

早产儿视网膜病变大鼠模型中 bFGF 的表达

陈绪涛,周占宇

作者单位:(266003) 中国山东省青岛市,青岛大学医学院附属医院

作者简介:陈绪涛,毕业于华中科技大学同济医学院,在读硕士研究生,主治医师,研究方向:玻璃体视网膜病。

通讯作者:周占宇,医学博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:玻璃体视网膜病. zhouzhanyu1125@163.com

收稿日期:2012-01-17 修回日期:2012-02-07

Expression of bFGF in rat models of retinopathy of prematurity

Xu-Tao Chen, Zhan-Yu Zhou

Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Zhan-Yu Zhou. Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China. zhouzhanyu1125@163.com

Received: 2012-01-17 Accepted: 2012-02-07

Abstract

• AIM: Formation of RNV is the most important pathological change in retinopathy of prematurity (ROP), but its exact procession and mechanism is not discovered. This research was carried to detect the expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in rat models of ROP, in order to discuss the mechanism of ROP.

• METHODS: Forty new-born SD rats were classified into two groups: one was normal group and the other was hyperoxia group. The rats of hyperoxia group were bred in hyperoxia environment for 5 days from the seventh day to establishing the model. Strept avidin-biotin complex (SABC) was used to detect the level of bFGF protein, RT-PCR to detect bFGFmRNA.

• RESULTS: The level of bFGF protein and bFGFmRNA in the hyperoxia group were both obviously higher than the normal group, and there was statistical significance.

• CONCLUSION: Formation of RNV is relative to bFGF, bFGF plays a role in ROP.

• KEYWORDS: retinopathy of prematurity; experimental; basic fibroblast growth factor; rat

Chen XT, Zhou ZY. Expression of bFGF in rat models of retinopathy of prematurity. *Gujing Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012; 12(3): 404-406

摘要

目的:研究 bFGF 在早产儿视网膜病变 (ROP) 大鼠模型中的表达水平,以探讨 ROP 可能的发病机制。

方法:以 SD 大鼠为模型动物,用高氧诱导建立模型,采用

免疫组织化学 SABC 法检测 bFGF 蛋白水平,逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法检测 bFGFmRNA 水平。

结果:SABC 法显示正常组中 bFGF 蛋白微弱阳性染色,而高氧组阳性染色明显增强,前者灰度平均值明显高于后者,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); RT-PCR 法显示高氧组 bFGFmRNA 与 GAPDHmRNA 的比值显著高于正常组,其差别亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论:bFGF 参与了视网膜新生血管 (RNV) 的形成,与 ROP 的发病机制有关。

关键词:早产儿视网膜病变;实验性;碱性成纤维细胞生长因子;大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.03.08

陈绪涛,周占宇. 早产儿视网膜病变大鼠模型中 bFGF 的表达. 国际眼科杂志 2012; 12(3): 404-406

0 引言

早产儿视网膜病变 (ROP) 是早产儿和低体重儿发生的一种视网膜血管增生性疾病^[1],轻者可出现斜视、弱视,重者可形成视网膜脱离,最终致盲。自从 1942 年 Terry 首先报道以来,已成为很多国家婴幼儿失明的首要原因。ROP 最重要的病理环节是视网膜新生血管 (RNV) 的形成,其形成的确切机制尚未研究清楚。研究表明,有多种细胞因子可能与 RNV 的形成有关,如血管内皮生长因子 (VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、色素上皮衍生因子 (PEDF) 等,其中 VEGF 在其中所起的中心作用已被多数研究证实。但关于 bFGF 的作用尚存在争议,关于此方面研究的报道亦较少见。本研究采用 SD 大鼠建立模型,分别用免疫组织化学 SABC 法和逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法检测 bFGF 蛋白和 bFGFmRNA 的水平,以探讨 ROP 可能的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料 选择清洁级健康 SD 新生大鼠 40 只,性别不限,未断乳,与母鼠共同饲养,购于山东中医药大学动物实验中心。兔抗鼠 bFGF 多克隆抗体、SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒均购于武汉博士德;RNA 提取试剂盒 (RNAiso reagent)、RT-PCR 试剂盒 (PrimeScrip™ RT-PCR kit)、DL2000 DNA Marker 均购自大连宝生物 (Takara);引物由上海生工生物技术有限公司合成;病理切片机;低温高速离心机 (Sigma);Eppendorf 梯度 PCR 仪;Beckman 紫外分光光度计。

