

# AQP-1 和 VEGF 在大鼠视网膜缺血再灌注损伤中的表达

张金红, 张文芳, 鲁建华, 张书, 梁丽

作者单位: (730030) 中国甘肃省兰州市, 兰州大学第二医院眼科  
作者简介: 张金红, 女, 硕士研究生, 研究方向: 眼底病。  
通讯作者: 张文芳, 女, 博士, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师,  
甘肃省医学会眼科专业委员会主任委员. zhwenf888@163.com  
收稿日期: 2010-01-19 修回日期: 2010-03-24

## Expression levels of AQP-1 and VEGF in rat retinal ischemia reperfusion injury

Jin-Hong Zhang, Wen-Fang Zhang, Jian-Hua Lu, Shu Zhang, Li Liang

Department of Ophthalmology, Affiliated Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

**Correspondence to:** Wen-Fang Zhang. Department of Ophthalmology, Affiliated Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. zhwenf888@163.com

Received: 2010-01-19 Accepted: 2010-03-26

### Abstract

• **AIM:** To investigate the expression levels and significance of aquaporin-1 (AQP-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal ischemia reperfusion injury (RIRI).

• **METHODS:** The model of transient RIRI of the rat retina was constructed by elevation of the intraocular pressure. The expression levels of AQP-1 and VEGF was measured 6, 12, 24 and 48 hours, 3, 7 days after retinal ischemia using immunohistochemical staining. Normal retina was treated as control group.

• **RESULTS:** VEGF positive cells were not found in normal group and began to express after 12 hours in ischemia group, increased gradually and reached maximal levels 48 hours after RIRI. There was statistical difference between 48 hours group and other ischemia reperfusion group ( $P < 0.01$ ). AQP-1 positive cells were found in the outer retina in normal group, increased gradually in ischemia reperfusion group and also were found in the inner retina 7 days after RIRI, and the difference was significant ( $P < 0.01$ ).

• **CONCLUSION:** AQP-1 and VEGF may play an important role in various blinding ischemic ocular diseases, and co-effect the water metabolism of retina.

• **KEYWORDS:** AQP-1; VEGF; ischemia reperfusion; rat

Zhang JH, Zhang WF, Lu JH, et al. Expression levels of AQP-1 and VEGF in rat retinal ischemia/reperfusion injury. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(4):646-649

### 摘要

**目的:** 研究大鼠视网膜缺血再灌注损伤后水通道蛋白-1

和血管内皮生长因子的表达情况并探讨二者在视网膜缺血再灌注损伤中表达的意义。

**方法:** 通过提高眼内压的方法建立大鼠视网膜缺血再灌注模型, 于术后 6, 12, 24, 48h; 3, 7d 用免疫组化的方法检测水通道蛋白-1 和血管内皮生长因子在大鼠视网膜的表达情况, 并以正常大鼠视网膜作为对照。

**结果:** 正常对照组大鼠视网膜未能检测到血管内皮生长因子的阳性表达, 缺血再灌注 12h 后开始出现表达, 48h 达高峰, 且差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。水通道蛋白-1 在正常对照组可见到阳性表达, 缺血再灌注组随时间增长表达不断增强, 7d 在外层视网膜也出现表达, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

