

缺氧诱导因子-1 α 及促红细胞生成素在大鼠角膜新生血管中的表达

王济民¹, 石蕊², 魏会玲¹, 马勇², 高丹¹

作者单位:¹(715100) 中国陕西省大荔县人民医院眼科;
²(710068) 中国陕西省西安市, 陕西省人民医院眼科
作者简介: 王济民, 副主任医师, 研究方向: 白内障、青光眼及眼表疾病。

通讯作者: 王济民. 2570636014@163.com

收稿日期: 2014-05-24 修回日期: 2014-11-21

Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and erythropoietin at corneal neovascularization in rats

Ji-Min Wang¹, Rui Shi², Hui-Ling Wei¹, Yong Ma², Dan Gao¹

¹Department of Ophthalmology, Dali County Hospital, Dali 715100, Shaanxi Province, China; ²Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Ji-Min Wang. Department of Ophthalmology, Dali County Hospital, Dali 715100, Shaanxi Province, China. 2570636014@163.com

Received: 2014-05-24 Accepted: 2014-11-21

Abstract

• AIM: To describe the expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and erythropoietin (EPO) in rats' corneal and evaluate its potential effect on corneal neovascularization (CNV) growth.

• METHODS: The young SD rats (3mo) was chosen and randomly divided into 2 groups, which were experimental group and normal control group. CNV model was established by alkali burn, and the length and area of CNV was observed everyday after operation by slit lamp. After that, the expression of HIF-1 α and EPO was measured by SABC and RT-PCR methods at 1, 3, 5, 7, and 14d after alkali burn. The data was analyzed by SPSS 20.0.

• RESULTS: The area of CNV was increasing at 1, 3, 5, 7, and 14d after alkali burn, and the peak point appear at 7d. The growth speed was decreased after 14d. SABC method told us that no HIF-1 α and very tiny amount EPO was detected at normal rats' corneal. The expression of the two factors increased at 1d after alkali burn in corneal epithelium and endoderm. The results of RT-PCR showed that a few amounts of HIF-1 α and EPO mRNA were detected at normal group. The expression of the

two factors was increased at 3d after alkali burn, and the peak value was found at 7d, however, it was decreased at 14d. Statistical difference was found at different time ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: HIF-1 α and EPO is closely related to CNV.

• KEYWORDS: corneal neovascularization; alkali burn; hypoxia-inducible factor-1 α ; erythropoietin

Citation: Wang JM, Shi R, Wei HL, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and erythropoietin at corneal neovascularization in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(12):2139-2142

摘要

目的: 探讨缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 及促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 在碱烧伤大鼠角膜组织中的表达, 评估其在角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 发生发展中的作用。

方法: 健康 3 月龄 SD 大鼠, 随机分为实验组和对照组, 碱烧伤法建立 CNV 模型, 分别于造模成功后 1, 3, 5, 7, 14d 测量 CNV 的长度并计算面积, 同时取角膜组织以免疫组织化学检测 HIF-1 α 及 EPO 的表达部位, 并以 RT-PCR 法检测其 mRNA 的表达情况, 实验数据采用 SPSS 20.0 处理。

结果: 碱烧伤后 1, 3, 5, 7, 14d, CNV 的面积随时间逐渐增加, 7d 生长最为旺盛, 14d 后生长减慢。免疫组织化学提示: 正常角膜各层未见 HIF-1 α 的表达, 可见微量 EPO, 碱烧伤后 1d 时 HIF-1 α 及 EPO 免疫活性增强, 主要表达于角膜上皮及内皮层。RT-PCR 结果显示 HIF-1 α 及 EPO mRNA 的表达在正常大鼠角膜组织中表达极少, 在角膜碱烧伤后 3d 表达增强, 7d 达到高峰, 14d 后明显下降; 不同时间点组间比较存在统计学差异 ($P < 0.05$)。

