

大鼠视网膜缺血再灌注后 IGF-1 及 IGFBP-3 的表达和意义

张冬梅, 张文芳, 鲁建华, 杜 宁

作者单位: (730030) 中国甘肃省兰州市, 兰州大学第二医院眼科
作者简介: 张冬梅, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。
通讯作者: 张文芳, 女, 博士, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师,
甘肃省医学会眼科专业委员会主任委员, 研究方向: 眼底病。
zhangwf888@163.com
收稿日期: 2011-12-31 修回日期: 2012-02-10

Expression and significance of IGF-1 and IGFBP-3 in retinal ischemia-reperfusion in rats

Dong-Mei Zhang, Wen-Fang Zhang, Jian-Hua Lu, Ning Du

Department of Ophthalmology, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Correspondence to: Wen-Fang Zhang, Department of Ophthalmology, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. zhangwf888@163.com

Received: 2011-12-31 Accepted: 2012-02-10

Abstract

• AIM: To investigate the expression pattern and correlation of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and its binding protein-3 (IGFBP-3) in the ischemia-reperfusion in rats.

• METHODS: The models of retinal ischemia-reperfusion in rats were made. In order to analyze the correlation and expression between IGF-1 and IGFBP-3 in retinal ischemia-reperfusion model, immunohistochemical method was used.

• RESULTS: In the normal retina, IGF-1 and IGFBP-3 were slightly expressed, while in retinal ischemia-reperfusion group, the expression of IGF-1 ascended obviously at 6 hours, reached peak at 72 hours; the expression of IGFBP-3 ascended obviously at 12 hours, reached peak at 72 hours, and the two had a collaborative relationship.

• CONCLUSION: IGF-1 and IGFBP-3 expression are closely related to retinal ischemia-reperfusion injury, and have a positive correlation.

• KEYWORDS: retina; ischemia-reperfusion; IGF-1; IGFBP-3

Zhang DM, Zhang WF, Lu JH, et al. Expression and significance of IGF-1 and IGFBP-3 in retinal ischemia-reperfusion in rats. *Guji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(3):413-415

摘要

目的: 探讨胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 及胰岛素样生长因子结合蛋白-3 (IGFBP-3) 在大鼠视网膜缺血再灌注损伤 (RIRI) 后的表达规律及相关性。

方法: 建立大鼠视网膜缺血再灌注模型, 应用免疫组织化

学法检测大鼠 RIRI 后视网膜组织 IGF-1 和 IGFBP-3 表达的变化规律, 对两者进行相关性分析。

结果: 正常视网膜组织 IGF-1 和 IGFBP-3 即有轻微表达, IGF-1 在缺血再灌注后 6h 表达明显增高, 72h 达到高峰, IGFBP-3 在缺血再灌注后 12h 表达明显增高, 72h 达到高峰, 且二者具有相关性。

结论: IGF-1 和 IGFBP-3 表达与 RIRI 有关, 两者呈正相关。

关键词: 视网膜; 缺血再灌注损伤; IGF-1; IGFBP-3

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.03.11

张冬梅, 张文芳, 鲁建华, 等. 大鼠视网膜缺血再灌注后 IGF-1 及 IGFBP-3 的表达和意义. *国际眼科杂志* 2012;12(3):413-415

