

高血脂对脉络膜 VEGF 表达的影响

林 鸿,徐国兴,郭 健,谢茂松,郑学栋

基金项目:中国福建省教育厅科研基金资助项目(No. JGG200720,JB08118);中国福建省自然科学基金资助项目(No. 2008J0324)

作者单位:(350001)中国福建省福州市,福建医科大学附属第一医院眼科

作者简介:林鸿,眼科学硕士,主治医师,研究方向:视网膜病。

通讯作者:徐国兴,教授,博士研究生导师,研究方向:视网膜病。

zjfmuxg@pub5.fz.fj.cn

收稿日期:2011-12-01 修回日期:2012-01-10

Research on the expression of VEGF on choroidal blood vessels of hyperlipidemia rabbits

Hong Lin, Guo-Xing Xu, Jian Guo, Mao-Song Xie, Xue-Dong Zheng

Foundation items: Research Foundation of Department of Education of Fujian Province, China (No. JGG200720, JB08118); Natural Science Foundation of Fujian Province, China (No. 2008J0324)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Correspondence to: Guo-Xing Xu, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. zjfmuxg@pub5.fz.fj.cn

Received:2011-12-01 Accepted:2012-01-10

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of vascular endothelium growth factor (VEGF) in the choroidal blood vessels of hyperlipidemia rabbits, to explore the role of hyperlipidemia in the pathogenesis of choroidal neovascularization (CNV) in age-related macular degeneration (AMD).

• **METHODS:** Thirty-six rabbits were randomly divided into 2 groups, normal control group and hyperlipidemia group by feeding respectively standard diet and high cholesterol diet. The expression of VEGF was analysed with immunohistochemical method and RT-PCR at 1 month, 2, 3 months.

• **RESULTS:** Immunohistochemical method showed that the expression of VEGF was weak in normal control group. The expression of VEGF was enhanced in hyperlipidemia group and the difference was statistically significant when group G2, G3 compared with group C2 ($P < 0.05$), C3 ($P < 0.01$), and nonsignificant when group G1 compared with C1 ($P > 0.05$). RT-PCR showed that VEGFmRNA was detected in both normal control group and hyperlipidemia group. The expression of VEGFmRNA

paralleled to the result of immunohistochemical method.

• **CONCLUSION:** The lesion on the choroidal blood vessels and enhanced expression of VEGF caused by hyperlipidemia might lead to CNV.

• **KEYWORDS:** hyperlipidemia; choroidal blood vessels; vascular endothelium growth factor

Lin H, Xu GX, Guo J, *et al.* Research on the expression of VEGF on choroidal blood vessels of hyperlipidemia rabbits. *Guji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(3):400-403

摘要

目的: 研究高血脂动物模型脉络膜组织学改变及 VEGF 的表达,初步探讨高血脂在年龄相关性黄斑变性(AMD)患者脉络膜新生血管(CNV)形成中的作用及其机制。

方法: 新西兰大白兔 36 只随机分为正常对照组与实验组,分别喂养普通饲料与高脂饲料。分别于 1,2,3mo 后应用免疫组织化学法和 RT-PCR 法对脉络膜 VEGF 表达进行检测。

结果: 免疫组织化学结果显示对照组视网膜和脉络膜各层 VEGF 弱表达;实验组 1mo 时脉络膜组织中 VEGF 表达与对照组差异无统计学意义($t = 0.442$, $P = 0.668$);2mo 时脉络膜组织中 VEGF 表达较对照组明显增强($t = 2.330$, $P = 0.042$);3mo 组脉络膜组织中 VEGF 表达较对照组明显增强($t = 3.542$, $P = 0.005$)。RT-PCR 示对照组脉络膜组织中检测到微弱的 VEGFmRNA 表达;实验组 1mo 时脉络膜组织中 VEGFmRNA 的表达与对照组差异无统计学意义($t = 1.703$, $P = 0.119$);2mo 组脉络膜组织中 VEGFmRNA 表达较对照组明显增强($t = 14.138$, $P < 0.001$);3mo 组脉络膜组织中 VEGFmRNA 表达较对照组明显增强($t = 15.240$, $P < 0.01$)。

