

# 氧诱导视网膜病变小鼠模型的蛋白表达谱分析

漆晨 韩倩 薄其玉 刘勋 王飞 张琰 李筱荣

**【摘要】** **背景** 视网膜新生血管(RNV)是目前世界范围内主要的致盲原因之一,而目前的治疗效果并不理想,因此需要寻找在疾病状态下异常表达的蛋白质标志物,为新生血管性视网膜疾病的治疗提供新的靶点。**目的** 观察氧诱导视网膜病变(OIR)小鼠模型中视网膜血管的形态学特征,筛选并验证差异性表达的蛋白质分子。**方法** 选取 7 日龄健康清洁级 C57BL/6J 幼鼠 44 只,分为 OIR 组和正常对照组。OIR 组幼鼠先在氧体积分数为(75±2)%的环境下饲养 5 d,然后在正常空气环境中饲养 5 d,而正常对照组幼鼠仅在正常空气环境下饲养 10 d。取 17 日龄幼鼠经球后静脉注射高分子量异硫氰酸葡聚糖(FITC-dextran),然后制备视网膜铺片,观察视网膜血管的形态并统计视网膜无灌注区相对面积;取各组小鼠眼球行石蜡切片和苏木精-伊红染色,计数突破内界膜的血管内皮细胞核数;采用蛋白芯片法检测蛋白质分子在 OIR 组和正常对照组小鼠眼球中的差异性表达,并用 Western blot 法和 ELISA 法对差异表达蛋白进行验证。**结果** 视网膜铺片结果显示,OIR 组小鼠视网膜周边血管紊乱,静脉血管迂曲,视网膜中央有明显的无灌注区,在视网膜灌注区和无灌注区的交界处有大量新生血管芽,而正常对照组视网膜血管细密,静脉平滑,分布均匀整齐。OIR 组小鼠视网膜无灌注区的相对面积为(25.53±2.16)%,较正常组无灌注区的相对面积(0.66±0.36)%明显增加,差异有统计学意义( $t=-27.61, P<0.01$ )。石蜡切片苏木精-伊红染色结果表明,OIR 组小鼠视网膜平均每张切片突入玻璃体腔的血管内皮细胞核数为(28.41±3.97)/切片,而正常组为(0.16±0.31)/切片,两组间比较差异有统计学意义( $t=-54.42, P<0.001$ )。蛋白芯片检测结果显示,在检测的 62 个与新生血管和炎症相关的细胞因子中,表达变化达 1.5 倍以上者 10 个,包括 3 个上调因子和 7 个下调因子;表达变化达 2 倍以上的细胞因子 4 个,包括 3 个下调因子和 1 个上调因子。对表达差异最显著的 6 个细胞因子(上调、下调各 3 个)进行 Western blot 和 ELISA 验证,结果表明血小板因子 4(PF-4)、血管内皮生长因子 A(VEGF-A)、P-选择素(SELP)、血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)、可溶性肿瘤坏死因子受体 II(sTNF-R II)以及趋化因子半胱氨酸-X-半胱氨酸基元配体 16(CXCL16)的表达与蛋白芯片检测的表达趋势一致,其中 PF-4、SELP 和 VEGF-A 在 OIR 眼球中表达显著上调,CXCL16、sTNF-R II 和 VCAM-1 在 OIR 眼球中的表达显著下调,差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。**结论** 本研究成功建立 OIR 小鼠模型。细胞因子 PF-4、SELP、VEGF-A、CXCL16、sTNF-R II 和 VCAM-1 在 OIR 模型和正常对照小鼠的眼球组织中的表达存在显著差异,提示 OIR 状态下血小板系统处于激活状态,而促炎因子表达下调。PF-4 可能成为针对 RNV 的 VEGF 非依赖型治疗策略的新靶点。

**【关键词】** 病理性新生血管/生理病理;氧诱导视网膜病变;蛋白标志物表达谱,靶点;近交系 C57BL 小鼠

**Analysis of protein expression profiling in a mouse model of oxygen-induced retinopathy** Qi Chen, Han Qian, Bo Qiyu, Liu Xun, Wang Fei, Zhang Yan, Li Xiaorong. Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin Medical University Eye Institute, College of Optometry and Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300384, China  
Corresponding author: Zhang Yan, Email: yanzhang04@tmu.edu.cn; Li Xiaorong, Email: xli@tmu.edu.cn

**[Abstract]** **Background** Retinal neovascularization (RNV) is one of the major causes of blindness worldwide, but the pathogenic mechanism of this disease remains unclear, and therapeutic modalities need to be improved. Therefore, it is necessary to identify ocular protein markers with significant expression changes during RNV, thereby providing novel therapeutic targets for neovascular retinopathies. **Objective** This study was to investigate retinal vessel morphological characteristics and protein expression profiling in a mouse model of oxygen-induced

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.12.004

基金项目:第 45 批留学回国人员科研启动基金;教育部博士点基金联合资助(20111202110008);教育部博士点基金(20121202120005)

作者单位:300384 天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼科研究所 天津医科大学眼视光学院

