

MMP-2 和 VEGF 在视网膜新生血管中的表达及意义

底 煜 陈晓隆

Expression and significance of MMP-2 and VEGF in retinal neovascularization

Di Yu, Chen Xiaolong. Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China

Abstract Objective Researches showed that matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) has a critical role in the neovascularization of tumor, and vascular endothelial growth factor (VEGF) is a promoting factor of new blood vessel formation. There still is little literature about the effect of MMP-2 in retinal neovascularization up to now. This study tried to explore the expression and significance of MMP-2 and VEGF in retinal neovascularization. **Methods** A retinal neovascularization model was established in 30 7-day-old cleaning C57BL/6J mice exposed to an environment of high concentration of oxygen for 5 days, and 30 matched mice were raised in normal air environment. Fifteen mice from hyperoxic group and control group were sacrificed in 10 days after treatment and the eyeballs were enucleated to make retinal stretched preparation. Adenosine diphosphate-ase (ADPase) stained retina flat-mounts was performed to assess the retinal vascular profiles, and H&E staining was applied to count the number of new vascular cell nuclei. The expression of MMP-2 and VEGF was detected using immunohistochemistry by calculating the intergrated value of positive cells. **Results** The retinal stretched preparation presented more neovascularization in mice from the hyperoxic group compared with control group. The number of nuclei from the vascular endothelial cells in the new vessels breaking through the internal limiting membrane in the hyperoxic group was 33.51 ± 2.55 , indicating a significant increase in comparison with control group (7.27 ± 0.20) ($t = 9.345, P < 0.05$). There were stronger expression of MMP-2 protein and the VEGF protein in the ganglion cell layer, inner plexiform layer and inner nuclear layer, and neovascularization breaking through the internal limiting membrane in the hyperoxic group compared with control group ($t = 4.25, P < 0.05; t = 6.38, P < 0.05$). Expression of MMP-2 showed the positive correlation with the expression of VEGF ($r = 0.825, P < 0.05$). **Conclusion** Both MMP-2 and VEGF promote retinal neovascularization. The overexpression of MMP-2 and VEGF play a synergistic role during the formation of neovascularization.

Key words retinal neovascularization; matrix metalloproteinase-2; vascular endothelial growth factor

摘要 目的 探讨基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和血管内皮生长因子(VEGF)在视网膜新生血管中的表达及意义。**方法** 取 C57BL/6J 小鼠 60 只,随机分为高氧组和正常组,各 30 只。以高浓度氧诱导小鼠建立视网膜新生血管模型。采用 ADP 酶视网膜铺片、苏木精-伊红染色及免疫组织化学法分别观察视网膜血管的改变、计数视网膜新生血管内皮细胞数并检测 MMP-2、VEGF 蛋白的表达。**结果** 高氧组视网膜可见大量新生血管形成;突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核数为 (33.51 ± 2.55) 个,与对照组相比差异有统计学意义($t = 9.345, P < 0.05$)。高氧组与对照组比较, MMP-2、VEGF 蛋白在神经节细胞层、内丛状层、内核层和突破视网膜内界膜的新生血管中高表达,且二者表达呈正相关($r = 0.825, P < 0.05$)。**结论** MMP-2、VEGF 共同促进视网膜新生血管的形成,且二者可能具有协同作用。

关键词 视网膜新生血管; 基质金属蛋白酶-2; 血管内皮生长因子

分类号 R 774.1 R 779.7 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)12-1089-05

早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)发病机制目前尚不十分明确, Flynn 等^[1]认为主要与

新生血管的形成有关。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可能是最直接的眼内新生血管形成因子。另一方面,对于血管内皮细胞的趋化、迁移和增生起重要作用的基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)也日益引起研究者

本课题为辽宁省自然科学基金资助(20052089)
作者单位:110004 沈阳,中国医科大学盛京医院眼科
通讯作者:陈晓隆(E-mail:zhangyiou78@126.com)

的关注^[2-3]。研究表明 MMP-2 可能与肿瘤新生血管的生成有关^[4]。目前国内关于 MMP-2 对视网膜新生血管作用的报道较少,本实验通过氧诱导小鼠建立的 ROP 动物模型,观察 MMP-2 在其视网膜新生血管中的表达,并与 VEGF 的表达相比较,探讨二者之间的关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立及分组

