

转录因子 Islet-1 在氧诱导血管增生性视网膜病变中的表达

熊思齐, 江海波, 许惠卓, 夏晓波

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81000388)

作者单位: (400048) 中国湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院眼科
作者简介: 熊思齐, 博士, 主治医师, 研究方向: 玻璃体疾病、视网膜疾病、葡萄膜疾病。

通讯作者: 夏晓波, 博士, 主任医师, 研究方向: 青光眼、白内障。
xbxia21@163.com

收稿日期: 2014-10-08 修回日期: 2014-11-13

Expression of transcriptional factor Islet-1 in retina with experimental retinal neovascularization induced by oxygen

Si-Qi Xiong, Hai-Bo Jiang, Hui-Zhuo Xu, Xiao-Bo Xia

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81000388)

Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital Central South Hospital, Changsha 400048, Hunan Province, China

Correspondence to: Xiao-Bo Xia. Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital Central South Hospital, Changsha 400048, Hunan Province, China. xbxia21@163.com

Received: 2014-10-08 Accepted: 2014-11-13

Abstract

• **AIM:** To evaluate the expression of transcriptional factor Islet-1 in retina in experimental retinal neovascularization induced by oxygen.

• **METHODS:** The murine retinal neovascularization were induced by hyperoxia exposure. The morphological observation of retinal neovascularization was performed using angiography by fluorescein dextran injection under the fluorescence microscope, and the new blood vessels were quantified after 5d in room air (17-day-old) by counting the vascular epithelial cell nuclei protruding into vitreous cavity using HE stain. Realtime PCR and Western blot were used to examine retinal Islet-1 level in postnatal 7, 12, 14, 17 and 26d respectively.

• **RESULTS:** A lots of new blood vessels were demonstrated in the mouse retina in hyperoxic group by fluorescein angiography and histological method. Moreover, no significant difference was found in retinal Islet-1 level in postnatal 7d between hyperoxic group and control group, but was significantly higher in postnatal 12, 14 and 17d mice compared with control mice. However, mice at postnatal 26d, expression of Islet-1 in retina decreased to normal level.

• **CONCLUSION:** In processing mouse model of retinal

neovascularization, sustained hypoxia retinal tissue induce retinal neovascularization by increases the expression of transcription factor Islet-1.

• **KEYWORDS:** transcriptional factor; Islet-1; retinal neovascularization; oxygen induced retinopathy

Citation: Xiong SQ, Jiang HB, Xu HZ, et al. Expression of transcriptional factor Islet-1 in retina with experimental retinal neovascularization induced by oxygen. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(12):2127-2130

摘要

目的: 研究高氧诱导的视网膜新生血管模型鼠中转录因子 Islet-1 的表达差异。

方法: 采用高氧诱导的方法制作鼠视网膜新生血管模型, 运用荧光造影视网膜铺片及视网膜切片苏木精-伊红染色观察视网膜新生血管的形态。于小鼠出生后第 7, 12, 14, 17, 26d 取视网膜组织, 采用 Real-time PCR 及 Western blot 技术测定视网膜组织中 Islet-1 的表达水平。

结果: 模型组视网膜铺片及组织切片可见大量视网膜新生血管形成。小鼠出生后第 7d, 模型组与正常组视网膜组织中 Islet-1 表达水平无明显差异; 小鼠出生后第 12 ~ 14d, 模型组视网膜组织中 Islet-1 表达水平明显上调; 出生后 17d, 模型组视网膜组织中 Islet-1 表达水平仍高于正常组; 出生后 26d, 随着视网膜新生血管消退, 视网膜组织中 Islet-1 表达水平降至正常水平。

结论: 模型鼠视网膜新生血管发生过程中, 持续缺氧的视网膜组织通过增加转录因子 Islet-1 的表达, 从而诱导视网膜新生血管的发生。

关键词: 转录因子; Islet-1; 视网膜新生血管; 氧诱导视网膜病变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.12.05

