

血管抑素玻璃体注射对糖尿病大鼠视网膜及虹膜血管渗漏的影响

司马晶 Ma Jianxing 郭疆 Zhang Sarah X

【摘要】 目的 探讨血管抑素 (Angiostatin) 玻璃体腔注射对糖尿病大鼠视网膜、虹膜血管渗透性的影响及其机理。**方法** Brown Norway 大鼠 48 只。静脉注射链唑霉素 (Streptozotocin, STZ) 建立糖尿病模型, 随机分为 3 组 (每组糖尿病鼠与正常鼠各 8 只)。甲组: 右眼玻璃体腔注射磷酸盐缓冲生理盐水 (Phosphate Buffered Saline, PBS) 5 μ l, 左眼不注射; 乙组、丙组: 右眼玻璃体腔注射血管抑素 7.5 μ g/5 μ l, 左眼注射等量 PBS; 甲、乙组用埃文斯蓝微血管渗透性检测法检测视网膜和虹膜的血管渗透性。丙组用 Western blot 免疫印迹分析法检测视网膜血管内皮生长因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) 的表达。**结果** 糖尿病鼠较正常鼠的视网膜 ($P < 0.01$) 和虹膜 ($P < 0.05$) 的血管渗透性增加; 糖尿病鼠血管抑素注射眼与对侧 PBS 注射眼相比, 视网膜 ($P < 0.01$) 和虹膜 ($P < 0.05$) 血管渗透性降低; 正常鼠注射血管抑素眼与对侧注射 PBS 眼相比, 视网膜和虹膜血管渗透性无明显改变 ($P > 0.05$), Western blot 显示血管抑素显著降低了糖尿病鼠视网膜的 VEGF 水平, 但对正常鼠无影响。**结论** 血管抑素可明显降低糖尿病鼠视网膜、虹膜血管渗透性, 但对正常鼠影响不明显。血管抑素可下调糖尿病鼠视网膜 VEGF 的表达从而阻断其血管渗漏。因此预测血管抑素对糖尿病黄斑水肿、黄斑囊样水肿、葡萄膜炎等血管渗漏性疾病可能具有潜在的治疗价值。

【关键词】 血管抑素; 血管生成抑制因子; 糖尿病视网膜病变; 血管内皮生长因子; 玻璃体注射

The effect of angiostatin intravitreal injection on vascular leakage in retina and iris of experimental diabetic rats

SIMA Jing, MA Jianxing*, GUO Jiang, ZHANG Sarah X* Department of Ophthalmology, Shenzhen 2nd peoples hospital & Shenzhen hospital of Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong, 518035 China
*Department of Medicine, Department of Cell Biology, The University of Oklahoma Health Science Center, Oklahoma City, OK 73104, U.S.A.

【Abstract】 Objective To probe into the effect of an intravitreal injection of angiostatin on vascular leakage in retina and iris of the diabetic rats and study its possible mechanism. **Methods** Diabetes model was induced in 24 rats by an intravenous injection of STZ (streptozotocin) during 48 Brown Norway adult rats. Three groups were randomization distributed of them. There were 8 of both normal and diabetic rats each group. STZ-diabetic rats and age-matched normal rats received an intravitreal injection of 5 μ l of sterile PBS (Phosphate Buffered Saline) into the right eye, and the left eye was non-injected in the group A; Angiostatin was injected into the vitreous of the right eye, and the left eye received the same volume of sterile PBS as the control in the group B and group C. The vascular permeability of retina and iris was measured using the Evans blue method in the group A and group B. Expression of VEGF in retina was evaluated using western blot analysis in the group C. **Results** Diabetic rats showed significant increases of vascular permeability in the retina ($P < 0.01$) and iris ($P < 0.05$). Angiostatin-injected eyes showed significant decreases in vascular permeability in the retina ($P < 0.01$) and iris ($P < 0.05$) comparing with the PBS-injected eyes in STZ-diabetic rats. In contrast, intravitreal injection of the same dose of angiostatin into the age-matched normal rats did not result in any significant reduction in vascular permeability in the retina and iris, when compared with the contralateral eye with PBS injection ($P > 0$).

