

VEGF 和 MMP-9 在大鼠视网膜缺血再灌注损伤中表达及相关性研究

吴鹏程, 张文芳, 张 书

作者单位: (730030) 中国甘肃省兰州市, 兰州大学第二医院眼科
作者简介: 吴鹏程, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 白内障、眼底病。

通讯作者: 张文芳, 女, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向: 眼底病。
zhwenf888@163.com

收稿日期: 2013-12-18 修回日期: 2014-04-10

Expression levels and correlation of VEGF and MMP-9 in rat retinal ischemia/reperfusion injury

Peng-Cheng Wu, Wen-Fang Zhang, Shu Zhang

Department of Ophthalmology, Affiliated Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Correspondence to: Wen - Fang Zhang. Department of Ophthalmology, Affiliated Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. zhwenf888@163.com

Received: 2013-12-18 Accepted: 2014-04-10

Abstract

• AIM: To investigate the expression levels and correlation of VEGF and MMP-9 in the retinal ischemia/reperfusion injury (RIRI).

• METHODS: Eighty-four Wistar rats were divided into normal control group and at 6h, 12h, 24h, 48h, 3d and 7d group after retinal ischemia/reperfusion. The model of RIRI was constructed by elevating the intraocular pressure. The expression levels of VEGF and MMP-9 was measured using immunohistochemical staining.

• RESULTS: No VEGF positive cells were found in normal group and it began to express at 12h, increased gradually and reached maximal levels at 48h after RIRI. MMP-9 positive expression was rarely detected in the normal control group and began to increase at 6h, reached the peak at 24h. There was statistical difference between normal control group and ischemia/reperfusion group ($P < 0.01$) with regard to the expression of VEGF and MMP-9. The expression of VEGF was positively correlated to MMP-9 ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: The high expression of VEGF and MMP-9 is significantly correlated with RIRI and may play an important role in the occurrence and development of retinal ischemic injury.

• KEYWORDS: retina; ischemia/reperfusion injury; vascular endothelial growth factor; matrix metalloproteinase-9

Citation: Wu PC, Zhang WF, Zhang S. Expression levels and correlation of VEGF and MMP-9 in rat retinal ischemia/reperfusion injury. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(5):815-818

摘要

目的: 研究 VEGF 和 MMP-9 在大鼠视网膜缺血再灌注中的表达以及两者的相关性。

方法: 将 84 只健康成年 Wistar 大鼠随即分为正常对照组和缺血再灌注后 6, 12, 24, 48h; 3, 7d 组, 每组 12 只。采用升高眼内压的方法建立视网膜缺血再灌注模型, 应用免疫组织化学法检测大鼠视网膜缺血再灌注损伤 (retinal ischemia/reperfusion injury, RIRI) 后视网膜组织 VEGF 和 MMP-9 表达的变化。

结果: 正常对照组未见 VEGF 阳性表达, 视网膜缺血再灌注后 12h 开始出现 VEGF 的表达, 48h 达到高峰, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。缺血再灌注后 6h MMP-9 的表达开始增加, 24h 后达到高峰。正常对照组几乎未检测到 MMP-9 的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。经相关性分析发现, 缺血组视网膜 VEGF 和 MMP-9 的表达呈正相关 ($r = 0.834, P < 0.05$)。

结论: VEGF 和 MMP-9 在视网膜缺血再灌注损伤中的表达呈正相关, 两者可能协同作用, 在视网膜缺血性病变的发生发展中起重要作用。

关键词: 视网膜; 缺血再灌注损伤; 血管内皮生长因子; 基质金属蛋白酶

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.05.07

引用: 吴鹏程, 张文芳, 张书. VEGF 和 MMP-9 在大鼠视网膜缺血再灌注损伤中表达及相关性研究. 国际眼科杂志 2014; 14(5):815-818

0 引言

视网膜缺血再灌注损伤 (retinal ischemia/reperfusion injury, RIRI) 是眼科常见的病理过程, 也是造成视力损害和致盲的主要原因之一。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是目前已知最主要的血管生成因子, 在调节新生血管的生成中起重要作用^[1]。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 是一组降解细胞外基质成分的蛋白水解酶, 他可以降解几乎所有的细胞外基质成分, 其中基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 和基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 是分布最广泛的两种亚型, 尤其 MMP-9 可特异降解内皮细胞紧密连接蛋白, 在血管生成中的作用日益引起研究者的关注^[2]。已有研究发现 VEGF 和 MMP-9 在 RIRI 中表达增加^[3, 4], 但其作用机制至今尚未完全阐明。本研究主要观察大鼠 RIRI 模型中视

