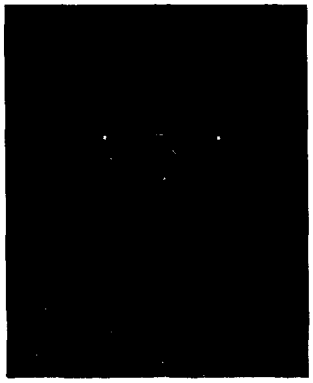
维普资讯 http://www.cqvip.com

VEGF诱导的大鼠视网膜白细胞聚集与血-视网膜通透性改变的相关性研究△

王 康 李明铭 李新民 王艳玲



作者简介:王康,男,1972年出生,山东烟台人。博士,副主任医师,硕士研究生导师。2005年入选北京市科技新星。近年来发表学术论文20余篇。主要从事眼底病、眼科激光的治疗。联系电话:010-63139094(O);E-mail:bnbn2000@sohu.com

About WANG Kang: Male, born in 1972. Medical doctor. Vice-chief director, director of master. Majored in laser treatment of fundus diseases. Tel: +86-10-63139094(O); E-mail: bnbn2000@sohu.com

VEGF induced retinal leukocyte accumulation and blood retinal barrier breakdown in rats

WANG Kang, LI Ming-Ming, LI Xin-Min, WANG Yan-Ling

[Key words] acridine orange fluorography; evans blue; rat; blood retina barrier; vascular endothelial growth factor

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between retinal leukocyte accumulation induced by vascular endothelial growth factor (VEGF) and blood retinal barrier breakdown in rats. **Methods** Twelve Brown-Norway rats were divided into control group and VEGF intravitreal injection group. After acridine orange ($5\ mg \cdot kg^{-1}$) and evans blue ($45\ mg \cdot kg^{-1}$) injecting through the jugular vein, the density of leukocytes and content of evans blue were detected in the retina. **Results** Twenty-four hours after VEGF intravitreal injection, the density of leukocytes in the retina of control group and VEGF intravitreal injection group were $(1.90 \pm 0.03) \times 10^{-6}$ per square micrometer and $(9.10 \pm 0.08) \times 10^{-6}$ per square micrometer, and the content of evans blue were $(14.78 \pm 3.27)\ ng \cdot mg^{-1}$ and $(51.72 \pm 6.77)\ ng \cdot mg^{-1}$. VEGF intravitreal injection groups were much higher than that of control groups ($P < 0.01$). **Conclusion** Retinal leukocyte accumulation induced by VEGF has relations with the increase of blood retinal barrier breakdown, which can be quantitatively detected by the methods of acridine orange fluorography and evans blue.

[Rec Adv Ophthalmol 2008;28(1):16-17,20]

【中图分类号】 Q959.836;R774 【文献标识码】 A
【文章编号】 1003-5141(2008)01-0016-03
【关键词】 吖啶橙造影;伊凡思蓝;大鼠;血-视网膜屏障;血管内皮生长因子

【摘要】 **目的** 探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)诱导的大鼠视网膜白细胞聚集及其与血-视网膜通透性改变的关系。**方法** 12只Brown-Norway大鼠分为对照组及VEGF注射组,吖啶橙($5\ mg \cdot kg^{-1}$)和伊凡思蓝($45\ mg \cdot kg^{-1}$)经颈静脉注入,分别检测视网膜中白细胞密度和伊凡思蓝含量。**结果** VEGF注射24 h后,对照组和VEGF注射组大鼠视网膜白细胞密度分别为$(1.90 \pm 0.03) \times 10^{-6}\ \mu m^{-2}$和$(9.10 \pm 0.08) \times 10^{-6}\ \mu m^{-2}$;视网膜标准化伊凡思蓝含量分别为$(14.78 \pm 3.27)\ ng \cdot mg^{-1}$和$(51.72 \pm 6.77)\ ng \cdot mg^{-1}$,VEGF注射组与对照组比较差异均有显著统计学意义($P < 0.01$)。**结论** VEGF注射后视网膜白细胞聚集和血管通透性显著增加,可以通过吖啶橙造影和伊凡思蓝定量检测。

[眼科新进展 2008;28(1):16-17,20]

