



DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.09.013

<http://xbyx.xysm.net/xbwk/fileup/PDF/201309944.pdf>

血小板反应蛋白-1在氧诱导小鼠视网膜病变模型中的表达及意义

易果果¹, 谭浅², 汪澎³, 蒋剑², 刘丹²

(1. 湖南省怀化医学高等专科学校护理系, 湖南 怀化 418099; 2. 中南大学湘雅医院眼科, 长沙 410008;
3. 重庆医科大学附属第一医院眼科, 重庆 400016)

[摘要]目的: 检测血小板反应蛋白-1 (thrombospondin-1, TSP-1) 在氧诱导视网膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 模型小鼠视网膜中的表达, 探讨其在视网膜新生血管中的作用。**方法:** 随机选取7日龄C57BL/6J新生小鼠40只, 分为模型组($n=20$)及正常对照组($n=20$)。模型组小鼠通过高氧诱导的方法建立OIR模型。于小鼠出生后第7, 9, 11天时两组各随机抽取5只小鼠, 取视网膜组织采用RT-PCR法检测TSP-1 mRNA的表达水平; 并于小鼠出生后第11天时两组随机取5只小鼠, 运用荧光造影视网膜铺片对视网膜新生血管进行形态学观察。**结果:** 出生后第11天时, 正常组小鼠视网膜铺片显示视网膜血管分布呈均匀的网状结构, 而模型组小鼠视盘周围可见大片无灌注区, 视网膜大血管扩张, 仅在周边见少量毛细血管分布, 为典型的OIR早期表现。出生后第7天, 模型组与对照组小鼠视网膜组织中TSP-1 mRNA表达水平差异无统计学意义($P>0.05$); 出生后第9天, 模型组小鼠视网膜组织中TSP-1 mRNA表达水平下降($P<0.05$); 出生后第11天模型组小鼠视网膜组织中TSP-1 mRNA表达水平明显低于正常组($P<0.01$), 且较第9天模型组亦下降($P<0.05$)。**结论:** 在新生小鼠OIR模型视网膜血管生长发育抑制期, 视网膜组织中TSP-1 mRNA的表达逐渐下降, 提示TSP-1可能作为负调节因子在早期参与视网膜新生血管的形成过程。

[关键词] 血小板反应蛋白-1; 氧诱导视网膜病变; 视网膜血管生长发育抑制期

Expression and significance of thrombospondin-1 in oxygen-induced retinopathy in mice

YI Guoguo¹, TAN Qian², WANG Peng³, JIANG Jian², LIU Dan²

(1. Department of Nursing, Huaihua Medical College, Huaihua Hunan 418099;

2. Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008;

3. Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

ABSTRACT

Objective: To examine the expression and function of thrombospondin-1 (TSP-1) in oxygen-induced retinopathy in new-born mice, and to investigate its role in retinal neovascularization.

Methods: A total of 40 C57BL / 6J newborn mice were divided equally into a model group ($n=20$)

收稿日期(Date of reception): 2012-12-21

作者简介(Biography): 易果果, 硕士, 医师, 主要从事眼科学研究。

通信作者(Corresponding author): 谭浅, Email: tanqianxy99@yahoo.com

基金项目(Foundation item): 湖南省科技厅科技计划项目(2012fj4353)。This work was supported by Science and Technology Plan Project of Science and Technology Department of Hunan Province, P. R. China (2012fj4353).

and a normal control group ($n=20$). Mice in the model group were exposed to 75% oxygen to establish the oxygen-induced retinopathy (OIR) model. On the 7th, 9th, and 11th day after the birth of mice, 5 mice were randomly selected each time from the 2 groups to examine the expression of TSP-1 mRNA with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). After that, 5 mice were selected on the 11th day to observe the retinal neovascularization by fluorescein angiography retinal flatmount.

