

Slit3/Robo4 在大鼠角膜新生血管中的表达

肖诗艺, 王莉, 陈仁典, 吴进, 张越骊, 何莉

基金项目: 深圳市科技计划项目 (No. 201203073)

作者单位: (518026) 中国广东省深圳市儿童医院眼科

作者简介: 肖诗艺, 毕业于华中科技大学同济医学院, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 角膜病、眼外伤。

通讯作者: 王莉, 毕业于华中科技大学同济医学院, 硕士, 主治医师, 研究方向: 角膜病、眼外伤。catlydzf@21cn.com

收稿日期: 2014-03-28 修回日期: 2014-05-27

Research expression of Slit3 and Robo4 in corneal neovascularization of rats

Shi-Yi Xiao, Li Wang, Ren-Dian Chen, Jin Wu, Yue-Li Zhang, Li He

Foundation item: Science and Technology Planning Project of Shenzhen (No. 201203073)

Department of Ophthalmology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518026, Guangdong Province, China

Correspondence to: Li Wang. Department of Ophthalmology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518026, Guangdong Province, China. catlydzf@21cn.com

Received: 2014-03-28 Accepted: 2014-05-27

Abstract

• **AIM:** To explore the roles of neuronal axon-guidance molecules Slit3 and Robo4 receptor in corneal neovascularization (CNV) by study their expression in neovascularized cornea of rats.

• **METHODS:** CNV models were established by implantation pellets containing basic fibroblast growth factor (bFGF) into corneal stroma. CNV models were measured by biomicroscopy photography. Immunohistochemical staining and imaging analysis system were used to detect the expression of Slit3 and Robo4 in the models after 1, 4, 7, 10 and 14d.

• **RESULTS:** The area of CNV and the expression of Slit3, Robo4 were increased in CNV models compared to that in normal cornea and reached highest level on 7d. And the expression level of Slit3 and Robo4 were significantly correlated with the size of CNV on every time point except 1d ($r=0.84-0.91$, all $P<0.05$).

• **CONCLUSION:** The expression of Slit3 and Robo4 may be related to the CNV development. They are potential therapeutic target for CNV.

• **KEYWORDS:** neuronal axon-guidance molecule; Slit3; Robo4; corneal neovascularization; micropocket assay

Citation: Xiao SY, Wang L, Chen RD, et al. Research expression of Slit3 and Robo4 in corneal neovascularization of rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(7):1190-1192

摘要

目的: 通过研究神经轴突导向因子 Slit3 及 Robo4 受体在大鼠正常角膜与新生血管化角膜中的差异性表达, 探讨其在角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 形成中的作用。

方法: 采用角膜微囊袋法建立以碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 诱导的大鼠 CNV 模型, 采用眼前段照相, 免疫组化染色、彩色图像分析系统分别计算 1, 4, 7, 10, 14d 共 5 个时间点的 CNV 面积和 Slit3, Robo4 的平均光密度值。

结果: Slit3 及 Robo4 在新生血管化角膜中表达增加, 在第 7d 达到最高, 且二者的表达水平与 CNV 的面积除第 1d 外, 在其他各时间点均呈正相关 ($r=0.84 \sim 0.91$, $P<0.05$)。

结论: Slit3/Robo4 与 CNV 形成明显相关, 其可能成为抑制 CNV 的重要靶点。

关键词: 神经轴突导向因子; Slit3; Robo4; 角膜新生血管; 微囊袋法

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.07.03

引用: 肖诗艺, 王莉, 陈仁典, 等. Slit3/Robo4 在大鼠角膜新生血管中的表达. *国际眼科杂志* 2014;14(7):1190-1192

0 引言

正常角膜透明无血管, 周围血管止于角膜缘, 当毛细血管进入角膜周边 1.5mm 以上即可称为角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV)。CNV 是大多数角膜疾病过程中的重要病理改变, 可破坏角膜免疫赦免, 继发角膜水肿、混浊进而影响视力甚至致盲^[1]。

