

轴突导向因子-1 mRNA 在氧诱导血管增生性视网膜病变中的表达

熊思齐 夏晓波 蒋 剑 孙 伟

Expression of netrin-1 mRNA in retina with experimental retinal neovascularization induced by oxygen

Xiong Siqi, Xia Xiaobo, Jiang Jian, Sun Wei. Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Abstract Objective It has been well-known that retinal neovascularization is associated to multiple factors. However, recent research showed that netrin-1 mRNA can promote the neovascularization. This study was to evaluate the expression of netrin-1 mRNA in retina in experimental retinal neovascularization induced by oxygen. **Methods** Fifty one-week-old C57BL/6J mice were divided into control group and hyperoxic group. The mice of hyperoxic group were exposed to 75% oxygen for 5 days and then returned to the room air to induce retinal neovascularization, and the mice in control group were raised in the environment of room air for the same time. The morphological observation of retinal neovascularization was performed using angiography by fluorescein dextran injection under the fluorescence microscope, and the new blood vessels were quantified after 5 days in room air (17-day-old) by counting the vascular epithelial cell nuclei protruding into vitreous cavity using HE stain. RT-PCR were used to examine retinal netrin-1 mRNA level in postnatal day 12, 14 and 17 respectively. **Results** A lots of new blood vessels were seen surrounding the optic disk with irregular distribution and large area of non-perfused area and fluorescein leakage in the mouse retina in hyperoxic group. However, in the normal mouse retina, retinal blood vessels showed the network distribution under the fluorescence microscope. The neovascular nuclei protruding into vitreous cavity was 17.2 ± 2.6 in hyperoxic group, and no similar neovascular nuclei was found in control group. No significant difference was found in retinal netrin-1 mRNA level in postnatal 12 days between hyperoxic group and control group but was significantly higher in postnatal 14-day mice and 17-day mice compared with control mice ($t = 8.61, P = 0.008; t = 7.12, P = 0.009$). **Conclusion** Netrin-1 mRNA level increases in hypoxia murine retina, which may play an important role in inducing retinal neovascularization.

Key words neovascularization; retina; netrin-1

摘要 目的 研究高氧诱导的视网膜新生血管模型鼠中轴突导向因子-1 (Netrin-1) mRNA 的表达差异。 **方法** 采用高氧诱导的方法制作鼠视网膜新生血管模型; 运用荧光造影视网膜铺片及视网膜切片苏木精-伊红染色观察视网膜新生血管的形态。于出生后第 12、14、17 d 取小鼠视网膜, 采用 RT-PCR 测定 Netrin-1 mRNA 的表达水平。 **结果** 模型组视网膜铺片及组织切片可见大量视网膜新生血管形成。出生后 12 d, 模型组与正常组视网膜组织中 Netrin-1 mRNA 表达水平无明显差异; 出生后 14 d, 模型组视网膜组织中 Netrin-1 mRNA 表达水平明显上调; 出生后 17 d 模型组视网膜组织中 Netrin-1 mRNA 表达水平仍高于正常组。 **结论** 模型鼠视网膜新生血管发生过程中, 持续缺氧的视网膜组织可能从转录水平增加 Netrin-1 的表达, 从而诱导视网膜新生血管的发生。

关键词 新生血管; 视网膜; 轴突导向因子-1

分类号 R 774 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)02-0105-04

缺血性视网膜疾病如增生型糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR)、视网膜中央静脉阻塞等血管阻塞性疾病、早产儿视网膜病变等是常见的致盲性眼病, 视网膜新生血管的形成是其严重并

本课题为教育部博士点基金(20070533018)、湖南省自然科学基金(07jj3068)资助

作者单位: 410008 长沙, 中南大学湘雅医院眼科

通讯作者: 夏晓波 (Email: Xbxia@yahoo.com)

发病。视网膜新生血管的形成是多种细胞因子^[1]、黏附分子^[2]、蛋白酶^[3]等相互作用的结果。最新研究发现轴突导向因子 Netrin-1 具有促血管生成作用^[4]。但是 Netrin-1 在视网膜新生血管形成中的作用尚不清楚。我们建立高氧诱导的鼠视网膜新生血管模型,检测模型鼠视网膜新生血管发生过程中 Netrin-1 mRNA 表达水平的变化,探讨 Netrin-1 mRNA 表达的变化与视网膜新生血管形成的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

