

· 实验研究 ·

血管内皮生长因子 mRNA 在高氧诱导 新生鼠视网膜异常新生血管化模型中的表达

张志华¹, 蒋犁¹, 乔立兴²

(1. 东南大学临床医学院, 江苏 南京 210009; 2. 东南大学医学院附属中大医院儿科, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的 分析血管内皮生长因子(VEGF)在高氧诱导视网膜异常新生血管化大鼠模型中的表达变化,探讨 VEGF 在高氧诱导视网膜新生血管化进程中所起的作用。方法 150 只 SD 新生大鼠随机分为氧诱导模型组和正常对照组,各 75 只。氧诱导模型组大鼠吸入浓度 $(80 \pm 2)\%$ 7 d,随后在正常空气环境。视网膜铺片 ADP 酶染色了解视网膜血管形态改变;常规苏木精-伊红染色定量反映视网膜血管增生情况,判断建模成功。半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)定量反映视网膜 VEGF mRNA 转录水平的变化。结果 氧诱导模型组 7 日龄时视网膜血管明显收缩、阻塞,出现大片无灌注区;14 日龄见新生血管形成;苏木精-伊红染色见模型组 14 日龄大鼠视网膜出现较多新生血管内皮细胞核;RT-PCR 结果显示,氧诱导模型组 7 d 时 VEGF mRNA 转录水平明显低于对照组,停氧后逐渐增强。VEGF mRNA 的表达在新生血管发生前升高,随新生血管退化逐渐下降。结论 未成熟视网膜 VEGF mRNA 的转录水平与组织氧状态呈密切负性相关关系;停氧后视网膜的相对缺氧导致 VEGF mRNA 转录上调,促使视网膜血管病理性增生。VEGF 的异常表达在 ROP 的新生血管化进程中起重要作用。

[中国当代儿科杂志,2007,9(4):371-374]

[关键词] 血管内皮生长因子;基因表达;视网膜病;视网膜新生血管化;新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)04-0371-04

Expression of mRNA of vascular endothelial growth factor in a rat model of hyperoxia-induced retinopathy

ZHANG Zhi-Hua, JIANG Li, QIAO Li-Xing. Medical College of Southeast University, Nanjing 210009, China (Jiang L, Email: jiangli7@sohu.com)

Abstract: Objective To examine the expression of mRNA of vascular endothelial growth factor (VEGF) in a rat model of hyperoxia-induced retinopathy and to investigate the role of VEGF in the process of neovascularization in retinopathy. **Methods** One hundred fifty one-day-old neonatal Sprague-Dawley rats were randomly divided into hyperoxia-induced retinopathy and normal control groups. The rats in the retinopathy group were exposed to $(80 \pm 2)\%$ oxygen for 7 days and then replaced by room air. The rats in the control group were exposed to room air all the time of the experiment. The morphologic changes of retinal vessels were estimated by observing the vascular pattern in adenosine diphosphate ase (ADPase) stained retina flat mounts. The newborn vessels were quantified by haematoxylin and eosin staining. Reversal transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the VEGF mRNA expression. **Results** In the retinopathy group at 7 days of age, most of central radial vessels became constricted and blocked, and central perfusion decreased obviously. After switching to room air exposure for 7 days (14 days of age), noticeable retinal neovascularization appeared. The expression of VEGF mRNA in the retinopathy group at 7 days of hyperoxia exposure was noticeably lower than in the control group, and increased gradually after switching to room air exposure. At 9 and 14 days of age, the expression of VEGF mRNA in the retinopathy group was noticeably higher than in the control group. The expression of retinal VEGF mRNA in the retinopathy group increased before neovascularization occurred, and decreased with regression of new vessels. **Conclusions** Hyperoxia exposure may decrease the transcription of VEGF mRNA and the growth of retinal blood vessels. The relative hypoxia after hyperoxia withdrawal can up-regulate the transcription of VEGF mRNA, resulting in a significant retinal neovascularization. The abnormal expression of VEGF in the retina may play an important role in the development of neovascularization in retinopathy.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9 (4):371-374]