神经轴突导向因子 Slit 最初是在果蝇体内发现的细胞外信号分子^[2], 是一种在进化上高度保守的分泌型细胞外基质糖蛋白。在哺乳动物, Slit 蛋白有 3 种, 即 Slit1, Slit2, Slit3^[3]。已有研究表明, Slit3 可在血管中表达, 调控血管生长, 促进血管形成^[4]。Robo 是 Slit 相应的受体, 哺乳动物中 Robo 家族有 4 个成员: Robo1 ~ Robo4, 其中 Robo4 主要表达于血管内皮细胞, 是内皮细胞特异型基因^[5]。目前 CNV 的发病机制尚未明确, 那么作为可调控血管生长的 Slit3/Robo4 在 CNV 中是否表达, 与 CNV 的形成和发展是否有关联, 是否对其形成起重要作用, 尚不得而知。为此, 我们通过分析动物模型中 CNV 形成与 Slit3/Robo4 蛋白的表达间的关联, 来探索 CNV 形成和发展的机制, 为 CNV 的治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 由深圳市疾病预防控制中心提供的标准化清洁级健康成年 SD 大鼠 40 只, 雌雄各半, 体质量 190 ~ 220g。所有大鼠均经裂隙灯显微镜检查无眼疾, 实验于适应性饲养 1wk 后开始, 符合 ARVO (the association for research in vision and ophthalmology) 有关用于研究目的动物的相关规定。

表1 正常角膜和新生血管角膜不同时间点上 Slit3 及 Robo4 光密度值以及与 CNV 面积的相关性

 $\bar{x} \pm s$

| 时间点 | 正常角膜 | | | 模型角膜 | | 相关系数 1 | 相关系数 2 |
|-----|------------|------------|--------------------------|------------|------------|--------|--------|
| | Slit3 光密度值 | Robo4 光密度值 | CNV 面积(mm ²) | Slit3 光密度值 | Robo4 光密度值 | | |
| 1d | 0.03±0.01 | 0.02±0.01 | 0.06±0.01 | 0.03±0.00 | 0.02±0.00 | 0.80 | 0.79 |
| 4d | 0.04±0.02 | 0.02±0.01 | 2.32±0.40 | 0.11±0.02 | 0.07±0.02 | 0.86* | 0.85* |
| 7d | 0.02±0.01 | 0.03±0.01 | 9.60±0.63 | 0.34±0.12 | 0.29±0.10 | 0.90* | 0.84* |
| 10d | 0.03±0.02 | 0.03±0.02 | 4.85±0.67 | 0.24±0.04 | 0.14±0.04 | 0.91* | 0.87* |
| 14d | 0.05±0.01 | 0.02±0.02 | 2.07±0.22 | 0.10±0.02 | 0.06±0.01 | 0.89* | 0.91* |

注:相关系数 1:CNV 面积与 Slit3 光密度值的相关系数;相关系数 2:CNV 面积与 Robo4 光密度值的相关系数;*: $P<0.05$ 。

1.1.2 主要试剂 bFGF (400-29 PeproTech), 羊抗 Slit3 多克隆抗体 (sc-31597 Santa Cruz), 鼠抗 Robo4 单克隆抗体 (sc-166872 Santa Cruz), DAB 显色剂 (武汉博士德生物技术公司), SABC 试剂盒 (武汉博士德生物技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 bFGF 缓释药丸的制备 参考 Kenyon 等^[6]的方法, 制作 bFGF 琼脂糖缓释胶丸: 在手术显微镜下将无菌医用明胶海绵剪成约 0.5mm×0.5mm×0.1mm 大小, 将其浸入 4℃ PBS 缓冲液, 过夜后, 无菌滤纸吸干水分, 滴加 1μL (100ng/μL) bFGF 溶液, 室温下放入超净工作台内干燥 48h 后, 将其浸入 2% 琼脂糖溶液包裹, 再置于超净台内干燥 48h 备用。

