

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.17.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220407.1042.002.html\(2022-04-07\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220407.1042.002.html(2022-04-07))

EphB4 抑制早产大鼠视网膜病变新生血管的实验研究*

李游¹,陈晓隆²,张玉强^{3△}

(1. 爱尔眼科医院集团锦州爱尔眼科医院,辽宁锦州 121001;2. 中国医科大学附属盛京医院眼科,沈阳 110004;3. 锦州医科大学骨科研究所,辽宁锦州 121001)

[摘要] **目的** 建立大鼠氧诱导视网膜病变模型模拟人类早产儿视网膜病变,研究促红细胞生成肝细胞激酶(Eph)B4/促红细胞生成肝细胞激酶受体相互作用蛋白(Ephrin)B2 对视网膜新生血管形成的影响,以及 EphB4 对视网膜病变新生血管的抑制作用。**方法** 将 80 只新生 SD 大鼠分成模型组、干预组、对照组和正常组,每组 20 只。模型组建立大鼠氧诱导视网膜病变疾病模型,干预组建立氧诱导视网膜病变模型并在玻璃体腔内注射 EphB4,对照组建立大鼠氧诱导视网膜病变模型并于玻璃体腔内注射生理盐水。每组 17 d 后处死并摘取双眼眼球,制作视网膜铺片和视网膜冰冻切片,分别做视网膜血管的 ADP 酶染色和 EphB4/EphrinB2 免疫荧光染色。取视网膜组织进行实时荧光定量 PCR 分析 EphB4 mRNA。**结果** 模型组和对照组视网膜可观察到大量新生血管及视网膜出血,而干预组视网膜的新生血管数量及出血较模型组和对照组明显减少。免疫荧光结果显示模型组和对照组视网膜 EphB4 和 EphrinB2 蛋白呈高表达,干预组 EphB4 和 EphrinB2 表达较模型组和对照组明显减少。实时荧光定量 PCR 显示模型组和对照组大鼠视网膜 EphB4 mRNA 呈高表达,干预组 EphB4 mRNA 低于模型组和对照组($P<0.05$)。**结论** 视网膜新生血管的增殖过程中 EphB4/EphrinB2 表达过高,EphB4 可有效抑制氧诱导视网膜病变新生血管的形成。

[关键词] 氧诱导;早产儿视网膜病变;新生血管;促红细胞生成肝细胞激酶 B4;促红细胞生成肝细胞激酶受体相互作用蛋白 B2

[中图法分类号] R779.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)17-2896-05

Experimental study on the inhibition of EphB4 on neovascularization in retinopathy of prematurity*

LI You¹,CHEN Xiaolong²,ZHANG Yuqiang^{3△}

(1. Jinzhou AIER Eye Hospital, AIER Eye Hospital Group, Jinzhou, Liaoning 121001, China ;
2. Department of Ophthalmology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China ;3. Institute of Orthopaedics, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[Abstract] **Objective** A rat model of oxygen-induced retinopathy was established, to simulate retinopathy of premature infants and study the effect of erythropoiesis hepatocyte kinase (Eph) B4/erythropoiesis hepatocyte kinase receptor protein (Ephrin) B2 on retinal neovascularization and the inhibitory effect of EphB4 on retinal neovascularization. **Methods** A total of 80 newborn SD rats were randomly divided into the model group, the intervention group, the normal group, and the control group, with 20 rats in each group. In the model group, the rat model of oxygen induced retinopathy was established. In the intervention group, the rat model of oxygen induced retinopathy was established and EphB4 was injected into vitreous cavity. In the control group, the rat model of oxygen induced retinopathy was established and the same amount of normal saline was injected into the vitreous cavity. After 17d, the rats were killed and their eyeballs were removed, retinal paving and frozen sections were made, the retinal vessels were stained with ADP enzyme staining, and the expression of EphB4/EphrinB2 protein in retina was observed with immunofluorescence. Retinal tissues were taken for real time-PCR to analyze the expression of EphB4 mRNA. **Results** A large number of neovascularization