基金项目: 2004 年深圳市科技计划项目 (基金编号 200405097)

作者单位: 518035 广东, 南方医科大学深圳医院暨深圳市第二人民医院眼科

通讯作者: 司马晶, E-mail: sima618@163.com

05). Angiostatin injection significantly reduced VEGF level in the retinas of STZ-diabetic rats but did not affect retinal VEGF level in normal rats. **Conclusions** Angiostatin significantly reduce pathological vascular permeability in the retina and iris of STZ-diabetic rats but not in normal rats. Angiostatin down-regulates VEGF expression and thus, blocks the major cause of vascular leakage in the diabetic retina. Therefore, angiostatin may have a therapeutic potential in the treatment of diabetic macular edema, cystoid macular edema, uveitis and other diseases with vascular leakage.

【Key words】 Angiostatin, Angiogenic inhibitor, Diabetic retinopathy, Vascular endothelial growth factor, Intravitreal injection

眼组织尤其是视网膜组织的微血管病变是危害糖尿病患者视功能最严重的并发症。血视网膜屏障的破坏和血管渗透性增加是糖尿病的早期病理特征,也是糖尿病黄斑水肿的主要病理改变^[1]。虽然其发生机制尚不确定,但血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)在糖尿病视网膜膜中的过量表达被认为是血管渗透性增加、黄斑水肿及新生血管形成的主要原因。在链唑霉素(Streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病大鼠中,人们发现视网膜血管渗透性增加与VEGF或其受体的过量表达有关^[2,3],因此VEGF被认为是导致视网膜血管渗透性增加的主要诱导因子。

血管抑素(Angiostatin)是血纤维蛋白溶酶原的一个蛋白水解片段,能特异性地抑制血管内皮细胞的增殖,阻断新生血管形成、抑制肿瘤生长和转移^[4,5]。有研究认为增殖性糖尿病视网膜病变的发展可能与玻璃体腔血管抑素水平下降有关^[6]。本研究用血管抑素对糖尿病大鼠进行玻璃体腔内注射,并设立对照组,通过对其视网膜及虹膜血管渗透性检测、Western blot免疫印迹法测量VEGF在视网膜的表达,研究血管抑素在糖尿病视网膜病变(Diabetic Retinopathy, DR)血管渗漏中的作用,探讨其可能的治疗机制。

材料与方 法

1. 动物: 48只Brown Norway大鼠((Harlan, Indianapolis IN, USA.), 24只为诱导成功的糖尿病模型, 24只作为正常对照。动物饲养及实验均按国际惯例严格遵照ARVO声明进行。

2. 糖尿病模型诱导: 给空腹的8周龄成年鼠静脉注射STZ(50 mg/kg)诱导糖尿病大鼠模型, 每三天检测血糖水平, 血糖高于350 mg/dl者认为糖尿病大鼠模型诱导成功, 取糖尿病发病2周的大鼠用于实验。

3. 动物分组及玻璃体腔注射: 动物随机分为3组, 每组糖尿病鼠与年龄匹配的正常鼠各8只。甲

组为PBS(磷酸盐缓冲生理盐水: Phosphate Buffered Saline)注射组: 用玻璃毛细管将5 μ l PBS注入右眼玻璃体腔, 左眼不注射。乙组、丙组为血管抑素注射组。血管抑素购于Angiogenesis Research Industries, Inc (Chicago, IL, USA.), 用PBS溶解配制, 将血管抑素溶液7.5 μ g /5 μ l注入糖尿病鼠及年龄匹配正常鼠的右眼玻璃体腔, 左眼注入相同体积PBS作对照。

