

血管紧张素 II 和血管内皮生长因子在视网膜新生血管中的表达及意义

刘鹤南, 陈晓隆

基金项目: 中国辽宁省自然科学基金资助项目 (No. 20052089); 中国辽宁省教育厅科研基金资助项目 (No. 20060994)

作者单位: (110004) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院眼科

作者简介: 刘鹤南, 男, 助教, 住院医师, 硕士, 研究方向: 玻璃体视网膜手术的临床研究。

通讯作者: 陈晓隆, 男, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 玻璃体视网膜手术的临床研究. chenxl@sj-hospital.org

收稿日期: 2010-06-10 修回日期: 2010-07-19

Expression and significance of angiotensin II and vascular endothelial growth factor in retinal neovascularization

He-Nan Liu, Xiao-Long Chen

Foundation items: Natural Science Foundation of Liaoning Province, China (No. 20052089); Scientific Research Fund of Liaoning Provincial Education Department, China (No. 20060994) Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xiao-Long Chen. Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. chenxl@sj-hospital.org

Received: 2010-06-10 Accepted: 2010-07-19

Abstract

• **AIM:** To investigate a possible role for the angiotensin II (Ang II) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the development of retinal neovascularization.

• **METHODS:** It was a random control experimental study. Forty seven-day-old C57BL/6J mice were divided into two groups randomly including normal control group and hyperoxia model group. Hyperoxia model group were exposed to 75% oxygen to establish a model of oxygen-induced retinopathy. Fluorescent angiography was used to assess the vascular pattern of retina. The proliferative neovascular response was quantified by counting the nuclei of new vessels extending from the retina into the vitreous in cross-sections. Ang II and VEGF protein levels in retinas were measured by Western blot. Significant differences between groups were evaluated by independent-samples *t* test and Pearson correlation analysis. Statistical difference was considered significant at a *P* value less than 0.05.

• **RESULTS:** Fluorescent angiography presented increasing neovascular tufts with fluorescein leakage in hyperoxia model group compared to the normal control group. The

number of endothelial cells of new vessels extending from retina to vitreous were increased significantly in hyperoxia model group (43.23 ± 2.57) as compared with normal control group (1.37 ± 0.93) ($P=0.00$). The expression of Ang II protein in retinas were increased significantly in hyperoxia model group (0.365 ± 0.004) compared with normal control group (0.035 ± 0.003) ($P=0.00$). The expression of VEGF protein in retinas were increased significantly in hyperoxia model group (0.372 ± 0.004) compared with normal control group (0.049 ± 0.007) ($P=0.00$).

• **CONCLUSION:** There is specific relation between Ang II and VEGF in angiogenesis promoting effect. Ang II participate in the occurrence and development of retinal neovascularization via the upregulation the expression of VEGF.

• **KEYWORDS:** retinal neovascularization; renin-angiotensin system; angiotensin II; vascular endothelial growth factor

Liu HN, Chen XL. Expression and significance of angiotensin II and vascular endothelial growth factor in retinal neovascularization. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(8):1481-1484

摘要

目的: 探讨血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在视网膜新生血管发生发展中的作用。

方法: 随机对照实验研究。选取 7d 龄 C57BL/6J 新生小鼠 40 只, 随机分为 2 组: 正常对照组和高氧模型组, 每组 20 只, 高氧模型组建立氧诱导视网膜病变模型。采用荧光素血管灌注视网膜铺片观察视网膜血管形态学改变; 制作视网膜组织切片并进行 HE 染色计数突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数; 采用 Western blot 检测视网膜 Ang II 和 VEGF 蛋白的表达。采用独立样本 *t* 检验和 Pearson 相关分析进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 作为差异具有统计学意义。

结果: 荧光素血管灌注视网膜铺片: 高氧模型组较正常对照组可见大量新生血管丛, 伴明显荧光渗漏。突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数: 高氧模型组 (43.23 ± 2.57) 个较正常对照组 (1.37 ± 0.93) 个明显增多, 差异具有统计学意义 ($P=0.00$)。视网膜 Ang II 蛋白表达水平: 高氧模型组 (0.365 ± 0.004) 较正常对照组 (0.035 ± 0.003) 明显上调, 差异具有统计学意义 ($P=0.00$)。视网膜 VEGF 蛋白表达水平: 高氧模型组 (0.372 ± 0.004) 较正常对照组 (0.049 ± 0.007) 明显上调, 差异具有统计学意义 ($P=0.00$)。