SFP 级健康 C57BL/6J 小鼠(中南大学动物实验中心提供);右旋糖苷异硫氰酸荧光素(FITC-dextran)(美国 Sigma 公司);Trizol 裂解液及微量总 RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司);反转录及 cDNA 合成试剂盒(美国 Fermentas Life Science 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 高氧诱导的视网膜新生血管小鼠模型的建立

SFP 级新生 C57BL/6J 小鼠(50 只)。采用随机数字表法将 50 只小鼠分为模型组(25 只)和正常对照组(25 只)。参照 Smith 的方法建立小鼠缺氧诱导的视网膜新生血管动物模型^[1]。出生后第 7 d 的 C57BL/6J 小鼠与母鼠一起置于氧浓度为(75 ± 2)% 的氧箱中 5 d,于出生后第 12 d 回到正常环境中诱导视网膜新生血管模型。

1.2.2 荧光素心脏灌注射视网膜铺片

出生后第 17 d 的正常组小鼠(5 只)及模型鼠(5 只)腹腔内注射麻醉剂 1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)后,打开胸腔,抽取配置 FITC-Dextran(50 mg:1 mL 4% 多聚甲醛)0.5 mL,用 1 mL 注射器灌注左心室后,迅速摘除眼球,显微镜下视网膜铺片,荧光显微镜下观察视网膜血管结构。

1.2.3 视网膜新生血管内皮细胞核计数

过量麻醉处死出生后第 17 d 的正常组小鼠(5 只)及模型鼠(5 只)后,摘除眼球并固定、脱水、浸蜡包埋,通过角膜平行视神经做眼球矢状位系列切片(6 μm),含视神经的切片除外。显微镜下计数突破内界膜的血管内皮数,每只眼随机抽取 5 张切片(每隔 60 μm 取 1 张),取平均内皮细胞数用于统计分析。

1.2.4 RT-PCR 检测 Netrin-1 mRNA 表达水平

提取出生后第 12、14、17 d 正常组小

鼠(共 15 只)及模型鼠(共 15 只)视网膜总 RNA,采用 RT-PCR 检测视网膜组织中 Netrin-1 mRNA 的表达水平。(1)视网膜总 RNA 提取:根据 Trizol 总 RNA 提取说明书提取视网膜总 RNA。(2)逆转录反应:cDNA 第一链的合成按照 RevertAid™ cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行。产物放入 -20 °C 备用。(3)聚合酶链反应:Netrin-1 引物序列:上游 5'-GCCTTCCTCACCGACCTCA-3',下游 5'-GCCTCCTGCTCGTTCTGTT-3';β-actin 引物序列:上游 5'-CGTTGACATCCGTAAGAC-3',下游 5'-TGGAAGGTGGACAGTGAG-3';反应条件:94 °C 预变性 5 min,然后 94 °C 30 s,55 °C 40 s,72 °C 45 s,共 36 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳,同时以 DNA marker 为分子量标准。凝胶成像系统观察并照相。使用 Gel analyzer 软件测定各泳道扩增产物的灰度值。结果以 Netrin-1 与内参照 β-actin mRNA 扩增产物的灰度相对比值表示。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计学软件对数据进行分析。两组间视网膜中 Netrin-1 mRNA 表达水平的比较采用独立样本的 t 检验,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光素心脏血管造影视网膜铺片观察视网膜血管形态