0 引言

视网膜缺血再灌注损伤 (RIRI) 是造成视神经损害和致盲的常见眼科临床疾病的病理过程^[1]。本实验选用成年 SD 大鼠, 采用升高眼压的方法制作 RIRI 模型, 应用免疫组织化学法检测大鼠 RIRI 后视网膜组织 IGF-1 和 IGFBP-3 表达的变化规律, 对两者进行相关性分析来探讨其在 RIRI 中可能发挥的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 兔抗大鼠 IGF-1 一抗 (北京博奥森生物技术有限公司), 兔抗大鼠 IGFBP-3 一抗 (北京博奥森生物技术有限公司), 免疫组织化学 SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司), 选择 40g/L 多聚甲醛 (武汉博士德生物工程有限公司), 裂隙灯显微镜 (德国 Zeiss), HMIAS-2000 高清晰彩色医学图文分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司), 免疫组织化学所需相关设备均由甘肃中医学院病理教研组提供。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及模型制备 选用 80 只健康成年 SD 大鼠 (由甘肃中医学院动物实验中心提供), 雌雄不限, 体质量 (220 ± 20) g。实验前经裂隙灯检查双眼等大, 角膜透明, 瞳孔等大等圆, 虹膜血管清晰, 晶状体无混浊。将所选大鼠随机分为: 对照组 (正常组)、缺血再灌注后 0h 组、6h 组、12h 组、24h 组、48h 组、72h 组、168h 组, 每组 10 只。除对照组外, 缺血再灌注组模型的建立采用前房加压灌注法^[2,3]。大鼠称质量, 用 100g/L 水合氯醛 (0.0035mL/g) ip 麻醉, 麻醉满意后, 将大鼠取俯卧位固定于鼠台上, 随机选取该大鼠的 1 眼造模, 5g/L 托吡卡胺滴眼液散瞳, 结膜囊内滴氯霉素滴眼液 2 次, 5g/L 丙美卡因滴眼液行眼表面麻醉, 将连接平衡盐溶液瓶输液管的 4.5 号头皮针沿颞侧角巩膜缘刺入大鼠眼前房, 针头斜面向上以免损伤虹膜和晶状体, 胶布固定头皮针于大鼠同侧耳缘处。缓慢升高输液瓶至瓶内液面与大鼠实验眼垂直距离 150cm 处, 此时眼压 110mmHg (1mmHg = 0.133kPa), 可见球结膜及虹膜迅速变白, 直接检眼镜下见视网膜苍白, 动静脉变细明显, 视网膜中央动静脉的供血完全阻断。氯霉素滴眼液滴

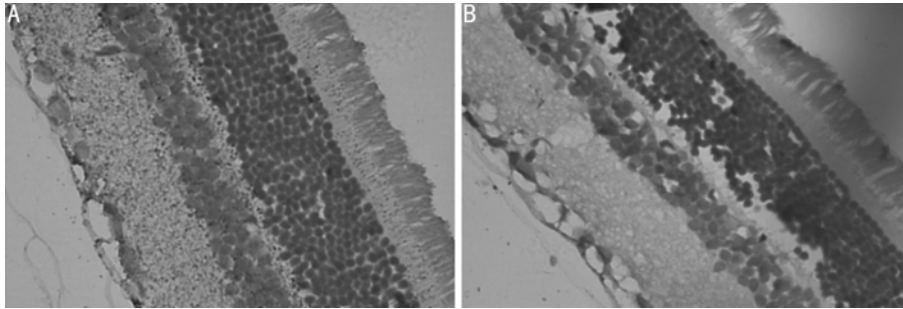


图1 大鼠在视网膜缺血再灌注损伤后72h IGF-1 和 IGFBP-3 的表达(SABC法, ×400)
 A: IGF-1; B: IGFBP-3。

眼以保持实验动物角膜湿润,进一步预防感染。前房内灌注持续形成高眼压造成视网膜缺血60min后,缓慢降低输液瓶高度至大鼠眼水平,使眼压缓慢降低。关闭输液器,拔出输液针头,虹膜及球结膜颜色迅速恢复正常,直接检眼镜下见眼底视网膜呈橘红色,说明被阻断的血管已重新开放,形成再灌注。术毕结膜囊涂红霉素眼膏,松解大鼠,待其自然苏醒后回笼。

1.2.2 标本的取材和固定 除去造模中出现角膜失代偿、前房出血及晶状体损伤的大鼠,每组随即抽取6只造模成功大鼠。按实验设计预订时间(即灌注后0,6,12,24,48,72,168h)取材,向腹腔内注射过量100g/L水合氯醛以处死实验大鼠,在眼球3:00~9:00位做好标记后,立即摘取眼球,保留视神经大约1~1.5mm,置于40g/L多聚甲醛磷酸缓冲液(pH7.4)内4℃固定24h,常规梯度乙醇脱水及二甲苯透明后石蜡包埋、切片。

1.2.3 HE染色观察病理学变化 取包埋好的眼球标本,平行于视神经矢状轴且以其为平面的视网膜进行连续切片6~8张,每张厚约5μm,置于预先用多聚赖氨酸处理的洁净载玻片上,60℃温箱烤片过夜。行HE染色,光镜下观察各组视网膜内层组织结构变化。

