

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00482

## 缺氧条件下血管内皮生长因子受体2对视锥细胞的保护作用

石珂\*, 张倩, 赵璐, 应红梅, 汪昌运

南昌大学第二附属医院眼科, 南昌 330006

**[摘要]** **目的** 探讨缺氧条件下血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)对视网膜视锥细胞的作用。**方法** 8周龄视锥细胞特异性敲除 VEGFR2(cone-specific VEGFR2 knockout)小鼠(简称 KO 小鼠)和野生型 C57BL/6 小鼠(简称 WT 小鼠)各 6 只,右眼均予以玻璃体腔内一次注射 8 mmol/L 氯化钴(CoCl<sub>2</sub>)制作缺氧模型,左眼注射磷酸盐缓冲液(PBS)作为对照。次日行视网膜电图(ERG)检查光感受器功能,免疫荧光共定位法检测视锥细胞密度,并观察其形态。**结果** KO 和 WT 小鼠缺氧侧眼的暗适应 ERG a 波振幅和 b 波振幅均下降,与 PBS 对照侧相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),但 KO 小鼠与 WT 小鼠之间相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。KO 小鼠和 WT 小鼠缺氧侧眼的明适应 ERG a 波振幅和 b 波振幅较对照侧均下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),且 KO 小鼠较 WT 小鼠下降更明显( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),说明视锥细胞功能下降。形态学观察发现 KO 小鼠和 WT 小鼠缺氧侧眼的视锥细胞均出现变化,表现为密度下降,形态短小,排列疏松、紊乱,且 KO 小鼠的改变更为显著。**结论** VEGFR2 在缺氧条件下对视锥细胞具有保护作用。

**[关键词]** 缺氧;视锥(视网膜);血管内皮生长因子受体2;视网膜电描记术

**[中图分类号]** R 774.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)05-0482-05

### Protective effect of VEGF receptor 2 on cone photoreceptors under hypoxia condition

SHI Ke\*, ZHANG Qian, ZHAO Lu, YING Hong-mei, WANG Chang-yun

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the protective effect of VEGF receptor 2 (VEGFR2) on retinal cone photoreceptors under hypoxia condition. **Methods** Eight-week-old cone-specific VEGFR2-knockout (KO) mice and wild-type (WT) C57BL/6 mice received intravenous injection of 8 mmol/L cobalt chloride in the right eyes for hypoxia condition and PBS in the left eyes for control, with 6 mice in each group. On the next day electroretinogram (ERG) was conducted to evaluate the photoreceptor function, and immunofluorescence colocalization was used to determine the density and morphology of cone photoreceptors. **Results** In KO and WT groups, hypoxia eyes had significantly decreased a-wave and b-wave amplitudes in scotopic ERG compared with PBS control eyes ( $P < 0.01$ ), but with no significant difference between hypoxia eyes of KO and WT groups ( $P > 0.05$ ). In both KO and WT groups, the hypoxia eyes also had significantly decreased a-wave and b-wave amplitude in photopic ERG compared with PBS control eyes ( $P < 0.01$ ), and the decrease in KO mice was more significant than that in WT group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), indicating the decrease of cone function in KO animal. Morphology examination showed noticeable changes under hypoxia condition in both KO and WT groups, showing decreased density, shortened appearance, and disordered arrangement, with the changes in KO group being more noticeable. **Conclusion** VEGFR2 has a protective effect on cone photoreceptors under hypoxia condition.

**[Key words]** anoxia; cones (retina); vascular endothelial growth factor receptor-2; electroretinography

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(5): 482-486]

缺氧是糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)病理改变的重要环节之一<sup>[1]</sup>,由于视网膜神经元正常代谢需消耗大量的氧,缺氧将导致神经

元损伤甚至死亡。视锥细胞作为视觉传导通路的一级神经元,负责昼光觉和色觉,受损后将严重影响视功能,故探索视锥细胞的“保护伞”对应用于保存 DR

**[收稿日期]** 2014-02-03 **[接受日期]** 2014-03-26

**[基金项目]** 江西省教育厅青年科学基金(GJJ13046)。Supported by Youth Scientific Research Foundation of Jiangxi Education Department (GJJ13046)。

**[作者简介]** 石珂,主治医师。

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0791-86299710, E-mail: 86325294@qq.com