网膜 VEGF 及 MMP-9 的表达变化规律以及两者的相关性,探讨两者在 RIRI 中的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 选用 84 只 SPF 级健康成年 Wistar 大鼠(由甘肃中医学院实验动物中心提供),雌雄不限,体质量 220±20g,裂隙灯下检查角膜透明,瞳孔等大等圆,虹膜血管清晰,晶状体无混浊。将所选大鼠随机分为 7 组:正常对照组、缺血再灌注后 6,12,24,48h,3,7d 组,每组 12 只。

1.1.2 缺血再灌注模型的建立 模型的建立采用前房内生理盐水灌注法^[5]。大鼠称重,用体积分数 10% 水合氯醛 3.5mL/kg 腹腔注射麻醉,麻醉满意后,将大鼠取俯卧位固定于鼠台上,随机选取每只大鼠一眼造模,10g/L 地卡因点眼局部麻醉,复方托吡卡胺散瞳,用氯霉素滴眼液冲洗结膜囊,将连接生理盐水瓶输液管的 4 号半头皮针沿颞侧角巩膜缘刺入大鼠眼前房,避免损伤虹膜和晶状体,胶布固定头皮针于大鼠同侧耳缘处。缓慢升高输液瓶至与大鼠实验眼垂直距离 150cm 处,此时眼压 110mmHg (1mmHg=0.133kPa),可见球结膜及虹膜迅速变白,视网膜颜色苍白,说明视网膜中央动脉的供血完全阻断。氯霉素眼液滴眼以保持角膜湿润并预防感染。持续形成高眼压造成视网膜缺血 60min 后,缓慢降低输液瓶高度至大鼠眼球水平,使眼压缓慢降低。关闭输液器,拔出输液针头,虹膜及球结膜颜色迅速恢复正常,眼底视网膜恢复橘红色,说明受阻血流重新开放。术毕结膜囊涂红霉素眼膏,待清醒后回笼。

1.1.3 主要试剂 鼠抗 VEGF 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),羊抗 MMP-9 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),二抗及 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 标本的取材及固定 按实验预定时间腹腔注射过量麻醉药处死各组大鼠,在眼球 3:00 或 9:00 方位做好标记后,立即摘取眼球,保留视神经大约 0.5~1mm,置于 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液(pH7.4)内 4℃ 固定 24h,去除眼前节,梯度酒精脱水和二甲苯透明后,常规石蜡包埋。

1.2.2 病理学观察 将包埋好的眼球标本,以平行于视神经矢状轴且以其为平面的视网膜进行连续切片,厚约 5μm,置于预先用多聚赖氨酸处理的载玻片上,60℃ 温箱烤片过夜,HE 染色,光镜观察各组视网膜组织内层结构的变化。

1.2.3 免疫组织化学染色 切片常规脱蜡至水,微波修复抗原。滴加 3% 的 H₂O₂,室温 10min 灭活内源性酶。滴加 5% 正常山羊血清封闭液,室温孵育 20min。甩干,切片滴加适当比例稀释 MMP-9 第一抗体(1:400),4℃ 过夜。滴加生物素标记二抗(PBS 稀释),37℃ 孵育 10min,滴加第二代辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃ 孵育 10min,DAB 显色,苏木素复染 1min,脱水,透明,封片。显微镜观察(设阴性对照:用 PBS 代替一抗,其余步骤相同)。VEGF 免疫组化染色滴加一抗为鼠抗 VEGF 抗体(1:200),其余步骤同上。

统计学分析:采用 SPSS 11.0 统计软件,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间不同时间点作单因素方差分析并进行两两比较。

表 1 各组视网膜 MMP-9 和 VEGF 阳性表达的平均光密度值 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	VEGF	MMP-9
正常对照组	0.06±0.04	0.05±0.03
缺血再灌注 6h	0.08±0.05	0.17±0.05 ^b
12h	0.23±0.06 ^b	0.30±0.04 ^b
24h	0.43±0.07 ^b	0.38±0.06 ^b
48h	0.52±0.06 ^b	0.32±0.05 ^b
3d	0.33±0.06 ^b	0.27±0.05 ^b
7d	0.22±0.05 ^b	0.23±0.05 ^b