正常出生第 17 d 小鼠视网膜铺片可见整个视网

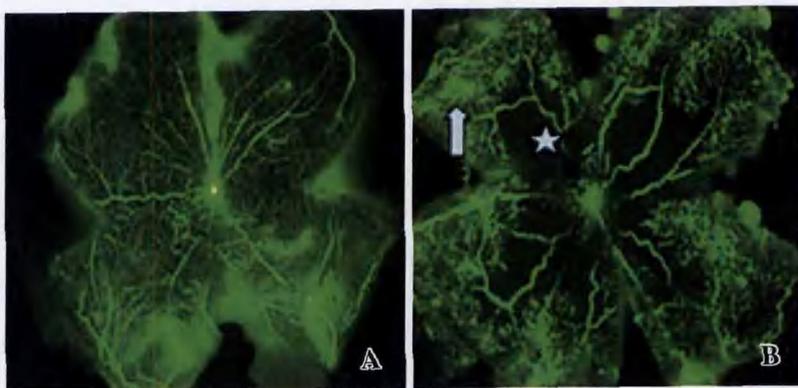


图 1 荧光造影视网膜铺片观察视网膜血管形态 A:正常组视网膜铺片显示视网膜血管分布呈均匀的网状结构 B:模型组视盘周边见大片无灌注区(星号),视网膜大血管不规则扩张,走行迂曲,无灌注区周围可见大量新生血管丛,伴明显荧光渗漏(箭头)

Fig. 1 Angiographic analysis of retinal vascular structure A: The mice retinas under the room air-raised condition The vessels of normal mice form a fine radial branching pattern in the superficial retinal layer and a polygonal reticular pattern in deep retinal layer without neovascular tufts B: The murine model of retinal neovascularization Neovascular tufts appear as hyperfluorescence at the junction between perfused and non-perfused area (star) with dilation and tortuosity of radial vessels (arrow)

膜血管分布呈均匀的网状结构,视盘中央发出的血管规则地呈放射状向周边部走行,视网膜血管间的毛细血管交织成网状。模型组鼠视盘周围毛细血管闭塞,可见大片无灌注区。视网膜大血管不规则扩张,走行迂曲。中周部正常毛细血管网消失,血管密度增高且分布紊乱,可见新生血管丛和荧光渗漏(图 1)。

2.2 突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核计数

正常组中未见明显突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核;而模型组均可见突出内界膜的血管内皮细胞核,发生率为 100%。模型组突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核均数为 17.2 ± 2.6 (图 2)。

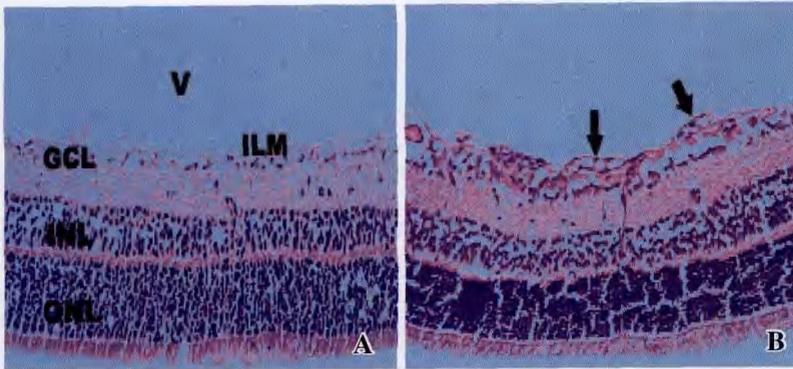


图 2 组织切片观察突破内界膜的新生血管内皮细胞核 A:正常组未见明显突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核 B:模型组可见大量突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核 V:玻璃体腔 GCL:神经节细胞层 INL:内核层 ONL:外核层
Fig.2 Histologic analysis of neovascular cell nuclei protruding into vitreous cavity A: Room air-raised mice No cellular nuclei protruding into the inter limiting membrane is seen in the eyes of control normoxic mice B: Murine model of oxygen induced retinopathy A large number of neovascular nuclei protruding into vitreous cavity are seen in model mice V: vitreous cavity GCL: ganglion cell layer INL: inter nuclei layer OUL: outer nuclei layer

2.3 RT-PCR 检测视网膜中 Netrin-1 mRNA 表达水平

提取出生后第 12、14、17 d 正常组小鼠及模型鼠视网膜总 RNA,采用 RT-PCR 方法半定量测定 Netrin-1 mRNA 的表达水平。结果如图 3 所示:Netrin-1 mRNA 扩增产物大小为 287 bp,β-actin 扩增产物大小 201 bp。出生后第 12 d 时,刚出氧舱的模型鼠视网膜组织中 Netrin-1 mRNA 表达水平与正常对照鼠差异无统计学意义($t = 1.07, P = 0.119$)。出生后第 14 d 时,模型鼠视网膜组织中 Netrin-1 mRNA 表达水平较对照