* 基金项目:辽宁医学院校长基金项目(XZJJ20140221)。 作者简介:李游(1983—),副主任医师,博士,主要从事小儿眼科学研究。
△ 通信作者, E-mail: zhangyuqiang1981@163.com。

and retinal hemorrhage were observed in the model group and the control group, while the number of neovascularization and retinal hemorrhage in the intervention group were significantly reduced. Immunofluorescence showed that EphB4 and EphrinB2 were highly expressed in the model group and the control group, while the expression of EphB4 and EphrinB2 were significantly decreased in the intervention group. Real time-PCR showed that EphB4 mRNA was highly expressed in the retinal of rats in the model group and the control group, and EphB4 mRNA in the intervention group was lower than that in the model group and the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of EphB4/EphrinB2 was high in the proliferation of retinal neovascularization, and EphB4 can effectively inhibit the formation of retinal neovascularization in oxygen induced retinopathy.

[Key words] oxygen induction; retinopathy of prematurity; neovascularization; EphB4; EphrinB2

在早产儿视网膜病变的患者中,视网膜新生血管大量增殖可导致出血,牵拉视网膜可导致裂孔及脱离,严重者可永久致盲^[1],由此带来的各种问题越来越引起人们的重视。目前已知与早产儿视网膜病变的视网膜新生血管形成有关的因素有很多,但新生血管的增殖机制非常复杂^[1-2],仍有许多未知因素无确切结论。因此,本课题组从基因角度入手,进一步研究早产儿视网膜病变的治疗方案。RTK 信号通路是生成新生血管的机制之一^[3],其中促红细胞生成肝细胞激酶(Eph)/促红细胞生成肝细胞激酶受体相互作用蛋白(Ephrin)系统传递血管内皮生长因子(VEGF)/血管内皮细胞生长因子受体(VEGFR)和内皮细胞 TEK 酪氨酸激酶(Tie)定位信号,其在血管形成中影响血管内皮细胞的增殖,控制新生血管发展^[4],EphB4/EphrinB2 在视网膜新生血管的形成和增殖中起到了重要的作用。因此,本课题组拟建立 SD 大鼠氧诱导视网膜病变模型来模拟人类早产儿视网膜病变,研究视网膜新生血管增殖过程中 EphB4/EphrinB2 表达的变化,观察玻璃体腔内注射 EphB4 能否抑制或减少视网膜新生血管的生成,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

20 只健康 SD 孕鼠购于锦州医科大学实验动物中心,待新生幼鼠 7 d 龄时进行建模和实验。

1.2 方法

1.2.1 SD 大鼠视网膜病变模型的建立

80 只 7 d 龄 SD 大鼠分为 4 组:模型组、干预组和对照组和正常组,每组 20 只。将模型组置于氧浓度 75% 的密闭舱内 5 d 后回到正常室内环境中,建立视网膜病变模型^[2];干预组建立视网膜病变模型并于出仓后(12 d)玻璃体腔注射 EphB4 1 μ L(美国 VasGene Therapeutics 公司);对照组幼鼠同样建立视网膜病变模型,于 12 d 玻璃体腔注射生理盐水 1 μ L;正常组置于正常空气中常规饲养。各组分别于 17 d 处死并取材。

1.2.2 组织的制备

腹腔注射 3 g/kg 水合氯醛处死大鼠,取双眼。将右眼一部分制作成视网膜铺片进行 ADP 酶染色,另一部分做冰冻切片进行 EphB4/Ephrin 免疫荧光检测。左眼视网膜组织集中冷冻保存,用于实时荧光定量 PCR 检测 EphB4 mRNA。

1.2.3 视网膜铺片的制作及 ADP 酶染色

摘取的 SD 幼鼠眼球在 4% 多聚甲醛中充分固定,手术显微镜下仔细分离出视网膜和脉络膜,用 0.05 mol/L 马来酸缓冲液冲洗,在 37 $^{\circ}$ C 的 ADP 培养液中培养 15 min,磷酸盐缓冲液(PBS)彻底清洗,10% 硫酸铵着色,甘油明胶密封,显微镜下观察视网膜血管的形态和分布^[2]。

1.2.4 EphB4/EphrinB2 蛋白的免疫荧光双标检测

制作视网膜冰冻切片。山羊血清封闭后加入一抗 EphB4 及 EphrinB2 多克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 冷藏过夜后加入 Cy3 和荧光素钠标记的二抗 IgG,暗盒内室温静置 90 min,加入 DAPI 暗盒内室温静置 5 min,充分洗涤,甘油明胶密封,遮光,激光共聚焦显微镜下观察 EphB4/EphrinB2 蛋白在视网膜的分布和表达情况^[2]。