**结论:** 水通道蛋白-1 和血管内皮生长因子在视网膜缺血性疾病中起着重要的作用, 二者可能共同影响了视网膜的水代谢过程。

**关键词:** 水通道蛋白-1; 血管内皮生长因子; 缺血再灌注; 大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.04.011

张金红, 张文芳, 鲁建华, 等. AQP-1 和 VEGF 在大鼠视网膜缺血再灌注损伤中的表达. *国际眼科杂志* 2010;10(4):646-649

### 0 引言

视网膜血管性疾病包括视网膜中央动脉/分支动脉阻塞, 静脉阻塞, 早产儿视网膜膜病变, 糖尿病性视网膜病变等, 以及临床常见的闭角型青光眼急性发作和一些影响视网膜血流的内眼手术, 这些疾病和手术均存在着不同程度的视网膜缺血再灌注损伤 (retinal ischemia reperfusion injury, RIRI), 其造成视网膜的水肿是影响患者视力恢复的主要因素之一。水通道蛋白-1 (aquaporin-1, AQP-1) 作为一种调节水分子跨膜转运的膜蛋白, 维持体内水的渗透平衡<sup>[1]</sup>。其异常表达, 打破了视网膜组织对水的调解平衡, 并在缺血缺氧的过程中诱导新生血管的生成, 导致了视网膜的水肿<sup>[2,3]</sup>。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在体内可促进新生血管的形成, 同时也可以引起血管渗漏性的增强<sup>[4]</sup>。我们通过建立大鼠视网膜 RIRI 损伤动物模型, 研究 AQP-1 和 VEGF 的表达情况并探讨二者在视网膜 RIRI 损伤中表达的意义。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康成年 SPF 级 Wistar 大鼠 56 只, 雌雄各半, 体质量  $220 \pm 20g$ , 由甘肃中医学院动物实验中心提供。裂隙灯下检查角膜透明, 瞳孔等大等圆, 虹膜血管清晰, 晶状体无混浊。将所选大鼠随机分为 7 组, 分别为缺血再灌注后 6, 12, 24, 48h; 3, 7d 组, 正常对照组, 每组 8 只大鼠。

**1.2 方法** 缺血再灌注模型的建立: 大鼠称重, 用体积分数 100g/L 水合氯醛 3.5mL/kg 腹腔注射麻醉, 麻醉满意后, 将大鼠取俯卧位固定于鼠台上, 随机选取每只大鼠的 1 眼造模, 10g/L 地卡因点眼局部麻醉, 复方托吡卡胺散瞳, 用氯霉素滴眼液冲洗结膜囊, 将连接生理盐水瓶输液

