

· 实验研究 ·

糖尿病大鼠视网膜血管内皮细胞生长因子及碱性成纤维细胞生长因子的表达

宋鄂 董宇 崔治华 杨威 王雅坤 吴家祥

【摘要】 目的 研究糖尿病大鼠视网膜病变早期血管内皮细胞生长因子(VEGF)及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)作用的关系。 **方法** Wistar 大鼠 55 只,建立糖尿病大鼠模型,随机分为正常对照组(10 只),糖尿病 1、3、5 个月组(每组各 15 只)。每组分别在视网膜石蜡切片上行 VEGF、bFGF 原位杂交及免疫组织化学检测,以观察两者的表达情况。 **结果** 原位杂交检测结果显示,bFGF 在糖尿病 3 个月组开始有表达,表达个体数百分比为 77.8%,5 个月组表达个体数百分比为 88.9%;VEGF 在糖尿病 3 个月组无阳性表达,5 个月组表达个体数百分比为 66.7%。免疫组织化学检测结果显示,bFGF 在糖尿病 3 个月组开始阳性表达,表达个体数百分比为 55.6%,5 个月组表达个体数百分比为 88.9%;VEGF 在 3 个月组表达个体数百分比为 33.3%,5 个月组表达个体数百分比为 88.9%。 **结论** 糖尿病大鼠视网膜病变的 VEGF 表达出现在 bFGF 之后。

【关键词】 糖尿病视网膜病/免疫学; 免疫组织化学; 原位杂交; 内皮细胞生长因子; 成纤维细胞生长因子,碱性; 疾病模型,动物

中图分类号:R587.26 R771.3

Expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in diabetic rats
SONG E*, DONG Yu, CUI Zhi-hua, et al. Department of Ophthalmology, First Clinical hospital of Jilin University, Chang chun 130021, China
Corresponding author: WU Jia-xiang, Email: songe23@21cn.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression and relation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in rats with diabetic retinopathy. **Method** Fifty-five Wistar rats were randomly divided into the control group (10 rats), and 1, 3, and 5-month-diabetes group (15 rats in each diabetes group), and the diabetic models were set up. The expressions of VEGF and bFGF were detected by situ hybridation and immunohistochemistry on retinal paraffin sections.

Results The results of situ hybridation showed that expression of bFGF was found in 3-month-diabetes group with the percentage of 77.8%, and 88.9% in 5-month-diabetes group; the positive expression of VEGF was not found in 3-month-diabetes group but in 5-month-diabetes group with the percentage of 66.7%. Immunohistochemistry indicated that the positive expression of bFGF started in 3-month-diabetes group with the percentage of 55.6%, and 88.9% in 5-month-diabetes group; the percentage of the expression of VEGF was 33.3% in 3-month-diabetes group and 88.9% in 5-month-diabetes group.

Conclusion The expression of VEGF occurs after the expression of bFGF in rats with DR.

【Key words】 Diabetic retinopathy/immunology; Immunohistochemistry; In situ hybridization; Endothelial growth factors; Fibroblast growth factor, basic; Disease models, animal

糖尿病视网膜病变(DR)是糖尿病最常见的眼部微血管并发症,新生血管形成是 DR 最主要的病理改变,目前研究表明这种新生血管形成与生长因子密切相关,而且可能是多因子的协同作用^[1]。我们已用链脲佐菌素(STZ)大鼠视网膜血管铺片证明了两者的关

系^[2]。本实验旨在用石蜡切片来进一步证明两者的关系,以便为将来临床防治 DR 提供一定的理论基础,现将内容报告如下。

1 材料和方法

1.1 糖尿病动物模型的建立及分组

实验动物为生后 6 周、体重 180~200 g 的健康雄性 Wistar 大鼠 55 只,双眼均为实验眼,由本校实验动物部提供。随机分成对照组 10 只,糖尿病 1 个月组、3

基金项目:吉林省科学基金资助项目(990575-5)