4. 血管渗透性的检测: 于玻璃体腔注射2d后检测视网膜和虹膜的血管渗透性。按照改良埃文斯蓝微血管渗透性检测法^[1,7], 通过检测从血管渗漏到视网膜和虹膜的白蛋白来量化血管渗透性。方法: 大鼠麻醉后, 从股静脉注入埃文斯蓝(30 mg/kg), 将其置于温垫上2h以保证埃文斯蓝-白蛋白复合物进行完全循环。然后, 在生理压力下通过左心室灌注预热的1%多聚甲醛(pH=4.2) 2min, 以将染料从血管清除。灌注完毕后立即摘除眼球, 在手术显微镜下分离视网膜和虹膜。将每个样本在150 μ l 甲酰胺(Sigma)中70 $^{\circ}$ C孵育18h以提取埃文斯蓝染料。提取物在4 $^{\circ}$ C 70,000 rpm离心20min, 取100 μ l上清液测定620 nm吸光度。从埃文斯蓝-甲酰胺标准曲线计算提取物中埃文斯蓝的浓度, 以组织中总蛋白浓度进行标准化。结果以组织每毫克总蛋白中含多少微克埃文斯蓝表示。

5. Western Blot免疫印迹测量VEGF水平: 丙组动物于注射24h后取视网膜, 用抗VEGF抗体进行Western blot印迹分析^[8]。取每种组织的等量总蛋白(50 μ g), 经变性、电泳、电转膜、加抗VEGF的多克隆抗体(1:1,000)孵育, 用间接酶联检测法进行显影。同一样本经洗脱处理后再加上抗 β 肌动蛋白(β -actin)抗体孵育、显影。将显影后所得到的信号使用光密度分析法进行半定量分析, 并使用 β -actin标准化。VEGF抗体购于Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, USA.)。

6. 统计学分析: 用Student's t检验进行统计分析。同一动物注入血管抑素的右眼和注入PBS的

左眼间比较用配对 t 检验，而动物之间的比较用非配对 t 检验。

结 果

1. 糖尿病鼠眼组织的血管渗透性增加。为评估玻璃体腔内注射对血管渗漏的影响，糖尿病鼠和正常鼠右眼玻璃体腔均注射 5 μ lPBS，左眼未注射，2 天后检测血管渗漏情况。在未进行注射的眼中，糖尿病鼠较正常鼠的视网膜 ($P < 0.01$) 和虹膜 ($P < 0.05$) 的血管渗透性明显升高；而注射眼与未注射眼自身比较，糖尿病鼠和正常鼠视网膜、虹膜的血管渗透性均有增加，这可能是因损伤反应所致；然而，接受 PBS 注射的糖尿病鼠视网膜和虹膜的血管渗透性仍明显高于接受 PBS 注射的正常对照组 ($P < 0.01$) (表 1)，提示玻璃体腔注射不影响糖尿病鼠和正常对照鼠间的比较。

表 1 STZ 糖尿病鼠血管渗透性变化及 PBS 玻璃体腔内注射对血管渗透性的影响 (μ g/mg)

	视网膜		虹膜	
	未注射眼	PBS 注射眼	未注射眼	PBS 注射眼
STZ 糖尿病鼠	0.15 \pm 0.03	0.35 \pm 0.05	2.45 \pm 0.38	3.55 \pm 0.32
正常鼠	0.04 \pm 0.01	0.16 \pm 0.03	1.40 \pm 0.19	2.10 \pm 0.27
P 值	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.05$	$P < 0.01$

2. 血管抑素对糖尿病鼠视网膜及虹膜血管渗透性的作用：糖尿病鼠的血管抑素注射眼与 PBS 注射眼相比，表现出视网膜 ($P < 0.01$) 和虹膜 ($P < 0.05$) 血管渗透性的明显降低 (表 2)。血管抑素使这些组织的血管渗透性降低至正常鼠的水平。而在正常鼠玻璃体腔注射相同剂量的血管抑素，与对侧注射 PBS 的对照眼相比，并没有引起视网膜和虹膜血管渗透性的明显降低 ($P > 0.05$) (表 3)。

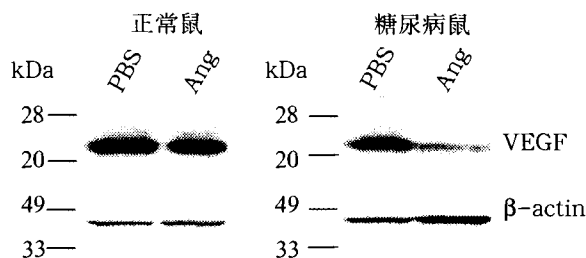
表 2 血管抑素玻璃体腔内注射对 STZ 糖尿病鼠血管渗透性的影响 (μ g/mg)

