

# 糖尿病大鼠玻璃体腔注射缺氧诱导因子-1 $\alpha$ siRNA 对血管内皮生长因子蛋白表达的影响

孟丽珠<sup>1</sup>, 陈松<sup>2</sup>, 陈蕾<sup>3</sup>, 刘艳<sup>4</sup>, 林锦镛<sup>2</sup>, 王玉川<sup>2</sup>, 韩梅<sup>2</sup>

基金项目:天津市科技支撑重点项目(No.08ZCGYSF01700)

作者单位:<sup>1</sup>(130051)中国吉林省长春市人民医院眼科;

<sup>2</sup>(300020)中国天津市,天津市眼科医院 天津医科大学眼科临床学院 天津市眼科研究所 天津市眼科学与视觉科学重点实验室;

<sup>3</sup>(054001)中国河北省邢台市,河北省眼科医院麻醉科;

<sup>4</sup>(236015)中国安徽省阜阳市第二人民医院眼科

作者简介:孟丽珠,毕业于天津医科大学,硕士,主治医师,研究方向:玻璃体视网膜疾病的基础与临床研究。

通讯作者:陈松,毕业于湖南医科大学,于首都医科大学附属北京同仁医院北京市眼科所从事博士后研究,医学博士,教授,博士研究生导师,主任医师,国务院专家特殊津贴享受者,研究方向:玻璃体视网膜疾病的基础与临床研究. chensong20@hotmail.com

收稿日期:2015-05-22 修回日期:2015-09-14

## Effect of intravitreal injection with small interfering RNA targeting hypoxia inducible factor - 1 $\alpha$ on vascular endothelial growth factor protein expression in diabetic rats

Li-Zhu Meng<sup>1</sup>, Song Chen<sup>2</sup>, Lei Chen<sup>3</sup>, Yan Liu<sup>4</sup>, Jin-Yong Lin<sup>2</sup>, Yu-Chuan Wang<sup>2</sup>, Mei Han<sup>2</sup>

**Foundation item:** Foundation of Key Project of Science and Technology Supporting in Tianjin ( No. 08ZCGYSF01700 )

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Changchun People's Hospital, Changchun 130051, Jilin Province, China; <sup>2</sup>Tanjin Eye Hospital, Clinical College of Ophthalmology, Eye Institute of Tianjin, Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science of Tianjin, Tianjin 300020, China; <sup>3</sup>Department of Anesthesiology, Hebei Provincial Eye Hospital, Xingtai 054001, Hebei Province, China; <sup>4</sup>Department of Ophthalmology, No. 2 People's Hospital of Fuyang City, Fuyang 236015, Anhui Province, China

**Correspondence to:** Song Chen. Tanjin Eye Hospital, Clinical College of Ophthalmology, Eye Institute of Tianjin, Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science of Tianjin, Tianjin 300020, China. chensong20@hotmail.com

Received:2015-05-22 Accepted:2015-09-14

## Abstract

• **AIM:** To evaluate the inhibitory effect of hypoxia inducible factor - 1 $\alpha$  ( HIF - 1 $\alpha$  ) small interfering RNA

( siRNA ) on the expression of vascular endothelial growth factor ( VEGF ) protein and explore the feasibility of potential therapeutic approach for diabetic neovascular disease.

• **METHODS:** Using pSilencer2.1 - U6neo for plasmid vector, HIF - 1 $\alpha$  siRNA recombinant plasmid was constructed. There was totally 54 healthy Sprague Dawley rats in which 15 rats were chosen as normal group and 39 rats were constructed for diabetic retinopathy model by streptozotocin ( STZ ) which was divided into three subgroups randomly including control model group ( DR group, 15 rats ), vector group ( 12 rats ) and gene therapy group ( HIF-1 $\alpha$  siRNA group, 12 rats ). Nothing was transfected into DR group and normal group. The vector plasmid and HIF - 1 $\alpha$  siRNA were injected into the vitreous in vector group and HIF - 1 $\alpha$  siRNA group respectively. The retinal morphology was observed by hematoxylin - eosin ( HE ) staining and the expression of VEGF protein was measured by immunohistochemical staining. The inhibition efficiency of VEGF was calculated at 24, 48, 72h and 1wk after injected. Significant differences between groups were evaluated by one-way analysis of variance, followed by LSD-*t* analysis.

