

## · 实验研究 ·

# 内皮抑素抑制氧致视网膜病变小鼠 新生血管形成的实验研究

张美霞 张军军 严密

**【摘要】 目的** 观察血管生成抑制因子内皮抑素(ES)对视网膜新生血管形成的抑制作用。 **方法** 将鼠龄为 7 d 的 32 只 C<sub>57</sub>BL/6J 小鼠随机分为给氧组(12 只)、ES 治疗组(12 只)和对照组(8 只)。将给氧组和 ES 治疗组小鼠置于浓度为(75±5)%高氧环境中生活 5 d, 然后回到正常氧环境中。ES 治疗组小鼠在出氧箱后 12、36 h, 一只眼玻璃体腔内注射 1 μg ES, 另一只眼注射 1 μl 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)作为对照。对照组小鼠生活在正常氧环境中。右旋糖苷-异硫氰酸荧光素(FITC-dextran)视网膜造影整装铺片了解视网膜新生血管改变;计数突破内界膜的内皮细胞数反映视网膜血管增生情况,观察 ES 对视网膜新生血管形成的抑制作用。 **结果** 与给氧组相比,ES 治疗组视网膜铺片见视网膜血管分支走行正常,未见明显的无灌注区;ES 治疗组平均每个视网膜切面可见突破内界膜的细胞核数减少,为(5.39±1.52)个,与给氧组[(22.56±2.13)个]比较,差异有统计学意义( $P<0.001$ )。 **结论** ES 可有效抑制视网膜新生血管的形成,有望成为治疗血管增生性视网膜病变的新途径。

**【关键词】** 视网膜新生血管化; 疾病模型,动物; 血管生成抑制剂

中图分类号:R774.13 R446

**Inhibitory effects of endostatin on oxygen-induced retinal neovascularization in rats with retinopathy**  
ZHANG Mei-xia, ZHANG Jun-jun, YAN Mi. Department of Ophthalmology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: ZHANG Jun-jun. Email: zhangjunjun@hotmail.com.cn

**【Abstract】 Objective** To observe the inhibitory effect of endostatin (ES) on oxygen-induced retinal neovascularization. **Methods** Thirty-four 7-day-old C<sub>57</sub>BL/6J mice were randomly divided into 3 groups: oxygen-exposed group (12 mice), ES group (12 mice) and the control group (8 mice). The mice in oxygen-exposed and ES group were exposed to (75±5)% oxygen for 5 days and then back to the normal air. In ES group, 1 μg ES endostatin were injected into vitreous in one eye, while PBS was injected into the other eye as the control 12 and 36 hours after being exposed to oxygen. The mice in the control group were fed in normal circumstance. The changes of retinal neovascularization was examined by fluorescence angiography with fluorescein isothiocyanate-dextran. The number of endothelial cells breaking through the internal limiting membrane (ILM) was counted and the inhibitory effects of ES on retinal neovascularization was observed. **Results** Compared with the oxygen-exposed group, the branches of retinal vessels went normal without any un-perfused area in ES group. The number of nuclei of endothelial cells breaking through ILM on each retinal cross-section decreased to (5.39±1.52), which differed much from that in the oxygen-exposed group (22.56±2.13) ( $P<0.001$ ). **Conclusion** ES can effectively inhibit the formation of retinal neovascularization in rats and might be a new path of the treatment for proliferative retinopathy.

**【Key words】** Retinal neovascularization; Disease models, animal; Angiogenesis inhibitor

视网膜新生血管的形成是多步骤、多阶段的复杂过程,它是视网膜缺氧、缺血产生各种新生血管刺激因子为基础的<sup>[1,2]</sup>。近年来,抗新生血管疗法倍受关注,但是由于其确切的作用机制尚不明了以及副作用较大等因素限制了进一步的临床应用。内皮抑素(ES)是 O'Reilly 等<sup>[3]</sup>在 1997 年从鼠血管内皮细胞瘤

(EOMA)中分离和提纯出来的一种多肽,具有长期大量使用不产生耐药性、无明显的毒副作用等特点,是迄今抗血管疗法中最具潜力的药物性蛋白。当前 ES 抑制新生血管的研究主要局限在抗肿瘤方面。而将其应用于视网膜新生血管的治疗研究报道较少。我们通过高氧后相对缺氧的方法诱发视网膜新生血管的产生,应用 ES 行玻璃体腔内注射,应用血管造影视网膜铺片和视网膜切片计数突破内界膜的细胞数来检测 ES

