

17 β -雌二醇预防早产儿视网膜病变的动物实验研究

范海燕,倪卫杰,施彩虹,蒋 坚,黄 蓉,王俊芳,胡海林,陈 重

作者单位:(201900)中国上海市,上海交通大学医学院附属第三人民医院眼科

作者简介:范海燕,硕士,住院医师,研究方向:眼底病。

通讯作者:倪卫杰,硕士,副主任医师,研究方向:眼底病。haiyan-fan@tom.com

收稿日期:2013-11-18 修回日期:2014-01-27

Prevention effects of 17 β - estradiol on retinopathy of prematurity in animal models

Hai - Yan Fan, Wei - Jie Ni, Cai - Hong Shi, Jian Jiang, Rong Huang, Jun - Fang Wang, Hai - Lin Hu, Zhong Chen

Department of Ophthalmology, the Third People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201900, China

Correspondence to: Wei - Jie Ni. Department of Ophthalmology, the Third People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201900, China. haiyan-fan@tom.com

Received:2013-11-18 Accepted:2014-01-27

Abstract

• **AIM:** To explore the effects and mechanisms of 17 β - estradiol on retinopathy of prematurity in rats.

• **METHODS:** Eighty 7 - day - old SD rats were randomly divided into normol group, high oxygen group, 17 β - estradiol treatment group and vegetable oil treatment group. Rats of the high oxygen group were put into the environment exposed to 75% oxygen for 5d and backed to room air for another 5d to establish the oxygen - induced retinopathy model. The treatment group was given 17 β - estradiol by injection with the dose of 0.5 μ L/rat/d (2 μ g/ μ L) before exposed to 75% oxygen. The vegetable oil treatment group is similar to 17 β - estradiol treatment group but the medicine changed to vegetable oil. Counting the endotheliocyte nuclei of new vessels which extended from retina to vitreous body in the tissue - slice of HE staining, and investigate the change of retinal blood vessels by using methods of retina flat - mount. The expression of VEGF in retina by immunohistochemistry and reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR) analysis.

• **RESULTS:** Rats treated with E₂ showed less neovascularization than high oxygen group and oxygen - exposed rats treated with vegetable oil ($P < 0.05$). Adenosine diphosphate - ase (ADP ase) stained retina flat - mount showed that: less free - vascular areas and new

blood vessels were seen in the 17 β - estradiol treatment group compared with the high oxygen group. The expression of VEGF in 17 β - estradiol treatment group lower than high oxygen group and vegetable oil treatment group, but higher than normal group in immunohistochemistry and RT - PCR analysis.

• **CONCLUSION:** 17 β - estradiol has prevention effects in retinal neovascularization and the mechanism may involve in its interaction with VEGF.

• **KEYWORDS:** retinopathy of prematurity; retinal neovascularization; 17 β - estradiol; vascular endothelial growth factor; animal models

Citation: Fan HY, Ni WJ, Shi CH, *et al.* Prevention effects of 17 β - estradiol on retinopathy of prematurity in animal models. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(3):407-410

摘要

目的:以大鼠为动物模型探讨 17 β -雌二醇对于早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 的预防作用并探讨其机制。

方法:选取 7 日龄 SD 大鼠 80 只随机分为正常对照组、单纯高氧组、雌二醇干预组以及溶媒干预组,单纯高氧组于氧浓度 75% 的容器内饲养 5d,再置正常空气下饲养至 17 日龄,雌二醇干预组饲养方法同单纯高氧组,在大鼠 7 ~ 17 日龄间每日皮下注射 17 β -雌二醇 (E₂,植物油稀释,配制浓度为 2 μ g/ μ L),每只大鼠 0.5 μ L/d,溶媒干预组饲养方法与雌二醇组相同,药物改为相同体积植物油。通过 HE 染色、视网膜铺片观测血管改变和增生情况,免疫组化及 RT-PCR 检测 VEGF 的表达。

结果:雌二醇干预组突破内界膜的内皮细胞较单纯高氧组及溶媒干预组明显减少 ($P < 0.05$);视网膜铺片可见雌二醇干预组较之单纯高氧组血管网有不同程度的改善,血管结构清晰,形态基本正常;免疫组织化学染色以及 RT-PCR 结果显示:VEGF 在雌二醇干预组的表达较之单纯高氧组及溶媒干预组降低,但仍高于正常组。

