

## · 实验研究 ·

# 脑源性神经营养因子在氧诱导视网膜病变的表达变化

段海霞 郭凯 王班伟

519000 珠海市第二人民医院眼科(段海霞、王班伟);010059 呼和浩特,内蒙古医科大学附属医院眼科(郭凯)

通信作者:郭凯,Email:gk1108@sina.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.01.011

**【摘要】** **背景** 早产儿视网膜病变等新生血管性疾病常导致不可逆性视力丧失,其氧化损伤机制研究日益受到关注,特别是脑源性神经营养因子(BDNF)对视网膜神经节细胞(RGCs)是否具有保护作用鲜有研究报道。**目的** 探讨 BDNF 在氧诱导视网膜病变(OIR)模型小鼠视网膜中的表达变化。**方法** 将 30 只 SPF 级 C57BL/6J 幼鼠完全随机分为 OIR 组和正常对照组,每组 15 只,OIR 组将日龄为 7 d(P7)的幼鼠与哺乳母鼠同时置于体积分数为(75±3)% 氧气的环境下喂养 5 d,然后返回正常环境中饲养,以建立 OIR 模型。分别取 2 个组 P17 幼鼠各 3 只处死后分离眼球,制备视网膜切片行苏木精-伊红染色,观察突破内界膜的血管内皮细胞核数目;另各组选取 3 只幼鼠行异硫氰酸荧光素(FITC-dextran)眶后注射制备视网膜铺片,观察视网膜血管分布。分别于 2 个组取 P13、P15、P17 小鼠各 3 只处死后提取视网膜组织,Western blot 法检测 2 个组幼鼠视网膜组织中 BDNF 的相对表达量的变化。**结果** 组织病理学研究显示,正常对照组 P17 小鼠视网膜内界膜光滑,未见突破内界膜血管内皮细胞核,而 OIR 同龄小鼠可见大量突破内界膜的血管内皮细胞核和新生血管管腔。正常对照组和 OIR 组 P17 小鼠视网膜突破内界膜血管内皮细胞核数分别为(1.70±0.68)个和(45.3±3.13)个,差异有统计学意义( $t=86.5, P=0.00$ )。视网膜铺片显示,正常对照组 P17 幼鼠视网膜血管走行正常,毛细血管呈网状分布;而 OIR 组 P17 小鼠视网膜血管迂曲,毛细血管网状结构消失,可见大量视网膜无灌注区。OIR 组 P15、P17 幼鼠视网膜组织中 BDNF 相对表达量为 263.992±9.451 和 218.432±9.710,分别高于正常对照组的 230.324±7.779 和 115.846±7.305,差异均有统计学意义( $t=14.2, 42.3, P<0.05$ )。**结论** BDNF 在小鼠视网膜中的表达变化趋势与 OIR 模型鼠新生血管形成的变化趋势一致,BDNF 表达变化可能与 OIR 的病理过程有关。

**【关键词】** 脑源性神经营养因子;低氧/并发症;视网膜新生血管/病理;动物模型;近交系 C57BL 小鼠

**基金项目:** 内蒙古自治区医疗卫生科研项目(201303046);内蒙古自然科学基金项目(2014BS0804)

**Expression changes of brain-derived neurotrophic factor in retina of oxygen-induced retinopathy** Duan Haixia, Guo Kai, Wang Banwei

Department of Ophthalmology, The Second People Hospital of Zhuhai, Zhuhai 519020, China (Duan HX, Wang BW);

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010029, China (Guo K)

Corresponding author: Guo Kai, Email: gk1108@sina.com

**[Abstract]** **Background** Neovascular diseases such as retinopathy of prematurity often leads to irreversible vision loss. The study on oxidative damage mechanism is becoming more and more important. Whether brain derived neurotrophic factor (BDNF) has protection to retinal ganglion cells (RGCs) has few research reports. **Objective** The study was to investigate the expression changes of BDNF in mouse retinas of oxygen-induced retinopathy (OIR). **Methods** Thirty SPF C57BL/6J immature rats were divided into OIR group and normal control group and to fifteen rats for each group. OIR models were established by raising 7-day-old (P7) mice together with maternal mouse in (75±3)% oxygen environment for 5 days and then returned to the normal air environment, and the mice of the normal control group were raised in the normal air environment. The P17 mice were sacrificed for retinal histopathological