1.2.2 角膜微囊袋法诱导大鼠角膜新生血管模型 参考 Marya 等的方法^[7], 将全部大鼠的右眼作为缓释药丸植入眼, 左眼作为非手术对照眼, 全部手术均在无菌条件下由同一术者操作。100g/L 水合氯醛腹腔内注射 (3mL/kg), 4g/L 盐酸奥布卡因滴眼液表面麻醉后, 用 3.0mm 角膜穿刺刀自角膜旁中央区向角膜缘作 2mm×2mm 潜行隧道, 隧道顶端距角膜缘 0.5mm, 以显微镊将制备的 bFGF 缓释药丸植入隧道内顶端, 术毕 3g/L 氧氟沙星眼膏点眼。

1.2.3 角膜新生血管的观察、测定 大鼠造模术后 1, 4, 7, 10, 14d, 用裂隙灯显微镜观察大鼠缓释药丸植入眼角膜缘长出的 CNV 长度和钟点数, 根据公式计算 CNV 面积: $S = C/12 \times 3.1416 \times [r^2 - (r-l)^2]$, S 为 CNV 生长面积, C 为血管网的跨圆周钟点数, r 为角膜半径, l 为 CNV 长度。并行眼前段照相。

1.2.4 免疫组化 SABC 法定位检测 Slit3 及 Robo4 的表达 分别于造模术后 1, 4, 7, 10, 14d, 过量麻醉并颈椎脱臼处死大鼠 (每次随机选取 8 例), 迅速取出角膜 (剪下药丸植入眼中新生血管区域的角膜, 作为“新生血管角膜”; 剪下非手术对照眼同一部位同等大小角膜, 作为“正常对照角膜”)。40g/L 多聚甲醛溶液固定 24h, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋 4μm 连续切片, 石蜡切片常规脱蜡水化。依次以 30g/L 过氧化氢孵育, 滴加稀释的一抗 (1:100) 4℃ 过夜, 滴加生物素标记二抗及 SABC 孵育, DAB 显色, 苏木素复染, 脱水、透明和封片。光镜下观察, 以细胞质膜出现棕黄色颗粒为染色阳性的判断标准, 反之为阴性。

1.2.5 图像分析系统测量 将 Slit3 及 Robo4 的染色结果分别输入计算机通过多媒体医用彩色病理图像分析系统 (HPIAS2000 型), 每张切片随机选取 5 个高倍视野 (×400) 分别测量 Slit3 及 Robo4 免疫组化的平均光密度值 (average optic density, AOD), 得出 Slit3 及 Robo4 的蛋白相对含量。

统计学分析: CNV 长度、面积和 Slit3、Robo4 免疫组织化学染色平均光密度均用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述。采用 SPSS 12.0 进行方差分析, t 检验和相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠角膜新生血管的生长情况 对照组可见角膜透明, 角膜缘血管网呈环状围绕角膜一周, 未伸入透明角膜。缓释药丸植入术后 1d 可见大鼠角膜缘血管环充血扩张, 未见明显新生血管生长; 术后 4d, 角膜缘长出新生血管, 数量稀少, 向植入物方向延伸, 且血管定向成束生长, CNV 面积为 (2.32±0.40) mm²; 术后 7d, CNV 生长达到高峰 (图 1), 血管生长最为密集, 管腔粗大, 充血明显, CNV 面积为 (9.60±0.63) mm²; 术后 10d, CNV 呈自行消退的趋势, 部分新生血管表现为管腔萎缩, CNV 面积为 (4.85±0.67) mm²; 术后 14d, CNV 呈明显消退改变, 仅有少许新生血管残留, 大部分表现为管腔萎缩呈银丝样改变, CNV 面积为 (2.07±0.22) mm²。

2.2 Slit3 及 Robo4 在角膜组织的表达定位 采用免疫组化 SABC 法定位 Slit3 和 Robo4 在正常角膜和新生血管角膜的表达。结果显示在正常角膜中, Slit3 几乎无或微弱表达, Robo4 主要表达于角膜上皮层; 在新生血管角膜, Slit3 主要表达于角膜基质的新生血管内皮细胞, 其表达随着血管内皮细胞侵入角膜基质层的增多而增强 (图 2)。Robo4 表达于角膜基质的新生血管内皮细胞和部分角膜上皮细胞, 且角膜上皮层的 Robo4 染色较正常角膜浅; 与 Slit3 一致, 随着血管内皮细胞侵入角膜基质层的增多, 其在血管内皮细胞的表达逐渐增强 (图 3)。分析以上表达定位结果: 相较于正常角膜, 新生血管角膜中 Slit3 和 Robo4 的蛋白表达水平明显增加。

