

• 临床研究 •

金雀异黄素对血管增生性视网膜病变小鼠中 VEGF 表达的影响

章云峰 许 静 钱宗云

【摘要】 目的 研究相对缺氧对小鼠视网膜血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达的诱导作用, 以及金雀异黄素 (genistein, Gen) 对其表达的影响和机理。**方法** 制作缺氧小鼠模型, 采用视网膜切片计数视网膜血管的增生, 免疫荧光法检测视网膜中 VEGF 的表达, 分析不同 Gen 浓度 (0、50、100、200 mg/kg) 对缺氧致血管增生性视网膜病变小鼠的 VEGF 表达的影响。**结果** 正常对照组小鼠视网膜切面有少量血管内皮细胞核, 0 剂量组 (相对缺氧组) 视网膜切片中突破内界膜的血管内皮细胞核数较对照组显著增加 ($P < 0.001$), 提示相对缺氧诱导视网膜血管新生, 表明动物模型制作成功。给药组突破内界膜的血管内皮细胞核数均较相对缺氧组减少, 并且呈剂量依赖性, 提示 Gen 可抑制缺氧诱导的视网膜血管新生。与对照组相比, 相对缺氧组小鼠视网膜内层 VEGF 的表达明显增强; Gen 给药组 VEGF 的表达较相对缺氧组减弱。**结论** Gen 可抑制缺氧诱导的 VEGF 的表达, 提示 Gen 对视网膜新生血管的形成具有预防和潜在的临床价值。

【关键词】 金雀异黄素; 视网膜血管新生; 血管内皮生长因子

视网膜新生血管的形成以及与其相伴的渗出、出血、增生等一系列病理改变可严重破坏眼的结构和功能, 导致患者视力障碍。而眼内新生血管的形成, 多伴有缺血、缺氧。视网膜缺血缺氧引起的新生血管形成是许多眼底病产生的关键环节和致盲的主要原因, 其主要病理改变是视网膜受到缺血缺氧损伤后, 释放大量的细胞因子如 bFGF、VEGF、PDGF, 作用于血管内皮细胞, 促使血管内皮细胞的有丝分裂、内皮细胞与周围细胞相互作用和血管管腔形成, 导致视网膜细胞异常增殖和新生血管形成, 而 VEGF 在新生血管形成过程中起着关键作用^[1]。

金雀异黄素 (Genistein, Gen) 是一种从大豆中提取的异黄酮类化合物, 结构和分子量与雌二醇相类似, 同时具有雌激素样活性, 因此被称之为植物雌激素 (phytoestrogens) 或植物源性雌激素 (plant-derived estrogens)。Gen 在预防和治疗肿瘤、某些慢性疾病及维持机体健康中的有效作用日渐被人们所关注。其作用机制从细胞水平上看, 可能与诱导细胞凋亡, 抑制细胞增殖, 促进细胞分化、抑制血管新生, 抑制免疫功能及类雌激素样作用有关^[2]。近年来, 动物实验及体外细胞培养研究提示 Gen 临床上可用于脉络膜血管新生的治疗, Gen 可抑制体外培养

的 PC12 细胞缺氧诱导的 VEGF 的表达^[3]。因此我们建立了相对缺氧致血管增生性视网膜病变小鼠模型, 研究 Gen 对视网膜血管新生的抑制作用, 观察 Gen 对 VEGF 表达的影响, 探讨 Gen 抑制视网膜血管新生的机制。

材料与方法

一、材料

C57BL/6 小鼠购自南京医科大学动物房, Genistein 购自 Sigma 公司, VEGF 蛋白单克隆抗体购自 NOVUS 公司。

二、方法

1. 动物模型的制作: 选择未生育过的成年 C57BL/6 雌性小鼠 10 只, 2 只为一组, 分别与 1 只雄性小鼠同笼饲养, 每笼平均出生 10 只新生 C57BL/6 小鼠。将小鼠随机分为相对缺氧组、3 个给药组 (Gen 50、100、200 mg/kg) 和对照组。将相对缺氧组、给药组小鼠于出生后第 7 天与同笼母鼠一起放入密闭的干燥瓶中, 形成一密闭氧箱。氧箱中通入湿化的纯氧和空气, 用测氧仪测量调整氧的体积分数至 80%。随后每 3~6 h 调节 1 次, 维持氧箱内氧的体积分数为 $75\% \pm 5\%$ 。每日 1 次打开氧箱加食, 换水。5 d 后将小鼠取出, 置于正常大气环境中 (氧的百分含量约 21%)。给药组小鼠于第 14 天

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2010.06.017

作者单位: 南京医科大学附属南京儿童医院药剂科 (210008),

E-mail: zyfpw@live.cn

开始腹腔注射 Gen, 剂量分别为 50、100、200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 连续 7 d。对照组 10 只小鼠生活在正常大气环境中。于第 21 天将各组小鼠处死。

