

# 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 与血管内皮生长因子在视网膜新生血管中的表达及相关性

刘宁宁, 柳力敏, 万超, 胡悦东, 陈蕾

基金项目: 中国辽宁省博士科研启动基金资助项目 (No. 20091115)

作者单位: (110001) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 刘宁宁, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 陈蕾, 硕士, 教授, 博士研究生导师, 先后承担和参加完成省级以上课题六项, 获辽宁省科技进步一等奖 1 项, 三等奖 2 项, 科技成果奖 1 项, 研究方向: 眼底病. leichen51@hotmail.com  
收稿日期: 2010-10-24 修回日期: 2010-11-09

## Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ and VEGF in the retinal neovascularization

Ning-Ning Liu, Li-Min Liu, Chao Wan, Yue-Dong Hu, Lei Chen

**Foundation item:** Scientific Research Foundation for the Doctoral Program of Liaoning Province, China (No. 20091115)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Lei Chen. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. leichen51@hotmail.com

Received: 2010-10-24 Accepted: 2010-11-09

### Abstract

• **AIM:** To investigate the expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and its relationship with vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal neovascularization.

• **METHODS:** Mouse model of hyperoxia-induced ischemic retinopathy were established. A novel fluorescein-dextran perfusion method had been developed to assess the vascular pattern. The retinal neovascular response was quantitated. HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in the retina was determined by immunohistochemical method.

• **RESULTS:** Lots of neovascularization were seen in hyperoxia group. The number of nuclei of proliferative retinal vessels increased significantly as compared with normal control group ( $P < 0.01$ ). The HIF-1 $\alpha$  was expressed in the ganglion cells and retinal blood vessels; and the VEGF presented in the inner nuclear layer, ganglion cells and retinal blood vessels.

• **CONCLUSION:** There are expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in the retinal neovascularization and they are correlated.

• **KEYWORDS:** retinal neovascularization; hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ; vascular endothelial growth factor

Liu NN, Liu LM, Wan C, et al. Expression of hypoxia-inducible

factor-1 $\alpha$  and VEGF in the retinal neovascularization. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(12):2256-2258

### 摘要

**目的:** 检测视网膜新生血管中缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 的表达, 研究其与血管内皮生长因子 (VEGF) 表达的相关性。

**方法:** 以高浓度氧诱导 C57BL/6J 小鼠建立视网膜新生血管模型, 取对照组和给氧组幼鼠眼球作荧光素血管灌注, 病理切片及免疫组织化学检测, 分别观察视网膜血管的改变, 视网膜新生血管内皮细胞数目及 HIF-1 $\alpha$ , VEGF 蛋白的表达。

**结果:** 给氧组视网膜可见大量新生血管形成, 新生血管内皮细胞核数为  $(23.38 \pm 1.07)$  个, 与对照组相比差异有极显著性 ( $P < 0.01$ )。HIF-1 $\alpha$  蛋白表达在神经节细胞层和突破视网膜内界膜的新生血管。VEGF 蛋白表达在内核层, 神经节细胞层和突破视网膜内界膜的新生血管。两者表达呈显著正相关 ( $r = 0.931$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论:** 在视网膜新生血管形成中存在 HIF-1 $\alpha$ , VEGF 的高表达, 且两者表达密切相关。

**关键词:** 视网膜新生血管; 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 血管内皮生长因子

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.12.008

刘宁宁, 柳力敏, 万超, 等. 缺氧诱导因子-1 $\alpha$  与血管内皮生长因子在视网膜新生血管中的表达及相关性. 国际眼科杂志 2010;10(12):2256-2258

