

神经科学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000063

慢性脑缺血模型小鼠视网膜内血管内皮生长因子和胶质纤维酸性蛋白的表达变化

周泽芬, 王凌希, 刘 刚, 龙志敏, 骆世芳, 贺桂琼, 汪克建

(重庆医科大学神经科学研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)在慢性脑缺血模型小鼠视网膜内的表达规律及两者的关系。**方法:**采用 C57 小鼠建立慢性脑缺血模型, 结合免疫组化方法, 观察缺血不同时间段小鼠视网膜中 VEGF、GFAP 在时间和空间上的表达变化。**结果:**在假手术组中 VEGF、GFAP 呈弱表达或不表达; 在手术组中, 缺血 120 d 时 VEGF、GFAP 表达增加($P=0.002$, $P=0.006$), 随缺血时间的延长, 缺血 180 d 时 VEGF、GFAP 表达强度及空间分布范围呈进行性增加($P=0.050$, $P=0.000$)。**结论:**VEGF、GFAP 在慢性脑缺血模型小鼠视网膜中表达进行性上调, 提示两者参与了视网膜缺血损伤的病理改变过程, 并在视网膜缺血损伤机制中起着重要作用。

【关键词】慢性缺血; 视网膜; 血管内皮生长因子; 胶质纤维酸性蛋白

【中图分类号】R322.81

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-06-23

Changes in the expression of vascular endothelial growth factor and glial fibrillary acidic protein in the retina of mice with chronic brain ischemia

Zhou Zefen, Wang Lingxi, Liu Gang, Long Zhimin, Luo Shifang, He Guiqiong, Wang Kejian

(Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To examine the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) and glial fibrillary acidic protein(GFAP) in the retina of mice with chronic brain ischemia as well as to analyze the relationship between VEGF and GFAP under retinal ischemic injury. **Methods:** C57 mice were used to establish chronic brain ischemia model. Immunohistochemical staining was performed to observe the distribution and expression of VEGF and GFAP in the mice retina at different ischemic time periods. **Results:** VEGF and GFAP were unexpressed or weakly expressed in sham operated group. In the operated group, expression of VEGF and GFAP was increased at 120 d after ischemia and was significantly increased in intensity and scope at 180 d after ischemia. **Conclusions:** Expression of VEGF and GFAP are increased in the retina of mice with chronic brain ischemia, which indicates VEGF and GFAP may be involved in the pathogenesis of retinal ischemic injury process.

【Key words】chronic ischemia; retina; vascular endothelial growth factor; glial fibrillary acidic protein

视网膜中央动脉是视网膜的主要供血动脉, 是眼动脉的重要分支, 而眼动脉和大脑的主要供血动脉—大脑中动脉, 均为颈内动脉的重要分支。颈内动脉狭窄或闭塞不仅可引起大脑的缺血, 还可导致眼缺血。既往的研究表明, 结扎小鼠双侧颈总动脉可为慢性脑缺血提供一个动物模型, 这种模型在大幅度降低脑血流量的同时也降低了眼的供血, 因此也是一个很好的眼缺血模型。

视网膜和大脑一样, 在胚胎发育上都来源于神经管, 因此视网膜可以作为神经系统的延伸^[1], 大脑有血—脑屏障, 视网膜有血—视网膜屏障, 大脑和视网膜均是相对低血流量和高氧萃取系统, 因此对缺氧都非常敏感^[2]。关于视网膜缺血的研究, 主要集中在急性缺血再灌注模型, 重视的是视网膜短时间内的病理变化^[3], 而关于慢性缺血对视网膜影响的研究尚未见报道。临床上更多的眼部缺血性病变是慢性的、不完全性的疾病进程。鉴于此, 本实验以慢性脑缺血模型小鼠为研究对象, 结合形态学方法, 检测慢性缺血后不同时间段视网膜内血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的表达变化。

作者介绍: 周泽芬, Email: 153558104@qq.com,

研究方向: 神经生物学。

通信作者: 汪克建, Email: wangkejian@cqmu.edu.cn。

基金项目: 留学人员科技活动项目计划资助项目(编号: NCET-11-1084)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000063.html>