结论: 高血脂通过直接损害脉络膜血管和增强 VEGF 的表达可能诱导 CNV 的发生。

关键词: 高血脂;脉络膜血管;血管内皮生长因子

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.03.07

林鸿,徐国兴,郭健,等.高血脂对脉络膜 VEGF 表达的影响.国际眼科杂志 2012;12(3):400-403

0 引言

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)是目前发达国家最主要的不可逆致盲眼病。在我国,随着人口的老龄化和卫生保健水平的不断提高,发病率也越来越高。以脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)形成为特征的湿性 AMD 是引起视力丧失的最主要原因。目前,其病因不明,流行病学调查表明:AMD 的发生与动脉粥样硬化^[1]、高脂饮食、高胆固醇^[2]密切相关。本实验通过测定高血脂动物模型脉络

表1 不同处理组血脂水平比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L, $n = 6$)

| 时间 | | TC | TG | LDL-C | HDL-C |
|-----|----------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| 1mo | C1 组 | 1.55 ± 0.24 | 0.76 ± 0.15 | 0.52 ± 0.16 | 1.25 ± 0.21 |
| | G1 组 | 25.45 ± 1.26 | 2.01 ± 0.38 | 18.77 ± 2.12 | 1.14 ± 0.09 |
| | <i>P</i> | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.265 |
| 2mo | C2 组 | 1.64 ± 0.20 | 0.85 ± 0.18 | 0.61 ± 0.12 | 1.21 ± 0.19 |
| | G2 组 | 39.83 ± 3.71 | 2.84 ± 0.35 | 23.98 ± 2.99 | 0.95 ± 0.11 |
| | <i>P</i> | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.014 |
| 3mo | C3 组 | 1.66 ± 0.22 | 0.81 ± 0.06 | 0.64 ± 0.10 | 1.30 ± 0.17 |
| | G3 组 | 48.92 ± 2.59 | 3.43 ± 0.41 | 28.3 ± 2.07 | 0.74 ± 0.06 |
| | <i>P</i> | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

膜血管组织学改变及 VEGF 的表达,揭示高血脂在湿性 AMD 发病中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰大白兔 36 只,月龄 3mo,体质量 1.50 ~ 1.70kg,雌雄兼可,健康无眼病,饲养于福建医科大学实验动物中心。饲养条件:自然光线,室温 20 ~ 25°C,空气流通,相对湿度 50% ~ 60%;动物分笼饲养,摄食普通颗粒兔饲料,自由饮水。鼠抗兔 VEGF 单克隆抗体 (Ab-3,克隆号 JH121) 为美国 Labvision-Neomarkers 公司,鼠免疫组织化学二步法检测试剂盒购自北京中杉金桥公司,RT-PCR 实验试剂购自美国 Fermentas 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 将动物随机分为 2 组,每组各 18 只:(1)高脂组:高脂饲料喂养,其中喂养 1mo 组 (G1)、喂养 2mo 组 (G2) 和喂养 3mo 组 (G3) 各 6 只;(2)正常对照组:普通饲料喂养,其中喂养 1mo 组 (C1)、喂养 2mo 组 (C2) 和喂养 3mo 组 (C3) 各 6 只。

1.2.2 高血脂动物模型的建立 高脂饲料喂养(饲料配方:2%胆固醇,5%猪油,10%蛋黄粉,0.5%牛胆酸钠,82.5%基础饲料)。每只兔子进食高脂饲料 100g/d;称体质量 1 次/wk;添加适量胡萝卜与青菜 2wk 1 次。在托吡卡散散瞳下,手持检眼镜动态观察视网膜脉络膜血管,1 次/wk。处死前取耳动脉血 1mL,酶法测定总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 及高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)。两组动物分别于饲养后 1,2,3mo 以 30g/L 戊巴比妥 30mg/kg 麻醉,处死后迅速摘除眼球,于锯齿缘后 0.5mm 处剪开眼球壁,在垫有冰块的平皿上迅速切除眼前节和玻璃体,在眼科显微镜下钝器解剖法分离视网膜及脉络膜组织。左眼组织速存于液氮速冻后 -80°C 保存,待提取 RNA。右眼组织放于 100mL/L 中性甲醛中固定,石蜡包埋、连续切片。

1.2.3 实验步骤 取右眼连续切片进行 HE 染色和免疫组织化学检测,其中免疫组织化学二步法检测视网膜脉络膜的 VEGF 表达,利用 HPIAS-2000 高清晰度彩色病理图文报告管理系统对 VEGF 的表达进行定量分析,每个标本随机选取 5 个不重叠的高倍镜视野 ($\times 400$),测定每个视野下阳性反应的平均光密度,以每个 5 个视野的平均光密度的平均值作为该例的测量值。RT-PCR 采用 Trizol 一步法提取脉络膜组织总 RNA,VEGF 和 β -Actin 引物由上海生工公司设计合成。PCR 产物以 15g/L 琼脂糖凝胶电泳,