作者单位:130021 长春,吉林大学第一医院眼科(宋鄂、董宇、崔治华、杨威);延边大学医学院(王雅坤);吉林大学基础医学部病理教研室(吴家祥)

通讯作者:吴家祥,Email: songe23@21cn.com

个月组、5 个月组各 15 只。糖尿病组鼠按 60 mg/kg 的剂量一次性腹腔内注射 STZ, 3 d 后测尿糖达 ++++ 以上, 空腹血糖达 16.5 mmol/L 以上, 且尿量及饮水明显增多鼠为糖尿病大鼠模型。对照组仅腹腔内注射同样体积的 0.1 mmol/L 的柠檬酸缓冲液。1 个月后血糖恢复至正常鼠每组留取 2 只, 视为血糖恢复鼠, 作为 STZ 对视网膜毒性的观察组。实验结束时, 去除中间死亡鼠和血糖恢复鼠, 每组以 9 只鼠作为实验统计对象。

1.2 石蜡切片的制备

将部分眼球固定于 10% 中性福尔马林中 48 h, 经乙醇常规脱水, 二甲苯透明后浸腊包埋。连续 4 μm 切片; 用于免疫组织化学染色, 6 μm 切片用于原位杂交染色。

1.3 bFGF 原位杂交

bFGF 原位杂交所用探针由美国 CyberSyn 生物制品公司合成, 并由公司在探针的 5' 端直接标记生物素。参考 Isacchi 等^[4]方法, 设计 bFGF 寡核苷酸序列: bFGF 5'-ATGGCAGCCGGGAGCATCACCACGC-3', 以上探针为 5' 端生物素标记, 均在计算机 Gene Bank 软件中进行同源序列分析。

原位杂交步骤: (1) 制好的石蜡切片常规脱蜡至水; (2) 蛋白酶 K 37 C 孵育 15 min; (3) 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 1 min; (4) 3% H_2O_2 -蒸馏水阻断 25 min; (5) PBS 冲洗 5 min; (6) 0.2 mol 盐酸中和组织内碱性蛋白 10 min; (7) PBS 冲洗 1 min; (8) 乙醇脱水, 室温下自然干燥; (9) 将储存的杂交缓冲液在 50 C 下充分溶解, 加入探针到所需浓度; (10) 滴加配制好的含有探针 (bFGF) 的杂交缓冲液于切片中, 每片 50 μl , 用封孔膜将切片缠好, 封闭, 放入含有甲酰胺的湿盒中, 42 C 烤箱中孵育 20 h; (11) 切片浸入 5 倍柠檬酸三钠溶液 (SSC) 液中 2 min, 将封孔膜从载玻片上揭下; (12) 切片浸入含有 50% 去离子甲酰胺的 2 倍 SSC 液中 30 min; (13) 2 倍 SSC 液中 15 min; (14) 0.2 倍 SSC 液中 10 min; (15) 加封闭用羊血清 30 min; (16) 加兔抗生物素 50 μl 40 min; (17) 通用型 IgG/Biotin (1:100) 40 min; (18) 3-3-二氨基联苯胺 (DAB) 显色, Mayer 苏木精染核, 中性树胶封片。

1.4 VEGF 原位杂交

VEGF 原位杂交探针及工作液均购自武汉博士德生物工程有限公司。本试剂盒采用 VEGF 寡核苷酸探针, 经地高辛标记。寡聚核苷酸探针序列如下:

(1) 5'-CAGCCTGGGACCACTTGGCATGGT-GGAGGTAGAGC-3'

(2) 5'-CACATCTGCAAGTACGTTCGTTTA-ACTCAAGCTGC-3'

