

VEGFR-1 和 VEGFR-2 在氧诱导视网膜病变小鼠视网膜中表达的变化

朱丹 新吉夫 郭凯

【摘要】 **背景** 早产儿视网膜病变(ROP)是氧动力学异常导致严重视网膜血管病变的致盲眼病。血管内皮生长因子(VEGF)在 ROP 发病机制中发挥重要作用,但 VEGF 受体(VEGFR)在 ROP 发病中的作用研究较少。 **目的** 研究不同鼠龄氧诱导视网膜病变(OIR)小鼠视网膜中 VEGFR-1 和 VEGFR-2 的表达变化。 **方法** 将 60 只 SPF 级出生后 7 d(P7)的 C57BL/6J 小鼠与哺乳母鼠一起在体积分数(75±2)% O₂ 条件下饲养 5 d,建立 OIR 小鼠模型(OIR 组),以 60 只正常环境饲养的同品系同龄小鼠作为正常对照组。分别于 P8、P11、P12、P13、P14、P18 鼠龄时摘取 2 个组小鼠双侧眼球,制备视网膜切片,采用苏木精-伊红染色法检测小鼠视网膜血管的发育情况;采用实时荧光定量 PCR 法检测不同鼠龄小鼠视网膜中 VEGFR-1 和 VEGFR-2 mRNA 的相对表达水平;采用免疫组织化学法观察小鼠视网膜中 VEGFR-1 和 VEGFR-2 蛋白的表达。 **结果** 组织病理学结果显示,OIR 组 P13、P14、P18 小鼠有较多的血管内皮细胞核突破内界膜,光学显微镜下内界膜下的细胞增生,排列紊乱,视网膜表面或视网膜前有新生血管芽,但正常对照组各鼠龄小鼠视网膜结构正常。OIR 组 P12、P13、P14 和 P18 小鼠视网膜中 VEGFR-1 mRNA 的平均相对表达水明显高于正常对照组,差异均有统计学意义($P=0.046, 0.000, 0.000, 0.042$);OIR 组 P8、P11、P12、P13、P14 和 P18 小鼠视网膜中 VEGFR-2 mRNA 的平均相对表达水平明显高于正常对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。两个组间 P8、P11、P12、P13、P14、P18 小鼠视网膜中 VEGFR-1 蛋白阳性表达强度的差异均无统计学意义($M=50.00, 36.00, 41.00, 31.00, 28.00, 36.00$, 均 $P>0.05$);正常对照组与 OIR 组间 P8 和 P11 小鼠视网膜中 VEGFR-2 蛋白阳性反应强度的差异无统计学意义(均 $P>0.05$),正常对照组 P12、P13 小鼠视网膜中 VEGFR-2 蛋白的表达减弱,但 OIR 组同鼠龄小鼠视网膜中 VEGFR-2 蛋白的表达增强,2 组间差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);2 个组 P14 小鼠视网膜中 VEGFR-2 蛋白表达均明显增强,但 OIR 组的表达强度仍显著高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。正常对照组 P18 小鼠视网膜中 VEGFR-2 蛋白表达减弱,OIR 组 VEGFR-2 表达强度达峰($M=20.11, P<0.01$)。 **结论** VEGFR 参与 OIR 小鼠视网膜新生血管的形成,VEGFR-2 的促新生血管新生作用强于 VEGFR-1。

【关键词】 早产儿视网膜病变; 氧诱导视网膜病变; 血管内皮生长因子; 受体; 荧光定量 PCR; 免疫组织化学; C57BL/6J 小鼠

Expressions of VEGFR-1 and VEGFR-2 in mouse retinas with oxygen-induced retinopathy Zhu Dan, Xin Jifu, Guo Kai. Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China

Corresponding author: Zhu Dan, Email: zhudan1968@163.com

[Abstract] **Background** Retinopathy of prematurity (ROP) causes blindness due to retinal vasculopathy caused by abnormal oxygen dynamics. Studies have clarified the pivotal role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the development of ROP, while the studies on the role of VEGF receptor (VEGFR) in ROP are fewer.