引用: 熊思齐, 江海波, 许惠卓, 等. 转录因子 Islet-1 在氧诱导血管增生性视网膜病变中的表达. *国际眼科杂志* 2014; 14(12): 2127-2130

0 引言

眼内缺血性视网膜疾病是常见的致盲性眼病之一, 视网膜新生血管的形成是这类疾病的严重并发症, 与其相伴的渗出、出血、增殖等一系列病理改变可严重破坏眼的结构和功能, 导致患者视力下降甚至视力丧失。随着对视网膜新生血管发生机制认识的深入, 多种细胞因子、黏附分子、蛋白酶被证明在视网膜新生血管的形成过程中起着重要的作用。而这些促血管生成因子的表达受上游转录因子的调控。转录因子胰岛素基因增强结合蛋白 1 (Islet-1)

具有促血管新生及促血管发生的作用,并参与调控 VEGF 等促血管生成因子的表达^[1]。为了探讨 Islet-1 在视网膜新生血管形成中的重要作用,本项目建立氧诱导的视网膜新生血管模型(oxygen-induced retinopathy, OIR)鼠,通过观察视网膜组织中 Islet-1 表达的变化及与视网膜新生血管形成的对应关系,从而揭示了 Islet-1 在视网膜新生血管形成中的调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料 SFP 级健康 C57BL/6J 小鼠(中南大学动物实验中心提供);右旋糖苷异硫氰酸荧光素(FITC. dextran, 美国 Sigma 公司);Trizol 裂解液及微量总 RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司);反转录及 cDNA 合成试剂盒(美国 Fermentas Life Science 公司);兔抗鼠 Islet-1 抗体(美国 Abcam 公司);兔抗鼠 β -actin 抗体(美国 Abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 高氧诱导的视网膜新生血管小鼠模型的建立 SPF 级新生 C57BL/6J 小鼠 120 只。采用随机数字表法将小鼠分为模型组(60 只)和正常对照组(60 只)。参照 Smith 等^[2]的方法建立小鼠缺氧诱导的视网膜新生血管动物模型。出生后第 7d 的 C57BL/6J 小鼠与母鼠一起置于氧浓度为(75±2)%的氧箱中 5d,于出生后第 12d 回到正常环境中诱导视网膜新生血管模型。

1.2.2 荧光素心脏灌注视网膜铺片 出生后第 17d 的正常组小鼠(5 只)及模型鼠(5 只)腹腔内注射麻醉剂 1% 戊巴比妥钠(30mg/kg)后,打开胸腔,抽取配置 FITC-Dextran(50mg:1mL 4% 多聚甲醛)0.5mL,用 1mL 注射器灌注左心室后,迅速摘除眼球,显微镜下视网膜铺片,荧光显微镜下观察视网膜血管结构。

1.2.3 视网膜新生血管内皮细胞核计数 过量麻醉处死出生后第 17d 的正常组小鼠(5 只)及模型鼠(5 只)后,摘除眼球并固定,脱水、浸蜡包埋,通过角膜平行视神经做眼球矢状位系列切片(6 μ m),含视神经的切片除外,切片行苏木精-伊红(HE)染色。显微镜下计数突破内界膜的血管内皮数,每只眼随机抽取 5 张切片(每隔 60 μ m 取 1 张),取平均内皮细胞数用于统计分析。

1.2.4 Real-time PCR 检测视网膜组织中 Islet-1 mRNA 表达水平 采用 Trizol 一步法提取出生后第 7,12,14,17,26d 正常组小鼠(25 只)及模型鼠(25 只)视网膜组织总 RNA。以逆转录后获得的 cDNA 为模板,Real-time PCR 仪扩增目的基因。引物序列: Islet-1 引物序列:上游 5'-CGATCCTACAG ATATGGGAGACATGGGCGATC-3';下游 5'-CGTCGACTCC TCATGCCCTCAATAGGACTGG-3'。 β -actin 引物序列:上游 5'-TGGTTACAGGAAGTCCCTCAC-3';下游 5'-AAGC AATGCTGTCACCTTCC-3'。各样品的目的基因和管家基因分别进行 Real-time PCR 反应。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 2min,95 $^{\circ}$ C 变性 15s,57 $^{\circ}$ C 退火 15s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45s,共进行 40 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 10min。所有标本检测均重复 3 次,用标准曲线的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法进行结果计算。

