基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0508-04

缺氧诱导因子 1α 反义寡核苷酸抑制早产鼠视网膜病血管内皮生长因子表达及新生血管形成的实验研究

张 琴,韦 红

(重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨缺氧诱导因子 1α(Hypoxia inducible factor ,HIF-1α)反义寡核苷酸(Antisense oligonucleotides,ASODN)对新生鼠仔视网膜病变(Retinopathy of prematurity ,ROP)视网膜血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)表达及新生血管形成的影响。方法:7 d Wistar 新生鼠仔分为两组,实验组(n=40)制作 ROP 动物模型,另设对照组(n=40)。两组分别从日龄 12 、14 、16 d 开始眼内注射 HIF-1α ASODN 或生理盐水(NS)。得到 5 组标本:分别为正常眼(A)、正常眼 +ASODN(A1),ROP 眼(B),ROP 眼 +ASODN(B1),ROP 眼 +NS(B2)。分别于 12、14、17 d 视网膜铺片观察血管发育及增生情况,17 d 切片计数突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数,免疫组化法观察视网膜 VEGF 和 HIF-1α 蛋白水平的表达。结果:视网膜铺片显示 B 组于 12 d 出现视网膜血管收缩变窄甚至闭塞,视网膜中央部大片无灌注区,14 d 视网膜新生血管开始形成,17 d 大量新生血管形成。B1 组新生血管较 B、B2 组明显减少。突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数 B2 组与 A,A1 组差异有显著性,而 B1 组与 B,B2 组有显著性差异。免疫组化结果显示 A,A1 组毛细血管内皮细胞胞浆中有少许 VEGF 表达,无 HIF-1α 表达。B、B2 组较 A,A1 组 VEGF 在胞浆和胞核中表达明显增加,HIF-1α 在胞核中表达。B1 组 VEGF、HIF-1α 在胞核中表达均较 B,B2 组明显减少。结论:吸入高氧回到常氧可使视网膜缺氧导致 HIF-1α 表达增加,从而上调 VEGF 表达促进新生血管形成。用 HIF-1α ASODN 可通过抑制 HIF-1α 的表达,下调 VEGF 表达,抑制新生血管形成,可能成为 ROP 基因治疗的目的基因之一。

【关键词】缺氧诱导因子;反义寡核苷酸;血管内皮生长因子;新生血管;早产儿视网膜病变

【中国图书分类法分类号】R772.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-07-06

Effect of -1 α hypoxia inducible factor antisense oligonucleotides on the expression of vascular endothelial growth factor and retinal neovascularization in premature rat modle with retinopathy

ZHANG Qin, et al

(*Department of Neonatology, Children's Hospital, Chongqing medical Univercity*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) antisense oligonucleotides(ASODN) on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and retinal neovascularization in premature rat with retinopathy . *Methods*: A total of 80 postnatal day 7 wistar rats were randomly assigned into two group.The experimental group (n=40) were established as ROP mode group. The control group (n=40) was exposed to room air in the same experimental condition. HIF-1 α ASODN was injected into rats' left cavum vitreum at 12、14、16 d in these two groups. Some of the experimental group were injected with saline at 14、16 d. So there were five groups of specimens including: normal eye(A),normal eye with HIF-1 α ASODN(A1),ROP eye (B),ROP eye with HIF-1 α ASODN (B1),ROP eye+ saline(B2). The retinal vascular development and proliferation in five groups were evaluated by the retina stretch preparation of 15 newborn rats at 12、14、17 d respectively.Eyeball cross-section was staimed with hematoxylin and eosin(HE).The nuclei of proliferative retinal vessels of five groups were counted. The expression of VEGF and HIF-1 α in retina by immunohisto-chemical stain were observed among all groups. *Results*: In ROP group (B) the central vessels became tortuous and constricted and the central avascular area increased at 12 d. At 14 d, neovascularization was seen, peaking at 17 d.ROP eye with HIF-1 α ASODN (B1) presented the same as group A, but Neovascularization decreased obviously as compcured with group B. Retinal vessel shape of ROP eye+ saline (B2) is same as group B. VEGF was mainly expressed in capillary endothelium endochylema and nucleus of ganglionic layer of retina and inner nuclear layer. The expressions of VEGF were weaker in group A, A1 than in group B,B2,with significant differences (P<0.05). The expression of HIF-1 α was mainly seen in capillary endothelium nucleus of ganglionic layer of retina and inner nuclear layer .

