

环缩酚肽抑制小鼠血管增殖性视网膜病变的研究

梁小玲¹, 刘汉生², 陈浩宇¹, 黄永盛¹, 唐仕波¹, Peter A. Campochiaro³

(1. 中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060; 2. 海南省人民医院眼科, 海南 海口 570010;
3. 美国 Johns Hopkins 大学 Wilmer 眼科中心, Baltimore, MD 21287, U. S. A)

摘要 【目的】观察两种环缩酚肽的衍生物 (Hep-A) 和 (Hep-B) 对氧诱导的血管增殖性视网膜病变的抑制作用。【方法】将鼠龄为 7 d(P7) 的 C57BL/6 幼鼠置于体积分数 75% 的氧气箱中连续生活 5 d, 建立氧诱导的血管增殖性视网膜病变模型。在 12 d(P12) 幼鼠回到正常大气环境中, 同时开始给小鼠皮下注射安慰剂 (第 1 组, $n = 23$)、Hep-A 10 mg/kg (第 2 组, $n = 22$) 或者 Hep-B 10 mg/kg (第 3 组, $n = 22$), 每天两次, 持续 5 d。在 17 d(P17) 取鼠眼进行冰冻切片和 GSA (griffonia simplicifolia lectin B4) 染色, 或作荧光素灌注和视网膜平铺片, 用图象分析软件定量计算视网膜无灌注区和新生血管的面积。【结果】病理检测视网膜新生血管面积: 第一组为 $(0.51 \pm 0.08) \text{ mm}^2/\text{鼠}$ ($n = 7$); 第 2 组为 $(0.11 \pm 0.01) \text{ mm}^2/\text{鼠}$ ($n = 8$); 第 3 组为 $(0.16 \pm 0.02) \text{ mm}^2/\text{鼠}$ ($n = 8$)。视网膜平片检测视网膜新生血管面积: 第 1 组为 $(1.36 \pm 0.02) \text{ mm}^2/\text{眼}$ ($n = 32$), 第 2 组为 $(0.19 \pm 0.01) \text{ mm}^2/\text{眼}$ ($n = 28$), 第 3 组为 $(0.07 \pm 0.01) \text{ mm}^2/\text{眼}$ ($n = 28$); 视网膜平片检测视网膜无灌注区面积: 第 1 组为 $(2.33 \pm 0.08) \text{ mm}^2/\text{眼}$, 第 2 组为 $(1.08 \pm 0.09) \text{ mm}^2/\text{眼}$, 第 3 组为 $(1.22 \pm 0.11) \text{ mm}^2/\text{眼}$ 。经 ANOVA 分析, 第 2 组和第 3 组分别与第 1 组比较, 视网膜新生血管的面积和视网膜无灌注区的面积, 均明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。【结论】两种环缩酚肽衍生物均能强效地抑制氧诱导的血管增殖性视网膜病变小鼠形成视网膜无灌注区和新生血管, 对血管增殖性视网膜病变有抑制治疗作用。

关键词 环缩酚肽衍生物; 血管增殖性视网膜病变; 视网膜新生血管; 视网膜无灌注

中图分类号 R744.1

文献标识码 A

文章编号 1672-3554(2003)06-0532-04

Cyclic Heptadepsipeptide Inhibited Retinal Neovascularization and Nonperfusion in Oxygen-Induced Ischemic Retinopathy Mice

LIANG Xiao-ling¹, LIU Han-sheng², CHEN Hao-yu¹, HUANG Yong-sheng¹,
TANG Shi-bo¹, Peter A Campochiaro³