Objective This study was to evaluate the relationship between the expressions of VEGFR-1 and VEGFR-2 in retina and post-birth time in the mice with oxygen-induced retinopathy (OIR). **Methods** Sixty 7-day-old (P7) SPF C57BL/6J mice together with lactating female mice were fed in the environment with (75±2)% oxygen concentration for 5 days and then returned to normal air to establish OIR models, and other 60 matched mice were kept in normal air environment as the control group. At P8, P11, P12, P13, P14, and P17, both eyes of each mouse were enucleated to prepare the retinal sections. Retinal blood vessels were examined by hematoxylin and eosin stain under the light

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.01.009

作者单位: 010050 呼和浩特, 内蒙古医科大学附属医院眼科

通信作者: 朱丹, Email: zhudan1968@163.com

microscope. Real-time fluorescence quantitative PCR and immunohistochemistry were used to detect the expressions of VEGFR1 mRNA and VEGFR2 mRNA and their proteins in mouse retinas, respectively. The use and care of the animals complied with the *Regulations for the Administration of Affair Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission*. **Results** Many vascular endothelial cell nucleus broke through the internal limiting membrane were seen with disorganized cell proliferation under the internal limiting membrane and retinal neovascularization bud in the P13, P14 and P18 mice in the OIR group, but no similar manifestation was found in the mice of the normal control group. The relative expression values of VEGFR-1 mRNA in retinas were significantly higher only in P12, P13, P14 and P18 mice in the OIR group than those in the normal control group ($P = 0.046, 0.000, 0.000, 0.042$), but the expression values of VEGFR-2 mRNA were all increased in the retinas of P8, P11, P12, P13, P14 and P18 mice in the OIR group, showing significant differences in comparison with the normal control group (all at $P = 0.000$). No considerable difference was found in the expression level of VEGFR-1 protein in P8, P11, P12, P13, P14 and P18 mice between the two groups ($M = 50.00, 36.00, 41.00, 31.00, 28.00, 36.00$, all at $P > 0.05$). The expression levels of VEGFR-2 protein in retinas of P8 and P11 were close between the two groups (all at $P > 0.05$). Gradually attenuated expressions were seen in VEGFR-2 protein in P12, P13 mice of the normal control group, however, the expressions were enhanced in the OIR group, with significant differences between the two groups (all at $P < 0.01$). Enhanced expressions of VEGFR-2 protein were found in P14 mice in both groups, but stronger expressions were in the OIR group ($P < 0.01$). The positive response of the expression of VEGFR-2 protein was weaker in P18 mice in the normal control group but peaked in the OIR group, showing significant difference between them ($M = 20.11, P < 0.01$). **Conclusions** VEGFR participates in the neovascularization of OIR mouse, and the effect of VEGFR-2 is stronger than that of VEGFR-1 in the development of OIR neovascularization.

[Key words] Retinopathy of prematurity; Oxygen-induced retinopathy; Vascular endothelial growth factor; Receptor; Real-time quantitative PCR; Immunohistochemistry; Mouse, C57BL/6J

早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 是由于视网膜血管尚未发育完全产生视网膜新生血管并导致纤维组织增生所致, 造成视力的严重损害。随着围产医学的进步, 早产儿的生存率明显提高, ROP 发生率也有所增加, 在发达国家是新生儿和儿童致盲的首位原因^[1]。来自中国的相关研究显示, 出生体质量低于 2 000 g 的早产儿 ROP 的患病率高达 17.18%^[2]。视网膜新生血管 (retinal neovascularization, RNV) 形成是 ROP 发生及发展的重要病理改变, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在 ROP 患者 RNV 的发生中发挥重要作用^[3-4], 但 VEGF 受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 包括两种亚型, 而关于 VEGF 究竟是通过哪种 VEGFR 发挥作用目前研究较少。本研究建立氧诱导视网膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 小鼠模型, 评估 VEGFR-1 和 VEGFR-2 在模型鼠 RNV 发生及发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

120 只 7 日龄 SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 雌雄各半, 购自内蒙古医科大学动物实验室, 饲养于内蒙古医科大学 SPF 级动物实验室。在本研究中, 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》。

1.2 OIR 小鼠模型的制作

将 60 只出生 7 d (P7) 的 C57BL/6J 小鼠与哺乳母鼠一起置于高氧环境中饲养, 氧气体积分数控制在 (75±2)%, 环境温度为 23 ~ 25 °C。将小鼠置于 12 h 光照/12 h 黑暗环境中, 每 2 天更换哺乳母鼠和垫料, 加水加食, 饲养 5 d 后回到正常环境。在正常环境中饲养的 60 只同品系同龄小鼠作为正常对照组。分别将 P8、P11、P12、P13、P14、P18 小鼠以颈椎脱臼法处死, 摘取小鼠双侧眼球进行后续实验。