通信作者:张琰,Email: yanzhang04@tmu.edu.cn;李筱荣,Email: xli@tmu.edu.cn

retinopathy (OIR). **Methods** Forty four C57BL/6J mouse pups were randomly divided into normal control group and OIR group at postnatal day 7 (P7). The mice in the normal control group were raised under the normal air for 10 days. The mice of the OIR group were exposed to  $(75 \pm 2)\%$  oxygen for 5 days. The mother mice were alternated between the two groups every day. The mice of the OIR group returned to normal air at P12. Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) was retrobulbarly injected at P17 mice from both groups, and the retinal flatmounts were prepared after fixation. The FITC-dextran-labeled retinal vessels were observed and quantified; the paraffin sections of eyeballs were processed for hematoxylin and eosin staining, and the number of pre-retinal vascular cell nuclei was quantified. The total proteins were extracted from the eyes, and the expression profiling was analyzed by a customized protein array and verified by Western blot and ELISA. **Results** The retinal flatmounts labeled with FITC-dextran showed that the peripheral retinal microvessels in the OIR group were tortuous, disorganized with neovascular buds, and the vascular obliteration was prominent in the center of retina. Contrastly, the vessels were smooth, organized, and evenly distributed in the normal control group. The percentage of vascular obliteration area in the OIR group was  $(25.53 \pm 2.16)\%$ , which was significantly higher than  $(0.66 \pm 0.36)\%$  in the normal control group ( $t = -27.61, P < 0.01$ ). The number of pre-retinal vascular cell nuclei, as revealed by hematoxylin and eosin staining, was  $(28.41 \pm 3.97)/\text{slide}$  in the OIR group, which was substantially higher than  $(0.16 \pm 0.31)/\text{slide}$  in the normal control group ( $t = -54.42, P < 0.001$ ). Protein array showed that 10 out of the 62 examined pro-inflammatory, pro-angiogenic cytokines exhibited more than 1.5-fold expression changes, including 3 up-regulated cytokines and 7 down-regulated cytokines; 4 cytokines showed more than 2-fold expression changes, in which 3 cytokines were down-regulated and 1 cytokine was up-regulated. The differential expressions were verified by Western blot and ELISA. The expression trends of platelet factor 4 (PF-4), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), selectin P (SELP), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), soluble tumor necrosis factor receptor II (sTNF-RII) and chemokine C-X-C motif ligand 16 (CXCL16) were consistent with those revealed by protein array. PF-4, VEGF-A and SELP were up-regulated, and the other 3 were significantly down-regulated (all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Differential expression patterns of the cytokines, including PF-4, VEGF-A, SELP, VCAM-1, sTNF-R II and CXCL16, are identified between normal and OIR mouse eyes. These differential expression patterns suggest that under the condition of OIR, the platelet system is activated, and proinflammatory factors are down-regulated. PF-4 might become a new target for VEGF-independent therapeutic strategy against RNV.

[**Key words**] Neovascularization, pathologic/physiopathology; Retinal disease, oxygen-induced; Protein markers, expression profiling, targets; Mice, inbred C57BL

以视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 为主要表现的疾病, 如增生性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR)、视网膜静脉阻塞、早产儿视网膜病变以及湿性年龄相关性黄斑变性是世界范围内主要的致盲眼病<sup>[1]</sup>。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是 RNV 的主要致病因子, 其促进新生血管生成和渗漏的作用已在基础和临床研究中得到证实<sup>[2-3]</sup>。目前临床上应用的抗新生血管药物多数以 VEGF 为主要靶点, 如 ranibizumab、bevacizumab、aflibercept 等<sup>[4]</sup>。但是玻璃体腔注射抗 VEGF 药物可引起眼内炎、视网膜脱离及眼内出血等并发症<sup>[5]</sup>, 而且 VEGF 是视网膜神经细胞生存的营养因子<sup>[6]</sup>, 长期拮抗 VEGF 可导致视网膜神经元的凋亡、脉络膜毛细血管超微结构改变、光感受器线粒体中断等不良反应<sup>[7-9]</sup>。另外, 有相当一部分患者对抗 VEGF 药物不敏感, 这也提示我们可能存在不依赖于 VEGF 的其他促新生血管生成的通路<sup>[10-11]</sup>。因此, 进一步寻找新的、高效、低毒的拮抗 RNV 的蛋白质分子靶点对 RNV 的临床治疗具有重要意义。本研

究中利用高通量蛋白芯片技术检测氧诱导视网膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 小鼠模型中差异性表达的蛋白质分子, 探索与 RNV 有关的蛋白标记物和潜在的 RNV 干预靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 取清洁级 7 日龄 C57BL/6J 健康幼鼠 44 只及相应母鼠 (购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心), 按随机数字表法将幼鼠分为 OIR 组和正常对照组, 每组 22 只。本研究经天津医科大学动物伦理委员会批准, 实验动物的使用和饲养遵循美国 ARVO 声明。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 小鼠细胞因子抗体玻片芯片-3 (货号: AAM-CYT-G3) (美国 Ray Biotech 公司); 异硫氰酸葡聚糖 (fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-dextran) 粉末 (美国 Sigma 公司); 组织蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒 (北京康为世纪公司); PVDF 膜 (美国 Bio-Rad 公司); 兔抗鼠 VEGF-A、血管

细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)、可溶性肿瘤坏死因子受体 II (soluble tumor necrosis factor receptor II, sTNF-R II)、趋化因子半胱氨酸-X-半胱氨酸基元配体 16 (CXCL16) 多克隆抗体(美国 abcam 公司);兔抗鼠选择蛋白 P(selectin P, SELP) 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);大鼠抗小鼠  $\beta$ -微管蛋白单克隆抗体(美国 BD 公司);增强型化学发光试剂(瑞典 Amersham Biosciences 公司);抗淬灭封片剂(美国 Vectashield 公司);ELISA 试剂盒(美国 R&D 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);UVP 凝胶成像系统(美国 UVP 公司);Infinite 200 PRO 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 OIR 模型的建立** 参考文献[12]中描述的方法建立 OIR 模型,其方法略有改进,即 OIR 组幼鼠在氧体积分数为(75±2)%的密闭玻璃容器中饲养,并用 CY-12C 数字测氧仪每日监测出气口氧浓度,每日打开密闭容器 1 次,更换垫料、鼠粮、水及母鼠,饲养 5 d 后移至正常空气环境中继续饲养 5 d;正常对照组幼鼠则在正常空气环境中饲养 10 d。