凝胶成像系统进行灰度扫描,记录 VEGF 及 β -Actin 的吸光度 (A) 值,计算 VEGF/ β -Actin 值。

统计学分析:数据采用 SPSS 12.0 软件包进行统计学处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验和 one-way ANOVA 分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异, $P < 0.01$ 为有显著统计学差异。

2 结果

2.1 血中 TC, TG, LDL-C 和 HDL-C 的测定 各实验组动物的 TC, TG, LDL-C 水平与对照组相比均具有显著统计学差异 ($P < 0.01$, 表 1)。

2.2 眼底改变情况 G1 组和对照组的眼底未见异常改变;G2 组:视网膜动脉变细或管径不均,静脉充盈、迂曲,有的脉络膜血管充盈粗大;G3 组:视网膜动脉变细、管径不均或间断血柱。静脉充盈、迂曲加重,部分动静脉交错扭曲呈绳索样。脉络膜血管分布不均匀,有的充盈粗大,有的隐伏痉挛。

2.3 视网膜和脉络膜组织形态学变化 对照组视网膜、脉络膜结构整齐,细胞着染,排列正常,未见坏死、出血等结构改变(图 1A)。G1 组未见明显改变(图 1B);G2 组可见血管排列紊乱(图 1C);G3 组可见视网膜神经节细胞不同程度减少,部分脉络膜可见团状血管芽,血管管径较小(图 1D)。

2.4 视网膜和脉络膜组织中 VEGF 的表达 对照组 VEGF 表达于神经节细胞、内核层、视网膜光感受器层、视网膜色素上皮层和脉络膜层,呈浅棕色反应,弱阳性或可疑阳性表达(图 2A)。实验组 VEGF 表达于视网膜神经纤维层、内丛状层、内核层、外丛状层、光感受器层、视网膜色素上皮层和脉络膜层。G1 组呈浅棕黄色反应(图 2B),图像分析结果模型组较对照组平均光密度高,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。G2 组呈棕黄色反应(图 2C),与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2)。G3 组呈棕褐色反应或棕黄色反应(图 2D),与对照组比较差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$, 表 2)。

2.5 视网膜和脉络膜组织中 VEGFmRNA 的表达 如图 3 所示,对照组的脉络膜组织中可以检测到微弱的 VEGFmRNA 表达,但 3 组之间的差异无统计学意义。在实验组中,G1 组脉络膜组织中 VEGFmRNA 较对照组表达增强,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$);G2 组 VEGFmRNA 表达较对照组明显增强,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);G3 组 VEGFmRNA 表达较对照组显著增强,差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$, 图 4)。

