

视网膜新生血管模型中 CD105 的表达

李娟¹, 李立^{1*}, 汤永强¹, 王强²

(1. 重庆医科大学附属第二医院眼科, 重庆 400010; 2. 第三军医大学大坪医院高压氧科, 重庆 400042)

[摘要] **目的:**通过高氧诱导 C57BL/6J 小鼠视网膜新生血管动物模型, 观察 CD105 在视网膜新生血管中的表达。 **方法:**取出生后 7 d 的 C57BL/6J 小鼠 40 只, 随机分为正常对照组和高氧组, 每组 20 只。采用高氧诱导视网膜新生血管建立动物模型, H-E 染色观察小鼠视网膜新生血管的情况, 免疫组化方法观察 CD105 在小鼠视网膜中的表达。 **结果:**H-E 染色结果表明, 小鼠视网膜新生血管模型建立成功。高氧组小鼠 CD105 显著表达, 积分光密度为 $(9\ 985.63 \pm 1\ 016.28)$ /鼠, 阳性染色面积为 $(14\ 246.61 \pm 6\ 052.29)$ μm^2 /鼠, 而正常对照组仅有微弱表达 [积分光密度为 $(1\ 625.36 \pm 638.44)$ /鼠, 阳性染色面积为 $(3\ 619.31 \pm 1\ 760.03)$ μm^2 /鼠], 两组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。 **结论:**CD105 在视网膜新生血管形成中可能有一定作用, 其检测对于视网膜新生血管的定性、定量评估及治疗具有一定临床意义。

[关键词] CD105; 视网膜疾病; 视网膜新生血管化

[中图分类号] R 774.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)02-0166-04

Expression of CD105 in oxygen-induced retinal neovascularization models in mice

LI Juan¹, LI Li^{1*}, TANG Yong-qiang¹, WANG Qiang² (1. Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China; 2. Department of Hyperbaric Oxygen, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression of CD105 in oxygen-induced retinopathy (OIR) in C57BL/6J mice. **Methods:** Forty 7-day old C57BL/6J mice were evenly randomized into normal control group and hyperbaric oxygen group. The OIR model was induced with hyperbaric oxygen; the retinal neovascularization was observed by H-E staining and the expression of CD105 in OIR was observed by immunohistochemistry staining. **Results:** H-E staining indicated that the retinal neovascularization model was successfully established. CD105 was strongly expressed in the hyperbaric oxygen group, with the integral photodensity of angiogenesis being $9\ 985.63 \pm 1\ 016.28$ per mouse and the positive staining area being $(14\ 246.61 \pm 6\ 052.29)$ μm^2 per mouse; CD105 was weakly expressed in the control group with the integral photodensity of angiogenesis being $1\ 625.36 \pm 638.44$ per mouse and the positive staining area being $(3\ 619.31 \pm 1\ 760.03)$ μm^2 per mouse; the differences between the 2 groups were statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion:** CD105 may play a role in the retinal neovascularization; detection of CD105 might be valuable in evaluating retinal neovascularization and the subsequent treatment.

[KEY WORDS] CD105; retinal diseases; retinal neovascularization

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(2): 166-169]

视网膜新生血管形成是糖尿病性视网膜病变、早产儿视网膜病变, 视网膜中央或分支静脉阻塞等缺血、缺氧性眼疾病导致视力丧失的重要原因。CD105 是与增殖相关的内皮细胞膜上的抗原, 也是调节转化生长因子- β (TGF- β)受体复合物的一个组成部分。它调节内皮-间质的信号传递, 是血管生成所必需的。本实验用高浓度氧诱导 C57BL/6J 幼鼠建立视网膜新生血管病变动物模型, 观察 CD105 在新生血管组织中的表达。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 日龄 7 d 的 C57BL/6J 清洁级幼鼠 40 只, 雌雄不限, 体质量 4~5 g; 哺乳母鼠; 成年鼠 8 只。均由重庆医科大学动物中心提供。主要生