Results: On the 11th day, fluorescein angiography retinal flatmount showed that the retinal blood vessels presented mean network distribution in the normal control group, while in the model group, a lot of dilatated areas in the retinal main vessels surrounded the optic disc. Meanwhile lots of new blood vessels were found surrounding the optic disc with irregular distribution but well distributed peripheral retinal small vessels, which was typical of early stage OIR. There was no significant difference in the retinal TSP-1 mRNA level between the model group and the normal control group in the postnatal 7-day mice ($P>0.05$). Compared with the normal control group, the expression of TSP-1 mRNA in the model group was significantly lower in postnatal 9-day and 11-day mice ($P<0.05$, $P<0.01$), and the expression of TSP-1 mRNA in postnatal 9-day mice was lower than that in the postnatal 11-day mice ($P<0.05$).

Conclusion: In the early stage of OIR model (retinal vascular growth and development stage), the expression of TSP-1 mRNA in the retinal tissue is gradually decreased, implying that TSP-1 (as a negative regulatory factor) may be involved in the formation of retinal neovascularization in the early stage.

KEY WORDS

thrombospondin-1; oxygen-induced retinopathy; retinal neovascularization

1971年由Barnziger等^[1]首次从凝血酶刺激后的血小板细胞膜中分离出血小板反应蛋白-1(thrombospondin-1, TSP-1), 作为第一个被发现的内源性多肽类新生血管抑制剂, TSP-1的抑制血管新生及抗肿瘤作用引起广泛的关注。新生小鼠的氧诱导视网膜病变的制备类似于早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP), 但其在病理上可分为两期, 即病理I期(视网膜血管生长发育抑制期)、病理II期(视网膜新生血管增生期)^[2]。目前尚没有关于视网膜血管生长发育抑制期TSP-1表达水平的研究报道。本实验通过高氧诱导C57BL/6J小鼠建立氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)模型, 检测模型鼠视网膜中TSP-1 mRNA在OIR视网膜血管生长发育抑制期的表达水平, 探讨TSP-1 mRNA表达的变化与视网膜新生血管形成早期的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验选用中南大学动物实验中心提供的C57BL/6J小鼠; 右旋糖苷异硫氰酸荧光素(FITC-dextran)(美国Sigma公司); TRIzol裂解液(美国

Invitrogen公司); 反转录及cDNA合成试剂盒(立陶宛Fermatas公司)。

1.2 实验分组及模型

选取7日龄C57BL/6J新生小鼠40只, 雌雄不限, 与母鼠一起饲养至当日龄。采用随机数字表法将40只小鼠分为模型组($n=20$)及正常对照组($n=20$)。参照Smith等^[3]的方法建立新生小鼠OIR动物模型。将7日龄新生小鼠连同哺乳母鼠一同放入密闭氧箱吸入高氧5 d, 氧箱氧气浓度控制在(75±2)%, 温度控制在(23±2)℃, 每两天更换垫料, 添加饲料、水及替换母鼠。

1.3 实验方法

1.3.1 荧光素心脏灌注视网膜铺片

出生后第11天的正常对照组小鼠(5只)及模型组小鼠(5只)腹腔内注射麻醉剂1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)后, 打开胸腔, 抽取已配置好的异硫氰酸荧光素葡聚糖FITC-Dextran (50 mg:1 mL 4%多聚甲醛)0.5 mL, 用1 mL注射器灌注左心室后, 迅速摘除眼球, 置于40 g/L多聚甲醛中过夜, 显微镜下视网膜铺平, 荧光显微镜下观察视网膜血管结构。

1.3.2 RT-PCR 检测 TSP-1 mRNA 的表达水平

取出生后第7, 9, 11天正常对照组小鼠(各时间点5只)及模型组小鼠(各时间点5只)视网膜总RNA, 采用RT-PCR检测视网膜组织中TSP-1 mRNA的表达水平。