参照 Smith 等^[5]的方法,将鼠龄 7 d 的健康清洁级 C57BL/6J 小鼠 60 只(中国医科大学实验动物中心提供,均具有动物检疫合格证,雌雄不限),应用随机数字表法将动物随机分为对照组和高氧组,每组 30 只。对照组小鼠与哺乳母鼠一起在正常空气环境下饲养;高氧组小鼠与哺乳母鼠一起置于体积分数为(75 ± 2)%的高氧密闭玻璃容器内,5 d 后回到正常空气环境中饲养。

1.2 方法

1.2.1 视网膜铺片法观察血管的形态学变化 2 组各取 15 只幼鼠,于出生后 17 d 时处死,10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉,左心室灌注 4%多聚甲醛溶液约 5 min,立即摘除眼球,固定,去除眼前节,完整剥取视网膜组织。然后将视网膜放射状切开 4~5 刀,漂洗,孵育,显色,甘油明胶封片,制备视网膜铺片,光学显微镜下观察视网膜血管发育及增生情况并拍照。

1.2.2 视网膜组织切片的制作及血管内皮细胞核计数 2 组各取 15 只幼鼠,于出生后 17 d 时处死,摘除眼球,4%多聚甲醛溶液中 4℃固定 24 h。作 6 μm 厚的连续切片,每只眼球选 10 张(共计 300 张)石蜡切片进行苏木精-伊红染色,用双盲法光学显微镜下计数突破视网膜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细胞核,不包括玻璃体腔内与内界膜无联系的其他血管内皮细胞核。

1.2.3 免疫组织化学法检测 MMP-2、VEGF 的表达 从 2 组中各随机抽取 10 张未经染色的切片,按链霉素抗生物素蛋白-生物素复合物(SABC)法进行 MMP-2、VEGF 免疫组织化学检查。一抗为兔抗小鼠 MMP-2、VEGF 多克隆抗体(武汉博士德公司),抗体工作浓度 1:100,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。二抗为羊抗兔 MMP-2、VEGF 多克隆抗体,二氨基联苯胺(DAB)显色。MMP-2、VEGF 表达的阳性细胞为细胞质或细胞核内着淡黄色至棕褐色颗粒。图像分析:每张切片随机选取 5 个不连续的高倍视野(400 倍),利用 MetaMorph/Evolution MP5.0/BX51 进行灰度扫描,分别测定阳性细胞的积分光密度值(IOD 值),取其平均值作为分析指标。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对照组与高氧组血管内皮细胞计数的比较、MMP-2、VEGF 表达的比较采用独立样本的 *t* 检验, MMP-2 和 VEGF 蛋白水平的相关性采用 Pearson 直线相关分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜血管铺片

对照组在生后 17 d 时视网膜血管基本成熟,自视盘发出的大血管向四周呈放射状均匀分布,管径较粗,分支良好(图 1)。而高氧组在生后 17 d,即出高氧箱后 5 d,自视盘发出的视网膜血管更加迂曲,有大片无灌注区,大量新生血管形成,但这些新生血管网结构及分布极其紊乱,丧失了正常的放射状及多角形结构(图 2)。

2.2 视网膜新生血管细胞核计数

对照组 30 只眼 300 张组织切片中,仅在极少数切片中可见突破视网膜内界膜长入玻璃体的血管内皮细胞核(图 3)。高氧组 30 只眼 300 张组织切片,可见较多突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核(图 4),部分单独



图 1 对照组出生后 17 d 小鼠视网膜血管铺片 A:可见视网膜血管自视盘发出,向四周呈放射状均匀分布(×40) B:可见视网膜血管管径较粗,分支良好(×100) 图 2 高氧组出生后 17 d 小鼠视网膜血管铺片 A:可见自视盘发出的视网膜血管更加迂曲(×40) B:可见大片无灌注区,大量新生血管形成(×100)

