

小分子 RNA 干扰 HIF-1 α 对糖尿病视网膜病变小鼠视网膜的保护作用及机制

张瑞萍¹, 刘红凌²

引用:张瑞萍,刘红凌.小分子 RNA 干扰 HIF-1 α 对糖尿病视网膜病变小鼠视网膜的保护作用及机制.国际眼科杂志 2019; 19 (12):2017-2021

Luoyang First People's Hospital, Luoyang 471002, Henan Province, China. 3121274260@qq.com

Received:2019-01-29 Accepted:2019-11-12

作者单位:(471002)中国河南省洛阳市第一人民医院¹检验科;²肝炎科

作者简介:张瑞萍,女,本科,副主任技师,研究方向:临床生物化学和分子生物学。

通讯作者:张瑞萍. 3121274260@qq.com

收稿日期:2019-01-29 修回日期:2019-11-12

摘要

目的:探讨小分子 RNA 干扰 HIF-1 α 对糖尿病视网膜病变小鼠视网膜的保护作用及机制。

方法:C57BL/6 雄性小鼠 40 只随机分为正常组、糖尿病组、siRNA-HIF-1 α 组、siRNA-NC 组,制备糖尿病模型。观察各组小鼠视网膜组织病理学变化,免疫组织化学检测微血管密度(MVD),实时荧光定量 PCR 检测各组小鼠视网膜组织中 HIF-1 α 、VEGF、NF- κ B、IL-1、IL-6、TNF- α mRNA 表达,Western blot 法检测各组小鼠视网膜组织中 HIF-1 α 、ET-1、vWF 蛋白表达。

结果:糖尿病组、siRNA-NC 组和 siRNA-HIF-1 α 组大鼠的体质量低于正常组,而血糖水平高于正常组(均 $P < 0.05$);糖尿病组和 siRNA-NC 组小鼠视网膜组织中 MVD 高于正常组,而 siRNA-HIF-1 α 组低于糖尿病组和 siRNA-NC 组(均 $P < 0.05$);与糖尿病组和 siRNA-NC 组相比,siRNA-HIF-1 α 组小鼠视网膜组织中 HIF-1 α 、VEGF、NF- κ B、IL-1、IL-6、TNF- α mRNA 相对表达量降低(均 $P < 0.05$);与糖尿病组和 siRNA-NC 组相比,siRNA-HIF-1 α 组小鼠视网膜组织中 HIF-1 α 、ET-1、vWF 蛋白相对表达量降低(均 $P < 0.05$)。

结论:特异性沉默 HIF-1 α 基因可保护 DR 小鼠视网膜,其机制可能通过减少血管新生和血管内皮损伤有关。

关键词:糖尿病视网膜病变;HIF-1 α ;小分子 RNA 干扰;微血管密度;炎症因子

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.12.04

Protective effect of small interfering RNA targeting HIF-1 α in retina of diabetic retinopathy mice and its mechanism

Rui-Ping Zhang¹, Hong-Ling Liu²

¹Department of Laboratory; ²Department of Hepatitis, Luoyang First People's Hospital, Luoyang 471002, Henan Province, China

Correspondence to: Rui-Ping Zhang. Department of Laboratory,

Abstract

• **AIM:** To investigate the protective effect of small interfering RNA targeting HIF-1 α in retina of diabetic retinopathy mice and its mechanism.

• **METHODS:** Totally 40 C57BL/6 male mice were randomly divided into the normal group, diabetes group, siRNA-HIF-1 α group and siRNA-NC group. The diabetic models were constructed. The histopathological change of the retina of the mice was observed in each group. The microvessel density (MVD) was detected by immunohistochemistry. The expressions of HIF-1 α , VEGF, NF- κ B, IL-1, IL-6 and TNF- α mRNA in the retina in each group were detected by real-time quantitative PCR. The expressions of HIF-1 α , ET-1 and vWF proteins in the retina in each group were detected by Western blot.