1 材料和方法

1.1 主要试剂

二氨基联苯胺试剂盒(北京中杉金桥),GFAP 单克隆抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国);VEGF 单克隆抗体(Abcam 公司,美国);樱花冷冻切片包埋剂(日本樱花公司);其他均为国产分析纯。

1.2 动物模型的建立

3 月龄雄性 C57 小鼠(重庆医科大学动物中心)30 只,随机分为 2 组,即手术组和假手术组。手术组又根据缺血时间不同,分为缺血 120 d 组和缺血 180 d 组,每组各 10 只。模型制作:采用双侧颈总动脉狭窄法^[4]。用 3.5%的水合氯醛(0.01 ml/g)腹腔注射麻醉小鼠后,于颈部正中切开皮肤,钝性分离皮下组织,用玻璃分针分离颈动脉鞘,暴露颈总动脉,注意不要损伤迷走神经。在一侧颈总动脉外纵向放置 0.12 mm 的鱼线,再用 4-0 号丝线结扎该侧颈总动脉,在扎紧的同时轻而快的抽出鱼线。15 min 后再用相同方法结扎另一侧颈总动脉。术后逐层缝合皮肤。假手术组(10 只)只单纯暴露双侧颈总动脉,不做结扎。

1.3 免疫组化

根据不同分组,在相应的时间点处理动物。腹腔注射 4%的水合氯醛(0.01 ml/g)麻醉动物后,快速打开胸腔,50 ml 预冷的 0.9%生理盐水快速灌入左心室,右心耳流出,然后用 50 ml 4%多聚甲醛灌注预固定。灌注完毕,取出小鼠双侧眼球,放入 4%多聚甲醛后固定 24 h。去除角膜及晶状体后,将标本放入 30%的蔗糖脱水,樱花冷冻切片包埋剂包埋,恒冷切片机连续切片,片厚 10 μ m。切片经过磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)冲洗后,用 3% H_2O_2 处理 15 min,PBS 冲洗,加一抗(抗 GFAP 1:400 或抗 VEGF 1:400),4 $^{\circ}C$ 过夜,PBS 冲洗;二抗 37 $^{\circ}C$ 孵育 30 min,PBS 冲洗;二氨基联苯

胺显色;常规脱水、透明、封片,光镜下观察。每组随机选用 5 张切片,采用 MIAS 医学图像分析软件测量免疫阳性物质平均吸光度(absorbance,A)值。

1.4 统计学处理

数据采用 SPSS 17.0 统计软件处理,本实验中所有免疫组化数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料采用单因素方差分析,组间两两比较行 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 慢性缺血后小鼠视网膜内 GFAP 的分布及表达变化

免疫组化结果显示,假手术组小鼠视网膜内可见少量 GFAP 免疫阳性物位于视网膜节细胞层(图 1A);而在缺血 120 d 的小鼠视网膜中,可见 GFAP 免疫阳性物不仅分布于节细胞层,且在外丛状层血管断面周围有大量表达(图 1B)。经统计分析,其表达明显强于假手术组($P=0.006$,表 1);缺血 180 d 的小鼠视网膜中,GFAP 阳性表达在视网膜节细胞层更加明显,并可见较长的突起伸入外丛状层(图 1C),经统计分析,其表达明显强于假手术组($P=0.000$,表 1);并且 2 个缺血组之间表达呈进行性增加,差别有统计学意义($P=0.001$,表 1)。

2.2 慢性缺血后小鼠视网膜内 VEGF 的分布及表达变化

免疫组化结果显示,假手术组小鼠视网膜各层中,几乎无法观察到 VEGF 的阳性表达(图 2A);而在慢性缺血 120 d 的小鼠视网膜内,观察到外丛状层有明显的 VEGF 阳性表达,免疫阳性物主要分布于血管断面周围(图 2B),经统计分析,其表达明显强于假手术组($P=0.002$,表 1);慢性缺血 180 d 的小鼠视网膜内,VEGF 阳性表达显著增强,其分布从节细胞层到外核层均有表达,呈网络状(图 2C),经统计分析,其表

