

TGF- β 在氩激光诱导大鼠脉络膜新生血管中的表达

于爱萍,肖云,徐四俊,李明

作者单位:(830013)中国新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市,中国人民解放军第474医院全军眼科中心
作者简介:于爱萍,女,副主任医师,研究方向:眼底病。
通讯作者:于爱萍, y_aiping@163.com
收稿日期:2011-03-22 修回日期:2011-07-11

Expression of TGF- β in choroidal neovascularization induced by argon laser in RWH rats

Ai-Ping Yu, Yun Xiao, Si-Jun Xu, Ming Li

Eye Center of Chinese PLA No. 474 Hospital, Urumchi 830013, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Ai-Ping Yu. Eye Center of Chinese PLA No. 474 Hospital, Urumchi 830013, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. y_aiping@163.com

Received: 2011-03-22 Accepted: 2011-07-11

Abstract

• **AIM:** To study the expression of vessel endothelial transforming growth factor- β (TGF- β) in choroidal neovascularization (CNV) induced by argon laser in RWH rats.

• **METHODS:** Three groups of 21 RWH rats were photocoagulated by argon laser in single eye. 1 week, 2 weeks, 3 weeks after photocoagulation, the expression of TGF- β , and factor VIII related antigen (FVIII:Ag) was observed by immunohistochemical method.

• **RESULTS:** The result of FVIII:Ag immunohistochemistry showed that CNV initially formed 1 week after photocoagulation and reached the peak till 3rd week. TGF- β expression was observed in the ganglion cells, inner nuclear layer, retinal pigment epithelial cells, the vascular endothelial cells of retina and choroid in normal rats. Besides the above part, TGF- β expressed positively in the outer nuclear layer and choroid after retinal photocoagulation. 1 week to 3 weeks after photocoagulation, the positive stained density of FVIII:Ag and TGF- β in faculous region gradually increased ($P < 0.05$). The expression of FVIII:Ag was positively correlated with that of TGF- β ($r = 0.83, P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** CNV is positive correlated with the expression of TGF- β . The increased expression TGF- β may contribute to the main reason for the formation and

development of CNV.

• **KEYWORDS:** choroidal neovascularization; TGF- β ; FVIII:Ag

Yu AP, Xiao Y, Xu SJ, et al. Expression of TGF- β in choroidal neovascularization induced by argon laser in RWH rats. *Guji Yanke Zazhi* (Int J Ophthalmol) 2011;11(8):1327-1329

摘要

目的:评价血管内皮转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β) 在氩激光诱导 RWH 大鼠脉络膜新生血管 (CNV) 形成过程中的表达及其意义。

方法:RWH 大鼠 21 只,随机分成 3 组,每组 7 只。单眼视网膜氩激光光凝诱导 CNV 形成后,分别在光凝后 1, 2, 3wk 摘除双眼球,应用免疫组织化学技术对光凝区进行因子 VIII 相关抗原 (FVIII:Ag) 的检测以观察 CNV 形成,并检测 CNV 形成过程中 TGF- β 的表达,分析其变化趋势。

结果:FVIII:Ag 免疫组织化学检查结果显示,光凝后 1wk 开始形成 CNV, 3wk 达到高峰。正常 RWH 大鼠视网膜中, TGF- β 在视网膜神经节细胞层、内核层、色素上皮层、视网膜和脉络膜血管内皮细胞表达。视网膜光凝后,除上述部位外, TGF- β 在外核层和脉络膜的光凝损伤区阳性表达。光凝后 1~3wk, 光斑区内 FVIII:Ag 和 TGF- β 阳性染色密度逐渐增加 ($P < 0.05$), FVIII:Ag 与 TGF- β 阳性染色密度呈正相关 ($r = 0.83, P < 0.05$)。

