

大鼠晶状体胚胎发育形态学变化及 HIF-1 α 的表达

胡 迭, 孟旭霞, 王海韬, 于志颖

作者单位: (266000) 中国山东省青岛市, 青岛大学附属医院眼科
作者简介: 胡迭, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 玻璃体视网膜病。

通讯作者: 孟旭霞, 毕业于青岛大学, 硕士, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 玻璃体视网膜病. mengxuxia@163.com

收稿日期: 2014-06-19 修回日期: 2014-10-13

Morphological changes and expression of HIF - 1 α in rat lens during embryonic development

Die Hu, Xu - Xia Meng, Hai - Tao Wang, Zhi - Ying Yu

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China

Correspondence to: Xu-Xia Meng. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China. mengxuxia@163.com

Received: 2014-06-19 Accepted: 2014-10-13

Abstract

• **AIM:** To investigate the morphological changes and the expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) subunit during embryonic development of rat lens and explore the role of HIF-1 α in lens development process.

• **METHODS:** Thirty clean pregnant Wistar rats were divided into 6 embryon groups, 10-d, 12-d, 14-d, 16-d, 18-d and 20-d embryo. Two embryos were randomized obtained from every pregnant rat. One of the eyeball samples that were parallel to sagittal axis of optic nerve were cut into serial sections, used HE staining and examined by light microscope. Expression of HIF - 1 α protein in lens was detected by immunohistochemistry. The positive expression of HIF - 1 α mRNA of the other eyeball samples was detected by real-time PCR.

• **RESULTS:** In the 10th d of embryo (E10), the formation of lens vesicle were recognized under the light microscope. In the 12th d of embryo (E12), the anteriorly situated cells and posteriorly situated cells have already differentiated. The anteriorly situated cells were epithelium. In the 14th d of embryo (E14), primary fibers which came from posteriorly situated cells were examined. In the 16th d of embryo (E16), the lens epithelium undergoes extensive proliferation, and enlongate into the secondary fibers. In the 20th d of embryo (E20), the lens was maturation. By immunohistochemistry staining, the HIF - 1 α was highly expressed in the lens embryonic development. The expression was gradually promoting from E10 to E16, then

reducing. The lens epithelium expressed more HIF-1 α than fibers. The highest mean density was at E16, the lowest at E20. The difference was significant among of the 6 groups ($P < 0.0001$). The E10 group was combined with the E12 group, the E14 group was combined with the E16 group, showing no significant difference ($P > 0.05$). The other groups were compared with each other, finding significant difference ($P < 0.05$). By the real-time PCR, HIF - 1 α mRNA was highly expressed in the lens development, and was different at different time. The expression of HIF - 1 α mRNA was increasing from E10 to E16, then descending at E18 and E20. The expression of HIF-1 α mRNA was the highest at E16, the lowest at E20. The difference was significant among of the 6 groups ($P < 0.0001$). The E10 group was combined with the E12 group, showing no significant difference ($P > 0.05$). The other groups were compared with each other, finding significant difference ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The lens of Wistar rats differentiate from the E10 when the vesicle formed through the embryo phase. The lens is basic mature before birth. The HIF-1 α in the lens embryonic development is highly expressed and changeful. The varies of HIF-1 α expression is depend upon rat embryo development indicating that HIF - 1 α might participate in the process of development of rat lens.

• **KEYWORDS:** rats; lens; embryonic development; hypoxia-inducible factor-1 alpha

Citation: Hu D, Meng XX, Wang HT, *et al.* Morphological changes and expression of HIF-1 α in rat lens during embryonic development. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(11):1931-1934

摘要

目的: 观察大鼠胚胎发育不同时期晶状体的形态变化及缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 的表达, 探讨 HIF-1 α 在大鼠晶状体胚胎发育过程中的作用。

方法: 清洁级 Wistar 孕鼠 30 只, 分为 6 组, 分别为胚胎第 10, 12, 14, 16, 18, 20d, 每只孕鼠剖腹随机取 2 只胚鼠, 每只胚鼠的一只眼以平行于视神经矢状轴的方向连续切片, 常规 HE 染色, 光镜下观察, 采用免疫组织化学方法检测 HIF-1 α 的阳性表达; 另一只眼采用实时定量 PCR 方法检测晶状体组织中 HIF-1 α mRNA 的阳性表达。

