

环氧合酶-2 和存活素在视网膜新生血管中的表达

刘宁宁,赵宁,柳力敏,陈蕾,才娜

基金项目:辽宁省博士科研启动基金(No.20091115)
作者单位:(110001)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学附属第一医院眼科
作者简介:刘宁宁,女,博士,副主任医师,研究方向:眼底病。
通讯作者:才娜,女,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:糖尿病视网膜病变。caina0413@yahoo.com.cn
收稿日期:2012-09-14 修回日期:2012-12-25

Study of expression and relationship of COX-2 and Survivin in retinal neo-vascularization

Ning-Ning Liu, Ning Zhao, Li-Min Liu, Lei Chen, Na Cai

Foundation item: Scientific Research Foundation for Doctoral Program of Liaoning Province, China (No.20091115)
Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Na Cai. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. caina0413@yahoo.com.cn
Received:2012-09-14 Accepted:2012-12-25

Abstract

• **AIM:** To explore expression and relationship of COX-2 and Survivin protein in the retinal neovascularization.
• **METHODS:** Mouse model of hyperoxia-induced ischemic retinopathy were established. A novel fluorescein-dextran perfusion method was developed to assess the vascular pattern. Histologic methods were used to count blood vessel profiles in the inner retina with HE staining. Survivin and COX-2 expressions in the retina were determined by immunohistochemical method.
• **RESULTS:** Lots of neovascularization were seen in hyperoxia group. The number of nuclei of proliferative retinal vessels increased significantly as compared with normal control group ($P < 0.01$). The expression of Survivin was noted in the ganglion cells and the neovascularization breaking through the inner retina. The expression of COX-2 was noted in the inner nuclear layer and ganglion cells and retinal blood vessels. The expressions of them have positive correlation ($r = 0.394, P < 0.01$).
• **CONCLUSION:** There are high expressions of Survivin and COX-2 protein in the retinal neovascularization and they have correlation.
• **KEYWORDS:** retinal neovascularization; Survivin; Cyclooxygenase-2

Citation: Liu NN, Zhao N, Liu LM, et al. Study of expression and relationship of COX-2 and Survivin in retinal neovascularization. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013;13(1):46-48

摘要

目的:探讨存活素(Survivin)和环氧合酶-2(COX-2)在视网膜新生血管中的表达。
方法:以高浓度氧诱导 C57BL/6J 小鼠建立视网膜新生血管模型。取对照组和给氧组幼鼠眼球作荧光素血管灌注、病理切片及免疫组织化学检测,分别观察视网膜血管的改变、视网膜新生血管内皮细胞数目及 Survivin 和 COX-2 蛋白的表达。
结果:给氧组视网膜可见大量新生血管形成,新生血管内皮细胞核数为 23.38 ± 1.07 个,与对照组相比差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。正常对照组:视网膜组织各层中未见 Survivin 和 COX-2 蛋白表达($2.56 \pm 0.46, 2.37 \pm 0.80$)。给氧组:Survivin 蛋白表达在神经节细胞层和突破视网膜内界膜的新生血管(3.34 ± 0.40),COX-2 蛋白表达在内核层、神经节细胞层和突破视网膜内界膜的新生血管(3.89 ± 0.56)。两者表达呈显著正相关($r = 0.394, P < 0.01$)。
结论:在视网膜新生血管形成中存在 Survivin 和 COX-2 的高表达,且两者表达密切相关。
关键词:视网膜新生血管;存活素;环氧合酶-2
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.01.09

引用:刘宁宁,赵宁,柳力敏,等.环氧合酶-2 和存活素在视网膜新生血管中的表达.国际眼科杂志 2013;13(1):46-48

0 引言

血管发生(angio genesis)是指从已有的毛细血管或毛细血管后静脉发展而形成的新的血管^[1]。病理状态下,血管促进和抑制因子失去动态平衡,血管发生加速,如糖尿病视网膜病、肿瘤等^[2,3],引发一系列病理改变。Survivin 是最近发现的一种凋亡抑制蛋白,在正常成人组织无表达,而在几乎所有常见的肿瘤组织中表达上调,Survivin 通过抑制肿瘤细胞凋亡参与肿瘤的发生发展^[4,5]。COX-2 是环氧化酶(Cyclooxygenase, COX)异构体之一,它可通过多种途径参与肿瘤的发生。其中细胞凋亡受抑是 COX-2 促进恶性肿瘤进展的主要分子机制之一。目前关于 Survivin 在视网膜新生血管中的表达及是否与 COX-2 相关研究甚少,本研究通过高氧诱导的视网膜新生血管模型检测 Survivin 和 COX-2 蛋白的表达并探讨二者的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 7 天龄健康 C57BL/6J 幼鼠 28 只,由中国医科大学实验动物中心提供。兔抗鼠、人 COX-2, Survivin 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司)。异硫氰酸葡聚糖荧光素(FITC),美国 Sigma 公司。测氧仪(杭州立华仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型的制作 选择7天龄健康C57BL/6J幼鼠28只随机分成2组:组1(正常对照组)14只,与哺乳母鼠一起在正常氧环境下饲养;组2(给氧组)14只,与哺乳母鼠一起置于密闭玻璃容器内。玻璃容器内接入100%湿润医用纯氧气,氧气的流量控制在0.5~0.75L/min,使容器内氧气分压为75%±2%,期间用测氧仪持续监测容器内的氧分压。每2d打开氧箱更换垫料,加食,换水,替换母鼠1次。在此高氧环境下饲养5d后回到正常氧环境下饲养5d。

