

血管紧张素转换酶抑制剂抑制小鼠视网膜新生血管的实验研究

李 迅, 刘鹤南, 陈晓隆

基金项目: 中国辽宁省自然科学基金资助项目 (No. 20052089);
中国辽宁省教育厅科研基金资助项目 (No. 20060994)

作者单位: (110004) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京
医院眼科

作者简介: 李迅, 男, 硕士, 讲师, 主治医师, 研究方向: 玻璃体视
网膜手术的临床研究。

通讯作者: 李迅. lixun@sj-hospital.org

收稿日期: 2010-11-15 修回日期: 2010-12-09

Experimental study of angiotensin converting enzyme inhibitors for suppressing retinal neovascularization in mice

Xun Li, He-Nan Liu, Xiao-Long Chen

Foundation items: Natural Science Foundation of Liaoning Province, China (No. 20052089); Scientific Research Fund of Liaoning Provincial Education Department, China (No. 20060994) Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xun Li. Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. lixun@sj-hospital.org

Received: 2010-11-15 Accepted: 2010-12-09

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEI) on suppressing retinal neovascularization (RNV).

• **METHODS:** It was a random control experimental study. Thirty-six seven-day-old C57BL/6J mice were divided into two groups randomly including hyperoxia group and ACEI group, eighteen in each group. ACEI group and hyperoxia group were exposed to 75% oxygen to establish a model of oxygen-induced retinopathy, and received daily intraperitoneal injections of captopril 10mg/kg and the equal amount of saline respectively for five days continuously after leaving oxygen box. Fluorescent angiography was used to assess the vascular pattern of retina. The proliferative neovascular response was quantified by counting the nuclei of new vessels extending from the retina into the vitreous in cross-sections. Angiotensin II (Ang II) and vascular endothelial growth factor (VEGF) protein levels in retinas were measured by Western blot.

• **RESULTS:** Fluorescent angiography presented increasing neovascular tufts with fluorescein leakage in hyperoxia

group. Neovascular tufts and fluorescein leakage were decreased in ACEI group compared to the hyperoxia group. The number of endothelial cells of new vessels extending from retina to vitreous were decreased significantly in ACEI group compared with hyperoxia group ($P=0.00$). The expression of Ang II protein in retinas were decreased significantly in ACEI group compared with hyperoxia group ($P=0.00$). The expression of VEGF protein in retinas were decreased significantly in ACEI group compared with hyperoxia group ($P=0.00$).

• **CONCLUSION:** Early treatment with ACEI could inhibit RNV to some degree and protect the retinas.

• **KEYWORDS:** angiotensin II; angiotensin converting enzyme inhibitor; vascular endothelial growth factor; retinal neovascularization

Li X, Liu HN, Chen XL. Experimental study of angiotensin converting enzyme inhibitors for suppressing retinal neovascularization in mice. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(1):34-36

摘要

目的: 探讨血管紧张素转换酶抑制剂 (angiotensin converting enzyme inhibitors, ACEI) 对视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 的抑制作用。

方法: 采用随机对照实验研究。选取 7 天龄 C57BL/6J 新生小鼠 36 只, 随机分为 2 组: 高氧组和 ACEI 组, 每组 18 只。ACEI 组和高氧组小鼠建立氧诱导视网膜病变模型, 出氧箱后每日分别 ip 卡托普利 10mg/kg 和等量生理盐水, 连续 5d。采用荧光素血管灌注视网膜铺片观察视网膜血管形态学改变; 制作视网膜组织切片并进行 HE 染色计数突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数; 采用 Western blot 检测视网膜血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 和血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 蛋白的表达。

结果: 荧光素血管灌注视网膜铺片: 高氧组可见大量新生血管丛, 伴明显荧光渗漏, ACEI 组较高氧组视网膜新生血管减少, 荧光渗漏减轻。突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数: ACEI 组较高氧组减少, 差异具有统计学意义 ($P=0.00$)。视网膜 AngII 蛋白表达水平: ACEI 组较高氧组下调, 差异具有统计学意义 ($P=0.00$)。视网膜 VEGF 蛋白表达水平: ACEI 组较高氧组下调, 差异具有统计学意义 ($P=0.00$)。

