

• 实验研究 •

雌激素对视网膜血管渗漏的影响

张红兵 张军军 马麟 张美霞 赵英杰

【摘要】 目的 探讨用去势方法研究雌激素影响眼部疾病的可行性以及雌激素对视网膜血管渗漏的影响。方法 健康成熟的雌性 SD 大鼠 22 只,随机分为实验组和对照组。实验组雌性 SD 大鼠用去势方法降低体内雌激素水平;对照组用假去势方法,不影响雌激素水平。手术效果用阴道上皮涂片方法证实。用光动力诱导方法建立视网膜静脉阻塞模型,用分光光度计测量视网膜伊文思蓝渗漏量。结果 实验组大鼠阴道上皮成熟值降低明显($t=21.008, P=0.000$),对照组大鼠成熟值变化不明显($t=0.319, P=0.756$)。实验组大鼠视网膜平均伊文思蓝渗漏量为 $(25.503 0 \pm 4.378 47)$ ng/mg,对照组大鼠视网膜平均伊文思蓝渗漏量为 $(17.830 0 \pm 4.265 69)$ ng/mg。2 组之间差异有统计学意义($t=3.969 36, P=0.001$)。结论 去势方法是研究雌激素在眼部疾病作用的可靠模型,雌激素水平降低时视网膜血管的渗漏增加。

【关键词】 视网膜血管/药物作用; 雌激素/生理学; 疾病模型,动物; 渗漏

中图分类号:R446.9 R774.1

Effect of estrogen on the permeability of retinal blood vessel ZHANG Hong-bing, ZHANG Jun-jun, MA Lin, et al. Department of Ophthalmology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: ZHANG Jun-jun, Email: zhang_junjun@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of estrogen on the permeability of retinal blood vessel by ovariectomy. **Methods** Twenty-two healthy rats were divided into experimental and control group randomly. Estrogen level of rats decreased due to ovariectomy in the experimental group while stabilized by sham-ovariectomy in the control group. The results were confirmed by vaginal epithelium smearing. Retinal vein occlusion was established by photodynamic method, and leakage of Evan's blue in retina was determined by spectrophotometer. **Results** Mature value of vaginal epithelium decreased significantly in ovariectomy rats ($t=21.008, P=0.000$) while not significantly in sham-ovariectomy ones ($t=0.319, P=0.756$); the mean leakage of Evans blue was $(25.503 0 \pm 4.378 47)$ ng/mg in experimental group, and $(17.830 0 \pm 4.265 69)$ ng/mg in the control group, and the difference between the two groups is significant ($t=3.969 36, P=0.001$). **Conclusion** Ovariectomy is an useful method to study the effect of estrogen on ocular diseases, and when estrogen level decreases, the permeability of retinal blood vessel increases.

【Key words】 Retinal vessels/drug effects; Estrogens/physiology; Disease models, animal

视网膜血管渗漏是许多眼底疾病的特点,并严重影响视功能。目前该方面研究已经取得很大进展,但是尚不完善。近年研究发现雌激素除了一般生理作用外,对血管通透性也有明显调控作用^[1-3]。由于许多眼部疾病有明显的性别差异,最近研究发现雌激素受体在眼组织中有明显分布^[4,5],因此我们设计了该实验,以探讨雌激素对视网膜血管渗漏的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级健康成熟雌性 SD 大鼠 22 只,体重 200~

250 g。速眠新(长春军需大学兽医研究所),2%虎红(上海试剂三厂),伊文思蓝(中国医药集团上海试剂公司),甲酰胺(美国 Sigma 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 降低雌激素水平模型的制作 符合标准的雌性 SD 大鼠 22 只,随机分为实验组和对照组,每组各 11 只大鼠;实验组采用去势方法,即切除大鼠两侧卵巢;对照组采用假去势方法,仅切除卵巢周围部分脂肪组织^[6]。1 周后阴道上皮涂片了解大鼠体内雌激素水平的变化^[7]。