1.2.2 荧光素血管灌注及视网膜铺片 给氧组和对照组各取幼鼠4只,均于生后第17d进行乙醚麻醉,取相对分子量 2×10^6 荧光素粉FITC 50mg,溶于1mL的磷酸盐缓冲液(PBS)中,心腔内注射。立即摘除眼球,4%多聚甲醛固定10min,在解剖显微镜下去除眼前节。完整游离视网膜组织,固定在4%多聚甲醛溶液中3h。然后将视网膜放射状切开5~6刀,平铺到载玻片上,滴上少许中性树脂胶后,加盖玻片,荧光显微镜观察。

1.2.3 视网膜组织切片制作及观察 两组中各取10只幼鼠,均于生后第17d处死。眼球摘除后放入4%多聚甲醛中固定24h。常规脱水,石蜡包埋,苏木素-伊红(HE)染色,显微镜下观察结果。每只眼球取20张切片,相邻两张切片间隔30 μ m;用双盲法计数血管内皮细胞核,统计平均每只眼球每张切片突破内界膜的内皮细胞核数。选取切片时应避开视乳头周围;计数血管内皮细胞核时仅计数与内界膜有关系的血管内皮细胞核。

1.2.4 免疫组织化学检测及观察 从两组中各随机抽取10张未经染色的6 μ m切片,按链霉素抗生物素蛋白-生物素复合物(SABC)法进行Survivin和COX-2免疫组织化学检查,抗体工作浓度分别为1:200,1:100。以PBS代替一抗作为阴性对照,二氨基联苯胺(DAB)显色。Survivin和COX-2表达的阳性细胞为细胞浆着淡黄色至棕褐色颗粒。图像分析:每张切片在400倍光镜下,随机选取5个视野,利用计算机图像分析仪(LUZEX-F,日本)进行灰度扫描,分别测定Survivin和COX-2积分光密度值(IOD),取其平均值作为分析指标。

统计学分析:采用SPSS 10.0软件包进行统计学分析,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本t检验。Survivin和COX-2表达相关分析采用Spearman,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光素灌注视网膜血管铺片 对照组在生后第17d时,视网膜血管基本成熟,自视盘发出的大血管向四周呈放射状均匀分布,直至视网膜周边部(图1A)。给氧组在生后第17d,大血管显著扩张,大片无灌注区,大量新生血管形成(图1B)。

2.2 视网膜新生血管细胞核计数结果 对照组生后第17d,新生鼠20眼400张组织切片中未发现或仅在极少数切片中见到突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核,平均每张切片中新生血管内皮细胞核数少于 0.27 ± 0.20 个。10只给氧组生后第17d新生鼠20眼400张组织切片,可见较多突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核,平均每张切片中新生血管内皮细胞核数为 23.38 ± 1.07 个(图2)。与对照组相比差异有极显著性意义($t = 9.454, P < 0.01$)。