examination by hematoxylin and eosin staining, and the number of vascular endothelial cell nucleus extending the inner limiting membrane was counted. Whole retinal mounts were prepared after fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) (9 ml/kg) was retrosorbitally injected, and the distribution of retinal vessels was observed in P17 mice. The relative expression levels of BDNF in retinas were detected in P13, P15, P17 mice, and the results were compared between the normal control group and the OIR group. **Results** Histopathological examination showed that retinal inner limiting membrane was smooth in the normal control group, but a lots of vascular endothelial cell nucleus extending the inner limiting membrane were seen under the optical microscope in the OIR group. The number of the vascular endothelial cell nucleus extending the inner limiting membrane was  $1.70 \pm 0.68$  in the normal group and  $45.3 \pm 3.13$  in the OIR group, showing significant difference between them ( $t = 86.5, P = 0.00$ ). Whole retinal mount revealed that normal retinal vessels and network-like capillaries were exhibited in the mice in the normal group, while tortuous vessels, capillary loss and non-perfusion areas were revealed in the OIR group on the whole retina mounts. The relative expressing levels of BDNF in retinas were  $263.992 \pm 9.451$  and  $218.432 \pm 9.710$  in P15 and P17 mice in the OIR group, which were significantly higher than  $230.324 \pm 7.779$  and  $115.846 \pm 7.305$  in the normal control group ( $t = 14.2, 42.3, P < 0.05$ ). **Conclusions** OIR can be inhibited by increasing the expression of BDNF.

[Key words] Brain-derived neurotrophic factor; Hyperoxia/complications; Retinal neovascularization/pathology; Disease models, animal; Mice, inbred C57BL

**Fund program:** Medical and Health Research Project of Inner Mongolia (201303046); Natural Science Fund of Inner Mongolia (2014BS0804)

目前中国报道早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 的发病率为 20.3% ~ 40.0%, 患儿可因视网膜新生血管增生、出血及牵拉性视网膜脱离而导致不可逆性视力丧失<sup>[1]</sup>。在 ROP 发病机制的基础研究中使用的经典动物模型是氧诱导视网膜病变 (oxygen induced retinopathy, OIR) 模型。近年来的相关研究表明, ROP 的病理损害包括血管内皮细胞、星形细胞、视网膜神经元、神经胶质细胞和 Müller 细胞的损伤以及缺血性视网膜病变伴发的神经细胞的凋亡及变性<sup>[2-3]</sup>。目前新生血管性视网膜病变的氧化损伤机制研究日益受到关注, 氧化损伤机制通路研究涉及脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)、纤维母细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF<sub>2</sub>) 等神经营养因子, 一些相关的体内和体外实验同时证实 BDNF 可促进视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 的生长<sup>[4]</sup>, 但对 OIR 模型中 BDNF 对 RGCs 是否具有保护作用鲜有研究报道。本研究观察 OIR 氧化损伤通路中 BDNF 相对表达量的变化, 对视网膜疾病的防治研究提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 6 只 SPF 级 C57BL/6J 孕鼠和 30 只新生 C57BL/6J 幼鼠均购自广州南方医科大学, 饲养于广州中山大学中山眼科中心实验动物中心。实验动物的使用和管理遵循国家科学委员会颁布的《实验动物管理条例》。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 鼠抗 BDNF (1 : 500, MAB648-100 美国 RD 公司); FD2000S 型异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-dextran) (美国 Sigma 公司)。自动氧调控器 (美国 BioSperix 公司); Axioplan2 荧光显微镜 (德国 Zeiss 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 OIR 小鼠模型的建立** 将 30 只 C57BL/6J 新生小鼠 (P0) 完全随机分为 OIR 组和正常对照组, 每组 15 只。按文献[5]的方法建立 OIR 小鼠模型, 即将 7 日龄 (P7) C57BL/6J 幼鼠与母鼠同时置于体积分数为 (75±3)% 的氧气环境中饲养 5 d, 饲养箱中温度为 (23±2)℃, 每日更换母鼠, 然后将 P12 小鼠返回正常空气环境中饲养。正常对照组同龄幼鼠始终在正常空气环境中饲养。