患者的视功能具有重要意义。DR 的发生发展始终伴随着血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的高表达<sup>[2]</sup>。VEGF 的生物学作用除刺激新生血管形成、参与肿瘤发生及转移外,还可以保护运动神经元<sup>[3]</sup>,但其在视网膜光感受器类感觉神经元中的作用鲜有报道。VEGF 必须通过与 VEGF 受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 结合才能发挥效应。VEGFR 主要包括 VEGFR1 和 VEGFR2,研究发现抑制 VEGFR2 可阻断 VEGF 信号通路,而抑制 VEGFR1 则影响甚微<sup>[4]</sup>。基于以上背景,本研究选择 VEGFR2 作为研究靶点,利用经典氯化钴 (CoCl<sub>2</sub>) 玻璃体腔注射法建立缺氧模型,观察并比较视锥细胞特异性敲除 VEGFR2 (cone-specific VEGFR2 knockout) 小鼠和野生型小鼠视锥细胞结构及功能的变化,探讨 VEGFR2 在缺氧条件下对视锥细胞的作用。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 CoCl<sub>2</sub> 购自美国 Sigma 公司,花生凝集素 (peanut agglutinin, PNA)、羊抗兔荧光二抗、4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 购自美国 Vector 公司,兔抗小鼠 VEGFR2 一抗购自美国 R/D 公司, PBS 缓冲液、山羊血清等购自北京天根生化科技有限公司。微量注射器购自美国 Hamilton 公司, Espion 视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 仪购自美国 Diagnosys 公司,倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司,玻璃酸钠凝胶购自山东博士伦福瑞达公司。

1.2 实验动物分组 选用清洁级的 8 周龄、体质量 20~30 g 的健康无眼疾近交系视细胞特异性敲除 VEGFR2 小鼠,简称 KO 小鼠 (美国俄克拉荷马大学健康科学中心乐韵政教授惠赠) 和野生型小鼠,简称 WT 小鼠 (南昌大学动物科学部提供) 各 6 只。在经南昌大学第二附属医院医学研究伦理审查委员会批准后进行动物实验, WT 小鼠均采取右眼注射 8 mmol/L CoCl<sub>2</sub> 视为野生型缺氧组 (CoCl<sub>2</sub>-WT); 左眼注射磷酸盐缓冲液 (PBS) 视为野生型自身对照组 (PBS-WT), KO 小鼠均采取右眼注射 8 mmol/L CoCl<sub>2</sub> 视为基因敲除缺氧组 (CoCl<sub>2</sub>-KO), 左眼注射

PBS 视为基因敲除自身对照组 (PBS-WT)。

1.3 缺氧模型的建立 小鼠予以腹腔麻醉后,眼部周围用碘伏消毒,然后在显微镜下使用 Hamilton 微量注射器于角膜缘外 1 mm 向视神经方向进针,于瞳孔区见针尖后缓慢推药。右眼玻璃体腔内注入 8 mmol/L CoCl<sub>2</sub> 1  $\mu$ L,左眼玻璃体腔内注入 PBS 1  $\mu$ L。

1.4 ERG 检测光感受器细胞功能 使用复方托比卡胺滴眼液 (日本参天制药公司) 将小鼠散瞳后放于暗室过夜,第 2 天予以腹腔麻醉。再将小鼠置于加热温板上,参比电极和接地电极插入腭部和尾巴,铂制角膜电极置于双眼角膜上并予以玻璃酸钠凝胶润滑,以上操作均在暗室弱红光灯照明下完成。ERG 仪设置 0.000 4、0.04、4、400 及 2 000 (cd · s)/m<sup>2</sup> 光照强度以记录暗适应 ERG 以反映视杆细胞功能,然后开灯明适应 10 min 后在 2 000 (cd · s)/m<sup>2</sup> 光照强度下记录明适应 ERG 以反映视锥细胞功能。

1.5 免疫荧光共定位法观察 VEGFR2 表达及视锥细胞形态 由于视锥细胞在小鼠视网膜光感受器中仅约占 3%,采用蛋白质印迹法无法得到准确结果,故本研究以 PNA 为视锥细胞标记物,采用同时标记视锥细胞和 VEGFR2 以检测视锥细胞中 VEGFR2 的表达,同时标记视锥细胞和 DAPI 染色标记细胞核以观察视锥细胞形态。步骤如下:将完成 ERG 的小鼠处死后取出眼球,放入 4% 多聚甲醛固定 1 h,剪除角膜和晶体,再放入 4% 多聚甲醛中固定 15 min, PBS 清洗后乙醇梯度脱水,放入二甲苯 I 及二甲苯 II 中透明,浸蜡后包埋,切片 (5  $\mu$ m) 后烤干。石蜡切片置入二甲苯 I 及二甲苯 II 中脱蜡,无水乙醇漂洗后置入梯度乙醇,在 98 $^{\circ}$ C 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液中抗原热修复处理 20 min,自然冷却后漂洗 3 次。滴加山羊血清后湿盒温育 1 h, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育一抗,阴性对照组使用 PBS 代替一抗,次日洗涤 3 次后室温孵育二抗 1 h,加入含抗淬灭剂的 DAPI 封片,使用荧光显微镜观察并计数视锥细胞内节阳性细胞数量。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计学分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间多重比较采用 Dunnett *t* 检验。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 正常条件下 VEGFR2 在 KO 小鼠和 WT 小鼠视网膜中的表达 VEGFR2 大量表达于 WT 小鼠