Key words: Vascular endothelial growth factor; Gene expression; Retinopathy; Retinal neovascularization; Neonatal rats

[收稿日期]2006-12-30;[修回日期]2007-02-28

[基金项目]江苏省卫生厅科学基金资助项目(NO. H200635)。

[作者简介]张志华,女,硕士,医师。主攻方向:早产儿视网膜病变发病机制的研究。

[通讯作者]蒋犁,教授,硕士生导师,东南大学临床医学院。邮编:210009。

早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP) 目前已成为世界范围内儿童致盲的重要原因,近年来因 ROP 致盲的数量逐渐增加,约占儿童致盲原因的 6% ~ 18%^[1]。大量研究表明:吸氧浓度高及吸氧持续时间长等因素是导致 ROP 的重要原因之一。其病理特征主要为视网膜缺氧缺血和新生血管形成。在血管生长过程中,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前发现的作用最强的新生血管促进因子,起中心调控作用,对视网膜新生血管发生起着重要的中心调控作用。氧诱导视网膜异常新生血管化大鼠模型是 ROP 的主要模型之一,我们通过建立大鼠模型,采用 ADP 酶染色、苏木精-伊红染色、半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)等方法,动态观察高氧诱导下视网膜新生血管化的发展进程及 VEGF mRNA 在视网膜中的表达变化规律,探讨 VEGF 在 ROP 新生血管化进程中所起的可能作用以及 ROP 新生血管化的可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物与材料

选择普通级健康 SD 新生大鼠,性别不限,与哺乳母鼠同笼饲养。鼠种由复旦大学医学院提供,饲养于东南大学实验动物中心。VEGF 的上游引物序列:5'-CGTGAGAAGGGGAGC-3',下游引物序列:5'-GCAAGTACGTAGGTT-3',产物长度 460 bp;内参 β -肌动蛋白(β -actin)的上游引物序列 5'-ATGCCAAGCTGCGTCTGGACCTGGC-3',下游引物序列 5'-AGCATTACCGGTGCACGATGGAGGG-3',产物长度 606 bp。引物及 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0 试剂盒由上海生工生物工程公司合成购买。

1.2 动物模型制作与分组

模型组:幼鼠刚出生时作为生后第 1 天。1 日龄幼鼠与哺乳母鼠一起放入自制的密闭玻璃容器,调节氧流量,保持容器内氧浓度为 $(80 \pm 2)\%$,期间用测氧仪监测容器内氧浓度,控制室温 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照时间 12 h/天。在此高氧环境中生长 7 d 后,回到空气中饲养。

对照组:生后 1 d 的幼鼠,与哺乳母鼠一起置于 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的室内空气环境饲养。

两组又各分为 7 d, 9 d 和 14 d 共计 3 个亚组, 7 d, 14 d 亚组各取 10 只新生大鼠眼球,进行视网膜铺片行 ADP 酶染色;14 d 亚组各取 10 只新生大鼠眼球,行石蜡包埋,常规切片苏木精-伊红染色;

7 d, 9 d, 14 d 亚组另各取 10 只新生大鼠眼球,行 RT-PCR 实验。

1.3 实验方法

1.3.1 ADP 酶染色 麻醉:腹腔注射 5% 戊巴比妥 (0.01 mL/g) 。固定:摘除眼球,4% 多聚甲醛溶液 4°C 固定 4 h。取材:手术显微镜下,将视网膜以视乳头为中心做 4 ~ 5 个放射状切开,去除角膜、巩膜、脉络膜、视网膜色素上皮层。漂洗:浓度为 0.05 mol/L 、pH 值 7.2 的 Tris 马来酸缓冲液冲洗 5 次,每次 15 min。孵育: 37°C 反应液中孵育 15 min。显色:10% 硫化铵反应 5 min。铺片,光镜下观察结果。