1.2.5 免疫印迹法检测视网膜组织中蛋白表达水平 出生后第 7,12,14,17,26d 正常组小鼠(25 只)及模型鼠(25 只)视网膜组织研磨后加入蛋白抽提液裂解,离心提取蛋白后测定蛋白质浓度。取蛋白样品于 SDS-PAGE 凝胶中电泳,待目的蛋白接近凝胶底部时停止电泳,4 $^{\circ}$ C、120V 恒

压电转移至硝酸纤维膜上,质量分数 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h,加入一抗(兔抗鼠 Islet-1 和 β -actin 抗体)4 $^{\circ}$ C 孵育 12h 后,再加入二抗(生物素化的羊抗兔 IgG)室温孵育 1h,加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素室温孵育 30min,ECL 化学发光法检测。以 β -actin 作为内对照。

统计学分析:采用 SPSS 16.0 统计软件包对数据进行统计学分析。正常组及模型组小鼠视网膜中 Islet-1 表达水平的比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光素心脏血管造影视网膜铺片观察视网膜血管形态 正常出生第 17d 小鼠视网膜铺片可见整个视网膜血管分布呈均匀的网状结构,视盘中央发出的血管规则地呈放射状向周边部走行,视网膜血管间的毛细血管交织成网状(图 1A)。模型组鼠视盘周围毛细血管闭塞,可见大片无灌注区。视网膜大血管不规则扩张,走行迂曲。中周部正常毛细血管网消失,血管密度增高且分布紊乱,可见新生血管丛和荧光渗漏(图 1B)。

2.2 突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核计数 正常组中未见明显突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核(图 2A);而模型组均可见突出内界膜的血管内皮细胞核(图 2B),发生率为 100%。模型组突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核均数为 19.6±1.9。

2.3 Real-time PCR 检测视网膜组织中 Islet-1 mRNA 表达水平 提取出生后第 7,12,14,17,26d 正常组小鼠及模型鼠视网膜总 RNA,采用 Real-time PCR 方法测定 Islet-1 mRNA 的表达水平。结果如图 3 所示:出生后第 7d 的模型鼠与正常组小鼠视网膜组织中的 Islet-1 mRNA 表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。出生后第 12d 时,刚出氧舱的模型鼠视网膜组织中 Islet-1 mRNA 表达水平与正常对照鼠比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。出生后第 14d 时,模型鼠视网膜组织中 Islet-1 mRNA 表达水平较对照鼠明显上调,两者间差异有统计学意义($P < 0.05$)。出生后第 17d 时,出氧舱后 5d 的模型鼠此时视网膜新生血管形成数目最多,模型鼠视网膜组织中 Islet-1 mRNA 表达水平仍高于对照鼠($P < 0.05$)。出生后第 26d 时,此时模型鼠视网膜新生血管已经消退,模型鼠视网膜组织中 Islet-1 mRNA 表达水平与正常对照鼠差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 Western blot 检测视网膜组织中 Islet-1 蛋白表达水平 提取出生后第 7,12,14,17,26d 正常组小鼠及模型鼠视网膜总蛋白,采用 Western blot 方法测定视网膜组织中 Islet-1 蛋白的表达水平。结果如图 4 所示:出生后第 7d 的模型鼠及正常组小鼠视网膜组织中的 Islet-1 蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。出生后第 12d 时,刚出氧舱的模型鼠视网膜组织中 Islet-1 蛋白表达水平开始上调,与正常对照鼠比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。出生后第 14d 时,此时模型鼠缺氧的视网膜组织中 Islet-1 蛋白表达水平较对照鼠明显上调,两者间差异有统计学意义($P < 0.05$)。出生后第 17d 时,出氧舱后 5d 的模型鼠此时视网膜新生血管形成数目最多,模型鼠视网膜组织中 Islet-1 蛋白表达水平仍高于对照鼠($P < 0.05$)。出生后第 26d 时,此时模型鼠视网膜新生血管已经消退,模型鼠视网膜组织中 Islet-1 蛋白表达水平与正常对照鼠差异无统计学意义($P > 0.05$)。