视锥细胞的内节(图 1A),而 KO 小鼠视锥细胞内节仅见少量 VEGFR2 表达(图 1B);KO 小鼠视锥细胞

表达 VEGFR2 约为 WT 小鼠的 15.3%,差异有统计学意义( $P=0.0021$ ,图 1C)。

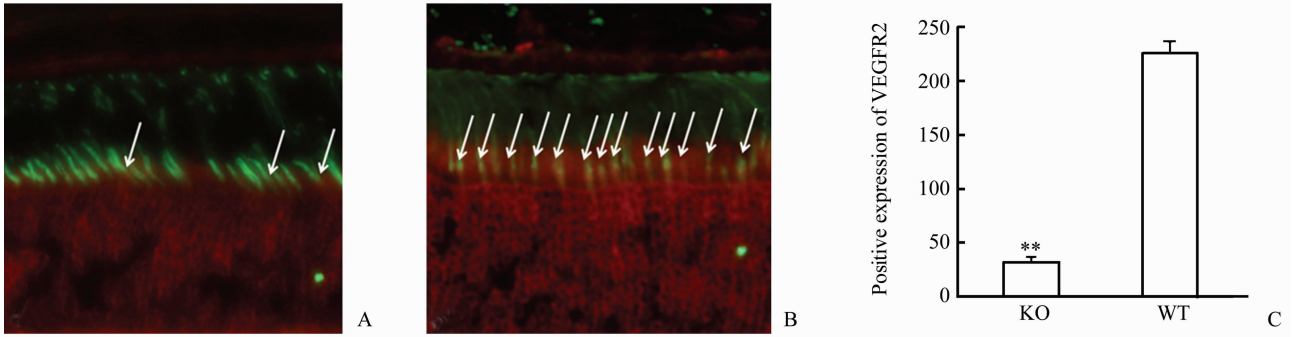


图 1 正常条件下 VEGFR2 在 KO 小鼠和 WT 小鼠视网膜中的表达

Fig 1 Retinal VEGFR2 expression in KO and WT mice under normal condition

A,B: Immunocolocalization image of cone-specific VEGFR2 knockout (KO) mice and wildtype (WT) mice. The white arrows signified the expression of VEGFR2 in cone inner segment. Green: Peanut agglutinin (PNA); Red: Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2). Original magnification:  $\times 400$ . C: VEGFR 2 expression.  $** P<0.01$  vs WT.  $n=6, \bar{x} \pm s$

2.2 缺氧条件下 KO 小鼠和 WT 小鼠 ERG 改变

KO 小鼠和 WT 小鼠缺氧侧眼的暗适应 ERG 的 a 波及 b 波振幅与各自的 PBS 对照侧眼球相比均明显下降( $P<0.01$ ),但 KO 小鼠和 WT 小鼠之间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ,图 2);KO 小鼠和 WT 小鼠缺氧侧眼的明适应 ERG a 波及 b 波振幅均较 PBS 对照侧眼球明显下降  $P<0.01$ ),且 KO 小鼠与 WT 小鼠相比下降更明显,差异有统计学意义

( $P<0.05, P<0.01$ ,图 3)。

2.3 缺氧条件下 KO 小鼠和 WT 小鼠的视锥细胞形态及密度改变 KO 小鼠和 WT 小鼠缺氧侧眼的视锥细胞均发生了变化,与其各自的 PBS 对照侧相比其视锥细胞外节密度下降,形态也较为短小,排列疏松、紊乱,且 KO 小鼠的这种改变较 WT 小鼠更为显著(图 4)。