1.3.2 半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

逆转录反应体系: MgCl_2 $4 \mu\text{L}$, 10 倍 RTbuffer $2 \mu\text{L}$, 去 RNA 酶水 $5.5 \mu\text{L}$, 脱氧核糖核苷酸混合物 $2 \mu\text{L}$, RNA 酶抑制剂 $0.5 \mu\text{L}$, AMVRT $1 \mu\text{L}$, 寡核苷酸结合引物 $1 \mu\text{L}$, 组织总 RNA $4 \mu\text{L}$, 共 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件: 42°C 30 min, 99°C 5 min, 5°C 5 min, 1 个循环。PCR 反应体系:cDNA 产物 $5 \mu\text{L}$, 5 倍 PCR buffer $5 \mu\text{L}$, rTaq 酶 $0.25 \mu\text{L}$, 脱氧核糖核苷酸混合物 $0.25 \mu\text{L}$, 上、下游引物各 $1 \mu\text{L}$, 灭菌蒸馏水 $12.5 \mu\text{L}$, 共 $25 \mu\text{L}$ 。反应条件: 94°C 2 min, 一个循环; 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 60 s, 共 32 个循环, 72°C 7 min。产物检测:取各组 PCR 产物 $5 \mu\text{L}$, 在含 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像系统行灰度扫描,记录 VEGF 及相应 β -actin 的光密度比值(A 值),进行分析。

1.3.3 视网膜新生血管内皮细胞核计数 每只眼球行 $6 \mu\text{m}$ 切片,每隔 10 张切片取 1 张,共取 10 张切片供病理检查,计数与内界膜有紧密联系的血管内皮细胞核,不包括玻璃体腔内其他与内界膜无联系的血管内皮细胞核。统计平均每只眼球每张切片突破内界膜的血管内皮细胞核数。

1.4 统计学处理

数据以均值($\bar{x} \pm s$)表示 SPSS11.5 软件进行两组间 t 检验,各组间行方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 视网膜血管形态变化

对照组:幼鼠生后第 7 天视网膜血管以视乳头为中心,呈放射状均匀分布,管径较粗,视乳头周边可见清晰毛细血管网结构。14 d 时成熟的毛细血管网覆盖整个视网膜,自视盘发出的大血管呈放射

状均匀分布至视网膜周边,血管网深浅层结构清晰,表层血管呈均匀放射状,深层血管呈多角性网状结构。模型组:幼鼠生后第7天视乳头周边几乎无毛细血管,血管走行僵直、分支减少,中央部现大片无灌注区。14天时,视网膜大量新生血管形成,血管密度增高,结构及分布紊乱,丧失了正常的放射状及多角形结构,视网膜仍有无灌注区。见图1。

2.2 高氧诱导视网膜血管异常增生的定量结果

模型组14日龄苏木精-伊红染色切片有较多突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核,平均每张切片血管内皮细胞核数为 (54.67 ± 2.16) 个。而对照组苏木精-伊红染色切片未见或极少见突破内界膜的血管内皮细胞核 (0.87 ± 0.05) 个,二者差异有显著性($t=18.47$, $P<0.01$)。

2.3 VEGF mRNA 在不同天数幼鼠视网膜中的转录水平

7日龄模型组视网膜 VEGF mRNA 的转录水平比对照组低,停氧后第2天(即9日龄),模型组 VEGF mRNA 的转录水平升高,比对照组明显上调。停氧后7d(即14日龄),模型组 VEGF mRNA 的转录仍较对照组高。见表1,图2。

表1 不同日龄幼鼠视网膜 VEGF mRNA 的转录水平 (A值)

分组	只数	7 d	9 d	14 d
对照组	10	0.188 ± 0.013	0.244 ± 0.017	0.273 ± 0.037
模型组	10	0.127 ± 0.011	0.462 ± 0.053	0.391 ± 0.024
<i>t</i>		10.326	9.43	6.816
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01

