

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000422

Akt 抑制剂对氧诱导视网膜新生血管形成的作用

汪 澎¹, 谭 浅²

(1. 重庆医科大学附属第一医院眼科, 重庆 400016; 2. 中南大学湘雅医院眼科, 长沙 410008)

【摘要】目的:观察 Akt 抑制剂对低氧环境下视网膜新生血管形成的抑制作用, 探讨 Akt 活性的抑制对于新生血管抑制的作用。**方法:**将鼠龄为 7 d 的 C56BL/6J 小鼠 14 只置于浓度为 $(75 \pm 2)\%$ 高氧舱环境中生活 5 d, 然后返回正常氧环境中。14 只小鼠于出氧舱后当日被随机平均分为实验组和对照组各 7 只, 实验组小鼠玻璃体腔内注射 $1.5 \mu\text{l}$ Akt 抑制剂, 对照组小鼠玻璃体腔内注射 $1.5 \mu\text{l}$ PBS。在 P17, 实验组和对照组小鼠 FITC-Dextran 左心室造影视网膜铺片了解视网膜的血管形态的改变以及小鼠组织学切片观察突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数量。**结果:**视网膜铺片结果显示实验组与对照组相比较, 视网膜可见新生血管芽, 但是新生血管丛数量及面积明显减少, 荧光渗漏明显减轻, 但无灌注区无明显的减小; 组织学切片结果表明与对照组相比较, Akt 抑制剂注射实验组突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数量明显减少, 实验组突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数量为 (14 ± 3.0) 个, 对照组为 (55 ± 3.0) 个, 差异具有统计学意义 ($P=0.001$)。**结论:**在缺氧环境下运用 Akt 抑制剂能够抑制视网膜新生血管的发生, 但 Akt 抑制剂不减少无灌注区的面积。

【关键词】Akt 抑制剂; 视网膜新生血管; 缺氧环境

【中图分类号】R774.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-06-02

Application of Akt inhibitor in the oxygen-induced retinopathy

Wang Peng¹, Tan Qian²

(1. Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital, Central South University)

【Abstract】Objective: To examine whether Akt inhibitor treatment during the phase of oxygen-induced retinopathy helps to prevent retinal neovascularization. **Methods:** Seven-day-old C56BL/6J mice were exposed to $(75 \pm 2)\%$ oxygen for 5 d, then returned to the room air to induce retinal neovascularization. Fourteen mice were equally randomized into control group and experiment group. On P12, $1.5 \mu\text{l}$ Akt inhibitor was injected into vitreous cavity of mice in experiment group and PBS was injected into mice in control group. Retinal neovascularization was analyzed with FITC-Dextran and histological analysis on P17. **Results:** Mice treated with Akt inhibitor had a reduced pathologic neovascular tufts and fluorescence leakage compared with those of PBS controls. For the area of capillary-free, no difference was seen between experiment group and control group. The histological analysis showed that neovascular nuclei protruding into vitreous cavity were decreased in experiment group compared with those in control group. **Conclusion:** Akt inhibitor treatment protects the retina from vessel pathological proliferation, but cannot protect the retina from vessel loss.

【Key words】akt inhibitor; retinal neovascularization; relative hypoxic condition

视网膜新生血管性疾病, 如早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP)、增殖型糖尿病视网膜病变、继发性新生血管性青光眼、缺血型的视网膜静脉阻塞等, 在全世界范围内, 这些都是最主要的导致眼盲的疾患, 已经引起了人们非常广泛

注意。

Akt 是一种分子量约为 57 kD 的蛋白质, 它属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族。越来越多的证据表明 Akt 与新生血管的形成之间存在着紧密的联系。内皮一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase eNOS) 是一种已知的 Akt 的下游靶物质, 最近的研究表明 Akt 能够磷酸化 eNOS, 导致其持续的激活^[1], 从而促进新生血管的形成^[2-4]。而且, 新的研究显示 Akt 能够调节体内或体外缺氧诱导的血管内皮生长

作者介绍: 汪 澎, Email: luckywp2000@aliyun.com,

研究方向: 视网膜新生血管。

通信作者: 谭 浅, Email: tanqianxy99@163.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150415.2229.005.html>

(2014-10-30)