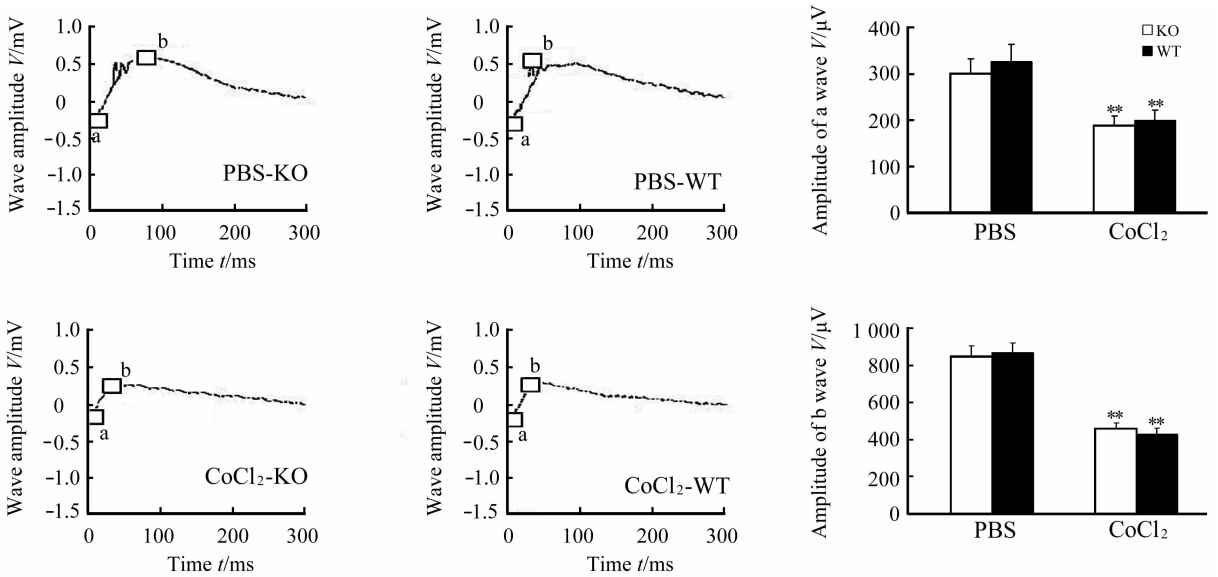


图 2 KO 小鼠和 WT 小鼠在正常及缺氧条件下暗适应视网膜电图

Fig 2 Scotopic electroretinogram findings of cone-specific VEGFR2 knockout (KO) mice and wildtype (WT) mice under normal and hypoxia conditions

$** P<0.01$  vs PBS.  $n=6, \bar{x} \pm s$

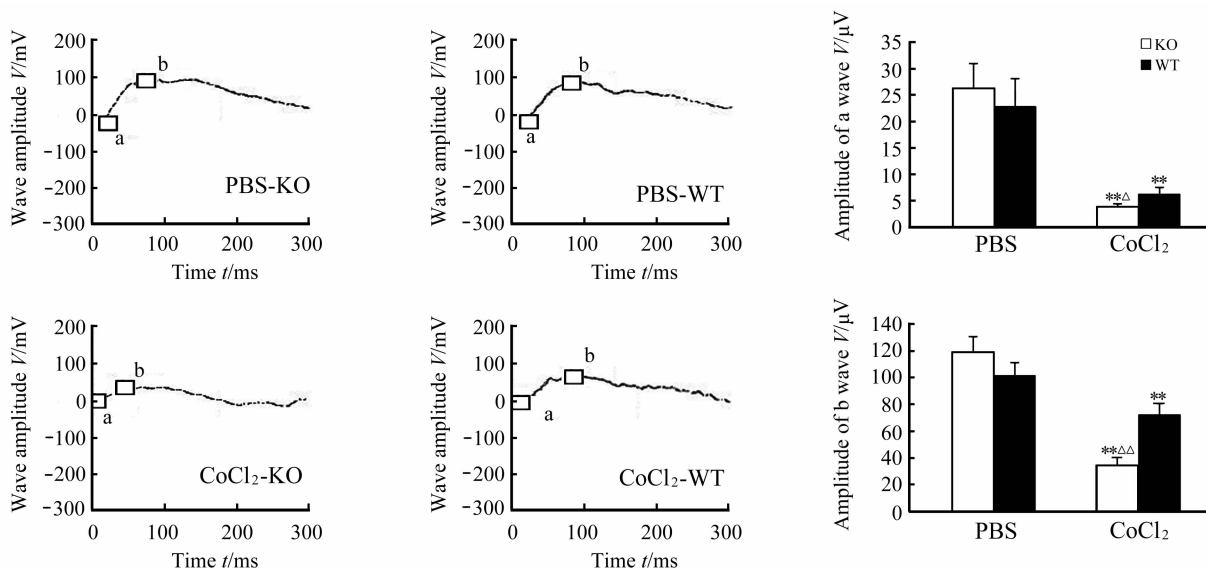


图 3 KO 小鼠和 WT 小鼠在正常及缺氧条件下明适应视网膜电图

Fig 3 Photopic electroretinogram findings of cone-specific VEGFR2 knockout (KO) mice and wildtype (WT) mice under normal and hypoxia conditions