(1. Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China,

2. Department of Ophthalmology, Hainan Province Hospital, Haikou 570010, China,

3. Wilmer Eye Institute, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland 21287, U. S. A)

Abstract 【Objective】To investigate the effects of two novel fungus-derived cyclic heptadepsipeptide (Hep-A) and (Hep-B) on oxygen-induced ischemic retinopathy in mice. 【Methods】The C57BL/6 mice were placed in 75% oxygen from postnatal day (P) 5 to P12. At P12, the mice were put back in room air and treated with subcutaneous injection of 10 mg/kg Hep-A, 10 mg/kg Hep-B, or vehicle twice a day. At P17, mice were either sacrificed and eye frozen sections were stained with griffonia simplicifolia lectin B4 (GSA) which selectively stained vascular cells and counterstained with eosin; or perfused with fluorescein-dextran and then made retinal flat-mount. The areas of the retinal neovascularization or retinal nonperfusion were tested under microscopy and recorded by a video camera and frame grabber, and then quantitated by Image-Pro Plus software. The data were analyzed by ANOVA software. 【Results】Compared to vehicle-treated mice, the area of retinal nonperfusion

收稿日期 2003-07-30

基金项目 “211 工程” 重点学科建设基金资助项目(中山医科大学 98006); 中山大学中山眼科中心留学回国人员科研启动基金资助项目 (200303)

作者简介 梁小玲(1963 -), 女, 广东广州人, 医学博士, 副教授. E-mail: thwang@gzsums.edu.cn

and neovascularization in oxygen-induced ischemic retinopathy mice treated with Hep-A or Hep-B was significantly reduced.【Conclusion】The analogs of cyclic heptadepsipeptide potently inhibit retinal nonperfusion and neovascularization in oxygen-induced ischemic retinopathy mice.

Key words cyclic heptadepsipeptide; ischemic retinopathy; retinal neovascularization; retinal nonperfusion

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(6) 532 ~ 535]

血管增殖性视网膜病变是一类常见的致盲眼病,许多疾病如高血压、糖尿病、视网膜中央静脉阻塞、早产儿视网膜病变等都可以引起血管增殖性视网膜病变。该病最终因视网膜新生血管增殖、出血和牵引性视网膜脱离而导致失明,并严重影响患者的生存质量,给患者及其家庭以及社会带来沉重的负担。对这类世界性致盲眼病,由于其发病机制还未十分清楚,临床上尚无理想的治疗方法。从 *Bartalinia robillardoies* 真菌培养的基质中分离出一种新的环缩酚肽(cyclic heptadepsipeptide, Hep),其化学衍生物可以强效而特异地抑制体外的内皮细胞及其他多种细胞表达细胞间黏附分子-1(Intercellular adhesion molecule, ICAM-1)^[1-4],但在体内的作用尚未了解。细胞黏附分子被认为参与了血管增殖性视网膜病变的发病过程^[5]。近来我们初步研究了 Hep 的两种化学衍生物对氧诱导的血管增殖性视网膜病变小鼠新生血管与无灌注区形成的影响。

1 材料与方法

1.1 氧诱导的血管增殖性视网膜病变小鼠模型的建立

参照 Smith 等^[6]的方法,将出生后 7 d (Postnatal 7 day, P7) 的 C57BL/6 小鼠与母鼠一起放入含氧体积分数为 75% ± 3% 的饲养箱中,孵育温度维持在 23 °C ± 2 °C,用氧气分析仪 (BioSperix, 美国) 监测并调控箱内氧气含量。P12 放回正常室内空气中饲养,这时造成小鼠视网膜相对缺氧, P17 视网膜内有大量的新生血管形成。

1.2 实验分组

将 67 只 C57BL/6 小鼠 (Jackson, 美国) 分为 3 组:第 1 组为安慰剂对照组,共 23 只小鼠,其中 7 只鼠 14 眼作冰冻切片, 16 只鼠 32 眼作荧光素标记视网膜平片检查;第 2 组和第 3 组分别为环缩酚肽 -A 和 -B 治疗组,每组各 22 只鼠,其中冰冻切片