• **RESULTS:** The body weights of diabetes group, siRNA-NC group and siRNA-HIF-1 α group were lower than the normal group, while the blood glucose levels were higher than the normal group (All $P < 0.05$). The MVD in the diabetic group and siRNA-NC group were significantly higher than those in the normal group, while the siRNA-HIF-1 α group were significantly lower than the diabetes group and siRNA-NC group (All $P < 0.05$). Compared with the diabetes group and siRNA-NC group, the relative expression levels of HIF-1 α , VEGF, NF- κ B, IL-1, IL-6 and TNF- α mRNA in the retina in the siRNA-HIF-1 α group were decreased (All $P < 0.05$). Compared with the diabetes group and siRNA-NC group, the relative expression levels of HIF-1 α , ET-1 and vWF proteins in the retina in the siRNA-HIF-1 α group were decreased (All $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Specific silencing of HIF-1 α gene could protect the retina of DR. The mechanism may be related to the reduction of angiogenesis and vascular endothelial injury.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; HIF-1 α ; small RNA interference; microvessel density; inflammatory factor

Citation: Zhang RP, Liu HL. Protective effect of small interfering RNA targeting HIF-1 α in retina of diabetic retinopathy mice and its mechanism. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019; 19 (12): 2017-2021

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)作为糖尿病患者常见的微血管并发症,是导致后天失明的主要因

素,严重威胁患者生存质量^[1]。研究表明^[2],视网膜血管新生是DR发病的重要机制。而高糖血症引起的慢性缺氧是导致DR的始发原因^[3]。缺氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)是缺氧环境下调控机体机能的重要调节因子,包括 α 和 β 两个亚基,其中,HIF-1 α 是主要的功能亚基,在缺氧环境中可稳定表达,与靶基因结合而产生一系列缺氧适应^[4],动物实验表明^[5],HIF-1 α 在糖尿病大鼠视网膜组织中呈高表达,且与糖尿病病程有关。但HIF-1 α 是否参与了DR发病,以及在DR发病过程的作用鲜有报道。本研究拟采用小分子RNA干扰技术特异性沉默HIF-1 α 基因,观察其对DR小鼠视网膜血管新生及神经节细胞凋亡的影响,并探讨可能的机制,以期对DR临床防治提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

链脲佐菌素购自上海然泰生物科技有限公司,焦碳酸二乙酯(DEPC)购自上海前尘生物科技有限公司,葡萄糖含量检测试剂盒购自上海索莱宝生物科技有限公司,Trizol总RNA提取试剂盒、Lipofectamine™ RNAiMAX转染试剂盒均购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒和PCR试剂盒均购自日本TaKaRa公司,HIF-1 α 、血管内皮生长因子(VEGF)、核因子- κ B(NF- κ B)、白细胞介素-1(IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及内参引物均由上海生工生物公司设计合成,siRNA-HIF-1 α 、siRNA-NC均由上海吉玛制药技术有限公司设计合成,苏木素-伊红(HE)染色试剂盒购自上海研晶生物公司,山羊抗小鼠CD34单克隆抗体购自美国R&D公司,免疫组化试剂盒购自北京中杉生物公司,兔抗鼠HIF-1 α 多克隆抗体购自美国Biorworld公司,兔抗小鼠内皮素-1(ET-1)多克隆抗体购自上海沪峰化工公司,兔抗小鼠血管性血友病因子(vWF)单克隆抗体购自美国Sigma公司,实时荧光定量PCR仪购自美国ABI公司,凝胶电泳分析系统购自美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组处理

SPF级C57BL/6雄性小鼠40只购自河南省实验动物中心[SCXK(豫)2010-1-0003],12周龄,体质量28 \pm 2g,利用随机数字表分为正常组、糖尿病组、siRNA-HIF-1 α 组、siRNA-NC组,每组10只。糖尿病模型构建:小鼠禁食10h,将链脲佐菌素按小鼠体质量60mg/kg剂量进行腹腔注射,连续注射5d,第7d时取尾静脉血检测血糖,以血糖>11.1mmol/L作为成功建模标准,对于建模不成功的,补充小鼠,保证每组10只。正常组给予等量的柠檬酸缓冲液,连续注射5d。

