

阻断促红细胞生成素抑制小鼠视网膜新生血管生成

黄文志¹, 李倩庆², 王露¹, 张伟¹

基金项目:广州市医药卫生科技项目(No. 20131A011027)
作者单位:(510180)中国广东省广州市第一人民医院¹眼科;
²超声医学科
作者简介:黄文志,主治医师,研究方向:视网膜病。
通讯作者:黄文志. huangwenzhi82@qq.com
收稿日期:2015-01-16 修回日期:2015-03-12

Blockade of retinal neovascularization by inhibiting erythropoietin in a mouse model

Wen - Zhi Huang¹, Qian - Qing Li², Lu Wang¹, Wei Zhang¹

Foundation item: Medical and Health Technology Fund of Guangzhou, China (No. 20131A011027)

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Ultrasound Medicine, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China

Correspondence to: Wen - Zhi Huang. Department of Ophthalmology, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China. huangwenzhi82@qq.com
Received:2015-01-16 Accepted:2015-03-12

Abstract

• AIM: To establish the murine model of oxygen induced retinopathy (OIR) and to evaluate the inhibition of retinal neovascularization by erythropoietin (EPO) blockade.

• METHODS: Neonates of C57BL/6 mouse (P7) were exposed to 75%±2% oxygen for 5d and return to normal air environment when 12d (P12) to establish oxygen-induced retinal neovascularization model. The neonates were divided into groups, injected with 0.5μL solution containing 25ng (group A), 50ng (group B), 250ng (group C) of soluble erythropoietin receptor (EPO-R) or PBS (group D) at P12, P14 and P16 in the right eye. On P17, the litters were sacrificed and their right eyes were enucleated and fixed with 4% paraformaldehyde, made pathological section. The number of breakthrough internal limiting membrane neovascular nuclei was counted with pathological retinal morphology, understanding the proliferative degree of retinal neovascularization.

• RESULTS: The pathological sections showed the neovascular cell nuclei which penetrating the inner limiting membrane in intravitreal EPO receptor injection group was reduced statistically than that in PBS injection group, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). And, neovascular nuclei count differences in the

various concentrations of EPO receptor group was statistically significant ($P < 0.01$). With the EPO receptor concentration increase, neovascular endothelial cells broken through the internal limiting membrane was reduced.

• CONCLUSION: Intravitreal injection of soluble EPO receptor can block EPO and improve neovascularization. The new method is expected to become new treatment of ocular neovascular diseases.

• KEYWORDS: oxygen - induced retinopathy; retinal neovascularization; erythropoietin

Citation: Huang WZ, Li QQ, Wang L, et al. Blockade of retinal neovascularization by inhibiting erythropoietin in a mouse model. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(4):605-607

摘要

目的:建立 C57BL/6 小鼠氧致血管增生性视网膜病变模型(oxygen induced retinopathy, OIR),探讨阻断促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)对视网膜新生血管的抑制作用。

方法:取鼠龄 7d (P7)的健康 C57BL/6 小鼠置于 75%±2% 氧气浓度的密闭氧舱中 5d,鼠龄 12d (P12)时返回正常空气环境以建立氧诱导鼠视网膜新生血管模型;新生小鼠于 P12~P16 隔日给予玻璃体腔内注射 0.5μL 含有 25ng (A 组),50ng (B 组),250ng (C 组)可溶性 EPO 受体的 PBS 液以及不含 EPO 受体的 PBS 液 (D 组)。于 P17 时分批处死各组小鼠,小鼠眼球以 4% 多聚甲醛固定,制成病理切片,进行视网膜组织形态病理学观察计数突破内界膜新生血管细胞核数,了解视网膜新生血管增生程度。

结果:计数病理切片突破内界膜新生血管细胞核数目,各组玻璃体内 EPO 受体注射组较 PBS 注射组新生血管细胞核数明显减少,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。并且各不同浓度 EPO 受体组间新生血管细胞核计数差异亦有统计学意义 ($P < 0.01$),随着 EPO 受体浓度增高,突破内界膜新生血管内皮细胞数减少。

结论:可溶性 EPO 受体玻璃体腔内注射能够阻断 EPO 的促新生血管生成作用,有望成为治疗眼部新生血管性疾病的新方法。

关键词:氧诱导视网膜新生血管性病损;视网膜新生血管;促红细胞生成素

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.4.09

引用:黄文志,李倩庆,王露,等.阻断促红细胞生成素抑制小鼠视网膜新生血管生成.国际眼科杂志 2015;15(4):605-607

0 引言

研究表明,促新生血管因子与抗血管生成因子的平衡被破坏是导致眼部新生血管形成的重要机制^[1],促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)是促新生血管因子中的

