

血管内皮生长因子在次声作用后的表达及其与血-视网膜屏障破坏的关系

邱苹 李泱 张文莉 高伟 张作明 姜勇 王士雯

【摘要】 目的 探讨血管内皮生长因子(VEGF)在次声暴露后大鼠视网膜的表达及其与次声暴露的关系。方法 免疫组织化学法研究不同时间次声暴露 VEGF 在视网膜各层的表达情况。结果 各实验所有视网膜组织中, VEGF 的表达随次声暴露的延长而有一定程度的加深。表现为棕黄色阳性染色弥漫分布于神经节细胞层和内核层内。血管分布的区域阳性染色分布较集中。可见表达于内皮细胞的细胞浆内和(或)细胞膜上呈棕黄色圆形,环状分布或不规则分布的颗粒。阴性对照未见阳性染色。结论 次声作用导致大鼠视网膜组织 VEGF 表达不同程度地升高,与次声所致血-视网膜屏障的损害密切相关。

【关键词】 次声;血-视网膜屏障;血管内皮生长因子

Effect of infrasound on the expression of VEGF in the retina and its relation to breakdown of blood-retinal barrier

QIU Ping, LI Yang, ZHANG Wenli, et al

Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the possible effect of infrasound on the expression of VEGF in the retina. **Methods** Twelve mature male rats were used to study the effect of infrasound at 8 Hz frequency and 130 dB sound pressure level. Histological examination and immunohistochemical staining with antibody against VEGF antigen were performed before and after the infrasound exposure. **Results** Vascular endothelial growth factor (VEGF) was upregulated by infrasound exposure. VEGF expression identified by immunohistochemical staining was mainly located in the inner nuclear layer and the ganglion cells of retina, while it was generally absent in the majority of retinas of the control eyes. **Conclusion** VEGF is upregulated by infrasound exposure, which may contribute to the breakdown of the blood-retinal barrier.

【Key words】 infrasound; blood-retinal barrier; VEGF

次声是频率低于 20Hz 的声波,具有波长长,大气衰减程度低,能够绕射等物理特性。近年来,次声不但作为环境污染因素引起人们的关注,而且其军事应用的潜在危险也令人注目。作者在过去的研究中发现,一定强度的次声可造成大鼠血-视网膜屏障

通透性的损伤^[1],但其机制还不清楚。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)常作为血管内皮损伤的检测指标。因此,作者拟通过免疫组织化学方法检测大鼠视网膜中 VEGF 蛋白的表达,以进一步研究次声对视网膜组织的损伤情况及血-视网膜屏障通透性改变的机制。

收稿日期:2004-01-02

基金项目:本课题受国家自然科学基金(No.39900162),军队九五重点课题(No.96Z042)及国家博士后科学基金资助(No.2003033189)。

作者单位:100853 北京市,解放军总医院老年心血管病研究所(邱苹,李泱,张文莉,高伟,王士雯);710032 西安市,解放军第四军医大学航空临床教研室(张作明);510515 广州市,解放军第一军医大学病理生理教研室(姜勇)

通讯作者:李泱, Tel:010-66936762

1 材料和方法

1.1 动物及动物模型的建立 健康成年雄性 SD 大鼠(解放军第四军医大学实验动物研究中心提供)12 只,体重 200 ~ 250 g,分笼饲养于安静舒适环境下〔基础噪音不高于 40dB SPL(sound pressure level)〕。用完全随机法将实验动物分为 4 组,每组 3 只。实验组给予 8 Hz, 130 dB SPL 的次声暴露,1 次/d,每次

2 h,分别暴露 1、7、21 d。对照组亦每日置于次声舱中 2 h,但不接受次声暴露。次声压力舱系统采用第四军医大学研制的电激励式次声压力舱系统。该舱体积为 0.86 m³,舱内各空间点次声的频率和声压级水平保持一致。

1.2 标本制作 眼后段做常规病理切片,采用免疫组织化学方法检测 VEGF 的表达情况。标本灌注固定同光镜标本制作。次日按常规脱水、石蜡包埋。所有眼球标本准备就绪后作 5 μm 厚度连续切片,贴于经 APES 胶处理后的载玻片上。阴性对照用未经次声作用的大鼠眼后段病理标本。用每一标本的连续切片以 PBS 代替第一抗体做自身空白对照。采用已知阳性的血管瘤标本作阳性对照。