各为 8 只鼠 16 眼,视网膜平片各为 14 只鼠 28 眼;均按上法建立血管增殖性视网膜病变模型。

1.3 给药方法

将 4 mg Hep 粉剂溶解到 100 μL 溶解剂中,每次注射前用等渗葡萄糖溶液稀释到最后的浓度 2 g/L。从 P12 取出小鼠到室内空气环境开始,对小鼠皮下注射 Hep-A 或 Hep -B 10 mg/kg 或者安慰剂,每天两次,持续 5 d。

1.4 病理检测视网膜新生血管的面积

在 P17,处死小鼠并迅速取下眼球,包埋, -80 °C 冰箱保存。整个眼球从一侧的虹膜根部开始到另一侧的虹膜根部切成 10 μm 的系列冰冻切片。相隔 100 μm 收集 1 张切片,连续收集 10 张。用生物素标记的凝集素 (griffonia simplicifolia lectin B4, GSA, Vector Laboratories, 美国) 进行组织化学染色, GSA 可以选择性结合到血管细胞上:切片在体积分数 10% 正常牛血清中孵育 30 min,室温下用生物素标记的 GSA 孵育 2 h,冲洗,过氧化物酶-卵白素 (Vector Laboratories, 美国) 孵育 45 min,冲洗,最后用二氨基联苯胺孵育显色,用伊红作对比染色。同轴显微镜检查, Image-Pro Plus (Media Cybernetics, 美国) 软件测量视网膜表面的 GSA 染色阳性的细胞及其面积。10 张切片 GSA 阳性细胞的总面积作为每只眼球新生血管的总量,用作一个单一的实验值。每鼠双眼新生血管的总量的均数用作统计分析的单一实验值。

1.5 视网膜平片检测视网膜无灌注区面积和新生血管的面积

在 P17,用乙醚麻醉小鼠,固定四肢,快速分离并暴露心脏,经左心室将 50 g/L 荧光素标记的葡聚糖 (Sigma, 美国) 1 mL 快速注入。处死小鼠,取下眼球,室温下在 100 mL/L 的甲醛中固定 1 h。显微镜下去除角膜、虹膜和晶体,小心地从眼杯中完整地剥离视网膜,从视网膜的锯齿缘到 4 个象限的赤道部做放射状切开,视网膜平铺在玻片上,封口,加盖玻片。用荧光显微镜检测平铺的视网膜, Im-

age-Pro Plus 软件测量无荧光素灌注的视网膜面积和有大量荧光素积聚的视网膜新生血管的面积。

1.6 统计学分析

所有数据输入 SPSS for window 10.0 统计软件,首先对各组总体方差进行齐性检验,如果方差齐性,则按照完全随机设计,采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)进行统计,当总的比较差异有统计学意义后再采用 SNK(Student-Newman-Keuls, SNK) -*q* 检验作各组均数间的两两比较

2 结果

2.1 冰冻切片检测视网膜新生血管的面积

正常 P17 小鼠视网膜 GSA 染色显示视网膜血管排列较整齐,从内丛状层到神经纤维层有浅表的、中间的和深部的毛细血管,但是没有延伸到内界膜以上(图 1.1、1.2)。安慰剂治疗的血管增殖性视网膜病变小鼠($n=7$),视网膜前突破内界膜有广泛的 GSA 阳性染色细胞,提示大量的视网膜新生血管形成,面积为 $(0.51 \pm 0.08) \text{mm}^2/\text{鼠}$;在视网膜中央区有大面积的深部毛细血管床缺失,提示视网膜毛细血管无灌注区形成(图 1.3、1.4)。Hep-A($n=8$)和 Hep-B($n=8$)治疗的小鼠,视网膜中央大部分血管化,只有少量的深部无血管区,视网膜前新生血管明显减少,面积分别为 $(0.11 \pm 0.01) \text{mm}^2/\text{鼠}$ 和 $(0.16 \pm 0.02) \text{mm}^2/\text{鼠}$ (图 1.5、1.6、1.7、1.8)。统计的结果方差齐性, $P < 0.01$ 。ANOVA 视网膜新生血管面积比较 $F = 21.3$, $P < 0.01$ 。SNK-*q* 检验比较组间差异, Hep-A 和 Hep-B 治疗的小鼠视网膜新生血管平均面积比对照组少, $P < 0.01$ 。