结论: HIF-1 α 和 EPO 与 CNV 的形成密切相关。

关键词: 角膜新生血管; 碱烧伤; 缺氧诱导因子-1 α ; 促红细胞生成素

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2014.12.08

引用: 王济民, 石蕊, 魏会玲, 等. 缺氧诱导因子-1 α 及促红细胞生成素在大鼠角膜新生血管中的表达. 国际眼科杂志 2014; 14(12):2139-2142

0 引言

眼部碱烧伤是最常见的眼外伤之一, 而角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV) 的形成是眼部创伤修复的常见并发症, 可严重影响视力恢复, 也是角膜移植排斥反应发生的高危因素^[1]。目前临床上仍缺乏满意的治

疗手段,其主要原因是 CNV 的发生机制尚未完全明了,而研究 CNV 发生初期的病变过程,对于阻止 CNV 的发生发展具有重要的意义。

研究发现,碱烧伤后组织微环境破坏,角膜的缺血缺氧状态、角膜缘干细胞损伤、炎症反应、细胞因子调控等多种因素均可能与 CNV 的发生有关^[2],其中缺氧可能是碱烧伤致 CNV 发生的始发因素之一^[3]。资料显示,缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)是缺氧状态下特异性发挥活性的转录因子,其在眼部缺氧致增殖性视网膜血管新生的过程中发挥着重要作用^[4],同时促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)也与此过程密切相关^[5],然而有关 HIF-1 α 及 EPO 的相互作用及其在 CNV 发生中的作用却鲜有报道。本研究通过碱烧伤建立大鼠 CNV 模型,观察 CNV 的生长情况,并应用免疫组织化学及 RT-PCR 法检测大鼠 CNV 组织中 HIF-1 α 及 EPO 的表达情况,初步探讨缺氧与 CNV 发生发展的关系,评估 HIF-1 α 及 EPO 在 CNV 发生中的可能机制,为临床 CNV 的诊治提供方向和依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康3月龄清洁级SD大鼠28只,体质量200~250g,雌雄不限,实验前裂隙灯显微镜检查双眼无疾患。随机分成两组,碱烧伤实验组25只,正常对照组3只。实验组右眼行角膜碱烧伤建立CNV模型,左眼以生理盐水作为实验对照。在动物饲养及实验过程中,严格遵守实验动物有关规定。

1.1.2 实验试剂 一抗:兔抗大鼠HIF-1 α 及EPO单克隆抗体(武汉博士德公司),SABC试剂盒和DAB显色试剂盒(北京中杉生物技术有限公司),自配PBS缓冲液,RT-PCR kits(美国MBI公司),PCR引物(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备 氯胺酮50mg/kg和异丙嗪25mg/kg按1:1比例混合背部皮下注射全身麻醉,爱尔凯因点眼3次表面麻醉。棉片清除结膜囊液体,直径2~2.5mm的圆形滤纸片浸入1mol/L NaOH溶液1min后,待滤纸片达饱和后置于大鼠右眼角膜中央10s,取下滤纸,用0.9%生理盐水冲洗角膜及结膜囊1min^[6];大鼠左眼用0.9%生理盐水代替1mol/L NaOH溶液做自身对照,碱烧伤后3d每日滴抗生素眼药水及眼膏预防感染。

1.2.2 角膜新生血管的模型观察 造模后14d内,每天用裂隙灯显微镜观察角膜形态学改变,包括角膜水肿情况、CNV出现时间、长度,并计算面积。角膜水肿程度参考Seo等^[6]分级标准:0级,无水肿;1级,轻度水肿;2级,水肿明显。CNV出现后,每天用游标卡尺测量自角膜缘长出的新生血管长度,每次测量时以连续弯曲度小、朝向角膜中心生长的最长血管的垂直长度为准,并按照Robert电脑数字公式^[7] $S=C/12 \times 3.14 \times [r^2 - (r-l)^2]$ 计算CNV面积。其中C为新生血管累及角膜的圆周钟点数,r为角膜半径(大鼠角膜半径约为3.5mm),l为CNV从角膜缘深入角膜的长度。

