

# SDF-1 和 VEGF 在糖尿病大鼠视网膜病变中的表达及 AMD3100 干预作用

游逸安, 赖中燕, 周倩倩

基金项目: 温州市科技局对外科技合作交流项目 (No. H20100012)

作者单位: (325000) 中国浙江省温州市, 温州医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 游逸安, 主任医师, 教授, 研究方向: 视网膜病、青光眼。

通讯作者: 游逸安. yya20032003@gmail.com

收稿日期: 2013-05-30 修回日期: 2013-09-16

## The molecular biological expression of SDF-1 and VEGF in rat diabetic retinopathy and the intervention effect of AMD3100

Yi-An You, Zhong-Yan Lai, Qian-Qian Zhou

**Foundation item:** Scientific and Technological Cooperation and Exchange Item of Wenzhou Science and Technology Bureau (No. H20100012)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China

**Correspondence to:** Yi-An You. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China. yya20032003@gmail.com

Received: 2013-05-30 Accepted: 2013-09-16

### Abstract

• **AIM:** To measure the expression of stromal cell derived factor-1 (SDF-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in retina of diabetic rats model at the different stage and explore the inhibitory effect of AMD3100 on the expression of SDF-1 and VEGF mRNA by RT-PCR and Western-Blot test.

• **METHODS:** RT-PCR and Western-Blot tests were carried out. In RT-PCR test, 60 adult SD rats were divided into normal group, antagonist group, and diabetes group. After diabetic rat model was induced using streptozotocin and antagonist group and diabetic group were injected intravitreally and postocularly with AMD3100 and PBS respectively. All rats were killed and the retina was extracted. after 1, 3, 5 months and the HE stain of paraffin sections was used and the expression of SDF-1 and VEGF mRNA were measured with RT-PCR. In Western-Blot test, 18 rats were divided into normal group, diabetes group and four antagonist groups which were using different concentration of AMD3100, and killed after 3 months.

• **RESULTS:** SDF-1 and VEGF mRNA were expressed in normal group, antagonist group and diabetes group. At

the same age group (1, 3 and 5 months) and among the normal group, antagonist group and diabetes group, the difference of expression of SDF-1 and VEGF mRNA were significant. The expressions in diabetic group were always highest and antagonist group lower than diabetic group. The expression of SDF-1 and VEGF mRNA was increased significantly with the extension of disease. The HE Stain of paraffin sections showed DM group had more cell nucleus which protruded internal limited membranes than normal control group and antagonist group. The Western-Blot test showed in 4 antagonist groups the SDF-1 and VEGF protein expression levels gradually decreased with the increases of SDF-1 antagonist AMD3100 concentration, the difference was significant. When intravitreally injected concentration of AMD3100 increased over 10 $\mu$ g/ $\mu$ L, the expression of SDF-1 and VEGF protein did not change, the difference was not statistically significant

• **CONCLUSION:** With the progression of diabetic retinopathy, the expression of VEGF and SDF-1 mRNA in the retinal tissue of diabetic rats increased. The antagonist AMD3100 could reduce the expression of SDF-1, VEGF and inhibit the development of new blood vessels. In a certain concentration range, this inhibitory effect of AMD3100 was dose-dependent.

• **KEYWORDS:** stromal cell derived factor - 1; vascular endothelial growth factor; AMD3100; diabetic retinopathy

**Citation:** You YA, Lai ZY, Zhou QQ. The molecular biological expression of SDF-1 and VEGF in rat diabetic retinopathy and the intervention effect of AMD3100. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(10):1960-1964

### 摘要

**目的:** 探讨不同时期糖尿病大鼠视网膜中基质细胞衍生因子-1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) mRNA 的表达, 以及不同剂量 SDF-1 拮抗剂 3100 对 SDF-1 表达的抑制作用。

**方法:** 将实验大鼠分为正常组、拮抗剂组、糖尿病组。腹腔注射链脲佐菌素建立大鼠糖尿病模型。拮抗剂组、糖尿病组分别于成模后 1wk 玻璃体腔注射 AMD3100 和 PBS。随后各组球后多次球后注射相应药物。实验方法采用 RT-PCR 和 Western-Blot。RT-PCR 实验共饲养三组大鼠 60 只, 各组均于 1, 3, 5mo 处死部分大鼠, 各组提取标本, RT-PCR 检测并 HE 染色观察视网膜血管增生情况。Western-Blot 实验将 18 只大鼠分为正常对照组、4 组不同剂量 AMD3100 的拮抗剂组及糖尿病组共 6 组, 饲养时间均为 3mo。

