

HIF-1 α 及 VEGF 在增生性糖尿病视网膜病变视网膜前膜中的表达

曹建峰¹, 庞东渤¹, 叶文婕²

作者单位:¹(121001)中国辽宁省锦州市,辽宁医学院第一附属医院眼科;²(225000)中国江苏省扬州市,扬州中医院心内科
作者简介:曹建峰,硕士,主治医师,研究方向:眼底病。
通讯作者:庞东渤,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼底病、青光眼. pang2000@163.com
收稿日期:2013-02-19 修回日期:2013-04-25

The expression of HIF-1 α and VEGF in proliferative diabetic retinopathy epiretinal membranes

Jian-Feng Cao¹, Dong-Bo Pang¹, Wen-Jie Ye²

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; ²Department of Cardiology, Yangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yangzhou 225000, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Dong-Bo Pang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. pang2000@163.com

Received:2013-02-19 Accepted:2013-04-25

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of the hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and the protein products of its target gene vascular endothelial growth factor (VEGF) in proliferative diabetic retinopathy (PDR) epiretinal membranes.

• **METHODS:** Totally 26 patients who have been obtained epiretinal membranes (PDRV-VI) were performed pars-plana vitrectomy. They were removed the epiretinal membrane intraoperation and to observe HIF-1 α , VEGF and expression of vascular endothelial marker CD34 in epiretinal membranes through immunohistochemical method.

• **RESULTS:** Vascular endothelial cells of PDR expressed HIF-1 α in 24 cases (92.3%) and VEGF in 15 cases (57.7%) in membranes, respectively. There were significant correlations between the numbers of blood vessels expressing CD34 and HIF-1 α ($r=0.556, P=0.028$). There were significant correlations between the numbers of blood vessels expressing CD34 and VEGF ($r=0.745, P=0.001$).

• **CONCLUSION:** HIF-1 α and VEGF may play an important role in the pathogenesis of PDR.

• **KEYWORDS:** proliferative diabetic retinopathy; hypoxia-inducible factor-1 α ; vascular endothelial growth factor

Citation: Cao JF, Pang DB, Ye WJ. The expression of HIF-1 α and VEGF in proliferative diabetic retinopathy epiretinal membranes. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013;13(5):857-860

摘要

目的:研究缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)及其靶基因血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在增殖型性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)视网膜前膜的表达,探讨其在PDR发生发展中的作用。

方法:针对26例PDR V~VI期患者,行玻璃体切除+剥膜术(有合并视网膜脱离者加行视网膜复位术),术中取出视网膜前膜行免疫组织化学染色,观察视网膜前膜中HIT-1 α 与VEGF和血管内皮标志物CD34的表达。同时行术前血糖、甘油三脂、糖化血红蛋白、是否合并视网膜进行术前分类并行多因素Logistic回归分析。

结果:PDR V~VI期视网膜前膜血管内皮细胞中,表达HIT-1 α 者24例(92.3%),VEGF者15例(57.7%),血管内皮标志物CD34者26例(100%)。血管内皮标志物CD34分别与HIT-1 α ($r=0.556, P=0.028$)和VEGF ($r=0.745, P=0.001$)直线相关。术前血糖、甘油三脂、糖化血红蛋白、是否合并视网膜是PDR视网膜前膜中表达因子HIT-1 α , VEGF和CD34表达的相关因素。

结论:HIT-1 α 和VEGF在糖尿病视网膜病变视网膜前膜中明显表达。HIT-1 α 和VEGF可能在PDR的发病中起重要作用。

关键词:增生性糖尿病视网膜病变;缺氧诱导因子-1 α ;血管内皮生长因子

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.05.05

引用:曹建峰,庞东渤,叶文婕. HIF-1 α 及VEGF在增生性糖尿病视网膜病变视网膜前膜中的表达. 国际眼科杂志 2013;13(5):857-860

0 引言

糖尿病是全球性的公共健康问题,受累人数已达到3.8亿。我国糖尿病患者超过1.5亿,其中约80%的患者没有正规地诊治。随着人们生活水平的提高,生活方式的改变,社会的老龄化,糖尿病的发病率呈增长趋势;据估计我国每天至少增加患者3000例,糖尿病已成为影响我国人民群众健康的一个重要疾病。在长期慢性的高糖血症的基础上,糖尿病微血管病变在眼底中表现为糖尿病视网膜病变。已知高糖血症能使红细胞内2,3-二磷酸甘油酸水平降低,红细胞携氧能力减低;使糖基化血红蛋白在血红蛋白中的比例增高,其对氧的亲合力高于正常血红蛋白,使氧不易扩散至组织中;使血液成分的改变以及毛细血管基底膜增厚等,从而引起视网膜组织

