

小鼠氧诱导视网膜新生血管形成中促红细胞生成素的变化

黄文志¹, 唐罗生²

作者单位:¹(510180)中国广东省广州市第一人民医院眼科;
²(410000)中国湖南省长沙市,中南大学湘雅二医院眼科
作者简介:黄文志,男,硕士,住院医师,研究方向:眼科临床。
通讯作者:黄文志. huangwenzhi82@sina.com
收稿日期:2010-08-10 修回日期:2010-09-15

Expression of erythropoietin in oxygen-induced retinopathy in mouse

Wen-Zhi Huang¹, Luo-Sheng Tang²

¹Department of Ophthalmology, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China;
²Department of Ophthalmology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410000, Hunan Province, China
Correspondence to: Wen-Zhi Huang. Department of Ophthalmology, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China. huangwenzhi82@sina.com
Received:2010-08-10 Accepted:2010-09-15

Abstract

• **AIM:** To evaluate the erythropoietin (EPO) expression in the eye of murine model of oxygen-induced retinopathy (OIR).
• **METHODS:** Totally 20 neonates of C57BL/6 mouse were randomly divided into experiment group ($n = 10$) and control group ($n = 10$), for establishing the OIR model, the pups in the experiment group were exposed to 75 ± 5 mL/L oxygen since their postnatal day 7 (P7) for 5 days and then to room air ($pO_2 = 20 \pm 1$ mL/L) with their nursing dams. The neonates in the control group were kept in the room air condition. All of the pups were sacrificed at P17, their right eyes were made into pathological sections for observing and counting the number of vascular cell nuclei on the vitreal side of the internal limiting membrane. And radioimmunoassay was used to compare the EPO content of the retina tissue in the left eye of the pups in the experiment group and the control group.
• **RESULTS:** The histopathological sections of retina showed the retinal neovascularization (RNV) endothelial nuclei were 80.0 ± 6.2 in the neonates after induced by oxygen and 1.0 ± 0.9 in the neonates growing up in normal air. There was significant difference between those two groups ($P < 0.01$). EPO radioimmunoassay indicated that the EPO content in experiment group was 80.8 ± 20.7 U/L, but 14.4 ± 6.8 U/L in the control group, it showed significant difference ($P < 0.01$). A significant correlation between EPO content and neovascular endothelial nuclei was noted in the experiment group and

control group ($r = 0.58$, $P < 0.01$).

• **CONCLUSION:** The RNV can be successfully established by the murine model of OIR. RNV was associated with the EPO high expression of the eye.

• **KEYWORDS:** retinopathy; oxygen-induced; retinal neovascularization; erythropoietin

Huang WZ, Tang LS. Expression of erythropoietin in oxygen-induced retinopathy in mouse. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(11):2074-2076

摘要

目的:观察 C57BL/6 小鼠氧诱导视网膜新生血管病变模型 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 眼内促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 含量的变化。

方法:新生 C57BL/6 小鼠 20 只,随机分为实验组 ($n = 10$) 和对照组 ($n = 10$)。实验组小鼠于出生后 7d (P7) 与母鼠共置于密闭的氧箱,含氧 75 ± 5 mL/L,共培养 5d (P5) 后回到正常氧环境,含氧 20 ± 1 mL/L,建立 OIR 模型。对照组小鼠不进入氧箱,与母鼠一同饲养于正常氧环境。于 P17 处死各组小鼠,摘取右眼眼球制作组织切片,HE 染色后进行病理组织学检查,计数突破内界膜视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 内皮细胞核数。采用放射免疫法测定实验组和对照组小鼠左眼视网膜组织 EPO 含量。

结果:实验组小鼠视网膜突破内界膜 RNV 内皮细胞核计数为 80.0 ± 6.2 个,而对照组仅为 1.0 ± 0.9 个,两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。实验组视网膜 EPO 含量为 80.8 ± 20.7 U/L,对照组为 14.4 ± 6.8 U/L,两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$),且视网膜组织 EPO 表达与 RNV 增生程度呈明显正相关 ($r = 0.58$, $P < 0.01$)。