**结果:**RT-PCR 检测 1,3,5mo 各同龄组中三组间大鼠视网膜 SDF-1 和 VEGF mRNA 的表达均有显著统计学差异 ( $P < 0.01$ ),且均以糖尿病组表达最高,拮抗剂组的表达低于糖尿病组。随着糖尿病病程的延长,SDF-1 和 VEGF mRNA 的表达进一步增加,视网膜 HE 染色切片上突破内界膜的内皮细胞核数明显增加。Western-Blot 检测表明,在一定范围内随着拮抗剂 AMD3100 浓度的增大,SDF-1 和 VEGF 的蛋白表达量逐渐减少,差异具有显著统计学差异 ( $P < 0.01$ );当继续增加浓度(玻璃体腔注射  $> 10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ),SDF-1 和 VEGF 的蛋白表达量无明显改变,差异无统计学意义(4 和 5 组相比,  $P > 0.05$ )。

**结论:**随着糖尿病视网膜病变病程的进展,糖尿病大鼠视网膜组织里 VEGF 和 SDF-1 mRNA 的表达量增加。SDF-1 受体拮抗剂 AMD3100 可降低 SDF-1 和 VEGF 的蛋白表达。这种拮抗作用在一定的浓度范围内,其抑制作用有剂量依从性,剂量越大,抑制作用越强。

**关键词:**基质细胞衍生因子-1;血管内皮生长因子;拮抗剂;糖尿病视网膜病变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.10.05

**引用:**游逸安,赖中燕,周倩倩. SDF-1 和 VEGF 在糖尿病大鼠视网膜病变中的表达及 AMD3100 干预作用. 国际眼科杂志 2013;13(10):1960-1964

## 0 引言

视网膜微循环障碍是增生性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 的病理基础,细胞因子则贯穿于整个过程之中。基质细胞衍生因子-1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1) 是一种具有趋化活性的细胞因子。最新研究表明,SDF-1/CXCR4 不仅广泛参与体内各类炎症及新生血管形成有关的疾病,在各种原因导致的视网膜新生血管的形成过程中,SDF-1 起着相当重要作用<sup>[1]</sup>。由于目前 SDF-1 与糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 中的研究主要局限于临床上 DR 患者玻璃体中 SDF-1 浓度与 DR 病变的研究,缺乏这方面动物实验和深入的基础研究。本实验通过建立糖尿病大鼠模型,测定视网膜中 SDF-1 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的含量,并玻璃体腔注射 SDF-1 拮抗剂 AMD3100,探索在糖尿病大鼠中 SDF-1 在视网膜中的表达和 AMD3100 对该模型大鼠视网膜中 SDF-1 的抑制作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** RT-PCR 方法选取清洁型雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 190 ~ 220g,鼠龄 6 ~ 7 周龄(上海斯莱克实验动物有限责任公司提供),于 SPF 级动物饲养房内饲养;采用随机数字表法将大鼠随机分成糖尿病组 (DM,  $n = 21$ )、拮抗剂组 (AGN,  $n = 21$ ) 和正常对照组 (CON,  $n = 18$ );按饲养时间不同,每组又分 3 个亚组,即 1mo 组 (M1 组)、3mo 组 (M3 组)、5mo 组 (M5 组)。蛋白免疫印迹 (Western-Blot, WB) 方法取上述同样 18 只大鼠随机分 6 组,每组 3 只,其中组 1 为糖尿病组,组 2 ~ 5 为不同浓度拮抗剂组,组 6 为正常对照组。

## 1.2 方法

**1.2.1 糖尿病模型的建立及分组给药** 实验大鼠禁食 12h 后,用新鲜配置 0.1mmol/L pH=4.5 的枸橼酸盐缓冲液稀

释链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ),以 60mg/kg 一次性腹腔内注射诱导建立糖尿病大鼠模型。14d 尾静脉采血测血糖稳定,并保持于 1wk 内均  $\geq 16.7\text{mmol/L}$ ,确定成模并纳入实验。RT-PCR 实验中,拮抗剂组于 STZ 注射大鼠糖尿病成模后 2wk 采用改制的 10 $\mu\text{L}$  微量进样器加诺和龙针头,在双眼玻璃体内注射拮抗剂 AMD3100 (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 2 $\mu\text{L}$  (PBS 溶液稀释)。DM 组玻璃体内注射 PBS 溶液 2 $\mu\text{L}$ 。之后分别在拮抗组双眼球后注射 AMD3100 (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 和 DM 组注射 PBS 溶液 20 $\mu\text{L}$ ,每周 1 次,连续 6wk,最后改为 2wk 1 次球后注射。用于 Western-Blot 实验的拮抗剂组大鼠于糖尿病成模后 2wk 按不同浓度 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (AGN1 组)、5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (AGN2 组)、10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (AGN3 组)、15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (AGN4 组) 分别行玻璃体腔注射 2 $\mu\text{L}$  AMD3100。糖尿病组玻璃体腔注射 PBS 液 2 $\mu\text{L}$ 。以上大鼠模型在玻璃体腔注射 2wk 后按原每组不同浓度每周 1 次球后注射 20 $\mu\text{L}$ ,饲养期为 3mo。