### 1.2.2 荧光素眼底血管造影法观察小鼠 RNV 的形成

参照文献[13]描述的方法,取相对分子质量为  $2 \times 10^6$  的高分子量 FITC-dextran 粉末溶于去离子水中,制备 50 mg/ml 的 FITC-dextran 灌注液,每组任意取 8 只 17 日龄幼鼠行球后静脉注射。操作时左手固定幼鼠头颈部皮肤,轻压眼眶使眼球突出,然后将按小鼠眼球大小弯成弧形的 1 ml 注射器针头刺入右眼内眦的 Tenon 筋膜,到达球后静脉丛后,缓慢注入 50  $\mu$ l 的 FITC-dextran 灌注液,静置数秒后缓慢退针,待灌注液循环 5 min 后取出小鼠眼球,于质量分数 4% 多聚甲醛中固定 40 min。然后在手术显微镜下剥离视网膜,并以视盘为中心放射状将其剪成 4 瓣,视网膜神经节细胞层向上平铺于载玻片上,用含 DAPI 的抗淬灭封片剂封片,于荧光显微镜下观察并照相,并用 CellSens Standard 软件(日本 Olympus 公司)测量无灌注区占全视网膜的相对面积。

**1.2.3 视网膜组织病理学检查突破内界膜的血管内皮细胞核数** 每组各取 17 日龄幼鼠 8 只,颈椎脱臼法处死,摘取眼球,按常规方法制成蜡块后行矢状位石蜡切片,切片厚度为 3  $\mu$ m,相邻 2 张切片间隔 40  $\mu$ m,每只眼球取 10 张切片,行苏木精-伊红染色,排除含视神经的切片,计算每张切片中突破内界膜进入玻璃体腔的血管内皮细胞核数。

**1.2.4 蛋白芯片检测小鼠眼球中差异表达的蛋白质分子** 每组各取 17 日龄幼鼠 2 只,颈椎脱臼法处死,摘取眼球,参照组织蛋白提取试剂盒说明书操作,提取各组眼球的总蛋白,使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。采用小鼠细胞因子抗体玻片芯片-3 对总蛋白行蛋白芯片分析。首先将 62 个小鼠细胞因子的捕获抗体逐一包被在固相玻璃载体上,将芯片封闭、清洗后,加入组织蛋白样品,使样品中的细胞因子与相应的捕获抗体结合;清洗后加入生物素化的检测抗体,使之与细胞因子-捕获抗体复合物结合;再次清洗,加入荧光标记的链亲和素,最后进行扫描定量分析。

**1.2.5 Western blot 法验证蛋白芯片检测结果** 各组分别取 17 日龄幼鼠 4 只,参照 1.2.4 方法提取眼球的总蛋白并测定蛋白浓度。根据蛋白浓度,每孔上样 50  $\mu$ g,参照文献[14-15]的方法行 Western blot 检测,分别行电泳、转膜、质量分数 5% 脱脂奶封闭后, PVDF 膜分别与 VEGF-A 多克隆抗体(1  $\mu$ g/ml)、SELP 多克隆抗体(1:200)、VCAM-1 多克隆抗体(1:1000)、sTNF-R II 多克隆抗体(1:500)、CXCL16 多克隆抗体(1  $\mu$ g/ml)以及  $\beta$ -微管蛋白单克隆抗体(1:1000)4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,然后与相应的辣根过氧化物酶标记的二抗孵育,用增强型化学发光试剂显色,用 UVP 凝胶成像系统拍照,用 Quantity One 软件(美国 Bio-Rad 公司)分析照片中显色条带强度,并以  $\beta$ -微管蛋白为内参,校正目标蛋白的表达水平。

**1.2.6 ELISA 法检测血小板因子 4 的表达变化** 取各眼球标本蛋白匀浆液 50  $\mu$ l,按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,然后用 Infinite 200 PRO 多功能酶标仪测定波长为 450 nm 的吸光度(A),并以 540 nm 的 A 值进行校正。经标准曲线测得的血小板因子 4 (platelet factor 4, PF-4) 蛋白浓度(ng/ml)再用标本的总蛋白浓度( $\mu$ g/ $\mu$ l)进行校正。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 统计学软件(美国 IBM 公司)进行统计分析。本研究中数据资料经 Shapiro-Wilk 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两水平实验设计,正常对照组与 OIR 组间小鼠视网膜无灌注区面积、突破内界膜血管内皮细胞核数及验证的小鼠眼球组织中各差异表达蛋白表达量的差异比较均采用独立样本 *t* 检验。采用双尾检验法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠视网膜铺片的形态学观察

荧光显微镜观察结果显示,正常对照组小鼠视网膜上自视盘发出的大血管向四周呈放射状均匀分布,直至视网膜周边部(图 1A~C),视网膜血管呈均匀网状结构(图 1D)。OIR 组小鼠视网膜上自视盘发出的大血管迂曲、变形(图 1E~G),分支减少,后极部可见大片无灌注区,中周部可见明显的视网膜血管无灌注区与有灌注区的分界限(图 1E,F),分界处可见大量新生血管和新生血管芽,新生血管网结构及分布紊乱(图 1H)。新生血管的定量分析结果显示,正常对照组小鼠视网膜无灌注区相对面积为(0.66±0.36)%, OIR 组为(25.53±2.16)%, 2 个组比较差异有统计学意义( $t=-27.61, P=0.000$ )(图 1I)。

**2.2 各组小鼠组织病理学表现及突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数定量比较**

正常对照组小鼠视网膜内界膜结构完整、平滑,血

管内皮细胞排列整齐,偶见突入玻璃体腔的血管内皮细胞核,平均突入玻璃体腔的血管内皮细胞核数为(0.16±0.31)/切片;OIR 组小鼠视网膜内界膜连续性破坏,内界膜下血管内皮细胞增生明显,细胞排列紊乱,可见大量突入玻璃体腔的新生血管管腔,平均突入玻璃体腔的血管内皮细胞核数为(28.41±3.97)/切片,两个组间差异有统计学意义( $t=-54.42, P=0.000$ )(图 2)。

