

VEGF 对大鼠慢性高眼压视网膜神经节细胞的作用

吕炳健, 王瑞夫, 董晓云, 吉秀祥

作者单位: (830011) 中国新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 解放军第 474 医院眼科 全军眼科中心
作者简介: 吕炳健, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 青光眼。
通讯作者: 吕炳健. lbingjian@126.com
收稿日期: 2012-05-14 修回日期: 2012-07-03

Effect of vascular endothelium growth factor on the retinal ganglion cells of rats with chronic intraocular hypertension

Bing-Jian Lü, Rui-Fu Wang, Xiao-Yun Dong, Xiu-Xiang Ji

Department of Ophthalmology, No. 474 Hospital of Chinese PLA, Urumchi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Bing-Jian Lü. Department of Ophthalmology, No. 474 Hospital of Chinese PLA, Urumchi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. lbingjian@126.com
Received: 2012-05-14 Accepted: 2012-07-03

Abstract

• **AIM:** To investigate how vascular endothelium growth factor (VEGF) contributes to the expression of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in retina of rats and evaluate the neuroprotection of VEGF for retinal ganglion cells (RGCs) of rats with chronic intraocular hypertension and its potential approach.

• **METHODS:** Thirty female adult Sprague Dawley rats were randomly divided into three groups: elevated intraocular pressure (EIOP) + VEGF (group A, including A3d, A14d), EIOP + placebo (group B, including B3d, B14d), normal + VEGF (group C, including C3d, C14d). The model of EIOP were established by obstructing episcleral veins in group A and B, only open the bulber conjunctiva without obstructing episcleral veins in group C. In group A and C, shortly after episcleral veins were cauterized, rats were intravitreally injected 2 μ L VEGF (concentration: 0.05 μ g/ μ L) at 2.0mm behind the limbus of cornea. To keep the IOP, 2 μ L vitreous body were drawn out before the intravitreal injection. In group B, 2 μ L H₂O were intravitreally injected. Three days and 14 days later, the animals were sacrificed and the eye balls were cut with cryostat, then TUNEL staining protocol were carried out to detect apoptotic cells and degenerate neurons in the retina. Immunofluorescent double labeling was performed to identify which cells were PEDF-positive cells in the retina.

• **RESULTS:** The IOP was obviously increased after the operation ($P < 0.05$), there was no significant difference in IOP between 3 days and 14 days after the operation.

TUNEL-positive cells and FJ-positive cells in retina of chronic intraocular hypertension group were much more than that of normal group. The number of TUNEL-positive cells in retinas of chronic intraocular hypertension+VEGF group was reducing.

• **CONCLUSION:** Intravitreal administration of VEGF has the effect of reducing the apoptosis of the RGCs in rats with chronic intraocular hypertension.

• **KEYWORDS:** vascular endothelium growth factor; pigment epithelium-derived factor; ocular hypertension; ganglion cell; apoptosis; β -tubulin

Citation: Lü BJ, Wang RF, Dong XY, *et al.* Effect of vascular endothelium growth factor on the retinal ganglion cells of rats with chronic intraocular hypertension. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(8):1459-1462

摘要

目的: 探讨血管内皮生长因子 (vascular endothelium growth factor, VEGF) 对大鼠视网膜色素上皮生长因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) 表达的影响及 VEGF 对慢性高眼压条件下神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 的保护作用和可能途径。

方法: 雌性 SD 大鼠 30 只, 随机分为高眼压+VEGF 组 A (包括 A3d, A14d)、高眼压+安慰剂组 B (包括 B3d, B14d) 和正常+VEGF 组 C (包括 C3d, C14d), A、B 组模型制作应用巩膜浅层静脉烧烙法建立慢性高眼压模型, C 组只剪开球结膜, 不烧烙巩膜浅静脉。A、C 组在模型建立后立即用 10 μ L 微注射器于大鼠角膜缘后 2mm 处刺入玻璃体腔, 抽出玻璃体 2 μ L, 再向玻璃体腔内注射 2 μ L (0.05 μ g/ μ L) 重组大鼠 VEGF, B 组同法注入等量的去离子水。在 3d 和 14d 后处死动物, 取眼球, 冰冻切片, 免疫组织化学法观察视网膜 PEDF 的表达, 用 TUNEL 染色检测各组视网膜神经节细胞的凋亡, 免疫荧光双标观察 PEDF 染色阳性的细胞是何细胞。