化试剂: CD105 购自 eBioscience 公司, 二抗购自 KPL 公司, DAB 购自北京中杉公司。

1.2 动物模型的建立 参照 Smith 等^[1]的方法, 将 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组 20 只(共 40 只眼)和高氧组 20 只(共 40 只眼)。后者与母鼠一起放入含氧体积分数为 $(75 \pm 5)\%$ 的饲养箱中, 孵育温度维持在 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, 用氧气分析仪监测并调控箱内氧气含量。当幼鼠日龄 12 d 时放回正常室内空气饲养, 这时造成小鼠视网膜相对缺氧。正常组幼鼠与成年鼠一同置于空气中饲养 10 d。于幼鼠日龄 17 d 时处死所有幼鼠与成年鼠。

[作者简介] 李娟, 硕士生. E-mail: lj340@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: eye27@163.com

1.3 检测小鼠视网膜新生血管的情况

1.3.1 H-E染色 处死幼鼠,摘眼球。4%多聚甲醛磷酸缓冲液,4℃固定24 h。作6 μm厚的连续切片,每只眼选10片作石蜡切片的H-E染色,光学显微镜下计数突破内界膜的新生血管内皮细胞核数,计算各组内皮细胞核平均数。

1.3.2 冰冻切片染色 幼鼠及成年鼠处死后迅速取下眼球,OCT包埋,-80℃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。4%多聚甲醛固定液覆盖切片20 min,PBS洗涤。3% H₂O₂/甲醇孵育10 min灭活内源性过氧化物酶。滴加正常血清封闭液,孵育15 min。滴加CD105一抗(1:50),置4℃冰箱孵育16~18 h,PBS洗涤。滴加生物素化山羊抗大鼠二抗(1:50),孵育15 min。滴加卵白素工作液S-A/HRP,DAB显色,镜下控制反应时间5~30 min。蒸馏水洗涤终止反应。苏木精复染,乙醇脱水,二甲苯透明,封片。同轴显微镜检查,Image-Pro Plus (Media Cybernetics,美国)软件测量视网膜新生血管中CD105的积分光密度及阳性染色面积。

1.4 统计学处理 统计分析应用SPSS 13.0软件包作*t*检验。

2 结果

2.1 H-E染色检测幼鼠视网膜新生血管的情况 光学显微镜下,各组视网膜新生血管的计数观察发现:正常组仅在极少数切片中见到突破内界膜的血管内皮细胞核(图1A),平均每张切片为(0.26±0.12)个。高氧组每张切片可见较多的突破内界膜的血管内皮细胞核(图1B),发生率为100%,平均每张切片突破内界膜血管内皮细胞核个数为(36.33±1.66)个。高氧组与正常组比较具有统计学差异($P<0.01$),表明模型建立成功。

2.2 免疫组化方法检测幼鼠及成年鼠视网膜CD105的表达 正常C57BL/6J成年鼠视网膜CD105几乎没有表达(图2A),其积分光密度为(48.72±0.65)/鼠,阳性染色面积为(106.84±15.20) μm²/鼠;正常组日龄17 d幼鼠视网膜CD105染色显示视网膜各层排列较整齐,从内丛状层到神经纤维层有少量毛细血管,但是没有延伸到内界膜以上(图2B),其积分光密度为(1 625.36±638.44)/鼠,阳性染色面积为(3 619.31±1 760.03) μm²/鼠;高氧组幼鼠视网膜前突破内界膜有广泛的DAB阳性染色细胞,提示大量的视网膜新生血管形

成(图2C),积分光密度为(9 985.63±1 016.28)/鼠,阳性染色面积为(14 246.61±6 052.29) μm²/鼠。高氧组与正常组积分光密度及阳性染色面积相比均具有统计学差异($P<0.01$)。

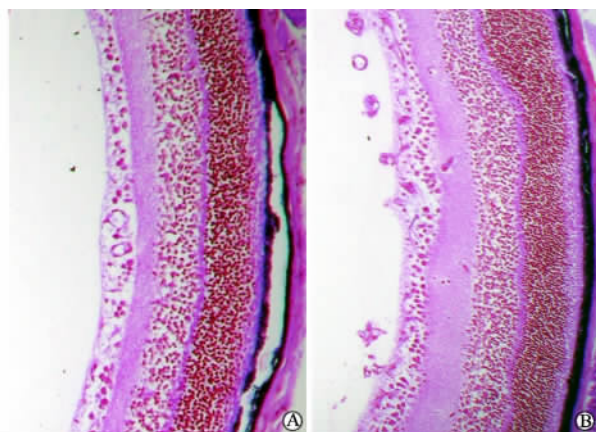


图1 幼鼠视网膜H-E染色

Fig 1 H-E staining of retina in 17-day old mice (×100)