结论: Ang II 促血管生成的作用与 VEGF 存在明确的联

系, Ang II 通过上调 VEGF 参与视网膜新生血管的形成。
关键词: 视网膜新生血管; 肾素-血管紧张素系统; 血管紧张素 II; 血管内皮生长因子
DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.08.009

刘鹤南, 陈晓隆. 血管紧张素 II 和血管内皮生长因子在视网膜新生血管中的表达及意义. 国际眼科杂志 2010; 10(8): 1481-1484

0 引言

视网膜新生血管是糖尿病视网膜病变和早产儿视网膜病变等增生性视网膜病理改变的主要特征^[1]。在这些增生性视网膜病变中, 视网膜新生血管形成导致视网膜水肿、出血、脱离等严重影响视力的并发症^[1]。尽管刺激视网膜新生血管生长的因素还未完全明确, 但有证据显示参与此过程的不仅有血管源性的细胞因子如血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF), 还包括血管活性激素如血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)^[2]。在增生性视网膜病变的发生、发展过程中, 肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 中主要效应介质 Ang II 可能与特异性生长因子特别是 VEGF 相互作用来影响视网膜的发育和功能, 最终共同导致视网膜新生血管形成。本研究的目的在于探讨视网膜新生血管发生发展过程中, Ang II 和 VEGF 影响视网膜新生血管形成的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物: 鼠龄 7d 的健康 C57BL/6J 清洁级新生小鼠 (中国医科大学动物部) 40 只, 体质量 4.0~5.0g, 性别不限, 与哺乳母鼠共同饲养。药品试剂: 卡托普利 (美国 Bristol-Myers Squibb 公司)、缬沙坦 (瑞士 Novartis 公司)、BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Pierce 公司)、ECL 发光试剂盒 (美国 Pierce 公司)、异硫氰酸葡聚糖荧光素 (美国 Sigma 公司)、兔抗小鼠 Ang II 多克隆抗体 (美国 Sigma 公司)、兔抗小鼠 VEGF 多克隆抗体 (美国 Sigma 公司)、羊抗小鼠 IgG-HRP (美国 Sigma 公司)。

1.2 方法 动物分组和模型建立: 将 40 只 7d 龄 C57BL/6J 清洁级新生小鼠随机分为两组: 正常对照组和高氧模型组, 每组 20 只。参照 Smith 等^[3] 的方法建立氧诱导视网膜病变模型, 高氧模型组小鼠及哺乳母鼠置于密闭氧箱中, 控制氧浓度为 (75±2)% , 5 d (鼠龄 12 d) 后回到正常空气环境中, 正常对照组一直置于正常空气环境中。所有动物保持温度 (21±1)°C, 光照-黑暗循环/12h。荧光素血管灌注视网膜铺片: 两组鼠龄 17d 的小鼠各取 2 只, 将异硫氰酸葡聚糖荧光素 (分子量: 2×10⁶) 溶于 1mL 的 40g/L 多聚甲醛中, 经左心室灌注 (30mL/kg), 摘取眼球, 于 40g/L 多聚甲醛中固定 1h, 游离视网膜, 以视盘为中心呈放射状对称切开, 用抗荧光衰退封片剂将视网膜封片, 采用荧光显微镜 (日本 Olympus 公司) 观察视网膜血管形态的变化。突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核计数: 两组鼠龄 17d 的小鼠各取 3 只, 摘除眼球后, 于 40g/L 多聚甲醛中固定 24h, 常规脱水, 石蜡包埋, 平行于角膜至视盘的矢状位连续 6μm 切片, 苏木素-伊红染色。每只眼球取 10 张切片, 每组 30 张, 由同一操作者采用随机、盲法在光学显微镜 (日本 Olympus 公司) 下对切片样本计数每张切片突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数。选取切片时注意避开