鼠明显上调,两者间差异有统计学意义($t = 8.61, P = 0.008$)。出生后第 17 d 时,出氧舱后 5 d 的模型鼠此时视网膜新生血管形成数目最多,模型鼠视网膜组织中 Netrin-1 mRNA 表达水平仍高于对照鼠($t = 7.12, P = 0.009$),但较出生后第 14 d 时 Netrin-1 mRNA 表达水平已有所下降。

3 讨论

Netrins 是一类在神经系统发育过程中具有神经细胞轴突导向和细胞迁移诱导作用的分泌型蛋白^[4-6]。最近的研究表明 Netrins 家族中的 Netrin-1 分子是一种重要的促血管生成物质^[7-8]。对体外培养的血管内皮细胞及血管平滑肌细胞研究发现:Netrin-1 不仅对血管内皮细胞及血管平滑肌细胞具有趋化作用,同时还是这两种细胞的有丝分裂原,Netrin-1 能促进体外培养的人主动脉内皮细胞、人微血管内皮细胞和血管平滑肌细胞迁移和增生^[9]。进一步的活体实验证明:外源性 Netrin-1 能直接诱导新生血管的发生^[10]。鸡胚绒毛尿囊膜实验中,Netrin-1 能明显增加胚绒毛尿囊膜新生血管的发生;另外,结扎大鼠髂动脉引起其下肢缺血,通过局部注射 Netrin-1 能明显增加下肢缺血区的灌注,组织学研究表明,缺血区血流灌注的增加是由于 Netrin-1 诱导产生了大量的新生血管^[11]。值得一提的是,Netrin-1 诱导胚绒毛尿囊膜及鼠缺血下肢血管新生的能力与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)相当。外源性 Netrin-1 同样能诱导眼部新生血管的发生,将含有 Netrin-1 或

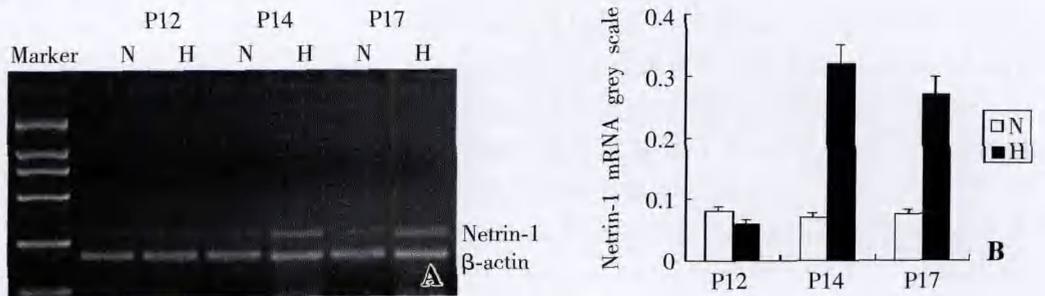


图 3 RT-PCR 检测视网膜中 netrin-1 mRNA 表达水平 A:小鼠出生后第 12 d(P12)、14 d(P14)、17 d(P17)正常鼠及模型鼠视网膜组织中 netrin-1 mRNA 的表达水平 B:图 A 各泳道中 netrin-1 与内参照 β-actin mRNA 扩增产物的灰度的对比值 N:正常鼠 H:模型鼠
Fig.3 RT-PCR analysis of netrin-1 mRNA expression in retina A: The expression of netrin-1 mRNA in retina in postnatal day 12,14 and 17 respectively B: Relative netrin-1 mRNA quantification related to β-actin mRNA N: normoxia H: hypoxia

VEGF 的缓释颗粒植入距角膜缘 1 mm 的角膜层间,发现由缓释颗粒释放的 Netrin-1 能诱导角膜新生血管的发生,且其诱导角膜新生血管的能力与 VEGF 相当^[12]。由此可见,外源性 Netrin-1 能够通过促进内皮细胞的增生与迁移,直接诱导新生血管的形成,或者在缺血、缺氧等病理刺激下与内源性促血管生成因子如 VEGF 等相互协同来加速新生血管的发生。基于此我们采用高氧诱导的视网膜新生血管模型鼠来研究内源性的 Netrin-1 对视网膜新生血管形成的调控作用。