2.2 视网膜平片检测视网膜无灌注区面积和新生血管面积

正常 P17 小鼠视网膜呈现均匀的网络状的血管结构,未见荧光素渗漏出血管外(图 2.1、2.2)。安慰剂组($n=32$),在视网膜中央出现大面积的无荧光素充盈区(提示为血流无灌注区),面积为 $(2.33 \pm 0.08) \text{mm}^2/\text{眼}$,同时周边视网膜出现大量高荧光素区(提示新生血管形成),面积为 $(1.36 \pm 0.02) \text{mm}^2/\text{眼}$ (图 2.3、2.4)。Hep-A($n=28$)和 Hep-B($n=28$)治疗组,可见小面积的视网膜无灌注,面积为 $(1.08 \pm 0.09) \text{mm}^2/\text{眼}$ 和 (1.22 ± 0.11)

$\text{mm}^2/\text{眼}$,少量的高荧光即新生血管形成区,面积为 $(0.19 \pm 0.01) \text{mm}^2/\text{眼}$ 和 $(0.07 \pm 0.01) \text{mm}^2/\text{眼}$ (图 2.5~2.8)。统计的结果视网膜无灌注和新生血管面积的方差均为齐性, $P < 0.01$ 。ANOVA 结果视网膜无灌注区面积, $F = 84.6$, $P < 0.01$,新生血管面积 $F = 81.2$, $P < 0.01$ 。SNK-*q* 检验比较组间差异,结果 Hep-A 或者 Hep-B 治疗组比对照组无灌注区面积少, $P < 0.01$;同样,视网膜新生血管面积也明显减少, $P < 0.01$ 。

3 讨论

本实验结果表明,皮下注射 ICAM-1 的拮抗剂 Hep-A 和 Hep-B 可使氧诱导的小鼠视网膜新生血管形成明显减少,同时视网膜无灌注区也明显减少。以往的研究发现 Hep 可以抑制体外内皮细胞及其他多种细胞表达 ICAM-1^[1-4],本实验发现它在体内也可抑制视网膜新生血管形成。已有的研究表明,在氧诱导的血管增殖性视网膜病变小鼠中,有多种细胞因子参与其发病过程^[7,8]。VEGF 是新生血管形成的关键刺激因子,VEGF 通过刺激 ICAM-1 和一氧化氮合成酶表达增多,诱发白细胞附壁,导致视网膜病变的无灌注区形成^[5,9,10],视网膜缺血和缺氧刺激 VEGF 的表达增多,如此恶性循环,使视网膜新生血管形成、眼内出血、牵引性视网膜脱离,最后致盲。结合 Hep 的体外实验和本研究结果,提示 Hep-A 和 Hep-B 在体内抑制视网膜新生血管形成的作用,可能是通过拮抗 ICAM-1,使 VEGF 的作用被阻断而达到的。

以往曾用 VEGF 受体激酶抑制剂治疗氧诱导的血管增殖性视网膜病变小鼠,发现它可完全抑制视网膜新生血管形成,但是同时增加了视网膜无灌注区^[11]。这与本研究结果有明显区别, Hep-A 和 Hep-B 抑制氧诱导的小鼠形成视网膜新生血管的同时,也使视网膜无灌注区明显减少。推测新发育的视网膜血管内皮细胞与新生血管的内皮细胞一样,其存活依赖于 VEGF。因此,VEGF 受体激酶抑制剂促进了两种类型的内皮细胞的凋亡,并增加毛细血管无灌注性,结果导致大片的视网膜无灌注区形成。这样,VEGF 受体拮抗剂在抑制新生血管形成的同时也加重了视网膜的缺血,而 Hep 通过抑制体内的血管内皮细胞或血液细胞(如白细胞等)分泌 ICAM-1,白细胞附壁减少,视网膜无灌注区域