因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达^[5-6],并且 VEGF 所诱导的血管内皮细胞的移行需要 Akt 的激活^[7]。Akt 参与了抗细胞凋亡信号通路,从而能够促进血管内皮细胞的的生长^[8]。在体外实验中,有研究显示 PI3/AKT 的抑制剂 LY294002 能够明显的抑制恒河猴脉络膜视网膜内皮细胞的存活及迁移^[9]。总之,Akt 作为一个“总开关”,控制着重要的细胞功能,包括增殖、凋亡、代谢和转导,它已经被越来越重视做为病理性血管形成治疗的有效方法^[10]。Akt 抑制剂 124005 是一种新型 Akt 抑制剂,化学名 1L-6-hydroxymethyl-chiro-inositol-2-(R)-2-O-methyl-3-Octadecylcarbonate,化学式为 $C_{30}H_{58}O_{10}$,分子量为 578.8 U,其选择性抑制 Akt 的 IC_{50} 为 $5 \mu\text{mol/L}$,明显小于抑制 PI3K 的 IC_{50} 值 $90 \mu\text{mol/L}$ ^[11]。基于以上,在本研究中,首先建立氧诱导视网膜病变(oxygen induced retinopathy, OIR)模型鼠,通过玻璃体腔注射的给药方式,观察 Akt 抑制剂对视网膜新生血管的抑制作用,从而更深一步的阐明 Akt 在视网膜新生血管形成中的调节作用,为治疗视网膜新生血管性疾病提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验动物及试剂

FITC-Dextran(异硫氰酸荧光素——右旋糖酐,分子量 2×10^6 Da,美国 Sigma 公司),C57BL/6J 小鼠(清洁级,中国科学院上海实验动物中心),Akt 抑制剂(德国 Merck 公司),多聚甲醛(湖北大学化工厂),无水乙醇(湖北大学化工厂)。

1.2 实验动物分组

14 只小鼠被随机平均分为实验组和对照组各 7 只,其中实验组中随机挑选 4 只小鼠行 FITC-Dextran 荧光造影视网膜铺片,余下的 3 只小鼠行视网膜组织学切片;对照组中

随机挑选 4 只小鼠行 FITC-Dextran 荧光造影视网膜铺片,余下的 3 只小鼠行视网膜组织学切片。

1.3 小鼠视网膜新生血管动物模型的建立和玻璃体腔内注射 Akt 抑制剂及 PBS

选取鼠龄为出生 7 d(P7)的 C57BL/6J 小鼠建立氧诱导的视网膜新生血管模型;将鼠龄为 7 d 的 C57BL/6J 小鼠连同母鼠及测氧仪一起放入密闭的氧舱中,保持氧舱中的压力为常压(每天 3 次),控制氧浓度为 $(75 \pm 2)\%$,温度 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,每隔 2 d 替换母鼠。室内采用日光灯照明,光照周期为:光照 12 h,无光照 12 h。5 d (P12)后将小鼠放回空气中继续饲养。在小鼠出氧舱后的当天,即出生后的 12 d,运用腹腔注射 1%戊巴比妥钠麻醉后,用 11 号手术刀片划开眼睑,并使眼球向外突出。在显微镜下自角膜缘后 0.5 mm 处刺入微量进样器。在实验组 7 只小鼠将 $1.5 \mu\text{l}$ Akt 抑制剂注入玻璃体腔内;而在对照组 7 只小鼠将 $1.5 \mu\text{l}$ PBS 注入玻璃体腔内。然后把眼球复位,眼睑盖住角膜。经过高氧处理后,在 17 d (P17)将眼球取出做 FITC-Dextran 荧光造影视网膜铺片以评估视网膜新生血管及无灌注区。