**1.2.2 眼球的取材与固定** 分别于造模后 1,3,5mo 末称体质量、测空腹血糖后,以乙醚吸入麻醉,处死大鼠并取出眼球,于锯齿缘后 0.5mm 处剪开眼球壁,轻轻除掉眼前节和玻璃体,4 $^{\circ}\text{C}$  冷 PBS 液中快速剥离视网膜。RT-PCR 检测取双眼视网膜作为一个标本,各组放入含有 1mL RNAlater 保存液的 1.5mL 进口冻存管中,-80 $^{\circ}\text{C}$  低温。以备进行实时定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 研究。另外各组大鼠处死后取其眼球,去除前节后甲醛溶液固定、石蜡包埋并行 HE 染色。用于 Western-Blot 检测的大鼠于 3mo 后同样处死、取出眼球、剥离视网膜后,直接-80 $^{\circ}\text{C}$  低温保存。

**1.2.3 RT-PCR 检测视网膜 SDF-1 和 VEGF mRNA 含量** 从 RNAlater 保存液中取出样本,加入 1mL Trizol 后组织匀浆,常规分离抽提 RNA。取溶解后的样品分别用微量分光光度仪于  $A_{260}$  及  $A_{280}$  下测吸收值,测定 RNA 溶液纯度,  $A_{260}/A_{280}$  比值范围在 1.8 ~ 2.0,说明 RNA 纯度较高,可进行 RT-PCR 实验。对所抽提 RNA 样本进行电泳检测。琼脂糖凝胶电泳显示 28S,18S 和 5S RNA 条带的亮度。取总 RNA 为模板,根据反转录试剂盒提供方法以随机引物逆转录合成模板 cDNA,同时进行半定量 RT-PCR 检测。利用 DNASTAR 引物设计软件(上海捷瑞生物工程有限公司)设计引物。内参基因的双向引物为:5'-AGTCGCC GTGCCTACCAT-3' 和 5'-CGGGTCGGGAGTGGGTAA-3',长度为 129bp。目的基因 SDF-1 的双向引物为:5'-GATGCCCTGCCGATTCCTTT-3' 和 5'-GTCCTTTGGGCTGT TGTGCTTACT-3',长度为 204bp; VEGF 的双向引物为:5'-CCGGACGGCCTCTGAAACCAT-3' 和 5'-CAGCAGCCCGC ACACCGCATTAG-3',长度为 277bp。反应参数为:95 $^{\circ}\text{C}$  3min,循环体:95 $^{\circ}\text{C}$  30s,55 $^{\circ}\text{C}$  30s,72 $^{\circ}\text{C}$  30s,35 ~ 40 个循环,延伸:72 $^{\circ}\text{C}$  15min。将各个样品的内参基因 (18s) 与目的基因 (SDF-1 和 VEGF) 分别进行 PCR 反应。按照稀释的标准曲线,各样品的内参基因与目的基因的浓度由机器自动产生,每个样品的目的基因浓度除以其相对应的内参基因,就是此样品里基因的最后含量。

**1.2.4 Western-Blot 检测视网膜 SDF-1 和 VEGF 蛋白的含量** 将所取的单眼视网膜加入细胞组织裂解液约 500 $\mu\text{L}$ ,在冰上用高速组织分散器匀浆,10000r/min 离心 5min 后转移上清至新管中,蛋白与等体积的上样缓冲液混匀,100 $^{\circ}\text{C}$  加热 5 ~ 10min,经过 SDS-PVDF 凝胶电泳,半