1.3.2.1 视网膜总 RNA 的提取

新鲜视网膜组织置于 -70°C 保存。冷冻视网膜组织取出加入TRIzol 1 mL, 并转移到匀浆器中, 将匀浆器置于冰上研磨, 转移研磨好的液体到无RNA酶和无DNA酶的1.5 mL离心管中, 然后加入0.2 mL氯仿, 冰上温和震荡5 min后, 4°C 低温离心(12000 r/min, 15 min); 取上清400 μL 于另一新鲜的1.5 mL离心管, 加入等体积异丙醇, 颠倒、混匀后冰上置10 min, 再次 4°C 低温离心(12000 r/min, 10 min); 弃上清, 然后加入无水乙醇750 μL 及焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水250 μL , 4°C 低温离心(8000 r/min, 5 min)后弃上清, 在空气中干燥5 min后加入DEPC水至20 μL 。

1.3.2.2 反转录反应

按反转录试剂盒操作要求将上述总mRNA反转录成cDNA, 产物放入 -20°C 备用。取上述反转录反应产物于25 μL 反应体积中进行PCR反应。反应体积为模板2 μL , 上下游特异性引物各1 μL , 去离子水8.5 μL , PCR反应试剂(混合液)12.5 μL 。TSP-1引物: 上游5'-CCCTGGACTTGCTGTAGGTTATG-3', 下游5'-CTGAGTATCCCTGAGCCCTTGTG-3';

内参照GAPDH引物序列: 上游5'-AAG-CCCATCACCATCTTCCA-3', 下游5'-CCT-GCTTCACCACCTTCTTG-3'; 反应条件: 94°C 预变性5 min, 然后 94°C 30 s, 55°C 40 s, 72°C 45 s, 共35个循环, 最后 72°C 延伸10 min。取5 μL PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳, 同时以DNA标志参照物为分子质量标准。采用凝胶成像系统观察并照相。使用凝胶定量分析软件测定各泳道扩增产物的灰度值。结果以TSP-1与内参照GAPDH mRNA扩增产物的灰度值相对比值表示。

1.4 统计学处理

采用SPSS16.0统计学软件对数据进行分析。数据采用单因素方差分析, 两两之间的比较采用独立样本的t检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光素心脏血管造影视网膜铺片观察视网膜血管形态

正常对照组与模型组比较, 在第11天时, 正常对照组视网膜血管分布均匀, 主要动、静脉以视盘为中心呈放射状形态, 走形清晰, 毛细血管呈网状分布。而模型组小鼠视网膜中央可见大片无灌注区, 视网膜大血管扩张, 仅周边部见少量毛细血管分布(图1)。

