

结膜下和玻璃体内注射重组人 PEDF 对氧诱导大鼠 RNV 的作用

魏二霞, 柯晓云, 苕瑞红

基金项目: 中国广东省自然科学基金资助项目 (No. 7005196)
作者单位: (510282) 中国广东省广州市, 南方医科大学珠江医院眼科
作者简介: 魏二霞, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。
通讯作者: 柯晓云, 硕士, 主任医师, 副主任, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病. keyan96612@163. com
收稿日期: 2011-09-20 修回日期: 2011-11-03

Effects of pigment epithelium-derived factor on oxygen-induced retinal neovascularization in rats with subconjunctival or intravitreal injection

Er-Xia Wei, Xiao-Yun Ke, Rui-Hong Ju

Foundation item: Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (No. 7005196)
Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China
Correspondence to: Xiao-Yun Ke. Department of Ophthalmology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. keyan96612@163. com
Received: 2011-09-20 Accepted: 2011-11-03

Abstract

• **AIM:** To observe the inhibitive effect of subconjunctival or intravitreal injecting pigment epithelium-derived factor (PEDF) for retinal neovascularization (RNV) in oxygen-induced animal models.
• **METHODS:** Mouse models of oxygen-induced retinopathy of prematurity were established. 48 newborn rats were randomly divided into 6 groups (A: Air control group; B: High oxygen control group; C: High oxygen + intravitreal injection of 2 μ g PEDF group; D: High oxygen + subconjunctival injection of 2 μ g PEDF group; E: High oxygen + subconjunctival injection of 4 μ g PEDF group; F: High oxygen + subconjunctival injection of 8 μ g PEDF group). When the rats were taken off the high oxygen, the phosphate buffer solution (PBS) and corresponding dosage of PEDF were intravitreally or subconjunctivally injected in group C, D, E and F respectively. ADP-ase stained retinal flat-mounts was used to evaluate the retinal vascular modality and development, eyeball pathological section was used to count the pre-retinal endothelial nucleus in retinal new

vessel. Retinal PEDF expression were detected by Western blot.

• **RESULTS:** PEDF were achieved in retina after a periocular injection. Retinal flat-mounts: A group: The retina vessels of the normal had a fine radial branching pattern that extended from the optic nerve to the periphery; B group: There were more RNV compared with A group. The density and shape of RNV were disordered; Compared with B group, RNV decreased obviously in C group while D, E, F group decreased mildly. HE staining: A group: Retinal internal limiting membrane was smooth, and occasionally the endothelial cells broke through the inner retina. B group was significantly more than A group ($P < 0.05$). C group was significantly less than the B group ($P < 0.05$), D, E, F group had significant difference with C group (all $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** PEDF are able to penetrate the sclera into retina after a periocular injection, however, compared with intravitreal injection, the effect reduced significantly. How to reach the retina effectively requires further study by subconjunctival injection.

• **KEYWORDS:** oxygen; pigment epithelium-derived factor; neovascularization; prematurity

Wei EX, Ke XY, Ju RH. Effects of pigment epithelium-derived factor on oxygen-induced retinal neovascularization in rats with subconjunctival or intravitreal injection. *Guji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(1):21-24

摘要

目的: 观察结膜下和玻璃体注射重组人色素上皮衍生因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) 两种注射方式对氧诱导大鼠视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 的作用。

方法: 新生大鼠 2 只进行左眼结膜下注射 PEDF, Western-blot 检测视网膜 PEDF 的表达。氧诱导 SD 新生大鼠建立类似早产儿视网膜病变动物模型。新生鼠 48 只随机分为 6 组 (A: 空气对照组, B: 高氧对照组, C: 高氧 + 玻璃体注射 PEDF 2 μ g 组, D: 高氧 + 结膜下注射 PEDF 2 μ g 组, E: 高氧 + 结膜下注射 PEDF 4 μ g 组, F: 高氧 + 结膜下注射 PEDF 8 μ g 组)。当新生大鼠脱离氧时, C, D, E 和 F 组大鼠左眼用不同剂量和注药次数进行注射 PEDF, ADP 酶视网膜血管染色观察视网膜血管形态, 石蜡切片计数突破视