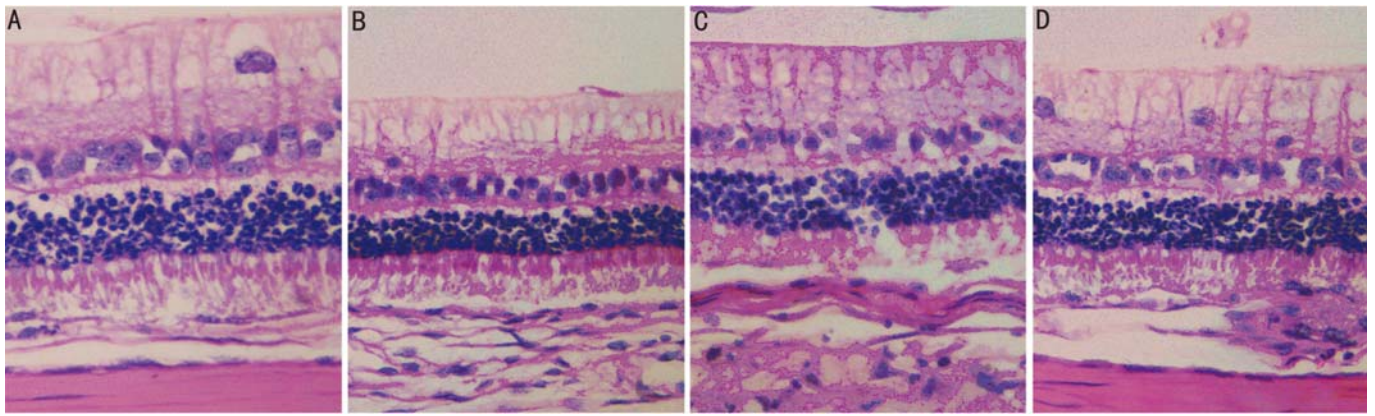


图1 视网膜脉络膜组织形态学改变(HE ×400) A:对照组;B:G1组;C:G2组;D:G3组。

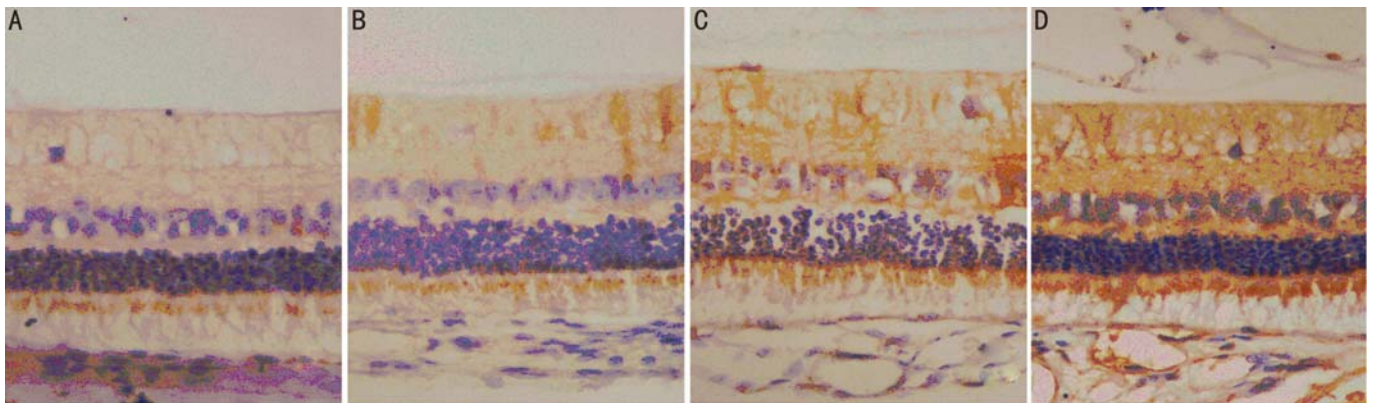


图2 视网膜脉络膜组织中 VEGF 的表达(免疫组织化学法, ×400) A:对照组;B:G1组;C:G2组;D:G3组。

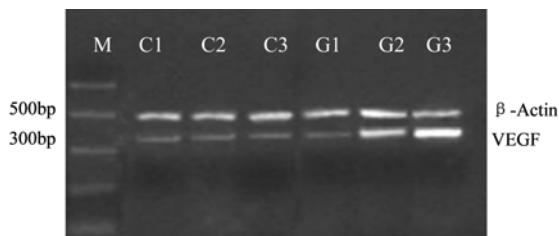


图3 不同处理组脉络膜组织中 VEGF mRNA 的 RT-PCR 结果。

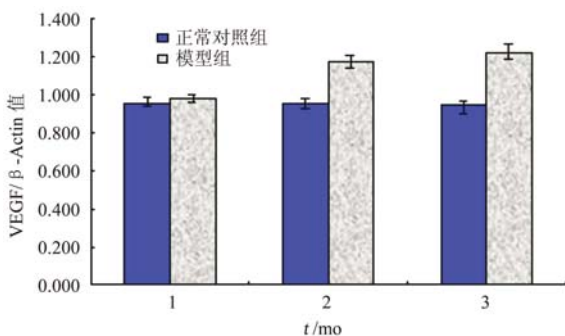


图4 不同处理组脉络膜组织 VEGF mRNA 的表达。

表2 兔视网膜脉络膜中 VEGF 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 时间点 | 分组 | | t | P |
|-----|-----------------|-----------------|-------|-------|
| | 对照组 | 实验组 | | |
| 1mo | 0.0990 ± 0.0167 | 0.1028 ± 0.0127 | 0.442 | 0.668 |
| 2mo | 0.0971 ± 0.0134 | 0.1243 ± 0.0253 | 2.330 | 0.042 |
| 3mo | 0.0980 ± 0.0111 | 0.1363 ± 0.0241 | 3.542 | 0.005 |