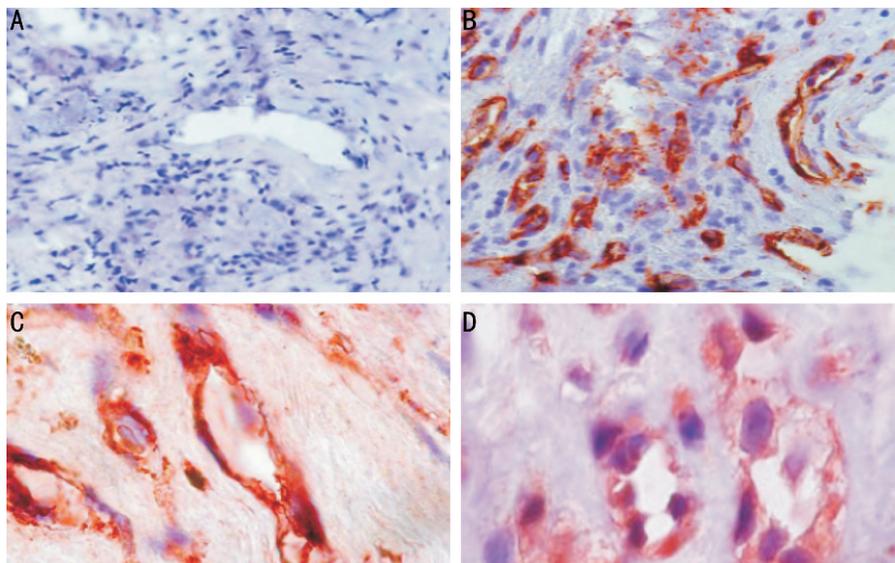


图1 PDR视网膜前膜中CD34和HIF-1 α 与VEGF的表达(SP, $\times 400$) A:阴性对照; B:CD34; C:HIF-1 α ; D:VEGF。

慢性缺血缺氧。低氧能使机体为适应低氧的环境产生一系列的基因表达发生变化,如刺激多种促血管生成因子生成及基质金属蛋白酶、整合素等合成,引起细胞外基质与基底膜溶解、消退,进而细胞迁移、增殖,导致视网膜新生血管生成。因而慢性缺血缺氧导致视网膜机能改变是糖尿病视网膜病变(DR)发生、发展的重要环节,寻找这个过程中的靶点因子对于DR的防治具有重要意义。目前国外研究发现,缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等在增殖型糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)发生、发展的整个过程都发挥着重要的作用。我们对PDR视网膜前膜手术标本进行免疫组织化学染色检测。利用白细胞分化抗原CD34在血管内皮细胞有强阳性表达,是目前检测微血管的可靠标记^[1],作为增殖膜新生血管表达标志。同时检测HIT-1 α 和VEGF等因子在视网膜前膜中表达,探讨PDR的发病机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

收集2011-01/08在辽宁医学院附一院眼科因PDR V~VI期需行玻璃体切割手术的患者26例26眼。PDR患者均为2型糖尿病,符合2002年美国糖尿病协会及WHO制定的诊断标准,PDR诊断标准^[2]为出现以下一种或更多:新生血管、玻璃体积血、视网膜前出血、视网膜脱离。其中男14例14眼,女12例12眼,年龄46~82(平均 56.6 ± 14.1)岁,患者伴牵引性视网膜脱离6眼。术前和术后行视力、裂隙灯、直接(间接)检眼镜、OCT、荧光造影检查。入选标准:(1)年龄 >20 岁,性别不限;(2)因PDR V~VI期接受玻璃体切除术;(3)首次手术。排除标准:(1)年龄 <20 岁;(2)既往进行过玻璃体切除术或孔源性视网膜脱离同时合并糖尿病的患者;(3)其它眼部疾病如青光眼、角膜新生血管等;(4)除糖尿病外的全身性疾病:诊断明确的冠心病、心衰、肾功能不全、血液系统疾病、代谢性疾病等。其中以在镜下观察视盘或视网膜有无新生血管分为活动性或非活动性PDR。

