

糖尿病大鼠视网膜中内质网应激蛋白、HIF-1 α 和血管内皮生长因子的表达

王静¹, 朱鸿², 施彩虹¹

基金项目:上海市第三人民医院基金项目(No. syz2010-05)
作者单位:¹(201900)中国上海市,上海交通大学附属第三人民医院眼科;²(200080)中国上海市,上海交通大学附属第一人民医院眼科
作者简介:王静,在读硕士研究生,研究方向:糖尿病视网膜病变。
通讯作者:施彩虹,硕士,主任医师,硕士生导师,研究方向:糖尿病视网膜病变。Dr_caihong@126.com
收稿日期:2015-02-16 **修回日期:**2015-04-21

Expressions of endoplasmic reticulum stress related protein, hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in the retina of diabetic rats

Jing Wang¹, Hong Zhu², Cai-Hong Shi¹

Foundation item: The Third People's Hospital Foundation of Shanghai(No. syz2010-05)

¹Department of Ophthalmology, the Third People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201900, China;²Department of Ophthalmology, the First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

Correspondence to: Cai-Hong Shi. Department of Ophthalmology, the Third People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201900, China. Dr_caihong@126.com

Received:2015-02-16 Accepted:2015-04-21

Abstract

• **AIM:** To evaluate the expressions and significances of endoplasmic reticulum stress related protein (BIP), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retina of diabetic rats.

• **METHODS:** Seventy-two male Sprague-Dawley (SD) rats were chosen and divided randomly into 6 groups: normal control 2mo (C2m, $n=12$), diabetes mellitus 2mo (D2m, $n=12$), normal control 4mo (C4m, $n=12$), diabetes mellitus 4mo (D4m, $n=12$), normal control 6mo (C6m, $n=12$) and diabetes mellitus 6mo (D6m, $n=12$). The diabetes mellitus mouse were induced by intraperitoneal injection of 0.1mol/L streptozotocin (STZ, 65mg/kg). The expression of BIP, HIF-1 α and VEGF in the retina were detected by enzyme-linked immuno sorbent assay. The location of BIP, HIF-1 α and VEGF in epiretinal membranes were investigated by immunohistochemistry staining.

• **RESULTS:** BIP were significantly increase than control groups in all DM groups with the course of diabetes ($P<0.01$). HIF-1 α were detected higher than control groups in all DM groups ($P<0.05$), but there was no statistical significance among treatment groups. VEGF in D4m and D6m groups were higher than control groups ($P<0.05$), and there was statistical significance between D4m and D6m groups. BIP can be detected in control groups a little, mainly in the inner limiting membrane and ganglion cell layers. HIF-1 α cannot be detected in control groups, meanwhile it can be detected in all layers in DM. VEGF can be detected in control groups a little, it mainly be detected in inner nuclear layer, outer nuclear layer, around retinal vessel and ganglion cell layers in DM groups.

• **CONCLUSION:** The expressions of BIP, HIF-1 α and VEGF increase in the retina of diabetic rats than control groups with progressive of diabetes mellitus, both endoplasmic reticulum stress and HIF-1 α signal path play important role in the progress of diabetic retinopathy.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; endoplasmic reticulum stress; hypoxia-inducible factor-1; vascular endothelial growth factor

Citation: Wang J, Zhu H, Shi CH. Expressions of endoplasmic reticulum stress related protein, hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in the retina of diabetic rats. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2015;15(5):772-776

摘要

目的:探索糖尿病大鼠视网膜中内质网应激相关BIP(蛋白重链结合蛋白)、HIF-1 α (低氧诱导因子-1 α)和VEGF(血管内皮生长因子)的表达及意义。

方法:72只雄性SD大鼠,随机分为6组:正常2月对照组(C2m),糖尿病2月组(D2m),正常4月对照组(C4m),糖尿病4月组(D4m),正常6月对照组(C6m),糖尿病6月组(D6m),每组各12只。实验组给予一次性腹腔注射65mg/kg STZ建立糖尿病模型。ELISA法检测BIP、HIF-1 α 和VEGF表达水平,免疫组化法观察大鼠BIP、HIF-1 α 和VEGF视网膜内定位情况。