结果: 术后眼压明显升高 ($P < 0.05$), 术后 3d 和 14d 的眼压无显著性差异。视网膜 PEDF 染色阳性细胞, B 组多于 A 组, A 组多于 C 组; TUNEL 荧光染色显示 VEGF 高眼压组 RGCs 的凋亡明显的少于高眼压组。

结论: 玻璃体腔注射 VEGF 可减少高眼压视网膜神经节细胞的凋亡。

关键词: 血管内皮生长因子; 色素上皮衍生因子; 高眼压; 神经节细胞; 凋亡; β -微管蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.08.09

引用: 吕炳健, 王瑞夫, 董晓云, 等. VEGF 对大鼠慢性高眼压视网膜神经节细胞的作用. 国际眼科杂志 2012;12(8):1459-1462

0 引言

血管内皮生长因子(vascular endothelium growth factor, VEGF)是一种促新生血管生成作用的细胞因子,它具有促进内皮细胞增殖,提高血管通透性,改变细胞外基质等生物学作用,在血管的发生中发挥重要作用。但随着研究的不断深入,发现 VEGF 还具有神经元、胶质细胞的营养和抗凋亡的作用。我们在建立前述的慢性高眼压大鼠动物模型的基础之上,应用免疫组织化学及 TUNEL 染色技术,研究外源性 VEGF 玻璃体腔注射对慢性高眼压条件下视网膜神经节细胞损伤的保护作用。 β -tubulin 是神经元的活性标记物,用免疫荧光双标来明确 PEDF 和神经节细胞的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 雌性成年 SD 大鼠购自第四军医大学实验动物中心;TUNEL 试剂盒(美国 Teva 公司);重组大鼠 VEGF(博士德生物制剂公司); β -tubulin(晶美生物公司);羊抗大鼠 PEDF 抗体(美国 Santa Cruz);小鼠抗大鼠 VEGF 抗体(晶美生物公司);小鼠抗大鼠 β -tubulin 抗体(美国 Santa Cruz);笔式眼压计 Tonopen XL(美国 Jackson 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 取雌性成年 SD 大鼠(220~250g)30只,随机分为3组:高血压+VEGF组(包括A3d, A14d)、高血压+安慰剂组(包括B3d, B14d)和正常+VEGF组(包括C3d, C14d),各组均为10只,随机选1眼为实验眼,A、B组模型制作应用巩膜浅层静脉烧烙法^[1],待眼压达4.0kPa以上时视为模型有效,C组只剪开球结膜,不烧烙巩膜浅静脉。A、C组在模型建立后即刻用10 μ L微注射器于大鼠角膜缘后2mm处刺入玻璃体腔,抽出玻璃体2 μ L,再向玻璃体腔内注射2 μ L(0.05g/L)重组大鼠 VEGF,E组同法注入等量的去离子水。分别于模型建立后3,14d处死大鼠。动物实验遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。测量各组术后3d和14d的眼压,动物灌注固定及切片、视网膜 PEDF 表达的免疫组织化学染色检测、视网膜 PEDF 染色阳性神经节细胞计数方法均同前期实验^[1,2]。

1.2.2 免疫荧光双标(PEDF + β -tubulin)观察视网膜 PEDF 染色阳性的细胞 取14d时间点高血压组和对照组各2张切片,室温下凉干2h。0.01mol/L PBS 洗涤3次,每次3min,甲醛双氧水室温下孵育30min。同前漂洗后,30mL/L 山羊血清孵育1h。加一抗(PEDF 1:50, β -tubulin 1:2500)室温过夜。0.01mol/L PBS 洗涤3次,每次3min。入二抗(1:1000 驴抗小鼠 donkey anti-mouse-Tex-Red,用 RB200 标记发橘红色光;1:400 驴抗羊 donkey anti-goat-FITC),用异硫氰酸荧光标记,发黄绿色光室温下避光孵育4h。甘油封片,荧光显微镜观察。免疫荧光双标染色阳性细胞为黄色,随机选5个独立高倍视野(\times 400),计数染色阳性细胞百分率,即阳性细胞百分率=(Σ 阳性细胞数/ Σ 总细胞数) \times 100%。