结论:CNV 形成与 TGF- β 表达正相关, TGF- β 表达增多可能是 CNV 形成和增殖的主要原因之一。

关键词:脉络膜新生血管; 转化生长因子 β ; VIII 因子相关抗原

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.08.006

于爱萍,肖云,徐四俊,等. TGF- β 在氩激光诱导大鼠脉络膜新生血管中的表达. 国际眼科杂志 2011;11(8):1327-1329

0 引言

脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 是年龄相关性黄斑变性、中心性渗出性脉络膜视网膜病变等眼病致盲的主要原因,在其形成过程中多种细胞因子发挥重要作用。血管内皮转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β) 是 CNV 形成过程中起关键作用的血管生成刺激因子。本实验以氩激光诱导 RWH 大鼠 CNV 模型,应用免疫组织化学方法检测因子 VIII 相关抗原 (factor VIII related antigen, FVIII:Ag),以观察 CNV 形成过程,并对 CNV 形成发展过程中 TGF- β 的表达进行定位及半定量研究,进而探讨 TGF- β 在 CNV 形成过程中的作用^[1,2]。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性 RWH 大鼠 21 只,体质量 220~250g,由乌鲁木齐市天山动物实验有限公司提供。兔抗人 FVIII: Ag 单克隆抗体(工作浓度为 1:100)购自新疆维吾尔自治区昌吉市生物技术有限公司,免疫 TGF- β 多克隆抗体、生物素化羊抗兔 IgG、生物素化兔抗羊 IgG、SABC 试剂盒及 AEC 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法 CNV 动物模型的建立及标本取材:所有大鼠 50g/L 水合氯醛 5mL/kg 腹腔内注射麻醉。复方托品酰胺眼液散瞳,氩绿激光(波长为 647nm)围绕视盘、距离视盘 1~1.5PD 等距离光凝 8:00~10:00。激光功率 200mW,光斑直径 100 μ m,曝光时间 0.04s。光凝后有气泡产生或伴有轻度出血标志击破 Bruch's 膜,记为有效点。激光损伤后随机分为 3 组,每组 7 只。每只大鼠右眼为实验眼,左眼为正常对照眼。分别在损伤后 1,2,3wk 氯胺酮过量麻醉处死,摘出眼球,于角膜缘后 0.5mm 处剪开眼球壁,去除眼前节和玻璃体,余下的眼杯用 40g/L 多聚甲醛 0.1mol/L PBS 固定,常规石蜡包埋,4 μ m 厚度连续切片,做 FVIII: Ag 和 TGF- β 免疫组织化学检测。实验步骤按试剂盒说明书进行,采用免疫组化 SABC 法染色,AEC 显色,经苏木素复染后封片。实验中分别用 0.01mol/L PBS 取代一抗孵育,作为阴性对照,已知阳性切片作为阳性对照。切片内被染成红色的点、团簇为阳性反应物。计算机图像分析系统检测视网膜光凝后不同时间光凝区 TGF- β 和 FVIII: Ag 阳性染色密度。

统计学分析:采用 SPSS 16.0 统计学软件对所得数据各时间点组间差异的显著性进行单因素方差分析;以 Pearson 法对 FVIII: Ag 与 TGF- β 蛋白表达进行相关性检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FVIII: Ag 的表达 正常 RWH 大鼠视网膜各层次清晰,内、外颗粒层排列规则,视网膜及脉络膜毛细血管内皮细胞可见 FVIII: Ag 染色阳性,其他部位无阳性表达。光凝后 1wk 光斑内 FVIII: Ag 阳性表达的血管内皮细胞围成管腔;3wk 时 FVIII: Ag 阳性表达达到高峰,即 CNV 形成达到高峰。视网膜光凝后 1~3wk,激光损伤区内 FVIII: Ag 阳性染色密度增加($P < 0.05$)。

2.2 TGF- β 的表达 TGF- β 在正常 RWH 大鼠视网膜神经节细胞层、内核层、视网膜色素上皮层、视网膜和脉络膜血管内皮细胞表达。光凝后第 1wk,在光凝区 TGF- β 表达于视网膜神经节细胞层、内核层、色素上皮层、视网膜和脉络膜血管内皮细胞以及外核层和脉络膜光凝损伤区。视网膜光凝后 1~3wk,激光损伤区内 TGF- β 阳性染色密度增加($P < 0.05$)。

2.3 TGF- β 和 FVIII: Ag 表达的相关性 随时间延长,TGF- β 与 FVIII: Ag 阳性染色密度正相关($r = 0.83, P < 0.05$)。

3 讨论

新生血管形成是一个复杂的过程,多种生长因子、细胞外基质、蛋白水解酶和细胞黏附分子参与反应。维持血

管正常代谢的刺激因子和抑制因子之间平衡被打破,内皮细胞和周细胞被激活,分裂增殖加快是新生血管形成的重要原因。TGF- β 受体信号的转导,在新生血管组织及肿瘤组织边缘部分血管起源的内皮细胞中高度表达。近年研究表明,TGF- β 与 CNV 密切相关,成为治疗 CNV 重要的靶分子之一,也是目前公认的最主要的、功能最强的新生血管形成促进因子。TGF- β 是内皮细胞选择性生长因子,具有增加微血管通透性、促使内皮细胞外基质溶解、内皮细胞增殖移行及诱导血管生成等多种功能^[3]。大量研究证实,在 CNV 形成过程中,TGF- β 是最主要的促血管生成因子^[3-6]。本研究 TGF- β 蛋白在 CNV 形成过程中的表达变化,进而探讨 TGF- β 蛋白在 CNV 形成过程中的作用。

本实验以氩激光视网膜光凝诱发 RWH 大鼠 CNV 形成,利用免疫组织化学方法检查激光损伤区内血管内皮细胞特性标志物 FVIII: Ag 表达变化以检测 CNV 形成过程^[7,8]。结果表明,1wk 后光斑内 FVIII: Ag 阳性表达的血管内皮细胞围成管腔,CNV 形成;3wk 时 FVIII: Ag 阳性表达高峰($P < 0.05$)。由此也反映 CNV 形成的过程,即光凝后 1wk 增殖的内皮细胞形成管腔,即 CNV 形成;CNV 继续增殖,3wk 时形成达到高峰。