1.2 方法

1.2.1 增生膜标本获取

标准闭合式三切口玻璃体切割术,剥离视网膜前膜,用显微镊取出膜组织;经湿棉签迅速

过渡生理盐水中,然后在显微镜下展平置于滤纸上,转入新鲜配制的10%福尔马林固定液中固定。

1.2.2 免疫组织化学法检测增生膜CD34和HIF-1 α 与VEGF的表达

手术中取出的膜标本立即置于10%福尔马林固定液固定10h以上,常规脱水、透明、石蜡浸蜡、包埋、连续切片4mm厚、摊片、烤片。染色步骤简述如下:常规脱蜡,梯度乙醇脱水,组织抗原修复,阻断内源性过氧化酶的活性,加正常山羊血清封闭,分别加兔抗鼠CD34抗体(1:10)、山羊抗兔HIF-1 α 抗体(1:200)、山羊抗兔VEGF抗体(1:200),链霉菌素-过氧化物酶孵育,DAB显色,苏木素复染,返蓝,梯度乙醇脱水、封片、显微镜观察。

1.2.3 图像处理

26例免疫组织化学标本组织切片用Leica Q550CW图像分析仪(德国)在显微镜校正网格 $\times 400$ 下,取阳性细胞较多的3个视野观察并计数,同时尽可能回避含有大量色素的区域,避免对计数结果的干扰。

统计学分析:在SPSS 11.5软件上运行,计量资料均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行Mann-Whitney Test秩和检验。CD34分别与HIF-1 α 和VEGF进行Pearson直线相关分析。以术前血糖、血脂、糖化血红蛋白、是否合并视网膜脱离分类进行多因素Logistic回归分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PDR增生膜中CD34和HIF-1 α 与VEGF的表达

免疫组织化学图片见图1,阴性对照中HIF-1 α 和VEGF未表达。实验组中PDR V~VI期视网膜前膜血管内皮细胞中,表达HIT-1 α 者24例(92.3%),计数为0~49(平均 20.7 ± 13.6)个;VEGF者15例(57.7%),计数为0~43(平均 9.5 ± 12.9)个;血管内皮标志物CD34者26例(100%),计数为11~83(平均 34.5 ± 16.2)个。活动性PDR与非活动性PDR比较,视网膜前膜中CD34和VEGF的表达量有统计学意义($P < 0.05$),而HIT-1 α 的表达量无统计学意义($P > 0.05$,表1)。

2.2 CD34分别与HIT-1 α 和VEGF直线相关分析

血管内皮标志物CD34分别与HIT-1 α ($r = 0.556, P = 0.028$)与VEGF($r = 0.745, P = 0.001$)直线相关,而HIT-1 α 与VEGF($r = 0.202, P = 0.454$)无相关性(表2)。

表1 PDR 视网膜前膜中表达因子的计数 ($\bar{x} \pm s$, 个)

因子	活动性 PDR (n=11)	非活动性 PDR (n=15)	P
CD34	44.2±17.9	27.3±11.7	0.0386
HIT-1α	17.6±16.8	22.9±12.2	0.3401
VEGF	18.6±16.1	2.9±4.1	0.0275

表2 直线相关分析数据

因子	CD34	HIT-1α
HIT-1α	r=0.556, P=0.028	-
VEGF	r=0.745, P=0.001	r=0.202, P=0.454

表3 多因素 Logistic 回归分析

变量	P	OR 值	95% CI
术前血糖≤8.3mmol/L	0.001	1.358	1.215~3.684
术前血糖>8.3mmol/L	0.000	1.086	1.025~3.072
糖化血红蛋白<6.5mmol/L	0.002	3.468	2.139~6.243
糖化血红蛋白6.5~7.5mmol/L	0.001	5.781	3.256~16.439
糖化血红蛋白>7.5mmol/L	0.001	4.963	2.867~15.169
合并视网膜脱行玻切+视网膜复位术	0.01	3.449	1.289~12.346
无合并视网膜脱单纯行玻切术	0.03	1.956	0.893~3.867
甘油三脂<1.7mmol/L	0.02	2.768	0.983~4.369
甘油三脂≥1.7mmol/L	0.03	2.085	0.917~5.539