在糖尿病视网膜病变中,血管中白细胞停滞、聚集现象是一种较早发生的功能性改变,局部白细胞增加堵塞毛细血管,可以引起血管内皮细胞损伤或死亡,最终血-视网膜屏障(blood retinal barrier, BRB)破坏[1]。吖啶橙(acridine orange, AO)造影已被国外许多学者应用于观察视网膜中白细胞的行为学改变[1-3],但国内相关报道较少。本研究观察大鼠血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)玻璃体内注射后视网膜中白细胞聚集和BRB通透性改变的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 雌性Brown-Norway大鼠12只,重约180 g。分为对照组和VEGF注射组,每组各6只。

收稿日期:2007-06-04
修回日期:2007-07-12
本文编辑:董建军
△基金项目:北京市科委科技新星项目基金资助(编号:2005-B-043);北京市优秀人才培养专项经费基金资助(编号:20042D0300102)
作者单位:100050 北京市,首都医科大学附属北京友谊医院眼科
Received date: Jun 4, 2007
Accepted date: Jul 12, 2007
Foundation item: Sci-Tech New-Star Project of Beijing (No: 2005-B-043); Special Foundation of Standout of Beijing (No: 20042D0300102)
From the *Department of Ophthalmology, Beijing Friendship Hospital Affiliated Capital Medical Science University, Beijing* 100050, *China*

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 玻璃体内注射VEGF方法 10 g·L^{-1}戊巴比妥钠50 mg·kg^{-1}腹腔注射麻醉大鼠,美多丽散瞳,爱尔卡因表面麻醉,实验结束后滴3 g·L^{-1}泰利必妥眼液预防感染。27号针头打眼后以微量注射器(上海激光光学仪器厂)将重组人VEGF$_{165}$(10 μg·L^{-1},Sigma)由大鼠右眼颞侧角膜缘后1 mm玻璃体内注射,并确定无晶状体损伤。实验24 h后观察大鼠视网膜中白细胞聚集及视网膜血管通透性改变[4]。

1.3 大鼠视网膜中白细胞聚集评价 AO(Sigma)用生理盐水稀释至1.0 g·L^{-1},由颈静脉按5 mg·kg^{-1}以1 mL·min^{-1}速度注入。30 min后用海德堡造影仪观察结果,扫描密度256线,图像为640(水平)×480(垂直)像素。AO白细胞荧光血管造影结果分析:取距视盘周围直径约5倍距离内的8个区域(以视网膜大血管为分界线)白细胞密度(单位为每平方微米细胞数),计算其平均数。

1.4 以伊凡思蓝(evans blue,EB)法检测视网膜通透性[5] 戊巴比妥钠45 mg·kg^{-1}腹腔注射麻醉大鼠。暴露右颈静脉,EB 45 mg·kg^{-1}在1 min内由静脉缓慢注入。循环120 min后,结扎下腔静脉,以pH 3.5,0.05 mol·L^{-1}的柠檬酸缓冲液稀释的10 g·L^{-1}多聚甲醛缓冲液,由左心室灌注,同时剪开左心耳,各种溶液灌注前均预热至37 ℃防止血管收缩。灌注压为120 mmHg(1 kPa=7.5 mmHg,约66 mL·min^{-1}),灌注2 min。灌注结束后,立即取出眼球,分离视网膜,4 ℃过夜晾干后称干重。将视网膜与150 μL甲酰胺(Sigma)在70 ℃下孵育8 h。然后将提取液移入超滤离心管中(Ultrafree MC,30000 NMWL UFC3LTK00;Millipore,Bedford,MA),离心机(Eppendorf Centrifuge 5417R)在4 ℃,6 000 r·min^{-1}下高速离心90 min。取上清液120 μL用酶标仪(Molecular Devices Spectra Max250)测其吸光度(A)值,测定620 nm和740 nm 2种波长F样品的A值之差(净吸光度值),建立EB染料浓度在甲酰胺中的标准曲线。每种样品测量3次,最后取其平均值。用视网膜干重(mg)标准化EB(ng)含量,EB渗漏量结果以ng·mg^{-1}表示。

1.5 统计学处理 实验数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间差异性比较采用单因素方差分析,SAS 6.12软件包自动处理,$P<0.01$为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜微循环中白细胞聚集密度 VEGF玻璃体内注射后2组大鼠视网膜微循环中白细胞聚集的改变:对照眼视网膜中仅有少量白细胞聚集,白细胞密度为(1.90±0.03)×10^{-6} μm^{-2},VEGF注射眼中白细胞密度显著增加,(9.10±0.08)×10^{-6} μm^{-2},为对照眼的4.9倍(图1,$P<0.01$)。