研究表明,在鼠激光诱导的 CNV 模型中,损伤部位视网膜色素上皮(RPE)样细胞、脉络膜血管内皮细胞和成纤维细胞中 TGF- β mRNA 表达增强^[9];在手术切除的 CNV 膜成纤维细胞和转分化的 RPE 细胞中存在 TGF- β 表达^[10];在年龄相关性黄斑变性(AMD)患者供眼的 RPE 中,以及在手术切除的 CNV 膜转分化 RPE 细胞中,TGF- β 表达增强^[11],进而证实 TGF- β 由 RPE 细胞、脉络膜血管内皮细胞分泌产生,被激活的巨噬细胞也分泌 TGF- β 。本研究中的 TGF- β 免疫组化结果发现,光凝后 1wk,除视网膜和脉络膜血管内皮细胞、神经节细胞层和内核层有阳性表达外,外核层及脉络膜损伤区也出现阳性表达,表明视网膜及脉络膜受到损伤刺激后产生的 TGF- β 可通过自分泌和旁分泌两种途径在损伤区聚集^[11,12]。

实验测定视网膜光凝后 1~3wk 损伤区 TGF- β 的表达发现,TGF- β 阳性表达密度逐渐升高。通过 VEGF 与 FVIII: Ag 阳性表达的相关性分析发现,光凝后 1~3wk,即在 CNV 形成发展过程中,代表血管活性内皮细胞的 FVIII: Ag 阳性染色密度逐渐增加($P < 0.05$);VEGF 阳性表达逐渐升高,与 FVIII: Ag 阳性表达正相关($r = 0.83, P < 0.05$),说明 CNV 形成增殖与 VEGF 正相关。上述结果提示,CNV 形成过程中 TGF- β 分泌升高,可能在 CNV 的形成和增殖过程中起到重要作用。

由此可见,进一步深入研究 TGF- β 在 CNV 形成过程中的作用机制,通过调控 TGF- β 蛋白表达水平对新生血管的形成和发展进行干预,可能会成为抑制 CNV 的一个重要手段。

参考文献

1 Tatar O, Shinoda K, Adam A, *et al.* Expression of endostatin in human choroidal neovascular membranes secondary to age-related macular

- degeneration. *Exp Eye Res* 2006;83(3):329-338
- 2 王康,王康孙,王玲,等. 激光诱导小鼠脉络膜新生血管模型中 CD105 的表达. *眼科研究* 2004;22(1):21-23
- 3 Kwak N, Okamoto B, Wood JM, et al. VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41(10):3158-3164
- 4 Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285(5425): 245-248
- 5 Wada M, Ogata N, Otsuji T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR/flk-1) mRNA in experimental choroidal neovascularization. *Curr Eye Res* 1999;18(3):203-213
- 6 Kvant A, Algere PV, Berglin L, et al. Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(9):1929-1934
- 7 Lopez PF, Sippy BD, Lambert HM, et al. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(5):855-868
- 8 Renno RZ, Youssri AI, Michaud N, et al. Expression of pigment epithelium-derived factor in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(5):1574-1580
- 9 Grisanti S, Tatar O, Canbek S, et al. Immunohistopathologic evaluation of choroidal neovascular membranes following verteporfin-photodynamic therapy. *Am J Ophthalmol* 2004;137(5):914-923
- 10 徐建锋,王雨生,杨秀梅,等. 倍频激光诱导的大鼠脉络膜新生血管中 CD105 的表达. *眼科研究* 2007;25(3):193-196
- 11 Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 1999;274(2):584-594
- 12 Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, et al. Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol* 2001;188(1):1-7

美国《科学引文索引》(扩展版) SCIE 2010 年收录中国大陆医学期刊名单及入库篇数

刊名	ISSN	入库篇数	SCI/SCIE
细胞研究(英文)	1001-0602	161	SCI/SCIE
亚洲男科学杂志(英文)	1008-682X	127	SCI/SCIE
中华医学杂志(英文)	0366-6999	667	SCI/SCIE
中国药理学报(英文)	1671-4083	227	SCI/SCIE
国际肝胆胰疾病杂志(英文)	1499-3872	96	SCIE
国际口腔科学杂志(英文)	1673-5749	53	SCIE
国际眼科杂志(英文)	2222-3959(1672-5123)	153	SCIE
生物医学与环境科学(英文)	0895-3988	71	SCIE
世界儿科杂志(英文)	1708-8569	67	SCIE
世界胃肠病学杂志(英文)	1007-9327	887	SCIE
消化病杂志(英文)	1751-2972	59	SCIE
亚太热带医学杂志(英文)	1995-7645	277	SCIE
浙江大学学报 B 辑(英文)	1673-1581	106	SCIE
中国癌症研究(英文)	1000-9604	37	SCIE
中国结合医学杂志(英文)	1672-0415	102	SCIE
中国神经再生研究(英文)	1673-5374	279	SCIE

摘编自中国科技期刊编辑学会网站