

大鼠视神经夹持伤后视网膜 Flt-1 的表达及意义

赵宏伟 胡莲娜 罗 灵 聂 闯 赵 军 闫洪欣 高付林 王 媛

摘 要 **目的** 观察大鼠视神经夹持伤后视网膜血管内皮生长因子受体-1(Flt-1)蛋白的表达变化及分布。**方法** 将12只成年健康SD大鼠右眼行手术视神经夹持10s,左眼行手术只暴露视神经,不夹持。伤后6h、3、7、21天各取3只行免疫组化染色观察视网膜Flt-1的表达变化及分布特征。并用图像分析仪对上述结果进行灰度量化后统计分析。**结果** 正常大鼠视网膜Flt-1蛋白呈低度表达,在视网膜内外核层、节细胞层均有少量表达。视神经夹持伤后6h视网膜的Flt-1蛋白表达开始升高,3天达到峰值,7天后开始下降,21天后降至正常以下。伤后各时间点Flt-1蛋白表达灰度值与对侧眼比较,差异均有统计学意义。**结论** 大鼠视神经损伤后伴有视网膜组织Flt-1蛋白表达的异常,后者可能参与伤后的视网膜及视神经组织的修复。

关键词 血管内皮生长因子受体-1 视神经夹持伤 大鼠

中图分类号 R77 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.04.033

Expression and Significance of Flt-1 in Retinal on Optic Nerve Clamping Injury of Rats. Zhao Hongwei, Hu Lianna, Luo Ling, et al. Department of Ophthalmology, The 306th Hospital of PLA, Beijing 100101, China

Abstract **Objective** To observe expression and distribution of Flt-1 in retinal on optic nerve clamping injury of rats. **Methods** The 12 healthy adult SD rats were surgiered that optic nerve were clamped 10s on right eye, only to be exposed optic nerve on left eye. Expression and distribution of Flt-1 were deteced with immunohistochemical staining in retinal on 6h, 3d, 7d, 21d optic nerve clamping injury of rats. And gray value of these results were analyzed with image analyzer. **Results** There was a low level expression of Flt1 protein mainly in the retina inner, outer nuclear layer and ganglion cell layer in normal rats. After clamping the optic nerve injury, Flt-1 began to rise at 6h, to be on top at 3d, to begin to fall at 7d, and to be lower at 21d than normal in retina. There was statistically significant of gray values in Flt-1 protein expression after injury between both eyes. **Conclusion** Optic nerve injury was accompanied by abnormal retinal tissue Flt-1 protein expression in rats, which could be involved in the repair of retinal and optic nerve after injury.

Key words VEGFR1/Flt-1; Optic nerve clamping injury; Rats

视神经是中枢神经延伸,一旦损伤,其再生和修复尤为困难。青光眼、外伤、缺血等均可以引起视神经的损伤。因此,神经保护治疗成为上述疾病的研究重点。近年来对血管内皮生长因子B(vascular endothelial growth factor, VEGF-B)的研究发现其具有神经保护作用,且不伴有新生血管的生成^[1,2]。而VEGF-B主要通过和Flt-1结合发挥作用。因此,在神经损伤后的保护治疗方面,Flt-1也成为潜在的有效靶点。本研究旨在通过对视神经损伤的过程中不同时间节点视网膜上Flt-1的表达分布及变化的观察,为视神经损伤后的基因靶点治疗提供实验依据。

材料与方法

1. 动物来源及分组:北京大学医学部实验动物中心提供

作者单位:100101 北京,中国人民解放军第306医院(赵宏伟、胡莲娜、罗灵、赵军、闫洪欣、高付林、王媛);100853 北京,中国人民解放军第301医院(聂闯)

通讯作者:胡莲娜,电子信箱:hulianns306@gmail.com

12只清洁级6~8周龄SD大鼠,体质量200~300g,雌雄各半。右眼为实验眼,手术行视神经夹持;左眼为对照眼,手术只暴露视神经,不夹持。

2. 动物模型制备:视神经夹持伤模型:10%水合氯醛以5ml/kg腹腔注射麻醉,显微镜下剪开右眼球结膜,钝性向后分离,打开肌锥,暴露视神经,用反向镊自视神经后2mm夹持10s,造成视神经挤压伤,随即用载玻片压迫眼球,显微镜下观察大鼠眼底血液供应情况,确认无缺血后纳入实验。左眼手术只暴露视神经,不夹持。