• **RESULTS:** HIF - 1 $\alpha$  siRNA recombinant plasmid was confirmed by enzyme digestion and sequence analysis. HE staining showed that the retinal cells at each layers in normal control group were arranged regularly, and cell's morphology was roughly normal. The retinal cells at each layers arranged in disorder in diabetic rat And the inner limiting membrane was not complete with neovascular buds and neovascularization cluster growing out of the inner limiting membrane vertically. Immunohistochemical staining showed that the positive expression of VEGF was brown yellow granules, which was mainly located in ganglion cell layer. It also revealed the expression of VEGF protein was weakly positive in normal control group, while the DR group and empty vector group were significantly increased. Compared with DR group and the empty vector group, gene therapy group was significantly decreased, the difference was statistically significant ( *P*<0.05 ). VEGF protein level was reduced by 27.4%, 40.6%, 47.5%, 64.5% at 24, 48, 72h and 1wk.

• **CONCLUSION:** Intravitreal injection with HIF-1 $\alpha$  siRNA

can efficiently inhibit VEGF protein in retina of diabetic rats, which may be a new method for the treatment of diabetic neovascular disease.

• **KEYWORDS:** hypoxia inducible factor - 1; vascular endothelial growth factor; RNA interfering; retinal neovascularization; gene therapy

**Citation:** Meng LZ, Chen S, Chen L, *et al*. Effect of intravitreal injection with small interfering RNA targeting hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  on vascular endothelial growth factor protein expression in diabetic rats. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2015;15(10):1700-1704

## 摘要

**目的:**观察缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )小干扰RNA(siRNA)对糖尿病大鼠视网膜组织中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白表达的抑制作用,及其用于糖尿病新生血管性疾病治疗的可行性。

**方法:**以 pSilencer2.1-U6neo 为质粒载体,构建 HIF-1 $\alpha$ . siRNA 重组质粒。选取雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 54 只,随机分为正常对照组(15 只)和实验组(39 只)。实验组采用尾静脉注射链尿佐菌素(STZ)的方法建立糖尿病大鼠模型,造模成功后将实验组随机分为糖尿病组(15 只)、基因治疗组(12 只)和空载体组(12 只)。正常对照组及糖尿病组大鼠均不做转染;基因治疗组和空载体组分别转染 HIF-1 $\alpha$ . siRNA 重组质粒和 pSilencer 空载体质粒。行苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE 染色)观察视网膜组织形态,并采用免疫组织化学法检测 VEGF 蛋白的表达。分别于干扰后 24、48、72h,1wk 时计算 VEGF 蛋白的抑制效率。采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验进行统计学分析。

**结果:**HIF-1 $\alpha$ . siRNA 重组质粒经酶切、测序鉴定,确定为目的序列。HE 染色显示:正常对照组大鼠视网膜各层细胞排列整齐,细胞形态基本正常。糖尿病大鼠视网膜各层细胞排列紊乱,内界膜不完整,新生血管芽、新生血管簇呈垂直状突破内界膜生长。免疫组织化学染色显示:VEGF 阳性表达为细胞浆出现棕黄色颗粒,主要位于神经节细胞层。正常对照组 VEGF 蛋白呈弱阳性表达,而 DR 对照组和空载体组表达明显增强,基因治疗组较 DR 组和空载体组表达明显减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。VEGF 蛋白抑制率 24、48、72h 和 1wk 时分别为:27.4%、40.6%、47.5%、64.5%。