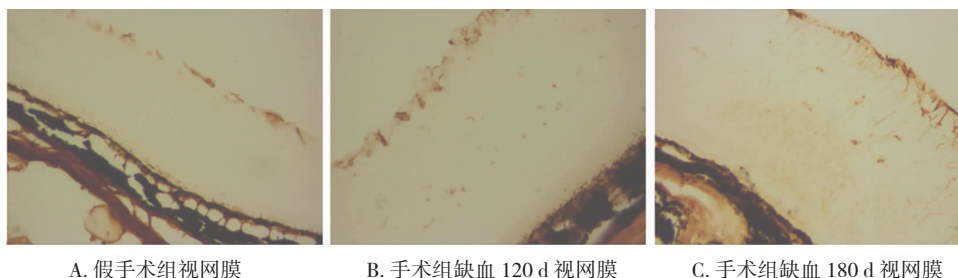


图 1 慢性脑缺血模型小鼠视网膜内 GFAP 的分布及表达 (400 $\times$)

Fig.1 Expression of GFAP in the retina of mice with chronic brain ischemia (400 $\times$)

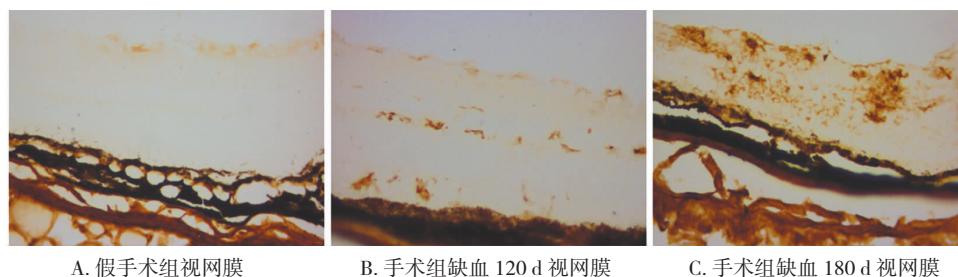


图 2 慢性脑缺血模型小鼠视网膜内 VEGF 的表达 (400 $\times$)

Fig.2 Expression of VEGF in the retina of mice with chronic brain ischemia (400 $\times$)

达明显强于假手术组 ($P=0.005$, 表 1); 并且 2 个缺血组之间表达也呈进行性增加, 差别有统计学意义 ($P=0.009$, 表 1)。

表 1 小鼠慢性脑缺血模型视网膜中 VEGF 和 GFAP 的表达变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Changes in the expression of VEGF and GFAP in the retina of mice with chronic brain ischemia ($\bar{x} \pm s$)

	VEGF	GFAP
缺血 120 d 组	0.177 ± 0.006^a	0.297 ± 0.029^a
缺血 180 d 组	$0.380 \pm 0.026^{a,b}$	$0.503 \pm 0.055^{a,b}$
假手术组	0.080 ± 0.000	0.163 ± 0.031
F 值	$F=287.7$	$F=55.0$
P 值	$P1=0.002, P2=0.005, P3=0.009$	$P1=0.006, P2=0.000, P3=0.001$

注: 缺血组与假手术组比较, a, $P<0.01$ 差异具有统计学意义; 缺血 180 d 组与缺血 120 d 组相比, b, $P<0.01$ 差异具有统计学意义; $P1$ 为缺血 120 d 组与假手术组比较, $P2$ 为缺血 180 d 组与假手术组比较, $P3$ 为缺血 180 d 组与缺血 120 d 组比较

3 讨 论

VEGF 是一种强有力的, 可扩散的, 内皮特有的有丝分裂原, 在缺氧时释放, 作用于血管内皮细胞, 可增加血管通透性, 刺激内皮细胞增殖, 形成新生血管; 另外, VEGF 还可改变细胞外基质, 使其更利于新生血管的生长^[5]。视网膜是一个相对低流速高耗氧的组织, 以往的研究发现视网膜急性缺血时, 组织内 VEGF 表达迅速上调^[6], 并且它的上调与随后血管新生的程度同步并呈比例增加。说明视网膜中 VEGF 对缺血缺氧非常敏感, VEGF 表达增加, 相应的新生血管生成也会增加。这样的结果是, 一方面新生血管的形成使视网膜内血流量增加, 对缺血有所缓解; 另一方面新生血管容易出血、渗漏, 随后使组织改变和纤维化, 最后会干扰眼内组织的正常结构和功能^[7]。