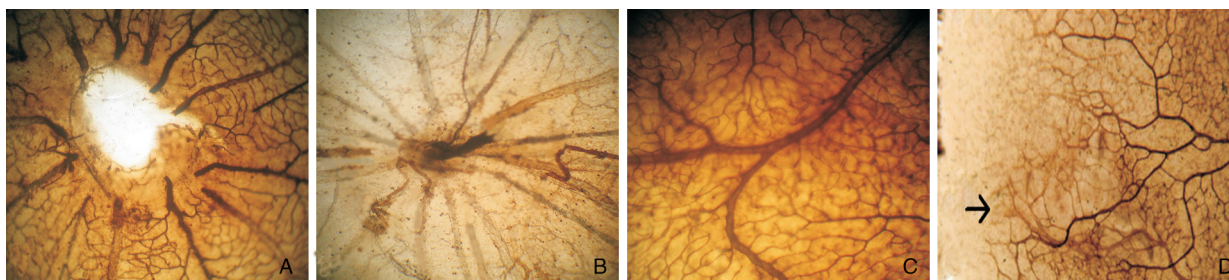


图1 各组视网膜血管形态变化。A:对照组7日龄幼鼠视网膜血管以视乳头为中心,呈放射状均匀分布,周边血管网结构清晰;B:模型组高氧7d后视网膜血管发育滞缓,走行僵直、分支减少,中央部及周边部出现大片无灌注区。C:对照组14日龄视网膜毛细血管网覆盖整个视网膜,血管网深浅层结构清晰。D:模型组14日龄视网膜大量新生血管形成,血管密度增高,结构及分布紊乱,丧失了正常结构。

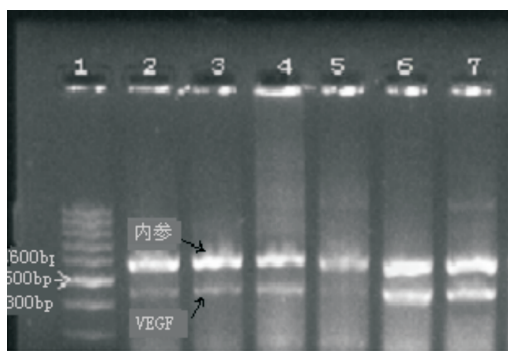


图2 各组幼鼠 VEGF mRNA 表达电泳图。1. Marker; 2,3,4 分别为对照组7,9,14日龄;5,6,7 分别为模型组7,9,14实验组。

3 讨论

ROP 的特征是视网膜的异常新生血管化,新生

血管的形成在其发生发展中起主导作用。在大量实验研究基础上,有学者将 ROP 的病理生理变化分为两个阶段^[3,4]:首先是组织氧过多-血管生长停滞阶段,患儿停止氧疗回到正常空气环境后,此时氧张力降低,此前已发生收缩的血管不能供应足够氧到视网膜;然后进入组织低氧-血管增殖阶段,新生的血管出现了形态结构异常,逐渐发展成为 ROP。

本实验选用 SD 新生大鼠作为诱导视网膜新生血管的模型动物,是因产后3周的新生鼠视网膜发育与人孕36周胎儿相似^[5]其具有生长快、繁育性能好、存活率高等优点。相对小鼠而言,大鼠的耐高氧能力及生命力要明显增强,实验动物死亡率降低,可保证同一实验条件下的动物数量,价廉易管制。本研究建立的新生鼠视网膜异常新生血管化模型产生的基础是视网膜组织缺氧,与 ROP 视网膜新生血管形成机制相同,且具有制作方法简单、易重复、制作

周期短、可定量研究及价格低廉等优点。因此,该大鼠模型为研究视网膜新生血管形成机制的理想动物模型。

ADP 酶组织染色显示模型组视网膜血管改变符合 ROP 的病理过程。计数视网膜组织切片中突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目是进行定量研究的金标准^[6,7]。眼组织切片苏木精-伊红染色结果显示,停氧后 1 周的模型组视网膜出现较多新生血管,而同日龄对照组视网膜几乎没有新生血管产生。证实本实验 ROP 大鼠的模型制作成功。