网膜内界膜的新生血管内皮细胞核数目。

结果:结膜下注射重组人 PEDF,可检测到视网膜 PEDF 蛋白表达。视网膜铺片结果显示:A 组视网膜血管发育正常;B 组视网膜大量的新生血管生成;C 组新生血管明显减少;D,E,F 组新生血管稍减少。组织病理学检测突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞计数可见:A 组视网膜内界膜平滑,偶见突破的视网膜内皮细胞。B 组明显高于 A 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。C 组明显低于 B 组($P < 0.05$),D,E,F 组与 C 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。

结论:巩膜和脉络膜-色素上皮层对 PEDF 是有渗透性的,可以跨越结膜下组织到达视网膜,但与玻璃体注射组相比,抑制新生血管作用有显著减弱;玻璃体注射可有效抑制氧诱导大鼠 RNV。

关键词:氧气;色素上皮衍生因子;新生血管;早产儿

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.01.07

魏二霞,柯晓云,苕瑞红. 结膜下和玻璃体内注射重组人 PEDF 对氧诱导大鼠 RNV 的作用. 国际眼科杂志 2012;12(1):21-24

0 引言

早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)是世界范围内主要的致盲眼病^[1]。目前更多的治疗是针对其并发症,即针对新生血管、玻璃体积血以及牵引性视网膜脱离的治疗。在 ROP 的早期阶段进行冷冻或激光疗法可以减轻视力损伤的严重性,但都存在视网膜剥离、出血及视网膜损伤等副作用,从而导致预后不良^[2]。因此,无创性内科治疗和预防新生血管化越来越受到重视,血管生成抑制剂抑制新生血管化成为新的研究方向。色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)被认为是目前发现的活性最强的内源性血管生成负向性调节因子,作为新生血管生成抑制剂具有高效性、特异性和安全性等优点。采用结膜下注射这种途径可以避免眼内路径潜在的并发症(出血、白内障、继发性青光眼、眼内感染、视网膜脱离等),最大限度地减少了对眼睛的侵袭,是一种简单的治疗途径。我们采用结膜下和玻璃体内注射两种方式观察 PEDF 对氧诱导视网膜新生血管(retinal neovascularization, RNV)形成的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 SD 新生大鼠 50 只,清洁级动物,雌雄不拘,与哺乳母鼠共同饲养,由南方医科大学实验动物中心提供。重组人色素上皮衍生因子(peprotech 公司),兔抗人 PEDF 抗体(Santa 公司),ADP、Tris、马来酸、硫化铵显色液(武汉博士德生物公司),眼球固定液(中山眼科中心病理室提供),氧气分析仪(上海嘉定学联仪表厂),双目立体解剖显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 Western-blot 检测视网膜 PEDF 蛋白 备用的 2 只新生鼠在 14 天龄时左眼结膜下注射 PEDF,右眼注射相同体积的无菌磷酸缓冲液后将大鼠双眼视网膜剥离,分别放入液氮中保存,将在液氮保存的视网膜标本放入匀浆机,加入含 PMSF 裂解液,充分匀浆后离心,取上清液与上

样液混合,SDS-PAGE 电泳分离,电转至硝酸纤维素膜,使用兔抗人 PEDF 单克隆抗体进行免疫杂交,然后进行化学发光、显影和定影,检测左右眼视网膜组织重组人 PEDF 蛋白的表达。

1.2.2 实验分组 SD 新生大鼠 50 只,随机分为 6 组,每组 8 只,A:空气对照组,B:高氧对照组,C:高氧+玻璃体注射 PEDF 2 μ g 组,D:高氧+结膜下注射 PEDF 2 μ g 组,E:高氧+结膜下注射 PEDF 4 μ g 组,F:高氧+结膜下注射 PEDF 8 μ g 组,另 2 只新生大鼠进行左眼结膜下注射 PEDF。