对视网膜新生血管的抑制作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型的制作

将四川大学华西医学中心动物中心提供的新生 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠 32 只随机分为 ES 治疗组 (12 只)、给氧组 (12 只) 和对照组 (8 只)。给氧组小鼠于生后 7 d 与同笼的 2 只母鼠一起进入有机玻璃制作的密闭氧箱, 氧箱盖上有 3 个孔, 一孔接氧气, 一孔接测氧仪 (上海嘉定学联仪表厂产品), 一孔为通气孔。氧箱内接入 100% 医用湿润氧气, 流量控制在 0.2~0.5 L/min, 维持氧箱内氧气浓度为 (75±5)%, 每隔 6 h 测一次氧浓度, 隔日打开氧箱换水、加饲料, 5 d 后回到正常环境中, 建立视网膜新生血管动物模型<sup>[1]</sup>。ES 治疗组小鼠处理同给氧组, 分别在出氧箱后 12、36 h, 一只眼玻璃体腔内注射 ES 1  $\mu$ l (1  $\mu$ g/ $\mu$ l), 另一只眼注射 PBS 1  $\mu$ l。对照组 8 只小鼠生活在正常氧环境中。

### 1.2 视网膜血管造影及整装铺片

3 组 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠中, 任选 2 只于出生后 17 d 行右旋糖苷-异硫氰酸荧光素 (FITC-dextran) 视网膜血管造影及整装铺片。3 组小鼠中任选 2 只, 将 3% 戊巴比妥钠按 15~20 mg/kg 的剂量腹腔内麻醉小鼠, 打开胸腔, 用 30 号注射针头将 1 ml PBS (含 50 mg FITC-dextran) 注入左心室, 观察小鼠的口、鼻、耳廓变黄为灌注成功。然后将小鼠眼球摘除, 标记方向, 4% 多聚甲醛中固定 1~2 h。手术显微镜下铺片。

### 1.3 增生性视网膜病变新生血管的计数

3 组小鼠于生后 17 d 均用 3% 戊巴比妥钠按 15~

20 mg/kg 的剂量腹腔内注射麻醉后处死。摘除眼球, 标记方向, 4% 甲醛固定 48 h, 常规脱水, 石蜡包埋, 矢状面平行视神经连续 6  $\mu$ m 切片。去除含有视神经的切片, 每个标本两个切片行常规苏木精-伊红 (HE) 染色。显微镜下计数突出视网膜内界膜的细胞核数。

### 1.4 统计学分析

HE 切片内皮细胞核数以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS10.0 软件行 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 视网膜血管造影及铺片结果

正常对照组小鼠视网膜有深浅两层血管网, 从视神经周围发出走向视网膜周边, 浅层血管呈放射状分布, 深层血管呈网状分布, 血管逐级分支, 和人类视网膜血管走行相似; 大血管在走行过程中分出小的侧支, 走行与大血管接近垂直, 靠近周边部处大血管分支为弓形血管, 在此基础上又发出侧支 (图 1)。给氧组小鼠视网膜血管迂曲扩张, 分支减少, 近视盘周围形成无灌注区, 周边毛细血管相互交织成交通支, 在闭塞区与非闭塞区之间形成新生血管, 渗漏荧光素 (图 2)。ES 治疗组有 3 只眼发生玻璃体积血, PBS 玻璃体腔注射眼中有 2 只眼发生玻璃体积血; 视网膜铺片见视网膜血管分支走行正常, 未见明显的无灌注区 (图 3)。

### 2.2 氧致视网膜病变新生血管计数

正常对照组偶见突破内界膜的血管内皮细胞 (图 4), 平均数为 1.11±1.43; 给氧组可见突破内界膜的血管内皮细胞 (图 5), 平均数为 22.56±2.13, 与正常