1.2.4 免疫组织化学染色观察 IGF-1 及 IGFBP-3 的表达 制成的切片置于65℃烤箱中烤2~3h,脱蜡、水洗,高压修复,置于3mL/L H₂O₂中加热阻断内源性过氧化物酶,PBS缓冲液中洗涤,加免疫抗大鼠IGF-1多克隆抗体(一抗)孵育盒中4℃孵育,PBS缓冲液中洗涤,严格按照说明书方法染色,DAB显色,苏木素复染,脱水,透明,封片。显微镜观察拍照(设阴性对照:用PBS代替一抗,其余步骤相同)。IGFBP-3采用免疫组织化学SABC法严格按照说明书方法染色(除一抗外,余步骤同上),然后显微镜观察,每次染色均做阳性和阴性对照。采用HMIAS-2000高清晰彩色医学图文分析系统,IGF-1及IGFBP-3的免疫组织化学染色切片,结果判定以细胞胞浆内呈棕黄色为阳性^[4,5],每个时间点各取3张,在同一放大倍率(200倍)下随机选择5个不同视野,在视网膜阳性表达区域计算平均吸光度(A)值来定量测定表达含量。

统计学分析:数据处理采用SPSS 17.0统计软件,根据数据特征采用t检验,相关性分析采用Pearson法。数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜组织病理学变化 正常视网膜组织染色均匀,结构清晰,给予缺血再灌注处理后,0h即可见细胞水肿;再灌注后6h细胞水肿明显,达到高峰,结构疏松,神经节

表1 各组大鼠 RIRI 后不同时间 IGF-1 与 IGFBP-3 的表达

分组	IGF-1	IGFBP-3
0h	0.075 ± 0.030	0.041 ± 0.007
6h	0.421 ± 0.026	0.090 ± 0.025
12h	0.686 ± 0.024	0.278 ± 0.026
24h	1.126 ± 0.048	0.740 ± 0.056
48h	1.975 ± 0.096	1.231 ± 0.046
72h	3.313 ± 0.102	2.011 ± 0.106
168h	2.395 ± 0.096	1.348 ± 0.086

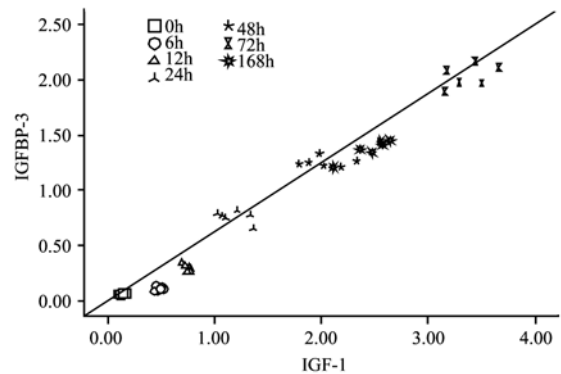


图2 IGF-1 与 IGFBP-3 表达相关性。

细胞层细胞体积增大,水肿明显;再灌注12h细胞水肿有所减轻;72h视网膜水肿基本消失,视网膜轻度变薄。

2.2 IGF-1 与 IGFBP-3 的表达 IGF-1结果判定以视网膜中细胞质染色为棕黄色表示阳性,在正常组中即可见有轻微表达,表达最弱,再灌注后6h可见表达明显增高,于再灌注后72h表达达到高峰(图1A),此后开始下降,再灌注后168h,IGF-1表达较正常值仍高($P < 0.05$)。IGFBP-3结果判定以视网膜中细胞质染色为棕黄色表示阳性,在正常组中亦可见有轻微表达,主要分布于神经节细胞层,再灌注后6h仍未见明显增高,于再灌注后12h表达开始明显增高,同时在再灌注后72h表达达到高峰(图1B),再灌注后168h表达下降($P < 0.05$,表1)。

2.3 IGF-1 与 IGFBP-3 的相关性 图2直观地表示IGF-1和IGFBP-3的表达变化具有直线上升趋势,变化是同向的,二者具有正相关性。为了更进一步了解IGF-1和IGFBP-3之间密切程度和相关方向,采用Pearson分布法计算二者的相关系数,结果示相关系数 $r = 0.993 (0 < r < 1)$,具有统计学差异($P < 0.05$)。从而证明,二者在视网膜组织中具有显著的正相关性。

3 讨论

胰岛素样生长因子系统 (insulin-like growth factors, IGFs) 是一个复杂的体系,自发现到现在已有 40 多年的历史。它最早被称为硫化因子,1978 年被正式命名为胰岛素样生长因子,主要由肝脏合成。此外,生殖器官、生殖道、胎盘和胚胎等也能合成 IGFs。IGFs 生物学作用广泛,在维持和调控细胞生长、增殖、分化、成熟、再生及抑制细胞凋亡方面具有重要作用。近年来,其在眼科疾病中的作用逐渐受到关注。关于在视网膜中是否表达 IGFBP-3,1996 年 Burren 等^[6]研究认为,IGFBP-3 在眼组织的表达定位于脉络膜内皮层和色素层,以及睫状体的色素上皮。而在 2003 年, Yang 等^[7]对于 IGFBP1-6 在眼组织中的表达做了重新评估,证实 IGFBP-3 在人类视网膜和视网膜色素上皮 (RPE) 均有表达,且组织中 IGFBP-3 可以与 IGF-1 结合,减少组织内 IGF-1 的表达量^[8],从而对 RIRI 产生影响^[9]。