	视网膜	虹膜
PBS 注射眼	0.32 \pm 0.06	3.50 \pm 0.35
血管抑素注射眼	0.08 \pm 0.03	2.31 \pm 0.48
P 值	$P < 0.01$	$P < 0.05$

表 3 血管抑素玻璃体腔内注射对正常鼠血管渗透性的影响 (μ g/mg)

	视网膜	虹膜
PBS 注射眼	0.11 \pm 0.03	2.15 \pm 0.49
血管抑素注射眼	0.08 \pm 0.06	1.91 \pm 0.35
P 值	$P > 0.05$	$P > 0.05$

3. 血管抑素显著降低了糖尿病鼠视网膜的 VEGF 水平，但在正常鼠中却无此作用。通过 Western blot 免疫印迹方法测量 VEGF 水平，抗 VEGF 抗体识别带约位于 23Kda，经 β -actin 标准化后可见视网膜 VEGF 特异性抗体在 STZ 糖尿病鼠的血管抑素注射眼明显低于 PBS 注射眼，但在正常鼠两眼无明显区别 (图 1)。



注: PBS:PBS 注射眼; Ang:血管抑素注射眼

图 1 血管抑素介导 STZ 糖尿病鼠视网膜 VEGF 表达下调。将 STZ 糖尿病鼠和年龄相匹配的正常成年鼠右眼注射血管抑素 7.5 μ g/眼，左眼注射相同剂量 PBS。用抗 VEGF 抗体 Western blot 印迹法测量视网膜 VEGF 水平。

讨 论

血管抑素是一种有效的血管生成抑制因子，能特异性地抑制血管内皮细胞的增殖并诱导其凋亡^[5]。在本研究中我们发现血管抑素的另一新活性，它可以降低糖尿病鼠的病理性血管渗漏，但对正常鼠无影响；并可以阻断 STZ 糖尿病鼠 VEGF 在视网膜的过量表达，而在正常对照组中无此作用。这些结果提示，血管抑素诱导的血管渗透性的降低可能与其下调 VEGF 的表达有关。过去有报道 STZ 糖尿病鼠的血管渗透性是升高的^[9]，本研究结果与此相符。值得注意的是玻璃体腔注射 PBS 亦可造成糖尿病鼠和正常鼠的视网膜、虹膜血管渗透性升高，这可能与玻璃体腔注射的创伤反应有关。因此，本实验中所有的研究眼在注射血管抑素的同时，均注射相同剂量的 PBS 于对侧眼作对照，以排除创伤反应的影响。

有研究表明，血管抑素可以抑制氧诱导的增殖性视网膜病变新生血管的形成^[10]。而笔者曾报道在氧诱导的增殖性视网膜病变鼠，玻璃体腔注射血管抑素 2 天后并没有引起视网膜新生血管形成减少，而此时其降低血管渗透性的作用达到了高峰^[7]。本研究结果亦表明血管抑素可以显著降低糖尿病鼠的血管渗透性。综上推测血管抑素介导的血管渗透性的降低并不是通过抑制新生血管生成而发生的。

在 DR 早期，视网膜血管渗透性增加先于临床

视网膜病变出现^[1]。非增殖期 DR 就已有明显的血-视网膜屏障破坏, 视网膜渗出水肿, 故有学者认为 VEGF 与 DR 存在着必然联系^[11]。许多证据提示, VEGF 是 DR 血管渗漏的主要致病因素^[12,13], VEGF 也被认为是一种血管渗透性因子^[14,15], 其提高皮肤毛细血管渗透性的效能是组胺的 50,000 倍^[16], VEGF 的过度表达与糖尿病血管渗漏有关^[2]。本研究证实血管抑素阻断糖尿病鼠的 VEGF 在视网膜过度表达, 但对正常鼠无作用。目前, 尚不明确血管抑素是如何阻断 VEGF 的表达。然而, 已经发现血管抑素可抑制 p42/p44 MAP 激酶通路的活性^[17]。有证据表明, p42/p44 MAP 激酶通路在 VEGF 表达调节中起关键作用^[18], 血管抑素介导的 VEGF 表达阻断作用可能与 MAP 激酶通路抑制有关。