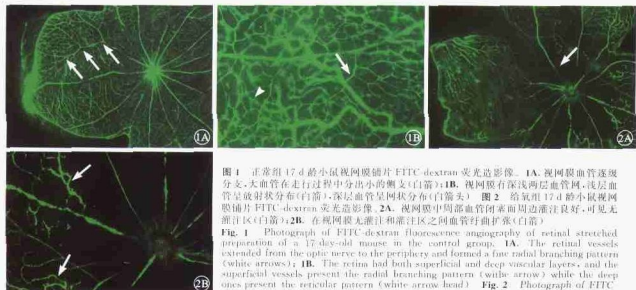


图 1 正常组 17 d 龄小鼠视网膜铺片 FITC-dextran 荧光造影像。1A. 视网膜血管逐级分支, 大血管在走行过程中分出小的侧支 (白箭); 1B. 视网膜有深浅两层血管网, 浅层血管呈放射状分布 (白箭), 深层血管呈网状分布 (白箭头) 图 2 给氧组 17 d 龄小鼠视网膜铺片 FITC-dextran 荧光造影像。2A. 视网膜中周边血管回索而周边灌注良好, 可见无灌注区 (白箭); 2B. 在视网膜无灌注和灌注区之间血管行曲扩张 (白箭)

Fig. 1 Photograph of FITC-dextran fluorescence angiography of retinal stretched preparation of a 17-day-old mouse in the control group. 1A. The retinal vessels extended from the optic nerve to the periphery and formed a fine radial branching pattern (white arrows); 1B. The retina had both superficial and deep vascular layers, and the superficial vessels present the radial branching pattern (white arrow) while the deep ones present the reticular pattern (white arrow head) Fig. 2 Photograph of FITC-dextran fluorescence angiography of retinal stretched preparation of a 17-day-old mouse in oxygen exposed group. 2A. Occluded central retinal vessels and well-perfused peripheral vessels with hypoperfused area (white arrow); 2B. Tortuous and dilated vessels between the hypoperfused and perfused area (white arrow).

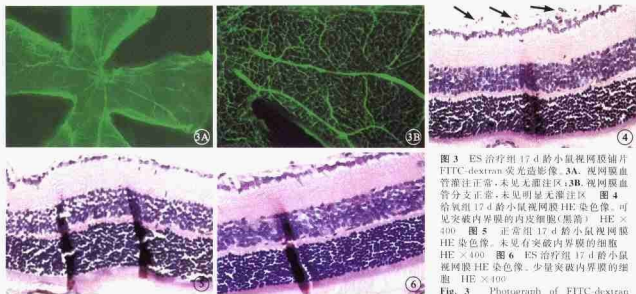


图 3 ES 治疗组 17 d 龄小鼠视网膜铺开 FITC-dextran 荧光造影像。3A. 视网膜血管灌注正常, 未见明显无灌注区。3B. 视网膜血管分支正常, 未见明显无灌注区。图 4 给氧组 17 d 龄小鼠视网膜 HE 染色像。可见突破内界膜的内皮细胞(黑箭)。HE  $\times 400$ 。图 5 正常组 17 d 龄小鼠视网膜 HE 染色像。未见有突破内界膜的细胞。HE  $\times 400$ 。图 6 ES 治疗组 17 d 龄小鼠视网膜 HE 染色像。少量突破内界膜的细胞。HE  $\times 400$ 。

Fig. 3 Photograph of FITC dextran fluorescence angiography of retinal. 3A. Normal perfusion of retinal vessels without hypoperfused area. 3B. Normal branches of retinal vessels without hypoperfused area. 4. Photograph of HE staining of the retina of a 17 day-old mouse in oxygen-exposed group. Endothelial cells breaking through internal limiting membrane (black arrow). HE  $\times 400$ . 5. Photograph of HE staining of the retina of a 17 day-old mouse in control group. No cells breaking through internal limiting membrane. HE  $\times 400$ . 6. Photograph of HE staining of the retina of a 17 day-old mouse in ES group. A few cells breaking through internal limiting membrane. HE  $\times 400$ .

stretched preparation of a 17-day-old mouse in ES group. 3A. Normal perfusion of retinal vessels without hypoperfused area. Fig. 4. Photograph of HE staining of the retina of a 17 day-old mouse in oxygen-exposed group. Endothelial cells breaking through internal limiting membrane (black arrow). HE  $\times 400$ . Fig. 5. Photograph of HE staining of the retina of a 17 day-old mouse in control group. No cells breaking through internal limiting membrane. HE  $\times 400$ . Fig. 6. Photograph of HE staining of the retina of a 17 day-old mouse in ES group. A few cells breaking through internal limiting membrane. HE  $\times 400$ .