A: Normal control mouse; B: Oxygen-induced retinopathy mouse

3 讨论

血管生成主要见于损伤组织的修复和病理状态(肿瘤、糖尿病性视网膜病变等),视网膜新生血管的形成是个极其复杂的过程,其发生形式属于血管生成,具备这一病理改变的疾病具有相同的特征:视网膜血管的阻塞引起局部的缺血或缺氧。内皮细胞增殖为血管形成的主要步骤。本实验发现:光学显微镜下H-E染色,正常组40只眼,仅极少数可见突出内界膜的新生血管,细胞核数为1个,每只眼视网膜新生血管的平均数为(0.26±0.12)个,而高氧组老鼠每只眼均可见突破内界膜的新生血管,发生率为100%,每只眼视网膜新生血管的平均数为(36.33±1.66)个,两组相比差异具有统计学意义($P<0.01$),表明模型建立成功。

对视网膜新生血管的治疗,临床尚无肯定有效的治疗方法。目前主要是通过激光光凝术、冷凝术或玻璃体切割术,虽然能够挽救一部分人的视力,但其严重的不良反应如黄斑水肿、视野缩小等限制了其应用^[2],探索一种新型的、无损伤的治疗新生血管的方法可能会有更广泛的应用前景。

CD105是相对分子质量为180 000的同源二聚体膜糖蛋白,与转化生长因子TGFβ₁和TGFβ₃有很强的亲和力。Wikstrom等^[3]提出CD105主要在未成熟血管表达。即与一般的血管内皮细胞标记物不同,CD105仅在处于增殖状态的血管内皮细胞(即

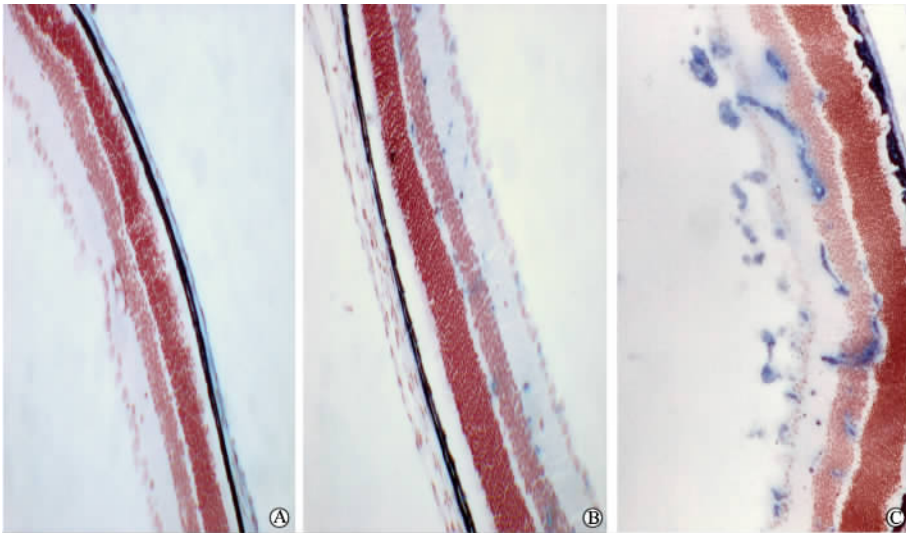


图 2 小鼠视网膜 CD105 的表达

Fig 2 CD105 expression in retina of mice(Immunohistochemistry, ×100)

A: Normal adult mouse; B: Normal 17-day old mouse; C: Oxygen induced retinopathy in 17-day old mouse