VEGF 作为血管内皮特异性的生长因子,是血管内皮细胞强有力的有丝分裂原,是目前已知的最有力的促进血管生长的细胞因子,在血管生长过程中起中心调控作用^[8]。在 VEGF 的正常表达作用下,正常视网膜血管才可能在生后进一步生长至最初的无血管区和缺氧区。而生后给予长时间、高浓度的吸氧会引起 VEGF 表达异常,从而导致血管的异常生长。本实验通过 RT-PCR 发现,模型组新生鼠视网膜 VEGF mRNA 的表达与对照组相比有显著的改变。吸氧期间,模型组视网膜 VEGF mRNA 显著下降,处于一个低水平,说明高氧可使 VEGF 的基因表达受到抑制。模型组新生鼠回到正常空气后,视网膜处于相对低氧环境,刺激了 VEGF mRNA 表达水平的上调。实验结果显示,停氧第 2 天,VEGF mRNA 的表达即有明显上升,此后持续增加,至停氧后 1 周,视网膜 VEGF mRNA 的表达仍高于正常对照组水平。

通过 ADP 酶染色、苏木精-伊红染色及 RT-PCR 实验,我们可以清楚看到 VEGF 的表达与视网膜生长的密切关系。在高氧期间模型组,VEGF mRNA 表达处低水平期,视网膜血管的生长发育滞缓。停氧后,VEGF mRNA 表达迅速增加,模型组视网膜血管相应表现为活跃增生,出现大量异常的新生血管。而且通过实验发现,VEGF mRNA 的表达在新生血管发生前升高,随着新生血管退行逐渐下降。我们可以据此推断,由于 VEGF 对血管的形成、生长、发育的至关重要的作用^[8],模型组大鼠视网膜 VEGF

在不同阶段的异常表达,导致了视网膜血管的异常生长发育。吸氧阶段 VEGF 表达的异常下调,使得血管生长异常缓慢甚至停滞;而停氧后,VEGF 表达异常升高,视网膜血管的增生也变得异常活跃,从而导致了视网膜的异常新生血管化。VEGF 表达的变化在高氧导致的血管关闭和消失以及增生过程中起着重要媒介作用,与血管发育的活跃程度以及血管增生强度有密切关系。

由于血管的生长发育是血管生长刺激因素与抑制因素二者共同作用的结果,VEGF 并不是唯一起作用的因素,因此研究、发现其他影响因素对 ROP 发生发展中的作用,是一项艰巨的任务,需要更深入的工作。

[参 考 文 献]

- [1] Donahue SP. Retinopathy of prematurity[J]. Br J Ophthalmol, 2002, 86(10):1071.
- [2] Gilbert C, Rabi J, Eckstein M, O'Sullivan J, Foster A. Retinopathy of prematurity in middle-income countries[J]. Lancet, 1997, 350(9070):12-14.
- [3] Calvert JW, Zhou C, Zhang JH. Transient exposure of rat pups to hyperoxia at normobaric and hyperbaric pressures does not cause retinopathy of prematurity[J]. Exp Neurol, 2004, 189(1):150-161.
- [4] Shih SC, Ju M, Liu N, Smith LE. Selective stimulation of VEGFR-1 prevents oxygen-induced retinal vascular degeneration in retinopathy of prematurity[J]. J Clin Invest, 2003, 112(1): 50-57.
- [5] Dennis M, Marcus G, X, Samuel S, El-Shabraway M, Ruth BC, Manuela B, Dennis MM. Effects of sustained hyperoxia on revascularization in experimental retinopathy of prematurity[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(2):496-502.
- [6] Smith LE, Wesolowski E, Mclellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, D'Amore PA. Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(1):101-111.
- [7] Browning J, Wylie CK, Gole G. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997, 38(6):1168-1174.
- [8] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation[J]. Nature, 2000, 407(14): 242-248.

(本文编辑:吉耕中)