

【实验研究】

陈珊珊 杨中伊 李姝蓉 刘桥生 付书华

【摘要】 目的 探讨 Arresten 在氧诱导小鼠视网膜新生血管形成中的抑制作用及机制。**方法** 选取 48 只出生后 7 d 健康清洁级 C57BL/6J 幼鼠,随机分为氧诱导视网膜病变(oxygen induced retinopathy, OIR)组、OIR + Arresten 组和常氧组,每组 16 只。OIR + Arresten 组及 OIR 组幼鼠在体积分数为 $(75 \pm 2)\%$ 的高氧环境下饲养 5 d,然后转移至正常氧气环境中饲养 5 d,其中 OIR + Arresten 组幼鼠于高氧饲养刚结束时,给予双眼玻璃体内注射 Arresten 蛋白。常氧组幼鼠则在常规氧气环境中连续饲养 10 d。在鼠龄 17 d 时,各组取 6 只幼鼠经股静脉注射异硫氰酸葡聚糖溶液处死并摘出眼球,视网膜铺片后观察视网膜的血管形态、计算无灌注区面积。同时对小鼠眼球视网膜行石蜡切片和 HE 染色,计算侵入同时,通过细胞培养实验,利用 MTT 法检测 Arresten 蛋白对入血管内皮细胞增殖的抑制作用。常氧组、OIR 组、OIR + Arresten 组视网膜无灌注区相对面积分别为 $(2.35 \pm 1.62)\%$ 、 $11.25 \pm 1.52\%$ 、 $3.12 \pm 1.12\%$,三组间总体比较,差异有统计学意义($F = 18.732, P < 0.05$),且 OIR 组无灌注区相对面积与 OIR + Arresten 组无灌注区面积比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。常氧组小鼠视网膜的内界膜结构仍保持平滑完整,未发现有新生血管。OIR + Arresten 组每张切片上血管内皮细胞核的数量分别为 (15.18 ± 4.83) 个、 (7.33 ± 3.88) 个,常氧组每张切片上血管内皮细胞核的数量显著低于 OIR 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Arresten

蛋白对人脐静脉内皮细胞增殖的抑制率随着其浓度的升高而增加,但当 Arresten 蛋白浓度达到 $1000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,人脐静脉内皮细胞的增殖抑制率达到顶峰,为 $(58.00\pm0.65)\%$ 。结论 Arresten 蛋白能够抑制氧诱导的小鼠视网膜新生血管形成,通过抑制血管内皮细胞增殖来抑制新生血管形成。

【关键词】 Arresten;氧诱导视网膜病变;视网膜新生血管

【中图分类号】 R772.2

视网膜组织缺血缺氧诱发的视网膜新生血管(retinal neovascularization, RNV)形成是导致视功能损害的重要原因之一^[1]。已有大量研究证实,血管生成诱导因子和血管生成抑制因子在 RNV 形成过程中均发挥重要作用,两者的平衡状态决定了新生血管是否出现^[2]。Arresten 是一种特异性抑制内皮细胞增殖和血管生成的多肽因子,研究表明 Arresten 蛋白对肿瘤新生血管形成有抑制作用^[3]。然而,它对 RNV 形成的作用及机制仍不清楚。本研究拟利用氧诱导视网膜病变(oxygen induced retinopathy, OIR)小鼠模型,通过在小鼠玻璃体内注射 Arresten 蛋白,探讨 Arresten 对 RNV 形成的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 选取 48 只出生后 7 d 健康清洁级 C57BL/6J 幼鼠(购自南昌大学医学院实验动物中心),按随机数字表法将幼鼠分为 3 组,每组 16 只,分别为 OIR + Arresten 组、OIR 组和常氧组。实验动物的使用严格遵循南昌大学及视觉与眼科研究协会关于科学研究中动物使用的相关规定。

1.1.2 主要试剂及仪器 相对分子质量约为 20×10^3 的异硫氰酸葡聚糖(FITC-dextran)(美国 Sigma 公司);抗淬灭封片剂(美国 Vectashield 公司);CY-12C 数字测氧仪(浙江省建德市梅城电化分析仪器厂);荧光显微镜(日本 Olympus 公司);Hamilton 微量注射器(上海骊葆科学仪器有限公司);DG5033A 酶联免疫检测仪(上海珂淮仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 OIR 小鼠模型的建立 根据文献^[4]提供的方法:将 OIR + Arresten 组及 OIR 组幼鼠饲养在密闭玻璃容器中,持续通入体积分数为 $(75\pm 2)\%$ 的氧气,CY-12C 数字测氧仪每 4 h 测量 1 次出气口处的氧气体积分数,每天开放密闭容器 1 次,更换鼠粮、垫料、水及轮换母鼠。当幼鼠在高氧环境中连续饲养 5 d 后再转移至普通空气环境中饲养 5 d。常氧组幼鼠则在普通空气环境中连续饲养 10 d。