3. 免疫组化荧光染色:取不同时间点大鼠各3只,10%水合氯醛过量后麻醉致死,显微镜下摘除眼球,角膜穿孔后置于4%多聚甲醛溶液中2h,4℃的15%蔗糖溶液中约1h,沉底后取出再置入30%的蔗糖溶液,4℃冰箱过夜。第2天取出眼球后用滤纸吸干表面蔗糖溶液后用OCT包埋液包埋,待组织浸没并排尽气泡后用液氮速冻,-20℃冷冻切片切片机切片,厚度为10μm。用SABC-Cy3免疫组化染色试剂盒(博士德公司,产品编号SA1074)按试剂盒说明:切片滴加0.01mol/L PBS1:10稀释的正常血清封闭液,室温10min。滴加0.01mol/L PBS稀释的一抗(货号BA0487 1:200),4℃过夜。0.01mol/L PBS冲

洗。滴加 0.01mol/L PBS 稀释的生物素化二抗(1:100),37℃ 3min,0.01mol/L PBS 冲洗。甘油封片,荧光显微镜观察拍照。Cy3 在 554nm 激化,在 568~574nm 发射荧光,呈现红色。

4. 图像分析系统:将免疫荧光染色结果照片导入图像分析仪(MIAS-300 图像分析仪),灰度值范围 $0 \leq \text{Grey} \leq 255$,最大值为 255,在图像显示屏上为最亮点;最小值为 0,在图像显示屏上为最黑点。每只眼选取 5 张荧光染色照片(每时间点 3 只大鼠,共 15 张),每张照片对视网膜神经节细胞层、内核层、外核层各任意选取一点灰度值后取平均值。

5. 统计学方法:采用 CHISS 统计软件对数据进行分析,灰度值以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各时间点内定量数据资料

行配对 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Flt-1 蛋白表达的分布特征:免疫组化荧光染色显示正常大鼠视网膜 Flt-1 蛋白呈低度表达,在视网膜内外核层,节细胞层均有少量表达。视神经损伤后 6h,视网膜组织的 Flt-1 表达即开始升高,染色显示较强红色亮荧光;3 天后进一步表达升高,达到峰值,荧光强度进一步增高;7 天后开始下降,21 天后进一步下降至正常水平以下。从荧光染色强度来看视神经损伤后 Flt-1 蛋白的表达变化在视网膜神经节细胞层影响最明显(图 1)。

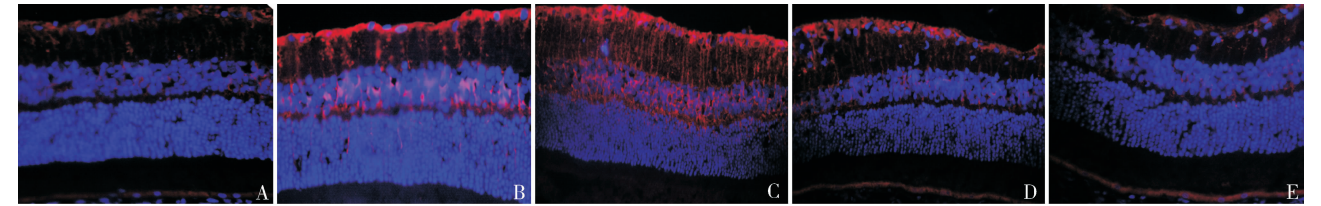


图 1 视神经夹持伤后视网膜 Flt-1 的表达及分布

A. 正常大鼠视网膜 Flt-1 蛋白呈低度表达,在视网膜内外核层,节细胞层均有少量表达;B. 视神经损伤后 6h,视网膜组织的 Flt-1 表达即开始升高,红色荧光显示,节细胞层,内外核层,内丛状层明显;C. 视神经损伤后 3 天后 Flt-1 进一步升高,达到峰值;D. 视神经损伤 7 天后 Flt-1 开始下降;E. 视神经损伤 21 天后 Flt-1 表达进一步下降至正常水平以下

2. 视神经损伤后视网膜 Flt-1 蛋白的表达变化:对荧光染色的灰度值行统计分析结果显示,视神经损伤后个时间点的 Flt-1 灰度值与正常眼比较差异均有统计学意义(表 1)。且视神经损伤后 Flt-1 表达有明显高峰曲线,在 3 天后视网膜组织的 Flt-1 表达达到峰值,随后下降(图 2)。

表 1 视神经夹持伤后不同时间大鼠 Flt-1 蛋白表达的灰度值变化($\bar{x} \pm s$)