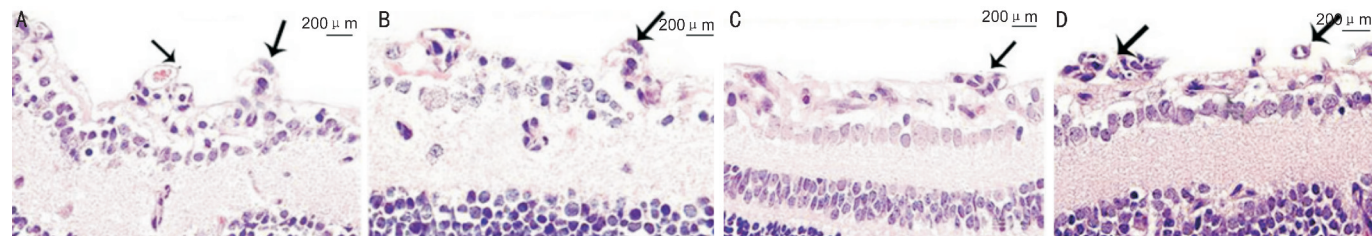


图1 光镜下各组P17d视网膜结构层次 A:OIR+25ng组可见突破内界膜,长入玻璃体腔的新生血管细胞核及管腔形成(箭头所指,HE×200);B:OIR+50ng组,箭头所指为新生血管细胞核(HE×200);C:OIR+250ng组,箭头指示突破内界膜新生血管细胞核较少;D:OIR+PBS组,可见大量新生血管细胞核突破内界膜,进入玻璃体腔。

重要一员。研究已经证实 EPO 在增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)视网膜新生血管形成^[2]以及角膜损伤后新生血管形成中起到重要作用,我们的前期实验发现 EPO 在氧诱导小鼠视网膜新生血管模型中高表达,且小鼠视网膜新生血管形成与眼球局部 EPO 上调明显正相关^[3]。因此,我们通过建立氧诱导小鼠视网膜新生血管模型,并以可溶性 EPO 受体(Erythropoietin receptor, EPOR)特异性阻断 EPO,观察视网膜新生血管生成情况,进一步探讨阻断 EPO 对缺氧诱导视网膜新生血管形成的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 选择7天龄健康 C57BL/6 新生小鼠80只,性别不限,新生小鼠未断奶,与哺乳母鼠共同饲养,系清洁级动物,由广东省医学实验动物中心提供。室温 23℃±2℃ 下喂养,予以12h明暗交替光照,母鼠能自由摄食及饮水。实验动物及实验条件符合国家科学技术委员会的《实验动物管理条例》。重组小鼠 EPO 可溶性受体购于 R&D Systems, Inc。

1.2 方法

1.2.1 模型建立 用随机数字表法将80只小鼠随机分为4组,每组20只。按 Smith 等^[4]方法建立 OIR 模型。小鼠于出生后7d(P7)与母鼠共置于密闭的氧箱,箱内通入75%湿润的医用氧气,用 RS-5100 型数字测氧仪测量氧箱的氧气体积分数,用氧流量计观察氧流量,每6h1次,含氧 75±2mL/L,氧流量 0.17~0.19L/min;5d后(P12)回到正常氧环境,含氧 20±1mL/L。

1.2.2 小鼠玻璃体腔注射 在P12d第一次行小鼠右眼玻璃体腔注射,参考 Joshua 等方法^[5]。以戊巴比妥钠对小鼠麻醉,术眼角膜 5g/L 丁卡因麻醉3次,术前3d 5g/L 左氧氟沙星眼药水滴眼,1% 聚维酮碘消毒液冲洗然后行玻璃体腔注射。将毛细玻璃管加热后拉丝,然后连接于 5μL 微量注射器。抽取 PBS 液及各浓度 EPO 受体 0.5μL。自锯齿缘后穿入眼球,将液体注入后部玻璃体,注意避免损伤晶状体。术后以 5g/L 左氧氟沙星眼药水冲洗眼球。各组注射药物如下,EPO 受体浓度参考 Daisuke 等^[6]实验:A组:25ng/0.5μL,体质量 6.63±0.22g;B组:50ng/0.5μL,体质量 6.58±0.28g;C组:250ng/0.5μL,体质量 6.64±0.23g;D组:PBS 液体 0.5μL,体质量 6.71±0.19g,各组间体重无统计学差异(P>0.05)。并分别于 P14, P16d 重复以上步骤。

1.2.3 视网膜形态光镜观察及突破内界膜血管细胞核计数 于 P17 以 10g/L 戊巴比妥钠腹腔注射过量麻醉处死,迅速摘除小鼠眼球并在眼球 3:00 或 9:00 方位做好标记。小鼠眼球常规于眼球固定液中固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,做一系列连续矢状切片,厚度