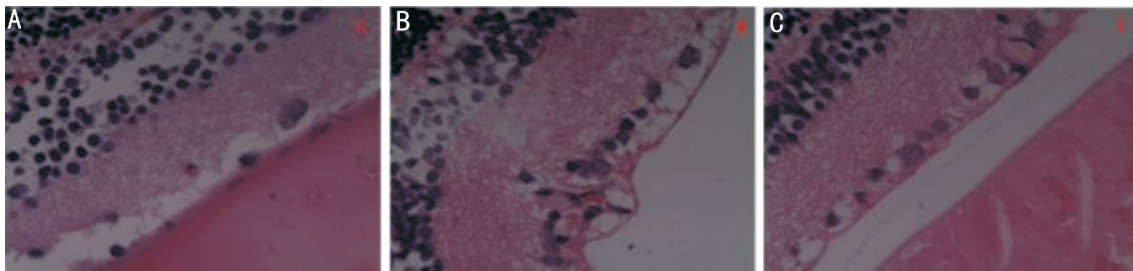


图1 HE染色观察视网膜血管增生情况 A:DM 5mo组视网膜细胞极度水肿,可见突大量破内界膜的细胞核; B:AGN 5mo组视网膜细胞水肿减轻,突破内界膜的内皮细胞核减少;C:CON 5mo组未见内皮细胞核突破内界膜。

干式转膜,50g/L脱脂奶粉封闭1h,然后分别加入1:500稀释的兔抗大鼠SDF-1和VEGF抗体(美国Abcam公司),4℃下孵育过夜,洗膜后加入结合辣根过氧化物的二抗(1:20000),室温孵育1h,洗膜后应用ECL显色剂显影,用Bio-Rad的凝胶成像系统照相并进行光密度分析。同法检测β-actin内参照蛋白,通过目的基因与内参基因条带的光密度比值作为SDF-1和VEGF蛋白的相对含量分析。

统计学分析:采用SPSS 17.0软件包进行统计分析,实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组先行正态分布检验。各组间均值差异比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐者用LSD-*t*检验,方差不齐者用Dunnett<sup>2</sup>-*t*。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠的基本情况** 用于RT-PCR检测的60只大鼠在建模和饲养的过程中死亡3只,无正常组大鼠死亡。DM组和拮抗剂组大鼠成功建模后饲养的过程中,无血糖返回正常现象,食量、饮水量及尿量均显著增加,同时体质量增长显著缓慢,并出现皮毛枯黄、晶状体发白等。各组大鼠处死前平均血糖无统计学差异( $P > 0.05$ ,表1)。用于Western-Blot检测的18只大鼠3mo后血糖,糖尿病组均值为 $27.6 \pm 3.1$ mmol/L,各拮抗剂组为 $26.9 \pm 3.7$ mmol/L、正常组为 $5.7 \pm 1.1$ mmol/L,糖尿病组与拮抗剂各组相比无统计学差异( $P > 0.05$ ),糖尿病组、拮抗剂各组与正常组相比有显著统计学差异( $P < 0.01$ )。

**2.2 HE染色观察视网膜血管增生情况** 大鼠糖尿病组1mo可见少量的内皮细胞突破内界膜,正常对照组和拮抗剂组大鼠视网膜内界膜平整,结构清楚。3mo大鼠糖尿病组,视网膜表面可见明显的血管内皮细胞核突破内界膜,并且视网膜内界膜下细胞增殖,排列紊乱。糖尿病5mo组(DM5)表现最明显,并可见新生血管芽(有些毛细血管腔中可见红细胞)。在DM5组,视网膜表面可见少量的血管内皮细胞核突破内界膜,较相应的糖尿病组突破内界膜的内皮细胞明显减少;视网膜内界膜下虽然排列也不整齐,表现明显轻于相应的糖尿病组,但更接近于正常组(图1)。各组大鼠突破内界膜的内皮细胞核数见表2。采用单因素方差分析,各期切片平均突破内界膜内皮细胞核数在糖尿病组有统计学差异( $P < 0.05$ ),而在拮抗剂组各期差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。糖尿病各期平均突破内界膜内皮细胞核数与相应的正常对照组(CON组)比较,差异有显著统计学意义( $P < 0.01$ ),与拮抗剂组相比也具有显著统计学差异( $P < 0.01$ )。

## 2.3 各组视网膜SDF-1和VEGF mRNA含量

**2.3.1 各组SDF-1 mRNA含量的比较** 各组视网膜上

表1 RT-PCR各组大鼠处死前平均血糖情况( $\bar{x} \pm s$ ,mmol/L)

分组	1mo	3mo	5mo	P
正常对照组	5.8±1.0	5.9±1.5	5.4±1.3	>0.05
糖尿病组	25.9±3.6	27.8±1.3	26.6±4.0	>0.05
拮抗剂组	25.3±3.8	25.8±1.5	27.4±3.5	>0.05

表2 突破内界膜的内皮细胞核个数 ( $\bar{x} \pm s$ ,个/高倍镜)