(3) 5'-ATATTAACATCACGTCTTTGTCTC-TAGAGCAGTTT-3'。

原位杂交步骤: (1)~(9) 步同 bFGF 原位杂交方法; (10) 滴加 VEGF 探针 20 μl , 用封孔膜将切片缠好, 封闭, 放入底部含有湿沙布的湿盒, 42 C 烤箱中孵育 20 h; (11) 同 bFGF 原位杂交方法; (12) 切片加入封闭液, 室温下孵育 20 min, 不洗, 直接滴加兔抗地高辛, 37 C 下孵化 60 min; (13) 滴加生物素化羊抗兔 IgG, 37 C 下孵育 30 min; (14) 滴加卵白素-生物素-过氧化物酶复合物 (ABC-AP), 37 C 下孵育 30 min; (15) 硝基四氮唑蓝 (NBT) 显色; (16) 水溶性封片剂封片。整个过程戴消毒手套。

1.5 免疫组织化学检测

链亲合素 (SP) 试剂盒及 DAB 为美国 DAKO 公司产品。免疫组织化学染色步骤: (1) 切片脱蜡、脱水; (2) 3% H_2O_2 阻断 25 min; (3) PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; (4) 抗原修复; (5) 山羊血清封闭 30 min; (6) 滴加特异性一抗 (抗 bFGF 或 VEGF) 于切片上, 孵育 40 min; (7) PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; (8) 滴加相应的二抗 (IgG 或 Biotin), 孵育 40 min; (9) PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; (10) 加相应的三抗 (S-A/HRP) 孵育 40 min; (11) PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; (12) DAB-蒸馏水溶液显色; (13) Mayer 苏木精复染, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.6 统计学分析

原位杂交及免疫组织化学结果均用表达个体数百分比表示, 即有阳性表达的 STZ 大鼠的只数占各组大鼠总数的百分比, 其结果采用 Fisher 精确概率检验。

2 结果

2.1 正常对照组及血糖恢复鼠、糖尿病 1 个月组

bFGF 与 VEGF 的原位杂交及免疫组织化学均无阳性表达。

2.2 糖尿病 3 个月组

原位杂交染色结果: (1) bFGF: 7 只鼠 bFGF mRNA 在内核层细胞及血管壁阳性表达 (图 1), 表达个体数百分比为 77.8%, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P=0.00226$); (2) VEGF: 无阳性表达。免疫组织化学染色结果: (1) bFGF: 5 只鼠在内核层血管壁细胞阳性表达, 表达个体数百分比 55.6%, 与对照组相比差异有统计学的意义 ($P=0.029$) (图 2); (2) VEGF: 3 只鼠在节细胞层及内核层有阳性表达, 表达

个体数百分比 33.3%, 与对照组相比差异无统计学意义 ($P=0.206$) (图 3)。

2.3 糖尿病 5 个月组

原位杂交染色结果: (1) bFGF: 8 只鼠 bFGF mRNA 阳性表达, 表达个体数百分比 88.9%, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P=0.00041$); (2) VEGF: 6 只鼠 mRNA 阳性表达, 表达个体数百分比 66.7%, 与对照组 (图 4) 相比差异有统计学意义 ($P=0.0091$), 位于内界膜层、节细胞层、内核层、外核层及色素上皮层 (图 5)。免疫组织化学染色结果: (1) bFGF: 8 只鼠在内核层细胞及血管上有阳性表达, 表达个体数百分比 88.9%, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P=0.00041$) (图 6); (2) VEGF: 8 只鼠阳性表

达, 表达个体数百分比 88.9%, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P=0.00041$), 主要位于内核层、节细胞层的细胞及血管壁 (图 7)。

3 讨论

DR 是以新生血管形成为主要标志的一种异常增生性疾病, 目前认为与生长因子的作用密切相关, 而且可能是多种因子相互协调、共同作用的结果^[1]。因此, 研究生长因子间的相互作用比研究单因子更有意义。我们曾利用 STZ 糖尿病大鼠视网膜血管消化铺片的方法, 观察了与 DR 新生血管形成最密切的 2 个生长因子 VEGF 及 bFGF 的表达情况^[7]。在本实验中, 我们利用 STZ 糖尿病大鼠视网膜的石蜡切片, 进一步观