结论: 早期应用 ACEI 可一定程度抑制 RNV 形成。

关键词: 血管紧张素 II; 血管紧张素转换酶抑制剂; 血管内皮生长因子; 视网膜新生血管

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.01.012

李迅,刘鹤南,陈晓隆. 血管紧张素转换酶抑制剂抑制小鼠视网膜新生血管的实验研究. 国际眼科杂志 2011;11(1):34-36

0 引言

视网膜新生血管(retinal neovascularization, RNV)形成可以导致视网膜水肿、出血、脱离等严重影响视力的并发症^[1]。尽管刺激 RNV 生长的因素还未完全明确,但有证据显示参与此过程的不仅有血管源性的细胞因子如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),还包括血管活性激素如血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)^[2]。而 Ang II 可能与特异性生长因子特别是 VEGF 相互作用来影响视网膜的发育和功能,最终共同导致 RNV 形成^[2]。因此,抑制 Ang II 可能将会成为预防和治疗 RNV 一个潜在的临床方法。我们实验的研究目的在于探讨 RNV 发生发展过程中,血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitors, ACEI)卡托普利抑制 RNV 的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物:鼠龄 7 天的健康 C57BL/6J 清洁级新生小鼠(中国医科大学动物部)36 只,体质量 4.0~5.0g,雌雄不限,与哺乳母鼠共同饲养,所有动物均具有动物检疫合格证,无任何眼疾。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》。药品试剂:卡托普利(美国 Bristol-Myers Squibb 公司)、BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司)、ECL 发光试剂盒(美国 Pierce 公司)、异硫氰酸葡聚糖荧光素(美国 Sigma 公司)、兔抗小鼠 AngII 多克隆抗体(美国 Sigma 公司)、兔抗小鼠 VEGF 多克隆抗体(美国 Sigma 公司)、羊抗小鼠 IgG-HRP(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法 动物分组和模型建立:将 36 只 7 天龄 C57BL/6J 清洁级新生小鼠随机分为 2 组:高氧组和 ACEI 组,每组 18 只。参照 Smith 等^[3]的方法建立氧诱导视网膜病变模型,高氧组和 ACEI 组小鼠及哺乳母鼠置于密闭氧箱中,控制氧浓度为(75±2)%,5d(鼠龄 12 天)后回到正常空气中。小鼠出氧箱后,ACEI 组和高氧组每日分别 ip 卡托普利 10mg/kg 和等量生理盐水,连续 5d。所有动物保持温度(21±1)℃,光照-黑暗循环时间为 12h/12h。荧光素血管灌注视网膜铺片:2 组鼠龄 17 天的小鼠各取 4 只,将异硫氰酸葡聚糖荧光素溶于 1mL 的 40g/L 多聚甲醛中,经左心室灌注(0.03mL/g),摘取眼球,于 40g/L 多聚甲醛中固定 1h,游离视网膜,以视盘为中心呈放射状对称切开,用抗荧光素封片剂将视网膜封片,采用荧光显微镜观察视网膜血管形态的变化。突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核计数:2 组鼠龄 17 天的小鼠各取 4 只,摘除眼球后,于 40g/L 多聚甲醛中固定 24h,常规脱水,石蜡包埋,平行于角膜至视盘的矢状位连续 4μm 切片,HE 染色。每只眼球取 10 张切片,每组 40 张,由同一操作者采用随机、盲法在光学显微镜下对切片样本计数每张切片突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数。选取切片时注意避开视盘周围,计数血管内皮细胞核时仅计数与内界膜有紧密联系的细胞核,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。Western blot 检测 Ang II 及 VEGF 蛋白表达:2 组鼠龄 17 天的小鼠各取 10 只,提取视网膜

表 1 小鼠视网膜 Ang II 和 VEGF 蛋白相对表达量的比较

	灰度值比		P
	高氧组	ACEI 组	
Ang II	0.379 ± 0.006	0.091 ± 0.007	0.00
VEGF	0.401 ± 0.007	0.096 ± 0.005	0.00

组织蛋白质,用 BCA 蛋白定量试剂盒定量视网膜组织蛋白质含量,每个样品上样含量 30μg,以 10% SDS-PAGE 电泳(4℃,120V,2h)分离蛋白质,电转移法将蛋白质转移至硝酸纤维素滤膜上,用 40g/L 脱脂奶粉,于 4℃ 下过夜封闭硝酸纤维素滤膜的非特异性蛋白质结合位点,将滤膜于兔抗小鼠 AngII 多克隆抗体(1:400)、兔抗小鼠 VEGF 多克隆抗体(1:400)在 37℃ 下孵育 2h,TBS-T 缓冲液冲洗滤膜 3 次后,将滤膜转移至二抗羊抗小鼠 IgG-HRP(1:1000),37℃ 下孵育 1h,TBS-T 缓冲液再次冲洗滤膜后,ECL 化学发光显影。采用 β-actin(1:400)作为内参照。应用 Quantity One 4.2 软件分析,分别比较各组 Ang II、VEGF 条带灰度值与 β-actin 条带灰度值的比值,表示各组蛋白相对表达水平。

统计学分析:所有数据应用 SPSS 16.0 for Windows 进行统计学分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料组间比较采用独立样本 *t* 检验,两变量间相关性采用 Pearson 相关分析,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光素血管灌注视网膜铺片 高氧组视盘周围可见大片无灌注区,视网膜血管不规则扩张,走行迂曲,无灌注区周围可见大量新生血管丛,伴明显荧光渗漏;ACEI 组与高氧组比较,血管迂曲和不规则扩张减轻,新生血管丛减少,荧光渗漏减轻。