Fig. 1 Retinal flat-mounts of 17-day-old mouse in control group A: The retina vessels extended from the optic disc have fine radial branches(×40) B: The retina vessels are very thin with the fine branches(×100) Fig. 2 Retinal flat-mounts of 17-day-old mouse in hyperoxic group A: The retina vessels extended from the optic disc obvious distort(×40) B: The bigger non-perfusion area and increased neovascularization are seen(×100)

出现,部分成簇出现,平均每张切片中新生血管内皮细胞核数与对照组相比差异有统计学意义($t=9.345, P<0.05$)(表 1)。

表 1 对照组、高氧组新生血管数量和 MMP-2、VEGF 表达的比较($\bar{x} \pm s, IOD$ 值)

Table 1 The number of VECs and expression of MMP-2 and VEGF in control group and hyperoxic group($\bar{x} \pm s, IOD$ value)

Group	Number of VECs	IOD value	
		MMP-2	VEGF
Control	7.27 ± 0.20	8.74 ± 3.91	10.32 ± 2.13
Hyperoxic	33.51 ± 2.55	14.22 ± 3.93	19.65 ± 2.43
<i>t</i>	9.35	4.25	6.38
<i>P</i>	< 0.05	< 0.05	< 0.05

VECs: vascular endothelial cells (Student's *t* test)

2.3 视网膜组织中 MMP-2、VEGF 的表达

对照组视网膜各层中 MMP-2 蛋白表达较少见(图 5A), VEGF 蛋白微弱表达于神经节细胞层、内丛状层、内核层的某些细胞和外核层(图 6A)。高氧组 MMP-2(图 5B)、VEGF(图 6B)蛋白明显表达在神经节细胞

层、内丛状层、内核层和突破视网膜内界膜的新生血管。阴性对照未见 MMP-2(图 5C)、VEGF(图 6C)的淡黄色至棕褐色颗粒表达。对照组和高氧组 MMP-2、VEGF 表达的比较见表 1。MMP-2 蛋白与 VEGF 蛋白表达呈正相关($r=0.825, P<0.05$)(图 7)。

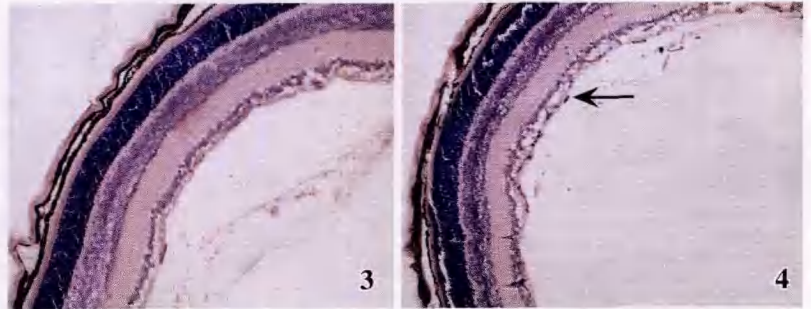


图 3 对照组 17 d 龄的鼠视网膜未见突破内界膜的血管内皮细胞核(HE × 200)

图 4 高氧组 17 d 龄鼠视网膜可见大量突破内界膜的血管内皮细胞核(箭头)(HE × 200)

Fig. 3 No vascular endothelial cell breaking through the internal limiting membrane is seen in 17-day-old mouse of control group (HE × 200) Fig. 4 A large number of vascular endothelial cells breaking through the internal limiting membrane are exhibited in 17-day-old mouse of hyperoxic group (arrow)(HE × 200)