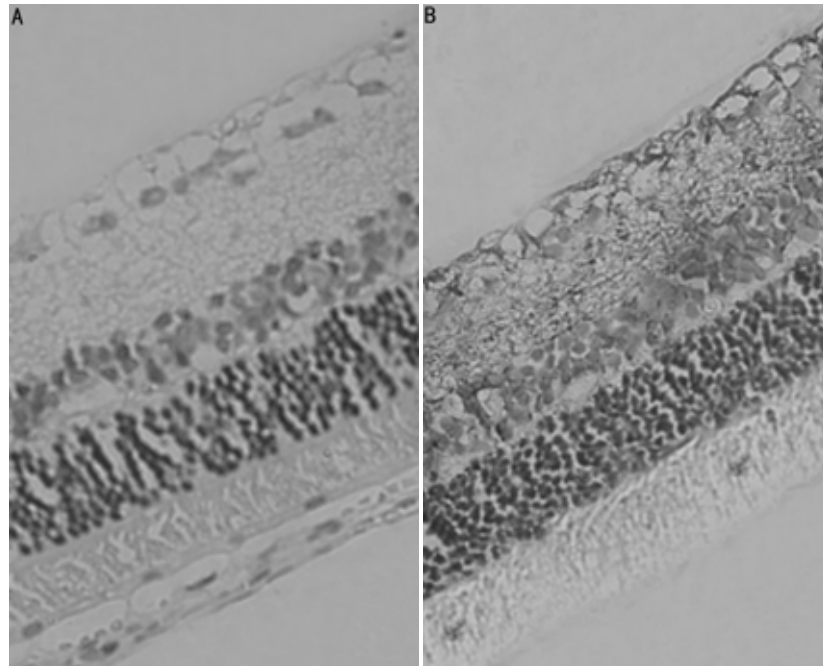


图1 大鼠视网膜 VEGF 的表达 (IHC × 400) A: 正常对照组; B: 缺血再灌注 48h。

管的 4 号半头皮针沿颞侧角巩膜缘刺入大鼠眼前房, 避免损伤虹膜和晶状体, 胶布固定头皮针于大鼠同侧耳缘处。缓慢升高输液瓶至与大鼠实验眼垂直距离 150cm 处, 此时眼压 110mmHg (1mmHg = 0.133kPa), 可见球结膜及虹膜迅速变白, 视网膜颜色苍白, 说明视网膜中央动脉的供血完全阻断。氯霉素眼液滴眼以保持角膜湿润并预防感染。持续形成高眼压造成视网膜缺血 60min 后, 缓慢降低输液瓶高度至大鼠眼球水平, 使眼压缓慢降低。关闭输液器, 拔出输液针头, 虹膜及球结膜颜色迅速恢复正常, 眼底视网膜恢复橘红色, 说明受阻血流重新开放, 已形成再灌注。术毕结膜囊涂红霉素眼膏待清醒后回笼。实验主要试剂: 兔抗大鼠 AQP-1 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司), 鼠抗 VEGF 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司), 生物素化的羊抗兔和兔抗鼠 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司), DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。光镜制片: 缺血再灌注组和正常对照组均用过量麻醉处死大鼠, 在大鼠眼球 3:00 或 9:00 方位做好标记后, 迅速摘除眼球, 保留视神经 0.5 ~ 1mm, 置于 40g/L 多聚甲醛磷酸缓冲液 (pH7.4) 内 4℃ 固定 24h, 去除眼前节, 梯度乙醇脱水和二甲苯透明后, 常规石蜡包埋。以平行于视神经矢状轴平面对视网膜进行连续切片, 厚约 5μm, 置于预先用多聚赖氨酸处理的载玻片上, 60℃ 温箱烤片过夜, HE 染色, 光镜观察各组视网膜组织内层结构的变化。免疫组化染色: 石蜡切片二甲苯脱蜡, 乙醇梯度脱水, 蒸馏水洗涤, 微波热修复, 自然冷却 30min 后, 用蒸馏水和 PBS 缓冲液各洗涤 3 次, 加内源性过氧化物酶阻断剂阻断 10min, 再用 PBS 缓冲液洗涤 3 次后用正常动物非免疫血清封闭 10min, 甩干滴加一抗, 4℃ 过夜, 复温 1h 后 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 加生物素标记的二抗后, 再用 PBS 洗涤 3 次, 再加辣根酶标记的链酶卵白素工作液, PBS 洗涤 3 次后 DAB 显色 5min, 镜下观察掌握染色深度, 苏木素复染 2min 后盐酸乙醇分化, 自来水冲洗后, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 封片。

统计学分析: 采用 SPSS 16.0 统计软件, 组间不同时间点作单因素方差分析并进行两两比较。数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

表 1 各组视网膜 VEGF 和 AQP-1 平均光密度的变化

			( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )	
分组		VEGF	AQP-1	
对照组		0.025 ± 0.002	0.167 ± 0.041 <sup>f</sup>	
RIRI	6h	0.037 ± 0.002 <sup>d</sup>	0.268 ± 0.021 <sup>b,f</sup>	
	12h	0.248 ± 0.008 <sup>b,d</sup>	0.307 ± 0.023 <sup>b,f</sup>	
	24h	0.428 ± 0.134 <sup>b,d</sup>	0.339 ± 0.012 <sup>b,f</sup>	
	48h	0.523 ± 0.101 <sup>b</sup>	0.385 ± 0.014 <sup>b,f</sup>	
	3d	0.275 ± 0.083 <sup>b,d</sup>	0.403 ± 0.024 <sup>b,f</sup>	
	7d	0.164 ± 0.043 <sup>b,d</sup>	0.502 ± 0.035 <sup>b</sup>	

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs RIRI 48h; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs RIRI 7d。

## 2 结果

**2.1 HE 染色结果** 正常对照组大鼠视网膜各层结构排列整齐, 共 10 层, 与人的视网膜相似。缺血再灌注 6h 组视网膜各层均水肿, 神经节细胞层细胞排列紊乱, 出现空泡变性, 内丛状层明显增厚, 内核层和外核层间质排列疏松。12h 组视网膜各层水肿较前减轻, 3d 组视网膜内层开始变薄, 7d 组视网膜内丛状层, 内核层明显变薄。

**2.2 免疫组织化学染色结果** 细胞膜上出现棕黄色颗粒的细胞为免疫阳性细胞。正常对照组未能检测到 VEGF 的表达 (图 1A), 缺血再灌注组在再灌注后 12h 开始出现表达, 以后表达逐渐加强, 到再灌注后 48h 达到高峰 (图 1B), 以后开始减弱, 7d 仍可检测到其表达。缺血再灌注组 VEGF 的表达除 6h 组外与正常对照组相比均有统计学差异 ( $P < 0.01$ ), 48h VEGF 的表达与其余缺血再灌注组比较均有统计学差异 ( $P < 0.01$ , 表 1), VEGF 主要分布于视网膜的内层, 视锥视杆细胞层亦有表达。AQP-1 在正常对照组也有表达, 主要集中于视网膜的外层, 即色素上皮层和视锥视杆层 (图 2A), 缺血再灌注 7d 组内层视网膜首次出现表达, 主要是神经纤维层和神经节细胞层, 并且外层视网膜表达较正常组增强 (图 2B), 与正常对照组和其余缺血再灌注组相比均有统计学差异 ( $P < 0.01$ , 表 1)。