2.2 突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数 高氧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;ACEI 组(14.97 ± 2.01)个与高氧组(41.88 ± 2.34)个比较,平均每张切片中突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数减少,差异有统计学意义($P = 0.00$)。

2.3 视网膜 Ang II 和 VEGF 蛋白表达的变化 Western-blot 检测发现 2 组视网膜均有 Ang II 蛋白表达,Ang II 蛋白在 ACEI 组视网膜中表达较高氧组显著下降,差异有统计学意义($P = 0.00$,表 1);且 2 组视网膜中均有 VEGF 蛋白表达,VEGF 蛋白在 ACEI 组视网膜中表达较高氧组显著下降,差异有统计学意义($P = 0.00$,表 1)。经 Pearson 相关分析,在氧诱导视网膜病变中,Ang II 和 VEGF 蛋白的表达呈明显正相关($r = 0.91$, $P = 0.00$)。

3 讨论

本研究利用氧诱导视网膜病变模型,目的在于探讨 ACEI 对 RNV 的抑制作用。结果表明,ACEI 通过抑制 Ang II 生成,从而下调 VEGF,进而抑制 RNV 形成。

Ang II 不仅是一种血管活性物质,而且还是一种生长因子,可以促进多种血管细胞的扩散、转移以及合成,从而引起血管生成和重建^[4]。VEGF 是一种有效的促血管生成的活性因子,在增殖性视网膜病变中,VEGF 表达上调

并参与血-视网膜屏障的破坏^[5]。两者共同存在于视网膜神经节细胞层、Müller细胞层、外核层和视网膜色素上皮层中,影响视网膜微血管系统的发育^[6-8]。因此,在视网膜微血管系统中,Ang II直接或通过上调其他特异性生长因子特别是 VEGF 来影响视网膜血管周细胞的功能,发挥促 RNV 形成等作用。

ACEI 对血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的阻滞主要是通过阻断 ACE, 减少 Ang II 生成, 从而抑制 VEGF, 并且发挥抑制 RNV 形成的作用。本研究中, 早期应用 ACEI 可一定程度减少视网膜 Ang II 和 VEGF 蛋白表达, 减轻视网膜血管渗漏、血管内皮细胞增殖并且抑制 RNV 形成。除了减少 Ang II 生成以外, 短期内 ACEI 抑制 RNV 形成还可能与内皮素、基质金属蛋白酶以及缓激肽等因素有关^[9-11]。相关研究表明, 在增生性视网膜病变中, ACEI 抑制内皮素表达, 从而抑制视网膜毛细血管闭塞、内皮细胞增生和周细胞凋亡; ACEI 抑制基质金属蛋白酶表达, 从而抑制其对视网膜血管内皮细胞趋化、迁移和增殖; ACEI 减少缓激肽的降解, 激活细胞内的一氧化氮合酶, 促进一氧化氮和前列环素等扩血管物质的合成, 从而对视网膜起到保护作用^[9-11]。

实验结果表明, 通过 ACEI 减少 Ang II 生成, 从而抑制 VEGF, 短期内对以 RNV 为特征的增殖性视网膜病变的防治和转归有重要意义。但长期的疗效比较还需进一步的实验和临床研究来证实。

参考文献

1 Battagay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 1995;73(7):333-346

2 刘鹤南, 朱颖, 陈晓隆, 等. 肾素-血管紧张素系统阻滞剂预防早产儿视网膜病变研究. *中华眼底病杂志* 2010;28(3):291-293

3 Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(1):101-111

4 Nouet S, Nahmias C. Signal transduction from the angiotensin II AT₂ receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11(1):1-6

5 Wang X, Wang G, Wang Y. Intravitreal vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 α in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2009;148(6):883-889

6 Otani A, Takagi H, Oh H, et al. Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression in bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(5):1192-1199

7 Tee LB, Penrose MA, O'Shea JE, et al. VEGF-induced choroidal damage in a murine model of retinal neovascularisation. *Br J Ophthalmol* 2008;92(6):832-838

8 Kilic U, Kilic E, Järve A, et al. Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells *in vivo* by activating ERK-1/2 and Akt pathways. *J Neurosci* 2006;26(48):12439-12446

9 Moravski CJ, Skinner SL, Stubbs AJ, et al. The renin-angiotensin system influences ocular endothelial cell proliferation in diabetes: transgenic and interventional studies. *Am J Pathol* 2003;162(1):151-160

10 Ishizaki E, Takai S, Ueki M, et al. Correlation between angiotensin-converting enzyme, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in the vitreous of eyes with diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2006;141(1):129-134

11 Ebrahimian TG, Tamarat R, Clergue M, et al. Dual effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on angiogenesis in type 1 diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(1):65-70