1.3 小鼠视网膜血管的病理组织学检查

用质量分数 4% 多聚甲醛固定小鼠眼球 24 h, 常规脱水, 浸蜡, 石蜡包埋。常规脱蜡后制备视网膜 4 μm 厚切片, 用苏木精-伊红染色, 高倍镜下 (400 倍) 观察切片中突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核并计数。每张切片任意选取 5 个高倍视野计算阳性细胞平均数, 仅计数与内界膜有紧密联系的血管内皮细胞核, 不包括玻璃体腔内其他与内界膜无联系的血管内皮细胞核。

1.4 实时荧光定量 PCR 法检测小鼠视网膜中 VEGFR-1 mRNA 和 VEGFR-2 mRNA 的表达水平

剥离小鼠视网膜, 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 并用紫外分光光度计法定量。行逆转录反应合成 cDNA,

以其为模板进行实时荧光定量 PCR。根据 GenBank 中 VEGFR-1、VEGFR-2 基因序列设计引物。VEGFR-1 上游引物:5'-CCACCTCCATGTTTGAAGAC-3';探针:5'-AGTCCAGGTGAATCGCTTCA-3';下游引物:5'-TACCAGCAGTCTGCTGACCTCCCC-3';VEGFR2:上游引物:5'-CTCCATCTTTTGGTGGGATG-3';探针:5'-GCTGGTCTGGTTGGAGCCT-3';下游引物:5'-AGGCCACAGACTCCCTGCTTTTACTG-3';β-actin 内参照上游引物:5'-TGCCTGACGGTCAGGTCA-3';探针:5'-CACTATCGGCAATGAGCGGTTCCG-3';下游引物:5'-CAGGAAGGAAGGCT2GGAAG-3'。反应条件为:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 30 s,95℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,共 40 个循环。反应结束后,记录荧光强度达阈值时的循环数,采用相对定量 2^{-ΔΔCt} 法,计算每个目的基因 mRNA 相对拷贝数,实验重复 3 次,取平均值。

1.5 免疫组织化学法检测小鼠视网膜中 VEGFR-1 和 VEGFR-2 蛋白的表达

切片制作方法同 1.3 中所述,常规用二甲苯脱蜡,高压下枸橼酸抗原修复 2 min,浸入体积分数 0.3% H₂O₂ 中 10 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,体积分数 20% 羊血清 37℃ 封闭 30 min。分别加入 0.1 ml 兔抗小鼠 VEGFR-1 抗体(bs-0170R,1:200)(北京博奥森试剂公司)和 0.1 ml 兔抗小鼠 VEGFR-2 抗体(bs-0565R,1:200)(北京博奥森试剂公司),4℃ 孵育过夜,室温放置 30 min 后,加入生物素标记的羊抗兔 IgG(KIT9710,未稀释)(福州迈新生物技术开发有限公司),37℃ 孵育 10 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,加入链霉抗菌生物素蛋白-过氧化酶,PBS 洗涤 2 次,每次 5 min。二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB)显色 5 min,苏木素染色 7 min,盐酸乙醇分化 30 s,流水冲洗 7 min 返蓝,体积分数 95% 乙醇浸泡 30 s,分别在无水乙醇 I、无水乙醇 II、二甲苯 I 和二甲苯 II 浸泡 5 min,晾干封片,显微镜下拍照。以细胞质内出现淡黄色至棕褐色颗粒为阳性反应细胞,每张切片任意选取 5 个高倍视野计算阳性细胞平均数,阳性细胞 ≤25% 者为+,26%~50% 者为++,51%~74% 者为+++,≥75% 者为++++,重复 3 次。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0(美国 IBM SPSS 公司)统计学软件进行分析。本研究中实施荧光定量 PCR 测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 个组间均数经 F 检验证实方差齐。采用完全随机分组两因素两水平研究设计,正常对照组与 OIR 组不同鼠龄小鼠视网膜中 VEGFR-1 mRNA 和 VEGFR-2

mRNA 相对表达的总差异比较均采用两因素方差分析,组间和组内的多重比较采用 LSD-t 检验。本研究中免疫组织化学的检测指标为等级数据资料,采用 Friedman M 检验法比较 2 个组不同鼠龄小鼠视网膜 VEGFR 蛋白不同反应强度下的样本个数差异。采用双尾检测法,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 个组小鼠视网膜血管生长情况