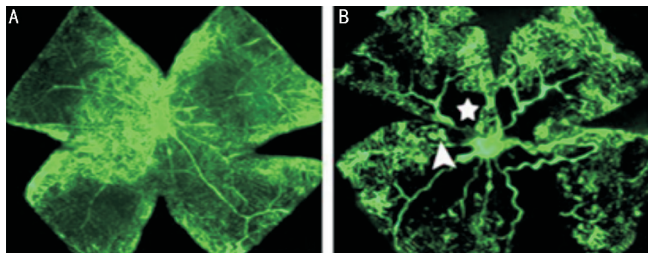


图1 FITC-Dextran 荧光造影视网膜铺片($\times 400$) A:正常鼠:整个视网膜血管分布呈均匀的网状结构;B:模型鼠:视网膜中央区可见大片无灌注区(\star 所示),大血管迂曲扩张,视网膜中周边部有大量新生血管(箭头所示)。

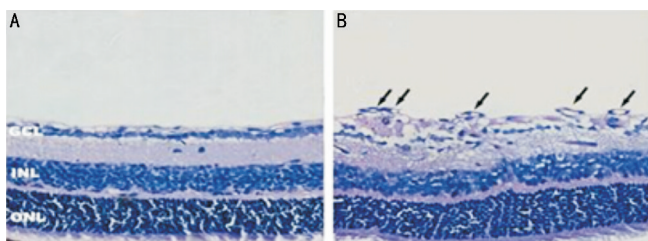


图2 视网膜组织学分析(HE $\times 200$) A:正常鼠:正常鼠未见突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核。B模型鼠:模型鼠能见到大量突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核(箭头所示)。GCL:神经节细胞层;INL:内核层;ONL:外核层。

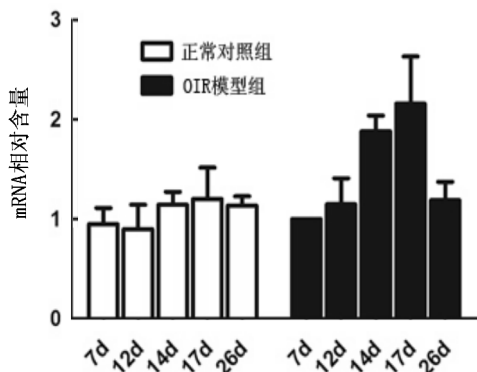


图3 鼠视网膜组织中 Islet-1 mRNA 的表达。

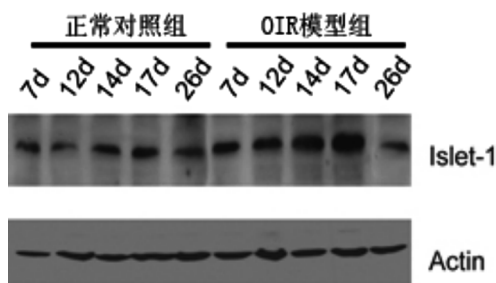


图4 鼠视网膜组织中 Islet-1 蛋白的表达。

3 讨论

糖尿病性视网膜病变、缺血性视网膜静脉阻塞、早产儿视网膜病变、Eale's 病等缺血性视网膜疾病是目前国际上发病率较高的一类致盲性疾病,常导致视力严重损害,甚至视力丧失、眼球萎缩。由于新生血管的形成在缺血性视网膜疾病的发生、发展过程中起着重要作用,因此非常有必要从基因水平探讨视网膜新生血管形成的机制和寻求有效的抑制药物。视网膜新生血管是众多因子相互作用的结果。最近,我们的研究表明低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)^[3]及其下游基因促红细胞生成素(EPO)^[4]和血