1.2.2 光动力法建立视网膜静脉阻塞模型^[8-10] 尾静脉按 40 mg/kg 的剂量注射 2%虎红后,固定于多波长眼底激光仪前特制的固定架上,以+78D 前置镜,用黄绿色激光光凝视盘周围所有主要视网膜静脉。范围

基金项目:卫生部基金资助项目(2001321)

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院眼科(张红兵,现在西安市眼科医院)

通讯作者:张军军,Email: zhang_junjun@hotmail.com

为距视盘 1 个视盘直径(PD)开始,长约 4 PD。激光参数为光斑直径 50 μm 、能量 75 mW、曝光时间 0.2 s、击发点数 150~200 点。大鼠苏醒后回笼饲养。

1.2.3 不同伊文思蓝浓度与净吸光度[A,旧称光密度(OD)]值关系的测定 配制 25 $\mu\text{g/L}$ ~1 000 $\mu\text{g/L}$ 不同浓度伊文思蓝的甲酰胺溶液,分别在分光光度计上测量 620 nm 和 740 nm 的 A 值。

1.2.4 视网膜伊文思蓝渗漏量的测定 所有大鼠均于 2 周后速眠新肌肉注射麻醉,解剖暴露髂外静脉,血管内注射伊文思蓝(45 mg/kg)。120 min 后剪开胸腔,结扎腹主动脉,左心室插管,灌注 37 C 预热的生理盐水 250 ml,同时剪开右心耳,进行血管灌注 5 min。然后迅速摘除眼球,在 10%多聚甲醛中固定 10 min,分离视网膜。将视网膜与 300 μl 甲酰胺在 70 C 孵育 18 h,然后在 4 C 下以离心半径 28 cm、17 500 r/min 下高速离心 120 min,取上清液 100 μl ,用分光光度计测量 620 nm 和 740 nm 波长的 A 值,二者差值 $\times 100$ =净 A 值。根据伊文思蓝与净 A 值的关系,得到实际溶液中伊文思蓝浓度,用浓度乘以 300 μl 得出视网膜伊文思蓝渗漏量。吸除剩余溶液,剩余物质真空冷冻干燥 5 h,用电子天平称出其重量,即为视网膜干重。最后用视网膜干重(mg)标化伊文思蓝(ng)渗漏量,结果表示为 ng/mg。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.0 统计软件对伊文思蓝与净 A 值的关系进行直线回归分析;两样本均数的差别用 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 手术情况

去势和假去势手术顺利,术中无明显出血和死亡,术后无感染,平均手术时间 10~15 min。

2.2 阴道上皮涂片结果

正常大鼠阴道上皮涂片:细胞多边性,细胞浆均质红染,核固缩,着色不明显;去势手术后 1 周 SD 大鼠阴道上皮涂片:细胞大小和形状接近正常细胞,细胞浆淡染,核大,着色明显;假去势手术后 1 周 SD 大鼠阴道上皮涂片:细胞大小和形状与正常细胞相同,细胞浆均质红染,核固缩,着色不明显。记录方法用成熟值(MV)和成熟均数(MI)表示。对照组手术前 MV 平均值为 $86.363\ 6 \pm 6.160\ 73$,手术后 MV 平均值为 $87.045\ 5 \pm 4.585\ 05$,二者比较差异无统计学意义($t = 0.319, P = 0.756$)。实验组手术前 MV 平均值 $87.500\ 0 \pm 5.361\ 90$,手术后 MV 平均值 $43.636\ 4 \pm$

$3.599\ 24$,二者差异有显著统计学意义($t = 21.008, P = 0.000$)。

2.3 视网膜中央静脉阻塞模型

22 只眼在激光结束时即可见到静脉内有明显黑色血栓形成,部分栓子松动后其间静脉内无血液流动,远端静脉淤曲、扩张,周边视网膜散在小点片状出血。2 周后眼底荧光血管造影显示:实验组和对照组 SD 大鼠未激光光凝眼眼底无荧光素渗漏,激光光凝眼眼底均有荧光素渗漏,实验组视网膜荧光素渗漏(大片状渗漏)明显强于对照组(点状渗漏)。