1.4 FITC-Dextran 荧光造影视网膜铺片

从实验组及对照组各取出生后第 8 天(P8)小鼠 4 只,采用 1%戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔内充分麻醉小鼠,之后打开小鼠(包括实验组和对照组)的胸腔,充分暴露其心脏,用 1 ml 注射器抽取配置好 ($50 \text{ mg}:1 \text{ ml}$ 蒸馏水) 1 ml FITC-Dextran 从左心尖底部缓慢进针,行左心室充分灌注,在灌注的后期,用镊子轻轻的挤压心脏,以帮助心脏充分灌注,使视网膜血管造影充分。然后使眼球脱臼并摘除眼球,并放入 4%多聚甲醛中固定 10 min。随后在活体显微镜下沿角膜缘剪开眼球,去除掉角膜、晶状体以及玻璃体,用玻璃棒小心的分离出视网膜,以视盘为中心呈放射状剪开,将载玻片放入 4%的多聚甲醛中,连同视网膜一起托出,最后用自制的毛刷轻轻的将视网膜铺平。滴 1 滴 2%中性树胶于视网膜铺片上,盖上盖玻片,置于荧光显微镜下观察,取激发光波长 490 nm,滤过波长 520 nm,并比较视网膜新生血管从面积及视网膜无灌注区的大小。采用像素分析法检测无灌注区面积,新生血管丛及渗漏面积和全视网膜面积^[25-26]。

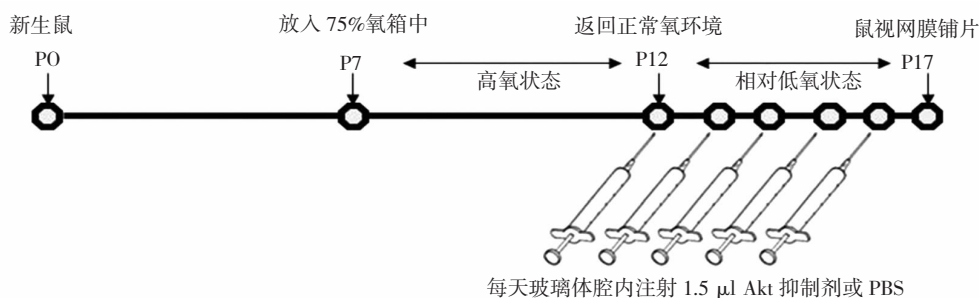


图 1 实验方法简化黑白图

Fig.1 Simplified diagram of experimental method

1.5 突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核计数

从实验组及对照组中各取出生后第 17 天(P17)小鼠 3 只,摘除眼球,4%多聚甲醛中固定 1 d。将眼球按角膜中心朝上的方向放置于石蜡中进行包埋,切片方向与角膜和视神经连线的轴相平行,对每只眼球进行连续切片,切片的厚度为 5 μm 。从模型组切片中随机选取切片行 CD34 免疫组化染色,标记视网膜新生血管。染色方法按 SP 免疫组化试剂盒内说明书进行,以肝癌组织切片作阳性对照,双蒸水代替一抗作阴性对照,每只眼球随机取出 10 张切片,除外含视神经的切片,每组各 60 张切片,行苏木素-伊红(H&E)染色。光学显微镜下计数每张切片上突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数,每组各计数 60 张切片并取其平均值。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计学分析,所有数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间均数比较采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 荧光造影视网膜铺片观察视网膜血管的形态及无灌注区

对照组(图 2A):视乳头周围毛细血管闭塞,可见大片明显的无灌注区(五角星区域),视网膜大血管不规则扩张,走行迂曲。中周部正常毛细血管网消失,血管密度增高且分布紊乱,可见明显新生血管丛和荧光渗漏(箭头所指)。

实验组(图 2B):与对照组相比较,视网膜可见新生血管芽,但是新生血管丛数量及面积明显减少(箭头所指),荧光渗漏明显减轻,但无灌注区无明显的减小(五角星区域)。

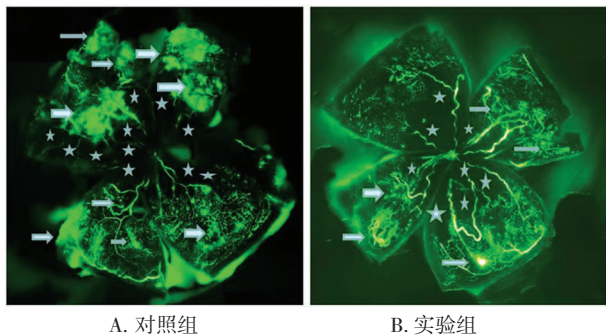
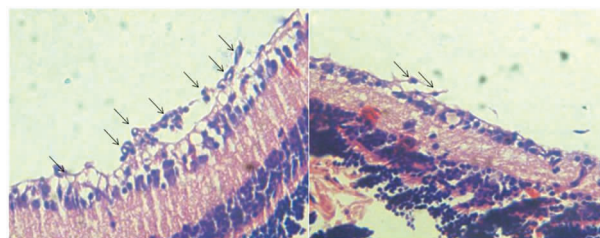