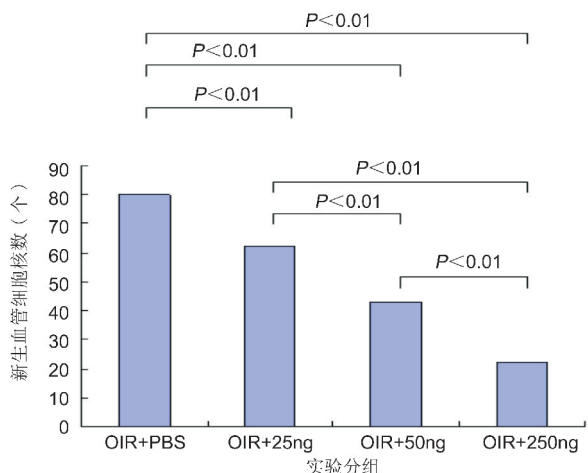


图2 不同浓度可溶性 EPO 受体玻璃体腔内注射对小鼠视网膜新生血管形成的抑制作用。

3μm,每只眼球间断取10个病理切片,相邻两个切片间隔4μm,在×200下每个切片取10个视野,计数突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目,统计平均每只眼球每张切片突破内界膜的血管内皮细胞核数。计数血管内皮细胞核时仅计数与内界膜有紧密联系的血管内皮细胞核,不包括玻璃体腔内其它与内界膜无联系的血管内皮细胞核。

统计学分析:所有数据均采用 SPSS 16.0 统计分析软件包进行分析。本试验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,多个样本均数间两两比较的 SNK-q 检验,双变量等级相关分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 突破内界膜视网膜新生血管细胞核观察和计数 实验显示,光镜下各组 P17d 视网膜结构层次清晰。视网膜由里至外分为10层,外核层细胞数目最多,排列4~7层;内核层细胞数量少,排列成2~3层;神经节细胞最少,大小不一,呈圆形或椭圆形。每张3μm切片选取10个高倍镜视野计数突破内界膜新生血管细胞核数,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,反映各实验组视网膜新生血管增生程度,A组新生血管细胞核计数为 62±20 个,B组为 43±18 个,C组为 22±8 个,D组为 80±24 个,各组比较差异有统计学意义(P<0.01)。各组视网膜切片上除可见位于内层视网膜血管外,均可见数目不一的血管穿过内界膜,进入玻璃体腔,见图1。

2.2 可溶性 EPO 受体浓度与突破内界膜血管细胞核计数的关系 不同浓度可溶性 EPO 受体玻璃体内注射对 OIR 小鼠视网膜新生血管的抑制作用呈剂量依赖关系($r_s = 0.85, P<0.01$)。随着 EPO-R 浓度增高,抑制作用随之增强,见图2。

3 讨论

我们以 7d 龄 C57BL/6 小鼠,在 75% 高氧环境下暴露 5d 后,再回到正常氧环境,所有小鼠均可以观察到视网膜新生血管。在视网膜中总计内皮细胞数是困难的,因为在光镜下内皮细胞难以从周围细胞中一一分辨出来。考虑到视网膜新生血管是从非正常部位的血管增生,计数突破内界膜的血管内皮细胞数目则更具有科学性。我们通过平行视神经矢状位视网膜连续薄层切片观察和计数突破内界膜新生血管内皮细胞核数,成功地建立了小鼠视网膜新生血管模型。该模型新生血管的发生与组织缺氧有关,是许多常见眼底病共同的发病机制,其制作方法相对简单,具有可重复性、可定性、费用低等特点。因此该模型是进行视网膜新生血管发生机制及治疗效果研究的有效模型。