作者介绍:张 琴(1975-),女,副主任医师,硕士,研究方向:新生儿疾病。

通讯作者:韦 红,女,博士,副教授,E-mail:waehong@sina.com。

基金项目:重庆市自然科学基金(编号:CSTC,2007BB5326)。

No HIF-1 α were observed in group A and A1. The expressions of HIF-1 α were weaker in group B1 than in group B and B2, with significant differences ($P<0.05$). *Conclusion*: Breathing in homo-concentration oxygen then stopping oxygen supply suddenly can increase expression of HIF-1 α and VEGF in rat's retina. The positive correlation is presented between them. Injecting HIF-1 α ASODN into rat's left cavum vitreum can inhibit expression of HIF-1 α and VEGF in retina, thereby inhibit retinal neovascularization. HIF-1 α might be one of the targets for the gene therapy for ROP.

【Key words】Hypoxia inducible factor; Antisense oligonucleotides; Vascular endothelial growth factor; Neovascularization; Retinopathy of prematurity

视网膜新生血管形成是早产儿视网膜病变(Retinopathy of prematurity, ROP)典型的病理改变[1]。大量的实验和临床数据证实血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)在正常视网膜血管发育和 ROP 的发病机制中发挥重要作用[2-5],近年来的研究发现,VEGF 在缺氧组织中的转录活化主要受缺氧诱导因子 1α (Hypoxia inducible factor -1α, HIF-1α)调节[6]。因此,我们设计 HIF-1a 反义寡核苷酸(Antisense oligo nucleotides, ASODN)注入 ROP 模型鼠玻璃体腔中,观察其对视网膜 VEGF 的表达及新生血管形成的影响。为基因治疗 ROP 提供动物实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

以 HIF-1 α 基因第 2 个外显子的 mRNA 序列为模版,在起始密码子区设计 ASODN,序列为:5'-CCGCCGGCGCC-CTCCATGGT-3',委托上海生物工程有限公司合成,硫代修饰。VEGF、HIF-1 α 的一抗和二抗分别由北京中杉生物公司及武汉博士德生物公司提供。

1.2 方法

1.2.1 ROP 动物模型制备及分组[7] 7 d 清洁级 Wistar 新生鼠仔 80 只(重庆医科大学实验动物中心提供)称重随机分为两组,实验组(n=40)于出生后 7 d 置于 75% ± 1%氧箱内饲养 5 d 然后回到正常空气饲养 5 d,对照组(n=40)于正常环境饲养。对照组和实验组分别从 12、14、16 d 开始予左眼玻璃体腔注射 HIF-1 α ASODN 2 μl(10 μ mol/l),氟派酸眼药水滴眼 3 次 /d,直至炎症消失。右眼作为自身对照。一部分实验组左眼注入生理盐水。即得到 5 组标本:分别为正常眼(A),正常眼 + HIF-1 α ASODN(A1),ROP 眼(B),ROP+ HIF-1 α A-SODN(B1),ROP 眼 + 生理盐水(B2)。

1.2.2 观察视网膜血管形态学改变 实验组和对照组各取新生鼠 15 只,鼠龄分别为 12、14、17 d 各 5 只(每个时间点有一只左眼注射生理盐水),进行视网膜铺片以观察 5 组视网膜血管发育及增生情况(ADP 酶染色法)。

1.2.3 测定血管内皮细胞核数 采用视网膜切片法。每组各取 10 只新生鼠,均于 17 d 颈椎脱臼处死。摘除眼球,组织切片 HE 染色计数 5 组标本突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数。具体方法见参考文献[7]。

1.2.4 免疫组化测定视网膜组织中 VEGF 和 HIF-1 α 含量 从 5 组标本中各随机抽取 20 张未经染色的切片分别进行 VEGF 和 HIF-1 α 的免疫组化检测(SABC 法)。用 Image-Pro Plus Version 5.1 软件对免疫组织化学染色结果进行分析。每张切片任意选取 3 个高倍视野(×400),测量细胞的平均光密度值(OD)以表示阳性产物的强度。

1.2.5 统计学分析 所有数据以统计分析软件 SPSS10.0 进行分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料的多组均数采用单变量多因素数据方差分析,均数间两两比较采用 SNK-q 检验。