形成减少, VEGF 分泌减少, 形成的视网膜新生血管也少。另一种可能的机制是, VEGF 刺激内皮细胞形成新生血管的过程中需要 ICAM-1 的帮助, Hep 抑制了这种作用, 也就抑制了视网膜新生血管形成; VEGF 对新发育的视网膜血管内皮细胞的营养和支持作用, 不需要 ICAM-1 的帮助, 因此 Hep 不会引起大片的视网膜无灌注区形成。当然, 这些推测还有待今后更多的研究进一步检验。本结果提示 Hep 在治疗血管增殖性视网膜病变时可能比 VEGF 受体拮抗剂更加有利。

本研究通过用皮下注射 Hep 抑制氧诱导的血管增殖性视网膜病变模型小鼠的方法, 初步探讨了 Hep 对血管增殖性视网膜病变的预防和治疗作用, 但其作用机制, 最佳给药途径、时间、剂量等还有待今后更进一步研究, 希望通过这方面的研究, 为人类血管增殖性视网膜病变的预防和治疗能提供新的资料。

(本文图 1 见封 2, 图 2 见封 4. Fig. 1 shown in inside front cover, and Fig. 2 shown in back cover)

参考文献:

- [1] Foster C A, Dreyfuss M, Mandak B, *et al.* Pharmacological modulation of endothelial cell-associated adhesion molecule expression: implications for future treatment of dermatological diseases[J]. *J Dermatol*, 1994, 21(11): 847.
- [2] Hommel U, Weber H P, Oberer L, *et al.* The 3D-structure of a natural inhibitor of cell adhesion molecule expression[J]. *FEBS Lett*, 1996, 379(1): 69.
- [3] Boger D L, Chen Y, Foster C A. Synthesis and evaluation of aza HUN-7293[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2000, 10(15): 1741.

- [4] Chen Y, Bilban M, Foster C A, *et al.* Solution-phase parallel synthesis of a pharmacophore library of HUN-7293 analogues: a general chemical mutagenesis approach to defining structure-function properties of naturally occurring cyclic (depsi) peptides[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(19): 5431.
- [5] Joussen A M, Poulaki V, Qin W, *et al.* Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthases expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion *in vivo*[J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(2): 501.
- [6] Smith L E, Wesolowski E, McLellan A, *et al.* Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(1): 101.
- [7] 梁小玲, 高汝龙, 李绍珍, 等. 生长因子在玻璃体视网膜增殖膜中的免疫组化研究[J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(4): 356.
- [8] Liang X, Li C, Li Y, *et al.* Platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor immunolocalized in proliferative retinal diseases[J]. *Chin Med J*, 2000, 113(2): 144-147.
- [9] Ozaki H, Seo M S, Ozaki K, *et al.* Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(2): 697.
- [10] Tang S, Le-Ruppert K C, Gabel V P. Express of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) on proliferating vascular endothelial cells in diabetic epiretinal membranes[J]. *Br J Ophthalmol*, 1994, 78(5): 370.
- [11] 白宁艳, 唐仕波, 林健贤, 等. 白细胞与早期糖尿病视网膜病变关系的研究[J]. *眼科学报*, 2002, 18(2): 71.