^bP<0.01 vs 正常对照组。

相关性分析采用 Pearson 法。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果 正常对照组视网膜与人的视网膜相似。视网膜各层结构清晰,神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)排列整齐,细胞数目较多,无空泡变性,内核层(inner nuclear layer, INL)及外核层细胞排列紧密(图 1A)。随缺血再灌注的时间增加,视网膜水肿,视网膜厚度而改变。再灌注 6h,神经纤维层和内丛状层水肿,淡染(图 1B)。再灌注 12h,视网膜水肿加重(图 1C)。再灌注 24h,内层视网膜高度水肿,内丛状层明显增厚,结构疏松,内核层部分细胞变圆变小,染色加深,并出现大量空泡(图 1D)。48h 水肿减轻,节细胞层及内丛状层有较多深染的胞核。再灌注 3d,部分节细胞消失,内丛状层轻度变薄,内核层细胞减少,部分细胞核结构不清(图 1E)。7d 内层视网膜明显萎缩变薄,残留节细胞数目少,排列稀疏,内丛状层几乎消失,内核层余 2~3 层,结构及排列紊乱(图 1F)。

2.2 免疫组织化学染色结果 正常对照组未见 VEGF 的表达(图 2A),缺血后 6h VEGF 的表达与正常对照组无明显差异,缺血后 12h 视网膜开始出现 VEGF 的表达,并逐渐增加,到再灌注后 48h 达到高峰(图 2B),以后开始减弱,主要集中于 INL 及 RGC 层,视锥视杆细胞层亦有表达,差异有统计学意义(P<0.01,表 1)。正常对照组几乎未检测到 MMP-9 的表达(图 2C),缺血再灌注后 6h MMP-9 表达开始增加,24h 后达到高峰(图 2D),以后逐渐减弱,视网膜各层均可见其表达,主要位于视网膜内层,差异有统计学意义(P<0.01,表 1)。经统计学分析 MMP-9 与 VEGF 二者的相关系数为 $r=0.834$ (P<0.05,图 3)。

3 讨论

视网膜可以看作是大脑的一部分,对缺血缺氧非常敏感,视网膜中央动脉是供给视网膜血供的终末动脉,极易发生缺血,并可迅速导致视网膜的严重损伤,所以缺血性视网膜损伤在眼科疾病中较为常见。视网膜缺血损伤主要发生在青光眼、视网膜中央动静脉阻塞、早产儿视网膜病变、糖尿病性视网膜病变等视网膜缺血性疾病中。有效挽救缺血视网膜组织的措施是恢复血流再灌注,然而由于各种因素的影响再灌注并不能使缺血的视网膜功能障碍减轻,反而加重了组织损伤,即 RIRI。大量学者研究发现 RIRI 的机制与兴奋性氨基酸、氧自由基、微血管的损伤、钙超载、炎症因子等因素密切相关。近年来研究发现缺血缺氧诱导的视网膜新生血管形成在 RIRI 中发挥了重要作用。本实验利用前房高压的方法建立 RIRI 模型,运用免