1.2.3 TUNEL 染色检测各组视网膜神经节细胞的凋亡

室温下生理盐水浸洗组织切片5min;再用0.01mol/L PBS 室温下浸洗5min,每张切片用100 μ L(10 μ g/mL)蛋白酶 K 溶液下孵育5min;再用0.01mol/L PBS 室温下浸洗5min,每张切片加100 μ L 平衡缓冲液,室温放置5min;平衡后,每张切片加100 μ L TdT 反应复合物(生物素化的核苷酸、TdT 酶、平衡缓冲液按1:1:98配置),塑料膜覆盖切

片,37 $^{\circ}$ C 孵育2h;复温后用去离子水按1:10稀释20 \times 柠檬酸钠缓冲剂(SSC, saline sodium citrate buffer)到2 \times SSC,去掉塑料膜,2 \times SSC 室温下浸洗切片15min 终止反应;0.01mol/L PBS 室温下浸洗切片5min \times 2,室温下3mL/L H₂O₂浸洗3min,以封闭内源性过氧化物酶;用0.01mol/L PBS 按1:500稀释链霉素生物素 HRP,室温下每张切片加100 μ L 稀释孵育液30min;0.01mol/L PBS 室温下浸洗切片5min \times 2, DAB 呈色;去离子水或双蒸水漂洗数次。脱水封片。光镜下观察,TUNEL 染色阳性细胞为棕黄色,阳性细胞计数方法同免疫荧光双标染色。

统计学分析:采用 SPSS 12.0 统计学软件进行统计分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。三组在造模后3d和14d的眼压值比较采用两因素方差分析,组间均数的两两比较采用 Dunnett-*t* 检验;造模后 TUNEL 染色阳性细胞率的比较采用析因设计的方差分析,组间均数的两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠眼压变化 统计学分析表明,术后眼压明显升高($P < 0.05$),术后3d和14d的眼压差别没有统计学意义(图1)。

2.2 免疫组织化学染色检测视网膜 PEDF 的表达 各组视网膜均有 PEDF 表达, PEDF 阳性细胞主要分布在视网膜色素上皮层(retinal pigment epithelium, RPE)、外丛状层(outer plexiform layer, OPL)、内颗粒层(inner nuclear layer, INL)、内丛状层(inner plexiform layer, IPL)、视网膜神经节细胞层(retinal ganglion cell layer, RGCL)、视网膜神经纤维层(retinal nerve fiber layer, RNFL)等几层。A和B组视网膜 PEDF 的表达比C组均有增加,主要在 RGCL 和 RNFL 两层,可见染色阳性的细胞形态和清晰的细胞突起,突起视网膜 PEDF 染色阳性细胞可向下延伸到内核层。B组和A组之间也有明显的变化,B组数要多于A组, PEDF 阳性细胞,也主要分布在 RGC 和 RNFL 层,同一组两个不同的时间点(3d, 14d) PEDF 阳性细胞的数量也有明显差异,14d时间段的 PEDF 阳性细胞数要高于3d时间段(图2)。

2.3 PEDF 阳性视网膜神经节细胞计数及其变化规律 视网膜 PEDF 阳性神经节细胞的表达在三组有明显的变化:A组与B组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$),B组与C组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。在两个时间点上B组和A组都有相似变化:14d较3d增加($P < 0.05$),C组两个时间点上的差异没有统计学意义($P > 0.05$,图3)。