2.4 不同伊文思蓝浓度与净 A 值之间的关系

实验测得不同伊文思蓝浓度在 620 nm 和 740 nm 的 A 值,其差值 $\times 100$ =净 A 值。统计分析伊文思蓝浓度与净 A 值之间呈高度直线相关($r = 0.994, P = 0.001$),为 $Y = 3.681E - 03X + 7.848E - 02$ (Y 表示净 A 值,X 表示伊文思蓝浓度)。

2.5 2 组视网膜伊文思蓝渗漏量及统计分析

对照组伊文思蓝平均渗漏量为 $(17.830\ 0 \pm 4.265\ 69)$ ng/kg,实验组伊文思蓝平均渗漏量为 $(25.503\ 0 \pm 4.378\ 47)$ ng/kg,二者差异有统计学意义($t = 3.969\ 36, P = 0.001$)。

3 讨论

去势和假去势动物模型,作为研究雌激素作用的经典方法,在心血管、神经和骨科等专业广泛应用,并取得了显著成果^[11-13],但是对眼科还未见报道。本实验首次探讨了用该方法研究雌激素对眼部疾病作用的可行性,结果证实该手术简单易行。阴道上皮细胞角化程度主要受雌激素调控,血液雌激素水平明显降低时角化程度明显下降,在正常月经周期不同时间比较稳定,因此用阴道上皮涂片可以反应体内雌激素水平^[14,15]。本实验证实假去势大鼠手术前后 1 周阴道上皮细胞角化程度无明显变化,而去势大鼠手术前后阴道上皮细胞角化程度改变明显,可以反应大鼠体内雌激素水平的变化。

有文献曾报道激光光凝血管从视盘旁开始,以 2 PD 为度,但是这种方法栓塞静脉再通的机率很大^[16]。为了防止再通的发生,我们将光凝的血管长度延伸到 4 PD,结果光凝的静脉全部形成栓塞,高于相关文献报道的成功率 90%(9/10)^[16]。

伊文思蓝是一种四钠重氮染料,进入血液后与血浆白蛋白以 10:1 比例紧密结合,当视网膜血管通透性增加时,这种复合物就渗漏到血管外,通过测定视网膜伊文思蓝渗漏量,并用视网膜重量进行标化,就可以判

定视网膜血管的渗漏程度。该方法经过改进,实验结果更具有可比性^[17]。我们遵循上述原则,比较理想的测到了 2 组视网膜伊文思蓝渗漏量。

统计分析示 2 组视网膜伊文思蓝渗漏量的差异有统计学意义($t=3.969\ 36, P=0.001$),说明在大鼠视网膜静脉阻塞模型中,雌激素水平降低时,视网膜血管渗漏增加。这一方面与雌激素能够调控血管内皮生长因子的生成有关:视网膜静脉阻塞导致视网膜缺氧,血管内皮生长因子的基因表达上调,同时雌激素水平下降,其维持血管内皮生长因子水平相对稳定的能力降低,结果血管内皮生长因子生成增多,促进了新生血管的生成,导致荧光素渗漏增加^[18-20];另一方面与雌激素调控一氧化氮(NO)基础释放有关:NO 是一种重要的内皮源性血管舒张因子,能够扩张血管,抑制血管平滑肌细胞增生,抑制血小板聚集和阻止血细胞与血管内皮细胞粘附,生理条件下对维持血管正常扩张和通畅发挥重要作用,雌激素通过血管内皮细胞上的雌激素受体,调控 NO 的基础释放,雌激素水平降低时这种调控作用减弱,NO 的生成减少,使视网膜静脉阻塞更容易发生,加剧了视网膜静脉阻塞的程度^[21-25];另外,2 种因素是否具有协同作用,有待进一步研究。