1.2.2 靶向HIF-1 α 的siRNA设计和合成

利用GenBank基因库得到HIF-1 α 基因序列(AF207206),选取最有效的HIF-1 α -siRNA基因序列:5'-GAAACTCTCCAAGCAATTTT-3',以及非靶向性siRNA作为对照序列:5'-TTCTCCGAACGTGTCACGTTTC-3'。将siRNA溶解于经DEPC处理的生理盐水中,调整浓度为15 μ mol/L。

1.2.3 各组小鼠转染处理

建模4wk后,将4组小鼠腹腔注射麻醉后,用碘伏于眼周消毒,在显微镜观察下,于各只大鼠双眼,利用Hamilton微量注射器在角膜缘外1mm处进针,沿视神经方向直至瞳孔区,siRNA-HIF-1 α 组:将含HIF-1 α -siRNA基因序列和转染试剂的混合液注入玻璃

表1 基因序列

基因	序列
HIF-1 α	上游:5'-GGCGCGAACGACAAGAAAAAG-3' 下游:5'-CCTTATCAAGATGCGAACTCACA-3'
VEGF	上游:5'-AGGCGAGGCAGCTTGAGTTA-3' 下游:5'-CTGTGACGGTGACGATGGT-3'
NF- κ B	上游:5'-GCTCCTAAGGTGCTGACA-3' 下游:5'-ACCTCCGAAAGCGAGATA-3'
IL-1	上游:5'-ACCTGGGCTGTCTGTATGAGAG-3' 下游:5'-TGTTGATGTGCTGCTGCGAGAT-3'
IL-6	上游:5'-GTTCTCTGGAAATCGTGGA-3' 下游:5'-GGAAATGGGGTAGGAAGGA-3'
TNF- α	上游:5'-TGGAAGTGGCAGAAGAGGCACT-3' 下游:5'-AGAGGCTGAGACATAGGCACCG-3'
β -actin	上游:5'-CCTAGGCACCAGGTGTGAT-3' 下游:5'-TTGCTGACAATGCCGTGTTTC-3'

体腔;siRNA-NC组:将含siRNA对照序列和转染试剂的混合液注入玻璃体腔;正常组:将等量磷酸盐缓冲液(PBS)注入玻璃体腔;糖尿病组:将等量PBS注入玻璃体腔。每14d重复注射1次,连续注射4次。

1.2.4 视网膜组织病理学观察

各组小鼠于建模12wk后,处死摘取左眼球(每组10只左眼),将角膜缘环形剪开,甲醛固定24h,常规梯度乙醇脱水,石蜡包埋,连续切片,厚度约4 μ m,行HE染色,用光学显微镜观察各组视网膜组织病理学变化。

1.2.5 免疫组织化学检测

切片常规脱蜡后,用柠檬酸进行高温下组织抗原修复,加入H₂O₂,以灭活内源性过氧化物酶,将正常山羊血清加入,37 $^{\circ}$ C孵育60min,加入山羊抗小鼠CD34单克隆抗体,37 $^{\circ}$ C孵育60min,PBS冲洗3次,DAB显色,蒸馏水冲洗、复染、脱水、透明、封片,用PBS替代一抗作为阴性对照。微血管密度(MVD)计数参考文献^[6]:于低倍镜下寻找新生血管密集区,换用高倍镜分别选取5个视野计数微血管数,取均值作为MVD,标准为任何被染成棕褐色的单个内皮细胞或细胞簇记为1个MVD,对于组织结构不相连的分支结构亦作为1个MVD,但排除肌层较厚或管腔直径超过8个红细胞的血管。每张切片均由两位病理科副主任医师单独阅片,MVD计数差值超过10%则重新阅片。