(编辑 刘清海)

· 简 讯 ·

中国卫生部发布有关 SARS 的指导与处理原则文件

据央视国际报道, 中国卫生部今天发布了《传染性非典型肺炎流行病学调查指导原则》, 要求各地遵照执行。卫生部指出, 流行病学调查是传染病预防控制的关键措施和重要工作环节, 做好 SARS 流行病学调查对于指导疫情的预防和控制至关重要。SARS 流行病学调查的主要内容是病例的个案调查、接触者追踪和资料管理和利用。《指导原则》对流行病学调查的工作程序和方法、注意事项等做了具体规定。卫生部今天还发布了《传染性非典型肺炎密切接触者判定标准和处理原则》, 要求各地在发生 SARS 疫情时, 对 SARS 病人的密切接触者及时、科学、有效地采取措施。卫生部指出, 在一定条件下, SARS 具有较强的传染性, SARS 病人的密切接触者感染 SARS 可能性较大。“判定标准和处理原则”规定, 密切接触是指治疗或护理、探视 SARS 病人或疑似病人、与病人共同生活, 通过其他方式直接接触病人的呼吸道分泌物、体液、排泄物等。由于到目前为止, 尚未发现 SARS 病人的潜伏期具有传染性, 所以卫生部要求在判定密切接触者、分析他感染发病的可能性时, 可综合考虑接触时病人发病与否及症状情况、与病人接触方式、接触时采取的防护措施、接触时间长短等, 以便采取针对性措施, 接触者的调查和判定由疾病预防控制机构负责。《判定标准和处理原则》把密切接触者分为日常生活学习工作中的密切接触者、交通工具上的密切接触者(飞机、铁路旅客列车、汽车、轮船), 并对密切接触者和一般接触者的处理原则, 分别做了规定。

来源: 中新网 2003-10-31

Cyclic Heptadepsipeptide Inhibited Retinal Neovascularization and Nonperfusion in Oxygen-Induced Ischemic Retinopathy Mice (Text in page 532)