分组	1mo组	3mo组	5mo组	P
正常对照组	0.78±0.66	0.87±1.09	1.02±0.86	>0.05
糖尿病组	13.33±3.04 <sup>b</sup>	22.77±8.13 <sup>b</sup>	30.77±14.59 <sup>b</sup>	<0.01
拮抗剂组	7.11±2.66 <sup>d</sup>	12.55±2.01 <sup>d</sup>	13.05±3.39 <sup>d</sup>	<0.05

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 拮抗剂组、正常对照组;<sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组。

SDF-1 mRNA的表达量见表3。正常组、拮抗剂组和糖尿病组视网膜上均有SDF-1 mRNA的表达,同龄组中糖尿病组的表达显著性增高,且三组中各同龄组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。DM大鼠视网膜组织里SDF-1 mRNA的表达量随着病程的延长而增加(糖尿病1,3,5mo组相比, $F = 20.598, P < 0.01$ ;1,3mo组及3,5mo组相比, $P < 0.05$ );和同龄正常对照组大鼠相比较,DM大鼠视网膜组织中SDF-1 mRNA的表达量1mo时就明显升高( $P < 0.05$ ),3mo时mRNA明显增高( $P < 0.01$ ),5mo时差异更为显著( $P < 0.01$ );和同龄正常对照组大鼠相比较,拮抗剂组大鼠视网膜组织中SDF-1 mRNA的表达量均轻度升高( $P < 0.05$ );和同龄拮抗剂组大鼠相比较,糖尿病组大鼠视网膜组织里SDF-1 mRNA的表达量均升高(1,3mo组 $P < 0.05$ ,5mo组 $P = 0.001$ )。

**2.3.2 各组VEGF mRNA含量的比较** 各组视网膜上VEGF mRNA的表达量见表4。正常组、拮抗剂组和糖尿病组视网膜上均有VEGF mRNA的表达,且同龄组中糖尿病组的表达显著性增高。三组中各同龄组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。且DM大鼠视网膜组织中VEGF mRNA的表达量随着病程的延长而增加(糖尿病1,3,5mo组相比, $F = 24.332, P < 0.01$ ;1,3mo组及3,5mo组相比, $P < 0.05$ );和同龄正常对照组大鼠相比较,DM大鼠视网膜组织中VEGF mRNA的表达量1mo时就明显升高( $P < 0.05$ ),3mo时mRNA明显增高( $P < 0.01$ ),5mo时差异更为显著( $P < 0.01$ );和同龄正常对照组大鼠相比较,拮抗剂组大鼠视网膜组织中VEGF mRNA的表达量均轻度升高( $P < 0.05$ );和同龄拮抗剂组大鼠相比较,糖尿病组大鼠视网膜组织中VEGF mRNA的表达量均升高(1mo组 $P < 0.05$ ,3mo组 $P < 0.05$ ,5mo组 $P < 0.01$ )。

## 2.4 各组视网膜SDF-1和VEGF蛋白含量

**2.4.1 各组SDF-1蛋白含量的比较** 糖尿病对照组、4个

分组	1mo 组	3mo 组	5mo 组	P
正常对照组	50.23±10.92	66.55±30.04	70.04±35.02	>0.05
糖尿病组	356.59±123.42 <sup>b</sup>	667.87±66.02 <sup>b</sup>	909.74±118.35 <sup>b</sup>	<0.01
拮抗剂组	85.74±11.79 <sup>d</sup>	166.23±125.44 <sup>d</sup>	270.85±152.04 <sup>d</sup>	<0.01
P	<0.01	<0.01	<0.01	

<sup>b</sup>P<0.01 vs 拮抗剂组、正常对照组; <sup>d</sup>P<0.01 vs 正常对照组。

分组	1mo 组	3mo 组	5mo 组	P
正常对照组	14.65±9.68	16.98±5.24	14.96±6.29	>0.05
拮抗剂组	28.35±9.16	35.57±10.02	36.76±4.76	<0.05
糖尿病组	48.94±6.66	60.54±8.96	96.58±10.16	<0.01
P	<0.01	<0.01	<0.01	

拮抗剂组及正常对照组的视网膜上均有 SDF-1 的蛋白表达(图2,表5),且糖尿病组的表达显著性增高,差异有统计学意义(六组相比,  $F=462.329, P<0.01$ ),糖尿病组大鼠与拮抗剂各组大鼠相比,视网膜组织中 SDF-1 的蛋白表达量明显升高,差异有显著统计学意义(糖尿病组与4个拮抗剂组两两相比,均  $P<0.01$ ),随着 SDF-1 拮抗剂 AMD3100 浓度的增大, SDF-1 的蛋白表达量逐渐减少,差异具有显著统计学意义(AGN1 组和 AGN2 组, AGN2 组和 AGN3 组两两相比,  $P<0.01$ )。当拮抗剂浓度增加到拮抗剂 3 组后,如继续增加浓度, SDF-1 的蛋白表达量无明显改变,差异没有统计学意义(AGN3 组和 AGN4 组相比,  $P>0.05$ )。糖尿病组与正常组大鼠、拮抗剂组与正常组大鼠相比, SDF-1 的蛋白表达量均有升高,差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。