### 0 引言

研究发现视网膜组织缺血缺氧, 可诱导视网膜新生血管的形成, 进而表现为增生性糖尿病视网膜病变、缺血型视网膜静脉阻塞及早产儿视网膜病变等疾病。缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 是目前发现的唯一的一个特异性缺氧状态下发挥活性的转录因子, 由 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  组成, 其中 HIF-1 $\alpha$  水平主要依赖于细胞间的氧供, 决定了 HIF-1 的活性<sup>[1]</sup>。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是目前已知的最关键的血管生成促进因子, 其在低氧环境中的表达受 HIF-1 $\alpha$  的调控<sup>[2]</sup>。我们的研究通过高浓度氧诱导的视网膜新生血管模型, 观察 HIF-1 $\alpha$ , VEGF 在眼部视网膜新生血管的表达并将两者表达量相比较, 探讨两者之间的关系。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择鼠龄 7d 的健康 C57BL/6J 幼鼠 28 只 (由中国医科大学实验动物中心提供)。随机分成两组: 组 1 (正常对照组) 幼鼠 14 只, 与哺乳母鼠一起在正常空气环境下饲养; 组 2 (给氧组) 幼鼠 14 只, 与哺乳母鼠一起置于密闭玻璃容器内。玻璃容器内接入 100mL/L 湿润医用纯氧气, 氧气的流量控制在 0.5 ~ 0.75L/min, 使容器内氧

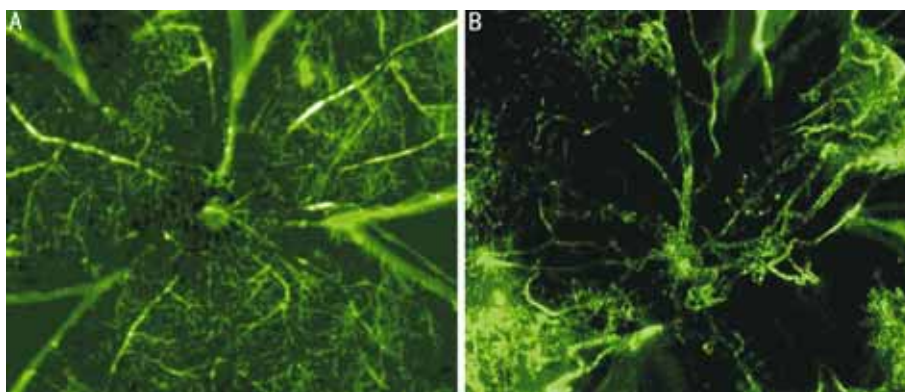


图1 荧光素灌注视网膜铺片 A:对照组;B:给氧组。

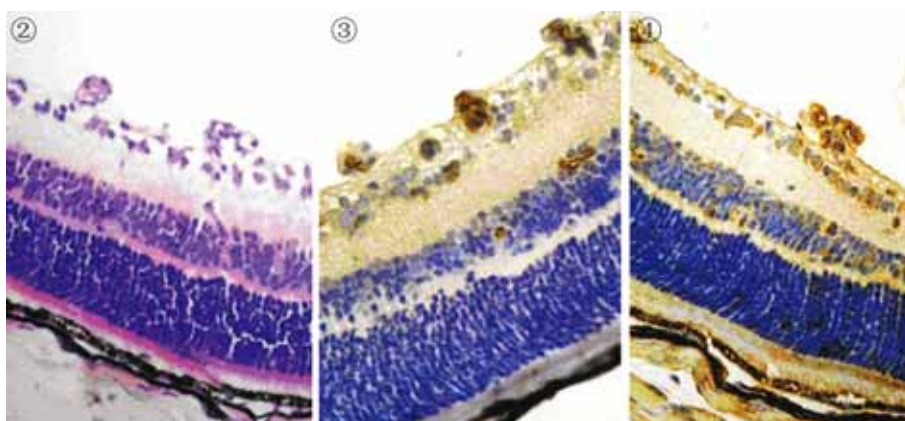


图2 给氧组视网膜切片(HE×400)。

图3 给氧组 HIF-1 $\alpha$  免疫组化染色像(DAB×400)。

图4 给氧组 VEGF 免疫组化染色像(DAB×400)。

气分压为  $75\% \pm 2\%$ , 期间用测氧仪持续监测容器内的氧分压。每2d 打开氧箱更换垫料, 加食, 换水, 替换母鼠1 次。在此高氧环境下饲养5d, 然后回到正常空气环境下饲养5d。