**结论:**HIF-1 $\alpha$ . siRNA 重组质粒能够抑制糖尿病大鼠视网膜中 VEGF 蛋白的表达,可能成为一种治疗糖尿病性新生血管性疾病的新方法。

**关键词:**缺氧诱导因子-1;血管内皮生长因子;RNA 干扰;视网膜新生血管;基因治疗

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.10.06

**引用:**孟丽珠,陈松,陈蕾,等.糖尿病大鼠玻璃体腔注射缺氧诱导因子-1 $\alpha$  siRNA 对血管内皮生长因子蛋白表达的影响.国际眼科杂志 2015;15(10):1700-1704

## 0 引言

慢性缺血缺氧是糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)发生、发展的重要环节,进展为增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)是糖尿病患者致盲的主要原因,PDR 的病理改变主要是视网膜新生血管(retinal neovascularization, RNV)的形成。寻找这个过程靶点对于 DR 的防治具有重要意义。目前研究认为,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与 RNV 的形成关系最为密切,被认为是缺血、缺氧诱导 RNV 形成过程中的关键调控因子。VEGF 不仅能促使 RNV 形成,而且与 DR 的进展程度以及 DR 引起的微血管异常、玻璃体积血密切相关<sup>[1-2]</sup>。大量研究证实,VEGF 在缺氧组织中的转录活化主要受缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )调节,并保持 VEGF mRNA 的稳定性。而 RNA 干扰(RNAi)已成为近几年来基因组学研究的热点内容之一,研究领域也已拓展到基因治疗范围。为此,我们采用 RNAi 技术,动态观察了 HIF-1 $\alpha$  小干扰 RNA(siRNA)对糖尿病大鼠视网膜组织中 VEGF 蛋白表达的抑制作用及抑制效率,以期为临床糖尿病 RNV 的基因治疗提供基础理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取 54 只雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠,鼠龄 12~14 周龄,体质量 220~260g,清洁级,天津市放射所动物研究中心提供,标准化饲养。所有大鼠均排除眼部疾病,随机将其分为正常对照组(15 只)及实验组(39 只)。主要试剂及仪器:石蜡切片机(LEICA,德国),OLYMPUS PM-6 显微照相机、OLYMPUS CH-30-313 生物显微镜(日本 Olympus 公司),VEGF 鼠抗人单克隆抗体、山羊抗小鼠 VEGF 抗体(美国 Santa Cruz 公司),SP 免疫组化试剂盒(SP-9002)、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),Zeiss 眼科手术显微镜(天津市眼科研究所提供)。

**1.2 方法** 实验组采用尾静脉注射 2% STZ 建立糖尿病大鼠模型:大鼠禁食 8~12h 后,按 45mg/kg 计算 STZ 使用量,尾静脉注射 72h 后取尾尖血测血糖,血糖 $>16.7$ mmol/L 确定为糖尿病大鼠。所有大鼠均自由进食、饮水。于成模后 2、4、8、12、16、18wk 分别测血糖。重组质粒的构建及鉴定方法,参照参考文献[3]。质粒转染前实验组大鼠随机分为糖尿病组(DR 组,15 只)、基因治疗组(12 只)和空载体组(12 只)。于成模 18wk 时,正常对照组及 DR 组分别随机选取 3 只大鼠,采用 FITC-dextran 荧光造影视网膜铺片观察视网膜血管形态变化<sup>[3]</sup>。成模 18wk 时,正常对照组及 DR 组不做转染,基因治疗组、空载体组大鼠玻璃体腔分别注射 HIF-1 $\alpha$  siRNA 重组质粒-脂质体复合物 4 $\mu$ L、空载体质粒 pSilencer2.1-U6neo-脂质体复合物 4 $\mu$ L;质粒与脂质体等体积混合,双眼注射。注射过程中发生玻璃体积血或视网膜脱离者不纳入研究。