管内皮细胞生长因子(VEGF)^[5]以及轴突导向因子 Netrin-1 是缺血、缺氧诱导的视网膜新生血管形成过程中的重要环节,运用靶向 HIF-1 α 、VEGF 及 EPO 的特异性 siRNA 可有效地抑制视网膜新生血管形成,抑制效率大约为 50% ~ 70%。以上结果提示部分视网膜新生血管不能被抑制(大约 30% ~ 50%)是因为视网膜血管新生可能存在其它的调控基因。

转录因子胰岛素基因增强结合蛋白 1 (insulin gene enhancer binding protein 1, Islet-1) 是同源框 LIM 转录因子家族的成员,含有 1 个或多个半胱氨酸(Cys)和组氨酸(His)重复序列。Islet-1 是结合于胰岛素 I 基因 mini 增强区或远端 FLAT 区的唯一蛋白,蛋白相对分子质量为 38kD^[6]。Islet-1 在胚胎发育过程中起着重要的作用。Islet-1 参与胰腺^[7]、心脏^[8]、神经元^[9]和视网膜组织^[10]的发育。目前的研究已经证明了转录因子 Islet-1 具有诱导新生血管形成的作用,并调控下游因子 VEGF 的表达。体外培养的毛细血管内皮细胞,随着 Islet-1 转录活性的增强,血管内皮细胞的增殖能力增强。同时 Islet-1 从转录水平上调血管内皮细胞中黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达,从而促进血管内皮细胞在细胞外基质中迁移。另外,Islet-1 作为上游转录因子能增加内皮细胞中 VEGF 及白细胞介素-1 β (IL-1 β) 等促血管生成因子的合成和分泌,并能促进血管内皮细胞管腔形成。但迄今为止尚无转录因子 Islet-1 是否参与体内新生血管形成的相关报道。

我们的研究表明在正常鼠视网膜组织的发育过程中 Islet-1 的表达水平无明显变化。而随着 OIR 模型鼠视网膜组织缺氧状态的持续存在,视网膜新生血管逐步形成,此时视网膜组织中 Islet-1 mRNA 和蛋白表达水平较正常鼠明显上调,而且与视网膜新生血管的发生存在时间上的对应关系。当模型鼠中视网膜新生血管消退,Islet-1 mRNA 和蛋白的表达水平下降,此时模型鼠与正常鼠视网膜组织中 Islet-1 的表达无明显差异。我们推断:在视网膜新生血管形成过程中,视网膜组织中增加的转录因子 Islet-1 与低氧诱导因子 1 (HIF-1)、细胞核因子- κ β (NF- κ β)、活化蛋白质-1 (AP-1) 等转录因子一起协同促进下游 VEGF 及 IL-1 β 等促血管因子的表达,从而调控视网膜新生血管的形成。

综上所述,我们的研究表明转录因子 Islet-1 可能是一种新的在视网膜新生血管发生发展中起到正向作用的转录因子,积极参与了新生血管形成,并起着重要的调控作用。而针对 Islet-1 在视网膜新生血管形成中调控作用的深入研究可能为进一步阐明视网膜新生血管发生的分子机制以及开创新的治疗途径奠定理论基础。

参考文献

- Barzelay A, Ben-Shoshan J, Entin-Meer M, et al. Potential role for islet-1 in post-natal angiogenesis and vasculogenesis. *Thromb Haemost* 2010; 103(1):188-197
- Smith LEH, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35(1):101-111
- Xia XB, Xiong SQ, Xu HZ, et al. Suppression of retinal neovascularization by siRNA target to HIF-1 α . *Current Eye Research*. 2008;33(10):892-902
- Xiong SQ, Xia XB, Xu HZ, et al. Suppression of retinal

neovascularization by small interference RNA targeting Erythropoietin. *Ophthalmologica* 2009;223(5):306-312
 5 Xia XB, Xiong SQ, Song WT, *et al.* Inhibition of retinal neovascularization by siRNA targeting VEGF165. *Mol Vis* 2008; 14:1965-1973
 6 Genead R, Danielsson C, Andersson AB, *et al.* Islet-1 cells are cardiac progenitors present during the entire lifespan; from the embryonic stage to adulthood. *Stem Cells Dev* 2010;19(10):1601-1615
 7 Du A, Hunter CS, Murray J, *et al.* Islet-1 is required for the maturation, proliferation, and survival of the endocrine pancreas. *Diabetes* 2009 ;58(9):2059-2069