2. 视网膜切片计数视网膜血管的增生: 每组小鼠均于出生后 21 d 处死, 眼球摘除并标记方向。摘除的眼球浸泡在 4% 中性甲醛溶液中 24 h, 常规脱水, 石蜡包埋。矢状面平行视神经连续 6 μm 切片, 每只眼随机抽取 5 个切面(有视神经断面的切面不记入在内), 常规脱蜡后, 予雪夫高碘酸-苏木素(PAS)染色, ×200 光学显微镜下计数整个眼切面中突破内界膜的血管内皮细胞核数目。

3. 免疫荧光法检测视网膜中 VEGF 的表达: 从相对缺氧组、给药组及常氧对照组中各随机抽取 10 张未经染色的 6 μm 视网膜切片, 常规脱蜡(切片依次在下述溶液中浸泡: 二甲苯 5 min × 3 次, 100% 酒精 5 min × 2 次, 90% 酒精 5 min, 80% 酒精 5 min, 70% 酒精 5 min, 清水冲洗。), 0.01 M 枸橼酸钠缓冲液中 100 °C 抗原修复 15 min, 自然冷却。清水冲洗 5 min。10% H₂O₂ 中处理 10 min, 清水冲洗 5 min, PBS 浸润组织 5 min 后, 拭去多余的 PBS, 加入正常山羊血清封闭液, 室温 20 min。拭去封闭液后, 予 VEGF(1:100)单抗 4 °C 孵育过夜。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。予以 FITC 标记的二抗(1:100)孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。在激光共聚焦显微镜下观察, 成像。切片浸泡于 PBS 中, 1 h 内测完。

三、统计学处理

计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组均数比较, 采用非配对 *t* 检验法, $P < 0.05$, 为差异有统计学意义。

结 果

一、Gen 对视网膜血管新生的影响

切片经 PAS 染色后, 视网膜在光学显微镜下可清楚分为 10 层。从内至外分别为: 内界膜; 神经纤

维层; 神经节细胞层; 内丛状层; 内核层; 外丛状层; 外核层; 外界膜; 视细胞层; 视网膜色素上皮层。内界膜是一层很薄、无细胞和特殊结构的薄膜, 呈红染。血管内皮细胞核扁长, 呈深蓝色, PAS 染色后很容易分辨。正常对照组平均每个眼切面突破内界膜的血管内皮细胞核数为 0.56 ± 0.69 , 高氧处理组为 25.63 ± 6.12 , 明显多于对照组 ($P < 0.001$), 提示相对缺氧诱导视网膜血管新生, 表明动物模型制作成功。50、100、200 mg/kg 体重 Gen 给药组突破内界膜的血管内皮细胞核数均较相对缺氧组减少, 呈剂量依赖性, 提示 Gen 可抑制缺氧诱导的视网膜血管新生(表 1)。

表 1 相对缺氧致视网膜血管的增生性改变及 Gen 的影响

分组	<i>n</i>	突破内界膜的血管内皮细胞核个数	
		\bar{x}	<i>s</i>
对照组	25	0.56	0.69
相对缺氧组	25	25.63##	6.12
不同剂量 Gen 给药组			
50 mg/kg	25	21.89 *	4.55
100 mg/kg	25	18.23 **	4.08
200 mg/kg	25	14.62 **	3.85

注: ##表示与对照组比较 $P < 0.01$, 不同剂量组与相对缺氧组比较, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ 。

二、Gen 对视网膜中 VEGF 表达的影响

正常对照组视网膜靠近内丛状层的内核层细胞以及节细胞, 有较弱的 VEGF 免疫荧光。相对缺氧组视网膜内层 VEGF 荧光明显较对照组强, 尤其是突破内界膜的血管内皮细胞的免疫荧光。50、100、200 mg/kg 体重 Gen 给药组与相对缺氧组比较, VEGF 荧光强度减弱, 肉眼观察荧光强度随剂量的增加而递减(图 1)。