2.3 图像分析结果 计算机图像分析系统检测正常角膜和新生血管角膜各时间点上 Slit3 和 Robo4 免疫组化染色结果的光密度值 (AOD), 结果见表 1。除第 1d 外, 各时间点上在新生血管角膜及正常角膜中两种蛋白表达相对应的光密度值差异有统计学意义 ($P<0.05$)。新生血管角膜中 Slit3 和 Robo4 的光密度值与 CNV 的面积变化相似, 两种蛋白对应的光密度值均随着时间增加, 在第 7d 达到最大值, 然后缓慢下降。与 CNV 的面积进行相关分析表明, 除第 1d 外, 在其他各时间点上, Slit3 和 Robo4 的光密度值与 CNV 的面积呈正相关, 相关系数介于 0.84~0.91 之间, 所有的 $P<0.05$ (表 1)。

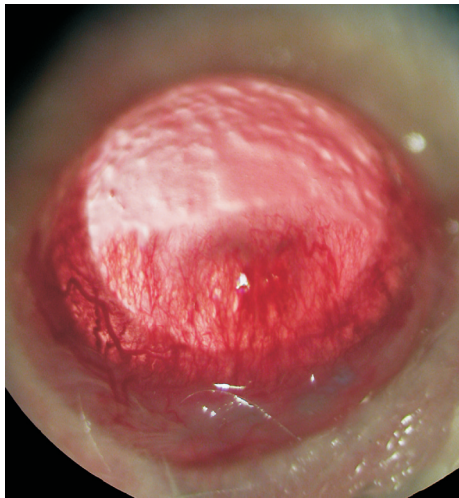


图1 大鼠角膜微囊袋诱导的大鼠角膜新生血管模型(药丸植入后第7d)。

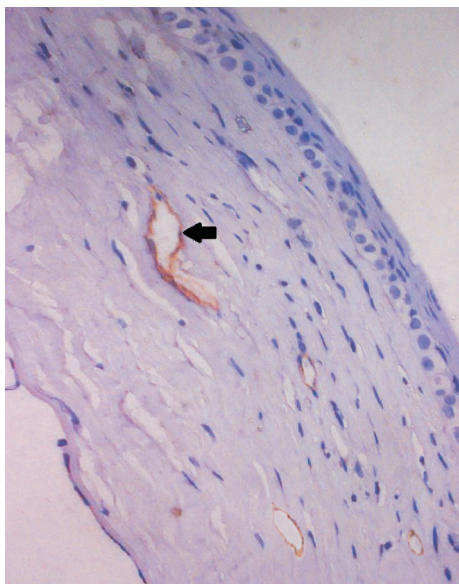


图2 药丸植入后第7d免疫组化SABC法定位大鼠新生血管化角膜中Slit3的表达,箭头所指示部分细胞质膜出现棕黄色颗粒为染色阳性结果(免疫组化SABC法×400)。

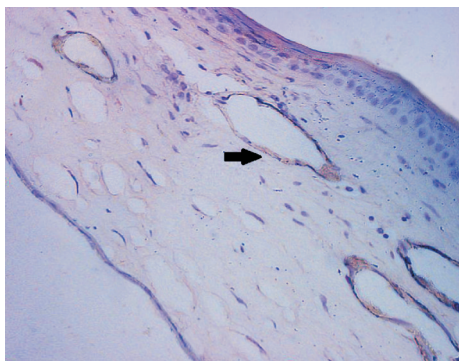


图3 药丸植入后第7d免疫组化SABC法定位大鼠新生血管化角膜中Robo4的表达,箭头所指示部分细胞质膜出现棕黄色颗粒为染色阳性结果(免疫组化SABC法×400)。