1.2.5 EphB4 mRNA 的实时荧光定量 PCR 检测

根据 EphB4 和内参 β -actin 的 mRNA 序列合成所需引物。先提取出视网膜组织中 EphB4 和内参 β -actin 的总 RNA,将总 RNA 逆转录成 cDNA 的第一链,进行 PCR 扩增反应,绘制溶解曲线^[1]。计算各组 EphB4 mRNA 的相对表达水平,进行统计^[2]。

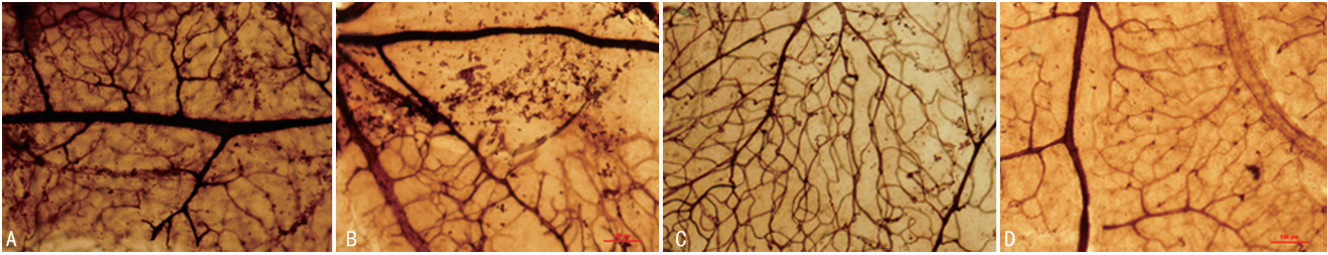
1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 视网膜新生血管的观察

新生血管呈毛刷状或团簇状,而正常血管呈树枝状走形,二者有明显不同的形态。模型组和对照组视网膜血管迂曲扩张,可见大量的新生血管分布及眼底片状出血;干预组视网膜血管树枝状走向,形态良好,有少量新生血管;正常组血管发育良好,见图 1。



A:模型组;B:对照组;C:干预组;D:正常组。

图 1 SD 大鼠视网膜血管 ADP 酶染色(200×)

2.2 视网膜中 EphB4 和 EphrinB2 蛋白的表达

激光共聚焦显微镜下可以清晰地观察到视网膜各层的组织形态,EphB4 和 EphrinB2 大量表达于视网膜新生血管生成区,且图像重合后发现 EphB4 的红色荧光与 EphrinB2 的绿色荧光聚集在视网膜新生血

管生成区互相重合呈黄色。细胞核染色为蓝色荧光。正常组少量表达 EphB4 和 EphrinB2,模型组和对照组大量表达 EphB4 和 EphrinB2,干预组 EphB4 和 EphrinB2 的荧光染色亮度明显弱于模型组和对照组,见图 2。