2.4 免疫荧光双标检测(PEDF + β -tubulin) 荧光显微镜下 PEDF 阳性标记显示为绿色, β -tubulin 阳性标记显示为红色。C组绿色荧光和红色荧光标记阳性的细胞胞体位于节细胞层,细胞突起均延伸到内网状层,胞体和细胞突起数量较少,分布均匀,绿色荧光和红色荧光相互重叠。A组绿色荧光标记阳性的细胞主要位于节细胞层、内核层、内网状层和色素上皮层,节细胞层可见 PEDF 阳性细胞的胞体,数量较多,分布均匀,红色荧光标记阳性的细胞位于节细胞层,可见细胞胞体,细胞突起向下延伸到内网状层,绿色荧光和红色荧光相互重叠。B组绿色荧光和红色荧光标记阳性的细胞胞体和突起的染色与A组相似,但胞体和突起的数量较B组少,但又多于C组(图4)。

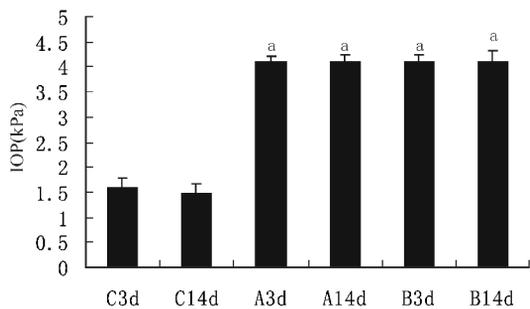


图1 大鼠玻璃体 VEGF 注射慢性高眼压术后各组眼压变化 ^a*P*<0.05 vs C 组。

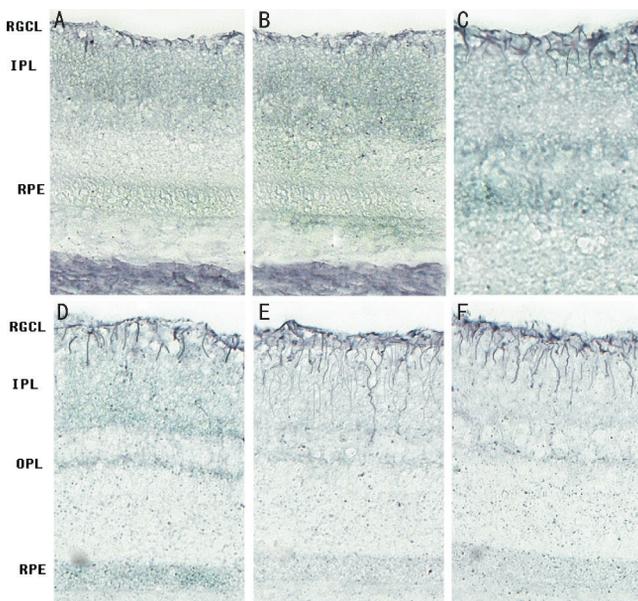


图2 各组大鼠玻璃体 VEGF 注射后视网膜 PEDF 的表达 (SABC×400) A: C3d 组; B: C14d 组; C: A3d 组; D: A14d 组; E: B3d 组; F: B14d 组。

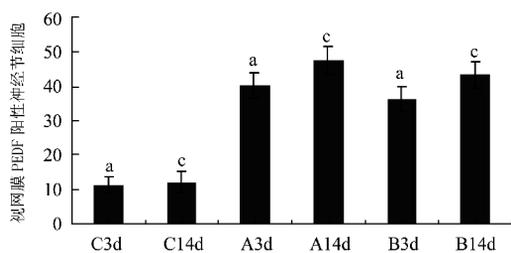


图3 各组大鼠玻璃体 VEGF 注射后 PEDF 阳性视网膜神经节细胞计数 ^a*P*<0.05 vs 各组 3d; ^c*P*<0.05 vs 各组 14d。

2.5 各组视网膜神经节细胞的凋亡 B 组视网膜神经节细胞层及内、外核层均有大量浓染的阳性细胞, B3d 和 B14d 之间无差异; 而 C 组视网膜神经节细胞层及内、外核层只有少量阳性细胞, C3d 和 C14d 之间无差异; A 组视网膜神经节细胞层及内、外核层也有大量的阳性细胞, 但是节细胞层阳性细胞数较 B 组明显减少, 其中 14d 节细胞层阳性细胞数较 A3d 少 (图 5)。