1.2.2 玻璃体内注射 Arresten 蛋白 OIR + Arresten 组幼鼠在高氧环境下饲养结束时,经腹腔内注射 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 戊巴比妥钠全身麻醉后,在位于角膜缘后 2 mm 处用 $10\text{ }\mu\text{L}$ 微量注射器以 45° 进针,缓慢将 $2\text{ }\mu\text{L}$ $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Arresten 蛋白注入幼鼠的双眼玻璃体内。注射完毕,静置 15 s 后缓慢撤针。OIR 组和常氧组幼鼠用同样方法注射等量生理盐水于玻璃体内。

1.2.3 小鼠荧光素眼底血管造影 按照文献^[5]描述的方法,首先将 FITC-dextran 粉末溶于去离子水中,配制成 $50\times 10^3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 FITC-dextran 溶液。各组分别取 6 只出生后第 17 天的小鼠,腹腔内注射戊巴比妥钠全身麻醉后,显微镜下用 1 mL 注射器经股静脉缓慢注入 0.5 mL FITC-dextran 溶液,静置 10 s 后缓慢撤针,待 FITC-dextran 循环 5 min 后利用二氧化碳窒息法处死幼鼠,迅速摘出眼球,放置于 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 多聚甲醛溶液中固定 40 min。显微镜下小心分离出视网膜,然后以视盘为中心放射状将视网膜剪成 4 瓣,用含 DAPI 的抗淬灭封片剂封片,于暗室内在荧光显微镜下观察并照相。并用 CellSens Standard 软件(日本 Olympus 公司)测量视网膜无灌注区及荧光渗漏区的相对面积。

1.2.4 小鼠眼球玻璃体内新生血管内皮细胞核计数 在小鼠出生后第 17 天,各组分别取 6 只小鼠,处死后摘除眼球,石蜡包埋,沿矢状位切成厚度为 $4\text{ }\mu\text{m}$ 的石蜡切片,每间隔 10 张收集 1 张用于计数新生血管细胞核数量,每只眼球共收集 10 张切片,排除含视神经的切片,行苏木精-伊红染色,分别计算出每张切片中突破内界膜进入玻璃体内的新生血管内皮细胞核的数量,然后计算出每张切片的平均数。

1.2.5 MTT 法检测 Arresten 蛋白对人血管内皮细胞增殖的影响 收集处于对数生长期的人脐静脉内皮细胞,于 96 孔培养皿中按 $20\times 10^6\text{ 个}\cdot\text{L}^{-1}$ 细胞密度进行接种,每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$ 。培养至细胞单层铺满孔底,分成实验组及对照组,每组设 7 个复孔。实验组培养液中分别加入浓度为 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $600\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $800\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Arresten 蛋白溶液,对照组培养液加入等体积 PBS 溶液。培养 3 d 后,弃培养液,PBS 清洗 2 遍,加入 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 培养液 $20\text{ }\mu\text{L}$,孵育 4 h。每孔加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ Formazan 溶解液,充分溶解后用酶联免疫检测仪测量波长 570 nm 处各孔的吸光度(A)值,然后计算细胞的增殖抑制率。增殖抑制率($\%$) = $(1 - \text{实验组 A 值}/\text{对照组 A 值})\times 100\%$,然后以细胞的增殖抑制率为纵轴,Arresten 蛋白浓度($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)为横轴,绘制细胞增殖抑制曲线。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。各组量化的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,经 Levene 检验证实方差齐,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组视网膜无灌注区相对面积及突入玻璃体内的新生血管内皮细胞核数量的总体比较均采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠 FITC-dextran 眼底血管造影时视网膜无灌注区及荧光渗漏区的相对面积 常氧组小鼠的视网膜血管呈均匀网状结构分布,视网膜中央未发现无灌注及荧光渗漏区(图 1A);OIR 组视网膜中央可见大片无灌注区及荧光渗漏区,荧光渗漏区主要位于无灌注区和灌注区的交界处(图 1B)。