于干扰后 24、48、72h,1wk 时分别取正常对照组、DR 组、基因治疗组及空载体组每组各 3 只大鼠 6 只眼球进行

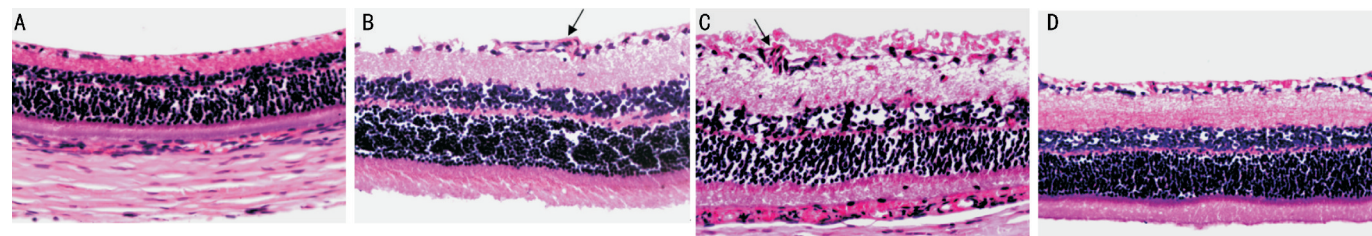


图1 四组大鼠视网膜组织切片像(HE,×400,箭头所示为早期新生血管芽) A:正常对照组,大鼠视网膜各层细胞排列整齐,细胞形态基本正常;B:DR组;C:空载体组,大鼠视网膜组织水肿,各层细胞排列紊乱,内界膜不完整,部分新生血管芽呈垂直状突破内界膜生长;D:基因治疗组,各层细胞结构排列较紊乱,节细胞、周细胞等各层细胞数较少,局部内界膜不完整,未见明显NV生长。

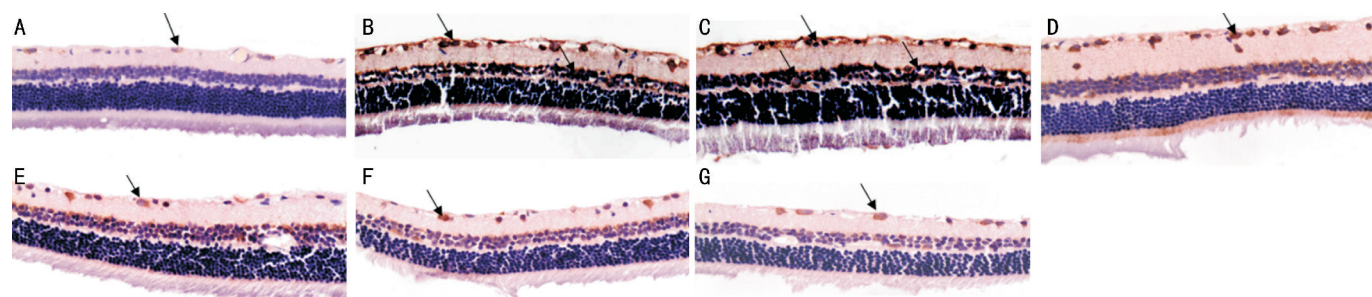


图2 视网膜组织中 VEGF 蛋白的表达(SP,×400) A:正常组,VEGF 蛋白呈弱阳性表达,主要位于视网膜神经节细胞层;B:DR组;C:空载体组,VEGF 蛋白呈强阳性表达,阳性着色主要位于神经节细胞层、内核层、内丛状层、神经纤维层、外核层也有表达;D~G:干扰组,分别为基因治疗组 24、48、72h 及 1wk,VEGF 蛋白表达量较 B 组和 C 组明显减少,且随时间递减,阳性表达主要位于神经节细胞层,少量位于内核层。