1.3 试剂及抗体 兔抗人/鼠 VEGF 单克隆抗体(美国 Santacruz 公司),生物素标记的羊抗兔 IgG、封闭用马血清及卵白素、生物素标记的过氧化酶(美国 Vector 公司),3,3-二氨基联苯胺(3,3-diaminobenzidine, DAB)显色剂(美国 DAKO 公司),APES 胶(美国 SIGMA 公司)。

1.4 免疫组织化学染色 切片 3% H₂O₂ 室温处理 30 min,正常马血清(1:100)室温封闭 0.5 h,滴加兔抗人/鼠 VEGF 单克隆抗体(1:120),4℃过夜,PBS 漂洗,滴加生物素标记的羊抗兔 IgG(1:50),室温

30 min,漂洗,显色剂为 0.04% 的 DAB,根据镜下观察终止反应,苏木素复染后脱水、透明、中性树脂封片,光镜观察与照相。

1.5 结果判定 在光镜观察下,清晰背景衬托下细胞间质出现棕黄色为 VEGF 阳性。

2 结果

2.1 对照组 用 PBS 液代替 VEGF 抗体,视网膜组织不着色(图 1)。正常视网膜组织中仅在内核层及神经节细胞层检测到个别微弱的 VEGF 免疫活性(图 2)。

2.2 实验组 各实验组所有视网膜组织中,VEGF 的表达随次声暴露时间的延长而有不同程度的加深。与正常视网膜组织相比,1 d 次声暴露组大鼠 VEGF 在神经节细胞、内核层细胞表达明显,可见视网膜血管内皮细胞的着色(图 3);7 d 组神经节细胞胞浆棕黄色染色的细胞增多,内核层可见到呈棕黄色阳性反应的胶质细胞,外网状层内的个别胶质细胞的树突及轴突显色(图 4)。至 21 d,所有被检的视网膜组织均显示出显著的 VEGF 免疫活性,神经节细胞、内核层细胞出现大量胞浆棕黄色颗粒,内网状层及外网状层树突及轴突的染色强度及密度较 7 d 组有所增强(图 5)。

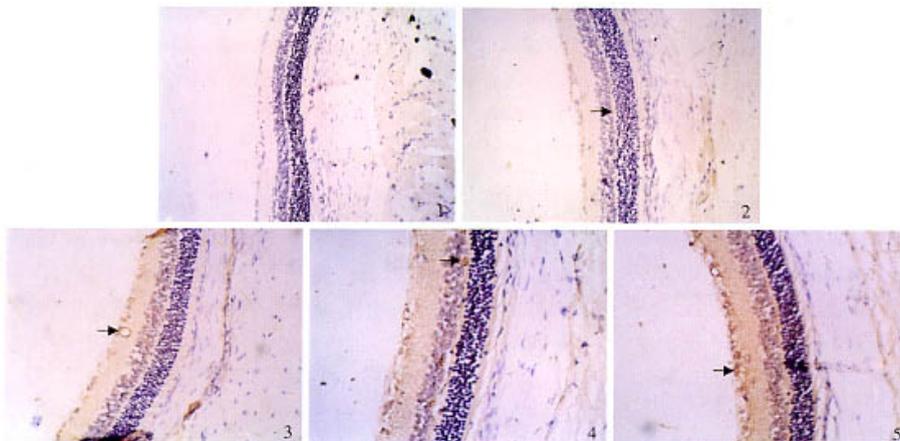


图 1 空白对照

图 2 正常视网膜组织 可见内核层细胞的 VEGF 淡染着色(箭头所示)

图 3 次声暴露 1 d 神经节细胞、内核层细胞表达明显,可见视网膜血管内皮细胞的着色(箭头所示)

图 4 次声暴露 7 d 神经节细胞层,内核层可见到呈棕黄色阳性反应的细胞(箭头所示)

图 5 次声暴露 21 d 神经节细胞、内核层细胞出现大量胞浆棕黄色颗粒,内网状层及外网状层树突及轴突的染色强度及密度加强,血管分布的区域阳性染色分布更为集中(箭头所示)