新生的血管内皮细胞)上强表达。而在大血管及正常组织血管内皮细胞上呈低表达或不表达^[4]。Warrington 等^[5]也证明,在人和鼠的血管内皮细胞中,CD105 能对抗 TGFβ₁ 的抑制作用,而且正常细胞水平的 CD105 对新血管的生成是必需的。这种表达特点说明,CD105 是内皮细胞增殖的相关标记物,其能区分新生与非新生血管,避免结果中假阳性的错误,能较为准确地评价新生血管的生成能力。研究发现,缺氧激活了 CD105 的基因启动子,增加了 mRNA 转录和蛋白质翻译,从而诱导了内皮细胞 CD105 的显著表达,表明 CD105 是在转录水平对缺氧做出应答。因此可以推测缺氧诱导的新生血管是通过内皮细胞 CD105 的表达而实现的^[6]。缺氧可有效刺激 CD105 基因的表达,当缺氧与 TGF-β₁ 共同作用时此作用加强。在缺氧条件下,增加的 CD105 对内皮细胞有自身保护作用^[7]。

本实验免疫组化结果表明,正常成年 C57BL/6J 鼠 CD105 几乎无表达,正常空气组小鼠 CD105 仅有弱表达,推测可能是因为新生小鼠的生长需要,血管增生能力较强所引起的。高氧组小鼠在从高氧舱移入正常空气中后,闭塞的血管不能适应组织对氧的需求,新生血管形成,其 CD105 表达较正常对照组明显增加,两组差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

基于 CD105 可以作为血管生成的较特异的标记物,同样 CD105 也可以作为抗血管生成治疗的靶点,这一特性为我们治疗视网膜新生血管形成性疾病提供了新的思路。据报道,抗 CD105 的抗体能与血管组织中的内皮细胞优先反应^[8]。Li 等^[9]证明用

反义寡脱氧核苷酸和 TGFβ₁ 一起抑制内皮细胞 CD105 的表达,可以引起血管生长的强烈抑制。Takahashi 等^[10]认为抗 CD105 的单克隆抗体可强烈抑制人内皮细胞的增殖从而抑制血管增生。随着对抗 CD105 制剂的深入研究,一旦将其成功运用于临床,将是广大眼新生血管患者的福音。

志谢:感谢第三军医大学附属第二医院马千里老师对本研究 Image-Pro Plus 图像分析方面的指导,以及重庆医科大学附属第二医院病理科马英老师对本研究病理学方面的指导!

[参考文献]

[1] Smith L E, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 1994, 35:101-111.
 [2] Miller J W. Vascular endothelial growth factor and ocular neovascularization[J]. Am J Pathol, 1997, 151:13-23.
 [3] Wikstrom P, Lissbrant I F, Stattin P, et al. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer[J]. Prostate, 2002, 51:268-275.
 [4] Li C, Guo B, Wilson P B, et al. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer[J]. Int J Cancer, 2000, 89:122-126.
 [5] Warrington K, Hillarby M C, Li C, et al. Functional role of CD105 in TGF-beta1 signalling in murine and human endothelial cells[J]. Anticancer Res, 2005, 25(3B): 1851-1864.
 [6] Li C, Issa R, Kumar P, et al. CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells[J]. J Cell Sci, 2003, 116:2677-2685.
 [7] Duff S E, Li C, Garland J M, et al. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications[J]. FASEB J, 2003, 17:984-992.

- [8] Yao Y, Kubota T, Takeuchi H, et al. Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: Comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody[J]. *Neuropathology*, 2005, 25: 201-206.
- [9] Li C, Hampson I N, Hampson L, et al. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor 1 on human vascular endothelial cells[J]. *FASEB J*, 2000, 14: 55-64.

- [10] Takahashi N, Haba A, Matsuno F, et al. Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 7846-7854.