结果: 大鼠胚胎 10d (E10), 晶状体泡形成; 胚胎 12d (E12), 前壁、后壁细胞分化, 前壁细胞发育成上皮细胞; 胚胎 14d (E14), 由后壁细胞发育来的原始纤维形成; 胚胎 16d (E16), 上皮细胞增生活跃, 次级纤维形成; 胚胎 20d (E20), 晶状体基本发育成熟。免疫组织化学染色检测到 HIF-1 α 在胚胎期晶状体中高表达, 上皮细胞较纤维细胞表达强烈。E10 至 E16 表达量升高, E16 达到峰值, 生发

区、过渡区染色最强。E18之后表达量降低,E20最低。6组比较, $P<0.01$,差异有统计学意义。组与组间两两比较,除E10与E12之间,E14与E16之间, $P>0.05$,差异无统计学意义外,余各组间比较, $P<0.05$,差异有统计学意义。实时定量PCR显示,HIF-1 α mRNA在胚胎期晶状体中持续表达,且随着胎龄不同变化,E10至E16,HIF-1 α mRNA表达量升高,E16达到峰值,E18、E20下降。6组比较, $P<0.01$,差异有统计学意义。组与组间两两比较,除E10与E12之间比较, $P>0.05$,差异无统计学意义外,余各组间比较, $P<0.05$,差异有统计学意义。

结论:在大鼠胚胎10d时,晶状体泡形成,发育开始,至出生前基本成熟。HIF-1 α 在晶状体胚胎发育过程中的阳性表达呈现时空变化。HIF-1 α 参与了晶状体的胚胎发育,且在此过程中起重要作用。

关键词:大鼠;晶状体;胚胎发育;缺氧诱导因子-1 α
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.11.04

引用:胡迭,孟旭霞,王海韬,等.大鼠晶状体胚胎发育形态学变化及HIF-1 α 的表达.国际眼科杂志2014;14(11):1931-1934

0 引言

缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1,HIF-1)是目前公认的在低氧状态下诱导细胞进行适应性应答的关键因子之一。HIF-1包括 α 和 β 两种亚基,HIF-1 α 为调节亚基,在低氧性生理、病理条件下表达丰富,与多种肿瘤的发生、发展^[1-3]、骨髓间充质干细胞成血管、成骨过程^[4]、缺血性心血管疾病^[5]密切相关。Shui等^[6]研究发现敲除了HIF-1 α 基因的新生鼠在生后3d即表现出晶状体纤维细胞的异常,生后1mo,晶状体体积较小且纤维细胞杂乱无章,因此HIF-1 α 对于维持晶状体正常生理特性、生后晶状体发育是至关重要的。而关于HIF-1 α 在晶状体胚胎发育过程中的作用,目前却知之甚少。此次实验观察不同胎龄大鼠晶状体的形态结构,并检测HIF-1 α 的表达,分析大鼠晶状体胚胎发育与HIF-1 α 的关系,旨在探讨HIF-1 α 在胚胎晶状体发育过程中的作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级未生产型成年Wistar大鼠(由青岛市实验动物中心提供),雌雄比例相当,体质量225±25g,屏障环境、室温下饲养,自由饮水,鼠颗粒饲料喂养。每晚20:00~22:30以雌雄个数1:1合笼,现场视其交配,次日,检查雌鼠阴道,有阴栓、涂片发现精子者列入研究对象,定位胚胎第0天。

1.1.2 实验分组 分别于胚胎第10d(E10)、第12d(E12)、第14d(E14)、第16d(E16)、第18d(E18)、第20d(E20)时氯胺酮麻醉孕鼠,剖腹取胚胎,获得各阶段的鼠胚,每组孕鼠5只,每只孕鼠随机数列法选取2只胚鼠,每只胚鼠一只眼用于实时荧光定量PCR检测晶状体中HIF-1 α mRNA表达,另一只眼石蜡包埋切片,HE染色观察形态学变化、免疫组化检测HIF-1 α 表达,共6组120眼,进行观察。所有实验动物的使用均遵循国家科技委颁布的《实验动物管理条例》。

