[J]? Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(8): 1483-1489.
[4] Grotendorst G R, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene[J]. Cell Growth Differ, 1996, 7(4): 469-480.
[5] Shi-wen X, Pennington D, Holmes A, *et al*. Autocrine overexpression of CTGF maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis[J]. Exp Cell Res, 2000, 259(1): 213-224.
[6] Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid and other fibrotic skin disorders[J]. J Invest Dermatol, 1996, 106(4): 729-733.
[7] 张 晶, 何静雯, 王泰龄, 等. 苦味酸天狼猩红偏振光法鉴别Ⅰ型及Ⅲ型胶原纤维[J]. 中华病理学杂志, 1996, 25(3): 180-181.
[8] Letterio J J, Bottinger E P. TGF-beta knockout and dominant-negative receptor transgenic mice[J]. Miner Electrolyte Metab, 1998, 24(4): 161-167.

(编辑 冷怀明)

文章编号:1000-5404(2003)09-0821-02

个案与短篇

血管内皮生长因子 mRNA 在激光视网膜损伤后的表达

The expression of VEGF mRNA after retina laser photocoagulation in rabbits

陈少军[1],阴正勤[1],高钰琪[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院眼科;[2]高原军事医学系病理生理学教研室,重庆 400038)

缺血性视网膜病变是由于视网膜循环障碍而造成视网膜缺血、缺氧并诱发脉络膜新生血管形成。脉络膜新生血管膜的渗出和出血造成的视网膜中心凹功能的毁损,是当今内眼疾病视力丧失的主要原因。近年来研究表明:新生血管的形成由各种生长因子和细胞因子刺激[1],其中血管内皮细胞生长因子在诱导眼底新生血管化中起着突出的作用[2]。激光也可作为刺激因素诱发新生血管生成[3-5]。本实验旨在用激光诱导眼底新生血生成的模型,通过原位杂交的方法观察 VEGF mRNA 表达的变化,结合新生血管生成的时相和部位,探讨 VEGF 与脉络膜新生血管发生之间的关系。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

主要仪器:多波长眼底激光机(Coherent,美国)、恒冷箱冰冻切片机(Bright,美国)。

主要试剂:地高辛随机引物标记药盒(德国);碱性磷酸酶标记的小鼠抗地高辛抗体(Boenringer Mannheim,德国)。

1.2 动物模型建立及标本制作

健康有色家兔18只,雌雄不限,体质量1.8~2.3 kg,分为以下各组:对照组2只兔4只眼;实验组16只,又分为光凝后1,3,7,14 d 4个时相组,每组4只兔8只眼。实验组家兔用1%阿托品散瞳,3%戊巴比妥钠(1 ml/kg)行耳缘静脉麻醉后,以波长647 nm的氪红激光(光斑直径200 μm,能量110~130 mW,时间0.15 s),在距视盘2~3个视盘直径的颞侧有髓神经纤维上下视网膜处密集照射20个点,光斑紧邻,最大间隔小于半个光斑直径。光斑效应为Ⅲ级(中度~重度)[6]。

实验组家兔分别于光凝后1,3,7,14 d全麻下行两侧颈总动脉插管。先用100 ml生理盐水冲洗,然后用100 ml 4%多聚甲醛液灌注固定。摘除眼球并沿角巩膜缘剪开巩膜,去除角膜及晶状体,眼后段组织浸泡在4%的多聚甲醛中固定6 h,常规脱水,制作视网膜纵截面冰冻切片(15 μm),贴片、烤干(50 ℃,10 min),置-70 ℃冰箱保存。

1.3 原位杂交

VEGF探针的制备参照Maniatis[7]方法进行。采用随机引物法地高辛标记cDNA探针。原位杂交方法见文献[8]。每张切片上分别加20 μl变性探针杂交液(探针终浓度为0.2 μg/ml),阴性对照加不含探针的杂交液。加盖玻片,置湿盒中42 ℃杂交过夜。漂洗后用氮蓝四唑(Nitroblue tetrazolium,NBT)显色,核快红复染,42 ℃烤干、封固。随机选取切片并标记端序,在光镜200倍下每隔1 cm选取1个视野,共9个视野。