1.2.6 利用实时荧光定量PCR检测各组小鼠视网膜组织中HIF-1 α 、VEGF、NF- κ B、IL-1、IL-6、TNF- α mRNA表达

取各组小鼠右眼视网膜组织(每组10只右眼),剪碎后,加入细胞裂解液,用Trizol总RNA提取试剂盒对总RNA进行提取,利用紫外分光光度计对总RNA纯度进行检查,以A₂₆₀/A₂₈₀ \geq 1.80作为合格样品。将总RNA逆转录为cDNA,以cDNA为模板进行PCR。各引物序列见表1。PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C 1min,92 $^{\circ}$ C 30s,92 $^{\circ}$ C 30s,58 $^{\circ}$ C 30s,73 $^{\circ}$ C 30s,连续进行38次循环,每个样品均设置3个平行反应复孔。用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法对各组小鼠视网膜组织中HIF-1 α 、VEGF、NF- κ B、IL-1、IL-6、TNF- α mRNA相对表达量进行分析。

1.2.7 Western blot法检测各组小鼠视网膜组织中HIF-1 α 、ET-1、vWF蛋白表达

取各组小鼠右眼视网膜组织(每组10只右眼),剪碎后,加入细胞裂解液,用总蛋

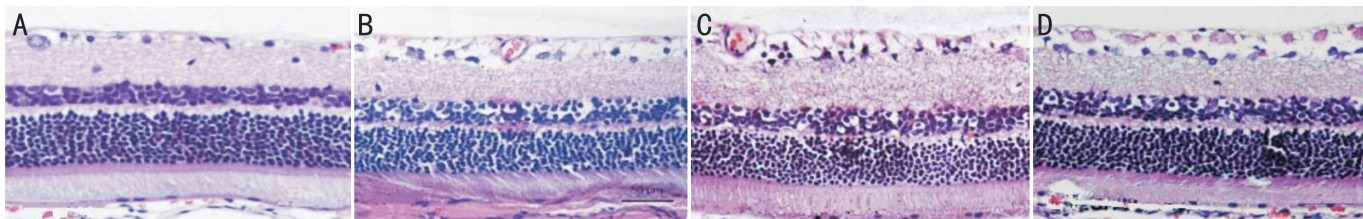


图1 各组小鼠视网膜组织病理学表现(HE×200) A:正常组;B:糖尿病组;C:siRNA-NC组;D:siRNA-HIF-1 α 组。

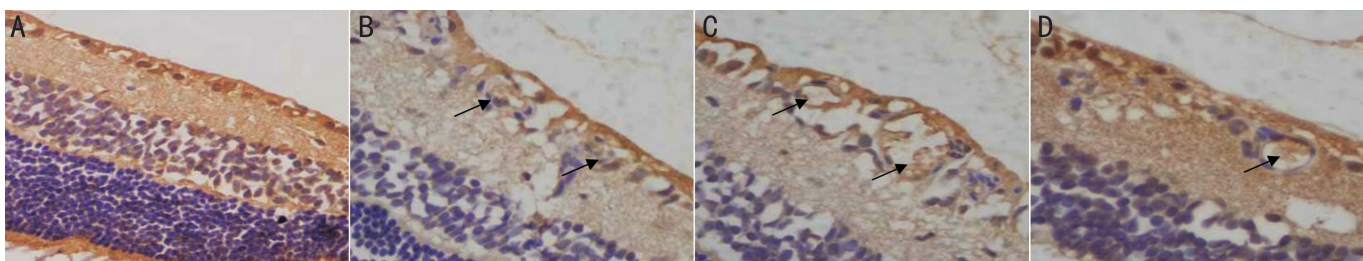


图2 各组小鼠视网膜组织免疫组织化学检测(免疫组化染色×400) A:正常组;B:糖尿病组;C:siRNA-NC组;D:siRNA-HIF-1 α 组。黑色箭头示CD34表达阳性。