1.2.3 角膜组织病理学检查 分别于碱烧伤后1,3,5,7,14d各时间点取5只兔,处死后摘除双眼眼球,剪下带

1mm宽巩膜的角膜(含角膜缘)后,取新生血管生长侧2/3角膜组织,对半剪开,一半用40%多聚甲醛固定后石蜡包埋用于免疫组织化学染色,另一半用于RT-PCR分析。

1.2.4 免疫组织化学检测角膜组织中HIF-1 α 及EPO蛋白的表达 取角膜切片采用免疫组织化学染色法(SABC法)检测HIF-1 α 及EPO的表达,按照试剂盒说明操作,常规脱蜡,PBS冲洗,92 $^{\circ}$ C~98 $^{\circ}$ C热抗原修复15min,室温冷却2h,PBS冲洗,正常山羊血清封闭10~15min,分别滴加一抗兔抗大鼠HIF-1 α 及HPO单克隆抗体(工作浓度为1:100),4 $^{\circ}$ C冰箱过夜,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育40min,滴加SABC工作液,37 $^{\circ}$ C孵育20min,DAB显色,苏木素复染,脱水、透明、封片,PBS缓冲液分别代替一抗经上述步骤染色作空白对照。光学显微镜下观察角膜组织免疫组织化学染色结果。以细胞膜和(或)细胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞。

1.2.5 半定量RT-PCR检测CNV组织中HIF-1 α 及EPO mRNA的表达 实验操作步骤:(1)角膜总RNA提取:新鲜角膜标本行组织匀浆,加入1mL Trizol,吹吸混匀后转入1.5mL Ep管中,氯仿提取法提取角膜总RNA。(2)逆转录反应合成cDNA:按照逆转录试剂盒说明操作。反应条件:第一步70 $^{\circ}$ C 5min,第二步37 $^{\circ}$ C 5min,第三步42 $^{\circ}$ C 60min,70 $^{\circ}$ C 10min备用。(3)RT-PCR:EPO 20 μ L反应体系,含Taq DNA聚合酶(5U/mL)1 μ L,25mmol/L MgCl₂ 5 μ L,上游引物1 μ L,下游引物1 μ L,cDNA 2 μ L,ddH₂O 10 μ L。其中上游引物序列:5'-CGCCTCATTTGCGACAG-3',下游引物序列:5'-AGTGGAGCGGCTTGGGT-3'。反应条件:第一步:94 $^{\circ}$ C预变性5min,然后94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 45s,总共30个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10min。HIF-1 α 20 μ L反应体系:(1)引物:上游引物:5'-CCAGATTCAAGATCAGCCAGCA-3',下游:5'-GCTGTCCACATCAAAA GCGTACTCA -3';(2)反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性30s;95 $^{\circ}$ C反应5s,60 $^{\circ}$ C退火31s,40个循环。分别取5 μ L PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳。PCR产物采用Eagle eye II图像分析仪进行灰度值分析。结果以EPO与内参照 β -actin mRNA扩增产物的灰度相对比值表示。

统计学分析:数据资料用SPSS 20.0统计软件包处理,所有数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,其中两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜形态学观察 碱烧伤后1d,角膜轻度水肿,未见新生血管生长;实验组最早第2d见新生血管芽长入角膜缘;碱烧伤后4d,CNV长入角膜缘内,呈毛刷状,达1mm左右;7d到达4mm,血管生长旺盛,出现分枝状吻合;10d时生长达高峰,此后生长速度减慢;14d时CNV达7mm,血管继续变粗、变长,但变得稀疏,面积仍进一步增加。统计学分析显示:碱烧伤后1,3,5,7,14d,随时间延长,角膜水肿加重,CNV逐渐增长,10~14d后角膜水肿减轻,CNV生长速度减慢。实验对照组未发现角膜水肿及明显CNV长入,其中实验组与实验对照组及正常对照在角膜水肿程度及新生血管面积组间差异存在统计学意义($P < 0.05$;表1,2;图1)。