**2.4.2 各组 VEGF 蛋白含量的比较** 糖尿病对照组、4 个拮抗剂组及正常对照组的视网膜上均有 VEGF 的蛋白表达(图2,表5),且同龄组中糖尿病组的表达显著性增高,差异有统计学意义(六组相比,  $F=851.432, P<0.01$ ),糖尿病组大鼠与拮抗剂各组大鼠相比,视网膜组织中 VEGF 的蛋白表达量明显升高,差异有显著统计学意义(糖尿病组与4个拮抗剂组两两相比,均  $P<0.01$ ),随着 SDF-1 拮抗剂 AMD3100 浓度的增大, VEGF 的蛋白表达量逐渐减少,差异具有显著统计学意义(AGN1 组和 AGN2 组, AGN2 组和 AGN3 组两两相比,  $P<0.01$ )。当拮抗剂浓度增加到拮抗剂 3 组后,如继续增加浓度, VEGF 的蛋白表达量无明显改变,差异没有统计学意义(AGN3 组和 AGN4 组相比,  $P>0.05$ )。糖尿病组与正常组大鼠、拮抗剂组与正常组大鼠相比, VEGF 的蛋白表达量均有升高,差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。

### 3 讨论

DR 的实质是进展性的微血管病变,其中在 DR 的病变进展中视网膜新生血管的异常增殖是一个重要的病理改变。因为正常的视网膜血管不会突破内界膜,故可以认为突破内界膜的血管为视网膜的新生血管芽。本实验通过采用计数突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目的方法来评价视网膜新生血管的增殖情况。本研究中 DM 组大鼠随着糖尿病病程的延长, HE 染色可见血管内皮细胞核突破内界膜并数量增多,视网膜内界膜下细胞增殖,排列紊乱,在 5mo 组表现最明显,并可见新生血管芽,有些

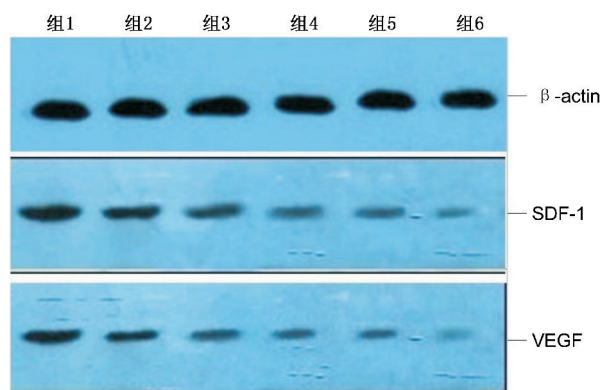


图2 各组 Actin 和 SDF-1 及 VEGF 的蛋白表达 组1:糖尿病组;组2:AGN1 组;组3:AGN2 组;组4:AGN3 组;组5:AGN4 组;组6:正常对照组。

分组	SDF-1	VEGF
糖尿病组	0.96±0.026	0.867±0.011
AGN1 组	0.76±0.017	0.673±0.014
AGN2 组	0.62±0.015	0.565±0.008
AGN3 组	0.51±0.007	0.453±0.013
AGN4 组	0.51±0.013	0.455±0.016
正常组	0.38±0.016	0.306±0.007

毛细血管腔中可见红细胞。这一结果表明,大鼠 DR 病变随着糖尿病病程的延长而加重,血管增殖更为明显。

SDF-1 是由骨髓基质细胞及其他组织的基质细胞分泌释放的一种 CXC 类细胞趋化因子, CXCR4 是目前已知 SDF-1 唯一的特异性受体。SDF-1 通过与 CXCR4 结合可以诱导骨髓来源的内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs) 移行至缺血缺氧组织并参与构成新生血管<sup>[2]</sup>。已有研究表明 PDR 患者眼部病变越严重,玻璃体中的 SDF-1 浓度越高。本实验利用 RT-PCR 技术发现,在正常对照组大鼠视网膜组织上存在 SDF-1,且表达相对较弱,这与袁源智等<sup>[3]</sup>结果相符。DM 大鼠视网膜组织上 SDF-1 mRNA 的表达显著高于同龄正常组,且随着病程的延长而增加(5mo 组,  $P<0.01$ )。糖尿病 1,3,5mo 组分别为 356.597±123.416, 667.873±66.018, 909.740±118.353, 差异有统计学意义 ( $F=20.598, P<0.05$ )。这表明,在 DM 大