3 讨论

VEGF 可以对高眼压状态下的视网膜起到保护作用, 减少神经节细胞的凋亡。VEGF 在较早的研究中发现是一类由缺血缺氧等原因刺激产生的促新生血管生成的细胞因子。它能促进内皮细胞增殖、血管形成和增加血管通透性。最近也有大量的实验证明 VEGF 还具有神经营养和神经保护作用。Alon 等^[3]研究提示, VEGF 可保护内皮

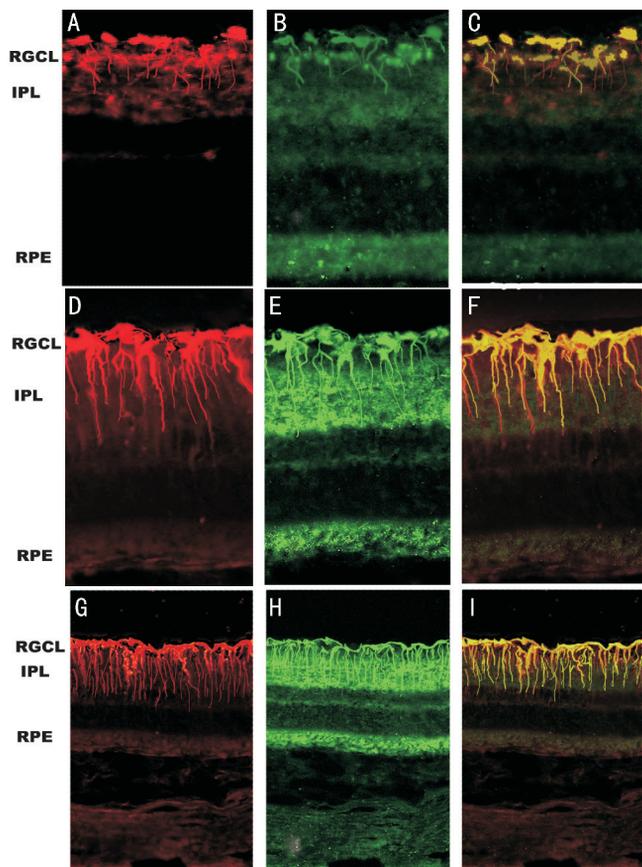


图4 大鼠高眼压术后 14d 视网膜 PEDF + β-tubulin 免疫荧光双标染色 (SABC×400) A: C14d 组 β-tubulin 染色; B: C14d 组 PEDF 染色; C: C14d 组 β-tubulin 和 PEDF 染色; D: A14d 组 β-tubulin 染色; E: A14d 组 PEDF 染色; F: A14d 组 β-tubulin 和 PEDF 染色; G: B14d 组 β-tubulin 染色; H: B14d 组 PEDF 染色; I: B14d 组 β-tubulin 和 PEDF 染色。

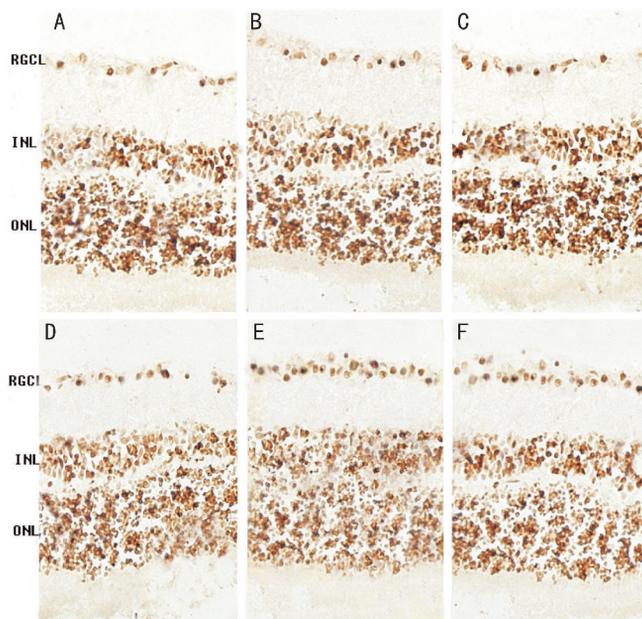


图5 各组大鼠玻璃体 VEGF 注射后视网膜 TUNEL 染色 (TUNEL 染色 ×400) A: C3d 组; B: C14d 组; C: A3d 组; D: A14d 组; E: B3d 组; F: B14d 组。