结论:小鼠视网膜新生血管形成与眼球局部 EPO 上调有关。

关键词:视网膜新生血管病变;氧诱导;视网膜新生血管;促红细胞生成素

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.11.010

黄文志,唐罗生.小鼠氧诱导视网膜新生血管形成中促红细胞生成素的变化.国际眼科杂志 2010;10(11):2074-2076

0 引言

促新生血管因子与抗血管生成因子的平衡被破坏是导致眼部新生血管形成的重要机制,血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是目前研究和了解得最多的一个非常重要的促血管生成因子,除此之外,还有许多重要的内源性促血管生成因子,包括碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF),

血管紧张素 II (angiotensin II, ANG-II)^[1], 内皮素 (endothelins, ETs), 神经肽 Y (neuropeptide-Y)^[2], 血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP)^[3], P 物质 (substance P)^[4]。在多种眼部新生血管模型中, 上述促血管生成因子被证实与眼部新生血管生成有一定的联系, 但仍不能完全阐明新生血管的形成机制, 因此, 有必要继续寻找其他潜在的促血管生成因子。最新发现 EPO 能够促进肿瘤新生血管的生成, 特异性阻断 EPO 后肿瘤的新生血管形成被抑制^[5]。进一步的研究发现 EPO 明显升高^[6]。因此, 我们推测 EPO 可能是新生血管性眼病中是促新生血管形成的重要因素之一。为证实这一推测, 我们建立氧诱导小鼠视网膜新生血管模型, 检测视网膜组织中 EPO 表达的变化; 并进一步了解 EPO 对小鼠氧诱导视网膜新生血管形成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 选择 7d 龄健康 C57BL/6 新生小鼠 20 只, 性别不限, 新生小鼠未断奶, 与哺乳母鼠共同饲养, 系清洁级动物, 由中国科学院上海实验动物中心提供。室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 下喂养, 予以 12h 明暗交替光照, 母鼠能自由摄食及饮水。实验动物及实验条件符合国家科学技术委员会的《实验动物管理条例》。红细胞生成素放射免疫试剂盒购于美国 DSL 公司。

1.2 方法 用随机数字表法将 20 只小鼠随机分为实验组 ($n = 10$) 和对照组 ($n = 10$)。实验组小鼠按 Smith 等方法建立 OIR 模型; 于出生后 7d (P7) 与母鼠共置于密闭的氧箱, 箱内通入 100% 湿润的医用氧气, 用 RS-5100 型数字测氧仪测量氧箱的氧气体积分数, 用氧流量计观察氧流量, 每 6h 1 次, 含氧 $75 \pm 5\text{mL/L}$, 氧流量 $0.17 \sim 0.19\text{L/min}$; 5d 后 (P12) 回到正常氧环境, 含氧 $20 \pm 1\text{mL/L}$ 。对照组小鼠与母鼠不进入氧箱, 饲养于正常氧环境。于 P17 以 10g/L 戊巴比妥钠 ip 过量麻醉处死各组 10 只, 迅速摘除右眼球并在眼球 3:00 或 9:00 方位做好标记。小鼠眼球常规于眼球固定液中固定, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 石蜡包埋, 做一系列连续矢状切片, 厚度 $5\mu\text{m}$, 每只眼球间断取 10 个病理切片, 相邻两个切片间隔 $40\mu\text{m}$, 在 $200 \times$ 下每个切片取 10 个视野, 计数突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目, 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。计数血管内皮细胞核时仅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它与内界膜无联系的血管内皮细胞核。处死的实验组和对照组 10 只小鼠, 摘取左眼, 分离出视网膜, 制成组织匀浆; 采用放射免疫测定法, 移注标准液、质控液和待测样本各 $50\mu\text{L}$ 于相应试管内; 以国产 FJ-2008G 全自动放射免疫 γ 计数器计数各试管沉淀部分的放射性强度, 并由与其连接的计算机程序处理后得出最终结果。

统计学分析: 所有数据均采用 SPSS 13.0 for Windows 统计分析软件包进行分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用两独立样本的 t 检验方法比较对照组与实验组突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目以及 EPO 含量, EPO 含量与视网膜新生血管内皮细胞核数的关系采用双变量等级相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜新生血管内皮细胞核计数 对照组 10 眼 100 张组织切片中, 未发现或仅在极少数切片中见到突破视网膜内界膜长入玻璃体的血管内皮细胞核, 平均每张切片中新生血管内皮细胞核数为 1.0 ± 0.9 个 (图 1A)。实验组