本次动物实验进一步证明,正常视网膜组织中 IGF-1 与 IGFBP-3 即有表达,在视网膜发生缺血再灌注损伤时,视网膜组织内 IGF-1 于再灌注后 6h 表达明显增强,IGF-1 表达在再灌注后 72h 达到高峰 ($P < 0.05$)。有研究证明,RIRI 后诱导细胞凋亡的因子 Bax 在再灌注后 24h 达到高峰,开始形成同源二聚体,诱导细胞凋亡,IGF-1 是多种细胞的强有力分裂原和抗细胞凋亡的因子,具有控制各种细胞的增殖、分化和凋亡的作用,通常通过自分泌和旁分泌的方式起作用。IGF-1 可以上调 Bcl-2 表达,Bcl-2 通过与 Bax 形成异二聚体进而控制细胞凋亡^[10,11],IGFBP-3 在 IGF-1 表达增强后开始增强,于再灌注后 72h 达到高峰 ($P < 0.05$)。通过 Pearson 分析,二者具有明显相关性,IGFBP-3 在组织中可以与 IGF-1 结合,且亲和度较 IGF-1R 高^[12],从而减少组织内 IGF-1 的表达量。已有研究证实外源性给予 IGF-1 可以降低脑缺血再灌注的损伤程度^[13],是否用于改善视网膜缺血再灌注仍未知,且能否通过改变 IGFBP-3 表达程度来调节 IGF-1,以达到保护 RIRI 的目的,仍是一个值得研究的课题。

参考文献

1 Casati S, Zoppini G, Muqgeo M, et al. Sustained regression of florid diabetic retinopathy in a patient with Donohue syndrome (leprechaunism).

Eur J Ophthalmol 2010;20(1): 224-227

2 Selles-Navarro I, Villegas-Perez MP, Salvador-Silva M, et al. Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative *in vivo* study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(10):2002-2014

3 Ophir A, Berenshtein E, Kitrossky N, et al. Protection of the transiently ischemic cat retina by zincdesferoxamine after ischemia-reperfusion. *IVOS* 1994;35(2):669-676

4 Penha AM, Schaeffel F, Feldkaemper M. Insulin, insulin-like growth factor-1, insulin receptor, and insulin-like growth factor-1 receptor expression in the chick eye and their regulation with imposed myopic or hyperopic defocus. *Mol Vis* 2011;17:1436-1448

5 Schlueter PJ, Peng G, Westerfield M, et al. Insulin-like growth factor signaling regulates zebrafish embryonic growth and development by promoting cell survival and cell cycle progression. *Cell Death Differ* 2007;14(6):1095-1105

6 Burren CP, Berka JL, Edmondson SR, et al. Localization of mRNAs for insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-I receptor, and IGF binding proteins in rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(7):1459-1468

7 Yang H, Chaum E. A reassessment of insulin-like growth factor binding protein gene expression in the human retinal pigment epithelium. *J Cell Biochem* 2003;89(5):933-943

8 Verbukh E, Weiss O, Halpert M, et al. Gene expression of insulin-like growth factor-I, its receptor and binding proteins in retina under hypoxic conditions. *Metabolism* 1998;47(11):1331-1336

9 Slomiany MC, Rosenzweig SA. Autocrine effects of IGF-I-induced VEGF and IGFBP-3 secretion in retinal pigment epithelial cell line ARPE-19. *Am J Physiol* 2004;287(3):C746-753

10 王新月,马静. Bcl-2/Bax 在缺血-再灌注损伤视网膜的表达. *眼外伤职业眼病杂志* 2008;30(7):518-520

11 张鸿,郑东明,赵冬雪,等. 胰岛素样生长因子-1 对大鼠据造型脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响(英文). *中国现代医学杂志* 2004;14(18):14-18

12 Jiang Y, Steinle JJ. Systemic propranolol reduces b-wave amplitude in the ERG and increases IGF-1 receptor phosphorylation in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(5):2730-2735

13 Guan J. Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) Derived Neuropeptides, a Novel Strategy for the Development of Pharmaceuticals for Managing Ischemic Brain Injury. *CNS Neurosci Ther* 2011;17(4):250-255