表1 碱烧伤后实验组不同时间角膜水肿分级数比率 眼 (%)

时间	0级	1级	2级
1d	1(20)	4(80)	0
3d	0	4(80)	1(20)
5d	0	3(60)	2(40)
7d	0	1(20)	4(80)
14d	0	4(80)	1(20)

表2 实验组不同时间 CNV 长度及面积 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

CNV	1d	3d	5d	7d	14d
长度(mm)	0.00±0.00	0.85±0.17	2.21±0.10	5.49±1.24	6.15±0.64
面积(mm ²)	0.00±0.00	8.89±1.37	18.11±2.23	33.40±2.01	36.13±0.89

2.2 各组大鼠角膜组织中 HIF-1 α 及 EPO 蛋白的表达

HIF-1 α 在正常大鼠角膜无表达,EPO 在角膜上皮及内皮中有微弱表达。碱烧伤后二者主要表达在大鼠角膜上皮细胞、内皮细胞以及新生血管内皮细胞中,棕黄色颗粒为阳性信号。其表达于碱烧伤后 3d 开始增强,5d 进一步增强,7d 时表达最明显,角膜碱烧伤后 14d 角膜组织的 HIF-1 α 及 EPO 表达水平逐渐降低,二者在表达部位及程度上较为一致。

2.3 各组大鼠 CNV 组织中 HIF-1 α 及 EPO mRNA 的表达

RT-PCR 显示,在 380bp 处检测到 EPO mRNA 扩增产物的表达,201bp 处检测到 β -actin 扩增产物的表达,图 2A 为 EPO 与 β -actin mRNA 扩增产物的灰度相对比值的图示,其表达量在 1,3,5,7,14d 不同程度增高,7d 时表达量最高,14d 后逐渐下降,但仍高于正常。HIF-1 α 与 EPO mRNA 的表达量基本一致(图 2B)。采用单因素方差分析结果表明,各时间点角膜组织中 EPO mRNA 的表达差异有统计学意义($F=802.21, P=0.000$)。

3 讨论

CNV 是角膜碱烧伤的常见并发症,而碱烧伤后新生血管的形成过程是极其复杂的病理生理过程。近年研究发现,碱烧伤致角膜微环境改变致角膜组织严重缺血缺氧可能为 CNV 形成的首发因素,从而启动一系列细胞因子的级联反应,最终致 CNV 的形成^[8]。HIF-1 α 是至今发现在缺氧状态下特异性发挥活性的核转录因子,并且对其下游基因的稳态表达起着有效地调控作用,如 EPO 编码 α 基因、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 编码基因^[9] 等。由此推测,HIF-1 α 和 EPO 可能在角膜碱烧伤的血管新生的过程中发挥重要作用。

HIF-1 是一个异源二聚体,是细胞生成、血管生长、血流供应、氧化和能量代谢相关基因转录和表达的一个重要调节基因^[10],由 HIF-1 α 亚单位和 HIF-1 β 亚单位组成,其中 HIF-1 α 亚单位是唯一的氧调节亚基,受低氧诱导,它决定 HIF-1 的活性^[11]。它与靶基因结合,促进其转录,使机体产生一系列缺氧适应反应,对于低氧环境中组织和细胞的生存、生长具有重要意义。其它领域的研究发现,在对心肌梗死、肿瘤等的研究中已经有人报道了 HIF-1 α 与新生血管的密切关系^[12]。我们的实验形态学结果提示:碱烧伤后 1~7d, CNV 逐渐形成并增长,7d 后生长速度逐渐增快,新生血管粗大,生长旺盛,10d 达