1.2 方法

1.2.1 切片的制备 所有胎鼠取头部,40g/L多聚甲醛固定1d,石蜡包埋,以平行于视神经矢状轴的方向连续切

片,每张切片厚4 μ m,将切片置于预先用多聚赖氨酸处理过的载玻片上,60℃温箱烤片、过夜。

1.2.2 形态学观察 每只眼球选取经晶状体不同部位的不连续切片5张,脱蜡、酒精复水、常规苏木素-伊红染色,光学显微镜下观察。

1.2.3 免疫组织化学方法检测各组HIF-1 α 的表达及图像分析 实验步骤按照PV6001免疫组织化学试剂盒(北京中山生物技术有限公司提供)说明要求进行,经过烤片过夜、脱蜡复水、H₂O₂灭活内源性酶、微波修复抗原、滴加兔抗大鼠HIF-1 α 抗体、滴加二抗、依次滴加SP试剂盒内试剂等步骤,DAB显色盒中显色,显微镜下观察,至细胞内出现鲜艳的棕黄色颗粒停止显色,为可检测到HIF-1 α 表达。阳性对照选用软骨组织,阴性对照选用PBS代替一抗,余步骤相同。各组标本均选取经晶状体不同部位的不连续切片5张,每张切片选取5个视野,应用Image pro plus 6.0图像分析软件对免疫组织化学切片进行分析,得到鼠胚期晶状体组织中HIF-1 α 的平均光密度值[mean density=IOD(累积光密度)/area(面积)]。

1.2.4 实时定量PCR检测各组HIF-1 α mRNA的表达

Trizol法提取各组胚鼠晶状体中总RNA,紫外分光光度计检测其浓度和纯度。按照逆转录试剂盒(日本TaKaRa公司提供)说明要求,取总RNA 2 μ g,以随机引物法合成cDNA,产物保存于-20℃冰箱。PCR反应体系为20 μ L,包括:10 μ L SYBR[®] Premix Ex TaqTM II,0.8 μ L上游引物,0.8 μ L下游引物,2.0 μ L cDNA溶液,灭菌蒸馏水6.4 μ L。引物序列由美国Invitrogen公司合成, β -actin作为内参照基因。引物序列设计如下:HIF-1 α 引物序列:Forward primer:5'-TGCATCTCCACCTTCTACCC-3';Reverse primer:5'-CTGCTCCATTCATCCTGTT-3',产物长度385bp。 β -actin引物序列:Forward primer:5'-TCTACAATGAGCTGC GTGTGG-3';Reverse primer:5'-GGAACCGCTCATTGCCAATG-3',产物长度497bp。反应条件如下:95℃预变形5min,95℃扩增30s,60℃退火45s,循环40次。荧光定量PCR仪自动绘制溶解曲线和荧光曲线,得到相应Ct值,应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析结果($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{待测样品}} - \Delta Ct_{\text{对照样品}}$, ΔCt 为目的基因Ct值-内参Ct值,本实验以成年大鼠晶状体为对样品)。

统计学分析:采用SPSS 17.0统计软件,所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,经Shapiro-Wilk检验呈正态分布,各组间均数经Levene检验方差齐。对不同胚胎时期晶状体中HIF-1 α 表达的差异采取单因素方差分析,两两比较采用LSD- t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光镜下观察 E10时,鼠胚视杯形成,来自表面外胚层的晶状体板内陷几乎填满整个视杯,晶状体凹与表面外胚层只有一细茎相连。晶状体凹内细胞呈立方形状,胞核较大,排列欠规则,上皮细胞及后壁细胞尚未分化(图1)。晶状体凹内陷,细茎消失,形成晶状体泡。E12时,前壁、后壁细胞已分化,前壁细胞成为上皮细胞,为单层上皮,未见核分裂相,后壁细胞加长成柱状,晶状体泡腔由圆形变为新月形,晶状体囊膜形成。E14,上皮细胞变为单层柱状上皮,后壁细胞继续伸长,前端和上皮细胞接触,细胞核变长,并向前移,晶状体泡腔消失,后壁细胞成为原始纤维。E16时,晶状体上皮细胞增生活跃,由单层变为多层