结论:17 β -雌二醇可在一定程度上预防 ROP 新生血管的产生,机制可能与抑制 VEGF 的表达相关。

关键词:早产儿视网膜病;视网膜新生血管;17 β -雌二醇;血管内皮生长因子;动物模型

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.03.07

引用:范海燕,倪卫杰,施彩虹,等.17 β -雌二醇预防早产儿视网膜病变的动物实验研究.国际眼科杂志 2014;14(3):407-410

0 引言

随着围产医学的发展,未成熟儿存活率的提高,随之而来的是早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity,

ROP)的发病率逐年增高,并逐渐成为儿童致盲的主要原因^[1]。视网膜新生血管形成是该病基本病理性改变,抑制视网膜新生血管生长是防治此病的关键。现行的治疗方法如激光、冷凝或手术均不可避免地破坏部分视网膜,进一步损伤视功能,且易复发。因此,寻找更有效的预防、治疗方法是我们面临的重要课题。对早产儿目前的研究显示^[2],其体内雌激素水平较之正常出生儿低,以往学者的研究已证明雌激素水平降低可使视网膜新生血管生成增加^[3],那么是否可以通过补充适量雌激素,从而预防 ROP 的发生,成为本部分的研究目的。

1 材料和方法

1.1 材料 选取清洁级 7 日龄 Sprague Dawley (SD) 新生大鼠 80 只(中国科学院上海实验动物中心提供),氧气分析仪(梅城电化分析仪器厂, CY-12C), 17-β 雌二醇(17β-estradiol, Sigma 公司, 美国), 即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒和 DAB 染色盒(武汉博士德生物工程有限公司), 小鼠抗大鼠 VEGF 单克隆抗体(Santa cruz 公司, 美国), RT-PCR 试剂盒[TaKaRa RNA PCR kit (AMV) ver3.0]、Total RNA 提取试剂及引物[宝生物工程(大连)有限公司]。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 不分性别选取健康 7 日龄 SD 新生大鼠 80 只, 称重后随机分为 4 组, 每组 20 只: 组 1(正常组): 将其置于正常空气环境下饲养至 17 日龄。组 2(单纯高氧组): 将幼鼠与母鼠共同置于密闭容器中, 控制氧浓度为 (75±2)% , 5d 后(出生后 12d) 回到正常室内环境中诱导视网膜新生血管形成。组 3(雌二醇干预组): 饲养方法同组 2, 但在小鼠吸氧前即 7 日龄时行皮下注射雌二醇(E2, 植物油稀释, 配制浓度为 2μg/μL) 0.5μL/d^[4,5], 1 次/d 至小鼠 17 日龄。组 4(溶媒干预组): 饲养及给药方法同组 3, 药物改为相同体积的植物油。然后取各组 17d 幼鼠右眼球 5 只, 制成石蜡切片, 行矢状位连续切片, 片厚 5μm, 行 HE 染色及免疫组化染色, 另摘取 3 只幼鼠眼球行视网膜铺片, 从其余大鼠的右眼视网膜组织提取总 RNA 行逆转录 RT-PCR。

1.2.2 建立 ROP 模型 将 7 日龄 SD 大鼠与哺乳母鼠一起置于笼盒中, 密闭, 进气孔接 100% 医用氧气, 出气孔接氧浓度测量仪, 先将氧气流量调至 5L/min, 使氧气迅速充满氧箱, 氧浓度达 70% 后将流量降至 1L/min, 使浓度缓慢上升至 75% , 再调低流量至 0.5L/min 左右维持氧浓度稳定在 (75±2)% 范围内, 连续 5d 吸氧, 每天开箱, 并与正常对照组更换哺乳母鼠, 防止大鼠肺损伤。

1.2.3 视网膜铺片 将幼鼠眼球 12:00 位置用缝线固定, 取出大鼠的右侧眼球, 用 40g/L 甲醛 PBS 液中固定 24h。在眼科手术显微镜下沿角巩缘剪开角膜去除晶状体, 用蒸馏水漂洗数次, 将视网膜不间断剪开, 保留视盘, 轻轻剥离眼球壁内侧的视网膜层, 放入清洁的培养皿中, 用蒸馏水反复漂洗 4 次, 加入 37℃ 新鲜配置的反应液(0.2mol/L pH7.2 的 TRIS 顺丁烯二酸缓冲液中含硝酸铅 3mmol/L、氯化镁 6mmol/L、ADP1g/L) 中孵育 15min, 用 100g/L 硫化铵反应 5min, 视网膜铺片, 中性树胶封片。