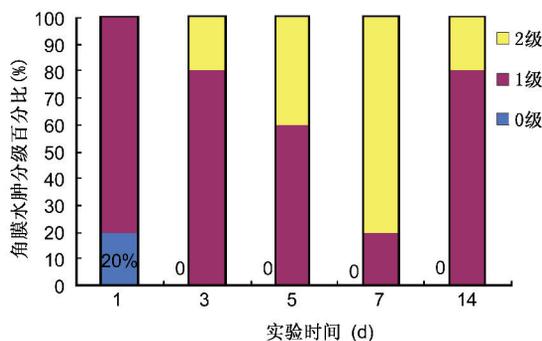


图1 碱烧伤后不同时间角膜水肿分级数比率。

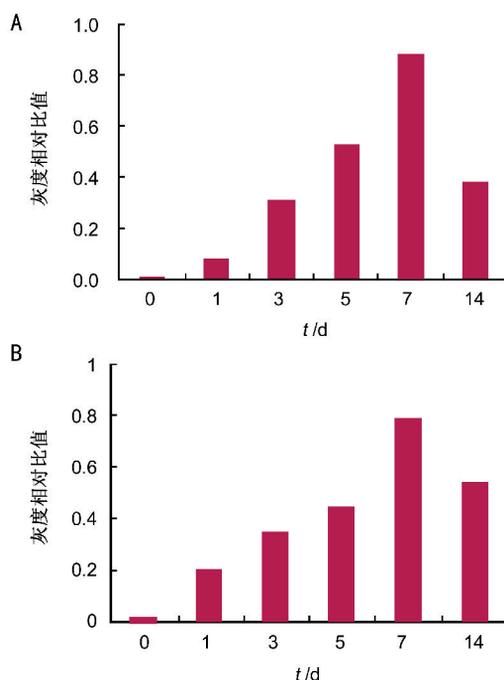


图2 各组大鼠不同时间点角膜组织中 EPO 和 HIF-1 α mRNA 的表达 A: EPO/ β -actin; B: HIF-1 α / β -actin。

高峰,此后逐渐退化,14d 时 CNV 长度增长,但变得稀疏。与此同时,我们观察正常对照组大鼠角膜组织中未发现 HIF-1 α 蛋白的表达,碱烧伤后 1d 其表达逐渐出现,且随着时间推移表达量逐渐增强,7d 时表达最明显,14d 时虽 CNV 面积较 7d 时增长,但 HIF-1 α 蛋白的表达下降,且两种检测方法记录的结果一致;由此推测,碱烧伤致组织缺氧可能在早期敏感地刺激 HIF-1 α 的表达,HIF-1 α 的表达进一步刺激各种血管形成因子,启动 CNV 的生长,7d 时其表达量达高峰,从而 CNV 的生长旺盛,管径增粗,分支吻合;随着其表达量的逐渐下降,可能通过某种方式影响血管形成网络,从而 CNV 生长进入退化期,但因其表达持续存在,故 CNV 仍进一步生长,但速度明显减慢。那么,HIF-1 α 在碱烧伤初期又是如何启动血管新生的过程并且影响血管生长网络表达呢?

资料显示,HIF-1 α 是至少 20 个红细胞生成和血管发生基因的转录激活子,包括 EPO、转铁蛋白、VEGF 以及一系列葡萄糖代谢的重要基因。其中 EPO 是一种糖基化蛋白质激素,其产生由组织的氧合状态调节,缺氧是其最强的诱导因子^[13,14],而 HIF-1 α 恰好控制着这一过程^[15]。我们对 EPO 的观察发现,正常大鼠角膜组织中有微量 EPO 的表达,这可能与其本身为造血生长因子有

关。碱烧伤后1d缺氧敏感刺激HIF-1 α 表达,同时EPO的表达也逐渐增强,其在表达部位及强度上与HIF-1 α 基本一致,提示二者之间可能有密切的相互调控关系。因此我们推测,HIF-1 α 及EPO均可能参与CNV的形成过程,维持角膜在缺氧状态下的组织修复,但其具体的相互调控方式还不明了,尚需后续进一步研究。