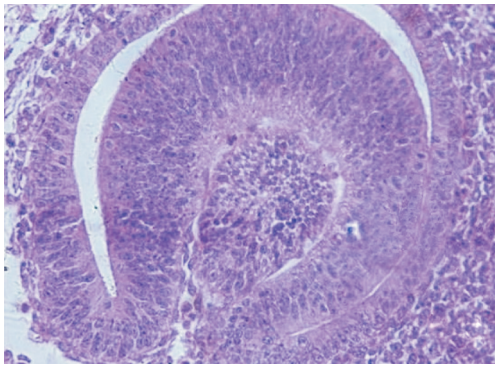


图1 HE染色(×400) E10,晶状体凹突向视泡,与表面外胚层分离,填充视泡。

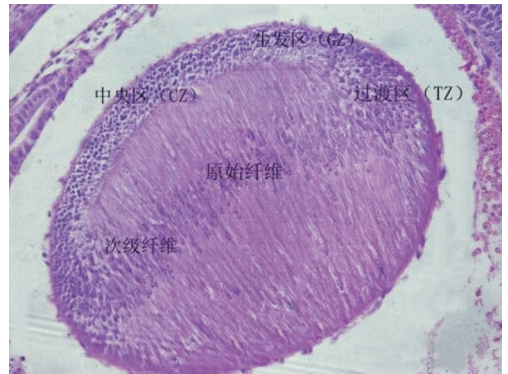


图2 HE染色(×200) E16,晶状体上皮为复层细胞,中央区细胞为复层扁平细胞,生发区细胞较大,分裂旺盛;过渡区细胞伸长,以后可分化为次级纤维细胞,中央原始纤维由晶状体后壁细胞发育而来,细胞核较长且靠近上皮细胞,中央部分细胞核消失。

(图2)。前极正中区域为中央区(central zone, CZ),此区细胞较为扁平,细胞较小。中央区外侧为生发区(germinative zone, GZ),细胞分裂活跃,较中央区细胞变大,呈立方形,细胞核较大,细胞排列不规则。生发区外侧赤道以内,为过渡区(transitional zone, TZ),细胞发生分化,逐渐拉长呈柱状或椎体形状,向前后延伸,部分原始纤维细胞核消失。E18时,上皮细胞增生减慢,细胞由多层恢复为单层。过渡区细胞前端和上皮细胞相毗邻,后端到达晶状体后囊膜,原始纤维细胞核消失更加明显。由过渡区细胞分化而来的新生细胞逐层包绕在原始纤维外面,形成次级纤维,成为胎儿核。E20时,晶状体发育较为成熟,位于晶状体前面的单层扁平细胞为上皮细胞,生发区、过渡区细胞继续分裂分化。

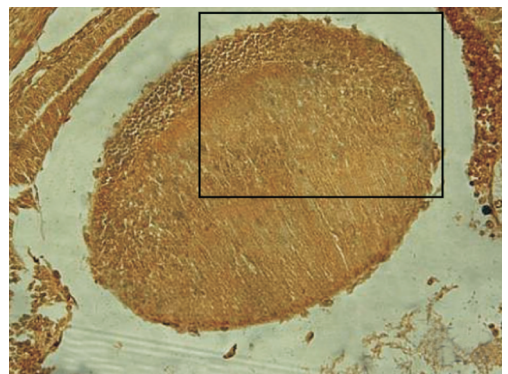


图3 免疫组化(×200) E16 HIF-1α,晶状体组织中见较强染色,上皮较纤维组织中染色稍强。

2.2 HIF-1α 免疫组织化学染色及平均光密度值分析 从E10开始,直至E20,晶状体组织中存在HIF-1α表达。E10, E12, E14, E16,表达逐渐增强, E16时,表达最强,无论是晶状体上皮细胞还是纤维细胞,均有较强着染,生发区细胞、过渡区细胞由于增生分化活跃,表达略强于中央区细胞,纤维细胞也有较强着染(图3,4)。E18, E20, HIF-1α表达减弱, E20,达到最弱。HIF-1α主要集中在细胞核中,不同胚胎期上皮细胞均较纤维细胞较强着染。各组之间采用单因素方差分析, $F=86.225, P<0.0001$, 每组晶状体HIF-1α表达不全相同,差异有统计学意义。各组间两两比较, E10与E12之间比较, $P=0.436$, E14与E16比较, $P=0.078$, 差异无统计学意义, 余各组间比较, $P<0.05$, 差异有统计学意义(表1)。