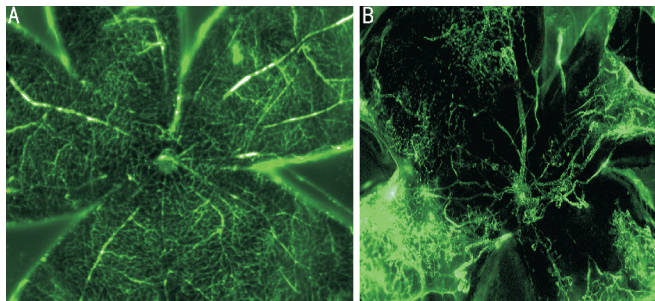


图1 小鼠荧光素灌注视网膜血管铺片($\times 200$) A:对照组;B:给氧组。

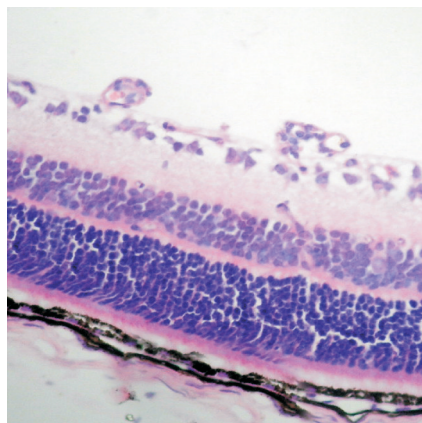


图2 给氧组17天龄小鼠视网膜HE染色(DAB $\times 200$)。

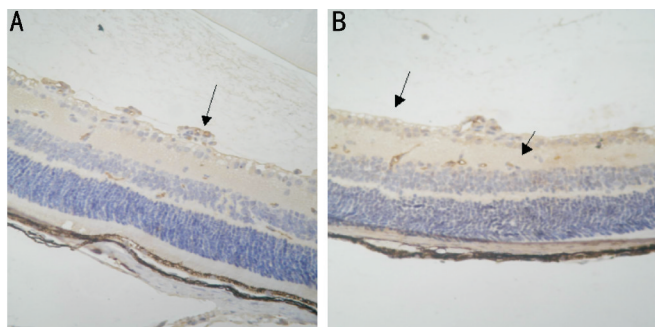


图3 给氧组17d龄小鼠视网膜中两种蛋白的表达(DAB $\times 200$) A:Survivin;B:COX-2。

表1 两组小鼠视网膜Survivin和COX-2的IOD比较 $\bar{x} \pm s$

分组	IOD	
	Survivin	COX-2
对照组	2.56 ± 0.46	2.37 ± 0.80
给氧组	3.34 ± 0.40	3.89 ± 0.56
t	9.23	5.80
P	<0.001	<0.001

2.3 视网膜组织Survivin和COX-2蛋白的表达 正常对照组:视网膜组织各层中未见Survivin和COX-2蛋白表达。给氧组:Survivin蛋白表达在神经节细胞层和突破视网膜内界膜的新生血管(图3A),COX-2蛋白表达在内核层、神经节细胞层和突破视网膜内界膜的新生血管(图3B)。给氧组Survivin和COX-2 IOD均明显高于对照组(表1)。

2.4 Survivin与COX-2蛋白相关分析 Survivin与COX-2蛋白在小鼠视网膜中表达呈正相关($r = 0.394, P < 0.01$)。

3 讨论

视网膜新生血管的发生、发展与眼组织缺血缺氧关系

密切,本实验通过高氧诱导小鼠建立视网膜新生血管模型观察到给氧组每只眼均可见到突出内界膜的新生血管。

目前,视网膜新生血管的形成机制研究仍是眼科的热点。而COX-2在新生血管中的作用也逐渐被人们所重视。环氧化酶存在两种同工酶,即COX-1和COX-2。两种酶的生理意义不同,COX-1是结构酶,在大多数正常人体组织中表达,其基本作用是维持机体的生理过程,保持内环境的稳定;COX-2为诱导酶,生理状态下多数细胞中不存在这种酶,但是在细胞因子、生长因子、癌基因等刺激因子的作用下,COX-2可被诱导表达,并参与炎症反应、细胞增殖及分化过程。近年来大量研究表明^[6,7],COX-2在多种肿瘤中有较高的表达,并认为参与了肿瘤新生血管的生成。COX-2对新生血管形成的调控有以下几种可能的机制:(1)诱导单核巨噬细胞、肿瘤细胞等产生血管内皮生长因子等血管生长因子^[8];(2)通过影响Survivin和Bcl-2等表达而抑制血管内皮细胞的凋亡^[9-11];(3)组织产生的PGE₂和PGF₂及血栓素A₂等直接促进血管生成;在眼中,前列腺素COX-2途径的血管效应主要是血管扩张,而对COX-2参与眼部血管生成的研究很少。Wilkinson-Berka等^[12]在氧致血管增殖性视网膜病变的C57BL/6鼠模型(ROP)中,向腹膜内注射COX-2选择性抑制剂Rofecoxib 15 mg/(kg·d),观察其对视网膜新生血管的抑制作用,应用COX-2选择性抑制剂可以抑制视网膜新生血管生成。本研究发现COX-2蛋白表达在内核层、神经节细胞层和突破视网膜内界膜的新生血管,提示COX-2在视网膜血管形成过程中起着重要作用。同样,Sennlaub等^[13]实验研究发现,COX-2选择性抑制剂APHS可明显抑制缺血性增殖性视网膜病变引起的玻璃体内的新生血管。

大量研究表明^[14,15],抑制肿瘤细胞凋亡是Survivin和COX-2参与肿瘤发展的共同机制。COX-2抑制剂塞来昔布能够激活Caspase-3和Caspase-9途径,诱导肝脏胆管细胞癌的凋亡^[16]。Barnes等^[17]在乳腺癌研究中发现COX-2和Survivin蛋白的表达呈正相关,认为COX-2和Survivin双表达是乳腺癌患者术后复发的危险因素。