高氧诱导的视网膜新生血管小鼠模型是 1994 年由 Smith 等^[13] 提供的一种完善的建立视网膜新生血管动物模型的方法。此模型方法简便易行,重复性好,新生血管的发生率为 100%, 目前已经成为研究视网膜新生血管最常用的动物模型之一。高氧诱导的视网膜新生血管模型是利用出生后第 7 d 的小鼠视网膜血管尚未发育成熟,持续 5 d 的高氧后,由于机体对高氧的保护性反应,视网膜血管普遍收缩,继而视网膜血管网广泛闭塞,移入正常空气中后,闭塞的血管不能适应视网膜组织对氧的需求,视网膜内层组织出现持续的缺血、缺氧,位于视网膜内层的视网膜神经节细胞及内核层视网膜细胞在缺血、缺氧等病理刺激下合成并释放多种促血管生成物质^[14], 如 VEGF^[15]、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)^[16] 等,从而促进视网膜新生血管的形成。本研究结果表明新生鼠出生 12 d 时,模型鼠视网膜组织中 Netrin-1 mRNA 表达水平与正常对照鼠比较差异无统计学意义。新生鼠出生 14 d 时,出氧舱后 2 d 的模型组鼠视网膜组织中 Netrin-1 mRNA 表达水平较对照组明显上调。新生鼠出生 17 d 时,出氧舱后 5 d 的模型鼠此时视网膜新生血管形成数目最多,模型鼠视网膜组织中 Netrin-1 mRNA 表达水平仍高于对照鼠,但较出生 14 d 时 Netrin-1 mRNA 表达水平已有所下降。我们推断模型鼠视网膜新生血管发生过程中,持续缺氧的视网膜组织可能从转录水平增加 Netrin-1 的表达,从而诱导视网膜新生血管的发生。

综上所述,模型鼠视网膜新生血管发生过程中,视网膜组织通过增加 Netrin-1 的转录从而上调 Netrin-1 mRNA 表达水平。但是视网膜新生血管的形成过程中 Netrin-1 蛋白的表达变化趋势是否与 mRNA 变化趋

势相一致,缺血、缺氧的视网膜组织是通过何种途径来增加 Netrin-1 的转录以及 Netrin-1 是通过哪种受体及信号途径来促进视网膜新生血管形成,仍有待于进一步的研究。

参考文献

- 1 Smith PM, Mandriota SJ, Vassalli JD, et al. Angiogenesis is regulating cytokines: activities and interactions [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996, 213: 31 - 67
- 2 Noel A, Maillard C, Rocks N, et al. Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis [J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57: 577 - 584
- 3 Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis [J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9: 267 - 285
- 4 Wilson BD, Li M, Park KW, et al. Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis [J]. *Science*, 2006, 313: 640 - 644
- 5 Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, et al. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system [J]. *Cell*, 1996, 87: 1001 - 1014
- 6 Yin Y, Sanes JR, Miner JH. Identification and expression of mouse netrin-4 [J]. *Mech Dev*, 2000, 96: 115 - 119
- 7 Barallobre MJ, Pascual M, Del Rio JA, et al. The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005, 49: 22 - 47
- 8 Eichmann A, Makinen T, Alitalo K. Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation [J]. *Genes Dev*, 2005, 19: 1013 - 1021
- 9 Freitas C, Larrivée B, Eichmann A. Netrins and UNC5 receptors in angiogenesis [J]. 2008, 11: 23 - 29
- 10 Nguyen A, Cai H. Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 6530 - 6535
- 11 Fan Y, Shen F, Chen Y, et al. Overexpression of Netrin-1 induces neovascularization in the adult mouse brain [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28: 1543-1551
- 12 Park KW, Crouse D, Lee M, et al. The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 16210 - 16215
- 13 Smith LEH, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35: 101 - 111
- 14 Ozaki H, Yu AY, Della N, et al. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40: 182 - 189
- 15 Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders [J]. *N Engl J Med*, 1994, 331: 1480 - 1487
- 16 Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, et al. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353: 782 - 792

(收稿:2008-05-11 修回:2008-11-26)

(本文编辑:胡纯钢 刘 艳)

本刊关于网上投稿的启事

本刊已实行网上审稿、网上退修等,欢迎广大作者从网上投稿。单位介绍信和图片仍请邮寄。没有条件上网的作者投稿时请附光盘。本刊电子信箱:ykyjzz@yahoo.com.cn

(本刊编辑部)