1.2.3 动物模型建立及处理 新生大鼠分别进行氧气或空气暴露:新生鼠与哺乳母鼠置于密闭容器内,500mL/L O₂ 24h,100mL/L O₂ 24h 为 1 个循环,共 7 个循环,测氧仪检测容器内的氧浓度,控制室温在 23 \pm 2 $^{\circ}$ C,每天打开一次容器更换垫料、食物,替换正常空气环境下饲养的母鼠,14d 后回到空气中饲养。玻璃体注射:双眼散瞳,苯巴比妥 ip,在手术显微镜下显微无齿镊分开大鼠上、下眼睑,轻压眶缘组织使眼球脱出,自制 30g 针头在角膜缘稍后进针,以 40 $^{\circ}$ ~60 $^{\circ}$ 朝向赤道区刺入玻璃体腔,将 PEDF 注入,并停留 1min 后拔针,氧氟沙星滴眼液点眼,眼球复位,眼睑覆盖于角膜上。结膜下注射:苯巴比妥 ip,在手术显微镜下分开大鼠上下眼睑,显微无齿镊夹住距颞侧角膜缘 3mm 处球结膜提起,小心进针,前进约 3mm 缓慢注射。注射后 14d 时,C~F 组左眼进行给药处理,不同注射方式和剂量:(1)玻璃体注射:以 2 μ g 作为注药剂量,鼠仔在第 14,16d 时左眼玻璃体内注入一次 PEDF,观察玻璃体注射 PEDF 发挥作用的情况。(2)结膜下注射:鼠仔在第 14d 连续 4d 左眼注射 PEDF,1 次/d,采用三种剂量 2,4,8 μ g,观察不同剂量 PEDF 发挥作用的情况。

1.2.4 ADP 酶视网膜血管染色观察视网膜深浅血管的形态学变化 每组取 2 只 18 天龄新生鼠,过量腹腔麻醉致死,摘除左眼球,40g/L 多聚甲醛中固定 1h 后,在手术显微镜下,于角膜缘后约 1mm 沿角膜缘环形剪开,去除角膜、晶状体,剥离视网膜,将游离视网膜以视乳头为中心放射切开,尽可能清除巩膜、脉络膜、玻璃体后再放入多聚甲醛中固定 24h 后进行 ADP 酶染色:用 4 $^{\circ}$ C 50mmol/L 的 pH=7.2 的 Tris-顺丁烯二酸缓冲液漂洗 15min \times 5 次后,加入 37 $^{\circ}$ C 新鲜配制的 0.2mol/L pH=7.2 的 Tris-顺丁烯二酸缓冲液(3.0mmol/L 硝酸铅,6.0mmol/L 氯化镁,ADP 1g/L)孵育 15min。再用室温 50mmol/L pH=7.2 的 Tris-顺丁烯二酸缓冲液漂洗 15min \times 5 次。然后加入 1:10 稀释的硫化铵染色 1min。最后再用 pH=7.2 的 Tris-顺丁烯二酸缓冲液漂洗 15min \times 3 次,镜下进行视网膜铺片,数码相机镜下拍照。

1.2.5 视网膜石蜡切片计数突破内界膜内皮细胞核 18d 时每组各处死 6 只鼠,过量麻醉致死,摘除眼球后浸泡在眼球固定液中过夜,常规脱水,石蜡包埋,做平行于角膜至视盘矢状位平面连续切片,切片厚度为 6 μ m,HE 染色,每只眼球每间隔 20 μ m 取一张切片,每眼共取 10 张,在光学显微镜下计数切片上突破内界膜内皮细胞核数,定量研究新生血管形成情况。

统计学分析: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用统计软件 SPSS 13.0 对数据进行单因素方差分析, 并用 Bonferroni 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜 PEDF 蛋白的表达 Western-blot 检测结果显示, 左眼即结膜下注射重组人 PEDF 蛋白后视网膜有 PEDF 表达, 而右眼则没有 PEDF 蛋白表达。说明结膜下注射 PEDF 可以到达视网膜组织(图 1)。

2.2 视网膜血管的形态观察 18d 时 A 组视网膜血管基本成熟, 自视盘发出的大血管向四周呈放射状均匀分布, 直至视网膜周边部, 周边部血管较粗。视网膜血管分深浅 2 层, 2 层血管通过螺旋血管相互连接, 深层血管呈多角形网状形态(图 2A), B 组在 18d 时, 有大量新生血管形成, 血管密度增高, 这些新生血管结构分布紊乱, 而且可见浅层和深层血管网有闭塞, 微血管瘤, 周边血管未达到锯齿缘(图 2B), C 组在 18d 时, 可见视盘发出的视网膜血管呈规则的放射状排列, 新生血管明显减少, 视网膜血管密度下降, 深浅视网膜血管网基本正常。结膜下注射 D, E 和 F 组在 18d 时, 视网膜血管密度增高, 血管结构与单纯高氧组无明显区别。