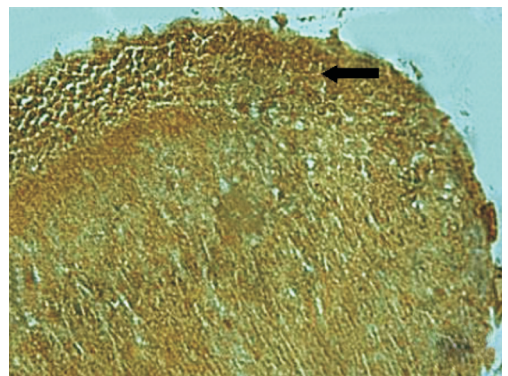


图4 免疫组化(×400) 为图3方框中区域放大图像,可见生发区、过渡区细胞棕黄色颗粒略显著于中央区(箭头所示区域)。

2.3 HIF-1α mRNA 在不同胚胎期晶状体中的表达 在晶状体胚胎发育中,始终能检测到HIF-1α mRNA较强表达。不同胚胎期之间比较, $F=134.458, P<0.0001$, 6组间HIF-1α的表达不全相同,差异有统计学意义。E10, E12, E14, E16 HIF-1α mRNA表达量逐渐升高, E18, E20,表达量降低。各组间两两比较,其中E10与E12比较 $P=0.31$, 差异无统计学意义, 余各组间 P 均 <0.05 , 差异均有统计学意义(表2)。

3 讨论

缺氧诱导因子1-α(HIF-1α)是一种核酸结合性转录因子,和多种辅酶结合,在低氧的条件下,不能被泛素化降解^[7],与HIF-1另一结构亚基β结合,形成HIF-1活性蛋白,

表1 HIF-1α在不同大鼠胚胎期晶状体中的表达

($\bar{x} \pm s, n=60$)

组别	眼数	平均光密度值
E10	10	0.35±0.02
E12	10	0.36±0.02*
E14	10	0.43±0.03 ^{a,c}
E16	10	0.46±0.02 ^{a,c,Δ}
E18	10	0.29±0.06 ^{a,c,e,g}
E20	10	0.20±0.03 ^{a,c,e,g,i}

^a $P<0.05$ vs E10; ^c $P<0.05$ vs E12; ^e $P<0.05$ vs E14; ^g $P<0.05$ vs E16; ⁱ $P<0.05$ vs E18; * $P=0.436$ vs E10; ^Δ $P=0.078$ vs E14。

表2 HIF-1 α mRNA 在不同大鼠胚胎期晶状体中的表达

组别	眼数	HIF-1 α mRNA
E10	10	5.21 \pm 0.29
E12	10	5.34 \pm 0.21 [*]
E14	10	6.08 \pm 0.32 ^{a,c}
E16	10	6.42 \pm 0.12 ^{a,c,e}
E18	10	4.51 \pm 0.32 ^{a,c,e,g}
E20	10	3.55 \pm 0.38 ^{a,c,e,g,i}

^a $P < 0.05$ vs E10; ^c $P < 0.05$ vs E12; ^e $P < 0.05$ vs E14; ^g $P < 0.05$ vs E16; ⁱ $P < 0.05$ vs E18; ^{*} $P > 0.05$ vs E10。

反式激活一系列基因,启动多种适应性应答,缓解缺氧对机体造成的压力^[8]。哺乳动物早期胚胎发育就处于这种环境中,Pringle等^[9]报道,大鼠胚胎发育环境的氧气浓度 $< 2\%$,此时,HIF-1 α 的存在,保证了心血管系统、四肢软骨系统的正常发育^[10]。丁震宇等^[11]也观察到,HIF-1 α 对于小鼠神经胚形成具有重要意义。我们的前期实验在大鼠视网膜胚胎发育过程中检测到HIF-1 α 的表达及动态变化^[12],证明HIF-1 α 参与了大鼠视网膜的胚胎发育。为了明确HIF-1 α 对于晶状体胚胎发育的作用,本实验运用免疫组织化学染色、实时定量PCR的方法检测HIF-1 α 在不同胚胎期晶状体中的表达,发现大鼠晶状体胚胎发育与人类基本相同,其过程与HIF-1 α 密切相关,表达呈现时空变化。

大鼠E10,大致相当于人胚胎4周^[13],晶状体泡基本形成,细胞尚未分化,均为立方形状,分裂旺盛。E12,晶状体细胞分化,出现前壁、后壁细胞,至大鼠E14,相当于人胚胎6周^[13],后壁细胞加长填充晶状体泡腔,原始纤维形成。来源于前壁细胞的上皮细胞尚未开始分裂,单层。大鼠E16,大致相当于人胚胎7周^[13],上皮细胞增生分化活跃,变为复层上皮。增生主要发生在生发区,核大,分裂相可见。分化集中在过渡区,细胞变长,包围原始纤维成为次级纤维。随后晶状体发育速度减慢,大鼠E20,大致相当于人胚胎9周^[13],晶状体发育较为成熟,上皮细胞分裂减弱,变回单层扁平上皮,晶状体纤维细胞进一步发育完善。