对照组相比较, 差异有统计学意义 ( $t = -10.219, P < 0.001$ ); ES 治疗组鼠眼平均每个视网膜切面可见突破内界膜的內皮细胞核数减少(图 6), 平均数为  $5.39 \pm 1.52$ , 与给氧组比较, 差异有统计学意义 ( $t = 109.015, P < 0.001$ )。

### 3 讨论

ES 是目前最为瞩目的已鉴定出的血管生成直接抑制药物。作为一种内源性的血管抑制因子, 在体内、体外的实验中显示出特异性抑制血管內皮细胞的增殖、迁移, 有抑制新生血管生成的作用, 为一种理想的抗血管生成药物, 并可重复给药无耐药性, 当前研究热点主要为抗肿瘤新生血管的生成, 为了观察其对视网膜新生血管是否也有同样的抑制作用, 我们采用高浓度氧诱导 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠建立氧致血管增生性视网膜病变的动物模型, 或玻璃体内注射一定剂量的 ES 后观察其对视网膜新生血管生成的影响。结果表明: 给氧组中 C<sub>57</sub>BL/6 小鼠视网膜铺开片显示视网膜血管纤曲扩张, 分支减少, 近视盘周围形成无灌注区, 周边毛细血管相互交织成交通支, 在闭塞区与非闭塞区之间形成新生血管; 另外血管內皮细胞核计数显示给氧组小鼠视网膜新生血管內皮细胞核计数明显高于正常对照组, 说明动物模型建立成功。ES 治疗组小鼠视网膜铺开片中未见明显的无灌注区及新生血管形成, 血管形态基本正常, 血管內皮细胞计数显示突破内界膜的血管

內皮细胞明显减少, 与给氧组相比差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。说明 ES 能在体内有效抑制视网膜新生血管的产生。

ES 抑制新生血管生成的确切作用机制目前不甚明了, 由于其可特异性抑制血管內皮细胞的增殖, 对非內皮细胞如牛动脉肌细胞、成纤维细胞及肿瘤细胞均无抑制增殖活性作用<sup>[2]</sup>; 可能由于血管內皮细胞将 ES 内吞后, 使接头蛋白 Shb 磷酸化, 形成一种相对分子质量为  $125 \times 10^3$  的具有酪氨酸激酶活性的复合物, 引起血管內皮细胞 G<sub>1</sub> 期阻滞、凋亡, 抑制新生血管的形成<sup>[4]</sup>。另有研究认为 ES 可以与金属蛋白酶前体蛋白形成稳定的复合物, 阻止基质金属蛋白酶的激活, 从而抑制新生血管生成<sup>[5]</sup>。ES 可诱导血管內皮细胞产生凋亡, 以抑制细胞的生长<sup>[6]</sup>。但也有研究表明, 未见有细胞凋亡的出现, 其抑制作用是通过下调內皮细胞生长相关基因, 如 c-fos, max, AT1-R 等, 下调与细胞结构稳定相关基因, 如  $\alpha$ - $\beta$  微管蛋白, 下调与细胞迁移、增生有关基因, 如内皮素-1 (endothelin-1), 内皮素受体 B (ETB R)、整合素  $\alpha$ v、整合素  $\beta$ 3、c-myc 等, 从而抑制內皮细胞生长、增殖、迁移及血管化<sup>[7]</sup>。

O'Reilly 等<sup>[8]</sup>应用 ES 对鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 在体血管生成模型进行实验, 结果表明, ES 可抑制在体血管生成, 而静止的血管组织正常功能则不受干扰, 说明 ES 应用于临床有可能对女性生殖周期变化过程有一定影响, 对实体肿瘤和良性血管瘤将有明显的治

疗效果,且很少有毒副作用产生<sup>[3,8]</sup>。在本实验中,我们观察到 ES 治疗组视网膜切片中未见有炎症反应和细胞毒性反应,并且正常视网膜血管的生成未受影响,说明 ES 玻璃体腔内注射抑制视网膜新生血管的生成可能是安全有效的,为将来的临床实验提供了依据。

#### 4 参考文献

- 1 Aiello LP. Vascular endothelial growth factor: 20th-century mechanisms, 21-century therapies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38:1647-1652.
- 2 Miller JW. Vascular endothelial growth factor and ocular neovascularization. *Am J Ophthalmol*, 1997, 151:13-23.
- 3 O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*,

1997, 88:277-285.