**1.2.2 小鼠视网膜的组织病理学检查** 2 个组各任意选取 3 只 P17 幼鼠, 颈椎脱臼法处死后摘取右侧眼球, 质量分数 4% 中性多聚甲醛固定 24 h, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡浸蜡包埋, 平行视神经矢状轴连续行厚 4 μm 切片, 每眼制作 10 张切片, 烤片, 过夜, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 行常规苏木精-伊红染色, 光学显微镜下观察。每 5 张切片中任意选取 1 张切片, 每眼共取 5 张切片, 自视神经处开始计数, 每张切片计数 10 个高倍视野, 计算突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数目。

**1.2.3 小鼠视网膜荧光铺片的制备** 将 FITC-dextran 溶于 PBS 中, 质量浓度为 50 g/L, 离心半径为 5 cm, 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 过滤, 全程避光。

分别由 2 个组任意选取 P17 幼鼠各 3 只,按 1.2 ml/kg 的剂量腹腔内注射体积分数 2.5% 的水合氯醛进行麻醉。参照文献[6]的方法,暴露幼鼠右眼,将 27G 注射器呈 45° 从鼻侧刺入眼眶内 2~3 mm,至眶后静脉窦周围,按 9 ml/kg 的剂量缓慢注射 FITC-dextran,注射 10 s 后颈椎脱臼法处死小鼠,摘除右眼球后置于 4% 多聚甲醛中,室温下浸泡 30 min。于解剖显微镜下沿角巩膜缘剪除角膜和晶状体,分离视网膜。沿赤道部至锯齿缘将视网膜呈放射状切成 4 瓣,平铺于载玻片,用抗荧光衰减封片剂封片,在荧光显微镜下观察、拍照并进行图像分析。

**1.2.4 Western blot 法检测幼鼠视网膜组织中 BDNF 蛋白相对表达量** 2 个组分别任意选取 P13、P15、P17 幼鼠各 3 只,颈椎脱臼法处死,摘取眼球,解剖显微镜下冰上分离视网膜,将其放入 200 μl 细胞裂解液中(使用前加入 100 倍蛋白酶抑制剂),冰上超声粉碎功率设定为 400 W,每超声 5 s 后间歇 5 s,共超声 5 min。4℃ 下 12 000 r/min 离心 30 min,吸取上清液,加入 5 倍 SDS,100℃ 煮 10 min,短暂离心后分装,-80℃ 保存。Western blot 法检测标本蛋白,检测步骤见说明书。小鼠视网膜中 BDNF 的表达量以吸光值(A)表示。

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 16.0 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用完全随机分组单因素干预量水平实验设计,正常对照组与 OIR 组间小鼠视网膜突破内界膜血管内皮细胞核数及视网膜组织中 BDNF 蛋白相对表达量的差异比较均采用独立样本 *t* 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 OIR 模型的组织病理学表现**

正常对照组、OIR 组母鼠和幼鼠生长情况良好,母鼠和幼鼠成活率为 100%。正常对照组 P17 幼鼠视网膜组织切片可见视网膜内界膜表面光滑,未发现突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核及新生血管管腔(图 1A),而 OIR 组 P17 幼鼠视网膜切片可见大量突破内界膜的血管内皮细胞核及新生血管(图 1B)。

**2.2 两组幼鼠视网膜突破内界膜的血管内皮细胞核计数**

正常对照组 P17 幼鼠视网膜内界膜平滑,突破内界膜血管内皮细胞核数为  $(1.70 \pm 0.68)$  个,OIR 组 P17 幼鼠视网膜突破内界膜的血管内皮细胞核数为  $(45.3 \pm 3.13)$  个,明显多于正常对照组,2 个组间差异有统计学意义( $t = 86.5, P = 0.00$ )(图 2)。

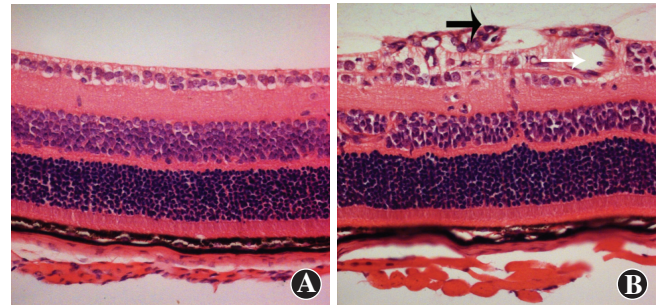


图 1 各组 P17 幼鼠视网膜组织病理学表现(HE ×200) A:正常对照组未发现突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核 B:OIR 组可见大量视网膜新生血管(白箭头)及突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核(黑箭头)