白提取试剂盒获得总蛋白,用BCA蛋白浓度检测试剂盒对总蛋白浓度进行检测。取25 μ g总蛋白,行SDS-PAGE电泳,电转移至PVDF膜,10%脱脂奶粉封闭2h,分别将一兔抗鼠HIF-1 α 多克隆抗体、兔抗小鼠ET-1多克隆抗体、兔抗小鼠vWF单克隆抗体加入(稀释比1:1200、1:800、1:1000),4 $^{\circ}$ C过夜孵育,TBST漂洗3次,将二抗加入,室温下孵育2h,TBST漂洗3次,用ECL化学发光试剂盒避光反应25min。拍照,用Image-Pro Plus图像分析软件进行分析,计算视网膜组织中HIF-1 α 、ET-1、vWF蛋白相对表达量。

统计学分析:采用统计分析软件SPSS 21.0对数据进行整理分析,计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况 糖尿病组、siRNA-HIF-1 α 组和siRNA-NC组小鼠经腹腔注射链脲佐菌素,7d时检测血糖,血糖值均 >11.1 mmol/L,成功率100%。建模12wk后,处死前再次检测体质量和血糖,糖尿病组、siRNA-NC组和siRNA-HIF-1 α 组大鼠的体质量均低于正常组,而血糖水平均高于正常组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表2。

2.2 各组小鼠视网膜组织病理学表现 HE染色结果显示,正常组小鼠视网膜中各层细胞结构清楚、排列规整、形态正常(图1A),糖尿病组和siRNA-NC组小鼠视网膜中各层细胞排列杂乱,细胞核出现肿胀、视网膜组织水肿(图1B、C);siRNA-HIF-1 α 组小鼠视网膜中各层细胞排列趋于规则,细胞核肿胀减轻(图1D)。

2.3 各组小鼠视网膜组织免疫组织化学检测 免疫组织化学检测结果显示,正常组小鼠视网膜血管内皮细胞CD34呈弱阳性表达(图2A);糖尿病组和siRNA-NC组小鼠视网膜血管内皮细胞CD34表达阳性细胞数增多(图2B、C);siRNA-HIF-1 α 组小鼠视网膜血管内皮细胞CD34表达细胞数较糖尿病组和siRNA-NC组减少(图2D)。

正常组、糖尿病组、siRNA-NC组和siRNA-HIF-1 α 组小鼠视网膜组织中MVD分别为 6.8 ± 1.3 、 19.7 ± 2.2 、 20.4 ± 2.6 和 12.8 ± 1.9 个,差异有统计学意义($F=56.952$,

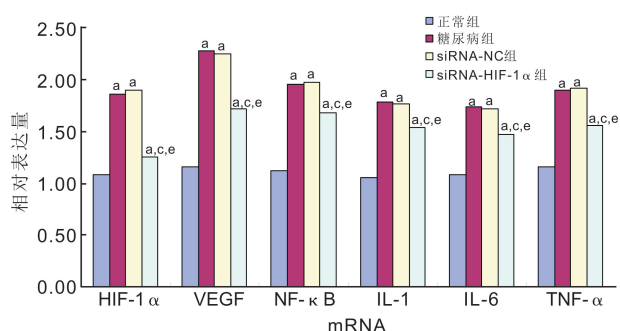


图3 各组小鼠视网膜组织中HIF-1 α 、VEGF、NF- κ B、IL-1、IL-6、TNF- α 表达 ^a $P<0.05$ vs 正常组; ^b $P<0.05$ vs 糖尿病组; ^c $P<0.05$ vs siRNA-NC组。

表2 建模12wk后各组小鼠体质量和血糖比较

组别	n	体质量(g)	血糖(mmol/L)
正常组	10	30.91 \pm 2.54	4.55 \pm 0.32
糖尿病组	10	23.24 \pm 3.02 ^a	24.67 \pm 2.34 ^a
siRNA-NC组	10	23.51 \pm 3.42 ^a	24.31 \pm 2.17 ^a
siRNA-HIF-1 α 组	10	23.12 \pm 2.83 ^a	25.14 \pm 2.63 ^a
F		17.146	197.464
P		<0.01	<0.01