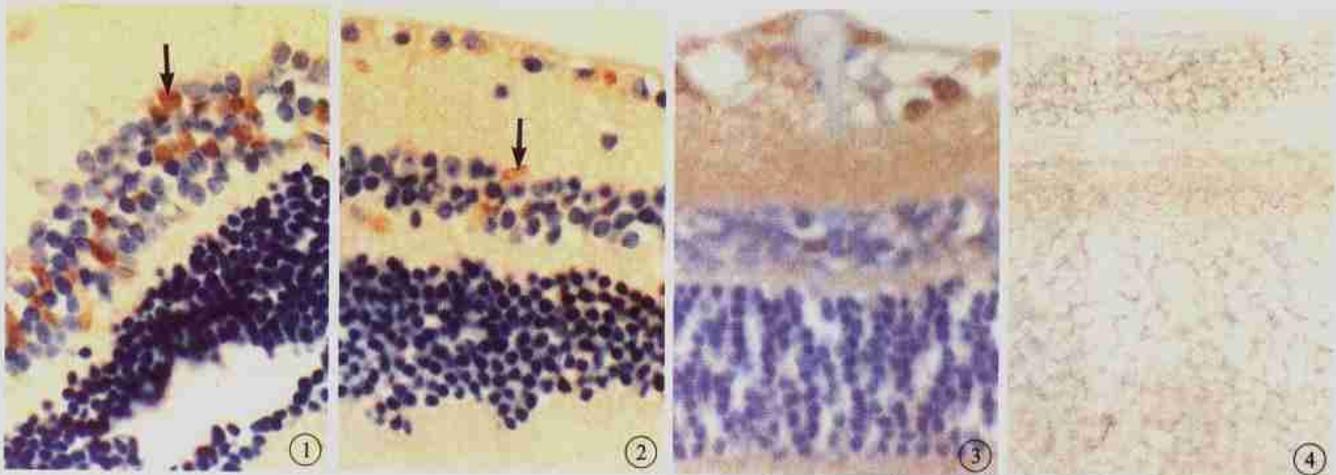


图 1 糖尿病 3 个月组大鼠视网膜切片 bFGF mRNA 像。内核层阳性表达 (黑箭) 原位杂交染色 $\times 400$ 图 2 糖尿病 3 个月组大鼠视网膜切片 bFGF 像。内核层血管壁阳性表达 (黑箭) 免疫组织化学染色 $\times 400$ 图 3 糖尿病 3 个月组大鼠视网膜切片 bFGF 像。内核层阳性表达 免疫组织化学染色 $\times 400$ 图 4 对照组大鼠视网膜切片 VEGF mRNA 像。阴性对照未染核 原位杂交染色 $\times 400$

Fig. 1 Photograph of bFGF mRNA of retinal paraffin section of the rat in 3-month diabetes group. Positive expression in inner nuclear layer (black arrow). Situ hybridation. $\times 400$ Fig. 2 Photograph of bFGF of retinal paraffin section of the rat in 3-month-diabetes group. Positive expression in angio-dissepiation of inner nuclear layer (black arrow). Immunohistochemical staining. $\times 400$ Fig. 3 Photograph of bFGF of retinal slide of the rat in 3-month-diabetes group. Positive expression in inner nuclear layer. Immunohistochemical staining. $\times 400$ Fig. 4 Photograph of VEGF mRNA of retinal paraffin section of the rat in control group. Unstained nuclear of negative control. Situ hybridation. $\times 400$