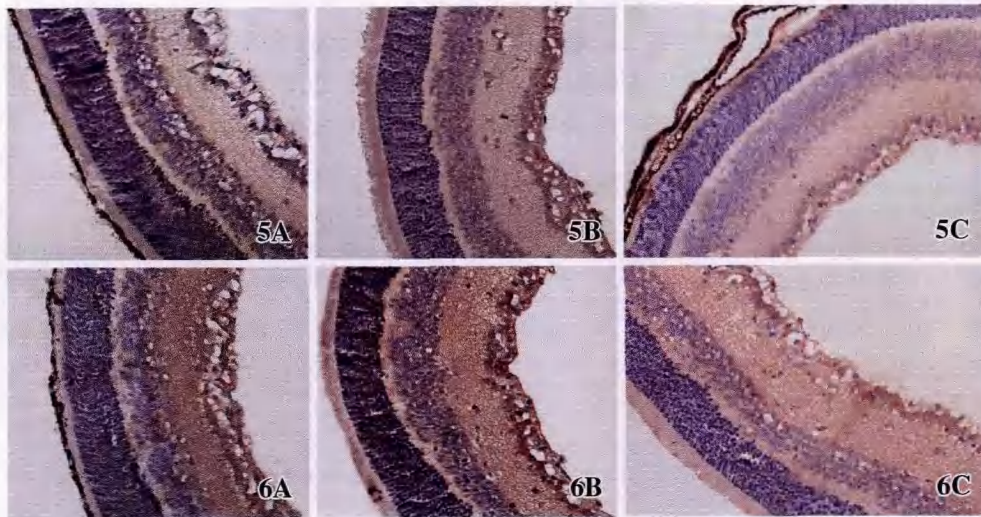


图 5 免疫组织化学法检测视网膜中 MMP-2 蛋白的表达(× 400) A: 对照组 17 d 龄鼠视网膜各层中少见 MMP-2 蛋白的表达 B: 高氧组 17 d 龄鼠可见 MMP-2 蛋白在神经节细胞层、内丛状层、内核层和突破视网膜内界膜的新生血管中高表达 C: 阴性对照视网膜切片中未见 MMP-2 蛋白的表达

图 6 免疫组织化学法检测视网膜中 VEGF 蛋白的表达(× 400) A: 对照组 17 d 龄鼠 VEGF 微弱表达于神经节细胞层、内丛状层、内核层和外核层部分细胞 B: 高氧组 17 d 龄鼠 VEGF 蛋白明显表达在神经节细胞层、内丛状层、内核层和突破视网膜内界膜的新生血管 C: 阴性对照视网膜各层未见 VEGF 蛋白的表达

Fig. 5 Expression of MMP-2 protein in retina of 17-day-old mouse by immunochemistry (× 400) A: MMP-2 shows the faint expression in retina of control group B: MMP-2 presents the strong expression mainly in the ganglion cell layer, inner plexiform layer, inner nuclear layer and neovascularization breaking through the internal limiting membrane in hyperoxic group C: No positive response cell for MMP-2 is found in retina of negative control Fig. 6 Expression of VEGF protein in retina of 17-day-old mouse by immunochemistry (× 400) A: VEGF protein is faintly expressed in retinal ganglion cell layer, inner plexiform layer, some cells of inner nuclear layer and outer nuclear layer in control group B: VEGF protein is strongly expressed mainly in the ganglion cell layer, inner plexiform layer, inner nuclear layer and neovascularization breaking through the internal limiting membrane in hyperoxic group C: No positive response cell for VEGF is seen in retina of negative control

3 讨论

新生小鼠视网膜血管的发育程度相当于孕龄为 4~5 个月的早产儿,而生后 7 d 小鼠视网膜血管的发育最接近人类早产儿视网膜血管的特点^[5-6],因此本研究利用新生小鼠模拟早产儿,观察吸氧对早产儿视网

膜血管的影响。本研究将 7 d 龄小鼠在高氧环境中饲养数日后,由于机体对高氧的保护性反应,正常发育中的视网膜血管停止生长,已有的血管普遍收缩继而广泛闭塞,并且出现了血管内皮细胞的退化;移入正常空气后,闭塞的血管不能适应组织对氧的需求,小鼠的眼底可出现视网膜血管增生等类似于 ROP 的改变^[7]。