在 DR 及葡萄膜炎等眼疾中, 血视网膜屏障的破坏及血管渗透性增加是黄斑水肿的主要原因^[19,20]。目前治疗糖尿病黄斑水肿的方法尚不令人满意, 黄斑水肿依然是糖尿病视力丧失的主要原因。本研究表明, 血管抑素可以降低糖尿病鼠视网膜及虹膜的血管渗透性; 血管抑素下调 VEGF 的表达从而阻断了 DR 视网膜血管渗漏的关键环节。因此, 血管抑素对糖尿病黄斑水肿、黄斑囊样水肿、葡萄膜炎等血管渗漏性疾病具有潜在的治疗价值。

参考文献

- Zhang, S.X., Sima, J., Shao, C. et al. Plasminogen kringle 5 reduces vascular leakage in the retina in rat models of Oxygen-induced retinopathy and diabetes. *Diabetologia*, 2004,47:124-131.
- Aiello, L. P. & Wong, J. S. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Intl. Suppl*, 2000, 77:S113-119.
- Qaum, T., Xu, Q., Jousen, A. M. et al. VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Investigative Ophthalmology & Visual Scienc*, 2001, 42:2408-2413.
- O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y. et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, 79:315-328.
- Claesson-Welsh, L., Welsh, M., Ito, N., Anand-Apte, B. et al. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95:5579-5583.
- Spranger, J., Hammes, H. P., Preissner, K. T. et al. Release of the angiogenesis inhibitor angiostatin in patients with proliferative diabetic retinopathy: association with retinal photocoagulation. *Diabetologia*, 2000, 43:1404-1407.
- Sima, J., Zhang, S.X., Shao, C. et al. The effect of angiostatin on vascular leakage and VEGF expression in rat retina. *FEBS Letters*, 2004, 564:19-23.
- 司马晶, Ma, J., Fant, J., 等. 翼状胬肉与正常角膜和结膜的 PEDF 和 VEGF 水平. *中国实用眼科杂志*, 2004, 22:333-334.
- Antonetti, D. A., Barber, A. J., Khin, S. et al. Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content: vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. *Penn State Retina Research Group. Diabetes*, 1998, 47:1953-1959.
- Meneses, P. I., Hajjar, K. A., Berns, K. I. et al. Recombinant angiostatin prevents retinal neovascularization in a murine proliferative retinopathy model. *Gene Therapy*, 2001, 8:646-648.
- 宋鄂, 董宇, 郝倩, 等. VEGF 与糖尿病视网膜病变早期的关系. *中国实用眼科杂志*, 2003, 21:537-541.
- Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G. et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *New England Journal of Medicine*, 1994, 331:1480-1487.
- Pe'er, J., Shweiki, D., Itin, A., Hemo, I. et al. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Lab. Invest*, 1995, 72:638-645.
- Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *American Journal of Pathology*, 1995, 146:1029-1039.
- Battegay, E. J. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J. Mol. Med*, 1995, 73:333-346.
- Senger, D. R., Connolly, D. T., Van de Water, L. et al. Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Research*, 1990, 50:1774-1778.
- Redlitz, A., Daum, G., Sage, E. H. Angiostatin diminishes activation of the mitogen-activated protein kinases ERK-1 and ERK-2 in human dermal microvascular endothelial cells. *J Vasc Res*, 1999, 36:28-34.
- Pages, G., Milanini, J., Richard, D. E. et al. Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase cascade. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 902:187-200.
- Ciulla, T. A., Danis, R. P., Harris, A. Age-related macular degeneration: a review of experimental treatments. *Surv. Ophthalmol*, 1998, 43:134-146.
- Lopes de Faria, J. M., Jalkh, A. E., Trempe, C. L. et al. Diabetic macular edema: risk factors and concomitants. *Acta Ophthalmol. Scand*, 1999, 77:170-175.

(收稿时间: 2007-01)