8 Moretti A, Bellin M, Jung CB, *et al.* Mouse and human induced pluripotent stem cells as a source for 215 multipotent Isl1+ cardiovascular progenitors. *FASEB J* 2010;24(3):700-711
 9 Pfaff SL, Mendelsohn M, Stewart CL, *et al.* Requirement for LIM homeobox gene Isl1 in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* 1996 26;84(2):309-320
 10 Elshatory Y, Everhart D, Deng M, *et al.* Islet-1 controls the differentiation of retinal bipolar and cholinergic amacrine cells. *J Neurosci* 2007;27(46):12707-12720

2014 年眼科杂志 SCI 影响因子排名

Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	Impact Factor	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	Impact Factor
1	PROG RETIN EYE RES	9.897	30	EYE CONTACT LENS	1.679
2	OPHTHALMOLOGY	6.170	31	VISUAL NEUROSCI	1.676
3	ARCH OPHTHALMOL-CHIC	4.488	32	CURR EYE RES	1.663
4	OCUL SURF	4.212	33	OCUL IMMUNOL INFLAMM	1.440
5	AM J OPHTHALMOL	4.021	34	J OCUL PHARMACOL TH	1.420
6	INVEST OPHTH VIS SCI	3.661	35	OPHTHALMIC RES	1.376
7	SURV OPHTHALMOL	3.507	36	OPTOMETRY	1.339
8	RETINA-J RET VIT DIS	3.177	37	OPHTHAL SURG LAS IM	1.318
9	EXP EYE RES	3.017	38	CAN J OPHTHALMOL	1.299
10	BRIT J OPHTHALMOL	2.809	39	OPHTHAL EPIDEMIO	1.271
11	J REFRACT SURG	2.781	40	CLIN EXP OPTOM	1.256
12	J VISION	2.727	41	OPHTHALMIC GENET	1.233
13	OPHTHAL PHYSL OPT	2.664	42	SEMIN OPHTHALMOL	1.196
14	CURR OPIN OPHTHALMOL	2.638	43	J AAPOS	1.142
15	J CATARACT REFR SURG	2.552	44	DOC OPHTHALMOL	1.108
16	ACTA OPHTHALMOL	2.512	45	BMC OPHTHALMOL	1.075
17	J GLAUCOMA	2.427	46	EUR J OPHTHALMOL	1.058
18	VISION RES	2.381	47	J EYE MOVEMENT RES	1.056
19	CORNEA	2.360	48	INDIAN J OPHTHALMOL	0.927
20	GRAEF ARCH CLIN EXP	2.333	49	CUTAN OCUL TOXICOL	0.920
21	MOL VIS	2.245	50	OPHTHAL PLAST RECONS	0.914
22	OPTOMETRY VISION SCI	2.038	51	J PEDIAT OPHTH STRAB	0.731
23	CONTACT LENS ANTERIO	2.000	52	OPHTHALMOLOGE	0.719
24	CLIN EXP OPHTHALMOL	1.953	53	KLIN MONATSBL AUGENH	0.665
25	J OPHTHALMOL	1.935	54	INT J OPHTHALMOL-CHI	0.500
26	EYE	1.897	55	ARQ BRAS OFTALMOL	0.440
27	OPHTHALMOLOGICA	1.867	56	J FR OPHTALMOL	0.361
28	J NEURO-OPHTHALMOL	1.807	57	REV BRAS OFTALMOL	0.163
29	JPN J OPHTHALMOL	1.795	58	JAMA OPHTHALMOL	

摘自丁香园网站