组别	眼别	眼数 (n)	Flt-1 蛋白表 达的灰度值	t	P
术后 6h	右	3	45.66 $\pm$ 8.54	5.089	0.000
	左	3	30.88 $\pm$ 7.32		
术后 3 天	右	3	79.65 $\pm$ 10.11	13.923	0.000
	左	3	32.12 $\pm$ 8.90		
术后 7 天	右	3	62.48 $\pm$ 9.98	10.246	0.000
	左	3	31.23 $\pm$ 6.32		
术后 21 天	右	3	27.65 $\pm$ 6.23	-2.103	0.045
	左	3	33.26 $\pm$ 8.24		

讨 论

血管内皮细胞生长因子受体-1(vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR1 或 Fms-related tyrosine kinase 1, Flt-1)是 VEGF 受体家族成员之一。VEGFR 成员共有 3 种,另外两种为 VEGFR2

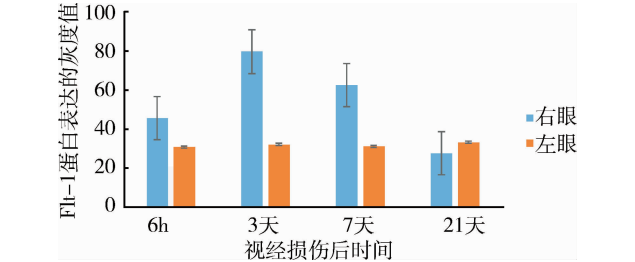


图 2 大鼠视神经夹持伤后 Flt-1 蛋白表达量的柱图显示

和 VEGFR3。VEGF 家族成员包括 VEGF-A、-B、-C、-D 和胎盘生长因子(placenta growth factor, PLGF)。他们主要通过上述 3 种受体(VEGFR-1, -2, -3)发挥作用。Flt-1 可以与 VEGF-A、VEGF-B 和 PLGF 结合;VEGFR2 可以与 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D 结合;VEGFR3 可以与 VEGF-C、VEGF-D 结合^[3]。在 VEGF 成员中,VEGF-A 的研究最多,它被认为是一种与血管生成密切相关的因子。VEGF-B 有两种异构型形式:VEGF-B186 和 VEGF-B167、VEGF-B 与 VEGF-A 有 47% 的同源性,且有共享的受体^[3]。因此,长期以来 VEGF-B 的生物学功能研究主要集中在对血管的影响方面,但大量相互矛盾的研究结果一度使 VEGF-B 的研究备受冷落^[4]。由于 Flt1 不仅与 VEGF-B 结合发挥

作用,同时又可以与 VEGF - A 和 PLGF 结合。另外, Flt - 1 又分为两种异构型式:膜性 mFlt - 1 和可溶性 sFlt - 1,二者有着不同的功能取向。这些因素使 Flt - 1 的功能学研究显得更为复杂和困难。而近年来 VEGF - B 在神经保护方面的作用逐渐受到关注,而 Flt - 1 作为目前发现的 VEGF - B 唯一的受体,它在神经保护方面的研究也越来越受到重视。

Li 等^[3]对 VEGF - B/Flt - 1 的视神经保护功能进行了多种模型的较为深入的研究。该研究小组在离体培养并用 H₂O₂ 诱导的视网膜神经节细胞(RGC)培养液中加入 VEGF - B167 后发现可以减少 50% 的 RGC 凋亡数量;在视神经夹持模型的研究中,该研究小组发现,在视神经夹持伤后 6h VEGF - B 和 Flt - 1 表达开始增强,前者主要在 RGC 和内核细胞层增强,后者在内丛状层,部分在内核层和锥杆细胞层表达增强,1 周后达到高峰。在给与玻璃体注射 VEGF - B167 及其抑制剂后 RGC 存活率分别升高了 1.7 倍和降低了 33%。玻璃体注射 Flt - 1 抑制剂后 RGC 的存活率也降低了 42%。Li 等^[4]的研究小组对 VEGF - B 的抗 RGC 凋亡机制进行了进一步的研究,发现 VEGF - B 是通过与 Flt - 1 结合后通过抑制 BH3 凋亡相关蛋白的表达来降低 RGC 凋亡发生的。

本研究结果显示,正常大鼠视网膜 Flt - 1 蛋白呈低度表达,在视网膜内外核层,节细胞层均有少量表达。在视神经损伤后 Flt - 1 表达有明显高峰曲线,在 3 天后视网膜组织的 Flt - 1 表达达到峰值,随后下降。与 Li 等^[3]的研究结果类似,但 Flt - 1 峰值出现时间较早,可能与视神经夹持力度以及动物个体化差异有关。