石蜡切片,分别进行 HE 染色及 SP 法免疫组织化学染色。染色方法按 SP 免疫组织化学试剂盒内说明书进行,以已知 VEGF 阳性表达的肝癌细胞作阳性对照,双蒸水代替一抗作阴性对照,具体步骤如下:大鼠腹腔麻醉后,摘除双眼眼球,放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 24h,梯度酒精脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋,4 $\mu$ m 厚度连续切片(切片方向与角膜和视盘连线的轴相平行),行 HE 染色及 SP 法免疫组织化学染色。各组每只眼球随机选出 5 张切片,每组共 30 张切片,光学显微镜下观察,Olympus 显微摄像系统采集图片。以细胞浆出现棕黄色颗粒为 VEGF 阳性信号。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理分析软件对各组不同时间点 VEGF 蛋白表达结果进行分析,测量其平均光密度(AOD)。HIF-1 $\alpha$  siRNA 对 DR 大鼠视网膜 VEGF 蛋白表达的抑制效率计算公式为:(DR 组 VEGF 蛋白相对表达量-基因治疗组 VEGF 蛋白相对表达量)/DR 组 VEGF 蛋白相对表达量 $\times$ 100%。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量数据的方差分析,Bonferroni 校正,进一步采用 LSD-*t* 检验进行各组之间两两比较,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠视网膜 HE 染色切片观察** 大鼠尾静脉注射 2% STZ 72h 后,血糖均 $>16.7$ mmol/L<sup>[3]</sup>。HE 染色显示,正常对照组大鼠视网膜各层细胞排列整齐,细胞形态基本正常,光感受器细胞内外节形态规整,内核层、外核层细胞核染色深紫,染色均匀,RPE 细胞核呈淡紫色,扁椭圆形,边界清晰,染色均匀;随着时间的推移,视网膜结构变化不明

显(图 1A)。DR 组及空载体组大鼠视网膜组织水肿,各层细胞排列紊乱,节细胞、周细胞等各层细胞数减少,胞核浓缩,内界膜不完整,视网膜内血管扩张,血管内皮细胞增殖突出于内界膜生长,部分新生血管芽、新生血管簇呈垂直状突破内界膜生长,出现了早期 NV 的改变(图 1B,C)。基因治疗组各层细胞结构排列较紊乱,节细胞、周细胞等各层细胞数较少,局部内界膜不完整,未见明显 NV 生长(图 1D)。

**2.2 大鼠视网膜 VEGF 蛋白的表达** 大鼠视网膜 VEGF 阳性表达为细胞浆出现棕黄的颗粒。正常组:VEGF 表达呈弱阳性,主要位于视网膜神经节细胞层(图 2A)。DR 组和空载体组:VEGF 表达呈强阳性,主要位于神经节细胞层、内核层,神经纤维层、外核层也有表达(图 2B,C)。基因治疗组:VEGF 表达明显减少,主要位于神经节细胞层和内核层(图 2D~G)。

**2.3 大鼠视网膜 VEGF 蛋白表达量的变化** 同一时间点组间视网膜 VEGF 蛋白表达差异具有统计学意义( $F=312.62,302.279,403.746,463.229,P=0.000$ )。进一步 LSD-*t* 检验比较,同时间点 DR 组和空载体组 VEGF 蛋白的表达量差异无统计学意义( $P=0.860,0.882,0.822,0.701$ )。基因治疗组较 DR 组及空载体组 VEGF 蛋白的表达量下降,但仍高于正常组,差异有统计学意义( $P=0.000$ ,图 3)。不同时间点组内比较,DR 组、空载体组及基因治疗组 VEGF 蛋白的表达量随时间变化差异均有统计学意义( $F=4.058,3.080,98.043;P=0.009,0.030,0.000$ )。DR 组不同时间点 VEGF 蛋白的表达呈逐渐上升趋势,1wk 时 VEGF 蛋白的表达量最高,进一步经 LSD-*t* 检验得出,与其它各时间点相比差异有统计学意义( $P=0.004$ ,