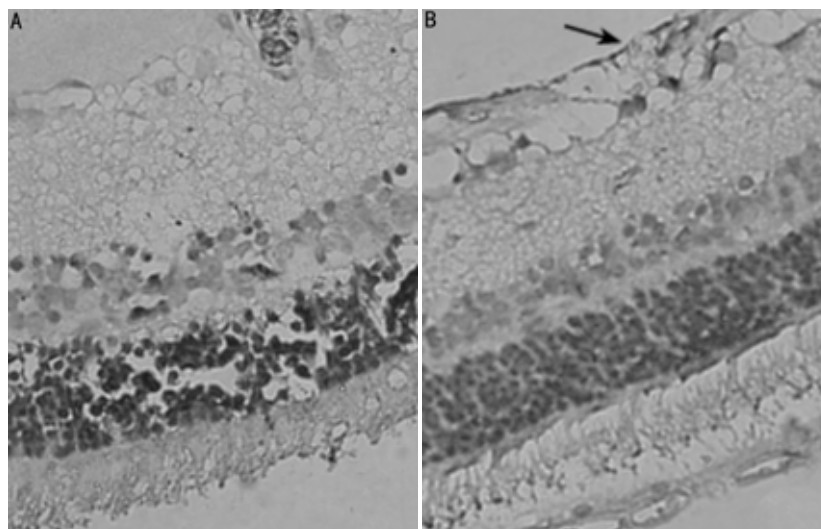


图2 大鼠视网膜 AQP-1 的表达(IHC ×400) A:正常对照组;B:缺血再灌注7d(箭头示 AQP-1 在神经节细胞层的表达)。

### 3 讨论

RIRI 损伤造成的视网膜水肿,以往认为其机制是缺血、炎症介质等多种损伤因素所致血-视网膜屏障(blood-retina barrier, BRB)破坏,血浆成分渗出,然而在检测视网膜水肿与荧光素渗漏时发现,少数患者局部或者整个视网膜的水肿程度与荧光素渗漏增加并不一致<sup>[5]</sup>。说明除视网膜血管渗漏外,还有其它机制参与了视网膜水肿的形成。研究认为神经活动所致视网膜局部积聚的多余水主要靠神经胶质细胞(Müller 胶质细胞)介导的跨膜/跨屏障转运来完成的,且这一转运过程的分子机制与 AQPs 介导的快速跨膜水转运有关。因而 AQPs 的表达异常,可以造成视网膜的水代谢异常。AQPs 是一类近年来颇受关注的调节水分子跨膜转运的膜蛋白。AQP-1 主要在无长突细胞的亚群, Müller 胶质细胞的基部突起,光感受器细胞和视网膜的色素上皮层表达<sup>[6]</sup>。AQP-1 是第一个从人类红细胞上分离出来的水通道蛋白,分子量为 28kDa,最先称之为膜内在蛋白(CHIP28),是调节细胞间隙渗透压的水选择性通道<sup>[7]</sup>。Iandiev 等<sup>[7]</sup>在升高眼内压制备的大鼠视网膜缺血再灌注损伤的模型中发现 AQP-1 的表达发生了变化,正常组在视网膜外层表达,而模型组在内层视网膜也出现了表达,其推测可能与神经胶质细胞为了清除血管周围渗漏的水而反应性的出现 AQP-1 的表达改变。我们在实验当中也发现 AQP-1 在视网膜的内层神经节细胞层出现了表达,与 Iandiev 的研究相似,同样 Iandiev 等<sup>[7]</sup>在链球菌素建立的糖尿病大鼠模型的视网膜上也发现了 AQP-1 的表达发生了变化。这种 AQP-1 的表达异常,具体机制尚不清楚,推测可能为视网膜 RIRI 损伤后,氧自由基的生成增多,兴奋性氨基酸的释放,钙超载,造成了视网膜组织生物膜的损伤,引起大量水分子的渗漏和细胞的肿胀<sup>[8]</sup>。Na<sup>+</sup>是维持细胞正常体积的关键离子,细胞的肿胀与胞内 Na<sup>+</sup>的减少密切相关,而 Rouzaire-Dubois 等<sup>[9]</sup>在其最近研究中发现 AQP-1 在大鼠神经节细胞的钠依赖性活动是细胞体积调节的一种新的机制,为了维持细胞的正常体积和清除视网膜积聚的水从而使 AQP-1 的表达发生了变化。VEGF 是目前已知的很强的促血管新生因子,缺氧是其最主要的诱导因素<sup>[10]</sup>。游志鹏<sup>[11]</sup>采取结