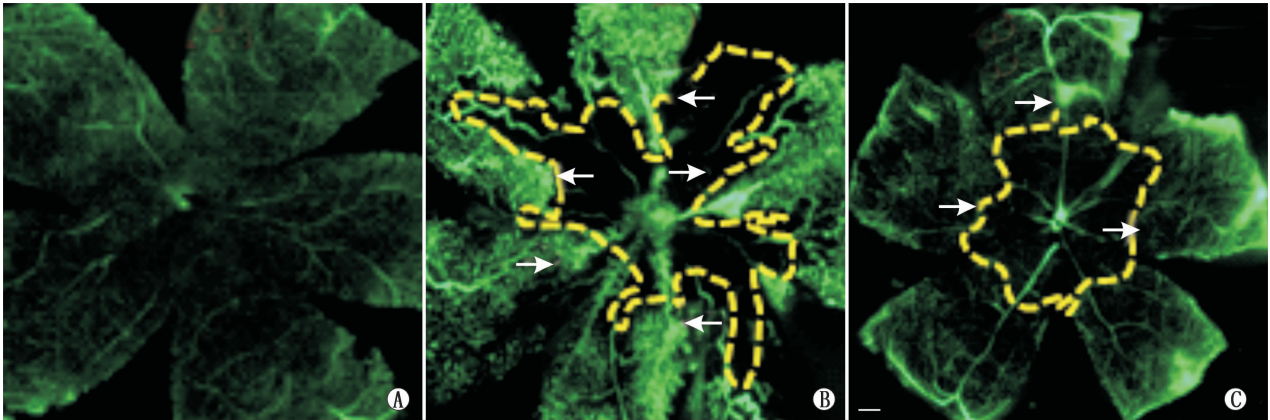


图 1 各组小鼠眼底 FITC-dextran 血管造影显示视网膜无灌注及荧光渗漏区。A、B、C 分别为常氧组、OIR 组、OIR + Arresten 组小鼠视网膜铺片;黄色虚线区域内为无血管灌注区;白色箭头为强荧光渗漏区;标尺 = 500 μm

2.2 各组小鼠视网膜形态及侵入玻璃体内的血管内皮细胞核数量比较 将视网膜石蜡切片进行苏木精-伊红染色,结果显示,OIR 组内界膜形态极不规则,细胞排列紊乱、增生明显,可见大量侵入玻璃体内的新生血管管腔,每张切片上血管内皮细胞核的数量为(15.18 \pm 4.83)个。OIR + Arresten 组也可发现有新生血管侵入玻璃体内,每张切片上血管内皮

OIR + Arresten 组视网膜中央可见小面积无灌注区(图 1C)。定量分析其面积:常氧组、OIR 组、OIR + Arresten 组视网膜无灌注区相对面积分别为(2.35 \pm 1.62)%、(57.28 \pm 9.36)%和(20.38 \pm 8.69)%,三组间视网膜无灌注区相对面积总体比较,差异有统计学意义($F = 18.732, P < 0.05$);且 OIR 组无灌注区相对面积显著高于 OIR + Arresten 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

细胞核的数量为(7.33 \pm 3.88)个。而常氧组小鼠视网膜的内界膜结构仍保持平滑完整,未发现新生血管侵入玻璃体内。3 组间侵入玻璃体内的新生血管内皮细胞核数量总体比较,差异有统计学意义($F = 106.37, P < 0.05$);其中,OIR + Arresten 组侵入玻璃体内的新生血管内皮细胞核数量显著低于 OIR 组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。见图 2。