2.2 EB法评价BRB破坏的情况 对照眼和VEGF注射眼的EB渗漏量分别为(14.78±3.27) ng·mg^{-1}和(51.72±6.77) ng·mg^{-1},VEGF注射眼显著增加,为对照眼的3.5倍($P<0.01$)。

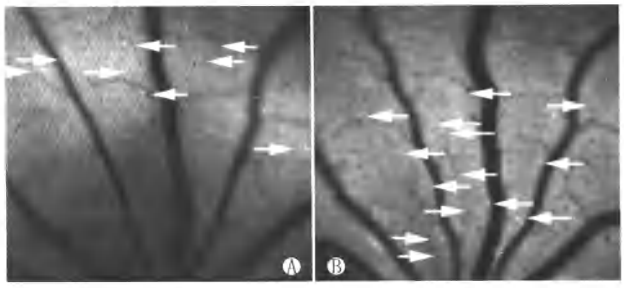


Figure 1 AO appearance showed leukocytes aggregation in the retinal vessel. A: Control group had little leukocytes in rat retinal; B: VEGF injection group had more leukocytes in rat retinal AO造影显示白细胞在视网膜血管中聚集。A:对照组大鼠视网膜中较少白细胞;B:VEGF注射组大鼠视网膜中白细胞明显增多

3 讨论

大量研究证明,白细胞在眼底微循环性疾病中具有重要作用。AO是一种组织化学和细胞化学的细胞核染料。当其与细胞核结合后,最大激发光谱为533 nm,最大发射光谱为492 nm,与荧光素钠相似。AO眼底血管造影可直接观察活体视网膜循环的单个白细胞的血液流变学行为,造影时只有白细胞显荧光,其他血液有形成分及血管均不显影[3]。本研究中我们发现,对照眼视网膜中仅有少量白细胞聚集,而VEGF注射眼中白细胞密度显著增加,为对照眼的4.9倍($P<0.01$)。

以往的研究已经发现,人类和啮齿类动物糖尿病视网膜病变中细胞间黏附因子-1(intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)表达量明显增加。糖尿病视网膜中血管内皮细胞ICAM-1表达增加可以导致白细胞与其黏附性增强,血管中白细胞聚集[6]。此外,另有研究发现VEGF诱导的BRB破坏和白细胞停滞、聚集现象也通过ICAM-1起作用[4]。VEGF可能引起白细胞聚集、黏附于血管壁。单核细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和血小板均可能与血管内皮细胞相结合,直接或间接造成细胞间紧密连接破坏,增加了视网膜血管通透性、白细胞停滞并聚集,局部白细胞增加堵塞毛细血管,可以引起血管内皮细胞损伤或死亡,最终BRB破坏[1,4]。同时,VEGF也可能直接作用于视网膜血管,造成视网膜通透性增加[7]。我们的研究证实VEGF注射眼视网膜血管通透性显著增加,为对照眼的3.5倍($P<0.01$)。这一结果可能与VEGF直接或间接作用有关。

白细胞停滞并聚集和BRB破坏,以及ICAM-1和VEGF表达的变化之间很有可能存在必然的内在联系。本研究证实,VEGF注射后视网膜白细胞聚集

(下转第20页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

抑制细胞的增生。而近年大量研究证实,RPE 细胞的增生是 PVR 的主要病理特征[2],所以很多研究都尝试用药物抑制细胞增生而达到治疗 PVR 的目的。

CsA 是一种环 11 肽,含有一个新的 9 碳氨基酸,即甲氨基壬烯醇酸,为环孢素类所特有,是一种强效免疫抑制剂[5]。1976 年开始广泛应用于器官移植患者术后排斥反应的防治[6],也用于血液病和肾病患者,后来逐渐在眼科用于角膜移植,和一些与免疫有关的眼病,如 Sjögren 综合征、Vogt-小柳原田综合征、Behcet 病等,这些都与 CsA 免疫抑制效应有关[7]。