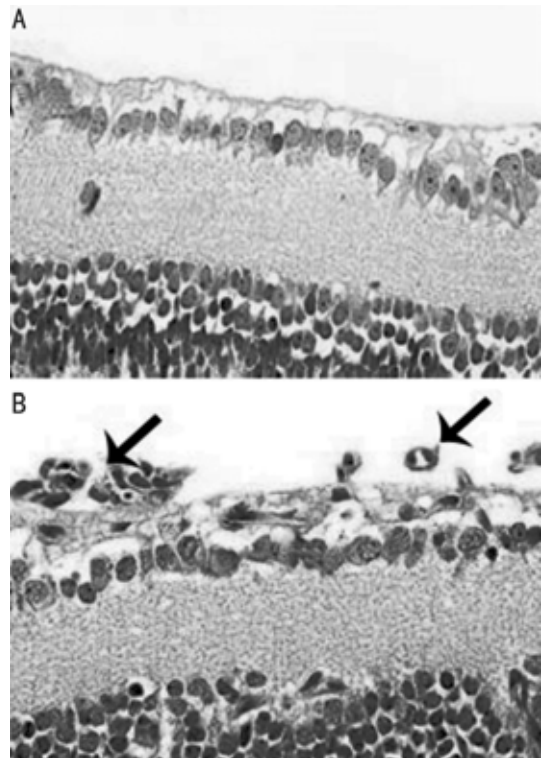


图 1 小鼠视网膜新生血管内皮细胞核 (HE $\times 200$) A: 对照组; B: 实验组。

可见较多突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核, 有些单独出现, 有些成簇出现, 平均每张切片中新生血管内皮细胞核数为 80.0 ± 6.2 个 (图 1B), 与对照组相比差异有非常显著性 ($P < 0.05$)。

2.2 视网膜组织 EPO 含量 对照组为 $14.4 \pm 6.8\text{U/L}$, 实验组为 $80.8 \pm 20.7\text{U/L}$, 实验组较对照组视网膜组织液 EPO 含量显著升高 ($P < 0.01$)。正常氧环境中生长的对照组小鼠中视网膜矢状位薄层切片未见明显 RNA 内皮细胞核 1.3 ± 0.5 个; 而实验组中小鼠视网膜切片 RNV 内皮细胞核计数为 82.0 ± 5.5 个。通过 Spearman 等级相关分析可以发现, EPO 含量与 RNV 内皮细胞核数间有显著相关 ($r = 0.58, P < 0.01$)。

3 讨论

目前对视网膜新生血管的治疗主要有激光光凝新生血管和玻璃体切除术切除增殖的纤维血管膜, 由于都是针对疾病后期的治疗, 其效果不能令人满意。因此, 有必要寻找抑制视网膜新生血管形成的药物。但对抑制视网膜新生血管的药物的研究一直受限于缺少合适的人类组织和动物模型。研究表明, 大多数糖尿病小鼠和大鼠即使经历长期高血糖也不发生典型的视网膜新生血管, 而药物诱导的糖尿病动物模型不仅需要较长时间才发生视网膜血管, 而且发生率很低。因此, 有必要寻求合适的动物模型以保证研究工作顺利开展。我们以 7d 龄 C57BL/6 小鼠, 在 75mL/L 高氧环境下暴露 5d 后, 再回到正常氧环境, 所有小鼠均可以观察到视网膜新生血管, 说明模型建立的成功率很高。对该模型建立机制的研究发现, 其机制类似于人类早产儿视网膜病变。胎鼠在出生时其视网膜血管尚未完全发育成熟, 在出生后继续发育, 特别是周边部, 向前发育的血管前端组织尚未分化为毛细血管, 这些组织对氧非常敏感, 若此时给予高浓度氧, 可致未发育的血管闭塞且抑制更多的血管形成, 这可能与机体在高氧环境下为维持

正常氧浓度而反应性地血管收缩痉挛有关。在维持一段时间高氧浓度后再回到正常氧浓度环境,此时的氧浓度对于视网膜即出现相对缺氧状态,早期血管通过扩张来代偿,晚期失代偿后就可出现新生血管的形成。