1.2 方法 将 40 只大鼠随机分为两组:正常组与高氧组,每组 20 只,正常组大鼠与母鼠一直在正常空气环境中共同饲养。将高氧组大鼠于生后第 7d 与一只同笼的母鼠一起置入玻璃密闭氧箱中,另一只同笼母鼠生活在正常氧环境中作为替换母鼠。氧箱的一端为进气孔,与氧体积分数为 850mL/L 的湿润氧氮混合气体连接,控制流量,并每日检测氧浓度 3~4 次,使氧箱内氧体积分数维持在 750 ±

20mL/L,另一端为出气孔,连接水封瓶。每日打开氧箱一次,加食、换水、换垫、替换母鼠,日光照明,温度维持在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 。高氧组在氧箱内饲养5d后再置入正常空气环境中继续饲养。于大鼠生后第17d摘取每鼠双侧眼球,左眼用于免疫组织化学SABC法检测,右眼用于RT-PCR检测。

1.2.1 SABC法检测大鼠bFGF蛋白的表达 将每鼠左眼行常规固定、冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋和石蜡切片,切片前载玻片均用多聚赖氨酸行粘片处理。检测时切片常规脱蜡至水,30mL/L过氧化氢室温处理10min以灭活内源性过氧化物酶,微波炉热修复抗原,滴加50mL/L BSA封闭液室温20min后甩去封闭液;滴加1:50兔抗鼠bFGF多克隆抗体,湿盒 4°C 过夜,滴加二抗(生物素化山羊抗兔IgG)37 $^\circ\text{C}$ 孵育20min,滴加过氧化物酶工作液(SABC)37 $^\circ\text{C}$ 孵育20min,以上各步间均用PBS洗涤3次。滴加DAB显色剂室温显色,充分冲洗,苏木素轻度复染,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。以PBS代替一抗作为阴性对照。显微镜下观察照相,每张切片随机选取6个视野,测定其灰度值并取平均值作为统计指标。

1.2.2 RT-PCR检测大鼠bFGFmRNA的水平 将剥离的右眼视网膜组织投入1mL裂解液中,充分研磨匀浆,直至组织完全融化裂解液呈透明状,室温静置5min后,12000r/min 4°C 离心5min。上清液移入1.5mL EP管中,加入0.2mL氯仿,震荡使充分乳化并室温静置5min后,12000r/min 4°C 离心5min。离心后分为3层,吸取无色上清液移入新EP管中并加入等体积异丙醇,混匀并静置10min后12000r/min 4°C 离心10min, RNA沉淀于管底。弃去上清,缓慢加入750mL/L乙醇1mL洗涤,12000r/min 4°C 离心5min后弃去乙醇。室温干燥沉淀数分钟,加入约30 μL RNase-free水溶解沉淀;用紫外分光光度计测定吸光度值(A_{260} 和 A_{260}/A_{280})。以提取的RNA为模板,按照试剂盒操作说明进行逆转录反应生成cDNA。以生成的cDNA为模板,按照试剂盒操作说明进行PCR,反应采用20 μL 体系,cDNA模板用量为2 μL 。bFGF上游引物序列为5'-TACCTGGCTATGAAGGAAGATGGA-3',下游引物序列为5'-TCGTTTCAGTGCCACATACCAA-3',扩增片段长度为144bp;GAPDH上游引物序列为5'-TTCTAGAGACAGCCGCATCT-3',下游引物序列为5'-TGGTAACCAGGTGTCCGATA-3',扩增片段长度为106bp。反应条件:94 $^\circ\text{C}$ 预变性3min;94 $^\circ\text{C}$ 变性30s,62 $^\circ\text{C}$ 退火30s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸45s,共35个循环;72 $^\circ\text{C}$ 终末延伸8min。取4 μL PCR产物,在含溴乙锭(EB)的20g/L琼脂糖凝胶中电泳。用BioCaptMW紫外凝胶成像系统成像,图像分析软件定量分析。最终结果用bFGFmRNA和同一样品中GAPDHmRNA的产物电泳条带光密度之比值来表示。