1.2.4 免疫组织化学检测 按试剂盒说明将石蜡切片二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 30g/L 过氧化氢孵育 10min 以阻断内源性过氧化物酶活性, 0.01mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 值 6.0) 高压抗原修复 3min, 滴加血清封闭液 10min, 滴加 VEGF 一抗工作液(工作浓度为 1:100) 4℃ 过夜, 滴加

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'→3')	目的基因长度(bp)
VEGF	F ATTGAGACCCTGGTGGAC ^[6]	191
	R CCTATGTGCTGGCTTTGG	
内参	F TGACAGGATGCAGAAGGAGA	131
	R GCTGGAAGGTGGACAGTGAG	

表 2 各组鼠 17d 突破内界膜的内皮细胞核的比较

组别	内皮细胞核数 (n=5, $\bar{x} \pm s$, 个)
正常组	1.00±0.81
单纯高氧组	21.29±1.38 ^{b,d}
雌二醇干预组	4.42±1.51 ^b
溶媒干预组	20.57±0.53 ^{b,d}

^bP<0.01 vs 正常组; ^dP<0.01 vs 雌二醇干预组。

生物素标记山羊抗鼠 IgG 二抗室温孵育 30min, 链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合(streptavidin-biotin peroxidase complex, SABC) 37℃ 30min, DAB 显色, 苏木素复染后封片。

应用美国 Image-Pro plus 专业图像分析软件对视网膜细胞中 VEGF 的免疫组织化学反应做定量测定: 每只眼球的随机抽取 5 张切片, 测其累计光密度(IOD) 并取均值。分析过程中所有切片的放大倍数(×400)、光源强度均相同。

1.2.5 RT-PCR 用 3g/L 戊巴比妥钠麻醉后摘除右眼, 去除眼前节, 取出视网膜置于 500μL RNAiso Reagent 液中, 两只视网膜组织为一个标本, 进行总 RNA 抽提, 测定 RNA 浓度和纯度。取 1μL RNA 溶液(约 1g) 按 TaKaRa RNA PCR kit(AMV) ver3.0 试剂盒说明书进行 RT-PCR 反应。退火温度分别为 VEGF 58℃, 取 PCR 反应产物 5μL, 加上样缓冲液 1μL, 混匀, 40g/L 琼脂糖凝胶 90V 电泳 60 min。采用凝胶成像分析系统拍照并测量吸光度值, 每个标本均以与内参照比值作为各目的 mRNA 的相对含量进行分析。引物序列见表 1。

统计学分析: 数据经 SPSS 13.0 软件行统计学处理, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 先行方差齐性检验再行单因素方差分析, 均数之间两两比较用 SNK-q 检验, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜新生血管芽计数 正常组鼠视网膜的内界膜完整, 其下面的细胞排列整齐, 未发现或仅有极少数切片中发现突破视网膜内界膜长入玻璃体腔的血管内皮细胞核(图 1A)。单纯高氧组和溶媒干预组切片中均可见较多突破内界膜的血管内皮细胞核(如图 1B, D 箭头所指), 内界膜下均可见因增殖而排列紊乱的内皮细胞, 部分切面可见管腔形成。经过统计学检测, 雌二醇干预组小鼠的 HE 染色切片上也可见到部分突破视网膜内界膜的内皮细胞核, 但数目较单纯高氧组明显减少(图 1C), 其与另外三组之间的差异有显著统计学意义(表 2)。

2.2 视网膜铺片 视网膜铺片经 ADP 酶染色后, 能够较容易地观察视网膜血管的形态和分布。正常组视网膜分深、浅两层血管网结构清晰可见, 深层血管呈多角形网状形态, 两层血管通过螺旋的交通动脉互相连接(图 2A); 浅