正常对照组 P8、P11、P12、P13、P14、P18 小鼠突破内界膜的血管内皮细胞核数均为 0.000,OIR 组 P8、P11、P12 小鼠也未见突破内界膜的血管内皮细胞核,OIR 组 P13、P14、P18 小鼠突破内界膜的血管内皮细胞核数分别为 0.600±0.516、3.100±1.370 和 8.700±2.111。苏木精-伊红染色可见正常对照组小鼠及模型组 P8 小鼠视网膜内界膜平整,视网膜结构清晰,表面光滑,未见血管内皮细胞核突入玻璃体腔。模型组 P13 小鼠可见少量血管内皮细胞核突破内界膜,P18 小鼠可见有较多的血管内皮细胞核突破内界膜,内界膜下细胞增生,排列紊乱,并见视网膜表面或视网膜前有大量新生血管芽(图 1)。

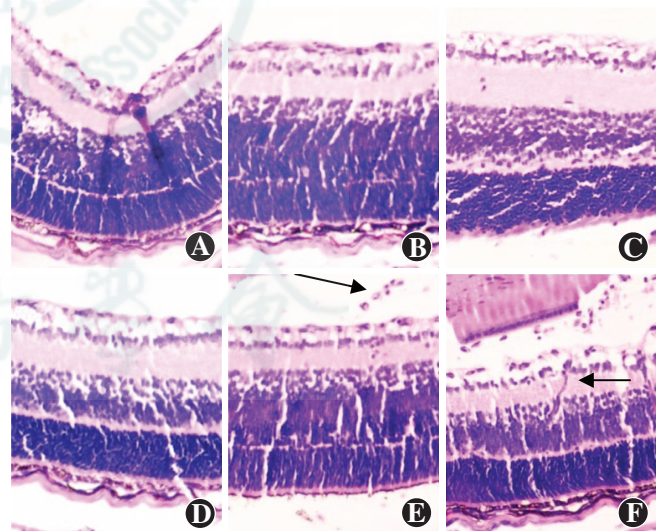


图 1 各组小鼠视网膜新生血管的组织病理学检查(HE×400) A:正常对照组 P8 小鼠视网膜形态正常,未见新生血管 B:正常对照组 P13 小鼠视网膜结构正常 C:正常对照组 P18 小鼠未见新生血管芽 D:OIR 组 P8 小鼠视网膜接近正常,未见新生血管 E:OIR 组 P13 小鼠可见血管内皮细胞核突破内界膜(箭头) F:OIR 组 P18 小鼠视网膜表面或视网膜前有大量新生血管芽(箭头)

2.2 2 个组小鼠视网膜中 VEGFR-1 mRNA 和 VEGFR-2 mRNA 的相对表达水平

2.2.1 小鼠视网膜中 VEGFR-1 mRNA 的表达水平

2 个组小鼠在不同组间和不同鼠龄视网膜中 VEGFR-1

mRNA 的相对表达差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 4.980, P = 0.028; F_{\text{鼠龄}} = 1338.250, P < 0.001$)。随着鼠龄的增加,正常对照组和 OIR 组小鼠视网膜中 VEGFR-1 mRNA 的表达量逐渐增高,P8、P11 组间差异无统计学意义 ($P = 0.752, 0.274$),但 OIR 组 P12 和 P18 小鼠稍高于同龄正常对照组小鼠,但差异无统计学意义 ($P = 0.046, 0.042$),而 P13、P14 小鼠视网膜中 VEGFR-1 mRNA 表达均明显高于同龄对照组小鼠,差异均有统计学意义 ($P = 0.000, 0.000$) (表 1)。

表 1 2 个组小鼠不同时间点视网膜 VEGFR-1 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s, 2^{-\Delta\Delta Ct}$)

组别	样本量	不同鼠龄 VEGFR-1 表达					
		P8	P11	P12	P13	P14	P18
正常对照组	10	0.23±0.04	0.28±0.06	0.32±0.08	0.28±0.08	0.36±0.11	0.57±0.12
OIR 组	10	0.23±0.05	0.27±0.05	0.34±0.07	0.38±0.14 ^a	0.45±0.10 ^a	0.58±0.14