**2.3 各组小鼠眼球中差异表达蛋白及水平**

OIR 组和正常对照组小鼠眼球中 62 个细胞因子的相对表达水平见表 1,其中 OIR 组有 10 个细胞因子的表达变化幅度达 1.5 倍及以上,包括 3 个上调因子和 7 个下调因子;还有 4 个细胞因子的表达变化达 2 倍以上,其中 PF-4 表达上调,而 CXCL16、sTNF-R II 和 VCAM-1 表达均下调(图 3)。

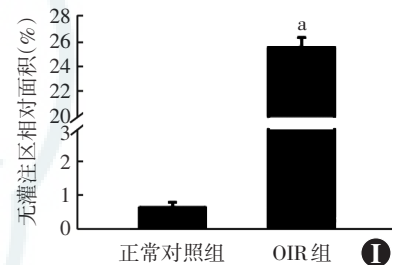
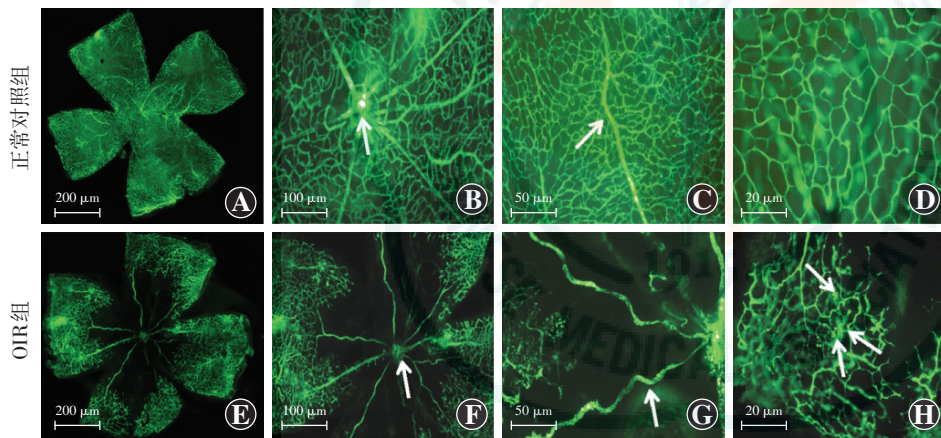


图 1 各组 17 日龄小鼠视网膜荧光素眼底血管造影表现 (FITC) A: 正常对照组视网膜整体图,由 40 倍显微镜下拍摄的 9 张图片拼接而成(标尺=200 μm) B: 正常对照组小鼠由视盘处(箭头)发出的大血管呈放射状分布(标尺=100 μm) C: 正常对照组小鼠自视盘发出的大血管走行正常(箭头)(标尺=50 μm) D: 正常对照组小鼠视网膜小血管呈网状(标尺=20 μm) E: OIR 组小鼠由 40 倍显微镜下拍摄的 9 张图片拼接而成的视网膜整体图(标尺=200 μm) F: OIR 组小鼠可见由视盘处(箭头)向周围分布的大血管,但血管无灌注(标尺=100 μm) G: OIR 组小鼠自视盘发出的大血管(箭头)迂曲扩张(标尺=50 μm) H: OIR 组小鼠可见视网膜新生血管芽(箭头)(标尺=20 μm) I: 正常对照组与 OIR 组小鼠无灌注区相对面积的定量分析 与正常对照组比较,  $^*P<0.001$  (独立样本  $t$  检验,  $n=8$ ) OIR: 氧诱导视网膜病变

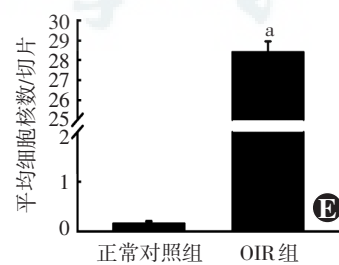
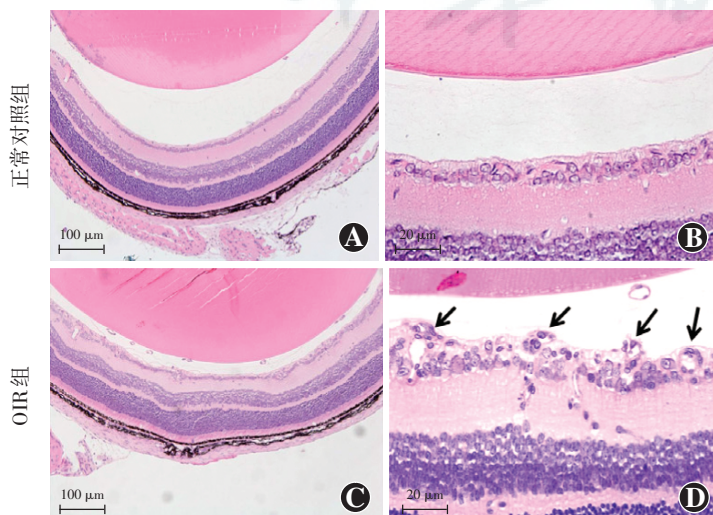
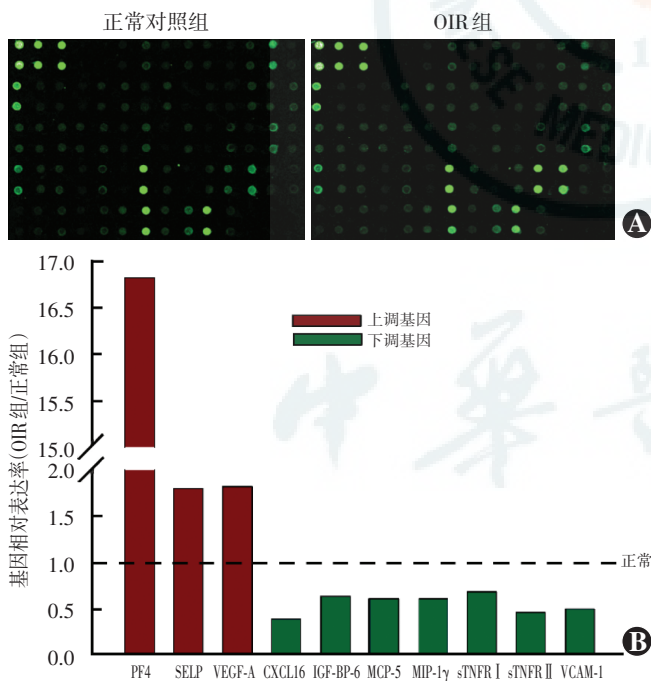