视盘周围, 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, 不包括玻璃体腔内其它与内界膜无联系的血管内皮细胞核。Western blot 检测 Ang II 及 VEGF 蛋白表达: 两组鼠龄 17d 的小鼠各取 15 只, 每组取 5 只新生鼠双眼完整的视网膜, 提取视网膜组织蛋白质, 用 BCA 蛋白定量试剂盒定量视网膜组织蛋白质含量, 每个样品上样含量 50μg, 以 100g/L SDS-PAGE 电泳 (4°C, 120V, 2h) 分离蛋白质, 电转移法将蛋白质转移至硝酸纤维素滤膜上, 用 40g/L 脂奶粉, 于 4°C 下过夜封闭硝酸纤维素滤膜的非特异性蛋白质结合位点, 将滤膜于兔抗小鼠 Ang II 多克隆抗体 (1: 400)、兔抗小鼠 VEGF 多克隆抗体 (1: 400) 在 37°C 下孵育 2h, TBS-T 缓冲液冲洗滤膜 3 次后, 将滤膜转移至二抗羊抗小鼠 IgG-HRP (1: 1 000), 37°C 下孵育 1h, TBS-T 缓冲液再次冲洗滤膜后, ECL 化学发光显影。采用 β-actin (1: 400) 作为内参照。每组样品重复检测 3 次。应用 Quantity One 4.2 软件分析, 分别比较各组 Ang II, VEGF 条带灰度值与 β-actin 条带灰度值的比值, 表示各组蛋白相对表达水平。

统计学分析: 所有数据应用 SPSS 16.0 for Windows 进行统计学分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料组间比较采用独立样本 *t* 检验, 两变量间相关性采用 Pearson 相关分析, 以 *P* < 0.05 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光素血管灌注视网膜铺片 正常对照组自视盘发出的血管向四周呈放射状均匀分布, 直至视网膜周边部, 视网膜血管交叉成网状, 分深浅两层, 浅层血管呈放射状分支形态, 深层血管呈多角形网状形态, 两层血管通过螺旋血管互相连接 (图 1A); 而高氧模型组视盘周围可见大片无灌注区, 视网膜血管不规则扩张, 走行迂曲, 无灌注区周围可见大量新生血管丛, 伴明显荧光渗漏 (图 1B)。

2.2 突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数 正常对照组未发现或仅在少数切片中发现突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核 (图 2A); 而高氧模型组可见较多突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核, 有些单独出现, 有些成簇出现 (图 2B), 与正常对照组比较差异有统计学意义 (*P* = 0.00)。

2.3 视网膜 Ang II 和 VEGF 蛋白表达的变化 Western blot 检测发现 2 组视网膜均有 Ang II 蛋白表达, Ang II 蛋白在正常对照组视网膜中表达微弱, 而在高氧模型组视网膜中表达显著上调, 与正常对照比较差异有统计学意义 (*P* = 0.00; 图 3)。Western blot 检测发现四组视网膜中均有 VEGF 蛋白表达, VEGF 蛋白在正常对照组视网膜中表达微弱, 而在高氧模型组视网膜中表达显著上调, 与正常对照组比较差异有统计学意义 (*P* = 0.00; 图 3)。经 Pearson 相关分析, 在氧诱导视网膜病变中, Ang II 和 VEGF 蛋白的表达呈明显正相关 (*r* = 0.83, *P* = 0.00)。

3 讨论

本研究利用氧诱导视网膜病变模型, 目的在于探讨 Ang II 和 VEGF 在视网膜新生血管发生发展中的作用。我们的研究显示: 在视网膜新生血管发生发展过程中, Ang II 和 VEGF 蛋白水平升高, 且两者呈正相关。已有研究表明, 完整的 RAS 存在于人类和多种生物的视网膜中^[4]。Ang II 作为 RAS 的主要成分和效应分子, 由血管紧张素 I 在血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE)