2.3 视网膜病理切片结果

2.3.1 视网膜病理切片 HE 染色结果 A 组: 视网膜内界膜平滑, 血管内皮细胞排列整齐, 罕见突破内界膜内皮细胞(图 3A)。B 组: 可见大量突破内界膜的内皮细胞, 有的部位形成新生血管团(图 3B), 并出现破裂出血(图 3C), 血管扩张淤血(图 3D)。C 组: 可见突破内界膜的血管内皮细胞明显减少, 形成或未形成新生血管腔(图 3E)。D, E, F 组突破内界膜血管内皮细胞少量减少, 但仍可见大量突破内界膜的血管内皮细胞(图 3F)。

2.3.2 突破视网膜内界膜血管内皮细胞核计数结果 A 组突破视网膜内界膜血管内皮细胞核数为 1.88 ± 0.922 个, B 组 25.00 ± 0.939 个, C 组 12.23 ± 0.963 个, D 组 24.58 ± 1.030 个, E 组 23.68 ± 0.770 个, F 组 23.20 ± 0.879 个, A 组与 B 组之间差异有统计学意义($P < 0.05$), B 组与 C 组之间差异有统计学意义($P < 0.05$), B 组与 D 组之间无统计学意义($P > 0.05$), C 组与 D, E, F 组比较均有统计学意义(均为 $P > 0.05$)。

3 讨论

PEDF 于 1989 年在胎儿视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)具有抗血管活性, 被认为是目前发现的活性最强的内源性血管生成负向性调节因子, 逐渐成为新生血管性疾病的研究热点^[3,4]。发现和提纯 PEDF 之初即发现其具有神经营养和保护作用, 不论是对中枢神经系统还是对外周神经系统都具有远期和近期的神经营养和保护作用, 后逐渐发现 PEDF 不仅具有神经营养和保护活性, 还具有较强的抑制血管生成活性^[5]。PEDF 是具有多功能的蛋白质, 可以阻止血管侵入视网膜、玻璃体和角膜^[4]。

目前大部分 PEDF 运输方法是通过病毒和采用玻璃体内或者视网膜前注射的途径, 玻璃体内注射腺病毒转染的 PEDF 正在进行一期临床试验^[6], 考虑到病毒载体可以诱导或限制其细胞免疫或体液免疫, 那么他们长期的表达可以导致对眼球或是对系统慢性长期的作用, 我们考虑另