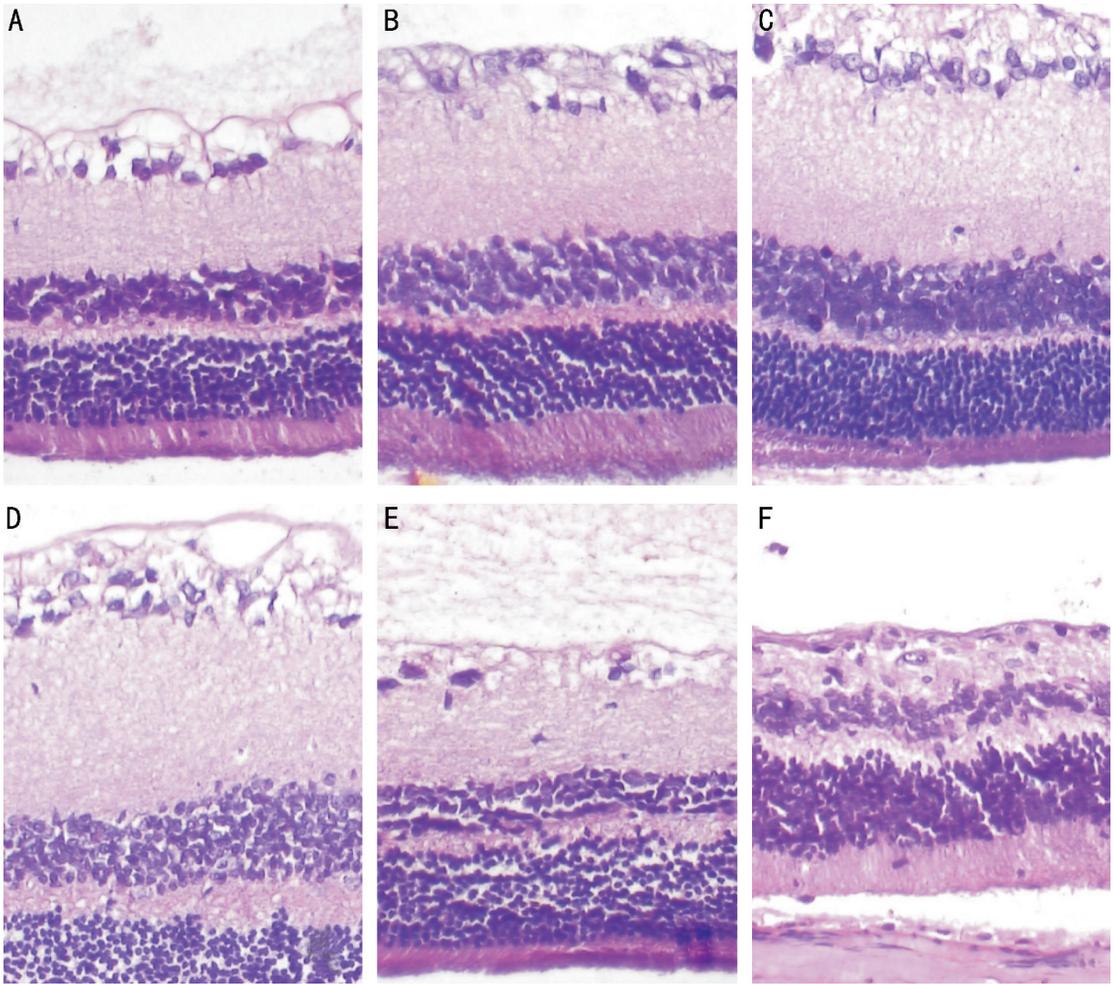


图1 HE染色结果(HE×400) A:正常对照组大鼠视网膜结构;B:再灌注6h,神经纤维层和内丛状层出现水肿、淡染;C:再灌注12h,视网膜水肿加重;D:再灌注24h,内层视网膜高度水肿,内丛状层明显增厚,结构疏松,内核层部分细胞变圆变小,染色加深,并出现大量空泡;E:再灌注3d,部分节细胞消失,内丛状层轻度变薄,内核层细胞减少,部分细胞核结构不清;F:再灌注7d内层视网膜明显萎缩变薄,残留节细胞数目少,排列稀疏,内丛状层几乎消失,内核层余2~3层,结构及排列紊乱。