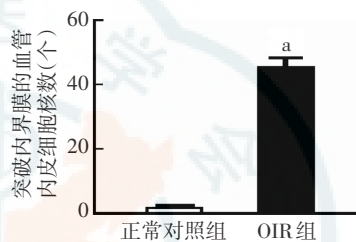


图 2 两组 P17 幼鼠视网膜新生血管内皮细胞核计数的量化比较 与正常对照组比较,OIR 组视网膜新生血管内皮细胞核计数显著增高, $P < 0.01$ (独立样本 *t* 检验, $n = 15$ ) OIR:氧诱导视网膜病变

**2.3 两组幼鼠视网膜铺片的比较**

视网膜铺片显示,正常对照组 P17 幼鼠视网膜大血管平滑,毛细血管成网状均匀分布,未发现视网膜无灌注区(图 3A)。OIR 组 P17 幼鼠视网膜大血管迂曲扩张,可见新生血管芽,周边部视网膜的团状新生血管呈高荧光,毛细血管的正常网状结构消失,视网膜中央区可见大面积无灌注区(图 3B)。

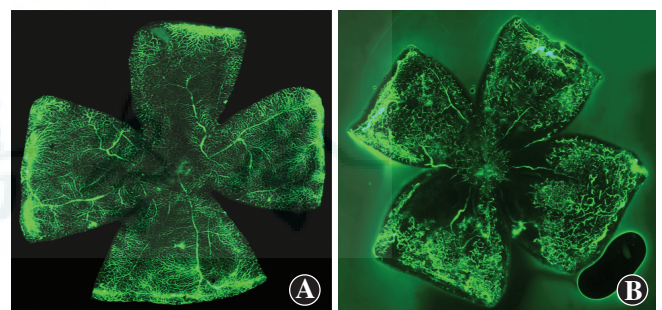


图 3 两组 P17 幼鼠视网膜铺片比较(FITC-dextran) A:正常对照组幼鼠视网膜血管走行正常,毛细血管呈网状均匀分布 B:OIR 组幼鼠视网膜大血管迂曲扩张,可见新生血管芽,视网膜周边部的新生血管团为高荧光,视网膜出现大面积无灌注区

**2.4 两组幼鼠视网膜 BDNF 表达量的比较**

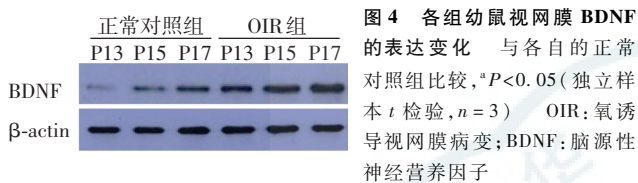
2 个组 P13、P15、P17 幼鼠视网膜中 BDNF 的表达量呈上升趋势。OIR 组 P13、P15、P17 幼鼠视网膜中 BDNF 的表达量均明显高于正常对照组,差异均有统计学意义( $t = 10.3、14.2、42.3$ ,均  $P < 0.05$ )(表 1,图 4)。



表 1 两组 P13、P15、P17 幼鼠视网膜组织中 BDNF 表达量的比较 ( $\bar{x} \pm s, A$  值)

组别	样本量	不同时间点 BDNF 的相对表达量		
		P13	P15	P17
正常对照组	3	186.204±9.653	230.324±7.779	115.846±7.305
OIR 组	3	162.274±6.618*	263.992±9.451*	218.432±9.710*
<i>t</i>		10.3	14.2	42.3
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

注: OIR: 氧诱导视网膜病变; BDNF: 脑源性神经生长因子 (独立样本 *t* 检验)



### 3 讨论

建立合适的 OIR 动物模型是 ROP 发病机制和治疗研究的基础, 本研究的预实验中采用隔日更换母鼠的方法建立 OIR 幼鼠模型, 发现哺乳期母鼠容易死亡, 进而影响造模的成功率, 因此在正式实验中, 我们每日更换氧箱中哺乳母鼠, 避免了母鼠死亡, 幼鼠造模成功率达到 100%。本研究的幼鼠视网膜组织病理学检查发现, 正常对照组同龄幼鼠未见突破视网膜内界膜的血管芽、血管管腔及内皮细胞核, 但 OIR 组不同日龄幼鼠均可见大量突破内界膜的视网膜新生血管和血管内皮细胞核, 按照文献[7-8]的标准, 确定造模成功。