2 结果

2.1 眼底病理改变

光凝后1 d,光凝斑部位视网膜隆起,散在大量红细胞和少量脱落的光感受器细胞核;其下的视网膜色素上皮细胞(RPE)结构松散、体积增大;光凝后3 d,光凝斑部位视网膜凹陷变薄,外核层消失;其周围形状如火山口隆起,视网膜结构明显破坏,并可见大量固缩核散布于视网膜全层;RPE单层细胞结构破坏、缺损;脉络膜下可见较多RPE样细胞增殖、侵入;光凝斑及周围视网膜下的脉络膜大血管层有新生毛细血管芽样结构出现:红色薄壁内皮细胞及核组成环形血管壁,相互连接成网状。实验组18只兔眼可见新生血管样结构,其发生率是56%。

2.2 VEGF mRNA 表达的变化

正常视网膜各层未见VEGF mRNA表达;光凝后1 d,VEGF mRNA表达明显增多,阳性细胞主要位于距光凝斑约1个光凝斑直径以外的视网膜节细胞层、内核层(胞浆呈蓝紫色)。光凝后3 d,VEGF mRNA表达有所减弱,仅节细胞层和RPE层有部分细胞呈阳性染色。光凝后7 d,VEGF mRNA表达更行减弱,接近正常对照;伤后14 d VEGF mRNA表达阴性。

作者简介:陈少军(1964-),女,山西省太原市人,博士研究生,主治医师,主要从事玻璃体-视网膜疾病方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752925

收稿日期:2001-09-13;修回日期:2002-02-20

(下转827页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

菌体浸渍 2 h 能完全杀菌。本实验所用桂皮制剂仅是酒精提取粗制物, MIC 为 500 μg/ml, 但 31.25 ~ 250 μg/ml 仍有中、轻度敏感。与前者比较同样有较强的抑菌作用, 但对于药物提取方法的影响有待进一步探讨。

综上所述, 本研究目的主要是将该实验方法作为对白珠念药敏试验的一个新方法探讨, 虽然所试药物的抑菌作用 MIC 浓度与以往的报道相似, 但该药敏试验方法简单、快速, 并有利于临床即时粗筛白念珠菌抗菌药物, 更有利于推广应用。

关键词: 血清芽管试验; 黄连; 姜黄; 桂皮; 伊曲康唑; 两性霉素 B

中图法分类号: R379.4; R965.1　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 王文莉, 王端礼, 李若瑜, 等. 酵母菌的 NCCLS 药敏试验方法及应用[J]. 中华医学检验杂志, 1997, 20(2): 119—122.

[2] 曹仁烈. 中药水煎剂在试管内抗皮肤真菌的观察[J]. 中华皮肤科杂志, 1957, 5(4): 286—290.

[3] 曹　煜, 茅　颍, 向俊才, 等. 中药姜黄有效成分抗真菌研究及临床应用研究[J]. 中华皮肤科杂志, 1994, 27(6): 354—356.

[4] 唐书谦, 叶庆佾, 钟白玉. 姜黄油、水浸液对真菌体外抑菌观察[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(6): 569—571.

[5] 张永圣. 桂皮乙醚抽出物的水溶液部分抗真菌的实验研究[J]. 微生物学报, 1958, 6(2): 233—235.

（编辑　刘洪娥）

（上接 821 页）

3　讨论

用高能量的密集光斑造模, 通过减少对视网膜内层的血供, 破坏 Bruch 膜, 诱导眼底新生血管生长, 是一种重现性较好的可靠模型, 可通过光镜、电镜及眼底荧光造影等可靠方法观察。Dobi 等[9] 用病理组织学观察猴的新生血管发生率为 86%, 鼠眼新生血管发生率为 60%, 而兔眼的新生血管发生率较二者略低。本实验通过将散在的光凝改为后极部密集光凝后, 兔眼新生血管发生率为 56%。