细胞免于凋亡。目前的研究证实 VEGF 有神经营养作用^[4], 可延长细胞的存活时间, 直至新生血管形成, 减轻脑缺血再灌注后脑水肿和神经元损伤。目前对 VEGF 在神经保护方面的研究也逐渐成为热点, 我们的实验发现外源

性的 VEGF 可以减少高眼压损伤下的视网膜神经节细胞的凋亡,明显地减轻了高眼压视网膜的损伤。随着时间的延长这种作用仍然存在,在术后 14d 它的这种作用要强于 3d 的,其原因可能是因为术后 3d,视网膜神经节细胞的凋亡还不是很明显,因此 VEGF 的保护作用相对来说也不突出。VEGF 对高眼压损伤下的视网膜神经节细胞还有抑制细胞变性的作用。此模型视网膜节细胞的损伤包括细胞凋亡和细胞变性、死亡两种模式,VEGF 具有抑制细胞凋亡和细胞变性的双重保护神经节细胞的作用。

VEGF 在刺激神经元生长的同时也能引起新生血管的生长。这个具有挑战性的问题仍然是需要我们迫切解决的问题。Oosthuysen^[5]认为 VEGF 的神经保护作用与它的血管作用没有关系。VEGF 可能通过调整内皮细胞和神经元的相关功能而对外伤刺激性神经再生起作用,这种再生作用与新生血管一起提高机体的修复作用。VEGF 能促进缺血的神细胞再生^[6]。Louissaint 等^[7]认为 VEGF 是连接神经生长、迁移与新生血管生成的桥梁。在我们的实验中用 2 μ L(0.05 μ g/ μ L)剂量的 VEGF 玻璃体注射,未发现视网膜明显的新生血管,可能是因为与此实验使用剂量较小有关,也可能是购买的试剂纯度及质量等方面的问题,或者是因为我们观察的时间不够长。同时高眼压模型中视网膜神经节细胞的损伤因素中,高眼压导致视网膜缺血也是一个重要的方面。从某一角度上分析,VEGF 能刺激新生血管的产生,因此能为视网膜提供一定的营养,这与它的神经营养、神经保护作用相一致。

玻璃体腔注射外源性 VEGF 能刺激视网膜产生 PEDF, PEDF 也是目前研究较多的一种神经营养因子,它能促进神经元的存活和分化;特异性地保护神经元免受凋亡及 H₂O₂、谷氨酸等的毒性作用。因此我们实验结果提示 VEGF 的神经保护作用可能部分的是通过刺激 PEDF 的表达增加而产生的。但是也不排除 PEDF 的产生仅仅是高眼压刺激的应急反应,本身与视网膜神经保护作用毫无相干。

参考文献

- 1 吕炳健,严宏,王百忍,等. 色素上皮衍生因子在慢性高血压大鼠视网膜的表达. 第四军医大学学报 2005;26(12):1126-1129
- 2 吕炳健,高晓唯,王瑞夫,等. 色素上皮衍生因子对大鼠慢性高血压视网膜神经节细胞的保护作用. 眼科研究 2011;28(5):427-431
- 3 Alon T, Hemo I, Itin A, et al. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995;1(10):1024-1028
- 4 Zheng XR, Zhang SS, Yin F, et al. Neuroprotection of VEGF-expression neural stem cells in neonatal cerebral palsy rats. *Behav Brain Res* 2012;230(1):108-115
- 5 Oosthuysen B. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 2001;28:131-138
- 6 Ma Y, Qu Y, Fei Z. Vascular endothelial growth factor in cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 2011;89(7):969-978
- 7 Louissaint A Jr, Rao S, Leventhal C, et al. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron* 2002;34(6):945-960