图 2 各组 17 日龄小鼠视网膜组织病理学检查及突破视网膜内界膜血管内皮细胞核数定量比较 A: 正常对照组小鼠视网膜各层形态正常(HE 标尺=100 μm) B: 正常对照组小鼠视网膜内界膜平滑、连续(HE 标尺=20 μm) C: OIR 组小鼠视网膜内界膜不平整(HE 标尺=100 μm) D: OIR 组小鼠可见突入玻璃体腔的血管内皮细胞核(箭头)(HE 标尺=20 μm) E: 正常对照组与 OIR 组平均每张切片突入玻璃体腔的血管细胞核数的定量分析 与正常对照组比较,  $^*P<0.001$  (独立样本  $t$  检验,  $n=8$ ) OIR: 氧诱导视网膜病变

**表 1 蛋白芯片检测 OIR 组和正常对照组小鼠眼球中 62 个细胞因子的相对表达水平**

基因名称	相对表达水平 (OIR 组/正常对照组)	基因名称	相对表达水平 (OIR 组/正常对照组)	基因名称	相对表达水平 (OIR 组/正常对照组)
<i>axl</i>	0.725	<i>IL3</i>	0.935	<i>MIP-1-α</i>	1.109
<i>BLC</i>	1.020	<i>IL3Rb</i>	1.093	<i>MIP-1-γ</i>	0.608
<i>CD30L</i>	0.992	<i>IL4</i>	1.006	<i>MIP-2</i>	1.083
<i>CD30</i>	1.095	<i>IL5</i>	0.949	<i>MIP-3-β</i>	0.979
<i>CD40</i>	0.815	<i>IL6</i>	0.950	<i>MIP-3-α</i>	1.056
<i>CRG-2</i>	1.132	<i>IL9</i>	0.913	<i>PF4</i>	16.817
<i>CTACK</i>	1.026	<i>IL10</i>	0.971	<i>SELP</i>	1.792
<i>CXCL16</i>	0.389	<i>IL12-p40/p70</i>	1.111	<i>RANTES</i>	1.081
<i>CCL11</i>	0.699	<i>IL12-p70</i>	1.036	<i>SCF</i>	1.419
<i>CCL24</i>	1.018	<i>IL13</i>	1.160	<i>SDF-1α</i>	1.009
<i>FASLG</i>	0.854	<i>IL17A</i>	0.960	<i>TARC</i>	1.124
<i>CX3CL1</i>	0.887	<i>KC</i>	1.062	<i>TCA-3</i>	1.056
<i>G-CSF</i>	0.890	<i>Leptin R</i>	0.928	<i>TECK</i>	0.830
<i>GM-CSF</i>	0.960	<i>Leptin</i>	1.127	<i>TIMP-1</i>	0.951
<i>IFN-γ</i>	1.052	<i>LIX</i>	1.105	<i>TNF-α</i>	0.911
<i>IGF-BP-3</i>	1.235	<i>SELL</i>	1.408	<i>sTNFR I</i>	0.679
<i>IGF-BP-5</i>	0.691	<i>XCL1</i>	0.961	<i>sTNFR II</i>	0.460
<i>IGF-BP-6</i>	0.634	<i>MCP-1</i>	0.965	<i>THPO</i>	0.958
<i>IL1-α</i>	1.012	<i>MCP-5</i>	0.607	<i>VCAM-1</i>	0.496
<i>IL1-β</i>	1.155	<i>M-CSF</i>	0.825	<i>VEGF-A</i>	1.809
<i>IL2</i>	1.018	<i>MIG</i>	0.873		

注: OIR: 氧诱导视网膜病变



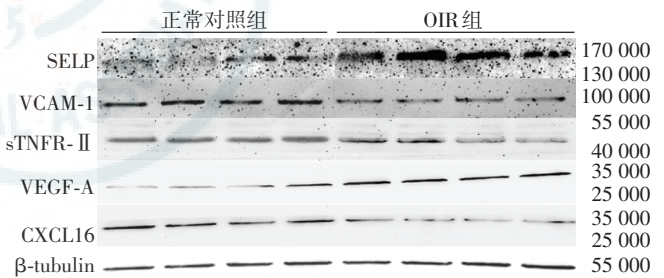
**图 3 OIR 组 17 日龄小鼠眼球蛋白芯片检测结果** A: 蛋白芯片扫描图片 B: 差异表达细胞因子的相对表达率 与正常组相比 OIR 组小鼠眼球组织中表达变化达 1.5 倍以上的细胞因子, 包括表达上调因子 (红色) 和表达下调因子 (绿色), 虚线代表正常组细胞因子表达水平 OIR: 氧诱导视网膜病变; PF: 血小板因子; SELP: 选择蛋白 P; VEGF: 血管内皮生长因子; CXCL: 趋化因子半胱氨酸-X-半胱氨酸基元配体; IGF-BP: 胰岛素样生长因子结合蛋白; MCP: 单核细胞趋化蛋白; MIP: 巨噬细胞炎症蛋白; sTNF-R I: 可溶性肿瘤坏死因子受体 I; sTNF-R II: 可溶性肿瘤坏死因子受体 II; VCAM: 血管细胞黏附因子