Kaur 等^[5]在缺氧诱导的新生鼠中可以发现了视网膜 Flt - 1 和 caspase - 3 的 mRNA 及蛋白表达的增强是导致视网膜神经节细胞的死亡的原因。该研究小组并发现褪黑素抑制上述途径来保护缺氧诱导的视网膜神经节细胞的死亡。Avraham - Lubin 等^[6]在前部缺血性视神经病变动物模型的研究中发现 VEGF 可以通过 Flt - 1 实现诱导神经干细胞分化,最终有助于稳定缺血性损伤中的视网膜结构。在感觉神经元和运动神经元方面,关于 Flt1 的神经保护方面的研究也有报道。Dhondt 等^[7]在体外试验中发现缺失了 VEGF - B 和 Flt - 1 的背根神经元细胞更容易出现退行性改变。Yu 等^[8]在离体和再体实验中均得到了证实,VEGF - B 可以通过与 Flt - 1 结合促进角膜神经再生。Poesen 等^[9]也发现敲除了 Flt - 1 基

因的 SOD1 鼠其本身的运动神经元疾病更为恶化。

本研究旨在通过对不同时间点视神经夹持伤模型中视网膜 Flt - 1 分布特征和表达变化进行了研究,为阐明 Flt - 1 在视神经损伤后如何参与视神经及视网膜功能修复提供实验依据。结果显示,正常大鼠视网膜中 Flt - 1 蛋白呈低度表达,在视网膜内外核层,节细胞层均有少量表达。在视神经损伤后 6h,视网膜组织的 Flt - 1 的表达即开始升高,3 天后进一步表达升高,达到峰值,7 天后开始下降。结果表明大鼠视神经损伤后的修复过程中伴随 Flt - 1 表达含量的变化,Flt - 1 可能参与了视神经视网膜的损伤修复。但由于 Flt - 1 分为膜性 Flt - 1 (mFlt - 1) 和可溶性 Flt - 1 (sFlt - 1),在血管方面,二者有着相反的作用,前者促进血管形成,后者抑制血管形成。在神经保护功能方面可能也存在同样的情况,是何种形式的 Flt - 1 在发挥主要作用尚不能确认。笔者后续的研究主要通过给予 Flt - 1 抑制剂及进一步从基因和蛋白定量方面阐明 mFlt - 1 和 sFlt - 1 各自对视神经保护的贡献。

参考文献

- 1 Dhondt J, Peeraer E, Verheyen A, *et al.* FLT1 receptor and its selective ligand VEGF - B protect against retrograde degeneration of sensory neurons[J]. *ASEB J*, 2011, 25(5):1461 - 1473
- 2 Li Y, Zhang F, Nagai N, *et al.* VEGF - B inhibits apoptosis via VEGFR - 1 - mediated suppression of the expression of BH3 - only protein genes in mice and rats[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(3):913 - 923
- 3 Li X, Kumar A, Zhang F, *et al.* Complicated life, complicated VEGF - B[J]. *Trends Mol Med*, 2012, 18(2):119 - 127
- 4 Li X, Lee C, Tang Z, *et al.* VEGF - B: a survival, or an angiogenic factor? [J]. *Cell Adh Migr*, 2009, 3(4):322 - 327
- 5 Kaur C, Sivakumar V, Robinson R, *et al.* Neuroprotective effect of melatonin against hypoxia - induced retinal ganglion cell death in neonatal rats[J]. *J Pineal Res*, 2013, 54(2):190 - 206
- 6 Avraham - Lubin BC, Goldenberg - Cohen N, Sadikov T, *et al.* VEGF induces neuroglial differentiation in bone marrow - derived stem cells and promotes microglia conversion following mobilization with GM - CSF[J]. *Stem Cell Rev*, 2012, 8(4):1199 - 1210
- 7 Dhondt J, Peeraer E, Verheyen A, *et al.* Neuronal FLT1 receptor and its selective ligand VEGF - B protect against retrograde degeneration of sensory neur[J]. *FASEB J*, 2011, 25(5):1461 - 1473
- 8 Yu CQ, Zhang M, Matis KI, *et al.* Vascular endothelial growth factor mediates corneal nerve repair[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(9):3870 - 3878
- 9 Poesen K, Lambrechts D, Van Damme P, *et al.* Novel role for vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor - 1 and its ligand VEGF - B in motor neuron degeneration[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(42):10451 - 10459

(收稿日期:2014 - 06 - 23)

(修回日期:2014 - 09 - 23)