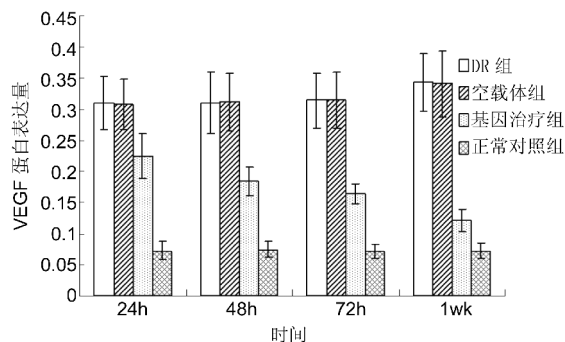


图3 相同时间点组间 VEGF 蛋白相对表达量(AOD 值)。

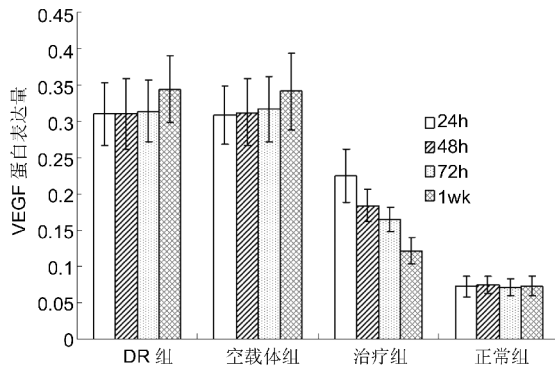


图4 不同时间点组内 VEGF 蛋白的表达量(AOD 值)。

0.004, 0.011); 空载体组不同时间点 VEGF 蛋白的表达呈逐渐上升趋势, 1wk 时的表达量与其它各时间点相比差异有统计学意义 ( $P = 0.007, 0.016, 0.039$ ); 基因治疗组 VEGF 蛋白的表达量随时间呈下降趋势, 但仍高于正常组, 组间比较差异均有统计学意义 ( $P = 0.000$ )。正常组各时间点 VEGF 蛋白表达量无明显变化 ( $F = 0.314, P = 0.815$ , 图 4)。

**2.4 VEGF 蛋白的抑制率** 干扰 24、48、72h、1wk 后 VEGF 蛋白的抑制率分别为 27.4%、40.6%、47.5%、64.5%。

### 3 讨论

长期慢性高血糖作用能引起糖尿病患者视网膜组织缺血缺氧, 晚期出现 RNV、玻璃体反复积血或牵拉性视网膜脱离, 是糖尿病患者致盲的主要原因, 抑制 RNV 的形成是治疗的重要目标。NV 的形成是一个极其复杂的过程, 可以简单地概括为: 增殖、出芽、形成、重塑 4 个阶段<sup>[4]</sup>, 大量基础研究逐步揭示了 NV 形成过程中的分子机制, 细胞因子在其中发挥的作用成为人们关注的焦点。在对血管内皮生长有诱导作用的众多生长因子中, VEGF 是最直接的眼球内 NV 形成因子, 在 DR、早产儿视网膜病变及年龄相关性黄斑变性等新生血管性眼病中发挥着重要作用<sup>[2,5]</sup>, 直接促进 NV 的形成, 并贯穿于 NV 形成和发展的全过程<sup>[6]</sup>。VEGF 在缺氧组织中的转录活化主要受 HIF-1 调节。HIF-1 是低氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的转录因子, 调控着下游众多基因的转录和表达, 最终导致缺血缺氧组织的血管新生, 是低氧诱导基因转录信息传递的最主要途径<sup>[7]</sup>。HIF-1 的活性主要是由 HIF-1 $\alpha$  决定。低氧条件下, HIF-1 $\alpha$  与 VEGF 5' 端增强子结合后促使 VEGF 的转录和表达增强; HIF-1 $\alpha$  还可上调 VEGF 受体的表达; 并且能够增强缺氧条件下 VEGF mRNA 的稳定性、防止其降解, 从而间接提高 VEGF 的生理活性, 促进血管新生<sup>[7,8]</sup>。研究表明在含氧量正常的高糖条件下, RPE 细胞依赖碳水化合物反应元件结合蛋白 (ChREBP 基因) 上调 HIF-1 $\alpha$ , 并调控其下游基因产物 VEGF 等的表达, 最终导致 RNV 的形成<sup>[9]</sup>, HIF 被认为是一个高血糖诱导因子, 当缺氧合并高血糖时, 视网膜更易受损伤<sup>[10]</sup>。由此可见, 抑制 HIF-1 $\alpha$  在 DR 防治方面具有重要临床意义。