## 2.4 差异表达细胞因子的验证结果

对表达差异最显著的 3 个上调因子和 3 个下调因子进行 Western blot 和 ELISA 验证。与正常对照组相比, OIR 组小鼠眼球组织中 PF-4、SELP、VEGF-A 的表达显著上调, 差异均有统计学意义 ( $t = -3.63, P = 0.008; t = -10.09, P = 0.000; t = -3.96, P = 0.007$ ) (图 4, 图 5A ~ C); 而 VCAM-1、sTNF-R II 和 CXCL16 的表达显著下调, 差异均有统计学意义 ( $t = 3.79, P = 0.009; t = 3.48, P = 0.017; t = 3.49, P = 0.013$ ) (图 4, 图 5D ~ F)

## 3 讨论

OIR 小鼠模型是研究 RNV 眼病的主要模型之一, 造模过程中由高氧环境进入正常环境第 5 天是 OIR 小鼠形成 CNV 的高峰期<sup>[12]</sup>, 因此本研究中选择该时点观察视网膜血管形态并进行蛋白芯片检测。本研究中用 FITC-dextran 标记的视网膜血管显示与正常对照组相比, 17 日龄 OIR 组小



**图 4 Western blot 验证细胞因子差异性表达结果** OIR: 氧诱导视网膜病变; SELP: 选择蛋白 P; VCAM: 血管细胞黏附因子; sTNF-R II: 可溶性肿瘤坏死因子受体 II; VEGF: 血管内皮生长因子; CXCL: 趋化因子半胱氨酸-X-半胱氨酸基元配体; β-tubulin: β-微管蛋白

鼠视网膜血管走行迂曲, 视网膜中心部位有无灌注区, 在无灌注区与灌注区交界处有大量新生血管芽, 视网膜周边血管网结构紊乱。视网膜组织病理学研究显示, OIR 组小鼠平均每张切片突入玻璃体腔的视网膜血管细胞核数较正常对照组显著增多, OIR 小鼠视网膜血管的形态、分布与文献报道一致<sup>[12]</sup>; 我们还发现小鼠眼球中 VEGF-A 的表达显著上调, 提示 OIR 小鼠模型建立成功。

蛋白芯片检测结果提示, 在 OIR 小鼠眼球中有血小板系统的激活。有文献报道, 在血管生成期间, 血小板可在受损的血管壁附近被激活, 进而导致 PF-4 的释放<sup>[16]</sup>, 这与 Nawaz 等<sup>[17]</sup>发现的 PF-4 在 PDR 患者玻璃

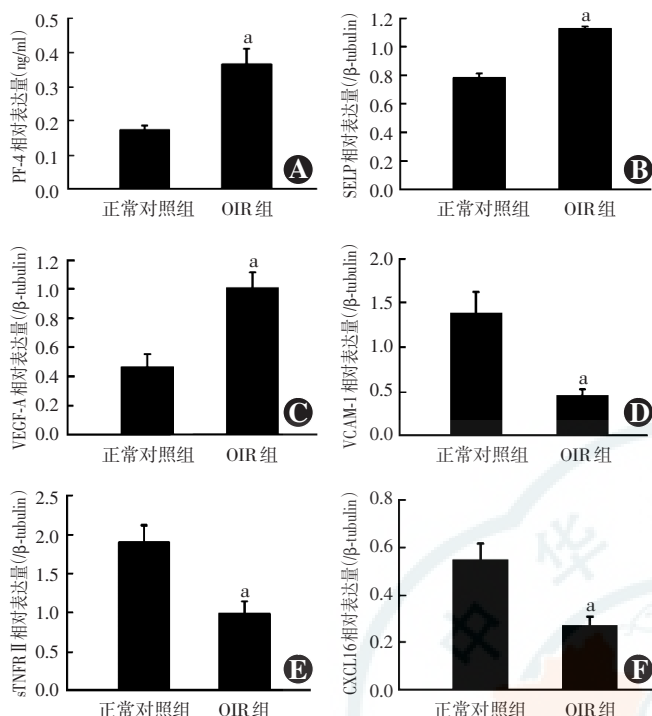


图 5 细胞因子差异性表达的定量分析 A:PF-4 的 ELISA 验证结果 B:SELP 的 Western blot 验证结果 C:VEGF-A 的 Western blot 验证结果 D:VCAM-1 的 Western blot 验证结果 E:sTNF-R II 的 Western blot 验证结果 与正常对照组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05(独立样本 *t* 检验,*n*=4) F:CXCL16 的 Western blot 验证结果 与正常对照组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05(独立样本 *t* 检验,*n*=4) OIR:氧诱导视网膜病变;PF:血小板因子;SELP:选择蛋白 P;VEGF:血管内皮生长因子;VCAM:血管细胞黏附因子;sTNF-R II:可溶性肿瘤坏死因子受体 II;CXCL:趋化因子半胱氨酸-X-半胱氨酸基元配体

体液中显著上调以及本研究中 PF-4 在 OIR 小鼠眼球中大幅度上调的实验结果一致。PF-4 属于谷氨酸-亮氨酸-精氨酸和半胱氨酸-X-半胱氨酸基元趋化因子家族,一方面可结合促血管生成因子,如 VEGF 和碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF),阻止二者与各自受体结合或 bFGF 形成二聚体<sup>[18-21]</sup>,另一方面还可抑制 VEGF 和单核细胞趋化蛋白-1 诱导的 MAPK-ERK 通路的活化而抑制新生血管生成<sup>[17]</sup>。因此,本研究初步揭示在 OIR 条件下可能存在以 PF-4 上调为主要表现的保护性机制,而 PF-4 则可作为 RNV 的新型保护性干预靶点。血小板的激活也可以导致在其表面表达的黏附分子 SELP 表达上调,而 SELP 可能通过促进早期炎症单核细胞浸润而促进缺血诱导的新生血管生成<sup>[22]</sup>。虽然在 OIR 小鼠模型中 SELP 在眼部的基因表达上调是否促进炎症和病理性新生血管生成还有待进一步研究,但我们的研究结果提示 SELP 可能是调节炎症性新生血管生成的一个靶点。