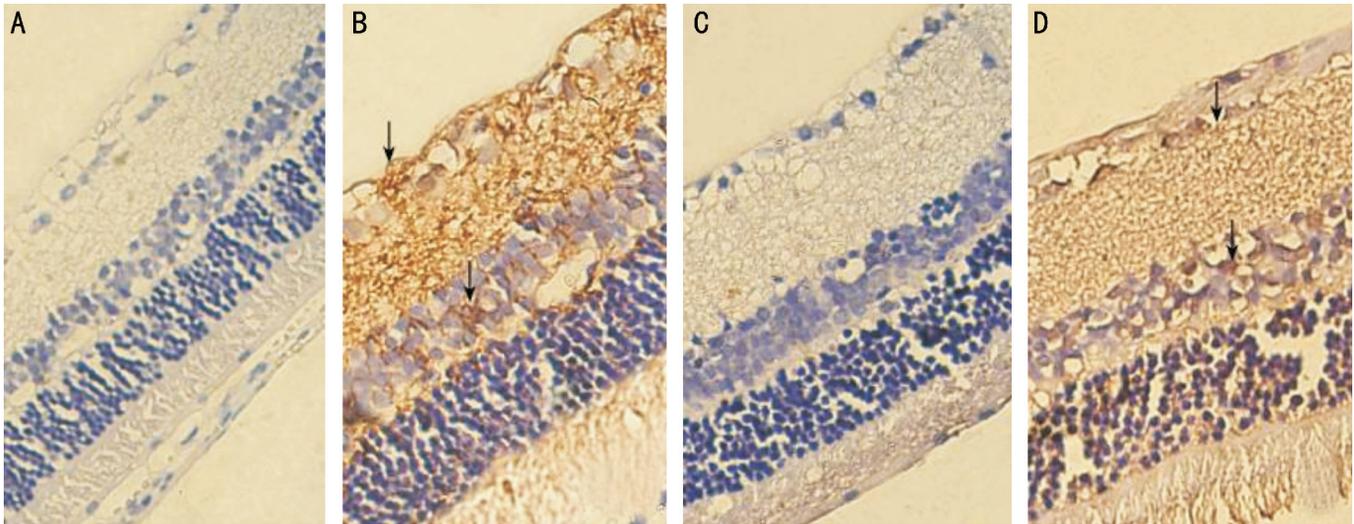


图2 免疫组织化学染色结果(×400) A:正常对照组视网膜可见VEGF无表达;B:缺血组48h视网膜可见VEGF为强阳性表达(箭头);C:正常对照组视网膜几乎无MMP-9的表达;D:缺血组24h视网膜各层均可见MMP-9阳性表达(箭头)。

疫组化的方法检测VEGF和MMP-9在大鼠RIRI中的表达情况。

VEGF是目前所知最强的血管生成因子,它能增加血管内皮细胞的通透性,促进内皮细胞的迁移和增生,指导其它内皮细胞基因的表达,使其产生蛋白酶,降解细胞外

基质,从而诱导视网膜新生血管的形成^[6]。以往大量研究表明,缺血缺氧是诱导VEGF表达的主要因素,但其机制目前并不完全清楚。Ogata等发现缺氧可以使视网膜血管周皮细胞、血管内皮细胞,视网膜色素上皮细胞及神经节细胞分泌VEGF^[7]。Hayashi等在实验中检测到在缺血再

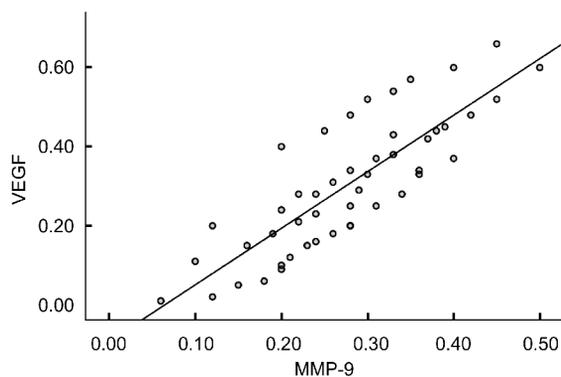


图3 缺血组视网膜 VEGF 和 MMP-9 的表达呈正相关。

灌注损伤中视网膜 VEGF 的表达明显增加^[6]。在本研究中我们发现视网膜缺血再灌注后 12h VEGF 的表达开始增加并逐渐增强,至再灌注后 48h 达到峰值然后开始下降,7d 仍可检测到 VEGF 的表达,与国外研究结果相似。VEGF 在 RIRI 中表达增加提示 VEGF 参与了 RIRI 并可能影响视网膜新生血管的生成。高水平的 VEGF 导致毛细血管渗透性增强,白细胞浸润增加,加重局部的炎症反应,损伤视网膜而加重缺氧,使 VEGF 的产生进一步增多导致新生血管形成^[8]。当新生血管到达其它血管时,缺氧压力减少,VEGF 的产生也减少。因此在新生血管形成以后,视网膜缺血缺氧得到一定改善,可能是后期 VEGF 减少的主要原因^[9]。

MMPs 是一组降解细胞外基质成分的锌依赖性肽链内切酶和蛋白水解酶,参与创伤修复、组织重建、新生血管、瘢痕形成等多种细胞的生理、病理过程。已有研究表明,MMP-2 和 MMP-9 与新生血管形成密切相关^[2]。Chintala 等^[10]发现敲除小鼠 MMP-9 基因,可对 RIRI 中的 RGCs 产生保护作用,推测 MMP-9 可能参与 RIRI 的病理过程。Zhang 等^[4]在研究中发现 MMP-9 的表达自视网膜缺血再灌注后 3h 出现,6h 显著增高,24h 达高峰,与视网膜内层水肿、细胞排列疏松紊乱、炎症细胞增多、RGCs 递减等病理变化高度相关。在本研究中缺血再灌注后 6h MMP-9 表达开始增加,24h 后达到高峰,以后逐渐减弱,提示 MMP-9 在 RIRI 中发挥重要作用。推测其机制可能为缺血缺氧诱导视网膜组织中中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞聚集和细胞因子表达增多,通过分泌 MMP-9 降解血管基质,增加血管壁的通透性,导致视网膜组织水肿、炎症细胞渗出及内皮细胞的迁移、增殖,从而合成更多的 MMP-9 并有利于视网膜新生血管的形成。