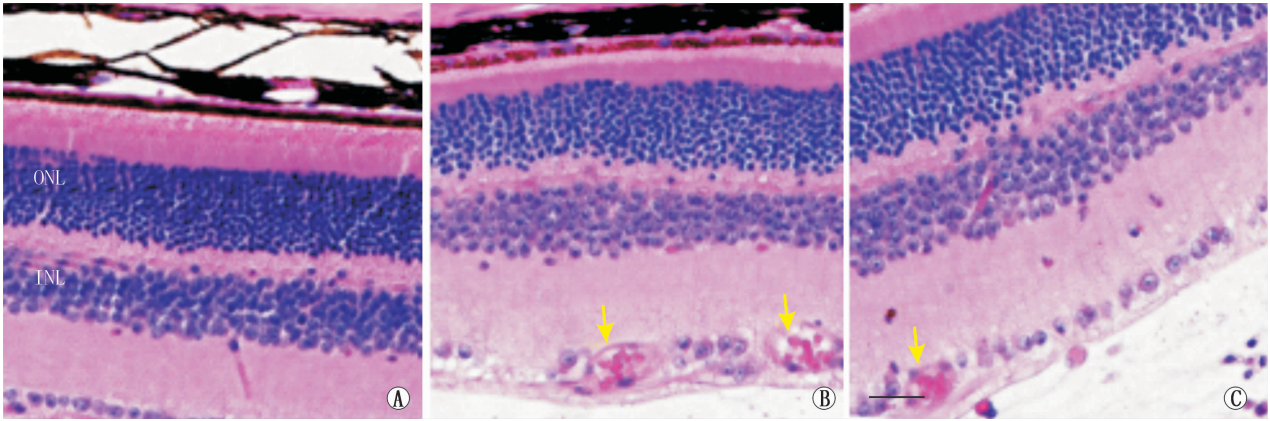


图 2 各组小鼠视网膜 HE 染色显示侵入内界膜的血管内皮细胞核(黄箭头)。A、B、C 分别为常氧组、OIR 组、OIR + Arresten 组小鼠视网膜切片 HE 染色;ONL:外核层;INL:内核层;标尺 = 50 μm

2.3 Arresten 蛋白对人脐静脉内皮细胞增殖的抑制作用 Arresten 蛋白对人脐静脉内皮细胞的增殖有明显的抑制作用,且当 Arresten 蛋白浓度在 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下时,抑制率随着浓度的增加而上升,当

Arresten 蛋白浓度为 1000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,人脐静脉内皮细胞的增殖抑制率达到顶峰,为(58.00 \pm 0.65)%;随后继续增加 Arresten 蛋白浓度,细胞增殖抑制率并不增加。见图 3。

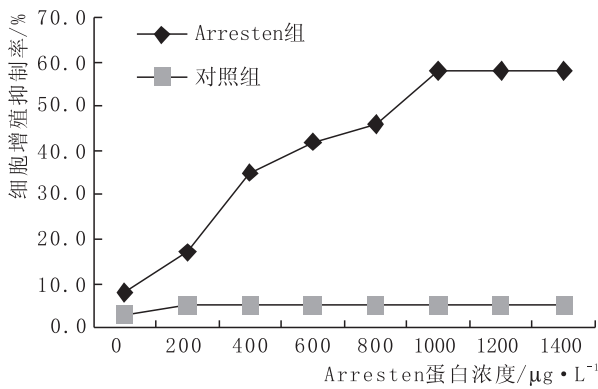


图3 Arresten 蛋白对人脐静脉内皮细胞增殖抑制率的影响

3 讨论

RNV 形成是致盲的重要原因之一,由于新生血管通透性高、易引起出血,并且可以促进结缔组织增生形成对视网膜的牵拉,从而引起患者视力下降。尽管抗血管内皮生长因子药物治疗是目前治疗 RNV 的有效方法,但它仍然存在很多不足^[6-8],如临床上经常会发现有相当一部分患者对抗血管内皮生长因子药物不敏感,治疗效果差^[9-10]。反复玻璃体内注射存在眼内感染及眼内出血等风险。而且,长期抗血管内皮生长因子治疗可以引起脉络膜毛细血管和光感受器细胞超微结构及功能异常^[11]。因此,继续研究新的治疗 RNV 的药物对防盲、治盲工作有重大意义。

Arresten 是由 Colorado 等^[12]于 2000 年发现的一种强效血管生成抑制因子,为 IV 型胶原 $\alpha 1$ 链的羧基末端的多肽片段,其对应的 DNA 编码序列长 690 bp,肽链由 230 个氨基酸残基组成。研究显示,纯化重组 Arresten 在离体条件下可以有效抑制血管内皮细胞增殖,在荷瘤小鼠体内能够抑制肿瘤细胞增殖、迁移和血管形成^[13-14]。Chew 等^[15]研究证实,Arresten 与内皮抑素 Endostatin 均为来自胶原蛋白的血管生成抑制因子,尽管两者都无毒副作用,但 Arresten 比 Endostatin 更稳定,更能有效地保持其活性。本实验中我们利用 OIR 小鼠模型,证实 Arresten 可以有效抑制 RNV 形成。在 OIR 组中,小鼠视网膜无灌注区接近 60%,且可见大量侵入玻璃体内的新生血管管腔形成;而在玻璃体内注射 Arresten 蛋白后,OIR 小鼠视网膜无灌注区下降至 30% 以下,侵入玻璃体内的新生血管管腔也显著减少。该结果表明,Arresten 蛋白可有效抑制 RNV 的形成。

新生血管形成过程非常复杂,涉及多个病理机制,其中血管内皮细胞分裂、增殖是其重要环节之一^[16]。为进一步研究 Arresten 蛋白抑制氧诱导的小鼠 RNV 的作用机制。实验过程中我们采用 MTT 比色法,观察了不同浓度 Arresten 蛋白对人脐静脉内皮细胞增殖的抑制作用,结果表明,Arresten 能有效