注: $F_{\text{分组}} = 4.980, P = 0.028; F_{\text{鼠龄}} = 1338.250, P < 0.001$ 。与各自对照组小鼠比较, ^a $P < 0.01$ VEGFR: 血管内皮生长因子受体; OIR: 氧诱导视网膜病变 (两因素方差分析, LSD-*t* 检验)

2.2.2 2 个组不同鼠龄小鼠视网膜中 VEGFR-2 mRNA 的表达水平 2 个组小鼠在不同组间和不同鼠龄视网膜中 VEGFR-2 mRNA 的相对表达差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 2668.840, P < 0.001; F_{\text{鼠龄}} = 1062.270, P < 0.001$)。随着鼠龄的增加,正常对照组和 OIR 组各鼠龄视网膜 VEGFR-2 mRNA 的相对表达量逐渐增高。各鼠龄 OIR 组小鼠视网膜中 VEGFR-2 mRNA 的相对表达量均明显高于正常对照组,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (表 2)。

表 2 2 个组小鼠不同鼠龄视网膜 VEGFR-2 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s, 2^{-\Delta\Delta Ct}$)

组别	样本量	不同鼠龄 VEGFR-2 mRNA 表达					
		P8	P11	P12	P13	P14	P18
正常对照组	10	0.28±0.05	0.23±0.04	0.33±0.08	0.33±0.05	0.62±0.18	0.46±0.13
OIR 组	10	0.33±0.09 ^a	0.45±0.10 ^a	0.49±0.14 ^a	0.61±0.16 ^a	0.73±0.21 ^a	0.86±0.22 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 2668.840, P < 0.001; F_{\text{鼠龄}} = 1062.270, P < 0.001$ 。与各自的对照组小鼠比较, ^a $P < 0.01$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) VEGFR: 血管内皮生长因子受体; OIR: 氧诱导视网膜病变

2.3 2 个组小鼠视网膜 VEGFR-1 和 VEGFR-2 蛋白的表达变化

2.3.1 2 个组小鼠视网膜中 VEGFR-1 蛋白的表达 在小鼠视网膜发育的不同阶段,VEGFR-1 在血管形成活跃区有弱的表达。随着视网膜血管变化,其表达部位有变化,但表达强度变化不明显。正常对照和 OIR 组小鼠视网膜的 VEGFR-1 阳性表达强度差异均无统

计学意义 ($M = 50.00、36.00、41.00、31.00、28.00、36.00$,均 $P > 0.05$) (表 3)。

表 3 不同鼠龄小鼠在不同 VEGFR-1 蛋白表达强度下的样本个数比较 (正常对照组/OIR 组, *n*)

鼠龄	样本量	不同表达强度的样本个数				M	P
		+	++	+++	++++		
P8	10	5/4	4/5	1/1	0/0	50.00	0.98
P11	10	4/3	4/4	2/3	0/0	36.00	0.74
P12	10	4/2	3/5	3/3	0/0	41.00	0.87
P13	10	3/1	4/3	3/6	0/0	31.00	0.68
P14	10	2/2	3/1	5/7	0/0	28.00	0.57
P18	10	2/2	4/2	4/6	0/0	36.00	0.74

注: VEGFR: 血管内皮生长因子受体; OIR: 氧诱导视网膜病变 (Friedman *M* 检验)

2.3.2 VEGFR-2 蛋白在小鼠视网膜中的表达情况

2 个组间 P8 和 P11 小鼠视网膜中,不同 VEGFR-2 蛋白表达强度的样本频数差异均无统计学意义 ($M = 36.50、27.50$,均 $P > 0.05$);正常对照组 P12、P13 小鼠视网膜中 VEGFR-2 表达有减弱的趋势,但 OIR 组同龄小鼠视网膜中不同表达强度的样本频数多于正常对照组,不同表达强度的样本频数差异均有统计学意义 ($M = 17.00、18.00$,均 $P < 0.01$);2 个组间 P14 小鼠视网膜中 VEGFR-2 表达均明显增强,各细胞层均呈强表达,但 OIR 组表达明显强于正常对照组,不同表达强度的样本频数差异有统计学意义 ($M = 25.00, P < 0.01$)。正常对照组 P18 小鼠视网膜中 VEGFR-2 表达减弱,而 OIR 组 VEGFR-2 的表达仍显著增强,差异有统计学意义 ($M = 25.00, P < 0.01$) (表 4)。