统计学分析:数据以均数 \pm 标准差表示,采用SPSS 11.5统计软件包进行分析,两组间样本均数的比较应用独立样本校正t检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 ROP模型大鼠bFGF蛋白的表达 正常组仅见微弱阳性着色或无着色;高氧组阳性染色明显增强,表现为胞内从黄色到棕黄色着色颗粒,主要表达于神经节细胞层和内核层(图1),灰度值低于正常组。正常组和高氧组的平均灰度值分别为 121.25 ± 7.12 和 85.32 ± 3.03 ,将两组均值进行比较,其差别有统计学意义($P < 0.05$)。

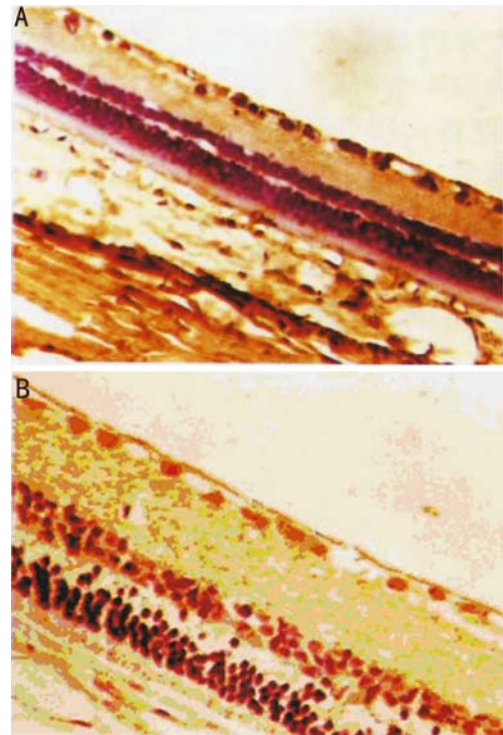


图1 ROP模型大鼠bFGF蛋白的表达(SABC, $\times 400$) A:正常组;B:高氧组。

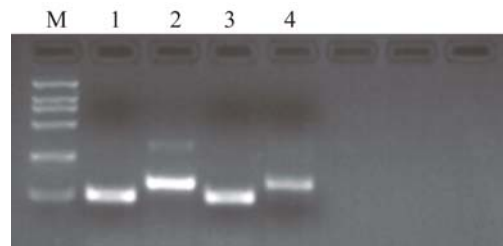


图2 RT-PCR产物凝胶电泳图 M:Marker;1,3:GAPDH;2:高氧组;4:正常组。

2.2 ROP模型大鼠bFGFmRNA的水平

2.2.1 RNA的鉴定 琼脂糖凝胶电泳的条带清晰可见,且紫外分光光度计测定各样本提取RNA的 A_{260}/A_{280} 在1.8~2.1之间,表明提取的RNA纯度良好。

2.2.2 RT-PCR产物凝胶电泳 bFGFmRNA和内参照GAPDHmRNA的RT-PCR产物片段大小分别为144bp和106bp,均与预期大小相符。两组GAPDH的条带均明显可见;正常组bFGF的条带暗,表达量低;高氧组bFGF条带明亮,表达明显高于正常组(图2)。正常组和高氧组bFGF与同一样品中GAPDH产物电泳的光密度比值分别为 0.15 ± 0.01 和 0.65 ± 0.02 ,两组均值比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

ROP的主要特征是RNV形成,而视网膜组织缺氧是其发病的关键因素。早产儿的视网膜血管未发育成熟,当处于高氧中时血管发育停止,不成熟的血管由于缺乏周细胞和基质的支持而发生收缩甚至闭塞,闭塞的血管不会重新开放,故在视网膜周边部存在无血管区和相对缺氧区。当离开高氧环境后,缺氧进一步加重,导致血管因子释放,促进新生血管形成。RNV形成可能是众多的促血管生成因子和抑制血管生成因子相互作用、相互调节的结果。当两类血管因子达到平衡时,血管生成的“开关”关闭;当这