结果:BIP表达随DM病程的延长而增加($P<0.05$),且DM各组与对照组相比,其差异均有统计学意义($P<0.01$)。HIF-1 α 在DM组中表达较对照组增加,其差异有统计学意义($P<0.05$),但DM组各组间差异无统计学意义。VEGF蛋白在D2m组与对照组间差别无统计学意义,但D4m、D6m与对照组间差别有统计学意义($P<$

0.05),且D4m和D6m两组间差别有统计学意义。免疫组化:BIP在对照组视网膜神经节细胞层中少量表达,DM组主要分布于视网膜内核层和神经节细胞层;HIF-1 α 在对照组基本不表达,DM组各层均有表达;VEGF在对照组大鼠中视网膜各层中少量表达,而DM组大鼠的内核层、外核层及视网膜血管、神经节细胞层中VEGF阳性表达。

结论:糖尿病大鼠视网膜组织中的BIP、HIF-1 α 、VEGF均较对照组增加且随糖尿病病程进展而增加,内质网应激和低氧诱导因子途径均可能在糖尿病视网膜病变的进展中起重要作用。

关键词:糖尿病视网膜病变;内质网应激;低氧诱导因子;血管内皮生长因子

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.5.07

引用:王静,朱鸿,施彩虹.糖尿病大鼠视网膜中内质网应激蛋白、HIF-1 α 和血管内皮生长因子的表达.国际眼科杂志2015;15(5):772-776

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病重要的微血管并发症,已成为四大主要致盲眼病之一^[1],如何早期预防及控制DR的发生和发展,关系到糖尿病患者的生存质量。DR的病理特征为血-视网膜屏障破坏和视网膜新生血管形成。我们前期研究发现,早期DR患者血清中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)等细胞因子表达增加^[2-4],细胞因子使血管通透性增加,内皮细胞增殖和迁移,促进新生血管形成,同时能够激活白细胞,导致多种活性物质的释放,使血-视网膜屏障破坏。在众多的细胞因子当中,VEGF被认为是与DR新生血管联系最紧密的一个。组织缺血、缺氧、氧化应激等都可以作为应激源诱导应激信号途径如内质网应激途径(endoplasmic reticulum stress, ERS)和HIF-1途径来适应机体内环境紊乱,相关研究表明在肿瘤细胞中以上两个信号通路与VEGF的形成关系密切^[5]。本实验通过检测不同病程糖尿病视网膜病变大鼠视网膜组织中HIF-1 α 、ERS相关蛋白BIP和VEGF的表达来探索三种因子在糖尿病视网膜病变病程中的动态变化。

1. 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物分组和模型建立 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠72只,1月龄,体质量约180~220g,购于上海西普尔-必凯实验有限公司。适应性喂养1wk,随机分为6组:正常2月对照组(C2m),糖尿病2月组(D2m),正常4月对照组(C4m),糖尿病4月组(D4m),正常6月对照组(C6m),糖尿病6月组(D6m),每组各12只。方法:大鼠禁食10~12h,使用pH=4.4的枸橼酸缓冲液(0.1mol/L)溶解链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)至浓度为2%溶液,按65mg/kg一次性腹腔注射进行DM大鼠造模。对照组大鼠接受等体积枸橼酸缓冲液(0.1mol/L)腹腔注射。药物注射48h后各组大鼠尾静脉取血检测空腹血糖,当血糖浓度高于16.7mmol/L,尿量和饮水明显增多即为DM造模成功,随后每2wk监测一次空腹血糖水平,并观察大鼠

一般情况。

1.1.2 主要试剂 兔抗鼠通用组化试剂盒和DAB显色盒(上海复申公司);VEGF兔抗大鼠抗体、BIP兔抗大鼠抗体(武汉博士德公司)、HIF-1 α 兔抗大鼠抗体(Bioworld公司);Elisa试剂盒(VEGF, HIF-1 α , BIP)均购于武汉博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 常规HE染色 各组大鼠相应时间点麻醉取眼球,4%多聚甲醛固定24h,酒精梯度脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,沿平行眼轴方向进行切片,厚4 μ m,脱蜡、HE染色、脱水、透明并封片。