图 2 荧光造影视网膜铺片后显示新生血管丛、荧光渗漏及无灌注区的图(放大倍数:5 $\times$)

Fig.2 Retinal neovascularization and capillary-free area analyzed by FITC-dextran (5 $\times$)

2.2 突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核的计数

对照组(图 3A)中有大量突破视网膜内界膜的内皮细胞核,其平均每张切片的血管内皮细胞核数为(55.0 ± 3.0)个,而实验组(图 3B)突破视网膜内界膜的内皮细胞核数明显减少,其平均每张切片的血管内皮细胞核数为(14.0 ± 3.0)个。两者间差异具有统计学意义($t=28.976, P=0.001$)(图 3,表 1)。



A. 对照组 B. 实验组

图 3 组织学切片显示突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核(黑色箭头所示)的结果(放大倍数:10 $\times$)

Fig.3 Histological results of the neovascular nuclei protruding into vitreous cavity (arrow) (10 $\times$)

表 1 对照组和实验组突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核数的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of number of neovascular nuclei protruding into vitreous cavity ($\bar{x} \pm s$)

组别	突破视网膜内界膜新生血管内皮细胞核数
对照组 (n=3)	55.0 ± 3.0 个 ^a
实验组 (n=3)	14.0 ± 3.0 个 ^a

注:a,差异具有明显统计学意义, $P=0.001$

3 讨 论

本研究发现:玻璃体腔内注射少量的 Akt 抑制剂(1.5 μl)即能有效的抑制视网膜新生血管的发生,但是不能减少无灌注区的面积。许多研究表明 Akt 与新生血管的形成之间存在紧密的联系。内皮一氧化氮合酶(eNOS)是一种已知的 Akt 的下游靶物质,最近的研究表明 Akt 能够磷酸化 eNOS,导致其持续的钙离子依赖性的酶激活^[1],从而促进新生血管的形成^[2-4]。且 Akt 的刺激能够增强内皮 NO 的合成,达到长期调节血管内皮的生长。又有体外实验证明内皮细胞的移行需要一氧化氮(nitric oxide, NO)^[12-13]。而且,新的研究显示 Akt 能够调节体内或体外缺氧诱导的 VEGF 的表达^[5-6],并且 VEGF 所诱导的血管内皮细胞的移行需要 Akt 的激活^[7]。VEGF 的主要功能是促进内皮细胞的生长,增强内皮细胞的增殖和移行,它发挥这样的功能主要是通过结合酪氨酸激酶受体和传递信号给各种下游蛋白质,当 VEGF 结合 Flk-1/KDR 受体就会引发 Akt 的磷酸化。从以上可以看出, Akt 激酶的激活整合了许多参与新生血管形成的信号途径,从而促进内皮细胞的增殖、移行及渗入,促进了新生血管的发生。

目前治疗视网膜新生血管主要是采用全视网

膜光凝,虽然有效,但不是最理想的。除了可能的复发和疾病的进展需要再次光凝外,还包括周围视野和暗视觉的丧失这样的副作用存在。越来越多的实验都在设计新的替代疗法以减轻这样的副作用。这样的设计方法包括靶向生长因子,细胞表面受体和解蛋白酶^[14-16]。在的实验中,给予玻璃体腔内注射 Akt 抑制剂后,能够有效的减少模型鼠中视网膜新生血管发生的程度。可以推测出在缺血缺氧的视网膜促进了视网膜组织 VEGF 等促血管形成因子的释放,从而激活及磷酸化 Akt,并激活下游蛋白质,导致视网膜内皮细胞的生存、增殖、移行和侵入,从而形成新生血管。给予了 Akt 抑制后,阻断了 Akt 这个信号通路,即使 VEGF 等促血管生成因子继续存在,也不会产生下游的功能,从而达到抑制新生血管形成的作用。