注:^a $P<0.05$ vs 正常组。

$P<0.01$),两两比较,糖尿病组和siRNA-NC组均高于正常组,而siRNA-HIF-1 α 组均低于糖尿病组和siRNA-NC组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 各组小鼠视网膜组织中HIF-1 α 、VEGF、NF- κ B、IL-1、IL-6、TNF- α 表达比较 与正常组相比,糖尿病组、siRNA-NC组和siRNA-HIF-1 α 组小鼠视网膜组织中HIF-1 α 、VEGF、NF- κ B、IL-1、IL-6、TNF- α mRNA相对表达量均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),与糖尿病组和siRNA-NC组相比,siRNA-HIF-1 α 组小鼠视网膜组织中HIF-1 α 、VEGF、NF- κ B、IL-1、IL-6、TNF- α mRNA相对表达量均降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表3、图3。

2.5 各组小鼠视网膜组织中HIF-1 α 、ET-1、vWF蛋白表达比较 与正常组相比,糖尿病组、siRNA-NC组和

表3 各组小鼠视网膜组织中 HIF-1 α 、VEGF、NF- κ B、IL-1、IL-6、TNF- α 表达比较

组别	n	HIF-1 α	VEGF	NF- κ B	IL-1	IL-6	TNF- α
正常组	10	1.08 \pm 0.09	1.16 \pm 0.13	1.12 \pm 0.08	1.05 \pm 0.10	1.08 \pm 0.07	1.16 \pm 0.09
糖尿病组	10	1.86 \pm 0.11 ^a	2.27 \pm 0.16 ^a	1.95 \pm 0.13 ^a	1.78 \pm 0.11 ^a	1.73 \pm 0.14 ^a	1.89 \pm 0.13 ^a
siRNA-NC组	10	1.89 \pm 0.15 ^a	2.24 \pm 0.14 ^a	1.97 \pm 0.14 ^a	1.76 \pm 0.08 ^a	1.71 \pm 0.11 ^a	1.91 \pm 0.15 ^a
siRNA-HIF-1 α 组	10	1.25 \pm 0.12 ^{a,c,e}	1.71 \pm 0.11 ^{a,c,e}	1.68 \pm 0.12 ^{a,c,e}	1.53 \pm 0.13 ^{a,c,e}	1.47 \pm 0.10 ^{a,c,e}	1.55 \pm 0.12 ^{a,c,e}
F		127.624	114.329	49.037	112.173	93.470	79.985
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:^aP<0.05 vs 正常组;^cP<0.05 vs 糖尿病组;^eP<0.05 vs siRNA-NC组。

表4 各组小鼠视网膜组织中 HIF-1 α 、ET-1、vWF 蛋白表达比较

组别	n	HIF-1 α 蛋白	ET-1 蛋白	vWF 蛋白
正常组	10	0.21 \pm 0.06	0.17 \pm 0.05	0.13 \pm 0.03
糖尿病组	10	0.68 \pm 0.09 ^a	0.61 \pm 0.08 ^a	0.54 \pm 0.06 ^a
siRNA-NC组	10	0.71 \pm 0.12 ^a	0.59 \pm 0.07 ^a	0.55 \pm 0.08 ^a
siRNA-HIF-1 α 组	10	0.49 \pm 0.08 ^{a,c,e}	0.38 \pm 0.06 ^{a,c,e}	0.34 \pm 0.05 ^{a,c,e}
F		50.246	71.690	133.307
P		<0.01	<0.01	<0.01

注:^aP<0.05 vs 正常组;^cP<0.05 vs 糖尿病组;^eP<0.05 vs siRNA-NC组。

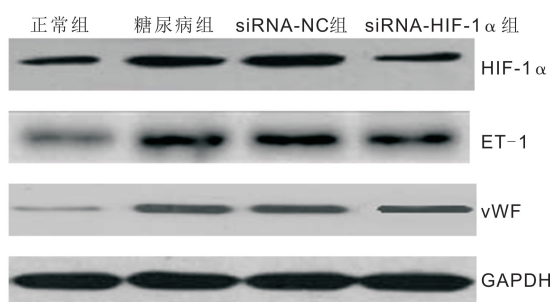


图4 各组小鼠视网膜组织中 HIF-1 α 、ET-1、vWF 蛋白表达。

siRNA-HIF-1 α 组小鼠视网膜组织中 HIF-1 α 、ET-1、vWF 蛋白相对表达量均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),与糖尿病组和 siRNA-NC 组相比,siRNA-HIF-1 α 组小鼠视网膜组织中 HIF-1 α 、ET-1、vWF 蛋白相对表达量均降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表4,图4。