本实验发现,HIF-1 α 在胚胎期晶状体发育过程中的表达呈现由低到高,再由高到低的变化趋势。晶状体细胞分裂增生旺盛的地方,HIF-1 α 表达增加,反之减弱。晶状体胚胎发育过程中,HIF-1 α 的表达与形态学变化相吻合。E10,HIF-1 α 在晶状体泡细胞中就有广泛表达,可能是由于胚胎发育中晶状体泡内细胞分裂旺盛,氧气需求大,造成局部相对缺氧环境,启动了HIF-1 α 表达。E12,E14,E16,HIF-1 α 的表达逐渐增强,E16时达到最强。形态学也观察发现,从E12开始,晶状体细胞出现分化、分裂增生日益活跃,E16分裂分化最为明显,此现象与HIF-1 α 的表达趋势一致。考虑可能是细胞不断分裂增殖,势必造

成了对氧耗的局部增大,出现了局部低氧,激活HIF-1 α 的表达,诱导其下游基因包括血管内皮生长因子^[14,15]的转录,改善缺氧微环境。且上皮细胞表达较纤维细胞略强,生发区、过渡区细胞表达尤为强烈,可能与此区细胞分裂分化现象较其他部位明显,氧耗较多有关。随着晶状体继续发育,在E18,E20,细胞分裂增生速度逐渐减慢,HIF-1 α 表达也随之降低。这是由于局部缺氧程度降低导致HIF-1 α 转录表达减少。

综上所述,HIF-1 α 在大鼠胚胎期晶状体发育中表达丰富,且随着晶状体细胞增生分化强弱,HIF-1 α 随之变化。我们认为,HIF-1 α 对大鼠胚胎期晶状体的发育是必不可少的,与细胞增殖密切相关,对晶状体胚胎发育起重要作用,但其作用机制尚不明确,需进一步研究。

参考文献

- Baba Y, Noshio K, Shima K, et al. HIF1 α overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. *Am J Pathol* 2010;176(5):2292-2301
- Griffiths EA, Pritchard SA, McGrath SM, et al. Increasing expression of hypoxia-inducible proteins in the Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *Br J Cancer* 2007;96(9):1377-1383
- Speisky D, Duces A, Bièche I, et al. Molecular profiling of pancreatic neuroendocrine tumors in sporadic and Von Hippel-Lindau patients. *Clin Cancer Res* 2012;18(10):2838-2849
- 邹多宏, 吴轶群, 张秀丽, 等. HIF-1 α 促进BMSCs成骨及成血管作用的体内外研究. *中华口腔颌面外科杂志* 2012;10(6):441-453
- 叶鸣, 王志刚, 李兴升. HIF-1 α 在缺血性心血管疾病中作用的研究进展. *心脏杂志* 2010;22(5):758-763
- Shui YB, Arbeit JM, Randall S. HIF-1 α : An Age-Dependent regulator of Lens Cell Proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(11):4961-4970
- Liu YV, Baek JH, Zhang H, et al. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 α and is required for O₂-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 α . *Mol Cell* 2007;25(2):207-217
- Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2010;29(5):625-634
- Pringle KG, Kind KL, Thompson JG, et al. Complex interactions between hypoxia inducible factors, insulin-like growth factor-2 and oxygen in early murine trophoblasts. *Placenta* 2007;28(11-12):1147-1157
- Dunwoodie SL. The Role of Hypoxia in Development of the Mammalian Embryo. *Developmental Cell* 2009;17(15):755-773
- 丁震宇, 李泽桂, 星懿展. 低氧诱导因子-1在小鼠胚胎神经胚形成阶段的发育学表达. *神经解剖学杂志* 2005;21(3):229-232
- 袁春燕, 孟旭霞, 辛莉莉. 大鼠视网膜胚胎发育过程中缺氧诱导因子-1 α 及血管内皮生长因子的表达. *中华实验眼科杂志* 2011;29(3):230-234
- Jakobiec JA. Ocular anatomy, embryology, and teratology. the USA: Harper&Row publishers 1982: 356-368
- Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *Mol Med* 1999;77(7):527-543
- McColm JR, Geisen P, Harnett ME. VEGF isoform and their expression after a single episode of hypoxia or repeated fluctuations between hyperoxia and hypoxia: relevance to clinical ROP. *Mol Vis* 2004;10:512-520