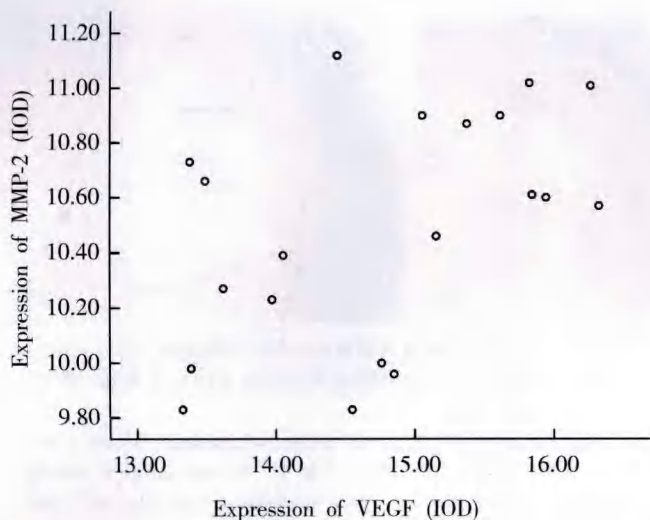


图7 MMP-2 和 VEGF 在视网膜新生血管中表达的相关分析 (IOD 值) ($r=0.825, P<0.05$)

Fig.7 The scatter plot of correlation of MMP-2 with VEGF expression (IOD value) ($r=0.825, P<0.05$)

本研究采用视网膜血管增生的形态学研究和计数视网膜组织切片中突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数量,均证明了高氧诱导小鼠视网膜新生血管模型制作成功。

视网膜新生血管的形成在 ROP 发病机制中起主导作用。在某些病理情况下,如缺血、缺氧环境,打破了血管生成的调节平衡,使视网膜血管内皮细胞、周细胞、RPE 细胞、Müller 细胞和神经节细胞中 VEGF 的表达上调^[8],色素上皮衍生因子 (pigment epithelium derived factor, PEDF) 表达下降^[9],导致了新生血管的生成。近年来,国内外对新生血管发病机制的研究主要集中在致血管形成因子,对细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 在新生血管发病机制中作用的研究报道较少。

MMPs 是分解 ECM 的蛋白酶类中最重要的一类,存在于正常人体中,参与多种生理和病理过程,如伤口愈合、新生血管形成、肿瘤浸润及转移、炎症反应、缺血缺氧损伤等。MMP-2 即明胶酶 A,初次发现于小鼠转移性肿瘤和培养兔骨中,相对分子质量为 72 000,是降解 ECM 的 MMPs 家族中的重要成员之一。研究表明,其对血管内皮细胞趋化、迁移和增生从而形成新生血管起着关键的作用^[10-11]。Kato 等^[12]用角膜微囊法诱导新生血管,发现敲除 MMP-2 基因的小鼠角膜新生血管生长的面积明显小于对照组,表明 MMP-2 能够促进角膜新生血管形成。Pournaras 等^[13]研究认为,虽然 VEGF 高水平表达对新生血管发生有主控作用,但 MMP-2 在基底膜和 ECM 的表达是血管内皮细胞趋

化、迁移、通过基底膜而形成新生血管的先决条件。本研究旨在探讨 MMP-2 表达与视网膜新生血管形成之间的关系,结果显示:在正常视网膜组织中, MMP-2 蛋白微弱表达;当组织缺氧时, MMP-2 蛋白在节细胞层、内丛状层、内核层和新生血管上明显表达。分析其可能的原因为节细胞层、内丛状层、内核层对组织缺氧敏感,同时组织缺氧又刺激大量的生长因子产生,而生长因子又可诱导 MMP-2 表达,从而促进新生血管的形成^[14]。

在刺激新生血管形成的多种因素中, VEGF 发挥最直接、最关键的作用,能特异地作用于血管内皮细胞,强烈地促进其增生。为了探讨 MMP-2 与 VEGF 间的关系,本实验对 MMP-2 与 VEGF 蛋白的表达进行了相关性分析。结果显示,二者在视网膜中的表达呈正相关,提示其在视网膜新生血管的形成中可能具有协同作用。推测其原因:(1) MMP-2 的表达上调可能促进血管生成因子 VEGF 的增加,从而促进血管形成。(2) VEGF 改变了内皮细胞的活化形式,增加了 MMP-2 的释放,加快基底膜的降解和内皮细胞的迁移,促进了新生血管的形成^[15]。