3 讨论

DR 作为糖尿病患者常见的眼部并发症,发病机制较为复杂,且发病率高、致盲率高,严重影响患者生活质量。研究表明^[6],长期高糖状态导致血管内皮功能异常及微循环障碍在 DR 发病中发挥关键性作用。本研究参考文献^[7]的方法,利用腹腔注射链脲佐菌素制备小鼠糖尿病模型,7d 时血糖值均>11.1mmol/L,出现了“多饮多食、体重减轻”的症状,提示成功构建了小鼠糖尿病模型,建模 12wk 后,HE 染色观察视网膜组织形态发现,糖尿病组小鼠视网膜中各层细胞排列杂乱,细胞核出现肿胀、视网膜组织水肿,提示高糖导致小鼠视网膜发生病理性改变。免疫组化染色结果显示,糖尿病组小鼠视网膜血管内皮细胞 CD34 阳性表达数增加,MVD 计数增加,而 CD34 是新生小血管特异性分化抗原^[8],提示血管新生参与了糖尿病小鼠视网膜病变。

研究表明^[9],糖尿病所致机体高糖环境会导致视网膜供血不足而处于相对缺氧状态。HIF-1 α 作为机体重要的氧含量感受器及调控蛋白,在调节血管新生、细胞外基

质代谢、炎症反应等过程中发挥重要作用^[10],本研究利用 siRNA 技术特异性将 HIF-1 α 沉默,并注入玻璃体腔,PCR 和 Western blot 结果均显示,siRNA-HIF-1 α 组视网膜组织中 HIF-1 α mRNA 和蛋白表达降低,提示视网膜组织中 HIF-1 α 基因被沉默。本研究显示,siRNA-HIF-1 α 组小鼠视网膜中各层细胞排列趋于规则,细胞核肿胀减轻,视网膜血管内皮细胞 CD34 表达细胞数和 MVD 计数均较糖尿病组和 siRNA-NC 组减少,说明特异性沉默 HIF-1 α 基因可减轻糖尿病小鼠视网膜病变以及微血管新生。VEGF 作为促进血管新生的关键性因子,在调控血管新生中发挥主导作用^[11],同时,VEGF 是 HIF-1 α 信号通路下游重要的靶基因^[12],本研究显示,糖尿病组小鼠视网膜组织中 HIF-1 α 、VEGF mRNA 相对表达量增加,而 siRNA-HIF-1 α 组均被抑制,说明特异性抑制 HIF-1 α 基因可能通过抑制 VEGF 而减少糖尿病小鼠视网膜血管新生。

有研究指出^[13],机体高糖状态可导致大量炎症因子释放而引发炎症反应。炎症反应可导致血管内皮功能损伤^[14]。ET-1 作为血管收缩因子,主要由血管内皮细胞分泌,与一氧化氮形成动态平衡而维持和保护内皮细胞功能^[15],有研究指出^[16],HIF-1 可直接激活 ET-1 表达。vWF 作为内皮细胞损伤因子,与内皮损伤程度呈正相关^[17],是血管内皮受损的标志物之一。本研究显示,糖尿病组小鼠 NF- κ B、IL-1、IL-6、TNF- α mRNA 相对表达量均升高,且 ET-1、vWF 蛋白相对表达量均升高,说明糖尿病小鼠机体发生炎症反应而导致视网膜组织中血管内皮功能损伤,本研究显示,siRNA-HIF-1 α 组小鼠视网膜组织中 VEGF、NF- κ B、IL-1、IL-6、TNF- α mRNA 相对表达量均降低,ET-1、vWF 蛋白相对表达量均降低,说明特异性沉默 HIF-1 α 基因可通过减轻炎症反应而减少视网膜血管内皮功能损伤。