志谢:中华眼底病杂志编辑部唐健老师在科研立题和论文撰写方面给予的无私帮助

4 参考文献

- Cullinan-Bove K, Koos RD. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus; rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology*, 1993, 133: 829-837.
- Bogin L, Degani H. Hormonal regulation of VEGF in orthotopic MCF7 human breast cancer. *Cancer Res*, 2002, 62: 1948-1951.
- Tominaga K, Kataoka Y, Sendo T, et al. Contrast medium-induced pulmonary vascular hyperpermeability is aggravated in a rat climacterium model. *Invest Radiol*, 2001, 36: 131-135.
- Ogueta SB, Schwartz SD, Yamashita CK, et al. Estrogen receptor in the human eye; influence of gender and age on gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40: 1906-1911.
- Munaut C, Lambert V, Noel A, et al. Presence of estrogen receptor type beta in human retina. *Br J Ophthalmol*, 2001, 85: 877-882.
- 苗明三. 实验动物和动物实验技术. 第三版. 北京:中国中医药出版社出版. 1997. 242.
- 乐杰. 妇产科学. 第四版. 北京:人民卫生出版社. 1997. 398-399.
- Kang SG, Chung H, Hyon JY. Experimental preretinal neovascularization by laser-induced thrombosis in albino rats. *Korean J Ophthalmol*, 1999, 13: 65-70.
- Wilson CA, Hatchell DL. Photodynamic retinal vascular thrombosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991, 32: 2357-2365.
- Nanda SK, Hatchell DL, Tiedeman JS, et al. A new method for vascular occlusion; photochemical initiation of thrombosis. *Arch Ophthalmol*, 1987, 105: 1121-1124.
- Simoncini T, Maffei S, Basta G, et al. Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms. *Circ Res*, 2000, 87: 19-25.
- Roggia C, Gao Y, Cenci S, et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow; a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 13690-13695.
- Garica-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, et al. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol*, 1999, 40: 574-584.
- Chateau D, Boehm N. Regulation of differentiation and keratin 10 expression by all-trans retinoic acid during the estrous cycle in the rat vaginal epithelium. *Cell Tissue Res*, 1996, 284: 373-381.
- Gupta PD, Relia SB, Rao SB, et al. Keratinization of rat vaginal epithelium-V. Modulation of intracellular calcium by estradiol. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1990, 37: 521-527.
- Kang SG, Chung H, Hyon JY. Experimental preretinal neovascularization by laser-induced thrombosis in albino rats. *Korean J Ophthalmol*, 1999, 13: 65-70.
- 许庆文. 伊文思蓝在测定视网膜屏障破坏中的作用. *中华眼底病杂志*, 2001, 17: 221-223.
- Ozaki H, Yu AY, Della N, et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha is increased in ischemic retina; temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40: 182-189.
- Suzuma I, Mandai M, Takagi H, et al. 17 beta-estradiol increases VEGF receptor-2 and promotes DNA synthesis in retinal microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40: 2122-2129.
- Miyamoto N, Mandai M, Takagi H, et al. Contrasting effect of estrogen on VEGF induction under different oxygen status and its role in murine ROP. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43: 2007-2014.
- Huang A, Sun D, Koller A, et al. 17 beta-estradiol restores endothelial nitric oxide release to shear stress in arterioles of male hypertensive rats. *Circulation*, 2000, 101: 94-100.
- Nematbakhsh M, Khazaei M. The effect of estrogen on serum nitric oxide concentrations in normotensive and DOCA Salt hypertensive ovariectomized rats. *Clinica Chimica Acta*, 2004, 344: 53-57.
- Yang D, Fu XD, Li YY, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in the vascular smooth muscle cells cycle arrest induced by 17 beta-estradiol. *Sheng Li Xue Bao*, 2003, 55: 684-691.
- Bucci M, Roviezzo F, Cicala C, et al. 17-beta-estradiol-induced vasorelaxation in vitro is mediated by eNOS through hsp90 and akt/pkb dependent mechanism. *Br J Pharmacol*, 2002, 135: 1695-1700.
- Haynes MP, Li L, Sinha D, et al. Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J Biol Chem*, 2003, 278: 2118-2123.

(收稿日期:2004-12-08)

(本文编辑:朱敏)

更正 本刊第 21 卷第 1 期 48 页“实时荧光聚合酶链反应定量检测大鼠视网膜中转化生长因子 β_1 和 β_2 的表达”一文,作者沈炜、柳林、刘志勇的单位应为第二军医大学长海医院眼科,特此更正。

本刊编辑部