本实验发现, 假手术组视网膜内 VEGF 表达极弱, 几乎无法观察到。而当慢性缺血 120 d 时, 视网膜的外丛状层出现了 VEGF 的强表达, 此时可清楚的观察到视网膜血管(点状或条状)。当缺血达 180 d 时, VEGF 几乎强表达于视网膜的全层, 其表达显著强于缺血 120 d 时, 阳性表达物排列杂乱, 此时分不清血管结构。该现象可能系以下原因: 当视网膜缺血时, 视网膜内 VEGF 的表达显著上调, 促进新生血管生成, 而新生血管一般呈丛状、扭曲生长; 另有学者发现, 在应对缺氧时, 视网膜的其它细胞内 VEGF 表达也增加, 包括苗勒细胞、周细胞和色素上

皮细胞^[8]。本研究结果提示, 随着缺血时段的延长, 小鼠视网膜内的 VEGF 不仅分布更广且其表达呈进行性增高的趋势。

本实验还观察到各组小鼠视网膜内 GFAP 阳性表达不一致。GFAP 是星形胶质细胞的标志蛋白, 是一种骨架蛋白, 星形胶质细胞的激活会引起 GFAP 的表达上调, 进而使细胞骨架发生重塑。以往有研究发现, 胶质细胞的激活会损害正常细胞, 如视网膜的节细胞, 在胶质细胞激活后会发生凋亡^[9]。但其他的研究发现, 视网膜中星形胶质细胞的激活对视网膜节细胞既有损害作用, 又有保护作用^[10]。在视网膜中, 星形胶质细胞占视网膜总胶质细胞的 10%, 其余 90% 的胶质细胞是苗勒细胞, 它们共同组成视网膜内复杂的神经胶质网络。苗勒细胞是一种特殊类型的星形胶质细胞, 正常情况下, 不表达 GFAP, 只有在视网膜发生损伤时, 才会出现 GFAP 的表达^[11]。本实验发现, 假手术组小鼠视网膜内 GFAP 阳性物仅少量表达于节细胞层, 而当缺血 120 d 时, 节细胞层 GFAP 的表达明显上调, 并且在外丛状层血管周围也出现了 GFAP 的阳性表达。有研究发现视网膜胶质细胞中对缺氧反应最早的是星形胶质细胞, 其次是苗勒细胞^[12]。视网膜中苗勒细胞还可以在血管表面发出细小分支, 包绕在毛细血管壁周围, 参与构成血-视网膜屏障。缺血 120 d 时, 血管周围 GFAP 的阳性表达, 该现象提示苗勒细胞被激活, 可能参与了缺血视网膜新生血管的生成, 并且可能与星形胶质细胞共同参与了视网膜缺血的病理变化过程。缺血 180 d 时, GFAP 表达更强, 节细胞层部分阳性表达呈堆叠状且大量 GFAP 阳性细胞从节细胞层伸出突起, 向视网膜外层延伸, 到达外丛状层。推测此时视网膜内胶质细胞已大量增生, 并且细胞结构也发生了显著改变。既往研究表明, 胶质细胞的轻度增生对神经元有保护作用, 但过度增生会阻碍神经元突起的再生, 影响神经元结构和功能的恢复, 但这两者之间的确切界点并不清楚。本实验中 GFAP 在不同缺血时间点表达的差异, 对视网膜神经元究竟起保护作用还是损害作用还不清楚, 需要进一步的研究。以往研究发现在多种视网膜的退行性疾病中, GFAP 表达也增加, 例如青光眼^[13]。Son 等^[14]还发现青光眼模型小鼠视网膜内随星形胶质细胞的活化和数量增加, 轴突会丧失。本实验中 GFAP 的表达增加, 说明缺血后视网膜内可能发生了细胞骨架的重塑。而这种细胞骨架的重塑可能与