**1.2 方法** 给氧组和对照组各取幼鼠4 只, 均于生后第17d 进行乙醚麻醉, 取相对分子量  $2 \times 10^6$  荧光素粉异硫氰酸葡聚糖荧光素(FITC, 美国 Sigma 公司提供)50mg, 溶于1mL 的磷酸盐缓冲液(PBS)中, 直接心腔内注射, 立即摘除眼球, 40g/L 多聚甲醛固定10min, 在解剖显微镜下去除眼前节, 完整游离视网膜组织, 固定在40g/L 多聚甲醛溶液中3h。然后将视网膜放射状切开5~6 刀, 平铺到载玻片上, 滴上少许中性树脂胶后, 加盖玻片, 荧光显微镜观察。视网膜组织切片制作及观察: 两组中各取10 只幼鼠, 均于生后第17d 处死。眼球摘除后放入40g/L 多聚甲醛中固定24h。常规脱水, 石蜡包埋, 切片方向平行于角膜至视乳头的矢状位连续  $6\mu\text{m}$  切片, 苏木素-伊红(HE)染色, 显微镜下观察结果。每只眼球取20 张切片, 相邻两张切片间隔  $30\mu\text{m}$ ; 用双盲法计数血管内皮细胞核, 统计平均每只眼球每张切片突破内界膜的内皮细胞核数。选取切片时应避开视乳头周围; 计数血管内皮细胞核时仅计数与内界膜有关系的血管内皮细胞核。免疫组织化学检测视网膜中 HIF-1 $\alpha$ , VEGF 蛋白的表达及观察: 从两组中各随机抽取10 张未经染色的  $6\mu\text{m}$  切片, 按链霉素抗生素素蛋白-生物素复合物(SABC)法进行 HIF-1 $\alpha$ , VEGF 免疫组织化学检查。抗体工作浓度1: 100。以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 二氨基联苯胺(DAB)显色。HIF-1 $\alpha$ , VEGF 表达的阳性细胞为细胞浆着淡黄色至棕褐色颗粒。图像分析: 每张切片在400 倍光镜下, 随机选取5 个视野, 利用计算机图像分析仪(LUZEX-F, 日本)进行灰度扫描, 分别测

定 HIF-1 $\alpha$ , VEGF 积分光密度值( IOD), 取其平均值作为分析指标。

统计学分析: 采用 SPSS 10.0 版软件包进行统计学分析, 结果以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 *t* 检验, HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 表达行相关分析, 以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 荧光素灌注视网膜血管铺片** 对照组在生后第17d 时(图1A) 视网膜血管基本成熟, 自视盘发出的大血管向四周呈放射状均匀分布, 管径较粗, 分支良好, 直至视网膜周边部。给氧组在生后第17d 即出氧箱后5d(图1B), 视网膜血管形态和分布发生明显改变, 失去了正常规则的网状分布。大血管显著扩张, 大片无灌注区, 大量新生血管形成。

**2.2 视网膜新生血管细胞核计数结果** 对照组生后第17d 新生鼠10 只20 眼400 张组织切片中未发现或仅在极少数切片中见到突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核, 平均每张切片中新生血管内皮细胞核数少于  $(0.27 \pm 0.20)$  个。给氧组生后第17d 新生鼠10 只20 眼400 张组织切片, 可见较多突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核(图2), 平均每张切片中新生血管内皮细胞核数为  $(23.38 \pm 1.07)$  个, 与对照组相比差异有极显著性意义( $t = 9.454, P < 0.01$ )。

**2.3 视网膜组织 HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 蛋白的表达情况** 鼠龄为17d 正常对照组: 视网膜组织各层中未见 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达。VEGF 蛋白微弱表达于神经节细胞层、内核层的某些细胞和外核层。鼠龄为17d 给氧组: HIF-1 $\alpha$  蛋白表达在神经节细胞层和突破视网膜内界膜的新生血管(图3)。VEGF 蛋白表达在神经节细胞层、内核层和突破视网膜内界膜的新生血管(图4)。对照组和给氧组 HIF-1 $\alpha$ , VEGF IOD

表1 两组 HIF-1 $\alpha$ , VEGF IOD 的比较  $\bar{x} \pm s$

	IOD		t	P
	对照组	给氧组		
HIF-1 $\alpha$	2.41 $\pm$ 0.69	3.62 $\pm$ 0.19	9.86	<0.01
VEGF	2.18 $\pm$ 0.75	4.34 $\pm$ 0.25	19.61	<0.01