图 1 视网膜组织 Western-blot 结果。

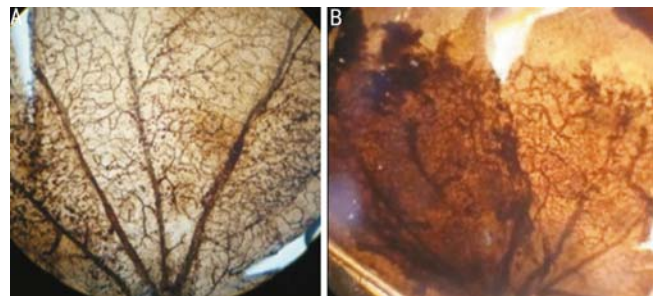


图 2 视网膜血管的形态学变化 (ADP 酶法 $\times 100$) A: A 组 18d; B: B 组 18d。

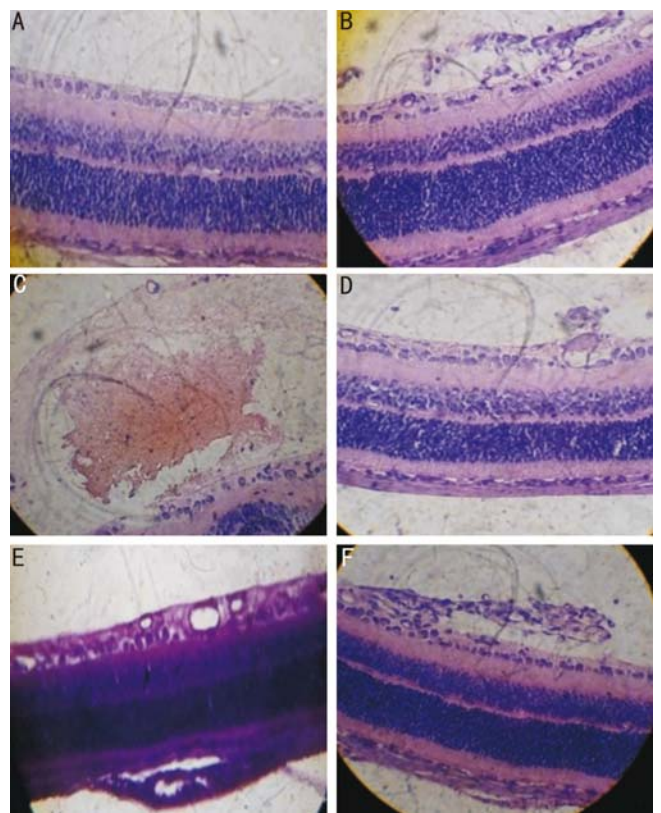


图 3 视网膜血管结构 (HE $\times 400$) A: A 组; B ~ D: B 组; E: C 组; F: F 组。

外的运输方式。直接纯的蛋白或是包括有治疗作用的活性结构的蛋白片段, 或许就可以加强疗效, 使副作用最小化。Stellmach 等^[7]采用腹腔注射 PEDF 蛋白, 可以有效抑制小鼠 RNV 形成。最近有学者使用结膜下注射 PEDF 或者有治疗活性的 PEDF 片段可以有效抑制脉络膜新生血管, 明显减少脉络膜新生血管的生成^[8]。而结膜下注射途径包括药物从巩膜、脉络膜、色素上皮, 最后到达视网膜。Amaral 等^[9]在大鼠结膜下注射 PEDF 或卵清蛋白, 最早至 1h 就可以在脉络膜和视网膜检测到完整蛋白质的表达。本实验结膜下注射 PEDF, 用 Western-blot 检测视网膜 PEDF 的表达, 证实了巩膜和色素上皮层对 PEDF 具有可渗透性, 与 Gehlbach 等^[10]小鼠结膜下注射 $3\mu\text{g}$ PEDF 的实验结果一致。

PEDF的视网膜渗透性可以通过有机体实验进行推测,但是实际的渗透性和其蛋白质传输的具体途径仍然未知。影响其渗透性的可能因素有组织的渗透性、眼内压、清除速度等,内部视网膜和巩膜主要由致密而相互交错的胶原纤维组成,没有血管,几乎没有细胞,但是它对某些物质(清蛋白、菊粉、高分子量的右旋糖苷)还是具有渗透作用的^[9];另外一个对大分子运输到视网膜的屏障是色素上皮-脉络膜。最近 Pitkanen 等^[11]在体外比较了人和兔子的巩膜与牛色素上皮-脉络膜对水溶性复合物的渗透系数,发现对于分子半径 1~6nm 的分子巩膜的渗透系数大约是色素上皮-脉络膜 10~100 倍。

本实验玻璃体注射 PEDF 可有效抑制氧诱导新生鼠 RNV 生成。然而结膜下注射 PEDF,与玻璃体内注射相比,抑制 RNV 的程度有明显差别,可能由于结膜下注射不能保持药物长期、稳定地到达视网膜,不能达到抑制血管平稳的有效浓度。所以为了保证蛋白质稳定长期的释放,可能需要一种蛋白运输装置,比如植入药物缓释装置、皮下植入泵装置等,需探索最佳的药物有效浓度,结膜下注射药物如何有效到达视网膜还需进一步研究。

参考文献

- 1 Chen J, Smith LE. Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis* 2007;10(2):133-140
- 2 Kaiser RS, Trese MT. Iris atrophy, cataracts, and hypotony following peripheral ablation for threshold retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 2001;119(4):615-617
- 3 Tombran-Tink J, Johnson LV. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30(8):1700-1707
- 4 Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999;285(5425):245-248
- 5 Bouck N. PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends Mol Med* 2002;8(7):330-334
- 6 Rasmussen H, Chu KW, Campochiaro P, et al. Clinical protocol. An open-label, phase I, single administration, dose-escalation study of ADGVPEDF. 11D (ADPEDF) in neovascular age-related macular degeneration (AMD). *Hum Gene Ther* 2001;12(16):2029-2032
- 7 Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, et al. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(5):2593-2597
- 8 Amaral J, Becerra SP. Effects of human recombinant PEDF protein and PEDF-derived peptide 34-mer on choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(3):1318-1326
- 9 Amaral J, Fariss RN, Campos MM, et al. Transscleral-RPE permeability of PEDF and ovalbumin proteins: implications for subconjunctival protein delivery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(12):4383-4392
- 10 Gehlbach P, Demetriades AM, Yamamoto S, et al. Periocular injection of an adenoviral vector encoding pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Gene Ther* 2003;10(8):637-646
- 11 Pitkanen L, Ranta VP, Moilanen H, et al. Permeability of retinal pigment epithelium: effects of permeant molecular weight and lipophilicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(2):641-646