讨 论

视网膜新生血管是非正常部位的血管增生, 我

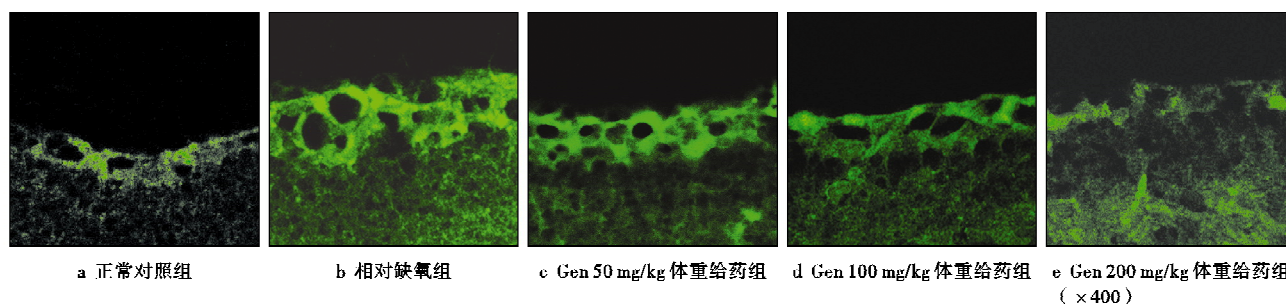


图 1 视网膜切片 VEGF 免疫荧光染色

他们将视网膜切片进行了雪夫高碘酸-苏木素(PAS)染色,此种染色方法可很好地显示视网膜的内界膜和突破内界膜的血管内皮细胞核。计数结果显示,相对缺氧组突破内界膜的血管内皮细胞数显著高于对照组,提示缺氧可致视网膜血管增生。

新生血管的形成是一种极其复杂的生物学过程,其中内皮细胞起着主导作用。而眼内血管新生常见的诱因是缺血、缺氧。因此与缺氧相关,同时又能特异性促内皮细胞分裂的某种物质,必定是刺激视网膜血管增生的关键因子。已有越来越多的研究证实,此种因子就是 VEGF^[4-5]。VEGF 是一种内皮细胞专一性丝裂原和血管新生强烈的刺激因子,对生理或病理状态下血管生成都起着重要的调节作用^[6-8]。

视网膜血管内皮细胞核计数结果显示:50 mg/kg、100 mg/kg 和 200 mg/kg 体重剂量 Gen 给药组均明显低于相对缺氧组,抑制作用呈剂量依赖性,提示 Gen 可抑制缺氧引致的视网膜血管增生。

已知 Gen 是一种特异性的酪氨酸蛋白激酶抑制剂^[9]。而 VEGF 的受体无论是 FLT1 或是 KDR 均是酪氨酸激酶类受体,也就是说 VEGF 与受体结合后,受体通过酪氨酸激酶磷酸化而被激活,继而启动细胞内系统,促进内皮细胞分裂增殖,血管新生。因此 Gen 是否通过抑制 VEGF 受体酪氨酸激酶磷酸化,从而阻断 VEGF 信号传导通路,抑制视网膜血管的新生有待进一步的实验证实。

另外,视网膜切片免疫荧光组织化学研究结果显示:不同剂量给药组 VEGF 荧光表达均较高氧对照组弱。提示 Gen 可引起 VEGF 表达减少,抑制缺氧诱导的视网膜新生血管形成。但 Gen 抑制 VEGF 蛋白表达增加的具体机制目前尚不明了。

总之,相对缺氧致血管增生性视网膜病变小鼠模型,提示了组织缺氧与血管新生的相关性,二者是许多常见眼底病共同的发病基础。因此该模型是研

究包括 ROP 在内的与缺氧相关的视网膜新生血管性疾病的合适模型。Gen 可抑制上述模型中缺氧诱导的 VEGF 蛋白表达的增加,抑制视网膜血管的新生,提示 Gen 在视网膜新生血管形成性疾病的预防及治疗中可能具有潜在的应用价值。

参考文献

- 1 Miller JW. Vascular endothelial growth factor and ocular neovascularization[J]. Am J Pathol, 1997, 151(1): 13-23.
- 2 Polkowski K, Mazurek AP. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data[J]. Acta Pol Pharm, 2000, 57(2): 135-155.
- 3 Andrew p, Levy, Nina S, Levy Mark A. Goldberg. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia[J]. J Bio Chem, 1996, 271(5): 2746-2753.
- 4 Pages G, Milanini J, Richard DM, et al. Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase cascade[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 902: 187-200.
- 5 Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia[J]. A M J Pathol. 2000, 156(3): 965-976.
- 6 Guang L Wang, Gregg L Semenza. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1[J]. Biochem J, 1995, 270: 1230-1237.
- 7 Wang G L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 5510-5514.
- 8 Gerber HP, Condorelli F, Park J, et al. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia[J]. J Biol Chem, 1997, 272(38): 23659-23667.
- 9 Constantinou A, Huberman E. Genistein as an inducer of tumor cell differentiation: possible mechanisms of action[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1995, 125: 109-115.

• 预告 •

2011 年,《临床小儿外科杂志》刊稿重点:儿童内镜外科、儿童外科营养支持、儿童创伤、儿童肿瘤、尿道下裂的诊断与治疗进展、小儿先天性心脏病的镶嵌治疗等。欢迎广大作者踊跃投稿。