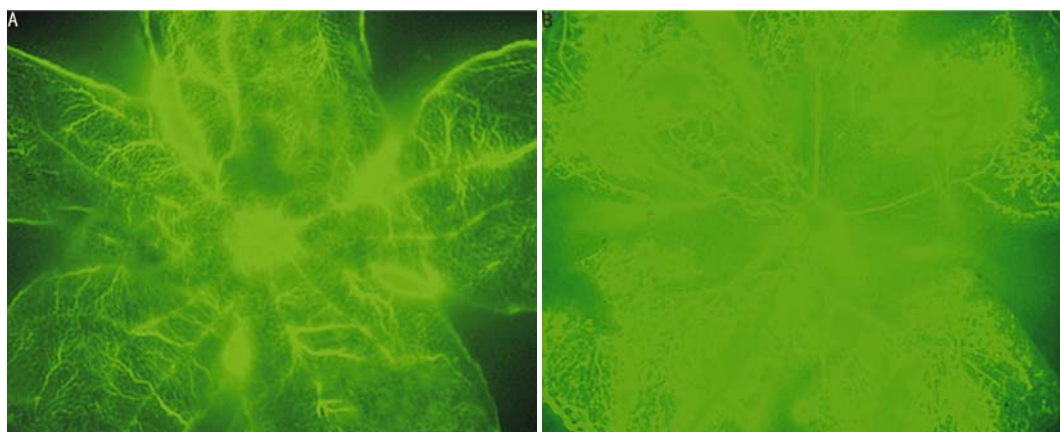


图1 荧光素血管灌注视网膜铺片(×80) A:正常对照组;B:高氧模型组。

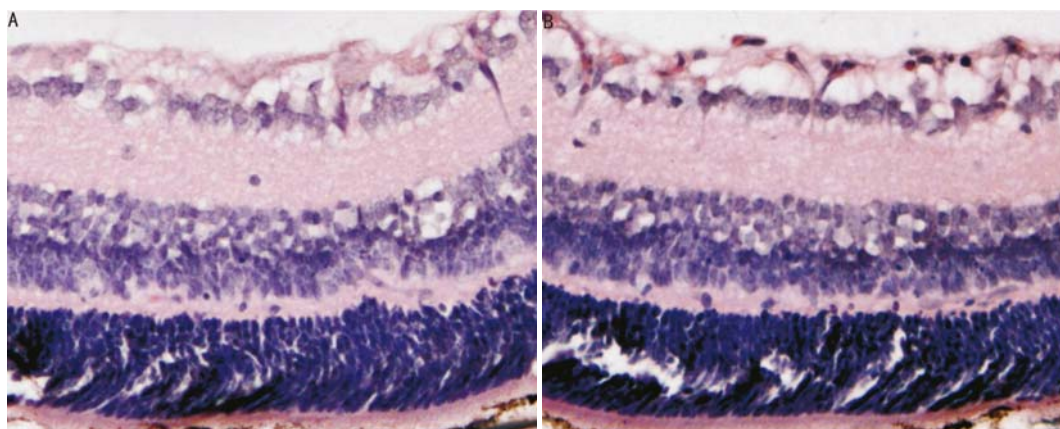


图2 突破视网膜内界膜血管内皮细胞核(HE染色×400) A:正常对照组;B:高氧模型组。

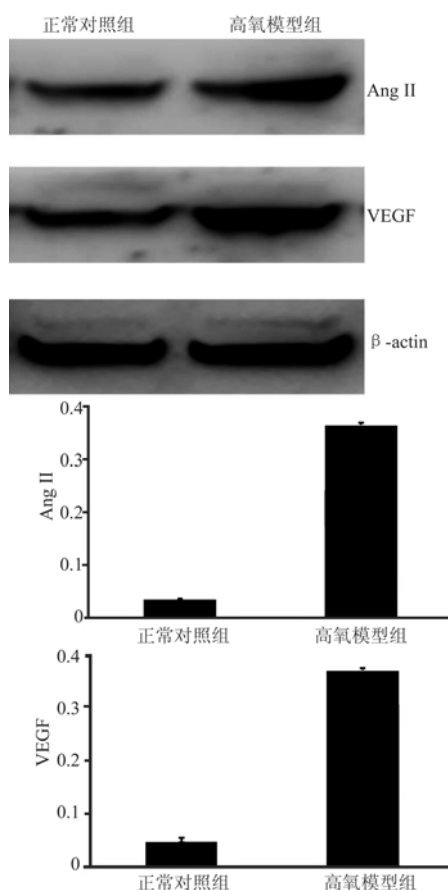


图3 视网膜 Ang II 和 VEGF 蛋白相对含量表达的变化。

和丝氨酸蛋白酶的作用下转化生成,通过血管紧张素 II 1 型受体(angiotensin II type 1 receptor, AT_1R)和血管紧张素 II 2 型受体(angiotensin II type 2 receptor, AT_2R)发挥作用^[2]。Ang II 不仅是一种血管活性物质,而且还是一种生长因子,可以促进多种血管细胞的扩散、转移以及合成,从而引起血管生成和重建;同时,Ang II 也参与细胞生长、分化、凋亡和细胞外基质沉积等各种细胞性活动;另外,Ang II 也在调节血压、交感神经活动和维持水、电解质平衡等许多生理活动中起着关键的作用;最后,Ang II 也参与许多病理过程,例如:心肌肥厚、心肌梗死、动脉粥样硬化、肾病以及肿瘤^[5-10]。