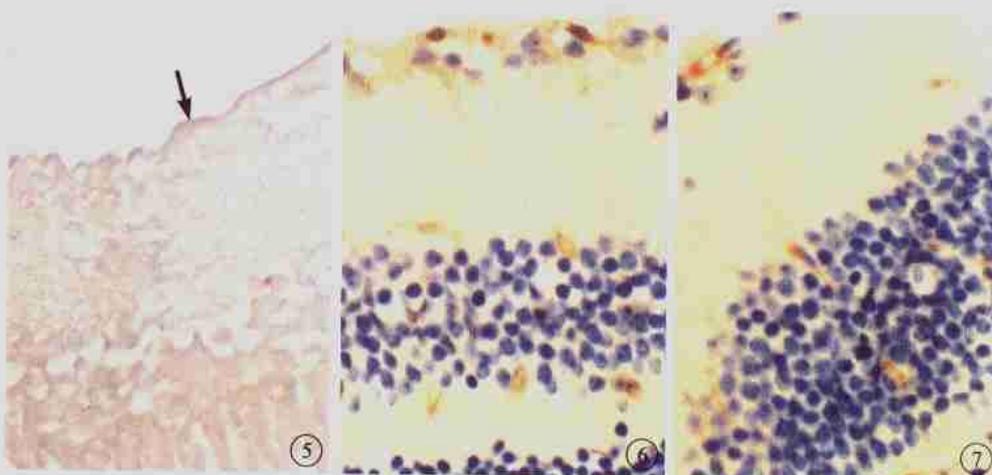


图 5 糖尿病 5 个月组大鼠视网膜切片 VEGF mRNA 像。内界膜阳性表达未染核 (黑箭) 原位杂交染色 $\times 400$ 图 6 糖尿病 5 个月组大鼠视网膜切片 bFGF 像。内核层及节细胞层血管壁阳性表达 免疫组织化学染色 $\times 400$ 图 7 糖尿病 5 个月组大鼠视网膜切片 VEGF 像。内核层及节细胞层血管壁阳性表达 免疫组织化学染色 $\times 400$

Fig. 5 Photograph of VEGF mRNA of retinal paraffin section of the rat in 5-month diabetes group. Unstained nuclear of positive expression in endothelial membrane (black arrow). Situ hybridation. $\times 400$ Fig. 6 Photograph of bFGF of retinal paraffin section of the rat in 5-month diabetes group. Positive expression of angio-dissepiation in endothelial membrane and ganglion cell layer. Immunohistochemical staining. $\times 400$ Fig. 7 Photograph of VEGF of retinal paraffin section of the rat in 5-month-diabetes group. Positive expression of angio-dissepiation in endothelial membrane and ganglion cell layer. Immunohistochemical staining. $\times 400$

察了包括视网膜血管在内的整个视网膜 VEGF 及 bFGF 的表达情况。结果显示,糖尿病 1 个月组 VEGF 及 bFGF 均无阳性表达;3 个月组 bFGF mRNA 及蛋白质均已表达,而 VEGF 除石蜡切片的蛋白质有 3 例表达外,其余均无阳性表达,且 VEGF 除血管外,在内核层还有细胞的阳性表达;5 个月组 VEGF mRNA 及蛋白质均有表达,同时 bFGF 的表达比 3 个月组增强。说明 bFGF 及 VEGF 的表达随病程延长而增强,但 bFGF 的表达与我们在 STZ 大鼠视网膜血管铺片上得到的结果^[2]相同,所不同的是在石蜡切片上,我们进一步证明了除视网膜血管外,视网膜尚有其它组织可以表达 VEGF,视网膜的内核层、色素上皮层、节细胞层、外核层也有表达,至于 VEGF 与 bFGF 的表达机理和作用,尚有待进一步的实验研究。有学者在体外实验中已经证明 VEGF 与 bFGF 对内皮细胞的促有丝分裂及趋化具有协同作用^[5],因此我们推测,尽管此时