综上所述,特异性沉默 HIF-1 α 基因可保护糖尿病视网膜病变小鼠视网膜,其机制可能通过减少 VEGF 表达抑制血管新生,以及减少炎症反应减轻血管内皮损伤有关,

有望成为 DR 基因治疗的新靶位。本研究后续将进一步对 HIF-1 α 作用靶点及具体的分子机制开展研究,以明确其在抗炎、减少血管内皮损伤中的相关机制。

参考文献

- 1 Kanjee R, Dookeran RI, Mathen MK, *et al.* Six-year prevalence and incidence of diabetic retinopathy and cost-effectiveness of teleophthalmology in Manitoba. *Can J Ophthalmol* 2016;51(6):467-470
- 2 Yu Z, Lu B, Sheng Y, *et al.* Andrographolide ameliorates diabetic retinopathy by inhibiting retinal angiogenesis and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2015;1850(4):824-831
- 3 唐枫燕, 李全民, 赵波. 缺氧诱导因子 1 α 与糖尿病周围神经病变的关系. *中华糖尿病杂志* 2014;6(4):266-268
- 4 Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 2015;5(5):378-389
- 5 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
- 6 Guo L, Jiang F, Tang YT, *et al.* The association of serum vascular endothelial growth factor and ferritin in diabetic microvascular disease. *Diabetes Technol Ther* 2014;16(4):224-234
- 7 石珂, 赵璐, 杨玉兰, 等. 靶向抑制 GLUT1 对糖尿病视网膜病变中视锥细胞的保护作用. *第三军医大学学报* 2014;36(15):1582-1586
- 8 韩林峰, 柯根杰, 王林, 等. 全视网膜激光凝对增生型糖尿病视网膜病变视网膜前膜中环氧合酶-2、血管内皮生长因子表达的影响. *中华眼底病杂志* 2016;32(2):140-143
- 9 Hao K, Kong FP, Gao YQ, *et al.* Inactivation of corticotropin-

- releasing hormone-induced insulinotropic role by high-altitude hypoxia. *Diabetes* 2015;64(3):785-795
- 10 Ioannou M, Paraskeva E, Baxevanidou K, *et al.* HIF-1 α in colorectal carcinoma: review of the literature. *J BUON* 2015;20(3):680-689
 - 11 Pożarowska D, Pożarowski P. The era of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs in ophthalmology, VEGF and anti-VEGF therapy. *Cent Eur J Immunol* 2016;41(3):311-316
 - 12 Wei J, Jiang H, Gao H, *et al.* Blocking mammalian target of rapamycin (mTOR) attenuates HIF-1 α pathways engaged-vascular endothelial growth factor (VEGF) in diabetic retinopathy. *Cell Physiol Biochem* 2016;40(6):1570-1577
 - 13 Briançon-Marjollet A, Monneret D, Henri M, *et al.* Intermittent hypoxia in obese Zucker rats: cardiometabolic and inflammatory effects. *Exp Physiol* 2016;101(11):1432-1442
 - 14 Wang CN, Yang GH, Wang ZQ, *et al.* Role of perivascular adipose tissue in nicotine-induced endothelial cell inflammatory responses. *Mol Med Rep* 2016;14(6):5713-5718
 - 15 Lu YP, Tsuprykov O, Vignon-Zellweger N, *et al.* Global overexpression of ET-1 decreases blood pressure-A systematic review and meta-analysis of ET-1 transgenic mice. *Kidney Blood Press Res* 2016;41(6):770-780
 - 16 杨硕, 张岭, 龚海英, 等. 藏麻正丁醇部位下调缺氧内皮细胞 HIF-1 α 及 ET-1 表达. *天津中医药* 2015;32(3):168-172
 - 17 Denorme F, De Meyer SF. The VWF-GPIIb axis in ischaemic stroke: lessons from animal models. *Thromb Haemost* 2016;116(4):597-604