鼠视网膜组织上 SDF-1 mRNA 的表达随着糖尿病 DR 病变的加重而增加,与以往人体 DR 玻璃体研究结果相符<sup>[4,5]</sup>。

本实验发现随着糖尿病 DR 病变的加重,视网膜中 VEGF mRNA 的表达也明显升高,糖尿病 1,3,5mo 组分别为 48.937±6.675,60.540±8.975,96.580±10.158,差异有统计学意义( $F=24.332, P<0.01$ )。这也提示了 VEGF 在新生血管形成中扮演着重要的角色。VEGF 通过影响细胞增殖、细胞迁移、诱导毛细血管腔形成,从而促进新生血管的生成和生长。

在血管新生的过程中 SDF-1/CXCR4 与 VEGF 有着复杂的关系。研究表明, CXCR4 在碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和 VEGF 的刺激下,可上调表达,从而使内皮细胞对 SDF-1 更加敏感。同时, SDF-1 也可以一个正反馈的形式促进 bFGF 和 VEGF 的分泌<sup>[6]</sup>。有离体实验证实了 AMD3100 能够降低由 VEGF 诱导的新生血管的形成数量<sup>[7]</sup>。Butler 等<sup>[4]</sup>在 PDR 玻璃体腔注射曲安奈德可使囊样黄斑水肿和活动性的新生血管消退,同时可显著降低 SDF-1 和 VEGF 的水平。在缺血缺氧视网膜动物模型中发现,动物玻璃体内注射 SDF-1 中和抗体后,即使有外源性 VEGF 的存在,也无视网膜新生血管的发生<sup>[4]</sup>。这一实验也证实了这个细胞因子调节的反馈机制的存在。

体外研究显示<sup>[8]</sup>,通过使用 AMD3100 来抑制 SDF-1/CXCR4 信号通路,能够破坏人类胚胎内皮细胞的芽生。应用 AMD3100 选择性拮抗 CXCR4 可以完全抑制由 SDF-1 介导的血管芽生增加<sup>[9]</sup>。通过 AMD3100 来拮抗其 CXCR4 与 SDF-1 的结合,减弱 EPCs 的趋化效应,从而抑制由 EPCs 介导的新生血管的生长。本研究发现 DM 大鼠应用拮抗剂 AMD3100 后,各拮抗组与同龄 DM 大鼠相比,拮抗剂组大鼠视网膜组织里 SDF-1 mRNA 的表达量均明显下降(1 和 3mo 组均  $P<0.05$ , 5mo 组  $P<0.01$ ), HE 染色突破内界膜的内皮细胞核数明显减少( $P<0.01$ )。这表明拮抗剂 AMD3100 可降低 DM 大鼠 SDF-1 的表达,从而抑制视网膜新生血管的增生。本实验也发现与同龄糖尿病组大鼠相比较,在 SDF-1 的表达下降的同时,拮抗剂组大鼠视网膜组织中 VEGF mRNA 的表达量也明显下降(1 和 3mo 组  $P<0.05$ , 5mo 组  $P<0.01$ ),这也再一次证明了这个细胞因子调节的反馈机制的存在。可以认为 AMD3100 通过拮抗 SDF-1 的受体 CXCR4,削弱了 SDF-1 与 CXCR4 相结合所产生的效应,进而 VEGF 蛋白的表达量也减少,最终起到了抑制新生血管生成的作用。

Carr 等在大鼠主动脉环离体的培养模型中,发现 SDF-1 可以依赖剂量诱导血管出芽,给予 10 $\mu$ mol/L AMD3100 后血管出芽减少了 50%,具有明显的抑制效果<sup>[8]</sup>。本实验采用不同浓度拮抗剂 AMD3100,应用 Western-Blot 检测视网膜 SDF-1 和 VEGF 含量,以了解 AMD3100 抑制新生血管生成的量效关系。发现随着拮抗剂浓度的增大, SDF-1 和 VEGF 的蛋白表达量逐渐减少,差异具有显著统计学差异(2 和 3 组, 3 和 4 组两两相比,  $P<0.01$ )。说明在一定的范围内增大拮抗剂浓度,可有效地增加 AMD3100 的拮抗作用,表现为剂量依从关系。但当增加到第 4 组(10 $\mu$ g/ $\mu$ L)时,继续增加浓度, SDF-1 和 VEGF 的蛋白表达量无明显改变,差异没有统计学意义(4 和 5 组相比,  $P>0.05$ )。徐庆胡等<sup>[10]</sup>发现应用小剂量玻璃体腔内注射