细胞缺氧后细胞外环境的改变有关,细胞外环境的改变能激活某些基因参与细胞代谢,也能促进生长因子产物的释放以促进功能恢复^[15]。

在视网膜组织中,神经元、血管和胶质细胞是视网膜 3 个重要的结构元件和功能单位。胶质细胞分布于血管与神经元之间,形成胶质膜覆盖,并参与血-视网膜屏障及神经纤维髓鞘的形成。胶质细胞骨架的改变间接表现了血管和神经细胞的改变。胶质细胞一直以来被更多关注的是在损伤时促进神经元功能恢复方面的作用。然而胶质细胞在视网膜血管的生长中也起重要作用,它能分泌血管营养因子,例如 VEGF,刺激视网膜血管的形成。Sinha 等^[16]研究发现视网膜内星形胶质细胞与视网膜血管有非常密切的关系,在视网膜受损时,星形胶质细胞对视网膜血管的重构有很神奇的作用。星形胶质细胞在和血管相联系的同时又和神经细胞体、轴突及突触联系,这样使神经元能够从血管中摄取葡萄糖,供给能量代谢^[17]。另外胶质细胞还能维持细胞内外离子、液体、神经递质平衡,并通过控制神经递质的释放,最终影响突触功能^[18]。

总之,视网膜中神经细胞、胶质细胞、血管内皮细胞在视网膜生理及病理状态下扮演着不同的角色,他们相互联系,相互影响。在视网膜慢性缺血中,GFAP、VEGF 究竟发挥着怎样的相互作用及其作用的机制,本课题组将对此进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] Pamell M, Guo L, Abdi M, et al. Ocular manifestations of Alzheimer's disease in animal models[J]. *Int J Alzheimers Dis*, 2012, 2012: 786494.
- [2] Ikram MK, Cheung CY, Wong TY, et al. Retinal pathology as bio-marker for cognitive impairment and Alzheimer's disease[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2012, 83(9): 917-922.
- [3] Sun MH, Pang JH, Chen SL, et al. Retinal protection from acute glaucoma induced ischemia-reperfusion injury through pharmacologic induction of heme oxygenase-1[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(9): 4798-4808.
- [4] Shibata M, Ohtani R, Ihara M, et al. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Stroke*, 2004, 35(11): 2598-2603.
- [5] Hennann DM, Zechariah A. Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(10): 1620-1643.
- [6] 梁 丽, 张文芳, 鲁建华, 等. AQP4 和 VEGF 在大鼠视网膜缺血/再灌注损伤中表达的规律及相关性分析[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2010, 36(3): 5-8.
- [7] 穴黎萍, 丁 鹏, 吴开力. Nestin 和 GFAP 在缺氧大鼠视网膜神经胶质细胞中的表达及高氧治疗的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(6): 1214-1243.
- [8] Miller JW, Le Couter J, Strauss EC, et al. Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease[J]. *Ophthalmology*, 2013, 120(1): 106-114.
- [9] Cho KJ, Kim JH, Park HY, et al. Glial cell response and iNOS expression in the optic nerve head and retina of the rat following acute high IOP ischemia-reperfusion[J]. *Brain Res*, 2011, 1403: 67-77.
- [10] Johnson EC, Morrison JC. Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma[J]. *J Glaucoma*, 2009, 18(5): 341-353.
- [11] 张亚洁, 许红霞, 曾凯宏, 等. 牛磺酸对高糖培养下视网膜 Müller 细胞 GFAP 和 TAUT 表达的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2007, 7(5): 649-652.
- [12] 胡六梅, 李维业, 罗 岩. 视网膜星形胶质细胞发育、增殖与分化对视网膜血管疾病的影响[J]. *国际眼科纵览*, 2008, 32(3): 149-153.
- [13] Gallego BI, Salazar JJ, de Hoz R, et al. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 92.
- [14] Son JL, Soto I, Oglesby E, et al. Glaucomatous optic nerve injury involves early astrocyte reactivity and late oligodendrocyte loss[J]. *Glia*, 2010, 58(7): 780-789.
- [15] Luna G, Lewis GP, Banna CD, et al. Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Müller cells following retinal injury: a comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin[J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 2511-2523.
- [16] Sinha D, Valapala M, Bhutto I, et al. β A3/A1-crystallin is required for proper astrocyte template formation and vascular remodeling in the retina[J]. *Transgenic Res*, 2012, 21(5): 1033-1042.
- [17] 曹金娟, 张昆南. 反应性星形胶质细胞增生在脑缺血中的作用[J]. *中华脑血管病杂志(电子版)*, 2012, 6(3): 41-43.
- [18] Pannasch U, Rouach N. Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior[J]. *Trends in Neurosci*, 2013, 36(7): 405-417.

(责任编辑:唐秋姗)