\*\*  $P < 0.01$  vs PBS;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs WT.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

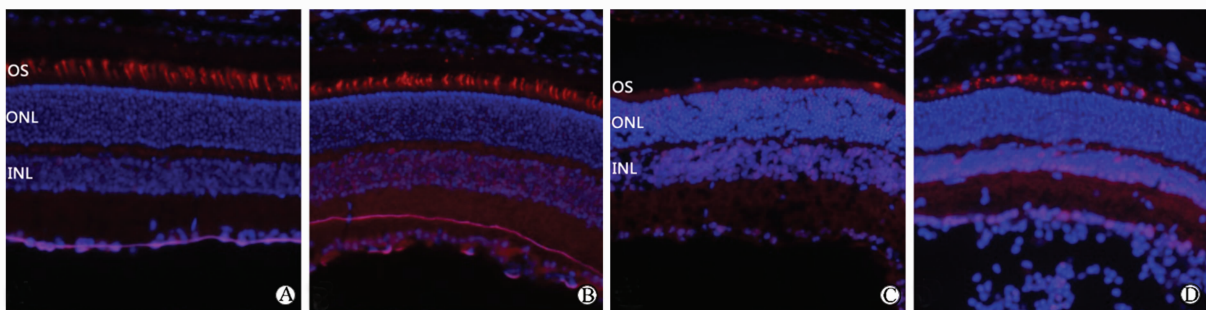


图 4 KO 小鼠和 WT 小鼠在正常及缺氧条件下视锥细胞的形态学改变

Fig 4 Cone photoreceptor morphology changes in cone-specific VEGFR2 knockout (KO) mice and wildtype (WT) mice under normal and hypoxia conditions

A: PBS-KO; B: PBS-WT; C: CoCl<sub>2</sub>-KO; D: CoCl<sub>2</sub>-WT. OS: Outer segment; ONL: Outer nuclear layer; INL: Inner nuclear layer. Red; Peanut agglutinin (PNA); Blue; 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Immuno-colocalization. Original magnification:  $\times 400$

### 3 讨论

DR 是主要的致盲性眼病之一, 研究发现 DR 患者血液循环阻力增高、血流速度下降、灌注不良导致视网膜组织缺血缺氧, 进而造成视网膜神经元等的损伤<sup>[5]</sup>。因此探讨缺氧条件下视网膜组织的病理改变有助于研究 DR 的发病机制。最常用于模拟低氧环境的化学药物是 CoCl<sub>2</sub>, 其原理在于阻止细胞内的呼吸链传递, 造成细胞的化学缺氧<sup>[6-7]</sup>。玻璃体腔内注射 CoCl<sub>2</sub> 是其衍生而来新兴的模拟视网膜组织缺氧的体内试验研究方法, 较链脲佐菌素腹腔注射

建立糖尿病模型周期短, 操作更便捷。国外学者曾在大鼠玻璃体腔中使用注射不同浓度的 CoCl<sub>2</sub> 去探讨其诱导缺氧的最佳浓度, 结果发现 3 mmol/L 效果最好<sup>[7]</sup>, 而本研究发现在小鼠中 8 mmol/L 浓度诱导急性缺氧环境效果最佳, 由于我们实验目的在于观察视锥细胞在缺氧条件下的损伤, 且 CoCl<sub>2</sub> 模拟的视网膜缺氧环境最早发生结构破坏的即为光感受器层, 故采取隔日实验的方法。

VEGF 在糖尿病微血管病变中起着重要作用<sup>[8]</sup>, 抑制 VEGF 活性如玻璃体腔注射 VEGF 抗体在临床中也取得了一定的疗效<sup>[9]</sup>。但近年来 DR 病