在视网膜中总计内皮细胞数是困难的,因为在光镜下内皮细胞难以从周围细胞中一一分辨出来。考虑到视网膜新生血管是从非正常部位的血管增生,计数突破内界膜的血管内皮细胞数目则更具有科学性。我们通过平行视神经矢状位视网膜连续薄层切片观察和计数突破内界膜新生血管内皮细胞核数,实验组和对照组差异有统计学意义($P < 0.01$),成功地建立了小鼠视网膜新生血管模型。该模型新生血管的发生与组织缺氧有关,是许多常见眼底病共同的发病机制,其制作方法相对简单,具有可重复性、可定性、费用低等特点。因此该模型是进行视网膜新生血管发生机制及治疗效果研究的有效模型。

EPO 来源于胚胎肝及成人肾脏,是一种低相对分子质量(30000)糖蛋白,由 165 个氨基酸组成,EPO 最为主要的生理作用是作为红细胞生成的刺激剂,通过促进红细胞系统前体的增生和分化、增加抗凋亡蛋白的表达及抑制凋亡过程来维持红细胞生成与耗损的动态平衡。EPO 通过其特异受体(erythropoietin receptor, EPOR)发挥作用,后者主要表达于红细胞系统集落形成单位。研究表明造血细胞与内皮细胞起源于相同的间叶组织祖先——血管内皮祖细胞,以往认为仅作用于造血系统的 EPO 在内皮细胞中也具有一定的功能^[7]。EPO 作为它的分裂原在体外能够激发内皮细胞增生、迁移、释放内皮素-1、增加游离钙的浓集等血管前反应,在体内能够诱导新生血管的形成。在体外培养的成人心肌内皮细胞上,研究人重组 EPO (rHuEPO)的血管生成活性,并与 VEGF 相比较,结果显示与正常的生理生长相比,rHuEPO 刺激毛细血管向外生长达 220%,展现出与 VEGF 相当的促血管生成潜力。目前已经发现,EPO/EPOR 系统广泛存在于肝、肾以外的组织,参与体内众多的正常和病理性血管生成过程:如炎症性血管形成^[8],伤口愈合^[9],女性生殖器官血管形成,肿瘤血管形成^[10]以及缺血缺氧诱导的视网膜新生血管生成,如 PDR 和早产儿视网膜病变^[11],并且对 EPO 或其受体的拮

抗能够抑制肿瘤新生血管形成。

本实验中,氧诱导新生血管性视网膜疾病模型(OIR)小鼠眼球组织液中促红细胞生成素含量较对照组明显升高。EPO 含量与 RNV 内皮细胞核数呈明显正相关。证实了 EPO 是 OIR 模型中视网膜新生血管形成的促进因素。从而为实验以及临床治疗视网膜新生血管性疾病提供了又一突破口。

参考文献

- 1 Sandra LA, Paula E. Papanek, Andrew S. G. Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:1163-1169
- 2 Kitlinska J, Lee EW, Movafagh S, et al. Neuropeptide Y-induced angiogenesis in aging. *Peptides* 2002;23:71-77
- 3 Beatriz C, Irene GC, Nieves RH, et al. Vasoactive intestinal peptide increases vascular endothelial growth factor expression and neuroendocrine differentiation in human prostate cancer LNCaP cells. *Regulatory Peptides* 2004;119:69-75
- 4 Pelletier L, Regnard J, Regnard J. Human bone marrow angiogenesis: in vitro modulation by substance P and neurokinin A. *British Journal Of Haematology* 2002;119:1083-1089
- 5 Kiyoshi N, Yasumasa N, Minoru S, et al. Erythropoietin/Erythropoietin-receptor system as an angiogenic factor in chemically induced murine hepatic tumors. *Int J Clin Oncol* 2004;9:184-188
- 6 Katsura Y, Okano T, Matsuno K, et al. Erythropoietin is highly elevated in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2005;28:2252-2254
- 7 Bahimann FH, Groot K, Spandau JM, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 2004;103:921-926
- 8 Heeschen C, Aicher A, Lehmann R. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003;102:1340-1346
- 9 Galeano M, Altavilla D, Bitto A. Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Crit Care Med* 2006;34(4):1139-1146
- 10 Ribatti D, Marzullo A, Nico B. Erythropoietin is an angiogenic factor in gastric carcinoma. *Histopathol* 2003;42:246-250
- 11 Assouline Y, Engel HM, Vega-Rich C. The development of retinopathy of prematurity in neonates treated with recombinant human erythropoietin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:40-50