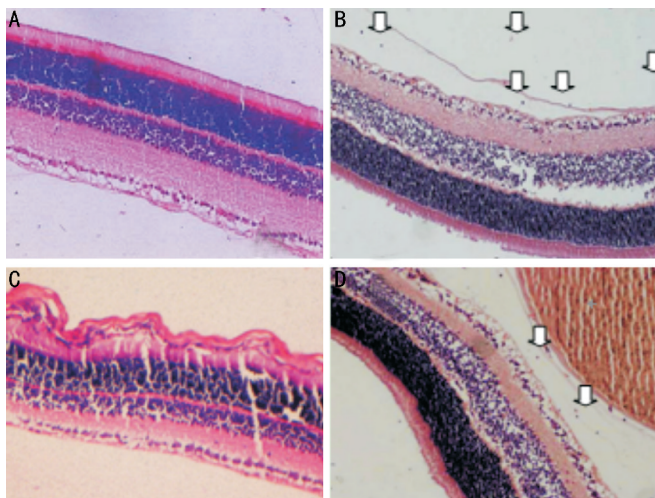


图1 视网膜组织学(HE×200) A:正常组;B:单纯高氧组;C:雌二醇干预组;D:溶媒干预组。

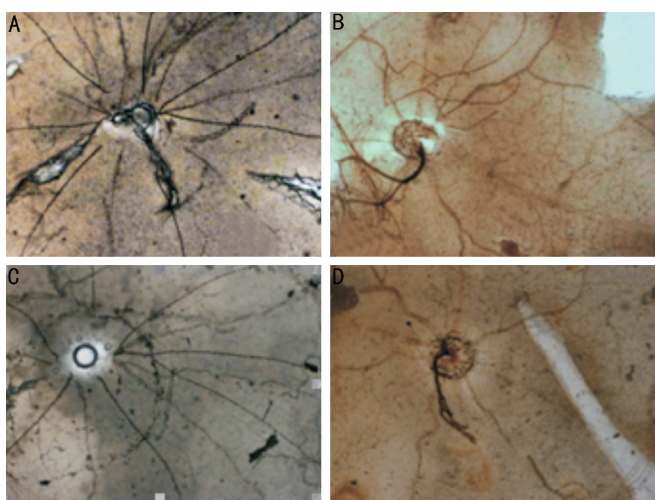


图2 ADP酶消化法观察视网膜血管形态的改变(×40) A:正常组;B:单纯高氧组;C:雌二醇干预组;D:溶媒干预组。

层血管自视盘向四周呈放射状均匀分布,直至视网膜周边部,单纯高氧组在生后17d时自视盘发出的视网膜血管走行迂曲,可以见到大量无灌注区及其周围的新生血管芽,新生血管结构极其紊乱,丧失了正常的两层血管网结构(图2B);雌二醇干预组血管迂曲和不规则扩张明显减轻,大血管向四周放射状均匀分布,小血管轻度阻塞,未见明显新生血管芽(图2C);溶媒干预组可见视盘旁血管主干较细,毛细血管发育不良,较多无灌注区及新生血管芽(图2D)。

2.3 VEGF在视网膜各层表达情况 VEGF免疫组织化学染色显示:VEGF阳性反应表现为细胞胞浆中棕黄色颗粒,阳性部位主要位于视网膜内界膜下的神经节细胞层,内丛状层和内核层的某些细胞,各层结构清晰可辨。四组视网膜切片均可见VEGF的棕黄色阳性颗粒,显示有VEGF的表达,与正常对照组比较(图3A),单纯高氧组和溶媒干预组视网膜VEGF表达明显增强(图3B,D),而雌二醇干预组的VEGF阳性细胞数和强度均比单纯高氧组有所减少(图3C)。正常组VEGF表达与单纯高氧组有统计学差异($P<0.05$),雌二醇干预组与高氧对照组相比较,具有显著统计学差异($P<0.01$),溶媒干预组与单纯高氧组相比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表3。