表 4 不同鼠龄视网膜在不同 VEGFR-2 蛋白表达强度的样本个数比较 (正常对照组/OIR 组, *n*)

鼠龄	样本量	不同表达强度的样本个数				M	P
		+	++	+++	++++		
P8	10	6/4	3/5	1/1	0/0	36.50	0.75
P11	10	5/2	4/7	1/1	0/0	27.50	0.56
P12	10	1/2	8/7	1/1	0/0	17.00	0.00
P13	10	1/1	8/7	1/1	0/1	18.00	0.00
P14	10	3/0	4/1	3/5	0/4	25.00	0.00
P18	10	0/0	5/0	3/5	2/5	25.00	0.00

注: VEGFR-2: 血管内皮生长因子受体; OIR: 氧诱导视网膜病变 (Friedman *M* 检验)

3 讨论

ROP 的产生与缺氧相关。在高浓度持续吸氧条件下,早产儿未发育完全的视网膜组织得到氧供,视网膜血管停止或延缓向无血管区的生长,一旦撤离高氧条件,无血管区视网膜则处于低氧状态,引起 VEGF 大量表达,促使新生血管生成,进而导致 ROP^[5-7]。临床

研究证实,氧浓度和供氧时间与 ROP 相关^[8]。本实验将出生后 7 d 的小鼠置于 75% O₂ 环境下连续饲养 5 d, 然后置于正常环境中继续饲养, 对不同鼠龄小鼠视网膜新生血管进行组织病理学观察, 发现正常对照组小鼠视网膜内界膜平整, 未见突入玻璃体腔的血管内皮细胞核, 而 OIR 组小鼠在高氧条件下, 视网膜可见少量血管内皮细胞核突破内界膜, P18 小鼠可见有较多的血管内皮细胞核突破内界膜, 并见视网膜表面或视网膜前有新生血管芽, 表明本实验所建立的 OIR 小鼠模型的表现与临床 ROP 相符。

VEGFR 主要包括 VEGFR-1 和 VEGFR-2。VEGFR-1 的生物学效应主要是诱导内皮细胞迁移, 无促内皮细胞分裂增生作用, 而 VEGFR-2 主要促进有丝分裂、新生血管形成和血管通透性增加^[9-10]。本实验结果显示, 在高氧诱导下形成 ROP 的小鼠视网膜中 VEGFR-2 表达随着鼠龄的增加而逐渐增强, 且伴新生血管出现, 提示 VEGFR-2 在 ROP 形成中可能扮演了重要角色; 而 OIR 组小鼠视网膜中 VEGFR-1 表达随着鼠龄增加而未发生显著变化, 提示 ROP 的形成与 VEGFR-1 的表达关联性较差。小鼠脱离高氧环境立刻置于正常环境中饲养时, 造成了相对低氧状态, 促进了 VEGF 的大量表达, 通过与 VEGFR-2 结合, 受体激活后发挥促血管新生作用, 这可能是 ROP 发生的分子机制^[11]。

本研究仅完成了不同鼠龄小鼠视网膜 VEGFR 表达强度的检测, 但并未进行功能性验证, 研究结果有一定局限性, 但与前期细胞实验结果相一致^[12], 可为解释 ROP 机制的假说提供参考。实时定量 PCR 显示, OIR 组小鼠 VEGFR-2 mRNA 的表达与小鼠出生后的时间呈平行关系, 即随着高氧时间的延长, 小鼠视网膜出现相对缺氧状态, 刺激其产生过量的 VEGFR-2 以保证足够的受体与 VEGF 结合, 继而大量生成视网膜新生血管。正常对照组 P14 小鼠视网膜中 VEGFR-2 mRNA 及其蛋白表达达到最高值, 提示正常对照组小鼠出生 14 d 视网膜血管仍处于发育阶段, P18 小鼠视网膜中 VEGFR-2 mRNA 和蛋白表达水平显著降低, 提示视网膜发育完全后, 正常视网膜对 VEGFR-2 的需求量下降, 因此 VEGFR-2 表达下调, 而 OIR 组 P18 小鼠 VEGFR-2 mRNA 表达仍显著增加, 提示视网膜血管发育异常, 结合视网膜表面新生血管芽大量出现, 认为可能因为视网膜新生血管的形成仍需要 VEGFR-2 的高表达, 但这一推测需要进一步的功能学研究进行验证, 如 RNAi 或者基因敲除动物实验。