3 讨论

VEGF是目前所知最强的内皮细胞选择性促有丝分裂因子和血管生成因子,它能在数分钟内增加微血管对血浆蛋白的通透性,其作用比组胺强50 000倍,这一独特的生物学效应使它对一些疾病的发生发展产生不良影响。

笔者前期的电镜学观察显示,大鼠暴露于8 Hz、130 dB次声作用下血-视网膜屏障通透性增高^[1],然而其分子机制还不清楚。本实验采用免疫组织化学方法进行研究,结果发现正常大鼠视网膜组织几乎无VEGF表达,而随次声暴露时间的延长,视网膜组织VEGF的免疫活性增强。在对以视网膜微血管高通透性为特点的糖尿病视网膜病变的研究中,人们发现视网膜及玻璃体下液中VEGF的表达增高^[2]。Yaccina等^[3]利用生长在多聚碳酸酯滤膜(polycarbonate filter)上致密融合的牛视网膜微血管内皮细胞单层模拟血-视网膜屏障的功效,发现VEGF可显著增加内皮单层对大分子,如白蛋白的通透系数。缺氧是刺激VEGF mRNA表达的最强因素^[4]。视网膜局部缺氧不仅诱导VEGF产生,还可使内皮细胞上VEGF受体数目增加5%,并保持受体的高亲和力^[5]。笔者认为在次声作用后,视网膜存在缺血缺氧状态,诱导VEGF大量产生,并作用于微血管内皮细胞,导致血-视网膜屏障开放,通透性发生改变。

Dorey等^[6]观察饲养于缺氧环境中新生大鼠视网膜组织,发现Müller细胞VEGF mRNA表达最强阳性,RPE细胞、星型胶质细胞、无长突细胞居中,神经

节细胞和其他内核层细胞次之^[6]。笔者的实验却并未观察到RPE细胞的VEGF免疫活性,而以内核层和神经节细胞的高表达为特征。这说明次声对血-视网膜屏障的损害与单纯缺氧视网膜损伤在机制上可能存在差异。作者认为此时次声的能量还不足以造成整个视网膜血液供应的损害,而耗氧量大的内层视网膜神经层,加之仅接受视网膜血管供应,较敏感的出现缺血、缺氧症状,从而诱导内层视网膜组织VEGF的表达增加。

参考文献

- 1 邱萍,姜勇,张作明,等.次声暴露对大鼠血-视网膜屏障超微结构的损害.中华眼科杂志,2002,38:499-501.
- 2 Burgos R, Simo R, Audi L, et al. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor are influenced by its serum concentrations in diabetic retinopathy. Diabetologia, 1997, 40:1107-1109.
- 3 Yaccina JA, Chang YS, Hollis TM, et al. Physiological transport properties of cultured retinal microvascular endothelial cell monolayers. Curr Eye Res, 1997, 16:761-768.
- 4 Kuroki M, Voest EE, Amano S, et al. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression *in vitro* and *in vivo*. J Clin Invest, 1996, 98:1667-1675.
- 5 Thieme H, Aiello LP, Takig H, et al. Comparative analysis of vascular endothelial growth factor receptor on retinal and aortic endothelial cells. Diabetes, 1995, 44:98-103.
- 6 Dorey CK, Aouididi S, Reynaud X, et al. Correlation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor with extraretinal neovascularization in the rat. Arch Ophthalmol, 1996, 114:1210-1217.

·基础研究·

RON基因反义核酸真核表达载体的构建及其对A549的体外作用

潘铁成 徐利军 李军 赵金平 陈涛 魏翔

【摘要】 目的 肺癌的发生是多因素作用的结果, RON基因参与其中,但它在肺癌的基因治疗中意义尚不明确。本研究旨在探讨RON能否作为肺癌的基因治疗靶点及针对该基因跨膜区段(RONm)反义核酸对肺癌细胞的生物学功能的影响。方法 从人肺鳞癌细胞提取总RNA进行RT-PCR、T载体克隆和测序,获得RON基因的跨膜区段,并将其反向插入真核表达载体中,转染肺癌细胞,利用ELISA检测细胞模型RON基因表达后的蛋白水平,同时

收稿日期:2004-08-26

作者单位:430030 武汉市,华中科技大学同济医学院附属同济医院胸心外科

作者简介:潘铁成,男,1953年1月生,湖北省武汉市人,医学硕士,教授,主任医师,科主任。Tel: 027-83662589