综上所述, MMP-2、VEGF 的表达在视网膜新生血管的形成中发挥重要的作用,调控 MMP-2、VEGF 的量可为 ROP 的防治开辟新的思路。

参考文献

- 1 Flynn JT, Chan-Ling T. Retinopathy of prematurity; two distinct mechanisms that underlie zone 1 and zone 2 disease [J]. Am J Ophthalmol, 2006, 142(1): 46 - 59
- 2 Ohno-Matsui K, Yoshida T, Uetama T, et al. Reduced retinal angiogenesis in MMP-2 deficient mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44: 5370 - 5375
- 3 Carmeliet P, Jain PK. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. Nature, 2000, 407(14): 249 - 257
- 4 Robert V, Hideaki N. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry [J]. Circ Res, 2003, 92: 827 - 839
- 5 Smith LE, Wesolowski E, Mclellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35: 101 - 111
- 6 Chen J, Smith LE. Retinopathy of prematurity [J]. Angiogenesis, 2007, 10: 133 - 140
- 7 张民英, 邹颖, 潘金顺, 等. 建立眼内新生血管动物模型的探索 [J]. 眼科新进展, 2005, 2(5): 393 - 395
- 8 Kaur C, Sivakumar V, Ang LS, et al. Early response of neurons and glial cells to hypoxia in the retina [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(3): 1126 - 1141
- 9 Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium derived factor; Apoptin inhibitor of angiogenesis [J]. Science, 1999, 285(9): 245 - 248
- 10 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 [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48: 907 - 915
- 11 Hoffmann S, He S, Ehren M, et al. MMP-2 and MMP-9 secretion by RPE is stimulated by angiogenic molecules found in choroidal neovascular

membranes[J]. Retina, 2006, 26(4): 454 - 461

12 Kato T, Kure T, Chang JH, et al. Diminished corneal angiogenesis in gelatinase a deficient mice[J]. FEBS Lett, 2005, 508: 187 - 190

13 Pourmaras CJ, Miller JW, Gragoudas ES, et al. Systemic hyperoxia decreases vascular endothelial growth factor gene expression in ischemic primate retina[J]. Arch Ophthalmol, 1997, 115(12): 1553 - 1558

14 Notaril L, Miller A, Martinez A, et al. Pigment epithelium derived factor is a substrate for matrix metalloproteinase type 2 and type 9; implications for downregulation in hypoxia[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(8):

2736 - 2747

15 Zhang H, Li C, Baciu PC. Expression of integrins and MMPs during alkaline burn induced corneal angiogenesis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 43: 955 - 962

(收稿: 2009-02-23 修回: 2009-10-19)

(本文编辑: 尹卫靖)

· 病例报告 ·

多阻塞点视网膜分支动脉阻塞一例

肖西立 郑燕林 张玲 唐苗苗

视网膜分支动脉阻塞(branch retinal artery obstruction, BRAO)中老年人多发,多为单一阻塞点,国内尚未见发生多个阻塞点 BRAO 的报道。成都中医药大学附属医院眼科收治 1 例 26 岁的多个阻塞点 BRAO 患者,较为罕见,患者发病 2 d 后就诊,错过了最佳治疗时机,但通过中西医结合治疗取得了较好的疗效,报告如下。

患者,男,26 岁,因左眼上方视物遮挡感 2 d 于 2009 年 5 月 11 日急诊入院。否认既往病史。入院检查:身高 168 cm,体重 88 kg,血压 130/80 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。眼科检查:视力右眼 1.0,左眼 0.8(从下方看)。双眼眼压正常。双眼外眼及眼前节均未见异常。右眼底视盘色泽正常,边界清晰,杯盘比为 0.3,动静脉比为 2:3,黄斑中心凹反射存在,视网膜未见出血、渗出等改变。左眼视盘色泽正常,边界清楚,杯盘比为 0.5,下方视网膜灰白水肿,鼻下、颞下支动脉变细,黄斑区色红,中心凹反射消失。实验室检查:红细胞 $5.56 \times 10^{12}/L$,血红蛋白 168 g/L,平均血小板体积 11.6 fL,血小板分布宽度 18.2。血糖 4.2 mmol/L,胆固醇 4.61 mmol/L,甘油三酯 1.62 mmol/L,高密度脂蛋白 0.79 mmol/L,低密度脂蛋白 3.51 mmol/L,载脂蛋白 A1 0.85 g/L。血液流变学示全血黏度、血浆黏度等各项值均在正常范围。眼底照相:下方视网膜灰白色水肿,鼻下、颞下分支动脉以及颞侧多处动脉变细,黄斑区色红(图 1)。荧光素眼底血管造影(FFA):左眼视网膜颞下及鼻下分支动脉近视盘处见多个高荧光点(阻塞点),在阻塞点远端的动静脉充盈明显迟缓,可见明显动脉荧光充盈,视网膜颞侧可见动脉阻塞点(图 2~4)。诊断:左眼 BRAO。入院时,立即球后注射阿托品 1 mL,低盐、低脂饮食,间断低流量吸氧,葛根素注射液 0.4 g、胞磷胆碱钠 0.5 g、三磷酸腺苷二钠 40 mg、5% 葡萄糖 100 mL 静脉滴注,每日 1 次;派立明滴眼液、噻吗洛