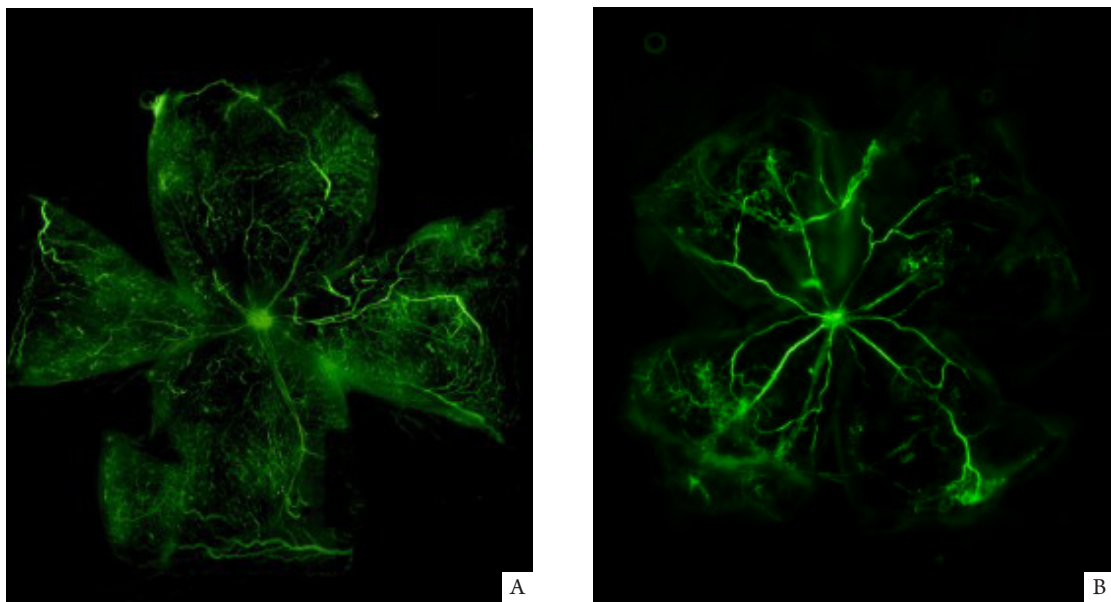


图1 荧光素心脏血管造影视网膜铺片($\times 200$)。A: 正常对照组。视网膜分布呈均匀的网状结构; B: 模型组。视盘周边可见无灌注区, 视网膜大血管扩张, 仅周边部见少量毛细血管分布。

Figure 1 Fluorescein angiography retinal flatmount ($\times 200$). A: Normal control group. The network distribution of the retinal blood vessels is showed; B: Model group. The retinal main vessels surrounding the optic disc are obviously dilatated, there are lots of new blood vessels surrounding the optic disc with irregular distribution, and there are only a few of small vessels in the peripherial of the optic disc.

2.2 RT-PCR 检测 TSP-1 mRNA 的表达结果

正常对照组小鼠视网膜组织中TSP-1 mRNA表达水平第7天、第9天及第11天TSP-1/GAPDH比值分别为 0.00881 ± 0.00012 , 0.00867 ± 0.00010 和 0.00838 ± 0.00013 , 各时间点之间表达差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。模型组小鼠视网膜组织中TSP-1 mRNA表达水平第7天、第9天及第11天TSP-1/GAPDH比值分别为 0.00870 ± 0.00011 , 0.00580 ± 0.00014 和 0.00345 ± 0.00012 , 各时间点之间表达差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。正常对照组小鼠视网膜中可检测到TSP-1 mRNA的表达, 但表达无明显趋势, 模型组小鼠视网膜中TSP-1 mRNA表达呈逐渐下降趋势。出生后第7天时, 刚进氧舱的模型组小鼠视网膜组织中的TSP-1 mRNA表达水平与在空气中饲养的正常对照组小鼠差异无统计学意义($P > 0.05$); 出生后第9天时, 高氧条件下2 d后模型组小鼠视网膜中TSP-1 mRNA的表达

水平较正常对照组小鼠下降, 两者间差异有统计学意义($P < 0.05$); 出生后第11天时, 高氧条件下4 d后模型组小鼠视网膜组织中TSP-1 mRNA的表达水平明显低于正常对照组($P < 0.01$), 与第9天时模型鼠相比也明显下降($P < 0.05$)(图2; 表1)。

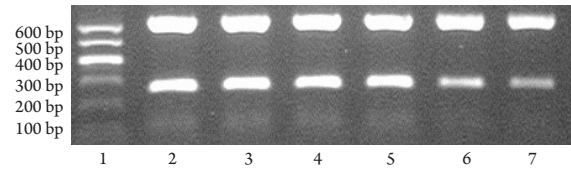


图2 两组小鼠视网膜组织TSP-1 mRNA表达情况。1: DNA标志参照物; 2, 3, 4: 正常对照组第7天、第9天、第11天; 5, 6, 7: 模型组第7天、第9天、第11天。

Figure 2 Expression of TSP-1 mRNA in retinal tissue in the 2 groups. 1: DNA marker; 2, 3, 4: Normal control group on the 7th, 9th, 11th day after birth of mice; 5, 6, 7: Model group on the 7th, 9th, 11th day after birth of mice.