扎颈总动脉阻断视网膜血流的方法,发现 VEGF 的表达在 48h 达到最强,以后开始减弱。我们发现 12h 开始出现 VEGF 的表达,48h 达高峰,7d 仍可见 VEGF 的表达。视网膜在缺血再灌注损伤后出现 VEGF 的表达增多,可能机制为,虽然血供恢复后,但是自由基导致细胞的呼吸链损伤,细胞仍处于一种缺氧状态,机体为了对抗缺氧,使 VEGF 的表达上调,其高表达增加了血管的渗透性,导致了视网膜的水肿,并且有可能导致新生血管的出现。在已有的研究中发现 AQP-1 在早产儿视网膜病变中的新生血管中出现表达,推测其水的渗透性促使血管内皮细胞的迁移,参与了视网膜的新生血管化<sup>[12]</sup>。我们在本研究中发现视网膜 RIRI 损伤后 VEGF 和 AQP-1 的表达增强,推测可能通过协同作用增加了血管的通透性,导致了视网膜的水肿,并通过促进内皮细胞的迁移,使视网膜出现新生血管,进一步损伤视网膜。

综上所述,视网膜 RIRI 损伤中, AQP-1 和 VEGF 的表达可能是导致视网膜水肿的主要因素之一。找到新的靶点,阻断二者的表达,减少视网膜的水肿和阻止视网膜的新生血管化,可能会减轻视网膜缺血再灌注造成的损伤,保护视功能。

#### 参考文献

- 1 Ishibashi K, Hara S, Kondo S. Aquaporin water channels in mammals. *Clin Exp Nephrol* 2009;13(2):107-117
- 2 Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS. Aquaporins and cell migration. *Pflugers Arch* 2008;456(4):693-700
- 3 Wang X, Xu X, Gu Q. Expression of aquaporin 1 in retinal neovascularization: experiment with mice. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2008; 88(22):1569-1571
- 4 赵伟. 角膜碱烧伤后血管内皮生长因子与新生血管渗漏性的相关性实验研究. *眼科新进展* 2009;29(1):18-21
- 5 Reizer J, Reizer A, Saier MH Jr. The mip family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1993;28(3):235-257
- 6 Iandiev I, Pannicke T, Biedermann B, et al. Ischemia-reperfusion alters the immunolocalization of glial aquaporins in rat retina. *Neurosci Lett* 2006;408(2):108-112

7 Iandiev I, Pannicke T, Reichenbach A, *et al.* Diabetes alters the localization of glial aquaporins in rat retina. *Neurosci Lett* 2007;421(2):132-136  
8 Ophir A, Berenshtein E, Kitrossky N, *et al.* Hydroxyl radical generation in the cat retina during reperfusion following ischemia. *Exp Eye Res* 1993;57(3):351-357  
9 Rouzair-Dubois B, Ouanounou G, O'Regan S, *et al.* Sodium-dependent activity of aquaporin-1 in rat glioma cells: a new mechanism of cell volume regulation. *Pflugers Arch* 2009;457(5):1187-1198

10 Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, *et al.* Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 1995;113(12):1538-1544  
11 游志鹏. 血管内皮生长因子在视网膜缺血再灌注损伤中的表达. *眼外伤职业眼病杂志* 2004;26(11):721-723  
12 Xun W, Liu Y, Qing G, *et al.* Aquaporin 1 expression in retinal neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity. *Prep Biochem Biotechnol* 2009;39(2):208-217

· 短篇报道 ·

## 老年性上睑皮肤松垂及睑内翻矫正术

许美玲, 孙凤海, 马洪梅, 贾健

作者单位:(300452)中国天津市,中国海洋石油总医院眼科  
作者简介:许美玲,女,主任医师,研究方向:白内障、青光眼、外眼病。  
通讯作者:许美玲. songxij@sina.com  
收稿日期:2010-01-27 修回日期:2010-03-16