本研究组前期的研究证实, FITC-dextran 眶后注射法与心脏灌注法均可用于 OIR C57BL/6J 幼鼠视网膜各层血管和新生血管的观察, 但 FITC-dextran 眶后注射法更经济, 操作更简单, 无需打开胸腔暴露心脏, 因此创伤更小, 更重要的是 FITC-dextran 眶后注射可在活体幼鼠重复操作<sup>[9]</sup>。本研究中使用眶后注射 FITC-dextran 法, 清晰地观察到视网膜新生血管及无灌注区, 进一步证实 FITC-dextran 眶后注射可定量观察研究视网膜新生血管性疾病。

OIR 病理机制尚不明确, 研究表明缺血性视网膜病变伴有神经细胞的凋亡和变性<sup>[10]</sup>。研究证实, BDNF 具有保护视网膜免受有害刺激、抑制缺血和光损伤对视网膜的损害、促进 RGCs 再生的功能<sup>[11-12]</sup>。本研究中发现, OIR 模型鼠视网膜中 BDNF 蛋白的表达变化时, P12 小鼠视网膜即开始出现新生血管, 随着日龄增加呈上升趋势, P17 小鼠视网膜新生血管量达峰, 与小鼠视网膜新生血管的增长趋势相对应<sup>[13]</sup>。本研究中 OIR 组不同鼠龄小鼠视网膜中 BDNF 相对表达

量明显高于正常对照组, 随造模时间延长, OIR 组小鼠视网膜中 BDNF 相对表达量呈现上升趋势, 而此期与新生血管大量产生、视网膜出现大量无灌注区的时间窗相吻合, 推测 BDNF 参与 OIR 的病理过程。本研究的局限性在于仅对 P12 ~ P17 小鼠视网膜中 BDNF 的表达变化趋势进行了初步观察研究, 间接推测了其表达变化与 OIR 小鼠视网膜血管新生的关系, 尚未进行 BDNF 对 OIR 小鼠视网膜的神经细胞的保护作用进行研究, 而血管内皮生长因子、缺氧诱导因子-1 和促红细胞生成素等可能均是 BDNF 作用的靶因子, 涉及 BDNF 表达与 OIR 的关系及其作用机制及其具体的影响途径等, 仍需我们进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization[J]. J Cell Physiol, 2000, 184(3): 301-310. DOI:10.1002/1097-4652(200009)184:3<301::AID-JCP3>3.0.CO;2-H.
- [2] Akula JD, Hansen RM, Martinez-Perez ME, et al. Rod photoreceptor function predicts blood vessel abnormality in retinopathy of prematurity[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(9): 4351-4359. DOI:10.1167/iovs.07-0204.
- [3] Lofqvist C, Chen J, Connor KM, et al. IGFBP3 suppresses retinopathy through suppression of oxygen-induced vessel loss and promotion of vascular regrowth[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(25): 10589-10594. DOI:10.1073/pnas.0702031104.
- [4] Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, et al. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(5): 1632-1636.
- [5] Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(1): 101-111.
- [6] Guo K, Li SQ, Li Jing, et al. Feasibility assessment for the observation of murine retinal vessel by retro-orbital injection of fluorescein isothiocyanate-dextran[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 1(1): 19-22. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.01.005.
- [7] Browning J, Wylie CK, Gole G. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997, 38(6): 1168-1174.
- [8] Pierce EA, Avery RL, Foley ED, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(3): 905-909.
- [9] Li S, Li T, Luo Y, et al. Retro-orbital injection of FITC-dextran is an effective and economical method for observing mouse retinal vessels[J/OL]. Mol Vis, 2011, 17: 3566-3573 [2015-09-23]. http://www.molvis.org/molvis/v17/a383/.
- [10] Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieger FW, et al. Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture[J]. Neuron, 1995, 15(4): 805-819.
- [11] Zhang CW, Lu Q, You SW, et al. CNTF and BDNF have similar effects on retinal ganglion cell survival but differential effects on nitric oxide synthase expression soon after optic nerve injury[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(4): 1497-1503. DOI:10.1167/iovs.04-0664.
- [12] Ziello JE, Jovin IS, Huang Y, et al. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia[J]. Yale J Biol Med, 2007, 80(2): 51-60.
- [13] LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, et al. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(3): 592-602.

(收稿日期: 2015-10-11)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)