程中神经退行性变逐渐得到重视,DR的治疗不应仅针对微血管病变,神经保护治疗同样重要<sup>[10]</sup>。由于VEGF还具有神经保护作用,因此VEGFR可能会降低这种保护作用而损伤神经视网膜,深入研究VEGF的神经保护作用可能为将来开发新的DR药物提供实验依据。如前所述,由于VEGF需与VEGFR结合才激活,VEGFR可成为研究的靶点之一。VEGFR2是VEGF受体家族的重要一员,López-Aguilera等<sup>[11]</sup>发现在高浓度氮气模拟缺氧环境下新生的大鼠中,VEGFR2可通过与血管紧张素受体2相互作用而对新生脑细胞产生保护效应。然而目前国内外对VEGFR2在视网膜光感受器中的作用方面报道较少,本实验运用KO小鼠,观察在缺氧条件下VEGFR2对视网膜光感受器的视锥细胞是否同样具有保护作用。

ERG是一种记录视网膜受到闪光刺激后产生的电位的技术,由于该电位可以从角膜表面被无创记录下,故常用于研究视网膜功能<sup>[12]</sup>,ERG包括暗适应弱光刺激时的反应(来源于视杆细胞)和明适应白色标准闪光刺激时的反应(来源于视锥细胞),我们观察到正常条件下KO小鼠的ERG并无明显改变,说明敲除VEGFR2在正常条件下并未对视锥细胞功能产生影响。但在注射CoCl<sub>2</sub>后与WT小鼠相比,暗适应ERG波幅下降幅度无明显差异,但明适应ERG较WT小鼠下降明显,表明其视锥细胞功能明显降低。在完成功能评估后,我们采用视锥细胞标记物—PNA行免疫荧光共定位观察其结构的改变,结果发现CoCl<sub>2</sub>注射后的缺氧环境下视网膜视锥细胞均发生了显著的变化,其外节密度下降,形态也较为短小,排列疏松、紊乱,且KO小鼠的改变更为明显。

综上所述,我们的研究表明在CoCl<sub>2</sub>诱导的急性缺氧环境下,KO小鼠其视锥细胞损伤较WT小鼠更为严重,而VEGFR2的缺失正是造成视锥细胞功能及解剖结构均下降的原因。该结果提示在缺氧应激条件下VEGFR2对视锥细胞中起着保护作用,但其背后的机制有待进一步研究。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 李筱荣,黎晓新,惠延年. 糖尿病眼病[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:131-212.
- [2] Gupta N, Mansoor S, Sharma A, Sapkal A, Sheth J, Falatoonzadeh P, et al. Diabetic retinopathy and VEGF[J]. *Open Ophthalmol J*, 2013, 7: 4-10.
- [3] Li X. VEGF-B: a thing of beauty[J]. *Cell Res*, 2010, 20: 741-744.
- [4] Ferrara N, Gerber H P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors[J]. *Nat Med*, 2003, 9: 669-676.
- [5] Arden G B, Sivaprasad S. Hypoxia and oxidative stress in the causation of diabetic retinopathy[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2011, 7: 291-304.
- [6] 王国红,毕凌云,李超堃,侯软玲,尹雅玲,李东亮. 氯化钴诱导化学缺氧对N9小胶质细胞的损伤作用及机制[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29: 557-562.
- [7] Hara A, Niwa M, Aoki H, Kumada M, Kunisada T, Oyama T, et al. A new model of retinal photoreceptor cell degeneration induced by a chemical hypoxia-mimicking agent, cobalt chloride[J]. *Brain Res*, 2006, 1109: 192-200.
- [8] Giuliani G P. Diabetic retinopathy: current and new treatment options[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2012, 8: 32-41.
- [9] Ip M S, Domalpally A, Hopkins J J, Wong P, Ehrlich J S. Long-term effects of ranibizumab on diabetic retinopathy severity and progression[J]. *Arch Ophthalmol*, 2012, 130: 1145-1152.
- [10] Villarreal M, Ciudin A, Hernández C, Simó R. Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy[J]. *World J Diabetes*, 2010, 1: 57-64.
- [11] López-Aguilera F, Plateo-Pignatari M G, Biaggio V, Ayala C, Seltzer A M. Hypoxic preconditioning induces an AT2-R/VEGFR-2 (Flk-1) interaction in the neonatal brain microvasculature for neuroprotection [J]. *Neuroscience*, 2012, 216: 1-9.
- [12] Stophen J. Ryan. 视网膜[M]. 4版. 黎晓新,赵家良主译. 天津:天津科技翻译出版公司,2011:105-137.

[本文编辑] 张建芬,孙岩