尚无明显的新生血管出现,但 VEGF 及 bFGF 对内皮细胞促有丝分裂的协同作用,很可能是将来 DR 新生血管形成的先兆。

4 参考文献

- 1 山下英俊,户张巖生,沢充,トラソスフオーシソ増殖因子ベータ(TGF-β)スーパーファミリーの眼組織における作用。日眼会誌,1997,101:927-947.
- 2 宋鄂,董宇,隋东明,血管内皮细胞生长因子及碱性成纤维细胞生长因子与糖尿病大鼠视网膜早期血管病变的关系。中华医学杂志,2003,83:996-999.
- 3 Isacchi A, Bergonzoni L, Sarmientos P. Complete sequence of human receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. Nucleic Acids Res, 1990, 18:1096.
- 4 Paques M, Massin P, Gaudric A. Growth factors and diabetic retinopathy. Diabetes Metab, 1997, 23:125-130.
- 5 Hayashi A, Kim HC, de Juan E Jr. Alterations in protein tyrosine kinase pathways following retinal vein occlusion in the rat. Curr Eye Res, 1999, 18:231-239.

(收稿日期:2004-06-07)

(本文编辑:朱敏)

· 消息 ·

中华医学会眼科学分会眼底病学组第十一次全国眼底病学术讨论会征文通知

中华医学会眼科学分会眼底病学组第十一次全国眼底病学术讨论会定于 2005 年 4 月 24~27 日,在南京市举行。会议内容包括:视网膜、葡萄膜、视神经以及全身病的眼底病变等疾病的诊断及治疗;激光在眼底病的应用和玻璃体视网膜手术;眼底病基础结合临床以及实验研究工作的经验与进展;眼底病的影像、电生理和超声检查、实验室检查;疑难病案讨论。

应征论文要求 800 字左右,含“目的、方法、结果、结论”四要素的“结构式”摘要和全文各一份。摘要必须包括论文的主要数据、资料等实质信息;摘要的脚注项应包括第一作者的性别、年龄、职称、工作单位、邮政编码、详细的通讯地址、联系电话、Email 地址等内容。摘要用另纸书写或打印并请另附一张存有摘要和全文的、Word 格式的软盘。欢迎通过电子邮件投稿。凡已在公开刊物上发表的论文请勿投寄。征文截稿日期为 2005 年 2 月 28 日。论文经评选后另发开会通知。未入选者不予退稿,也不另发通知,请作者自留底稿。凡入选论文将编入《第十一次全国眼底病学术讨论会论文汇编》,并择优在《中华眼底病杂志》刊出。会议期间交流的论文将颁发论文证书。来稿请挂号邮寄四川省成都市国学巷 37 号;四川大学华西医院中华眼底病杂志编辑部收,邮政编码:610041,电话:028-85422535,传真:028-85577707,Email:cjoofd@mail.sc.cninfo.net 或 cjoofd@yahoo.com.cn。请勿寄给个人。来稿请在信封下角注明“会议征文”。

中华医学会眼科学分会眼底病学组

《中华眼底病杂志》2005 年征订通知

《中华眼底病杂志》是中华医学会系列杂志,由中国科学技术协会主管,中华医学会主办,四川大学华西医院承办。主要通过论著、论著摘要、病例报告、临床病例讨论、讲座、综述、国内外学术动态等形式全面反映我国眼科领域内视网膜、葡萄膜、玻璃体、视神经疾病以及与全身病相关的眼底病等专业领先科研成果和临床诊疗经验以及国外研究进展,以广大眼科医师为主要读者对象,为培养眼底病医学专业人才、促进我国眼底病医学的普及与提高、促进国内外眼底病学术交流服务。

本刊为双月刊,每期 64 页,大开本,全铜版纸印刷,彩色、黑白图片均随文编排。单月 25 日出版。邮发代号 62-73。定价:每期 10.00 元,全年 6 期 60.00 元。热忱欢迎广大读者在当地邮局订阅;未能在邮局订阅者,可直接汇款到编辑部订购,免收邮寄费。邮购汇款至:四川省成都市国学巷 37 号;中华眼底病杂志编辑部收,邮政编码:610041。请正楷写清楚订阅人的地址(省、市、县、街道号、邮政编码)和姓名,以免误寄。

编辑部电话:028-85422535,传真:028-85577707, Email:cjoofd@mail.sc.cninfo.net 或 cjoofd@yahoo.com.cn。

本刊编辑部