AMD3100(8g/L)与大剂量(80g/L)相比结果无差异性,与本文结果相符。本结果说明随着 AMD3100 剂量的增大,受体与之结合增多,增强药物作用。当受体达到饱和后,其作用将不再增强。

AMD3100,商品名 Plerixafor,为一种化学合成药物,分子量为 502.79<sup>[11]</sup>,是美国 Genzyme 公司研发的趋化因子受体 4(CXCR4)的专一性拮抗剂,已用于多发性骨髓瘤与霍杰金淋巴瘤患者干细胞移植的临床实验<sup>[12]</sup>。此药的半衰期约为 8~9h。动物实验方面报道,目前采用 AMD3100(2.5mg/kg)隔天腹腔注射一次<sup>[13]</sup>。在玻璃体内注射剂量有不同报道。汪枫桦等<sup>[14]</sup>采取玻璃体腔内一次性注射 AMD3100 5 $\mu$ g,而徐庆胡等<sup>[10]</sup>一次性注射 8 $\mu$ g 和 80 $\mu$ g。由于血-视网膜屏障作用玻璃体内注药可使药物在玻璃体内维持相对较长时间。Butler 等对大鼠玻璃体注射 CXCL12/SDF-1 中和抗体 MAB310 采用 1 次注入,可维持有效浓度 1mo<sup>[8]</sup>。但 AMD3100 为分子化学合成药物,分子量相对较小,故易通过血-视网膜屏障。本实验周期长,采取玻璃体腔内注射 AMD3100 溶液 1 次后每周采用球后注射,以弥补药效的衰减作用。结果表明这一方法可有效抑制大鼠糖尿病视网膜病变的进展。有关这一药物的应用方法、疗效尚有待于更多实验的探讨。

#### 参考文献

- 1 袁源智,袁非,黎蕾,等. 实验性糖尿病对视网膜基质细胞衍生因子 1 表达的影响. 中华眼科杂志 2007; 43(10):912-916
- 2 Otani A, Kinder K, Ewalt K, et al. Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. *Nat Med* 2002; 8(9):1004-1010
- 3 袁源智,袁非,黎蕾,等. 基质细胞衍生因子-1 在 Wistar 大鼠视网膜上的生理性表达. 眼科研究 2007; 25(7):518-521
- 4 Butler JM, Guthrie SM, Koc M, et al. SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy. *J Clin Invest* 2005; 115(1):86-93
- 5 游逸安,许雯怡,朱乐如. 增殖性糖尿病视网膜病变玻璃体与血清 SDF-1, VEGF 含量分析. 医学研究杂志 2013; 42(1):100-104
- 6 Guinto G, del Valle R, Nishimura E, et al. Primary empty sella syndrome: the role of visual system herniation. *Surg Neurol* 2002; 58(1):42-48
- 7 Unoki N, Murakami T, Nishijima K, et al. SDF-1-CXCR4 contributes to the activation of tip cells and microglia in retinal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:3362-3371
- 8 Chen T, Bai H, Shao Y, et al. Stromal cell-derived factor-1/CXCR4 signaling modifies the capillary-like organization of human embryonic Stem cell-derived endothelium *in vitro*. *Stem Cells* 2007; 25(2):392-401
- 9 Carr AN, Howard BW, Yang HT, et al. Efficacy of systemic administration of SDF-1 in a model of vascular insufficiency: support for an endothelium-dependent mechanism. *Cardiovas Res* 2006; 69(4):925-935
- 10 徐庆胡,袁源智,王历阳,等. AMD3100 对小鼠高氧诱导视网膜病变中新生血管的抑制作用. 中华眼科杂志 2012; 48(4):350-355
- 11 苏靖,刘瑶,郑志兵,等. Plerixafor 的合成. 中国医药工业杂志 2007; 38(6):398-400
- 12 De Clercq E. Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100. *Mini Rev Med Chem* 2005; 5(9):805-824
- 13 周晓峰,王佐. AMD3100 促进载脂蛋白 E-/-小鼠动脉粥样硬化斑块形成. 中国动脉硬化杂志 2008; 16(6):445-448
- 14 汪枫桦,姜媛,王雯,等. CXCR4 抑制剂与抗血管内皮生长因子抗体联合应用对实验性脉络膜新生血管形成的干预作用. 中华眼底病杂志 2011; 27(6):553-556