1.2.2 免疫组织化学染色 各组大鼠相应时间点麻醉后取眼球,用4%多聚甲醛固定2h,去除眼前节,继续固定24h,酒精梯度脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋、平行眼轴方向4 μ m切片,烤干、脱蜡,经PBS冲洗后,用3%过氧化氢去除内源性过氧化物,室温下蛋白封闭液封闭5min,分别加VEGF抗体(1:50)、HIF-1 α 抗体(1:200)和BIP抗体(1:100),4 $^{\circ}$ C冰箱过夜。PBS漂洗3次后,加HRP标记的广谱二抗,37 $^{\circ}$ C孵育30min, PBS漂洗,滴加过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液,室温孵育10min, PBS漂洗3次, DAB显色,蒸馏水终止反应,苏木精给予复染,中性树脂封片。

1.2.3 酶联免疫吸附剂测定(ELISA) 按照试剂盒说明书进行,用自动酶标分析仪在450nm单波长下读取吸光度(OD值),根据标准品OD值,应用Curve Expert 1.3软件绘制标准曲线,进一步计算VEGF, HIF-1 α , BIP相应浓度。

统计学处理:采用SPSS 13.0统计软件进行分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组独立样本均数比较采用 t 检验;多组均数比较采用单因素方差分析,并通过SNK- q 进行多个样本均数间两两比较; $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型建立情况 各DM组大鼠的空腹血糖均持续高于16.7mmol/L,对照组大鼠血糖始终保持在正常范围内,对照组和DM组间血糖差异有统计学意义($P<0.01$)。对照组大鼠体重随月龄正常增长,而DM组大鼠诱导后1mon出现体重负增长。

2.2 各组大鼠视网膜HE染色结果 对照组各层结构清楚,排列有序;D2m组视网膜分层明显,细胞排列较松散;D4m组视网膜分层明显,神经节细胞层排列紊乱;D6m组视网膜外核层细胞撕脱,神经节细胞层排列紊乱,可见微血管病变,血管扩张(图1)。

2.3 DM各组与对照组三种蛋白的表达情况 DM各组与对照各组BIP表达比较,C2m与D2m组($t=7.075, P<0.001$)、C4m与D4m组($t=9.597, P<0.001$)、C6m与D6m组($t=9.161, P<0.001$)差异均有统计学意义;DM各组与对照各组HIF-1 α 表达比较,C2m与D2m组($t=8.060, P<0.001$)、C4m与D4m组($t=7.126, P<0.001$)、C6m与D6m组($t=6.010, P<0.001$)比较差异均有统计学意义;DM各组与对照组VEGF表达量比较,D2m与C2m组间差别无统计学意义($t=0.59, P=0.538$);而D4m与C4m组($t=4.23, P=0.002$),D6m与C6m($t=6.988, P<0.001$)差别均有统计学意义(表1)。视网膜组

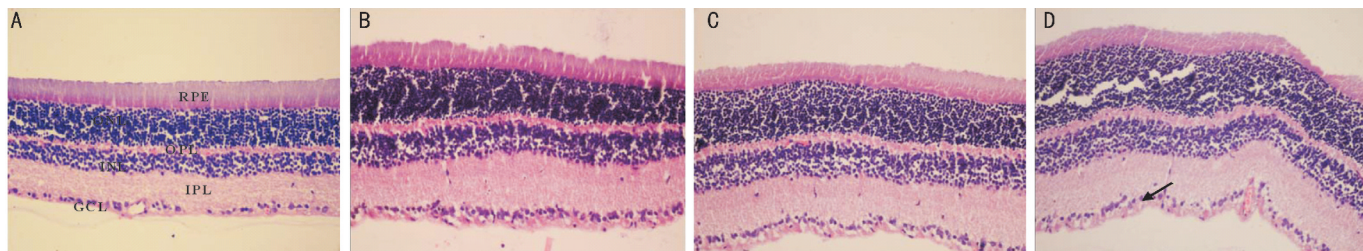


图1 对照组大鼠和不同月龄 DM 大鼠视网膜组织 (HE ×400, 箭头指向神经节细胞层) A: 对照组; B: D2m 组; C: D4m 组; D: D6m 组。