在过去的 10a 中, 玻璃体腔内注射 VEGF 抑制剂成为治疗新生血管性视网膜疾病的有效方法, 但是晚期治疗的局限性和随之而来的复发问题使得我们有必要寻找新的、

有效的防治方法<sup>[11]</sup>。近年来, RNAi 以其特异性、高效性、副作用小的优点, 在多种疾病模型中显示出潜在的治疗价值。在一项舌癌的研究中, 研究者观察到 HIF-1 $\alpha$  siRNA 在转录及翻译水平均显著抑制了 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 表达, 瘤内注射 HIF-1 $\alpha$  siRNA 能够抑制裸鼠体内肿瘤的生长<sup>[12]</sup>。大量研究证实了在氧诱导的 RNV 模型中, RNAi 通过下调 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的表达, 抑制了 NV 的形成<sup>[13]</sup>。目前对于糖尿病 RNV 的研究多采用该模型, 但是该模型中 RNV 具有自行消退的特点, 不适合长期研究; 而且无法正确地模拟 DR 的发生、发展过程。因此, 我们认为有必要建立糖尿病 RNV 模型进行深入研究。然而既往多数研究报告, 糖尿病 RNV 造模困难。选取的实验动物不同、STZ 使用剂量不同、诱导措施不同, 观察到的现象也不相同; 造模后能产生视网膜病变的类型和严重程度, 与动物的种属、寿命、病程及造模方法有关<sup>[14]</sup>。本研究选用 SD 大鼠, 按照 45mg/kg 尾静脉注射 2% STZ 诱导造模, 饲养至 18wk 时, FITC-dextran 荧光造影视网膜铺片可见大量微动脉瘤及强荧光渗漏<sup>[3]</sup>; 石蜡切片 HE 染色显示: DR 组与空载体组大鼠内界膜不完整, 可见较多突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核, 单独或成簇出现, 视网膜血管内皮细胞增殖, 新生血管芽、新生血管簇呈垂直状突破内界膜生长, 出现了早期 NV 的改变, 两种不同的形态学研究结果相一致。但 HE 染色方法成本低、更为简便、直观。免疫组织化学染色显示, DR 组和空载体组 VEGF 蛋白的表达明显增加, 基因治疗组较 DR 组及空载体组 VEGF 蛋白的表达量下降。各组 VEGF 阳性表达均为细胞浆出现棕黄的颗粒, 主要定位于神经节细胞层, 少量位于神经纤维层、内丛状层、内核层及外核层。考虑这种不均匀分布与视网膜病变程度、视网膜中 Müller 细胞的增生程度、Müller 细胞内线粒体的分布及高糖对细胞内生物氧化的影响有关。上述形态学研究结果进一步提示我们建立早期糖尿病 RNV 具有可行性。该造模方法虽然观察到了新生血管芽的形成, 但仍然耗时较长, 且尾静脉注射操作较为复杂, 有待于进一步优化。