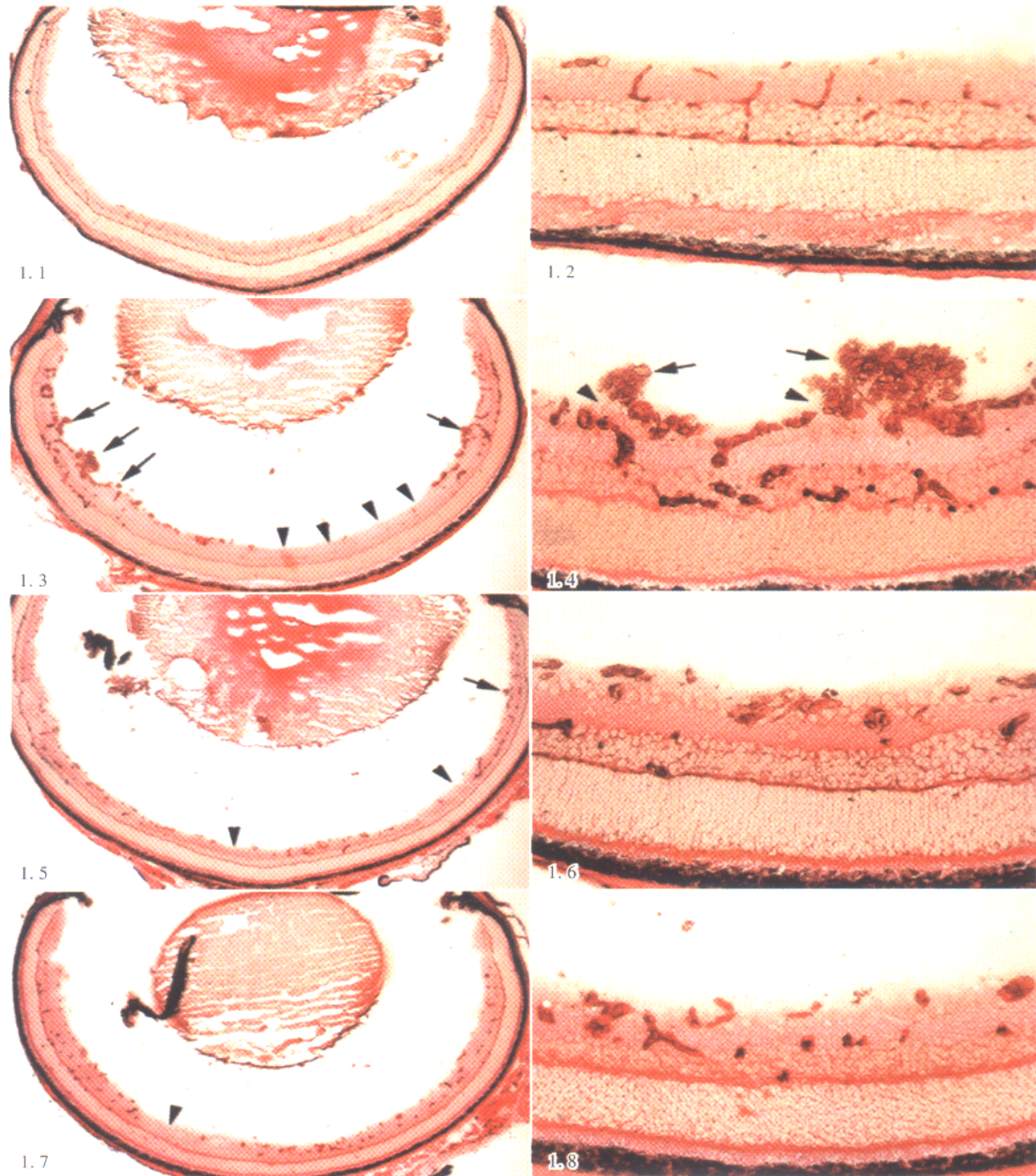


图 1 Hep-A 和 Hep-B 抑制血管增殖性视网膜病变的组织学改变

Fig. 1 Histological changes in ischemic retinopathy mice treated with Hep-A and Hep-B

- 1.1 (100 ×) and 1.2(400 ×):Regular vessels in a nonischemic retina of a normal P17 mouse.
- 1.3 Vehicle treated mouse, extensive retinal neovascularization (NV) above the internal limiting membrane (ILM) of the retina (arrows) and wide-ranging retinal nonperfusion (arrowheads).
- 1.4 High magnification of 1.3, density clumps of retinal NV above the ILM (arrows). Arrowheads pointed out the ILM of the retina.
- 1.5 Hep-A treated mouse, minimal NV on the superficial of the retina (arrows) and a little area lack of the deep capillary bed (arrowheads).
- 1.6 High magnification of 1.5, a few enlarge GSA positive cells on the surface of the retina, but no neovascularization above the ILM.
- 1.7 Hep-B treated mouse, none NV on the surface of the retina and nominal retinal nonperfusion (arrowheads).
- 1.8 High magnification of 1.7, some enlarged GSA positive cells on the surface of the retina, but not any neovascularization above the ILM