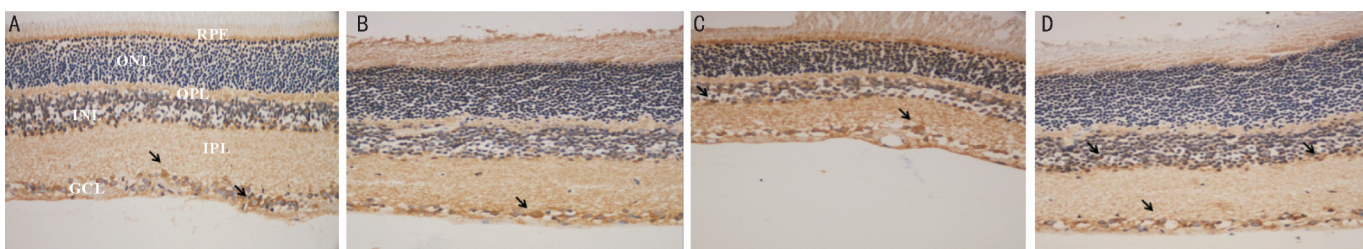


图2 对照组和不同病程 DM 大鼠视网膜组织 BIP 表达 (免疫组化染色×400, 箭头指向 BIP 阳性细胞) A: 对照组; B: D2m 组; C: D4m 组; D: D6m 组。

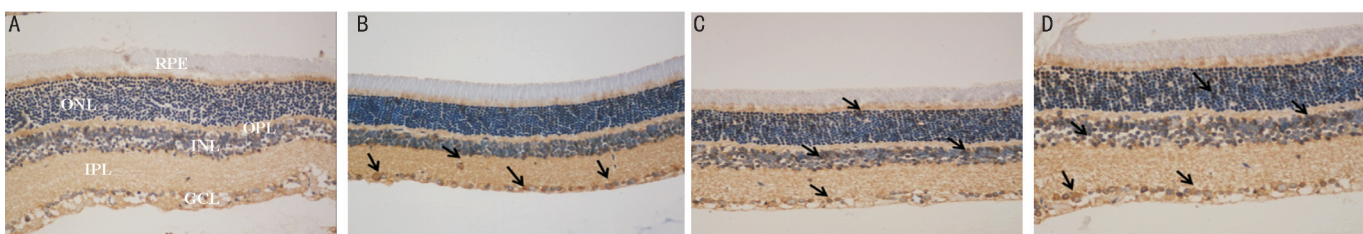


图3 对照组和不同病程 DM 大鼠视网膜组织 HIF-1α 表达 (免疫组化染色×400, 箭头指向 HIF-1α 阳性细胞) A: 对照组; B: D2m 组; C: D4m 组; D: D6m 组。

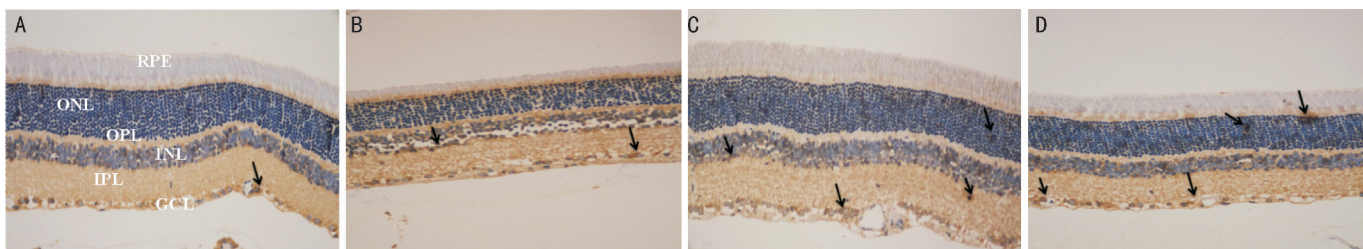


图4 对照组和不同病程 DM 大鼠视网膜组织 VEGF 表达 (免疫组化染色×400, 箭头指向 VEGF 阳性细胞) A: 对照组; B: D2m 组; C: D4m 组; D: D6m 组。

表1 对照组与 DM 大鼠视网膜组织 BIP, HIF-1α, VEGF 浓度水平 (x̄±s, pg/mL)