[收稿日期] 2006-10-21

[修回日期] 2007-01-12

[本文编辑] 孙岩

· 个案报告 ·

奥沙普秦联用头孢拉定致尖端扭转型室性心动过速一例报告

Oxaprozin combined with cefradine causing torsade de pointes: a case report

高琳, 梁春, 陈金明, 廖德宁, 吴宗贵*

(第二军医大学长征医院心血管内科, 上海 200003)

[关键词] 奥沙普秦; 头孢拉定; 心律失常, 室性; 心动过速

[中图分类号] R 541.71

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2007)02-0169-01

1 临床资料 患者,男,39岁,因“反复发作性晕厥1d”于2006年4月11日入院。患者于2006年3月29日因“网球肘”在当地医院行“小针刀”治疗,术后服用“头孢拉定2片,3次/d”及“诺松(奥沙普秦)2片,2次/d”共7d。2006年4月7日上午,患者突感黑朦,随后意识丧失、摔倒、大小便失禁,持续约1min后苏醒。20min后,再次出现上述症状,持续约1min后苏醒,即到当地医院就诊,急查血电解质“血钾3.27mmol/L、肌钙蛋白阴性”,心电图未见异常。予静滴钾、镁及心电监护等处理。当天下午3:00,患者再次发生晕厥,心电监护提示“尖端扭转型室性心动过速(Tdp)蜕变为室颤”,予直流电复律转复为窦性心律后苏醒。此后,上述症状未再发作。患者为明确诊断及进一步治疗转入我院。患者自诉有“强直性脊柱炎”病史3年。否认家族中有类似疾病者及其他家族遗传性疾病。

入院体检血压105/60mmHg(1mmHg=0.133kPa),双肺呼吸音清,心界无明显扩大,心率68次/min,律齐,各瓣膜听诊区未及杂音。腹软,无压痛及反跳痛,肝脾未及。双下肢不肿。入院后查血、尿、粪常规,出凝血时间,C反应蛋白(CRP)及抗“O”均在正常范围;心肌酶及肌钙蛋白检查未见明显异常,电解质检查示血钠133.6mmol/L,血钾4.54mmol/L,红细胞沉降率16mm/1h;头颅CT、胸部平片正常;腹部B超提示胆囊息肉;心脏彩超提示左心房内径(LAD)35.2mm,左心室内径(LVD)53.9mm,左心室射血分数(LVEF)70%,二尖瓣轻度反流;心电图QT间期0.42s。停用奥沙普秦及头孢拉定14d后上述症状未再发,行心脏电生理检查,结果显示:窦性心律,RR间期0.78s,QRS时间85ms,QT间期380ms,右心室S₁S₂程序刺激(500/360ms、430/350ms),测得心室有效不应期220ms。于430/350ms

及430/290ms时诱发连续两个室性早搏,未诱发出心动过速,静滴异丙肾上腺素,使心率达130次/min,反复心室S₁S₁、S₁S₂刺激均未诱发室速,将电极置于右室流出道,重复上述检查均未诱发出心动过速。术后予门冬氨酸钾镁片及美托洛尔(倍他乐克12.5mg 2/d)口服。术后随访5个月,无晕厥、黑朦发作。

2 讨论 奥沙普秦(4,5-二苯基唑-2-丙酸)是非甾体类抗炎药,其主要作用是抑制环氧化酶(COX-2)的活性。该类药可与碳酸酐酶结合,抑制碳酸酐酶,具有一定的利尿作用。此药主要通过胞质还原酶灭活,而体内醛固酮代谢也依赖于胞质还原酶。因此,奥沙普秦会竞争醛固酮的代谢酶,导致体内醛固酮含量增多^[1]。已有报道^[2]证实头孢拉定可引起Tdp,具体原因不明。本例为中青年男性患者,突发Tdp,经各项检查均未发现有器质性心脏疾病,考虑可能与低血钾有关。患者无腹泻、无营养代谢障碍、也无其他诱发低血钾的诱因,考虑可能与其服用头孢拉定及奥沙普秦有关。因此,在服用COX-2类药物时,应密切监测血钾、心电图及Q-T间期的变化,并慎与头孢类抗生素合用。

[参考文献]

- [1] 刘肖平. 特异性COX-2抑制药临床应用安全性新动态[J]. *实用疼痛学杂志*, 2005, 1: 66-69.
- [2] 袁 巩, 陶 杰, 袁一琳, 等. 头孢环己烯致药物性尖端扭转型室速一例[J]. *上海医学*, 1997, 20: 496.

[收稿日期] 2006-09-28

[修回日期] 2007-01-10

[本文编辑] 贾泽军

[作者简介] 高琳, 硕士生. E-mail: cutegaolin@163.com

* Corresponding author. E-mail: zgwu@medmail.com.cn