结合本次实验结果,我们认为碱烧伤致CNV形成可能的病理机制为:角膜碱烧伤后1d时,结膜严重缺血、坏死和角膜缘血栓形成,干细胞破坏,形成重度组织缺血缺氧微环境,此时白细胞趋化和浸润,诱发组织炎症反应,各种刺激因素首先诱导HIF-1 α 表达增强,其进一步刺激EPO的表达,促进血管新生,损伤后7d各种原因所致组织缺氧达高峰,同时HIF-1 α 和EPO的表达最强,此后随着组织各种代偿机制的启动,角膜缺氧状态改善,HIF-1 α 和EPO的表达减弱,CNV生长减慢,并逐渐出现部分退化。由此认为,HIF-1 α 可能是CNV发生的重要始动因素之一,其通过调节EPO及各种血管生成因子的表达而参与CNV的发生发展。

参考文献

- 1 Onder HI, Erdurmus M, Bucak YY, *et al.* Inhibitory effects of regorafenib, a multiple tyrosine kinase inhibitor, on corneal neovascularization. *Int J Ophthalmol* 2014;7(2):220
- 2 Hoffart L, Matonti F, Conrath J, *et al.* Inhibition of corneal neovascularization after alkali burn: comparison of different doses of bevacizumab in monotherapy or associated with dexamethasone. *Clin Exp Ophthalmol* 2010;38(4):346-352
- 3 Rodrigues M, Xin X, Jee K, *et al.* VEGF secreted by hypoxic Müller cells induces MMP-2 expression and activity in endothelial cells to promote retinal neovascularization in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes* 2013;62(11):3863-3873
- 4 Dursun A, Arici MK, Dursun F, *et al.* Comparison of the effects of

- bevacizumab and ranibizumab injection on corneal angiogenesis in an alkali burn induced model. *Int J Ophthalmol* 2012;5(4):448
- 5 Baltaziak M, Wincewicz A, Kanczuga - Koda L, *et al.* The relationships between hypoxia-dependent markers: HIF-1 α , EPO and EPOR in colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2013;51(4):320-325
- 6 Seo K, Choi J, Park M, *et al.* Angiogenesis effects of nerve growth factor (NGF) on rat corneas. *J Vet Sci* 2001;2(2):125-130
- 7 王峰,石蕊,赵琳. 兔角膜及房水中VEGF的表达与角膜新生血管形成的相关性. *国际眼科杂志* 2007;7(5):1311-1313
- 8 Shen M, Yuan F, Jin J, *et al.* The effect of TC14012 on alkali burn-induced corneal neovascularization in mice. *Ophthalmic Res* 2014;52(1):17-24
- 9 Oladipupo SS, Hu S, Santeford AC, *et al.* Conditional HIF-1 induction produces multistage neovascularization with stage-specific sensitivity to VEGFR inhibitors and myeloid cell independence. *Blood* 2011;117(15):4142-4153
- 10 Yamakuchi M, Lotterman CD, Bao C, *et al.* P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(14):6334-6339
- 11 易小灵,张明昌,张奕霞,等. HIF-1 α 在大鼠角膜碱烧伤后的作用研究. *眼科研究* 2007;25(8):575-578
- 12 Corzo CA, Condamine T, Lu L, *et al.* HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med* 2010;207(11):2439-2453
- 13 Chen F, Liu Q, Zhang ZD, *et al.* Co-delivery of G-CSF and EPO released from fibrin gel for therapeutic neovascularization in rat hindlimb ischemia model. *Microcirculation* 2013;20(5):416-424
- 14 徐静,李楠,张颖,等. 缺氧诱导因子-1 α 及促红素在糖尿病大鼠肾组织中的表达. *西安交通大学学报(医学版)* 2013;1:77-80
- 15 Wang Y, Yin H, Chen P, *et al.* Inhibitory effect of canstatin in alkali burn-induced corneal neovascularization. *Ophthalmic Res* 2011;46(2):66-72