Survivin是最近发现的一种新的凋亡抑制蛋白(IAP)家族成员之一,是迄今最小的hIAP蛋白。Survivin表达于胚胎和发育的胎儿组织,但不见于终末分化的成人组织,而其特异性地表达于肿瘤组织。体内外实验表明^[18,19],抑制Caspase-3和Caspase-7活性是Survivin抗细胞凋亡的重要分子机制。我们观察了视网膜新生血管中COX-2和Survivin蛋白的表达,并探讨两种相关因子的关系,结果显示,COX-2蛋白表达在内核层、神经节细胞层和突破视网膜内界膜的新生血管,其表达空间范围大于Survivin蛋白的表达,同时COX-2与凋亡抑制蛋白Survivin的表达呈显著正相关($r=0.394, P<0.01$),提示COX-2上调Survivin表达而抑制细胞凋亡,推测在视网膜新生血管形成的早期存在COX-2和Survivin两者协同效应,共同发挥着抗凋亡作用,从而加速新生血管的发展。在两者共同的表达中,可能存在着中介物质,在多因素的协同作用下抑制细胞的凋亡,随着深入开展相关研究,将帮助我们进一步明确新生血管的发生、发展机制。

参考文献

- 1 McNamara DA, Harmey JH, Walsh TN, *et al.* Significance of angiogenesis in cancer therapy. *Br J Sur* 1998;85:1044-1055
- 2 Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1: 27-31
- 3 Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257
- 4 Chen Z, Liu N, Zhu G, *et al.* Targeting of the anti-apoptotic gene survivin in human thyroid carcinoma. *Int J Mol Med* 2012;30(3):465-472
- 5 Wang F, Shan Y. Sulforaphane retards the growth of UM-UC-3 xenografts, induces apoptosis, and reduces survivin in athymic mice. *Nutr Res* 2012;32(5):374-380
- 6 Gois E Jr, Daniel RA, Parra RS, *et al.* Hyperbaric oxygen therapy reduces COX-2 expression in a dimethylhydrazine-induced rat model of colorectal carcinogenesis. *Undersea Hyperb Med* 2012;39(3):693-698
- 7 Zhu JL, Zhang GL, Lu HJ. CD24, COX-2, and p53 in epithelial ovarian cancer and its clinical significance. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012;4:2745-2751
- 8 Bamba H, Ota S, Kato A, *et al.* Effect of prostaglandin E1 on vascular endothelial growth factor production by human macrophages and colon cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2000;19(2):219-223
- 9 Yang Y, Zhu J, Gou H, *et al.* Clinical significance of Cox-2, Survivin and Bcl-2 expression in hepatocellular carcinoma (HCC). *Med Oncol* 2011;28(3):796-803
- 10 Oconnor DS, Schechner JS, Adida C, *et al.* Control of apoptosis during Angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol* 2000;156(2):393-398
- 11 Yu J, Leung WK, Ebert MP, *et al.* Increased expression of Survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *Br J Cancer* 2002;87(1):91-97
- 12 Wilkinson-Berka JL, Alousis NS, Kelly DJ, *et al.* COX-2 inhibition and retinal angiogenesis in a mouse model of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(3):974-979
- 13 Sennlaub F, Valamanesh F, Vazquez-Tello A, *et al.* Cyclooxygenase-2 in human and experimental ischemic proliferative retinopathy. *Circulation* 2003;108:198-204
- 14 Pazhang Y, Ahmadian S, Javadifar N, *et al.* COX-2 and survivin reduction may play a role in berberine-induced apoptosis in human ductal breast epithelial tumor cell line. *Tumour Biol* 2012;33(1):207-214
- 15 Kim GY, Lim SJ, Kim YW. Expression of HuR, COX-2, and survivin in lung cancers; cytoplasmic HuR stabilizes cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinomas. *Mod Pathol* 2011;24(10):1336-1347
- 16 Wu T, Leng J, Han C, *et al.* The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib blocks phosphorylation of Akt and induces apoptosis in human cholangiocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2004;3(3):299-307
- 17 Barnes N, Haywood P, Flint P, *et al.* Survivin expression in situ and invasive breast cancer relates to COX-2 expression and DCIS recurrence. *Br J Cancer* 2006;94(2):253-258
- 18 Shin S, Sung BJ, Cho YS, *et al.* An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001;40(4):1117-1123
- 19 Nassar A, Lawson D, Cotsonis G, *et al.* Survivin and caspase-3 expression in breast cancer: correlation with prognostic parameters, proliferation, angiogenesis, and outcome. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008;16(2):113-120