的比较:给氧组 HIF-1 $\alpha$ , VEGF IOD 均明显高于对照组(表1)。相关分析: HIF-1 $\alpha$  蛋白与 VEGF 蛋白呈显著正相关( $r = 0.931, P < 0.01$ )。

### 3 讨论

视网膜缺血缺氧性病变常继发视网膜新生血管。近来研究显示:某些转录因子参与了新生血管生成的调控,其中 HIF-1 $\alpha$  是目前公认的与新生血管生成关系最密切的转录因子,在缺氧状态下广泛存在于哺乳动物和人体内<sup>[3-5]</sup>。HIF-1 是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的一种异源二聚体核转录因子,由  $\alpha$  亚基(HIF-1 $\alpha$ )和  $\beta$  亚基(HIF-1 $\beta$ )组成。HIF-1 $\alpha$  是唯一的 O<sub>2</sub> 调节亚单位,决定 HIF-1 的活性。缺氧条件下,细胞核产生 HIF-1 与靶基因上的 HIF-1 结合位点结合,启动和促进靶基因的转录。靶基因转录启动后,相应的蛋白质产物增加,这些产物在新生血管形成中起重要作用<sup>[6]</sup>。研究表明,HIF-1 $\alpha$  可调节多种靶基因如 VEGF、红细胞生成素(erythropoietin, EPO)等的表达,它的活性对维持肿瘤细胞的能量代谢,新血管生成起重要作用。在裸鼠动物模型上已发现,HIF-1 $\alpha$  的缺失不仅可以明显降低恶性肿瘤的生长速度,而且还可以使这些肿瘤组织的新生血管生成明显减少<sup>[7]</sup>。这提示 HIF-1 $\alpha$  在恶性肿瘤组织的新生血管生成中可能发挥着重要作用。目前国内有关 HIF-1 $\alpha$  与眼部新生血管的研究较少,本研究利用氧诱导的视网膜新生血管模型,首次观察 HIF-1 $\alpha$  蛋白在视网膜的表达及与视网膜新生血管形成之间的关系。研究结果显示:在正常视网膜组织中,HIF-1 $\alpha$  蛋白表达阴性,当组织缺氧时,HIF-1 $\alpha$  蛋白主要表达在节细胞层和新生血管上,这可能是节细胞层对组织缺氧最敏感而 HIF-1 $\alpha$  只在细胞缺氧时表达,也是细胞感受缺氧时最早反应因子之一。HIF-1 $\alpha$  广泛参与低氧诱导的适应性反应,促进局部组织对低氧的耐受及新生血管形成。

新生血管的发生、发展是由一系列因素调控的复杂过程。其中,VEGF 起关键作用。VEGF 是血管内皮细胞的丝分裂原,它可增加血管的通透性,便于细胞外基质形成及血管内皮细胞分裂、移行,形成新生血管<sup>[8]</sup>。近年来的研究发现,VEGF 在缺氧组织中的转录活化主要受 HIF-1 $\alpha$  调节,并保持其 mRNA 的稳定性。HIF-1 $\alpha$  还可上调 VEGF 受体的表达,从而促进血管新生<sup>[9]</sup>。有研究表明 VEGF 是 HIF-1 $\alpha$  调节的主要目的基因,HIF-1 $\alpha$ -VEGF 轴在实体肿瘤的血管形成中起到早期调节的作用<sup>[10]</sup>。当肿瘤细胞的生长超出氧弥散的限度时,肿瘤细胞即处于缺氧的环境,缺氧引起肿瘤细胞内 HIF-1 $\alpha$  蛋白的积聚和核转位,激活 VEGF 的转录,此时 VEGF 的蛋白表达水平会超出正常水平的 10 倍以上,并进一步诱导新生血管的形成,缺氧使内皮细胞增生,导致 VEGF 及其受体 KDR 表达明显上调,而 VEGF 与受体相结合是新生血管生成的前提<sup>[11]</sup>。