2.3 HIT-1α 和 VEGF 与 CD34 表达的多因素 Logistic 回归分析

由表3可知,术前血糖、甘油三脂、糖化血红蛋白、是否合并网脱是 PDR 视网膜前膜中 HIT-1α 与 VEGF 和 CD34 表达量的相关因素。

3 讨论

糖尿病视网膜病变是糖尿病眼部并发症,特别是 PDR 最终可导致不可逆的视力丧失^[3]。其发病机制为多种因素协同作用的结果,包括慢性缺血缺氧、热休克应激、氧化应激反应、自由基的产生、蛋白质的非酶糖基化等。高血糖引起血管障碍,血液凝固系统亢进、纤溶系统功能低下,使视网膜血管尤其毛细血管阻塞,进而造成视网膜缺血缺氧和血液渗漏。典型的组织病理学改变包括足细胞和内皮细胞的丢失以及基底膜的增厚^[4],形成视网膜无灌注区,引起视网膜缺血、缺氧,引起血管生成抑制因子和刺激因子这一对拮抗因子原有平衡被打破,从而刺激新生血管生成^[5]。CD34 抗原是一种阶段特异性白细胞分化抗原,选择性地表达于人类造血干细胞(HSC)、祖细胞(PC)和血管内皮细胞表面。它是分子量为 105~120kD 的高度糖基化 1 型跨膜蛋白,部分氨基酸分析表明,CD34 分子中 35% 的氨基酸由苏氨酸和丝氨酸残基组成。CD34 是一种与新生小血管相关的抗原,其在新生血管内皮中表达远大于非新生血管内皮,提示其作用可能与新生血管生成有关,是最敏感的血管内皮标记物。

本实验结果揭示:(1) 血糖、血脂、糖化血红蛋白、是否合并视网膜脱是 HIT-1α 与 VEGF 和 CD34 表达量的影响因素。我们研究结果表明,在防治 PDR 时不仅要控制血糖,血脂、糖化血红蛋白、是否合并网脱是 PDR 的相关因素。(2) PDR 前膜血管内皮细胞中明显表达 HIT-1α 和 VEGF。HIT-1α 者 24 例(92.3%),计数为 0~49(平均 20.7±13.6)个;VEGF 者 15 例(57.7%),计数为 0~49(平

均 9.5±12.9)个。VEGF 又称血管通透因子(vascular permeability factor, VPF),在 DR 的发病机制中起着十分重要的作用。它首先于 1989 年从牛的垂体滤泡星状细胞培养液中分离纯化,是一种相对分子质量在 46000~48000 之间的糖蛋白二聚体,是血管内皮的强促分裂素。亚基之间通过二硫键相连,该键如被还原,则丧失所有的生物学特性。人 VEGF 基因位于 6p21.3,全长 28kb,编码 VEGF 基因约 14kb,基因由交替剪接 8 个外显子、7 个内含子组成,全长 14000 碱基对。编码产物分子质量为(34~45)×10³的同源二聚体糖蛋白。VEGF 是目前所知最强的内皮细胞选择性促有丝分裂肽和血管生成因子,可刺激血管内皮细胞增殖及移行、细胞外基质变性,诱导新生血管的形成。VEGF 参与 DR 的发病机制为:a 增加血管通透性;b 通过旁分泌作用促进内皮细胞迁移、增生和血管形成;c 上调 ICAM-1 基因表达,VEGF 增加视网膜血管 ICAM-1 的 mRNA 和蛋白质水平,使白细胞粘集,释放多种活性物质破坏血管壁,激活血小板,引起血流缓慢和血栓形成,导致视网膜局部缺血加重和新生血管形成;d 改变细胞外基质;VEGF 改变内皮细胞内某些基因的激活状态,使血浆纤溶酶原激活物等表达上调,导致细胞外基质变性,利于血管生长;e 增加内皮细胞对葡萄糖的转运,细胞内葡萄糖水平增高,通过非酶性糖基化、激活多元醇代谢途径以及诱发二酰甘油一蛋白激酶 C 机制等导致 DR。目前针对 VEGF 的基因治疗,由于具有高度的特异性及选择性,且克服了传统激光及冷凝治疗造成的周边视野缩小的缺点,所以这种抑制 VEGF 活性的基因治疗方法具有很高的应用研究价值和前景,为视网膜缺血增殖性病变的防治提供了一个崭新的方向和途径。(3) PDR 前膜血管表达因子 CD34 分别与 HIT-1α (r=0.556, P=0.028)与 VEGF (r=0.745, P=0.001)直线相关。由此证实下调 HIT-1α 和 VEGF 可减少 PDR 前膜新生血管形成,从而控制 PDR 的进一步发展。HIT-1α 由 A 亚基和 B 亚基组成,其中 HIT-1α 是功能性亚基,决定 HIF-1 的活性,它受缺氧诱导,且只有在缺氧状态下才开始表达,并与结构性 B 亚基结合形成具有活性的 HIF。HIT-1α 在缺氧状态下迅速聚集在细胞核内与 H117-1b 结合,改变包括 iNOS、内皮素-1、VEGF 和红细胞生成素等基因的表达。我们认为,在 PDR 中高血糖除了可以直接损害视网膜血管外,还能引起视网膜组织慢性缺血缺氧,从而促进 HIF-1α 表达上调,进而上调 VEGF 的表达等,参与了糖尿病视网膜病变新生血管的形成。HIT-1α 可作为视网膜疾病的治疗目标,针对 HIT-1α 的基因治疗,一方面,如果要促进血管生成(如色素性视网膜炎),可上调 HIT-1α 水平;另一方面,如果要抑制血管生成(如糖尿病视网膜病变),下调 HIT-1α 就具有关键作用。这对糖尿病视网膜病变的治疗及研究提供了一个新的思路及方向。(4) PDR 前膜血管内皮细胞中 HIT-1α 和 VEGF 表达并无直线相关。HIT-1α 与 VEGF(r=0.202, P=0.454)无直线相关。HIF-1α 是细胞对微环境氧浓度改变的一系列自适应反应中重要的调节因子,是缺氧诱导基因转录的关键环节。徐国兴等^[6]发现,正常大鼠的视网膜中不表达 HIT-1α,而 DR 组中出现明