表1 正常对照组与模型组在各时间点TSP-1 mRNA/GAPDH灰度值的比较($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of TSP-1 mRNA/GAPDH grey value in each time between the normal control group and the model group ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	第7天	第9天	第11天
正常对照组	0.00881 ± 0.00012	0.00867 ± 0.00010	0.00838 ± 0.00013
模型组	$0.00870 \pm 0.00011^*$	$0.00580 \pm 0.00014^*$	$0.00345 \pm 0.00012^{\blacklozenge}$

与正常对照组比较, $^*P < 0.05$; 与第9天比较, $^{\blacklozenge}P < 0.05$ 。

3 讨论

TSP-1是一种重要的细胞外基质糖蛋白, 最早是从培养细胞的上清液中分离出的一种新生血管抑制因子, 作为最早被发现且研究最为广泛的TSP成员, TSP-1广泛分布于全身多种组织中, 在眼部主要表达在视网膜色素细胞中, 参与损伤的修复、炎症反应和血管新生等许多病理过程。近年来, 其抗肿瘤、抗血管新生的作用引起了广泛的关注。实验已表明TSP-1可以调控血管内皮细胞的黏附、移行和生长^[4-6], 能影响及调控血管内皮细胞的增殖^[7]、诱导内皮细胞的凋亡^[8], 也被公认为一种有效的内源性血管生成抑制因子。TSP-1 I型重复序列(thrombospondin Type I repeats, TSRs)是其主要功能区域, 可结合CD36、硫酸乙酰肝素糖蛋白及整合素等实现对细胞间接触、轴突生长的调节, 从而抑制内皮细胞的增殖、诱导内皮细胞的凋亡、抑制血管的新生^[9]。TSP-1的重复序列TSRs中的CSVTCG序列、WSHWSPW序列及GVITRIR序列为其抗血管新生的主要活性片段, 它们对成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF-2)及

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)诱导的鼠角膜血管的新生及体外培养的内皮细胞的移行均有不同程度的抑制作用^[5,10-11]。Phelan等^[11]将CD36表达载体转染到CD36缺乏的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)后可使细胞对TSP-1敏感, TSP-1可抑制HUVEC的迁移和管状形成。这说明CD36是TSP-1发挥抗血管新生功能的重要受体。有实验进一步证实TSP-1可以通过激活CD36, p53fyn, caspase-3, p38MAPK途径来诱导血管内皮细胞的凋亡, 激活caspase介导内皮细胞凋亡引起的血管新生机制^[12]。此外, TSP-1介导的内皮细胞凋亡与促凋亡蛋白Bax的高表达、抗凋亡蛋白Bcl2的低表达及caspase的激活有关^[13]。

研究^[14]发现: 糖尿病患者玻璃体液中TSP-1的含量较正常人明显减少, 这很可能导致了视网膜血管新生平衡的转移, 并最终可导致糖尿病视网膜病变的发生。Sheibani等^[15]也认为高糖状态下, TSP-1的下降引起了早期血管功能异常。在高氧诱导的小鼠缺血性视网膜病变模型中, Suzumal等^[16]发现: TSP-1的mRNA水平在出生后的第13天至第19天是增加的, 在P15天时达到高峰, TSP-1的

mRNA水平与视网膜的血管化发展的时间相关。TSP-1的基因被归为立即早期反应基因。在新生小鼠OIR模型中, 出生后第7天的小鼠视网膜血管尚未发育成熟, 持续的高氧使机体产生反射性的视网膜血管普遍收缩, 继而血管广泛闭塞, 此为OIR病理I期; 持续5 d高氧后将小鼠移入正常空气中, 闭塞的血管不能适应视网膜组织对氧的需求, 视网膜内层组织出现持续的缺血、缺氧, 并合成、释放多种促血管生成物质, 如VEGF、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)等, 同时内源性血管生成抑制因子如TSP-1的表达量也增加^[15], 以拮抗促血管生成作用, 此为OIR病理II期^[17]。本实验选择在OIR病理I期即视网膜血管生长发育抑制期检测TSP-1的mRNA表达, 企图在视网膜新生血管发生之前, 血管化尚在启动阶段时观察TSP-1的早期变化。本研究结果表明: 新生鼠出生第7天时, 模型鼠视网膜组织中TSP-1 mRNA表达水平与正常对照组比较差异无统计学意义; 新生鼠出生第9天时, 模型鼠视网膜组织中TSP-1 mRNA表达水平较正常对照组下调; 新生鼠出生第11天时, 此时模型鼠视网膜中央可见大片无灌注区、视网膜大血管扩张, 模型鼠视网膜组织中TSP-1 mRNA表达水平明显低于正常对照组, 且较第9天时模型鼠降低。作者就此初步推测模型鼠在视网膜新生血管发生之前, 就可能已从转录水平降低了TSP-1的表达, 减少了其拮抗血管生成的作用, 打破了血管发生的平衡, 从而导致了新生血管的发生。