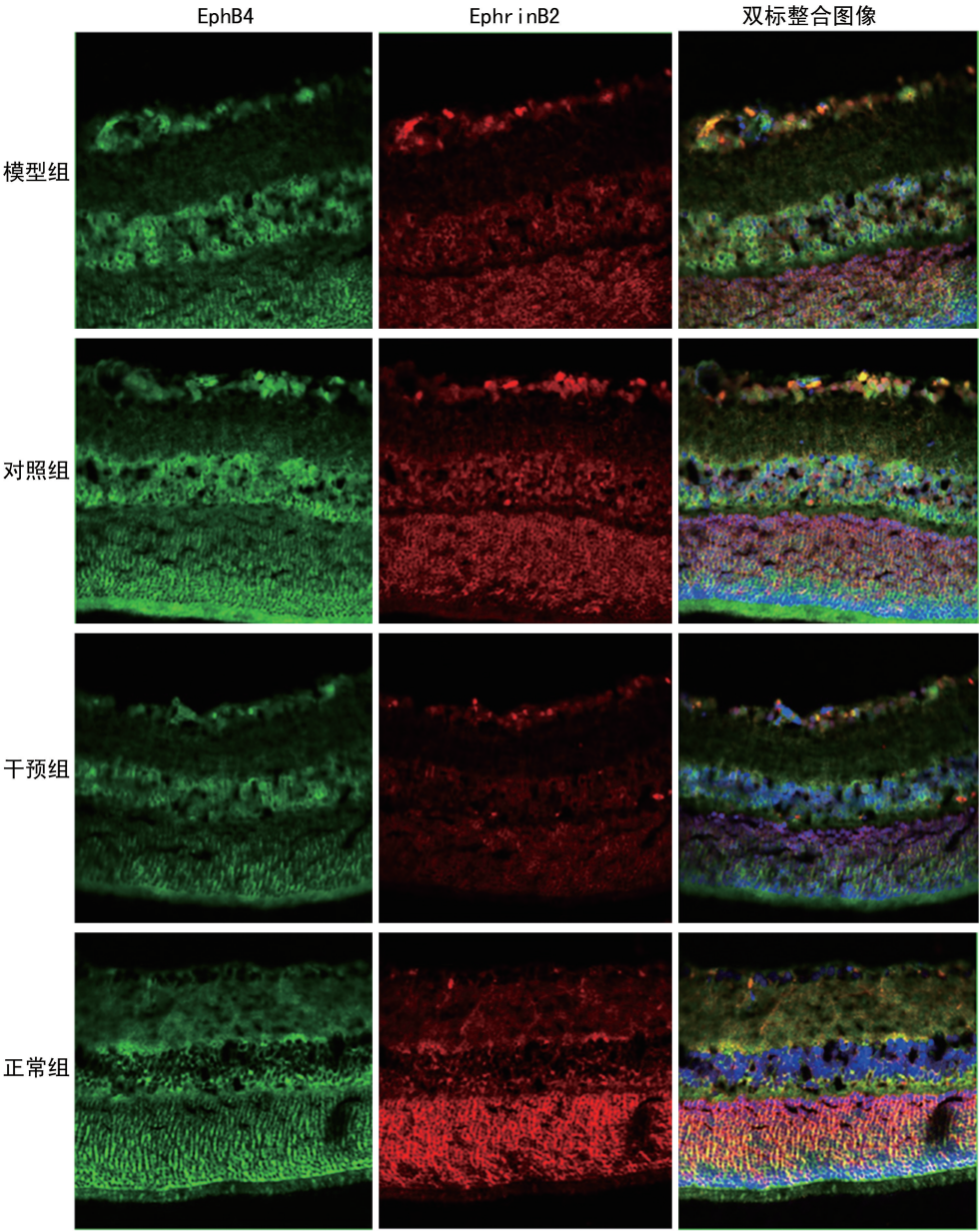


图 2 SD 大鼠视网膜 EphB4/EphrinB2 蛋白的免疫荧光双标染色(200×)

2.3 大鼠视网膜实时荧光定量 PCR 结果

EphB4 mRNA 在模型组视网膜的相对表达水平

为 0.87 ± 0.11 , 而正常组为 0.19 ± 0.03 , 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。EphB4 mRNA 在干预组视网膜的相对表达水平为 0.25 ± 0.04 , 明显低于模