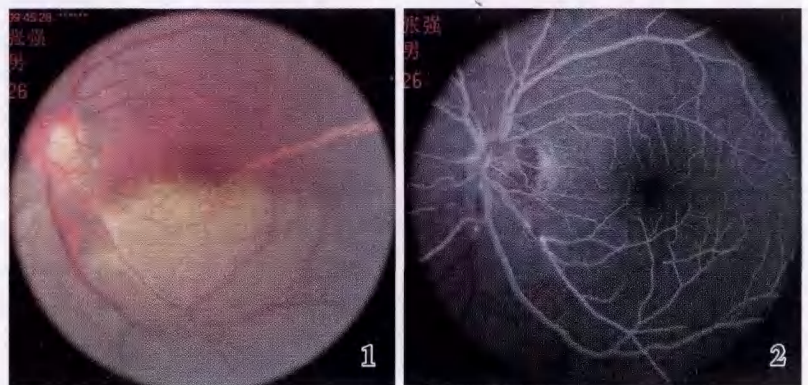


图 1 左眼眼底照相 图 2 左眼 FFA 所见

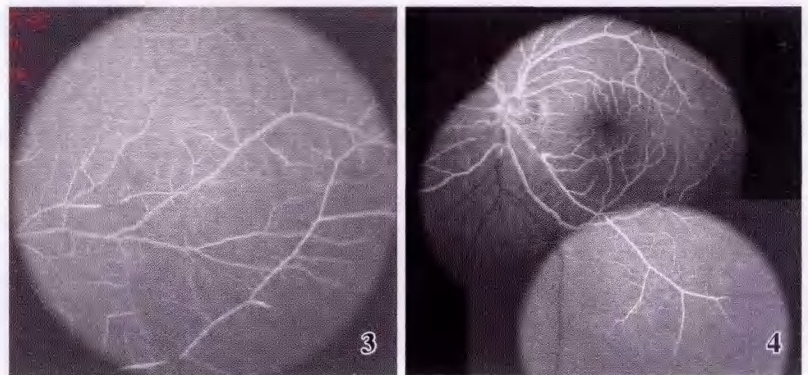


图 3 左眼 FFA 所见 图 4 左眼 FFA 组合图片

尔滴眼液点左眼,每日 2 次;并针刺睛明、球后、攒竹、承泣、太阳、风池、合谷等穴位,每日 1 次。治疗 3 d 后患者自觉左眼上方视物遮挡感明显好转,鼻上方轻微遮挡感。视力左眼 0.9。再次球后注射阿托品 1 mL,并加用复方樟柳碱左侧颞浅动脉旁注射 2 mL,每日 1 次,中药以二陈汤加减。入院 8 d 后左眼鼻上方视物遮挡感减轻,视力左眼 1.0。左眼下方视网膜水肿减轻,未波及黄斑,可见小片状出血。停用葛根素以及能量合剂,加丹参酮 II A 磺酸钠 40 mg 及 5% 葡萄糖 150 mL 静脉滴注,每日 1 次;环磷腺苷葡胺注射液 60 mg、5% 葡萄糖 100 mL 静脉点滴,每日 1 次。并改中药为当归活血汤及杞菊地黄丸加减。余治

作者单位:610075 成都中医药大学
通讯作者:肖西立 (Email: xxl1850707@vip.qq.com)