抑制内皮细胞的增殖,且在一定浓度范围内,内皮细胞增殖的抑制率随着 Arresten 浓度的升高而增加,当 Arresten 浓度为 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,其增殖抑制率接近 60%。但再继续增加 Arresten 蛋白浓度,并不能进一步抑制内皮细胞的增殖。因此,我们认为 Arresten 有可能是通过抑制内皮细胞增殖而发挥抑制氧诱导的 RNV 形成的作用。

参考文献

- [1] REZZOLA S, BELLERI M, GARIANO G, RIBATTI D, COSTA-GLIOLA C, SEMERARO F, et al. In vitro and ex vivo retina angiogenesis assays [J]. *Angiogenesis*, 2014, 17 (3): 429-442.
- [2] HANAHAN D, FOLKMAN J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. *Cell*, 1996, 86 (3): 353-364.
- [3] LV Y, ZHANG H F, FU Z D, ZHENG J P. Arresten protein inhibits migration of cervical cancer cells by regulating EMT [J]. *Chin Remed Clin*, 2017, 17 (9): 1273-1276. 吕懿, 张慧芳, 付振东, 郑金平. Arresten 蛋白通过调控上皮-间质转化抑制宫颈肿瘤细胞的迁移 [J]. *中国药物与临床*, 2017, 17 (9): 1273-1276.
- [4] LI R L, CHEN N, MENG L L, ZHU H. Effect of DNA damage marker γH2AX in the process of oxygen-induced retinal neovascularization [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35 (10): 879-884. 李若琳, 陈楠, 孟丽丽, 朱虹. DNA 损伤标志物 γH2AX 在氧诱导视网膜新生血管形成中的作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35 (10): 879-884.
- [5] LI S, LI T, LUO Y, YU H, SUN Y, ZHOU H, et al. Retro-orbital injection of FITC-dextran is an effective and economical method for observing mouse retinal vessels [J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 3566-3573.
- [6] MITTELU M, CHAUDHARY K M, LIEBERMAN R M. An evidence-based meta-analysis of vascular endothelial growth factor inhibition in pediatric retinal diseases: part 1. Retinopathy of prematurity [J]. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 2012, 49 (6): 332-340.
- [7] LI Y, BUSOY J M, ACHIRM B A, ZAMAN B A A, WOON Q T S, TAN G S, et al. A novel model of persistent retinal neovascularization for the development of sustained anti-VEGF therapies [J]. *Exp Eye Res*, 2018, 174: 98-106.
- [8] CAMPA C, ALIVERNINI G, BOLLETTA E, PARODI M B, PERRI P. Anti-VEGF therapy for retinal vein occlusions [J]. *Curr Drug Targets*, 2016, 17 (3): 328-336.
- [9] BROADHEAD G K, HONG T, CHANG A A. Treating the untreatable patient: current options for the management of treatment-resistant neovascular age related macular degeneration [J]. *Acta Ophthalmol*, 2014, 92 (8): 713-723.
- [10] FU S, DONG S, ZHU M, LE Y. VEGF as a trophic factor for Müller glia in hypoxic retinal diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1074: 473-478.
- [11] ZHANG Y, HAN Q, RU Y, BO Q, WEI R H. Anti-VEGF treatment for myopic choroid neovascularization: from molecular characterization to update on clinical application [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 3413-3421.
- [12] COLORADO P C, TORRE A, KAMPHAUS G, MAESHIMA Y, HOPFER H, TAKAHASHI K, et al. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (9): 2520-2526.
- [13] ASSADIAN S, EL-ASSAAD W, Wang X Q, GANNON P O, BARRES V, LATOUR M, et al. p53 inhibits angiogenesis by inducing the production of Arresten [J]. *Cancer Res*, 2012, 72 (5): 1270-1279.
- [14] AIKIO M, ALAHUHTAI I, NURMENNIEMI S, SUOJANEN J, PALOVUORI R, TEPPON S, et al. Arresten, a collagen-derived angiogenesis inhibitor, suppresses invasion of squamous cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (12): 1044-1048.
- [15] CHEW L J, PAN H, YU J, TIAN S, HUANG W Q, ZHANG J Y, et al. A novel secreted splice variant of vascular endothelial cell growth inhibitor [J]. *FASEB J*, 2002, 16 (7): 742-744.
- [16] ZHANG H F, HUDSON F Z, XU Z M, TRITZ R, ROJAS M, PATEL C, et al. Neurofibromin deficiency induces endothelial cell proliferation and retinal neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59 (6): 2520-2528.