VEGFR-1 在两组小鼠视网膜发育及 OIR 的发生及发展中均有弱表达, 随着视网膜血管变化, 其表达部

位有变化, 但表达强度变化不明显。P8 和 P11 时, 2 个组小鼠 VEGFR-2 蛋白阳性表达强度并无差异; P12、P13 时正常对照组 VEGFR-2 表达减弱, 但 OIR 组不断增强; P14 时两组 VEGFR-2 表达均明显增强, 在各细胞层均有强表达, 但 OIR 组的表达强度仍显著高于正常对照组。小鼠至 P18 时, 正常对照组 VEGFR-2 表达减弱, 而 OIR 组 VEGFR-2 表达显著增强; 正常对照组各个阶段比较发现, P14 时 VEGFR-1 表达最强, OIR 组 P18 时 VEGFR-2 表达最强。可以推断高氧状态下的小鼠立即置于正常环境后造成的相对缺氧状态, 可导致视网膜缺氧缺血, 刺激视网膜产生大量的 VEGFR-2, 可促使大量视网膜新生血管的生成, 其信号的强弱直接影响 OIR 的严重程度。

综上所述, VEGFR-2, 而不是 VEGFR-1, 可能在 OIR 中起着重要作用。因此, 本研究可为 ROP 发病机制提供数据参考, 也为开发抗 VEGFR-2 和信号通路阻断药物提供理论支持。

参考文献

- [1] Gilbert C, Foster A. Childhood blindness in the context of VISION 2020-the right to sight [J]. Bull World Health Organ, 2001, 79 (3) : 227-232.
- [2] 尹虹, 黎晓新, 李慧玲, 等. 早产儿视网膜病变的筛查及其相关因素分析 [J]. 中华眼科杂志, 2005, 41 : 295-299. doi: 10. 3760/j. issn. 0412-4081. 2005. 04. 003.
- [3] Hartmann JS, Thompson H, Wang H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and pigment epithelial-derived factor in a rat model of retinopathy of prematurity [J]. Mol Vis, 2011, 17 : 1577-1587.
- [4] Stone J, Chan-Ling T, Pe'er J, et al. Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of retinopathy of prematurity [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37 (2) : 290-299.
- [5] 徐洪斌, 陈晓隆. 缺氧对新生大鼠视网膜影响的研究 [J]. 眼科研究, 2004, 22 : 494-497. doi: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2004. 05. 014.
- [6] 陈宜, 黎晓新, 董建强. 氧诱导小鼠视网膜新生血管的实验研究 [J]. 眼科研究, 2008, 26 : 113-116. doi: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2008. 02. 009.
- [7] 张正培, 陈钦元, 余振钰, 等. 氧诱导的血管增生性视网膜病变小鼠模型 [J]. 眼科研究, 2003, 21 : 493-496. doi: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2003. 05. 014.
- [8] 单海冬, 赵培泉, 蒋定锋. 严重早产儿视网膜病变危险因素分析 [J]. 中华眼底病杂志, 2005, 21 (5) : 271-274.
- [9] Robinson GS, Ju M, Shih SC, et al. Nonvascular role for VEGF: VEGFR-1, 2 activity is critical for neural retinal development [J]. FASEB J, 2001, 15 (7) : 1215-1217. doi: 10. 1096/fj. 00-0598fj.
- [10] Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions [J]. Clin Sci (Lond), 2005, 109 (3) : 227-241. doi: 10. 1042/CS20040370.
- [11] Binder DR, Herring IP, Zimmerman KL, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2 in normal and diseased canine eyes [J]. Vet Ophthalmol, 2012, 15 (4) : 223-230. doi: 10. 1111/j. 1463-5224. 2011. 00973. x.
- [12] 朱丹, 白贤明, 陶勇. 米诺环素对缺氧猴脉络膜视网膜血管内皮细胞表达 VEGFR-1 和 VEGFR-2 的影响 [J]. 中华眼底病杂志, 2013, 29 : 62-66. doi: 10. 3760/cma. j. issn. 1005-1015. 2013. 01. 015.

(收稿日期: 2014-06-20)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)