另一方面,蛋白芯片检测中表达下调最明显的 VCAM-1、sTNF-R II 和 CXCL16 3 个基因具有一个共同的特征,即其表达均受肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis

factor-α,TNF-α) 调控。TNF-α 经核因子-κB 信号通路可诱导血管内皮细胞上的黏附分子 VCAM-1 的表达<sup>[23-24]</sup>。TNF-α 可诱导 TNF-α 受体 II (tumor necrosis factor receptor II,TNF-R II) 被金属蛋白酶剪切而变成可溶形式<sup>[25-27]</sup>,也可诱导血管内皮细胞中趋化因子 CXCL16 的表达<sup>[28]</sup>。但是,Limb 等<sup>[29]</sup>认为 RNV 形成过程中存在 TNF-α 抑制机制,而我们的结果显示,OIR 小鼠视网膜中 TNF-α 本身的表达水平也有所降低。因此,在 OIR 小鼠视网膜中,伴随大量新生血管而出现的 TNF-α 抑制机制可能会导致 TNF-α 的活性及其介导的信号通路的抑制,进而引起其所调控的下游基因 VCAM-1、sTNF-R II 和 CXCL16 的表达下降,因此这部分的研究结果提示,P17 OIR 小鼠眼球中 TNF-α 及其调控的促炎因子引起的炎症可能不是这一时点的主要病理改变。

通过对 OIR 小鼠模型眼球的蛋白芯片分析,我们发现了以新生血管为主的病理改变所导致的新型血小板系统激活机制,而 PF-4 的保护作用为我们进一步研究针对 RNV 的 VEGF 非依赖型治疗策略提供了新的靶点。

参考文献

- [1] Campochiaro PA. Ocular neovascularization [J]. J Mol Med (Berl), 2013, 91(3): 311-321. doi:10.1007/s00109-013-0993-5.
- [2] Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis [J]. Annu Rev Pathol, 2007, 2: 251-275. doi:10.1146/annurev.pathol.2.010506.134925.
- [3] Xu J, Li Y, Hong J. Progress of anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease: benefits and challenges [J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127(8): 1550-1557.
- [4] Sulaiman RS, Basavarajappa HD, Corson TW. Natural product inhibitors of ocular angiogenesis [J]. Exp Eye Res, 2014, 129: 161-171. doi:10.1016/j.exer.2014.10.002.
- [5] Falavarjani KG, Nguyen QD. Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature [J]. Eye (Lond), 2013, 27(7): 787-794. doi:10.1038/eye.2013.107.
- [6] Nishijima K, Ng YS, Zhong L, et al. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury [J]. Am J Pathol, 2007, 171(1): 53-67.
- [7] Avci B, Avci R, Inan UU, et al. Comparative evaluation of apoptotic activity in photoreceptor cells after intravitreal injection of bevacizumab and pegaptanib sodium in rabbits [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(7): 3438-3446. doi:10.1167/iovs.08-2871.
- [8] Peters S, Heiduschka P, Julien S, et al. Ultrastructural findings in the primate eye after intravitreal injection of bevacizumab [J]. Am J Ophthalmol, 2007, 143(6): 995-1002.
- [9] Inan UU, Avci B, Kusbeci T, et al. Preclinical safety evaluation of intravitreal injection of full-length humanized vascular endothelial growth factor antibody in rabbit eyes [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(4): 1773-1781. doi:10.1167/iovs.06-0828.
- [10] Li X, Kumar A, Zhang F, et al. VEGF-independent angiogenic pathways induced by PDGF-C [J]. Oncotarget, 2010, 1(4): 309-314. doi:10.18632/oncotarget.141.
- [11] 薄其玉, 张琰, 吴玉伟, 等. 血小板源性生长因子家族在新生血管性眼病中作用的研究进展 [J]. 中华眼科杂志, 2014, 50(6): 471-475. doi:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2014.06.26.
- [12] Smith LE, Wesolowski E, Mclellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(1): 101-111.
- [13] 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]. Mol Vis, 2011, 17: 3566-3573.
- [14] Zhang Y, Wu X, He Y, et al. Melanocortin potentiates leptin-induced STAT3 signaling via MAPK pathway [J]. J Neurochem, 2009, 110(1): 390-399. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06144.x.