3 讨论

角膜是重要的屈光介质,正常情况下无血管生长,使其透明性得以保持。在感染、外伤或免疫反应等病理状态下,CNV形成破坏角膜正常微环境,降低角膜透明性,严重影响视力,是临床上最常见,治疗难度较大的致盲性眼

病之一^[8]。CNV发病机制至今尚未明确,目前亦无理想治疗方法,因此探索CNV形成机制及其防治措施具有重要的理论价值和实际意义。

已有研究表明,Slit3是一种促血管生成因子,通过激活Robo4受体促进血管生成;在正常小鼠的肺、脑、肾脏的血管内皮细胞检测到Slit3的表达,而基因敲除Slit3的小鼠则表现出胚胎血管生成缺陷^[4]。Huminiacki等^[9]发现Robo4作为Slit新发现的受体具有血管表达特异性,在血管新生活跃区域附近的血管内皮细胞上高表达。Bedell等^[10]发现基因敲除Robo4的斑马鱼会表现出肌节间血管发育缺陷。综上所述,Slit/Robo信号在血管新生中具有重要作用。因此,我们将目标定位于Slit3/Robo4,探讨其在CNV中是否同样表达,并了解其与CNV相关性如何。

本文选择角膜微囊袋法制作新生血管模型,以bFGF诱导新生血管形成,可排除炎症等间接刺激因素,相较于以往的缝线法、碱烧伤等角膜新生血管模型,具有稳定性及重复性好,便于定量分析的优点^[6,7]。

本研究发现,造模术后第7d,CNV生长到达顶峰,术后10d CNV渐行消退,术后14d仅少许CNV残留。在正常角膜中,Slit3几乎无或微弱表达,Robo4主要表达于角膜上皮层;在新生血管角膜,Slit3主要表达于角膜基质的新生血管内皮细胞,Robo4主要表达于角膜基质的新生血管内皮细胞和部分角膜上皮细胞,随着血管内皮细胞侵入角膜基质层的增多,两者在血管内皮细胞的表达均逐渐增强。两者均于第7d达高峰,10d后表达开始减弱,与组织学CNV的形成过程一致。

综上所述,大鼠角膜Slit3/Robo4的表达水平与新生血管的形成有明显的相关性,故我们认为Slit3/Robo4可能作为调控因子共同参与了CNV的形成过程,靶向Slit3/Robo4的干预治疗有望成为角膜新生血管性疾病治疗的一个新途径。而Slit3具体是通过何种途径和机制来与Robo4受体作用参与角膜新生血管的形成过程呢,尚需我们进一步的研究探索。

参考文献

- 1 Chang JH, Gabison EE, Kato T, et al. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12(4):242-249
- 2 Nusslein-Volhard C, Wieschaus E, Kluding H. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Bou's Arch Dev Biol* 1984;193(9):267-282
- 3 Hohenester E, Hussain S, Howitt JA. Interaction of the guidance molecule Slit with cellular receptors. *Biochem Soc Trans* 2006;34(Pt 3):418-421
- 4 Zhang B, Dietrich UM, Geng JG, et al. Repulsive axon guidance molecule Slit3 is a novel angiogenic factor. *Blood* 2009;114(19):4300-4309
- 5 Park KW, Morrison CM, Sorensen LK, et al. Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial migration. *Dev Biol* 2003;261(1):251-267
- 6 Kenyon BM, Voest EE, Chen CC, et al. A model of angiogenesis in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(8):1625-1632
- 7 McCarty MF, Baker CH, Bucana CD, et al. Quantitative and qualitative *in vivo* angiogenesis assay. *Int J Oncol* 2002;21(1):5-10
- 8 刘祖国, 张惠. 重视我国角膜病的基础研究. *中华眼科杂志* 2006;42(8):673-675
- 9 Huminiacki L, Gorn M, Suchting S, et al. Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics* 2002;79(4):547-552
- 10 Bedell VM, Yeo SY, Park KW, et al. Roundabout4 is essential for angiogenesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(18):6373-6378