我们的研究观察 VEGF 蛋白在视网膜的表达,结果表明在视网膜新生血管形成中 VEGF 蛋白主要表达在节细胞层、内核层和新生血管上,其表达空间范围比 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达有所扩大。同时我们还发现 HIF-1 $\alpha$  的表达水平和

VEGF 的表达水平呈强正相关( $r = 0.931, P < 0.01$ ),这可能与 VEGF 基因上游的启动子中存在包含有 HIF-1 $\alpha$  结合位点的缺氧反应元件(hypoxic responsive element, HRE)有关<sup>[12]</sup>。在缺氧条件下,细胞核中的 HIF-1 $\alpha$  通过磷酸化过程活化后与 HRE 结合,引起 VEGF 基因的活化,诱导 VEGF 转录水平的提高<sup>[13]</sup>。此外, HIF-1 $\alpha$  还可通过增强 VEGF mRNA 的稳定性提高 VEGF 的表达<sup>[14]</sup>。VEGF 表达增加后即可与血管内皮细胞表面的 VEGF 受体相结合,从而激活一系列的缺氧传导通路,诱导新生血管的生成。我们推测,在视网膜新生血管形成中, HIF-1 $\alpha$  是 VEGF 表达的重要调控因子之一,但 VEGF 的表达同时还存在其他调控方式。HIF-1 作为至今发现的唯一的一个特异性缺氧状态下发挥活性的转录因子,随着对 HIF-1 $\alpha$  研究的深入,有可能为视网膜新生血管性疾病的预防和治疗找到全新的干预靶点。

### 参考文献

- 1 Semenza GL, Agani F, Booth G, et al. Structural analysis of hypoxia inducible factor-1. *Kidney Int* 1997;51:553
- 2 Wang W, Xu GL, Jia WD, et al. Expression and correlation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor and microvessel density in experimental rat hepatocarcinogenesis. *Int Med Res* 2009;37(2):417-425
- 3 Semenza GL. Regulation of vascularization by hypoxia-inducible factor 1. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1177:2-8
- 4 Arjamaa O, Nikinmaa M, Salminen A, et al. Regulatory role of HIF-1alpha in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Ageing Res Rev* 2009;8(4):349-358
- 5 Loinard C, Ginouvès A, Vilar J, et al. Inhibition of prolyl hydroxylase domain proteins promotes therapeutic revascularization. *Circulation* 2009;120(1):50-59
- 6 Roberts AM, Ohh M. Beyond the hypoxia-inducible factor-centric tumour suppressor model of von Hippel-Lindau. *Curr Opin Oncol* 2008;20(1):83-89
- 7 Sun Q, Zhou H, Binmadi NO, et al. Hypoxia-inducible factor-1-mediated regulation of semaphorin 4D affects tumor growth and vascularity. *Biol Chem* 2009;284(46):32066-32074
- 8 Boyd SR, Tan D, Bunce C, et al. Vascular endothelial growth factor is elevation ocular fluids of eyes harbouring uveal melanoma: identification of a potential therapeutic window. *Br J Ophthalmol* 2002;86(4):448-452
- 9 Mousa SA, Lorelli W, Campochiaro PA. Role of hypoxia and extracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells. *Cell Biochem* 1999;74(1):135-143
- 10 Westra J, Brouwer E, Bouwman E, et al. Role for CaMKII inhibition in rheumatoid arthritis: effects on HIF-1-induced VEGF production by rheumatoid synovial fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1173:706-711
- 11 Liu H, Yang Q, Radhakrishnan K, et al. Role of VEGF and tissue hypoxia in patterning of neural and vascular cells recruited to the embryonic heart. *Dev Dyn* 2009;238(11):2760-2769
- 12 Damert A, Ikeda E, Risau W. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible-factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem* 1997;327(pt2):419-423
- 13 Furlan D, Sahnane N, Carnevali I, et al. Up-regulation of the hypoxia-inducible factor-1 transcriptional pathway in colorectal carcinomas. *Hum Pathol* 2008;39(10):1483-1494
- 14 Hata Y, Sassa Y, Kita T, et al. Vascular endothelial growth factor expression by hyalocytes and its regulation by glucocorticoid. *Ophthalmology* 2008;92(11):1540-1544