- [15] Hu B, Zhang Y, Zeng Q, et al. Intravitreal injection of ranibizumab and CTGF shRNA improves retinal gene expression and microvessel ultrastructure in a rodent model of diabetes [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(1): 1606-1624. doi:10.3390/ijms15011606.
- [16] Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(1): 1-18. doi:10.1016/j.cytogfr.2010.10.011.
- [17] Nawaz MI, Van Raemdonck K, Mohammad G, et al. Autocrine CCL2, CXCL4, CXCL9 and CXCL10 signal in retinal endothelial cells and are enhanced in diabetic retinopathy [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 109: 67-76. doi:10.1016/j.exer.2013.01.008.
- [18] Gengrinovitch S, Greenberg SM, Cohen T, et al. Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(25): 15059-15065.
- [19] Chadderton NS, Stringer SE. Interaction of platelet factor 4 with fibroblast growth factor 2 is stabilised by heparan sulphate [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(7): 1052-1055. doi:10.1016/S1357-2725(02)00299-6.
- [20] Lozano RM, Redondo-Horcajo M, Jimenez MA, et al. Solution structure and interaction with basic and acidic fibroblast growth factor of a 3-kDa human platelet factor-4 fragment with antiangiogenic activity [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(38): 35723-35734. doi:10.1074/jbc.M101565200.
- [21] Perollet C, Han ZC, Savona C, et al. Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization [J]. *Blood*, 1998, 91(9): 3289-3299.
- [22] Egami K, Murohara T, Aoki M, et al. Ischemia-induced angiogenesis: role of inflammatory response mediated by P-selectin [J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 79(5): 971-976. doi:10.1189/jlb.0805448.
- [23] Zhang F, Yu W, Hargrove JL, et al. Inhibition of TNF-alpha induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium [J]. *Atherosclerosis*, 2002, 161(2): 381-386.
- [24] Rajashekhar G, Grow M, Willuweit A, et al. Divergent and convergent effects on gene expression and function in acute versus chronic endothelial activation [J]. *Physiol Genomics*, 2007, 31(1): 104-113. doi:10.1152/physiolgenomics.00157.2006.
- [25] Crowe PD, Walter BN, Mohler KM, et al. A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the 80-kD TNF receptor and TNF processing in T lymphocytes [J]. *J Exp Med*, 1995, 181(3): 1205-1210.
- [26] Aderka D, Engelmann H, Shemer-Avni Y, et al. Variation in serum levels of the soluble TNF receptors among healthy individuals [J]. *Lymphokine Cytokine Res*, 1992, 11(3): 157-159.
- [27] Steiner G, Studnicka-Benke A, Witzmann G, et al. Soluble receptors for tumor necrosis factor and interleukin-2 in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, reactive arthritis and osteoarthritis [J]. *J Rheumatol*, 1995, 22(3): 406-412.
- [28] Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, et al. The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 [J]. *J Immunol*, 2004, 172(10): 6362-6372.
- [29] Limb GA, Hollifield RD, Webster L, et al. Soluble TNF receptors in vitreoretinal proliferative disease [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(7): 1586-1591.

(收稿日期:2015-08-09)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)

## · 病例报告 ·

## 首诊眼科的虹膜转移癌一例

王雅坤 庄朝荣 解正高 王虹 肖芹 段钰 孙骏

患者,男,58岁,因左眼红、痛伴视力下降2周于2012年8月5日来诊,以左眼虹膜肿瘤入院。患者12d前在外院诊断为左眼虹膜睫状体炎和前房积血,给予局部糖皮质激素和全身止血药物治疗,未见好转,入院前2d左眼视物不清、眼胀及眼痛症状加重。患者自述6年前行甲状腺肿块切除术,否认其他全身疾病史。入院时右眼和左眼最佳矫正视力分别为0.8和0.5;眼压:右眼11 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),左眼10 mmHg。左眼眼睑无红肿,结膜混合充血,角膜透明, KP(-),前房无积血,中央前房深度正常,颞侧前房浅,瞳孔不圆,对光反射存在,颞侧虹膜表面见新生物,直径5~6 mm,色泽略黄,肿物表面可见血管(图1);晶状体轻度混浊,眼底检查视盘边界清,视网膜脉络膜未见明显隆起病灶;右眼未见明显异常。眼部B型超声检查左眼未见明显异常。患者全身一般状态良好,未触及全身浅表淋巴结肿大。入院后心电图、胸部X射线摄片检查均未见异常,实验室检查指标均在正常范围。入院第2天行眼眶MRI平扫,提示左眼虹膜上小片状T1T2信号影;颅内见多发的类圆形长T1T2信号影,部分病灶周围见水肿信号影,直径较大者约12 mm。眼眶增强MRI结果提示左眼虹膜区小片状异常信号影,颅内有多发占位病灶,考虑转移癌可能性大(图2)。入院第3天行PET/CT检查,可见颅内多发的高密度结节伴氟脱氧葡萄糖

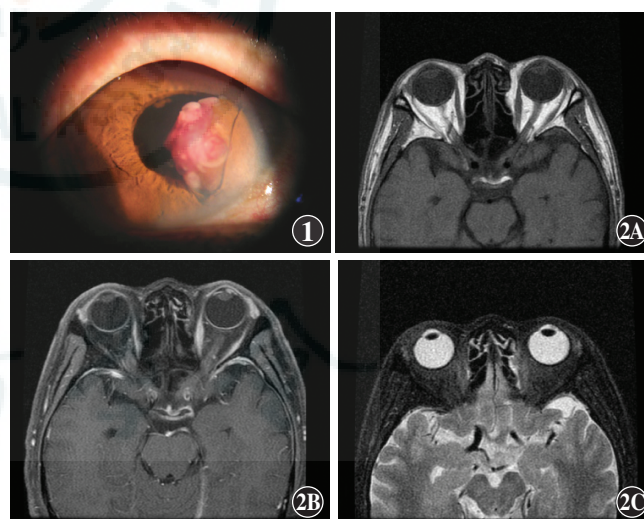


图1 左眼裂隙灯显微镜检查 可见颞侧虹膜表面新生物,其表面可见血管 图2 眼眶MRI图像 左眼虹膜区见小片状异常信号影,颅内多发占位 A:T1WI图 B:T1WI增强图 C:T2WI图

糖(fluorodeoxyglucose, FDG)代谢异常增高,部分病灶周围伴组织水肿,考虑颅内多发转移瘤(图3);患者左锁骨上及纵膈内淋巴结FDG代谢异常增高,考虑为肿瘤转移;左眼虹膜FDG代谢轻度增高,结合MRI检查考虑左眼虹膜占位病变;胃窦部检查发现局限性FDG代谢异常增高,延迟显像SUV最大值升高,胃大弯后壁(与左肾上极邻近处)出现边界清晰小圆形密度增高影,未见FDG代谢异常增高;食管壁略增厚,伴FDG代谢轻度增高(图4)。患者胃镜和组织病理学检查,诊断为(食道

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.12.005

作者单位:225001 扬州,苏北人民医院 扬州大学临床医学院眼科(王雅坤、庄朝荣、解正高、王虹),病理科(肖芹),核医学科(段钰),影像科(孙骏)

通信作者:王虹,Email:wh6012@126.com