型组及对照组 (0.96 ± 0.13), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

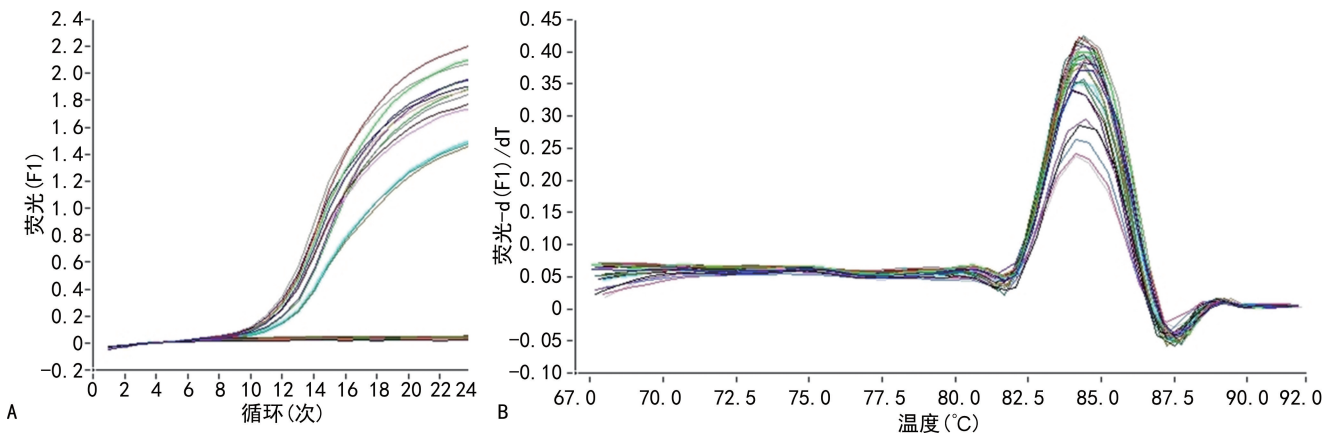


图 3 EphB4 mRNA 的实时荧光定量 PCR

3 讨 论

早产儿视网膜病变是一个非常复杂的病理过程。视网膜的新生血管没有发育完全, 容易破裂出血和机化, 形成机化膜后会牵拉视网膜发生裂孔, 造成视网膜脱离, 手术很难完全恢复视力。视网膜要形成新的血管, EphrinB 配体及其同源 Eph 受体是最重要的导向分子之一, 在信号传输中起着重要作用^[6]。EphrinB2 配体及其受体 EphB4 已被证明在动脉和静脉内皮细胞中均有特异表达, 传递血管内皮细胞之间的双向信号, 并控制胚胎中的心血管内皮细胞的生长和连接^[7]。内皮特异性 EphrinB2 缺失导致血管形态发生缺陷。相反, 功能性 EphrinB2 表达已被证明在出生后新生血管形成中促进动脉和静脉血管之间的相互作用^[8]。在血管重塑过程中, EphrinB2 的表达增强了血管修剪和周细胞对内皮组装的影响^[9], 参与了视网膜血管的形成。

有研究表明, 玻璃体腔注射可溶性 EphB4-Fc、EphrinB2 或可溶性 EphB4 能抑制大鼠视网膜血管的形成^[10]。同时, EphB4 和 EphrinB2 也存在于在动脉和静脉血管丛, 以及血管网的深层^[11], EphB4 在大鼠视网膜新生血管中的作用主要表现为视网膜浅静脉的血管生成及连接, 在视网膜血管发育过程中也大量存在^[9]。研究结果表明, EphB2-Fc 激活 EphrinB2 可明显增强血管生成^[12]。在小鼠胚胎细胞中敲除 EphrinB2 结合的 PDZ 区后发现, 视网膜血管内皮细胞形成丝状伪足的能力明显降低, 相互连接不紧密, 易形成发育不完全的新生血管^[13-14]。用 EphrinB2 抗体治疗后, 血管内皮细胞骨架的动态变化达到平衡, 血管形态多态性下降, 更趋于环状, 表明 EphB4/EphrinB2 是影响血管内皮细胞功能的重要因素之一, 是治疗视

网膜新生血管的有效靶点^[15]。

综上所述, Eph/Ephrin RTK 系统的复杂性、多方面性和普遍性正应用于各种复杂的分子、细胞研究。这是一个新的和快速增长的研究领域, 因为它们影响一系列细胞行为和生物过程, 因此, 在治疗人类疾病方面具有巨大的潜力。Eph/Ephrin 信号通路可以作为调节血管新生的靶点抑制视网膜新生血管的形成, 本研究通过注射 EphB4 调节视网膜病变中视网膜 EphB4/EphrinB2 的活性, 观察了 EphrinB2 表达的改变及对新生血管生成的影响, 为治疗视网膜新生血管提供新的理论依据和治疗策略。

参考文献

- [1] 李游, 庞东渤, 陈晓隆. P16 在氧诱导视网膜病变大鼠视网膜中的表达及作用机制[J]. 国际眼科杂志, 2017, 18(2): 221-225.
- [2] 李游, 张玉强, 张一. EphB4/EphrinB2 对糖尿病视网膜病变大鼠视网膜新生血管生成的影响[J]. 眼科新进展, 2020, 40(10): 925-928.
- [3] XING S, PAN N, XU W, et al. EphrinB2 activation enhances angiogenesis, reduces amyloid- β deposits and secondary damage in thalamus at the early stage after cortical infarction in hypertensive rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2019, 39(9): 1776-1789.
- [4] ZHAO Y, YIN L, ZHANG H, et al. Eph/ephrin family anchored on exosome facilitate communications between cells[J]. Cell Biol Int, 2018, 42(11): 1458-1462.