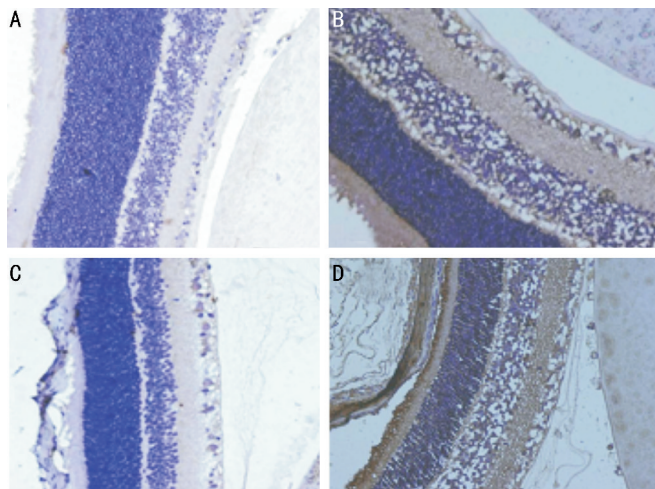


图3 视网膜免疫组化检测结果(×400) A:正常组;B:单纯高氧组;C:雌二醇干预组;D:溶媒干预组。

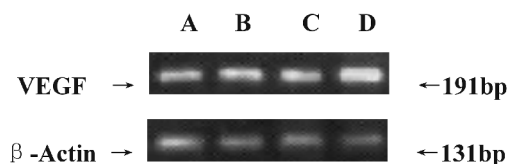


图4 视网膜组织中VEGF-mRNA的表达 A:正常组;B:单纯高氧组;C:雌二醇干预组;D:溶媒干预组。

表3 各组VEGF的表达

组别	Protein	VEGF-mRNA
正常组	3727±2343	0.98±0.02
单纯高氧组	12398±2465 ^{a,b}	1.30±0.15 ^{a,b}
雌二醇干预组	4195±2343	1.03±0.57
溶媒干预组	12466±1331 ^{a,b}	1.22±0.02 ^{a,b}

^a $P<0.05$ vs 正常组; ^b $P<0.01$ vs 雌二醇干预组。

2.4 VEGF-mRNA的表达情况 用琼脂糖凝胶电泳鉴定RT-PCR产物,可见条带清晰,无非特异性扩增条带,产物片段大小符合设计要求(图4),正常组有少量VEGF-mRNA的表达,单纯高氧组表达较之正常组明显增高($P<0.05$),雌二醇干预组VEGF-mRNA的表达较之单纯高氧组下降($P<0.05$),见表3。

3 讨论

1980年以来,随着医疗技术的发展,早产儿的存活率不断提高。由于早产低体质量儿的呼吸系统发育不成熟,生后需要给予一定量的氧气吸入才能提高血氧浓度,减少脑缺氧,然而国内外学者的研究证明持续大流量的吸氧可以引起ROP发病率的升高^[7]。视网膜新生血管形成是ROP的基本病理改变,也是其致盲的主要原因。

雌激素是一类维持机体正常生理状态的重要性激素,它可以通过受体依赖型以及基因和非基因两种途径对抗各种损伤因素,雌二醇受体(estrogen receptor, ER)在眼组织中也有明显分布,尤其是视网膜和葡萄膜^[2]。17 β -雌二醇活性为人体内主要由卵巢成熟分泌的一种活性最强的天然雌激素^[8]。早产儿视网膜血管发育尚不成熟,且其自身雌二醇水平较之正常新生儿低^[2],Darlow等^[9]的研究表明,ROP的严重程度与性别有关,男性婴儿更容易发生严重的视网膜病变,更加说明雌激素与ROP有密切的联系。雌激素的缺乏可通过改变血管紧张素-II活性加速

血管的闭塞,导致脉管机能紊乱^[10]。本实验选择7日龄的SD大鼠为造模动物,大鼠的视网膜血管自出生后开始由视盘处发育,11日龄时视网膜浅层血管发育完全,深层血管于8或9日龄时形成,15日龄时发育完全,因此新生鼠视网膜血管的这种发育特点与早产儿视网膜血管的发育是具有相似性的。在本研究中,单纯高氧组视网膜突破内界膜的内皮细胞核数与正常组相比存在显著差异,前者明显高于后者($P<0.01$),这表明本实验模型诱导成功。根据ROP视网膜新生血管形成的机制:我们在7日龄大鼠吸入高氧的同时使用 17β -雌二醇对其进行干预,结果显示:雌二醇干预组突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数较之单纯高氧组明显减少,而且视网膜血管形态结构清晰,深、浅两层血管网可见,证明了 17β -雌二醇对于高氧诱导的视网膜新生血管具有一定的预防作用。

在 17β -雌二醇预防ROP新生血管生成的机制方面,我们也做了初步的探讨。众所周知,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在视网膜新生血管生成的过程中起中心调控作用,是启动新生血管形成所必需的最重要最有效的物质,是ROP发病机制中的关键因子^[11]。在本研究中,VEGF在单纯高氧组的表达较之正常组明显增高,进一步证实了VEGF在视网膜新生血管的形成中发挥了重要作用。Miyamoto等^[4]的研究显示:低氧条件下雌激素可以降低VEGF的表达,抑制视网膜新生血管过度生成^[12]。Zhi等^[13]用RT-PCR方法测定, E_2 能够降低子宫内胎膜细胞中VEGF mRNA的水平,并且呈剂量依赖性;同时运用免疫组织化学方法也观察到了 E_2 能够抑制了VEGF的表达。周占宇等^[14]报道 E_2 可以抑制缺氧损伤后视网膜色素上皮细胞VEGF的表达,降低其乳酸脱氢酶释放率,该作用可以为其拮抗剂所阻断。国内另有学者的研究证明^[15]:雌激素可以调控缺氧条件下视网膜Müller细胞色素上皮衍生因子(PEDF)和VEGF的表达,对视网膜病理性新生血管的形成具有保护作用。在实验中我们也研究了雌二醇对于视网膜VEGF表达的影响,免疫组化及RT-PCR的结果均显示:雌二醇干预组VEGF的表达较之单纯高氧组及溶酶干预组降低,这说明了雌二醇是可以抑制VEGF的表达的,其减少视网膜新生血管生成的作用与此相关。