体外研究表明, RNAi 可高效特异性地抑制人 RPE 细胞 VEGF 的表达, 抑制效率达 65.0% ~ 90.0%<sup>[15]</sup>。本实验中, VEGF 蛋白抑制率 24、48、72h、1wk 时分别为 27.4%、40.6%、47.5%、64.5%。结合基因治疗组与 DR 组的 HE 染色及免疫组织化学染色结果, 可知抑制 HIF-1 $\alpha$  的

转录能够显著降低 VEGF 蛋白的表达,进而抑制了 NV 形成。随着时间的延长,抑制效率有增加的趋势。我们认为,以 HIF-1 $\alpha$  为靶点的基因治疗有可能成为有效抑制糖尿病 RNV 的新手段。但本实验所采用的 HIF-1 $\alpha$  siRNA 重组质粒尚不能完全抑制 RNV 的发生,这可能与 VEGF 在体内调控机制复杂,不完全依赖 HIF 途径有关。另外考虑与 HIF-1 $\alpha$  siRNA 重组质粒在视网膜中的转染效率、注射剂量、注射频率、靶序列的设计有关,联合抑制 VEGF 及其受体是否可获得更好的协同效应需要进一步观察。HIF-1 $\alpha$  siRNA 的抑制效率是否能够长期维持,仍需要深入研究。另外,本研究中观察的大鼠相对较少,出现新生血管芽是否具有普遍性,需要进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Noma H, Funatsu H, Yamashita H, *et al.* Regulation of angiogenesis in diabetic retinopathy: possible balance between vascular endothelial growth factor and endostatin. *Arch Ophthalmol* 2002;120(8):1075-1080
- 2 Gupta N, Mansoor S, Sharma A, *et al.* Diabetic retinopathy and VEGF. *Open Ophthalmol J* 2013;7:4-10
- 3 孟丽珠,陈松,刘艳,等. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$  小干扰 RNA 对糖尿病大鼠视网膜血管内皮生长因子 mRNA 抑制作用的动态观察. *中华眼底病杂志* 2011;27(3):245-249
- 4 Das A, McGuire PG. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Prog Retin Eye Res* 2003;22(6):721-748
- 5 Kurihara T, Westenskow PD, Friedlander M. Hypoxia-inducible factor (HIF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in the

- retina. *Adv Exp Med Biol* 2014;801:275-281
- 6 Lundkvist A, Lee S, Iruela-Arispe L, *et al.* Growth factor gradients in vascular patterning. *Novartis Found Symp* 2007;283:194-201
- 7 Campochiaro PA. Ocular neovascularization. *J Mol Med(Berl)* 2013;91(3):311-321
- 8 Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci* 2003;60(7):1376-1393
- 9 Chang ML, Chiu CJ, Shang F, *et al.* High glucose activates hREBP-mediated HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in human RPE cells under normoxia. *Adv Exp Med Biol* 2014;801:609-621
- 10 Chiu CJ, Taylor A. Dietary hyperglycemia, glycemic index and metabolic retinal diseases. *Prog Retin Eye Res* 2011;30(1):18-53
- 11 Todorich B, Yiu G, Hahn P. Current and investigational pharmacotherapeutic approaches for modulating retinal angiogenesis. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2014;7(3):375-391
- 12 Liang J, Zhang Z, Liang L, *et al.* HIF-1 $\alpha$  regulated tongue squamous cell carcinoma cell growth via regulating VEGF expression in a xenograft model. *Ann Transl Med* 2014;2(9):92-98
- 13 Jiang J, Xia XB, Xu HZ, *et al.* Inhibition of retinal neovascularization by gene transfer of small interfering RNA targeting HIF-1 $\alpha$  and VEGF. *J Cell Physiol* 2009;218(1):66-74
- 14 王应利,惠延年. 糖尿病视网膜病变动物模型选择的注意事项. *中华眼科杂志* 2012;48(7):587-590
- 15 Li GY, Fan B, Wu YZ, *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor gene expression by T7-siRNAs in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Chin Med J* 2005;118(7):567-573