果

3.1 左眼球视网膜铺片、ADP 酶血管染色^[4]

由图 1 可见,对照组视网膜血管以视盘为中心呈放射状排列直至周边,末梢分支变细与侧支分出的毛细血管相互吻合,形成密集的毛细血管网,走形自然,分布均匀,呈两层分布,无血管闭塞,而模型组 12 d 龄小鼠视网膜血管迂曲、扩张、变形,随着时间的增加,血管变形加重,17 d 时最严重,且视乳头周围出现大片灌注区,视网膜周边可见大量的新生血管生成,到 21 d 时模型开始恢复。

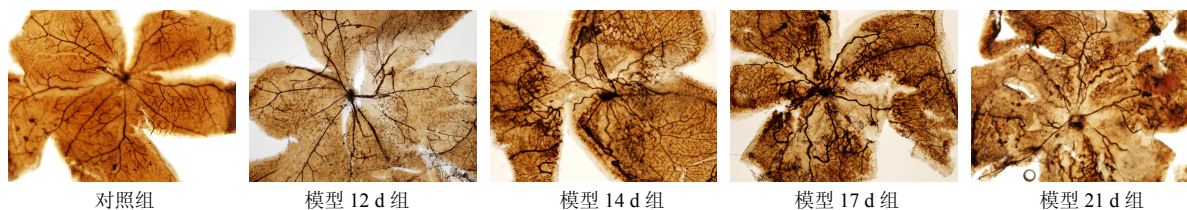


图 1 对照组和模型组的视网膜血管形态 (ADP 酶染色)

Fig. 1 Retinal blood vessel forms of mice in control group and model group (ADPase staining)

3.2 右眼球 VEGF 测定

由表 1 可见,视网膜 VEGF 变化显示,12 d 龄 VEGF 开始升高,17 d 龄达峰值,21 d 龄后逐渐下降,与对照组比较,不同日龄的模型组小鼠右眼球 VEGF 水平均差异显著 ($P<0.001$, $P<0.01$)。

4 讨论

在新生血管性视网膜病中,初期新生血管增殖活跃,这些脆性的新血管导致玻璃体出血或液体渗出而视力下降。随着病变发展,或视网膜光凝后,增殖的血管开始纤维变性和卷曲,从而牵引视网膜导致视网膜脱离等并发症的发生,直至视力丧失。

表 1 视网膜组织中 VEGF 的变化规律 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Variation of retinal VEGF ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分组	VEGF/ (pg·mL ⁻¹)
对照组 12 d	75.71±21.25
对照组 17 d	75.93±19.68
模型组 12 d	125.14±13.23 ^{△△△}
14 d	153.88±13.41 ^{△△△}
17 d	174.88±33.35 ^{△△△}
21 d	131.66±26.26 ^{△△}

与对照组 17 d 比较: ^{△△} $P<0.01$, ^{△△△} $P<0.001$

^{△△} $P<0.01$, ^{△△△} $P<0.001$ vs 17 d control group

及时地抑制这些生长因子有可能阻止疾病的进展^[5]。近年来,大量研究证实,VEGF在缺血性视网膜病变的新生血管形成过程中具有重要作用,VEGF最主要的作用是可以促进动脉、静脉,以及淋巴管来源的内皮细胞有丝分裂,血管内皮细胞是VEGF发挥作用的主要靶细胞^[2],这一作用与血管的新生有直接联系。VEGF是一种与血管增殖密切相关的多肽类生长因子,是最直接的血管内皮细胞促分裂素,并且作为血管生成旁分泌刺激因子而被分泌。其表达受多种因素的调节,其中组织的缺血缺氧最为重要。视网膜缺血时释放的新生血管因子是导致视网膜异常增殖和新生血管形成的主要原因^[5-6]。VEGF除具有促使生理性和病理性的血管生成及内皮细胞增殖的功能外,还可增加血管的通透性,促进内皮细胞间质的胶原酶的表达,促进血浆纤维蛋白原的外渗,导致纤维蛋白原的沉积。因此一直以来科学家们开发视网膜新生血管生物药物时都将VEGF当作潜在的治疗靶标,抗VEGF也被认为是临床抗血管生成治疗具有良好前景的策略。

只有明确VEGF的表达趋势,才能有针对性的采取措施,来抑制其表达,从而为临床治疗视网膜新生血管性疾病奠定基础。本文利用VEGF在高氧诱导鼠视网膜病变中的变化反映新生血管的发生发展过程,且视网膜VEGF含量变化和视网膜血管形态具有很好的正相关性,且在17 d龄新生血管最多。

本实验通过氧诱导新生血管小鼠模型,进行ADP酶染色和测定视网膜VEGF变化,视网膜VEGF变化和视网膜血管形态具有很好的正相关性,且在17 d龄新生血管形成最多。因此,根据以上结果认为VEGF是视网膜新生血管形成的主要因子,在其高峰之前抑制其表达,可以减少视网膜新生血管的形成,为抗VEGF的治疗时机的选择奠定了基础。

参考文献

- [1] 李养军,惠延年. IGF-1对视网膜新生血管形成的调控及其信号转导机制[J]. 国际眼科杂志, 2005, 5(5): 999-1005.
- [2] 刘元标. 血管内皮生长因子与血管新生[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 19(5): 396-400.
- [3] Aiello L P, Avery R L, Arrigg P G, *et al.* Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders [J]. *N Engl J Med*, 1994, 331: 1480-1487.
- [4] 胡金芳,刘兆凤,霍璇,等. 氧诱导视网膜新生血管小鼠模型的建立与特点[J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 353-355.
- [5] 李贞,倪卫杰. 视网膜新生血管生物药物治疗研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2007, 7(4):1119-1123.
- [6] 谢秀雯,周建强,崔红平. VEGF在糖尿病视网膜病变发病机制中作用的研究新进展[J]. 国际眼科杂志, 2011, 11(2): 282-285.