除了内皮细胞的功能,许多研究也考虑到了 Akt 调节下内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs)的生物活性。Grant 等^[17]研究显示成人的造血干细胞能够克隆的分化为造血细胞系包括内皮细胞从而是视网膜内皮细胞再生。他们还研究了在视网膜新生血管形成的过程中内皮前体细胞能够募集到受缺血缺氧损伤的部位来。他丁类药物需要激活 Akt 途径才能增强其促进内皮祖细胞分化和促进新生血管形成的功能。这些都表明了 Akt 在调节造血干细胞分化方面的重要作用^[18-22]。Akt 不仅能够调节内皮祖细胞的分化,而且能够调节其动力学^[23]和内皮祖细胞对缺血肌肉部位募集作用^[24]。

在本实验中,通过玻璃体腔内给药方式,注射后常规给予小鼠妥布霉素眼膏涂眼,未发现眼内炎症的发生;注射是在显微镜下自角膜缘后 0.5 mm 处刺入微量进样器,故未发生晶体损伤;因注射量为 1.5 μ l,相对于小鼠玻璃体腔容积,量极小,故不会造成高眼压。在眼球冰冻切片中,如发现玻璃体腔内有出血的切片,排除出本实验结果。

总之,本研究已经显示出 Akt 抑制剂能够有效的组织视网膜新生血管的发生发展,其可以为眼部新生血管性疾病的防治提供新的途径,为进一步开发出治疗眼部新生血管的新药奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Luo Z,Fujio Y,Kureishi Y,et al.Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide-dependent vasomotor activity in vivo[J].Clin Invest,2000,106(4):493-499.

[2] Ackah E,Yu J,Zoellner S,et al.Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis[J].Clin Invest,2005,115(8):2119-2127.

[3] Papapetropoulos A,Garcia-Cardena G,Madri JA,et al.Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells[J].Clin Invest,1997,100(12):3131-3139

[4] Murohara T,Asahara T,Silver M,et al.Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia[J].Clin Invest,1998,101(11):2567-2578.

[5] Mazure NM,Chen EY,Laderoute KR,et al.Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element[J].Blood,1997,90(9):3322-3331.

[6] Arsham AM,Plas DR,Thompson CB,et al.Akt and hypoxia-inducible factor-1 independently enhance tumor growth and angiogenesis[J].Cancer Res,2004,64(10):3500-3507.

[7] Yan TT,Li Q,Zhang XH,et al.Homocysteine impaired endothelial function through compromised vascular endothelial growth factor/Akt/endothelial nitric oxide synthase signaling[J].Clin Exp Pharmacol Physiol,2010,37(11):1071-1077.

[8] Gerber HP,McMurtrey A,Kowalski J,et al.Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway.Requirement for Flk-1/KDR activation[J].J Biol Chem,1998,273(46):30336-30343.

[9] Yu WZ,Zou H,Li XX,et al.Effects of the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor in a mouse model of retinal neovascularization[J].Ophthalmic Res,2008,40(1):19-25.

[10] Chen J,Somanath PR,Razorenova O,et al.Akt1 regulates pathological angiogenesis,vascular maturation and permeability in vivo[J].Nat Med,2005,11(11):1188-1196.

[11] Hu Y,Qiao L,Wang S,et al.3-(Hydroxymethyl)-bearing phosphatidylinositol ether lipid analogues and carbonate surrogates block PI3-K,Akt,and cancer cell growth[J].Med Chem,2000,43(16):3045-3051.

[12] Noiri E,Lee E,Testa J,et al.Podokinesis in endothelial cell migration:role of nitric oxide[J].Am J Physiol,1998,274(1):236-244.

[13] Murohara T,Witzenbichler B,Spyridopoulos I,et al.Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,1999,19(5):1156-1161.

[14] Robinson GS,Pierce EA,Rook SL,et al.Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy[J].Proc Natl Acad Sci USA,1996,93(10):4851-4856.

[15] Friedlander M,Theesfeld C,Sugita M,et al.Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases.[J].Proc Natl Acad Sci USA,1996,93(18):9764-9769.

[16] Penn JS,Rajaratnam VS,Collier RG,et al.The effects of an angiostatic steroid on neovascularization in a rat model of retinopathy of prematurity[J].Invest Ophthalmol Vis Sci,2001,42(1):283-290.

[17] Grant MB,May WS,Caballero S,et al.Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization[J].Nat Med,2002,8(6):607-612.