VEGF 是一种具有良好血管通透性、促进血管生成的活性因子,在缺血缺氧性视网膜病变中,VEGF 表达上调并参与血-视网膜屏障的破坏,于疾病的早期出现,并持续存在于整个疾病过程中^[11,12]。在视网膜周细胞和血管内皮细胞中,Ang II 通过 AT_1R 介导 VEGF 表达,刺激 VEGF 产生,两者共同存在于视网膜神经节细胞层、Müller 细胞层、外核层和视网膜色素上皮层中,影响视网膜微血管系统的发育^[13-15]。因此,在视网膜微血管系统中,Ang II 直接或通过上调其他特异性生长因子特别是 VEGF 来影响视网膜血管周细胞的功能、发挥促新生血管形成等作用。所以,通过阻滞 RAS 对以视网膜新生血管为特征的增生性视网膜病变的防治和转归有重要意义。对 RAS 的阻滞,主要通过 ACEI 和 ARB 来抑制 Ang II,从而发挥抑制新生血管形成的作用,但两者作用机制有所不同。ACEI 是通过阻断 ACE,减少 Ang II 生成来发挥其作用;而

ARB 则是通过选择性阻断 AT₁R 和 Ang II 结合而发挥拮抗作用。

实验结果表明,Ang II 在视网膜新生血管的发生发展中成为一个关键性的因子,RAS 在增生性视网膜病变视网膜新生血管形成中起关键作用,其促血管生成的作用与 VEGF 存在明确的联系。然而,RAS 相对较为复杂,与激肽释放酶-激肽系统、血管活性介质等都有交叉相互作用,因此,在增生性视网膜病变的视网膜血管渗漏和新生血管形成的临床前研究有望揭示它们之间的相互作用,特别是 RAS 阻滞剂抑制视网膜新生血管形成的实验和临床研究可能将会成为预防和治疗视网膜新生血管一个潜在的临床方法。

参考文献

- 1 Battagay EJ. Angiogenesis:mechanistic insights,neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 1995;73(7):333-346
- 2 刘鹤南,朱颖,陈晓隆,等. 肾素-血管紧张素系统阻滞剂预防早产儿视网膜病变研究. *中华眼底病杂志* 2010;28(3):291-293
- 3 Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(1):101-111
- 4 Sarlos S, Wilkinson-Berka JL. The renin-angiotensin system and the developing retinal vasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(3):1069-1077
- 5 Nouet S, Nahmias C. Signal transduction from the angiotensin II AT₂ receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11(1):1-6
- 6 Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, et al. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(6):881-900
- 7 Singh VP, Le B, Khode R, et al. Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis,oxidative

stress,and cardiac fibrosis. *Diabetes* 2008;57(12):3297-3306

- 8 Unger T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2002;89(2A):3A-9A
- 9 Xu J, Carretero OA, Lin CX, et al. Role of cardiac overexpression of ANG II in the regulation of cardiac function and remodeling postmyocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293(3):H1900-1907
- 10 Herr D, Rodewald M, Fraser HM, et al. Potential role of Renin-Angiotensin-system for tumor angiogenesis in receptor negative breast cancer. *Gynecol Oncol* 2008;109(3):418-425
- 11 Shi RZ, Wang JC, Huang SH, et al. Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2009;315(1):10-15
- 12 Skondra D,Noda K,Almulki L, et al. Characterization of azurocidin as a permeability factor in the retina:involvement in VEGF-induced and early diabetic blood-retinal barrier breakdown. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(2):726-731
- 13 Otani A, Takagi H, Oh H, et al. Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression in bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(5):1192-1199
- 14 Tee LB, Penrose MA, O'Shea JE, et al. VEGF-induced choroidal damage in a murine model of retinal neovascularisation. *Br J Ophthalmol* 2008;92(6):832-838
- 15 Kilic U,Kilic E,Järve A, et al. Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells *in vivo* by activating ERK-1/2 and Akt pathways. *J Neurosci* 2006;26(48):12439-12446