综上所述, 通过对本研究的初步结果进行分析, 发现新生小鼠OIR病理I期视网膜组织通过降低TSP-1的转录从而下调TSP-1 mRNA表达水平, 进一步开展针对其具体的信号转导途径及受体的研究, 可为视网膜新生血管性疾病的预防及早期治疗提供新的思路和方法。

参考文献

- Baeniziger NL, Brodic GN, Majerus PW. A thrombin-sensitive protein of human plate membranes[J]. *Pro Natl Acad Sci*, 1971, 68(1): 240-243.
- Van Wijngaarden P, Brereton HM, Coster-DJ. Genetic influences on susceptibility to oxygen induced retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(4): 1761-1767.
- Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(1): 101-111.
- Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, et al. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have antiangiogenic activity[J]. *J Cell Biol*, 1993, 122(2): 497-511.
- Dawson DW, Volpert OV, Pearce SFA, et al. Three distinct D-amino acid substitutions confer potent antiangiogenic activity on an inactive peptide derived from a thrombospondin-1 Type 1 repeat[J]. *Mol Pharmacol*, 1999, 55(2): 332-338.
- Panetti TS, Kudryk BJ, Mosher DF. Interaction of recombinant peocollagen and preperdin modules of thrombospondin-1 with heparin and fibrin[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(1): 403-437.
- Bagavandoss P, Milks JW. Specific inhibition of endothelial cell proliferation by thrombospondin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 170(2): 867-872.
- Nor JE, Mitra RS, Sutorik MM, et al. Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway[J]. *J Vasc Res*, 2000, 37(3): 209-218.
- Risua W, Flamme I. Vasculogenesis[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11: 73-91.
- Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, et al. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have antiangiogenic activity[J]. *J Cell Biol*, 1993, 122(2): 497-511.
- Phelan MW, Forman LW, Perrine SP, et al. Hypoxia increase thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells[J]. *J Lab Clin Med*, 1998, 132(6): 519-529.
- Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, et al. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1[J]. *Nat Med*, 2000, 6(1): 41-48.
- Nyor JE, Mitra RS, Sutorik MM, et al. Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activation the caspase death pathway[J]. *J Vasc Res*, 2000, 37(3): 209-218.
- Wang SJ, Gottlieb JL, Sorenson CM, et al. Modulation of thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor levels in vitreous fluid of patients with diabetes[J]. *Arch Ophthalmol*, 2009, 127(4): 507-513.
- Sheibani N, Sorenson CM, Cornelius LA, et al. Thrombospondin-1, a natural inhibitor of angiogenesis, is present in vitreous and aqueous humor and is modulated by hyperglycemia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 267(1): 257-261.
- Suzumal K, Takagi H, Otani A, et al. Expression of thrombospondin-1 in ischemia-induced retinal neovascularization[J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(2): 343-354.
- van Wijngaarden P, Brereton HM, Coster DJ, et al. Hereditary influences in oxygen-induced retinopathy in the rat[J]. *Doc Ophthalmol*, 2010, 120(1): 87-97.

(本文编辑 傅希文)

本文引用: 易果果, 谭浅, 汪澎, 蒋剑, 刘丹. 血小板反应蛋白-1在氧诱导小鼠视网膜病变模型中的表达及意义[J]. 中南大学学报:医学版, 2013, 38(9): 944-948. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.09.013

Cite this article as: YI Guoguo, TAN Qian, WANG Peng, JIANG Jian, LIU Dan. Expression and significance of thrombospondin-1 in oxygen-induced retinopathy in mice[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2013, 38(9): 944-948. DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.09.013