EPO 来源于胚胎肝及成人肾脏,是一种相对分子质量约 30.4×10^3 ,由 193 个氨基酸组成的糖蛋白激素,通过与其受体(EPO-R)结合发挥相应作用。EPO 最为主要的生理作用是作为红细胞生成的刺激剂,通过促进红细胞系统前体的增生和分化,增加抗凋亡蛋白的表达及抑制凋亡过程来维持红细胞生成与耗损的动态平衡。EPO 通过其特异受体 EPOR 发挥作用。研究表明造血细胞与内皮细胞起源于相同的间叶组织祖先——血管内皮祖细胞,以往认为仅作用于造血系统的 EPO 在内皮细胞中也具有一定的功能。EPO 作为它的分裂原在体外能够激发内皮细胞增生、迁移、释放内皮素-1、增加游离钙的浓集等血管前反应,在体内能够诱导新生血管的形成。目前已经发现,EPO/EPOR 系统广泛存在于肝、肾以外的组织,参与体内众多的正常和病理性血管生成过程:如炎症性血管形成,伤口愈合^[7],女性生殖器官血管形成^[8],肿瘤血管形成^[9]以及缺血缺氧诱导的视网膜新生血管生成,如 PDR 和早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)^[10]。在体外培养的成人心肌内皮细胞上,研究重组人促红细胞生成素(rhEPO)血管生成活性,并与 VEGF 相比较,结果显示与正常的生理生长相比,rhEPO 刺激毛细血管向外生长达 220%,展现出与 VEGF 相当的促血管生成潜力^[11]。有研究者发现 PDR 患者的玻璃体液中 EPO 水平明显升高,而其升高水平与血浆中 EPO 水平无关,因此推断随着糖尿病患者视网膜微循环障碍的加重,缺血、缺氧的视网膜组织分泌 EPO 增多,从而促进视网膜新生血管的发生。玻璃体腔注射可溶性 EPO 受体,减少了视网膜新生血管的发生,其对视网膜新生血管的抑制效率与可溶性 VEGF 受体相当^[12]。

我们选用玻璃体腔注射不同浓度可溶性 EPO 受体,通过与视网膜血管内皮细胞的 EPO 受体竞争性结合病理状态下升高的 EPO,是因为玻璃体腔注射药全身副作用少,局部药物浓度大。结果表明,EPOR 能明显抑制视网膜新生管的形成。关于可溶性 EPO 受体浓度的选择,我们参考了 Daisuke 等^[6]实验,有研究证实,血清与玻璃体内 EPO 浓度没有明显关系,考虑玻璃体内增高的 EPO 不是

源于血视网膜屏障的破坏,而是视网膜局部的产物,免疫组织化学法显示在正常视网膜组织中的 EPO 主要是由 Müller 细胞产生的^[13]。EPO 抑制剂虽然对血管增生性疾病有益,目前研究较多的是用于糖尿病性视网膜病变的治疗,但 EPO 对视神经及光感受器还有保护作用,如盲目使用会加重糖尿病神经病变及光感受器的凋亡,因此,本实验中选用的 EPOR 作为高效的 EPO 抑制剂,在抑制了视网膜新生血管形成的同时,不可避免的会在一定程度上影响正常的视网膜生理作用,这有待于在我们的下一步实验中进一步研究。

本实验中 OIR 模型组之间相比,不同浓度 EPO 受体组之间视网膜新生血管细胞核计数有明显差异,并且呈一定的剂量相关性。浓度越高,对视网膜新生血管的抑制作用愈明显。特异性阻断促红细胞生成素能抑制视网膜新生血管形成,有望成为继抗 VEGF 治疗后又一治疗眼部新生血管性疾病的有效方法。

参考文献

- 1 Kernt M, Thiele S, Liegl RG, et al. Axitinib modulates hypoxia induced blood-retina barrier permeability and expression of growth factors. *Growth Factors* 2012;30(1):49-61
- 2 Garcia-Ramirez M, Hernandez C, Simo R. Expression of erythropoietin and its Receptor in the human retina: a comparative study of diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2008;31(6):1189-1194
- 3 黄文志,唐罗生.小鼠氧诱导视网膜新生血管形成中促红细胞生成素的变化. *国际眼科杂志* 2010;10(11):2074-2076
- 4 Smith L, Wesolowski E, Melellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(1):1012-1017
- 5 Barnett JM, McCollum GW, Fowler JA, et al. Pharmacologic and genetic manipulation of MMP-2 and-9 affects retinal neovascularization in rodent models of OIR. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(2):907-915
- 6 Daisuke W, Kiyoshi S, Shigeyuki M, et al. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2005;353(8):782-792
- 7 Galeano M, Altavilla D, Bitto A. Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Crit Care Med* 2006;34(4):1139-1146
- 8 Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem* 1998;273(39):25381-25387
- 9 Ribatti D, Marzullo A, Nico B. Erythropoietin is an angiogenic factor in gastric carcinoma. *Histopathol* 2003;42(3):246-250
- 10 Assouline Y, Engel HM. The development of retinopathy of prematurity in neonates treated with recombinant human erythropoietin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(2):40-50
- 11 Kawachi K, Iso Y, Sato T, et al. Effects of erythropoietin on angiogenesis after myocardial infarction in porcine. *Heart Vessels* 2012;27(1):79-88
- 12 Takagi H, Watanabe D, Suzuma K, et al. Novel role of erythropoietin in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77(3):62-64
- 13 Fu QL, Wu WT, Wang H, et al. Upregulated endogenous erythropoietin/erythropoietin receptor system and exogenous erythropoietin revue retinal ganglion cells after chronic ocular hypertension. *Cell Mol Neurobiol* 2008;28(2):317-329