既往对缺血组织 MMPs 和 VEGF 相关关系的研究证实,缺血、缺氧可增加 MMPs 和 VEGF 的表达,二者相互作用,从而参与新生血管的形成等病理生理过程^[11,12]。为了进一步研究在视网膜缺血再灌注损伤中 VEGF 与 MMP-9 之间的关系,我们对两者的蛋白表达进行了相关性分析,结果显示两者在缺血再灌注后视网膜组织的表达呈正相关性($r=0.834, P<0.05$),且 VEGF、MMP-9 的表达趋势

与视网膜水肿的程度在时相上也有一致性。说明两者可能通过协同作用对视网膜缺血再灌注后视网膜组织的病理变化产生重要影响。推测在视网膜组织缺血缺氧刺激下,早期表达 VEGF,高浓度的 VEGF 可刺激胶质细胞、血管内皮等组织细胞的 MMPs 活化、表达增多,继而增加基质降解,参与组织缺血后的血管通透性增加,水分进入视网膜细胞外间隙,促进了视网膜的水肿发生。同时还相互协同促进内皮细胞增殖、血管新生等病理生理过程^[12],而一旦这种结构和功能上不完备的新生血管出现无序化增生,严重时可导致视网膜、玻璃体积血,视网膜增殖性病变等,视觉功能受损甚至失明。

综上所述,本研究表明 VEGF 和 MMP-9 在视网膜缺血再灌注损伤中均高表达且呈正相关,两者可能协同作用,在视网膜缺血性病变的发生发展中起重要作用。寻求有效的药物,阻止两者的过度表达,减轻缺血缺氧对视网膜的损伤,有望成为临床上视网膜缺血性病变防治的有效方法之一。

参考文献

- 1 Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18(1):4-25
- 2 Chantreain CF, Henriet P, Jodele S, et al. Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: a new role for metalloproteinases. *Eur J Cancer* 2006;42(3):310-318
- 3 游志鹏,姜德咏,唐朝珍,等. 血管内皮生长因子在视网膜缺血再灌注损伤中的表达. *眼外伤职业眼病杂志* 2004;26(11):721-723
- 4 Zhang X, Sakamoto T, Hata Y, et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental retinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Eye Res* 2002;74(5):577-584
- 5 Lai P, Li T, Yang J, et al. Upregulation of stromal cell-derived Factor 1 (Sdf-1) expression in microvasculature endothelial cells in retinal ischemia-reperfusion injury. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246(12):1707-1713
- 6 Chen B, Tang L. Protective effects of catalase on retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Exp Eye Res* 2011;93:599-606
- 7 Chao HM, Chuang MJ, Liu JH, et al. Baicalein protects against retinal ischemia by antioxidant, antiapoptosis, downregulation of HIF-1 α , VEGF, and MMP-9 and upregulation of HO-1. *J Ocul Pharmacol* 2013;29(6):539-549
- 8 李艳,李筱荣,袁佳琴,等. 血管内皮生长因子及其受体与糖尿病视网膜病变. *眼科新进展* 2006;26(8):629-631
- 9 罗南萍,黄厚斌,徐军,等. VEGF、IFN- γ 及 NO 与糖尿病视网膜病变关系的研究. *中国糖尿病杂志* 2001;9(1):24-27
- 10 Chintala SK, Zhang X, Austin JS, et al. Deficiency in matrix metalloproteinase gelatinase b (mmp-9) protects against retinal ganglion cell death after optic nerve ligation. *J Biol Chem* 2002;277(49):47461-47468
- 11 Ottino P, Finley J, Rojo E, et al. Hypoxia activates matrix metalloproteinase expression and the vegf system in monkey choroid-retinal endothelial cells: involvement of cytosolic phospholipase A2 Activity. *Mol Vis* 2004;10:341-350
- 12 Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix Metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2(10):737-744