分组	BIP	HIF-1α	VEGF
对照组			
C2m 组	23.546±8.87	648.838±126.56	104.526±19.36
C4m 组	34.763±7.74	598.352±117.34	98.627±25.47
C6m 组	33.762±5.74	567.099±134.24	112.627±23.68
DM 组			
D2m 组	146.350±79.51 ^b	1487.245±265.58 ^a	115.763±54.83
D4m 组	261.698±69.62 ^b	1519.221±321.43 ^a	276.845±104.28 ^a
D6m 组	427.425±124.38 ^b	1455.539±358.29 ^a	487.837±97.10 ^a

^aP<0.05; ^bP<0.01 vs 正常组。

织 BIP、HIF-1α 和 VEGF 表达在各 DM 组之间进行比较, 不同病程 DM 大鼠视网膜组织 BIP 表达差异有统计学意义 ($F=17.06, P<0.01$), 组间两两比较均有统计学意义 ($P<0.01$), 且随着病程的延长, BIP 的表达增加; HIF-1α 检测结果各组间差异无统计学意义 ($F=0.923, P=0.081$);

VEGF 检测结果: D2m 与 D4m 组之间差异无统计学差异 ($P>0.05$), D2m 与 D6m, D4m 与 D6m 组间差别均有统计学意义 ($P<0.01$)。

2.4 DM 各组与对照组三种蛋白表达的免疫组化结果

2.4.1 免疫组化结果 BIP 表达 BIP 在对照组视网膜中少量表达, 主要位于神经节细胞层, DM 组中主要分布于视网膜内核层和神经节细胞层 (图 2)。

2.4.2 免疫组化结果 HIF-1α 表达 HIF-1α 在对照组基本不表达, 而 DM 组神经纤维层、视网膜神经节细胞层、内核层和外核层均有表达 (图 3)。

2.4.3 免疫组化结果 VEGF 表达 VEGF 在对照组大鼠各层中少量表达, 而 DM 组的大鼠内核层、外核层及视网膜血管、神经节细胞层中 VEGF 明显阳性高表达 (图 4)。

3 讨论

DR 是糖尿病常见的微血管并发症之一, 其发病机制尚未完全清楚, 眼底新生血管对 DR 进展起到关键作用。新生血管不仅参与正常胚胎发育, 也参与不同病变的发生

或发展,如肿瘤、心血管疾病和糖尿病等^[6]。组织缺血、缺氧、氧化应激等都可以诱导机体产生应激反应,内质网应激途径和 HIF-1 途径属于应激反应信号途径,这两种细胞保护途径在分子细胞水平被大量的研究。有研究提示它们能够在肿瘤组织中同时被激活,共同促进 VEGF 的表达,从而促进新生血管的形成,当 HIF-1 α 途径和 ERS 途径共同激活时,VEGF 的表达水平高于两者单独激活,即两者有协同作用^[5]。糖尿病在低氧和高糖情况下导致视网膜组织供血不足,通过增加 VEGF 的表达,促进新生血管形成来改善供血供氧不足,但同时新生血管的形成加速了 DR 病程发展。VEGF 不仅能够促进血管内皮细胞的生长,而且增加血管内皮细胞的通透性,导致大量血浆蛋白溢出,进一步为新血管的生成提供了良好的基质^[7]。本实验中 D2m 组中 VEGF 未明显增多,D4m 和 D6m 组大鼠视网膜上观察到了明显的 VEGF 高表达,并且随时间延长表达逐渐增多,D2m 组中 VEGF 未明显增多,提示 VEGF 可能是在某些始动因素的刺激下间接表达增多,其表达高峰在时间上出现一定的延后性。