3 讨论

AMD 湿性型以 CNV 形成为特征,是 AMD 患者视力

丧失的最主要原因。目前,AMD 的病因和发病机制尚不明确,流行病学调查表明:AMD 的发生与动脉粥样硬化^[1]、高脂饮食、高胆固醇^[2]密切相关。血脂主要是指血液中的中性脂肪,即 TC 和 TG。因脂肪代谢或转运异常,血清中 TC, TG, LDL 过高或 HDL 过低称为高脂血症(hyperlipidemia)。本研究应用改良的高脂饲料喂养兔,结果显示血中 TC, TG 和 LDL 水平均明显高于普通饲料喂养的兔,且血脂水平随喂养时间逐渐升高,从而成功建立了高血脂动物模型以研究高血脂对脉络膜血管的影响。本实验选择大白兔作为动物模型,因其色素上皮层缺少色素而充分暴露出脉络膜组织,我们能够同时观察到视网膜和脉络膜两层血管和组织变化过程,这是选择兔为模型的一个非常突出的优点。

AMD 是一种由多因素引起的疾病,发病机制众说纷纭。目前主要有以下几种学说:视网膜色素上皮衰老机制、氧化损伤机制、血管模式机制和遗传学机制。血管模式机制认为:AMD 是一种血管性疾病,以原发性脉络膜血管灌注异常为主要特征,视网膜色素上皮细胞的损害是脉络膜血管变化的结果而不是原因^[3]。由于血管内皮细胞直接和血液接触,很容易受到血液中生化改变的影响,具有易损伤的功能性界面。研究表明,高血脂可以作为单一因素影响大血管内皮功能,造成血管壁的病理性改变^[2],是动脉粥样硬化发生发展的重要原因。脉络膜血管丰富,血流量大,且脉络膜毛细血管与系统循环的毛细血管不同,管壁薄,管径大,具有窗孔结构,直径大于 200Å 的物质也可畅通无阻。这些特征决定了脉络膜血管易受血液理化性质的影响。本研究结果证实高血脂同样可以作为

单一因素损害视网膜脉络膜血管,表现为动脉变细、管径不均甚至闭塞,静脉充盈、迂曲、卷缩成蛇行。脉络膜血管有的充盈粗大,有的隐伏痉挛。血管的病理性改变可导致组织缺血缺氧,而缺氧是公认的 CNV 形成的首要原因。对于老年人,由于机体组织器官普遍进行性脂质浸润、硬化,顺应性降低,血管阻力增加、灌注减少,病变尤为严重。

VEGF 是目前已知的功能最强的血管内皮细胞促有丝分裂素,可特异性作用于血管内皮细胞,诱导内皮细胞的增生、迁移。作为湿性 AMD 的最主要特征及最重要致盲原因,CNV 的生成机制尚未完全阐明,但大量研究证据显示新生血管的生成与成熟是一个非常复杂的相互调节过程,是一系列受体通过大量的配体完成的一系列活动,而 VEGF 是血管生成病理生理机制中一个关键的限速步骤。本实验通过蛋白质和基因水平定性、定位、半定量研究高血脂对脉络膜 VEGF 表达的影响。结果显示,正常情况下 VEGF 在视网膜和脉络膜各层均有微量表达,高血脂动物模型的视网膜和脉络膜组织中,VEGF 表达强度明显升高,并与喂养时间成正相关。VEGF 的表达受到多条途径的调控,研究表明,低氧作为促进血管形成的一个重要

刺激因素,通过低氧诱导转录因子(hypoxia inducible transcription factors, HIFs)结合 VEGF 基因启动子区上游增强子元件,从而促进 VEGF 的转录,在数分钟内可使 VEGF 水平升高 30 余倍^[4]。因此,高血脂有可能通过对脉络膜血管的影响如血管硬化闭塞、血管基膜节段性增厚造成缺氧状态而诱导 VEGF 的表达。

本研究结果表明,高血脂通过直接损害视网膜脉络膜血管造成组织的缺血缺氧状态,上调 VEGF 的表达,诱导 CNV 的发生,从而成为 AMD 发病的一个重要危险因素。

参考文献

- 1 Peeters A, Magliano DJ, Stevens J. Changes in abdominal obesity and age-related macular degeneration: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Arch Ophthalmol* 2008;126(11):1554-1560
- 2 Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352(16):1685-1695
- 3 Friedman E. Update of the vascular model of AMD. *Br J Ophthalmol* 2004;88(2):161-163
- 4 Pietras A, Johnsson AS, Pahlman S. The HIF-2alpha-driven pseudo-hypoxic phenotype in tumor aggressiveness, differentiation, and vascularization. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010;345(1):1-20