综上所述,早产儿本身雌激素水平较正常儿低,而雌激素又可以抑制视网膜新生血管过度生成,因此对于早产儿予以补充适合剂量的雌激素,有望成为预防ROP的一种有效方法。但在本研究中采用皮下给药的方式,不可避免会对全身内分泌水平产生影响,下一步的研究应考虑局部给药的方式减少对全身的影响,另外性别不同的个体自身雌二醇的基础水平可能有差异,在进一步的研究中应结合性别因素给予分组,在本部分的实验中,我们仅补充了雌二醇的单一剂量,无法判断效果与体内浓度的关系,因

此雌二醇的作用是否呈剂量相关性以及其是否具有促进视网膜血管发育成熟的作用也是有待解决的问题。

参考文献

- 1 Dorrell M, Uusitalo - jarvinen H, Aguilar E, et al. Ocular neovascularization; basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv Ophthalmol* 2007;52 (Suppl1):S3-S19
- 2 Trotter A, Maier L, Kohn T, et al. Growth of the uterus and mammary glands and vaginal cytologic features in extremely premature infants with postnatal replacement of estradiol and progesterone. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186(2):184-188
- 3 张红兵,张军军,马麟,等. 雌激素对视网膜新生血管生成作用的研究. *眼科研究* 2006;24(2):165-168
- 4 Miyamoto N, Mandai M, Takagi H, et al. Contrasting effect of estrogen on VEGF induction under different oxygen status and its role in murine ROP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(6):2007-2014
- 5 张社德,张文芳,鲁建华. 雌激素对高氧诱导新生鼠视网膜病变中血管生成和肿瘤坏死因子- α 表达的影响. *兰州大学学报(医学版)* 2009;35(3):15-19
- 6 Tanaka A, Tsuneyama K, Mikami M, et al. Gene expression profiling in whole liver of bile duct ligated rats: VEGF-A expression is up-regulated in hepatocytes adjacent to the portal tracts. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22(11):1993-2000
- 7 Silverman WA. A cautionary tale about supplemental oxygen; the albatross of neonatal medicine. *Pediatrics* 2004;113(2):394-396
- 8 于传鑫,李诵弦. 实用妇科内分泌学. 上海:复旦大学出版社 2011:65-75
- 9 Darlow BA, Hutchinson JL, Henderson-Smart DJ, et al. Prenatal risk factors for severe retinopathy of prematurity among very preterm infants of the Australian and New Zealand Neonatal Network. *Pediatrics* 2005;115(4):990-996
- 10 Arenas IA, Armstrong SJ, Xu Y, et al. Tumor necrosis factor and vascular angiotensin II in estrogen-deficient rats. *Hypertension* 2006;48(3):497-503
- 11 Sonmez K, Drenser KA, Capone A Jr, et al. Vitreous levels of stromal cell-derived factor 1 and vascular endothelial growth factor in patients with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 2008;115(6):1065-1070
- 12 Ma X, Bi H, Qu Y, et al. The contrasting effect of estrogen on mRNA expression of VEGF in bovine retinal vascular endothelial cells under different oxygen conditions. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249(6):871-877
- 13 Zhi X, Honda K, Sumi T, et al. Estradiol-17beta regulates vascular endothelial growth factor and Bcl-2 expression in HHUA cells. *Int J Oncol* 2007;31(6):1333-1338
- 14 周占宇,王荣荣,王崇辉,等. 雌激素对缺氧损伤的人视网膜色素上皮细胞表达血管内皮细胞生长因子的影响. *中华眼底病杂志* 2007;23(5):317-320
- 15 穆华,张晓梅,冯卓蕾,等. 雌激素对缺氧视网膜 Müller 细胞 PEDF 和 VEGF 表达的影响. *国际眼科杂志* 2012;12(11):2066-2068