ERS 作为近年来的研究热点,它与糖尿病视网膜病变的关系受到关注。内质网是细胞内主要的蛋白质合成场所,完成蛋白质的正确折叠和合成,内质网的稳定性决定了机体的内环境的稳态,当各种应激因素导致内质网稳态被打破时,过多的未折叠或错误折叠蛋白在内质网蓄积超过内质网的处理能力时,将引起 ERS。为了减轻应激反应,内质网将启动一个信号级联反应即未折叠蛋白反应(unfold protein response,UPR)。细胞通过改变其自身转录和翻译过程,如减少新生蛋白合成,降低进入内质网的蛋白量,增加内质网相关降解途径,增强内质网中的蛋白折叠功能,来发挥保护作用^[8]。发生 ERS 时,UPR 的 3 条主要通路均被激活,包括 IRE1 α -XBP-1、PERK-ATF4 和 ATF6 α 通路,并启动一系列的下流反应^[9]。有研究发现高糖可通过增加视网膜色素上皮细胞内同型半胱氨酸的水平来诱导 ERS,最终导致 VEGF 表达上调^[10]。Murata 等使用 ERS 的诱导剂衣霉素对大鼠行单眼眼周注射,结果实验眼视网膜组织中 VEGF 的表达远远高于对侧眼^[11]。反之,在 Akita 小鼠中,使用 ERS 抑制剂 PBA 眼周注射,VEGF 的表达则减少,以上结果提示在糖尿病视网膜病变中,ERS 能够促进 VEGF 的表达。UPR 中有很多伴侣蛋白的参与,BIP 又称葡萄糖调节蛋白,是存在于内质网上最多的应激蛋白,被认为是内质网应激反应的标志分子,BIP 的表达量在一定程度上反映了细胞的应激程度^[12,13]。本实验发现内质网应激相关蛋白 BIP 在不同病程 DM 大鼠视网膜中的表达均高于对照组,且随着病程的延长,BIP 的表达增加,说明内质网应激在 DR 的疾病进展过程中起重要作用。BIP 和 VEGF 的变化趋势一致,推测 BIP 可能为诱导 VEGF 表达的始动因素之一。

高糖和低氧环境除了能够诱导 ERS,也能够激活 HIF-1 α 介导的低氧诱导信号途径。体外研究表明,在肿瘤细胞中 HIF 途径和 ERS 途径能够共同促进 VEGF 的表达^[5],那么在 DR 中,是否也存在这种联系? HIF-1 是机体适应缺氧环境的主要转录因子,由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个蛋白质

亚基组成,HIF-1 β 亚基为结构性亚基,HIF-1 α 则是主要的功能亚基,后者受缺氧信号调控,只有在缺氧状态下才能稳定表达^[14]。在缺氧条件下,作为转录因子的 HIF-1 与靶基因结合,产生一系列反应来适应缺氧环境,包括增加红细胞生成、促进血管生长、增加血流供应,而 VEGF 属于靶基因之一,其转录起始点上游具有缺氧反应元件结构,缺氧条件下能够被 HIF-1 激活从而表达增多^[15]。本研究发现,DR 造模成功后 2,4,6mo,均见视网膜 HIF-1 α 的表达增多,且与对照组有显著性差异,提示此时视网膜已发生缺氧性改变。但 HIF-1 α 在不同病程大鼠之间的表达并无明显差异,即 HIF-1 α 并未随着病程的增加而增加,这可能与 HIF-1 的半衰期短有关,在常氧下其半衰期小于 1 min,只能在缺氧条件下产生,如果缺氧状态持续存在,则它的表达就持续增高,但不能像 VEGF 那样表现出随时间不断增高的趋势^[16]。也有研究表明高糖环境下培养的血管内皮细胞的 HIF-1 α 表达低于正常环境中的表达,推测高糖可能会造成 HIF-1 表达的减少^[17]。江丹等^[18]研究证明缺血缺氧条件下,HIF-1 α 能够上调人视网膜色素上皮细胞中 VEGF 的表达;Bhisitkul 等^[19]在缺氧条件下培养视网膜色素上皮细胞,用 RNA 抑制 HIF-1 α 基因表达时,VEGF 的表达也明显被抑制,表明缺氧条件下 HIF-1 α 是视网膜新生血管的始动因素。本研究通过建立糖尿病动物模型,进一步观察这一动态过程。通过检测发现 HIF-1 α 的表达与 VEGF 的表达同时升高,调节 VEGF 的表达可能是 HIF-1 α 参与 DR 发病的重要作用机制之一。