迄今发现与血管形成相关的生长因子中, 只有 VEGF 作为一种与缺氧关系密切、能特异促血管内皮细胞分裂可溶性糖蛋白, 在诱导脉络膜新生血管形成中起着突出的作用[10]。近年来, 应用免疫组织化学方法发现参与脉络膜新生血管形成的细胞主要有视网膜色素上皮细胞(RPE)和巨噬细胞[11]。RPE 病变、炎症或 Bruch 膜的破坏造成代谢紊乱, 其代谢产物消化排除障碍而沉积在 RPE 细胞基底膜下, 变成玻璃膜疣, 它的存在则可吸引巨噬细胞由脉络膜穿过 Bruch 膜进入 RPE 下, 巨噬细胞能产生多种促血管新生的细胞因子如 VEGF、bFGF 等, 从而起动了新生血管生长的过程。本实验模型由于光凝减少了对内层视网膜的血液供应, 造成了视网膜组织的缺氧状态。光凝后 1 ~ 3 d, 我们检测到光凝灶周围的节细胞层和内核层 VEGF mRNA表达明显增加, 光凝斑周围的视网膜下侵入的 RPE 样细胞及 RPE 层细胞中也有 VEGF mRNA 表达; 光凝后 3 d, 光凝斑及周围视网膜下有红色薄壁内皮细胞及核组成环形网状结构出现, 与正常组织原有血管的部位、分布和形态相比均不同。Ishibashi 等[12] 已在小鼠模型中用原位杂交和免疫组织化学方法证实, 光凝后 3 d 脉络膜血管内皮细胞通过 Bruch 膜缺损区迁移进入视网膜下, 光凝后 3 ~ 7 d 在堆积的巨噬细胞、迁移的 RPE 和 Muller 细胞中 VEGF mRNA 表达明显增高; 光凝后 7 ~ 14 d 经组织病理学和眼底荧光造影证实视网膜下有新生血管的形成。因兔脉络膜新生血管不具有渗漏荧光素的特征, 故我们未用眼底荧光造影进行观察。

本实验在正常视网膜检测不到 VEGF mRNA 的表达, 而光凝后 VEGFmRNA 的表达明显增高, 这与 Frank 等[13] 的研究结果一致, 且 VEGF mRNA 的表达在时间和部位与视网膜下新生血管化及周围色素上皮反应存在时空对应关系, 提示 VEGF 在激光光凝所致的眼内新生血管形成中起着重要的作用。

关键词: 血管内皮生长因子; 原位杂交; 视网膜; 脉络膜新生血管

中图法分类号: R774.102　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Risau W. Mechanisms of angiogenesis[J]. Nature, 1997, 386(17): 671—674.

[2] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, *et al*. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors[J]. FASEB J, 1999, 13(1): 9—22.

[3] Pollack A. Ultrastructure of Bruch's membrane after krypton laser photocoagulation II. Repair of Bruch's membrane and the role macrophages[J]. Arch Ophthalmol, 1986, 104(9): 1377—1382.

[4] Bird A C. Choroidal neovascularization in age-related macular disease[J]. Br J Ophalmol, 1993, 77(10): 614—615.

[5] Killingsworth M C, Sarks J P, Sarks S H. Macrophages related to Bruch's membrane in age-related mecular degeneration[J]. Eye, 1990, 4(Pt 4): 613—621.

[7] 金冬雁, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992. 495—569.

[6] 张承芬. 眼底病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 697—698.

[8] 蔡文琴 主编. 免疫组织化学和核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 408—413.

[9] Dobi E T, Puliafito C A, Destro M, *et al*. A new model of experimental choroidal neovascularization in the rat[J]. Arch Ophthalmol, 1989, 107(2): 264—269.

[10] Aiello L P, Northrup J M, Keyt B A, *et al*. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells[J]. Arch Ophthalmol, 1995, 113(12): 1538—1544.

[11] Otani A, Takagi H, Oh H, *et al*. Expressions of angiopoietins and Tie 2 in human choroidal neovascular membranes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(9): 1912—1920.

[12] Ishibashi T, Hata Y, Yoshikawa H. Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization[J]. Graefes Arch Clin Txp Ophth-almol, 1997, 235(3): 159—167.

[13] Frank R N. Growth factors in age-related macular degeneration pathogenic and therapeutic implications[J]. Ophthalmic Res, 1997, 29(5): 341—353.

（编辑　张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net