显的HIT-1 α 表达证实了缺氧在DR发病机制中的重要作用。Treins等^[7]对PDR视网膜检查发现,RPE在增加表达VEGFmRNA的同时,HIF-1 α 的表达也明显增加,推测HIF-1 α 的表达是缺氧状态下导致视网膜新生血管生成的关键。Ozaki等^[8]在缺血性视网膜病变模型中的实验、Yamada等^[9]在日本2型糖尿病HIF基因变化研究及Abu El-Asrar等^[10]研究表明,HIT-1 α 是缺血缺氧诱导细胞产生的核转录因子,能诱导下游VEGF基因的表达。VEGF是HIT-1 α 的靶基因之一,调节VEGF的表达可能是HIT-1 α 参与DR发病的重要作用机制之一。同时叶健华等^[11]研究证实:VEGF不但导致糖尿病微血管病变发生,而且与病变的严重程度密切相关。

我们认为HIF-1 α 是细胞对微环境氧浓度改变的一系列自适应反应中重要的调节因子,是缺氧诱导基因转录的过程中缺氧信息传递的共同通路,这一通路中HIF-1 α 的表达可能起到双面刃作用,一方面它促进细胞代谢,增强细胞对缺氧环境的适应能力,对保护细胞免受缺氧损伤具有积极的作用;另一方面,PDR前膜血管内皮细胞中HIT-1 α 和VEGF表达并无直线相关。HIT-1 α 诱导多种细胞因子的异常表达改变了局部正常的微环境,进而改变了正常的组织结构的功能,导致病变的进一步恶化。因此,如何调节HIT-1 α 的适度表达对于PDR的防治具有重要意义,有待进一步研究。

参考文献

1 Acevedo LM, Londono I, Oubaha M, et al. Glomerular CD34 expression in short- and long-term diabetes. *J Histochem Cytochem* 2008; 56(6):605-614

2 Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T, et al. Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and Vascularendothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2002;134:348-353

3 Lee MH, Atkinson S, Rapti M, et al. The activity of a designer tissue inhibitor of metalloproteinases (TIM-MMP) in a cell-based environment. *Cancer Lett* 2010;290:114-122

4 Arroyo AG, Genis L, Gonzalo P, et al. Matrix metalloproteinases; new routes to the use of MTL-MMP as a therapeutic target in angiogenesis-related disease. *Curr Pharm Des* 2007;13:1787-1802

5 Suojanen J, Salo T, KoiVunen E, et al. A novel and selective membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) inhibitor reduces cancer cell motility and tumor growth. *Cancer Biol Ther* 2009; 8:2362-2370

6 徐国兴, 许建斌, 胡建章. 糖尿病大鼠视网膜中缺氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子表达的研究. *国际眼科杂志* 2008;8(3):487-490

7 Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by advanced glycation end products. *J Bio Chem* 2001;276:4381-4384

8 Ozaki H, Yu AY, Della N, et al. Hypoxia inducible factor-1 α is increased in ischemic retina; temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:182-189

9 Yamada N, Horikawa Y, Oda N, et al. Genetic Variation in the Hypoxia-Inducible Factor-1 α Gene Is Associated with Type 2 Diabetes in Japanese. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(10):5841-5847

10 Abu El-Asrar AM, Missotten L, Geboes K. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and the protein products of its target genes in diabetic fibrovascular epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol* 2007;91(6):822-826

11 叶健华, 马承红, 周斌兵, 等. 血管内皮生长因子在早期糖尿病微血管病变中的变化及意义. *广东药学院学报* 2006;22(2):197-198