- 4 Dexellus J, Larsson H, Sasaki T, et al. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood*, 2000, 95:3403-3411.
- 5 Kim YM, Jang JW, Lee OH, et al. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Res*, 2000, 60:5410-5413.
- 6 Dhanabal M, Ramchandran R, Wateman MJ, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem*, 1999, 274:11721-11726.
- 7 Shichiri M, Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin. *FASEB J*, 2001, 15:1044-1053.
- 8 Dhanabal M, Volk R, Ramchandran R, et al. Cloning, expression, and in vivo activity of human endostatin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 258:345-352.

(收稿日期:2004-04-05)

(本文编辑:朱敏)

## 读者·作者·编者

### 本刊对图表的要求

凡用文字能表达的内容,尽量不用图和表。表和图的设计应科学、简洁、自明。表格请排写于相应正文段落之后,插图集中附于文后;图表均分别按其正文中出现的先后次序连续编码,每幅图表应冠有图(表)题。说明性的资料应置于图(表)下方注释中,并在注释中标明图表中使用的全部非公知公用的缩写。本刊采用三横线表(顶线、表头线、底线),如遇有合计或统计学处理(如 $t$ 值、 $P$ 值等),则在这行上面加一条分界横线;表内数据要求同一指标有效位数一致,一般按标准差的 $1/3$ 确定有效位数。线条图稿用绘图墨水在绘图纸上绘制,高度比例约为 $5:8$ 左右。以计算机制图者应提供激光打印图样。图题、图说明文字均用中、英文对照书写。

黑白照片必须清晰度和对比度良好,层次分明,彩色照片要求色彩鲜明,图像清晰。图片或照片大小要基本一致。图不宜过大,最大宽度半栏图不超过 $7.5\text{ cm}$ ,通栏图不超过 $17.0\text{ cm}$ ,高与宽的比例应掌握在 $5:7$ 左右。必须另外用纸将说明写好,不要粘贴,背面用铅笔注明作者姓名、图序号,并标明上、下方向,照片中需说明的部位请按印刷制版要求规范制作箭头或注字并加解释,图片和照片不能折损。若刊用人像,应征得本人的书面同意,或遮盖其能辨认出系何人的部分。大体标本照片在图内应有尺度标记。病理照片要求注明染色方法和放大倍数。图表中如有引自它刊者,应注明出处。

本刊编辑部

### 本刊对文稿中关键词标引的要求

每篇论文需标引 $2\sim 5$ 个关键词,请尽量使用美国国立医学图书馆编辑的最新版《Index Medicus》中医学主题词表(MeSH)内所列的词。如果最新版 MeSH 表中尚无相应的词,处理办法:(1)可选用直接相关的几个主题词进行组配;(2)可根据树状结构表选用最直接的上位主题词;(3)必要时,可采用习用的自由词并列于最后。关键词中的缩写词应按 MeSH 表还原为全称,如“HBsAg”应标引为“乙型肝炎表面抗原”。每个英文关键词第一个字母大写,各词汇之间分号“;”分隔。

本刊编辑部

### 关于收集本刊发表论文获奖证明的通知

本刊常年收集所刊发论文及论文课题的获奖信息。内容包括:①文题;②第一作者姓名、单位、邮政编码;③论文所在的年、卷、期、页;④获奖级别(国家级、部级、军级、省级、其他);⑤获奖性质(发明奖、科技进步奖、科技成果奖);⑥获奖等级;⑦获奖时间;⑧成果推广及社会效益简况。获奖证明请加盖单位公章并附获奖证书复印件(一文一份)。来信请寄:四川省成都市国学巷 37 号中华眼底病杂志编辑部,邮政编码:610041。

本刊编辑部