除了 HIF-1 α 和 ERS 都与 VEGF 有关联外,有研究表明 HIF-1 α 和 ERS 信号通路也具有关联,HIF-1 α 能够促进 ERS 中相关分子的表达,说明 HIF-1 α 通路和 ERS 通路之间并非独立。脐静脉内皮细胞在低氧环境中培养后,除了 HIF-1 α 明显增加外,内质网相关的分子伴侣包括 GRP78 和 Caspase 12 的表达也增加^[20]。用衣霉素诱导人类 HepG2 细胞使之发生 ERS,HIF-1 α mRNA 的表达也同时增加^[21]。分别激活肿瘤细胞中的 HIF-1 α 和 ERS 通路后测定 VEGF 的表达,另外同时激活两条通路后再测定 VEGF 的表达,比较发现后者 VEGF 的表达远远大于前者,说明两种信号途径在促进 VEGF 表达方面具有协同作用^[22]。DR 中是否存在 HIF-1 α 途径和 ERS 途径的协同作用是本课题组下一步研究的方向。如果在 DR 中 ERS 和 HIF-1 α 途径协同作用于 VEGF,那么对两种因子进行联合阻断治疗效果将明显优于单一阻断 VEGF,这将在临床上大大提高 DR 治疗的疗效。

参考文献

- 1 Aiello LP. Diabetic retinopathy and other ocular findings in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes care* 2014;37(1): 17-23
- 2 路春,朱鸿,施彩虹.早期糖尿病视网膜病变患者血清相关细胞因子的检测. *上海交通大学学报(医学版)* 2009;29(9):1053-1055
- 3 朱鸿,施彩虹.糖尿病视网膜病变患者外周血浆内皮素与血管内皮生长因子的变化及临床意义. *中华医学杂志* 2007;87(40): 2837-2839
- 4 任洪芹,朱鸿,高军,等.糖尿病视网膜病变大鼠早期血细胞因子的

变化. 国际眼科杂志 2011;11(1):40-42

5 Pereira ER, Frudd K, Awad W, *et al.* Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Hypoxia Response Pathways Interact to Potentiate Hypoxia-inducible Factor 1 (HIF-1) Transcriptional Activity on Targets Like Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J Biol Chem* 2014;289(6):3352-3364

6 Roybal CN, Yang S, Sun CW, *et al.* Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J Biol Chem* 2004;279(15):14844-14852

7 Simó R, Sundstrom JM, Antonetti DA. Ocular anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy; the role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes care* 2014;37(4):893-899

8 Engin F, Hotamisligil GS. Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones; an emerging therapeutic approach for metabolic diseases. *Diabetes Obes Metab* 2010;12(s2):108-115

9 Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010;140(6):900-917

10 Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, *et al.* Homocysteine - induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* 1999;94(3):959-967

11 Li J, Wang JJ, Yu Q, *et al.* Endoplasmic reticulum stress is implicated in retinal inflammation and diabetic retinopathy. *FEBS Lett* 2009;583(9):1521-1527

12 Gething MJ. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 1999;10(5):465-472

13 Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a

monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 2005;35(4):373-381

14 Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia; role of the HIF system. *Nat Med* 2003;9(6):677-684

15 Rankin EB, Wu C, Khatri R, *et al.* The HIF signaling pathway in osteoblasts directly modulates erythropoiesis through the production of EPO. *Cell* 2012;149(1):63-74

16 Lee JW, Bae SH, Jeong JW, *et al.* Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004;36(1):1-12

17 Catrina SB, Okamoto K, Pereira T, *et al.* Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1 α protein stability and function. *Diabetes* 2004;53(12):3226-3232

18 江丹,吴强,宋蓓雯,等. 缺氧和高糖对视网膜色素上皮细胞增生及 VEGF, TGF- β 1 表达的影响. 眼科新进展 2009;29(4):267-271

19 Bhisitkul RB, Ruan DT, Sherwood J, *et al.* HIF-1-mediated induction of VEGF in RPE cells; upregulation by constitutively active HIF-1 and inhibition by RNA interference. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(5):452

20 Ostergaard L, Simonsen U, Eskildsen - Helmond Y, *et al.* Proteomics reveals lowering oxygen alters cytoskeletal and endoplasmic stress proteins in human endothelial cells. *Proteomics* 2009;9(19):4457-4467

21 Werno C, Zhou J, Brüne B. A23187, ionomycin and thapsigargin upregulate mRNA of HIF-1 α via endoplasmic reticulum stress rather than a rise in intracellular calcium. *J Cell Physiol* 200;215(3):708-714

22 Pereira ER. Contribution of the Unfolded Protein Response to VEGF Expression. *The University of Tennessee* 2012;112-124