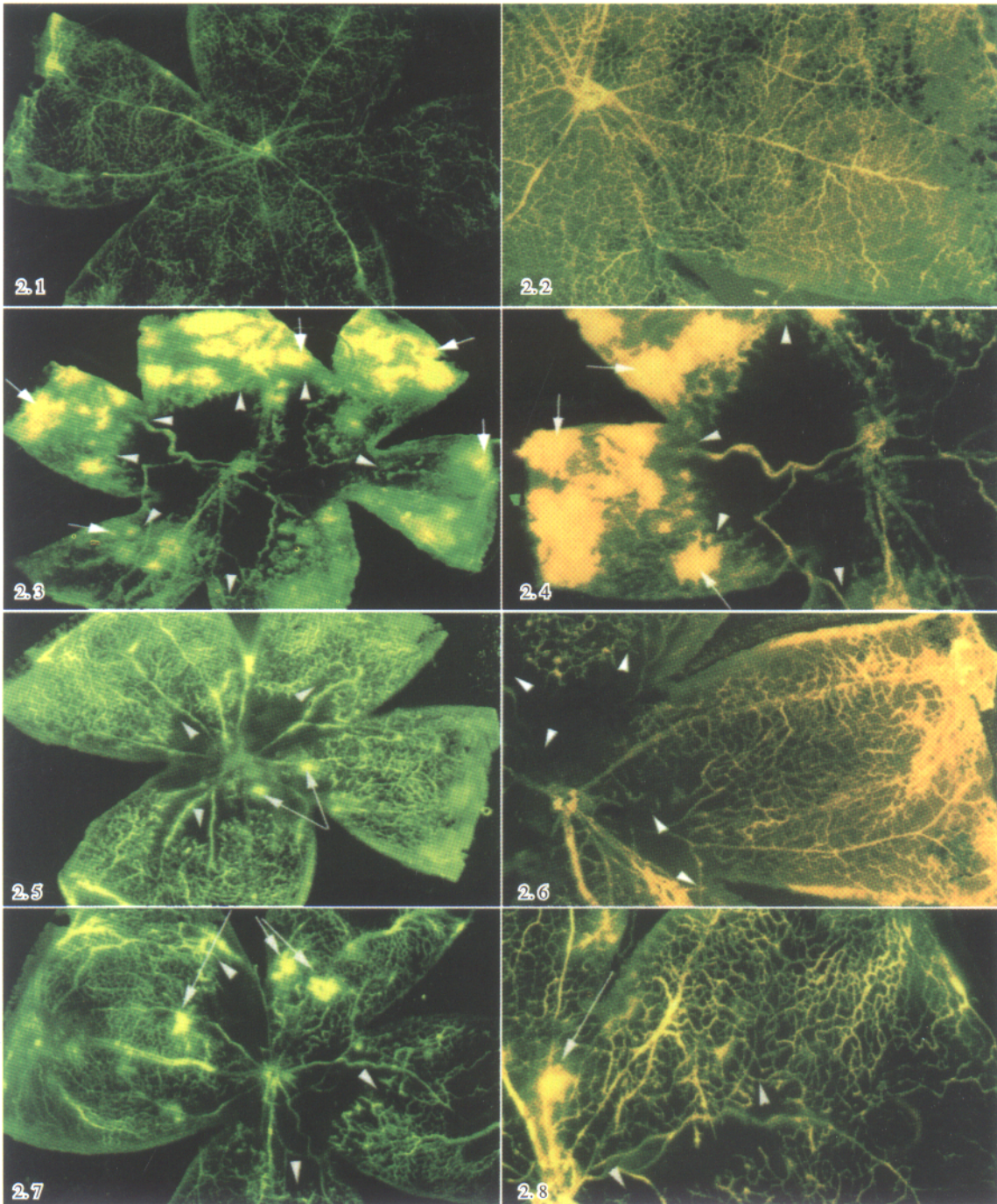


图 2 Hep-A 和 Hep-B 抑制血管增殖性视网膜病变的荧光素灌注视网膜平片改变

Fig. 2 Fluorescein-labeled retinal whole mount changes in ischemic retinopathy mice treated with Hep-A and Hep-B

2. 1 (100 ×) and 2. 2 (400 ×): Normal retinal vasculature in a normal P17 mouse.

2. 3 (100 ×) and 2. 4 (400 ×): Vehicle-treated mouse, large area of nonperfusion (arrowheads) close to the center of the retina and extensive high fluorescein area of neovascularization (arrows).

2. 5 (100 ×) and 2. 6 (400 ×): Smaller avascular area (arrowheads) and tiny patches of neovascularization (arrows) in Hep-A treated mouse with ischemic retinopathy.

2. 7 (100 ×) and 2. 8 (400 ×): Smaller nonperfusion area (arrowheads) and a few patches of neovascularization (arrows) in Hep-B treated mouse with ischemic retinopathy