许美玲,孙凤海,马洪梅,等. 老年性上睑皮肤松垂及睑内翻矫正术. *国际眼科杂志* 2010;10(4):649

### 0 引言

随着年龄的增长,上睑皮肤逐渐老化,表现为不同程度的松弛下垂,尤以上睑外侧为著。典型者呈“三角眼”畸形,重者遮盖视野,影响视力,部分沙眼结膜炎较重的患者还伴有睑内翻倒睫,“镰刀形”切除上眼睑皮肤及部分眼轮匝肌,外睑部部分眶膈脂肪球,对部分倒睫患者切削增厚睑板,取得了良好的临床效果。

### 1 临床资料

我院 2004-01/2010-01 共治疗上睑皮肤松垂 186 例,其中睑内翻倒睫 15 例,年龄 40~70 岁,其中 1 例外睑矫正不足,4a 后再次手术矫正。手术方法:术前划线,确定上睑皮肤的切除量,重睑线划在距上眼缘 4~5mm 处,由内眦至外眦划线到外眦角外 3~5mm 处,然后用镊子自重睑线向上夹持上眼皮皮肤确定切除皮肤的上缘,一般正中和外侧大约距下线 1.5~2.0cm 左右,沿重睑线由内向外划线,外眦部超越外眦角约 5~10mm,呈“镰刀形”,皮肤去除最宽的部分在外眦部分。用加少许肾上腺素的 20g/L 利多卡因作局部浸润麻醉,沿线切开上睑,去除切口内多余皮肤及部分眼轮匝肌,上睑脂肪下垂者,打开眶膈筋膜,轻轻提拉疝出的脂肪,用蚊式钳夹起突出脂肪的底部,沿止血钳剪除脂肪组织,如有内翻倒睫者,切削部分增厚睑

板,由于随着衰老导致上睑提肌腱膜附着点松弛所致,应及时将上睑提肌腱膜缩短,缝合固定于睑板上缘,用 5-0 尼龙缝线挂睑板缝合 4~5 针,睁眼观察两侧重睑形态对称后,缝合剩余皮肤切口,伤口涂抗生素眼膏,复盖灭菌凡士林纱布,加压绷带包扎,次日换药,5d 后拆线。全组 186 例,其中 15 例伴有睑内翻倒睫,在“镰刀形”切除的基础上,加部分睑板切削。术后形态效果好,患者满意。

### 2 讨论

人类衰老首先表现在眼睑肌肤上,30 岁左右即开始呈现鱼尾纹,随着皮肤弹力纤维的松弛,胶原纤维的萎缩,真皮层渐渐变薄,加之重力的作用,表现为上睑皮肤松弛下垂。随着衰老的加剧,老年性上眼睑的变化表现为:(1)上睑皮肤松垂,尤以外侧为甚,严重者表现为“三角眼”特征;(2)老年性上睑下垂;(3)眼球凹陷;(4)眉毛上抬或下垂;(5)额部皱纹增多<sup>[1]</sup>;(6)沙眼结膜炎较重者伴有上睑内翻倒睫。可以通过上睑除皱术改善上睑外形,切削增厚的睑板矫正内翻倒睫。上眼睑组织分为上下两半部分,我们手术解决的主要是下半部分。下半部分由前向后为皮肤,皮下组织,眼轮匝肌,肌下组织,睑板和睑结膜<sup>[2]</sup>。上睑皮肤松弛手术难度在于对“多余”皮肤量的确定。如术中切除皮肤量不足,切口上缘多呈现厚重感的“幕帘”样外观<sup>[3]</sup>。如过矫又可造成眼睑闭合不全。我们在下切口的设计上采用了稍向下的原则,划线设计距眼缘在 4~5mm 左右,传统手术均在 6~7mm。因为老年患者大多解决下垂,影响视力,视野等问题。下切口稍靠下可以起到术后外形恢复快,自然美观的作用。上线的设计,尽量在不影响闭合不全的情况下多切,略呈过矫状态。这样可以保持术后外观变化的时间长一些,因随着年龄增长,上睑皮肤不断的松弛下垂。既要保持美观,又减少二次手术的痛苦。

### 参考文献

- 1 元发芝,顾建英,杨霞,等. 老年性上眼睑除皱术. *中国临床医学* 2006;13(2):307-309
- 2 杨天鹏,楼家庆,英晓山. 上睑局部解剖 26 例分析. *杭州医学高等专科学校学报* 1997;2:10-12
- 3 刘通,耿传卫,蒋江. 特殊类型上睑重睑术方法探讨. *中国美容学* 2008;17(2):200-202