- [5] SATO S, VASAIKAR S, ESKAROS A, et al. EPHB2 carried on small extracellular vesicles induces tumor angiogenesis via activation of ephrin reverse signaling[J]. JCI Insight, 2019, 4(23):e132447.
- [6] DU M R, YAN L, LI N S, et al. Asymmetric dimethylarginine contributes to retinal neovascularization of diabetic retinopathy through EphrinB2 pathway [J]. Vascul Pharmacol, 2018, 108:46-56.
- [7] GROPPA E, BRKIC S, UCCELLI A, et al. EphrinB2/EphB4 signaling regulates non-sprouting angiogenesis by VEGF[J]. EMBO Rep, 2018, 19(5):e45054.
- [8] KACZMAREK R, GAJDZIS P, GAJDZIS M. Eph receptors and ephrins in retinal diseases [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12):6207.
- [9] WOLF K, HU H, ISAJI T, et al. Molecular identity of arteries, veins, and lymphatics[J]. J Vasc Surg, 2019, 69(1):253-262.
- [10] EHLKEN C, GUICHARD MM, SCHLUNCK G, et al. Expression of angiogenic and inflammatory factors in choroidal neovascularisation-derived retinal pigment epithelium [J]. Ophthalmic Res, 2019, 61(3):174-182.
- [11] DUN X P, PARKINSON D B. Classic axon guidance molecules control correct nerve bridge tissue formation and precise axon regeneration[J]. Neural Regen Res, 2020, 15(1):6-9.
- [12] WANG W, LO A C Y. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6):E1816.
- [13] KACZMAREK R, ZIMMER K, GAJDZIS P, et al. The role of eph receptors and ephrins in corneal physiology and diseases[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9):4567.
- [14] LIU F, YAO Z, LÜ P, et al. Pathophysiologic role of molecules determining arteriovenous differentiation in adult life [J]. J Vasc Res, 2020, 57(5):245-253.
- [15] NANDAKUMAR R, DINU V. Developing a machine learning model to identify protein-protein interaction hotspots to facilitate drug discovery[J]. Peer J, 2020, 8:e10381.

(收稿日期:2021-10-18 修回日期:2022-01-08)

(上接第 2895 页)

- [7] ZHENG X, FU Y, SHI S S, et al. Effect of forsythiaside A on the RLRs signaling pathway in the lungs of mice infected with the influenza A virus FM1 strain[J]. Molecules, 2019, 24(23):4219.
- [8] LU Z, YANG H, CAO H, et al. Forsythoside A protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury through up-regulating microRNA-124[J]. Clin Sci (Lond), 2020, 134(19):2549-2563.
- [9] WISEMAN D J, THWAITES R S, DRYSDALE S B, et al. Immunological and inflammatory biomarkers of susceptibility and severity in adult respiratory syncytial virus infections[J]. J Infect Dis, 2020, 222(Suppl 7):S584-591.
- [10] WANG B, SHEN P F, QU Y X, et al. MiR-940 promotes spinal cord injury recovery by inhibiting TLR4/NF- κ B pathway-mediated inflammation[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(8):3190-3197.
- [11] SONG K, LI S. The role of ubiquitination in NF- κ B signaling during virus infection[J]. Viruses, 2021, 13(2):145.
- [12] PAIK S, KIM J K, SILWAL P, et al. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(5):1141-1160.
- [13] 王凯, 刘小虹. 喘可治对小鼠急性肺损伤 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22):143-148.
- [14] NIU X, ZANG L, LI W, et al. Anti-inflammatory effect of Yam Glycoprotein on lipopolysaccharide-induced acute lung injury via the NLRP3 and NF- κ B/TLR4 signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 81:106024.
- [15] 汤鲁明, 柯迦勒, 徐晨希, 等. 萝卜硫素对脓毒症急性肺损伤大鼠肺组织 Toll 样受体 4/核因子 κ B 信号通路的影响[J]. 中华危重症医学杂志, 2019, 12(1):3-8.

(收稿日期:2021-12-08 修回日期:2022-04-11)