一平衡被打破时,促血管生成因子占优势,此“开关”打开,新生血管形成。

本实验采用SD大鼠作为模型动物,是因为其产后3wk的视网膜发育与人孕36wk相似,而且生长快、繁育性能好、存活率高^[2]。本研究建立的模型产生的基础是视网膜组织缺氧,与ROP中RNV的形成相似,并且具有制作方法简单、易重复、周期短和价廉等优势。因此该大鼠模型是较好的研究RNV形成机制的模型。bFGF是FGF家族成员之一,是一种强有力的有丝分裂原,它具有促分化、促增生、营养神经和抑制凋亡等生理功能。bFGF在体内分布广泛,正常生理状态下在垂体、神经组织、视网膜、心、肝、肾上腺、胎盘等处均有存在,而以垂体含量最高,其他组织含量甚微。国外已有多项实验研究了bFGF与几种RNV形成有关细胞系的作用关系:bFGF对视网膜血管内皮细胞(REC)和视网膜色素上皮细胞(RPE)有促增生和促移行的作用,可提高REC的增生率和存活率^[3-5];周细胞(PC)在特定情况下可通过释放bFGF一类的因子调控RNV的形成^[6];视网膜神经胶质细胞(RGC)通过分泌bFGF和PDGF-B等因子发挥对PC的保护作用,阻止PC的丢失^[7]。亦有研究表明bFGF具有诱导产生RNV的能力:Perry等^[8]研究发现,大鼠玻璃体腔大剂量注入bFGF后1~3mo,可观察到RNV产生并呈进行性生长;猴眼玻璃体内植入含有bFGF的聚合物载体后,可刺激RNV及虹膜新生血管形成^[9]。而Nyberg等^[10]研究纯氧环境下生长的新生小鼠,视网膜中检测出了与bFGF有很大相似性的多肽,可与bFGF抗体反应并具有刺激血管生长的活性。

我们实验的结果显示,高氧组大鼠视网膜中bFGF蛋白的表达明显强于对照组,而bFGFmRNA水平亦显著高于后者。这说明RNV形成过程中bFGF的表达水平明显增加,bFGF与ROP的发病机制应该有一定的关系。总而言之,我们的研究表明,bFGF参与了RNV的形成,这为进

一步研究ROP的发病机制提供了理论依据,但关于bFGF在其中所处的地位及与其他因子如VEGF的关系如何尚有待深入研究。

参考文献

- 1 黎晓新.我国早产儿视网膜病变特点和筛查指南.中华眼底病杂志 2004;20(6):384-386
- 2 Dennis M, Samuel S, El-Shabrawey M, et al. Effects of sustained hyperoxia on revascularization in experimental retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(2):496-502
- 3 Castellon R, Hamdi HK, Sacerio I, et al. EffectS of angiogenic growth factor combinations on retinal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2002;74(2):523-535
- 4 Yan Q, Li Y, Hendrickson A, et al. Regulation of retinal capillary cells by basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, and hypoxia *in vitro*. *Cell Mol Biol* 2001;37(1):45-49
- 5 Spraul CW, Kaven C, Lang GK, et al. Effect of growth factors on bovine retinal pigment epithelial cell migration and proliferation. *Ophthalmic Res* 2004;36(3):166-171
- 6 Watanabe S, Morisaki N, Tezuka M, et al. Cultured retinal pericytes stimulate *in vitro* angiogenesis endothelial cells through secretion of a fibroblast growth factor-like molecule. *Atherosclerosis* 1997;130(5):101-107
- 7 Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T. Induction of IL-8, MCP-1, and bFGF by TNF-alpha in retinal glial cells implications for retinal neovascularization during post-ischemic inflammation. *Graefes Arch Clin Eye Ophthalmol* 2004;242(6):409-413
- 8 Perry J, Du J, Kjeklbye H, et al. The effects of bFGF on RCS rat eyes. *Curr Eye Res* 1995;14(8):585-592
- 9 Hori S. Pathophysiology of intraocular neovascularization. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1990;94(12):1103-1121
- 10 Nyberg F, Habnenberger R, Ake M, et al. Enhancement of FGF-like polypeptides in the retinae of newborn mice exposed to hyperoxia. *FEBS Lett* 1990;267(4):75-77