近年来的研究发现,CsA 除了具有强大的免疫抑制效应外,还具有抗增生作用,适当的浓度能有效地抑制血管内皮细胞、皮肤成纤维细胞、结膜下成纤维细胞、晶状体上皮细胞的增生[8],而 CsA 用于治疗 PVR 的研究相对较少。本文利用体外培养 hRPE 细胞,观察 CsA 对 hRPE 细胞生长的影响,从而探寻一种安全有效的浓度-时间关系,结果显示:当 CsA 浓度为 $0.20\ mg \cdot L^{-1}$ 时,持续作用 72 h 对 hRPE 细胞生长有明显抑制作用($P < 0.05$);当 CsA 浓度 $\geq 0.40\ mg \cdot L^{-1}$ 时,作用 24 h 即有明显抑制作用($P < 0.05$)。

本研究旨在观察 CsA 对 hRPE 细胞增生的影响,寻求一种 PVR 治疗的新方法,实验结果也证实,CsA 对 hRPE 细胞的增生有一定的抑制作用,这为 CsA 在 PVR 治疗中作用的进一步研究提供实验依据,同时也为临床应用提供一定的理论基础。当然我们仅在体外实验初步证实了 CsA 对 hRPE 细胞增生的抑制作用,对于体内实验和临床应用,其确切浓度、药物毒性和用药途径都还需要进一步深入研究。

参考文献

1 Charteris DG. Proliferative vitreoretinopathy: pathobiology, surgical management, and adjunctive treatment [J]. *Br J Ophthalmol* 1995;79(10):953-960.
2 惠延年. 增生性玻璃体视网膜病变:带入 21 世纪的课题 [J]. 中华眼底病杂志 1999;15(2):67-68.
3 Pastor JC. Proliferative vitreoretinopathy: an overview[J]. *Surv Ophthalmol* 1998;43(1):3-18.
4 王雨生. 视网膜色素上皮细胞培养技术及其应用[J]. 中华眼底病杂志 1994;10(2):124-128.
5 田 萍. 新型强效免疫抑制剂 FK506 治疗自身免疫性眼病的最新进展[J]. 眼科新进展 *Yanke Xinjinzhan* 2000;20(2):92-93.
6 刘昭生. 环孢霉素 A 缓释制剂在眼科的应用[J]. 国外医学眼科学分册 2000;24(5):303-307.
7 戴 馨,王竫华. 环孢霉素 A 抗增殖作用的实验研究[J]. 眼科新进展 *Yanke Xinjinzhan* 2003;23(4):251-253.
8 Cortina P, Gomez-Lechon MJ, Navea A. Diclofenac sodium and cyclosporin A inhibit human lens epithelium cell proliferation in culture[J]. *Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;235(3):180-185.

(上接第 17 页)

和血管通透性增加,可以通过 AO 造影和 EB 定量检测。我们对剂量以及时间点的选择是参考了 Miyamoto 等[4]的研究,不同的是本研究的实验动物改用了国内常见的 BN 大鼠,使得此技术在国内的广泛应用成为可能。由于技术原因,在我们的研究中不能观察到白细胞在视网膜血管内的动态行为改变,希望今后通过技术改进弥补这一缺陷,并结合药物剂量依赖关系,进一步从分子水平阐述产生这种现象的内在原因。

参考文献

1 Nishiwaki H, Ogura Y, Kimura H, Kiryu J, Honda Y. Quantitative evaluation of leukocyte dynamics in retinal microcirculation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(1):123-130.
2 Tamura H, Miyamoto K, Kiryu J, Miyabara S, Katsuta H, Hirose F, *et al*. Intravitreal injection of corticosteroid attenuates leukostasis and vascular leakage in experimental diabetic retina[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(4):1440-1444.
3 Nishiwaki H, Ogura Y, Kimura H, Kiryu J, Miyamoto K, Matsuda N. Visualization and quantitative analysis of leukocyte dynamics in retinal microcirculation of rats[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(7):1341-1348.
4 Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Moromizato Y, Aiello LP, Ogura Y, *et al*. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) [J]. *AM J Pathol* 2000;156:1733-1739.
5 王 康,刘乃慧,李新民. 不同种系糖尿病大鼠血-视网膜通透性改变对比研究[J]. 眼科新进展 *Yanke Xinjinzhan* 2007;27(1):17-19.
6 Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Rohan R, Murata T, Llermont A, *et al*. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(7):10836-10841.
7 Gaudry M, Bregerie O, Andrieu V, El-Benna J, Pocidalo MA, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils [J]. *Blood* 1997;90(10):4153-4161.