2 结 果

2.1 视网膜铺片结果

ROP 眼(B 组):12 d 视网膜血管收缩变窄甚至闭塞,视网膜中央部有大片无灌注区(图 1),14 d 新生血管开始形成,17 d 视网膜大量新生血管形成(图 2)。而 A、A1 组在 17 d 时血管形态全部正常(图 3),ROP+ HIF-1 α ASODN(B1)组 17 d 视网膜大血管形态与正常眼 A 组同日龄相似,新生血管较 B 组明显减少。ROP 眼 + 生理盐水(B2)17 d 的铺片结果和 B 组近似。

2.2 组织切片 HE 染色的观察

视网膜新生血管芽情况:正常眼(A 组)极少见视网膜新生血管芽(图 4);正常眼 + HIF-1 α ASODN(A1 组)与 A 组相似;ROP 眼(B 组)可见较多视网膜新生血管芽(图 5);ROP+ HIF-1 α ASODN(B1 组)视网膜新生血管芽数量较 B 组明显减少(图 6);ROP 眼 + 生理盐水(B2 组)可见较多视网膜新生血管芽,与 B 组无明显差异。

计数突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数结果:A 和 A1 组突破视网膜内界膜的血管内皮细胞核数分别为 2.75 ± 0.72 和 2.70 ± 0.73,无显著性差异;B 组和 B2 组明显增多,分别为 32.80 ± 0.77 和 32.75 ± 0.71,二者虽显著性差异;但 B 和 A 组相比有显著性差异($P<0.05$),与 B1 组(28.90 ± 0.91)相比,后者表达减少,二者有显著性差异($P<0.05$)。

2.3 VEGF 免疫组化结果

光镜下见:正常眼(A 组):在视网膜节细胞层和内核层可见少许 VEGF 阳性细胞,细胞质着色呈淡黄色(图 7);正常眼 + ASODN(A1 组)与 A 组相似;ROP 眼(B 组)可见在视网膜节细胞层和内核层 VEGF 阳性细胞数量明显增多,表达增强,细胞质着色呈棕黄色(图 8);ROP+ HIF-1 α ASODN(B1)视网膜节细胞层和内核层 VEGF 阳性细胞数量较 B 组减少(图 9);ROP 眼 + 生理盐水(B2 组)VEGF 阳性细胞数量和表

达强度与 B 组无明显差异。

A 和 A1 组细胞的平均光密度值(OD)分别为 0.28 ± 1.40 和 0.28 ± 1.43。B 组该值明显升高,为 0.58 ± 1.42,与 A 组之间有显著性差异。B2 组(0.57 ± 2.14)与 B 组无显著性差异,B1 组为 0.32 ± 1.26,较 B 组少,且二者之间存在显著性差异(P<0.05)。

2.4 HIF-1α 免疫组化结果

光学显微镜(LM)所见:A 组:无 HIF-1 α 阳性细胞的表达 (图 10); A1 组与 A 组相似;B 组可见在视网膜节细胞层和内核层 HIF-1 α 阳性细胞表达,细胞核着色呈棕黄色(图 11); B1 组视网膜节细胞层和内核层 HIF-1 α 阳性细胞数量较 B 组减少, 表达减弱, 细胞核着色呈淡黄色 (图 12); ROP 眼 + 生理盐水(B2 组)HIF-1 α 阳性细胞数量和表达强度与 B 组无明显差异。

ROP 组(B、B1、B2)与 A、A1 组在 HIF-1 α 阳性细胞数(M)上有显著差异。B 组与 B2 组分别为 55.73 ± 1.89 和 54.90 ± 2.10,二者之间无显著性差异(P<0.05),而与 B1 组即 ASODN 干预组(25.13 ± 0.93)比较,后者明显减少,有显著性差异(P<0.05)。

3 讨 论

视网膜新生血管形成是 ROP 典型的病理改变。VEGF 对于正常血管发育和异常新生血管形成均起重要作用。本实验中,与正常组比较,ROP 眼(B 组)在 12 d 视网膜血管收缩变窄甚至闭塞,视网膜中央部有大片无灌注区, 14 d 新生血管开始形成, 17 d 视网膜大血管明显扩张、迂曲,大量新生血管形成。 病理切片 HE 染色亦可见 B 组突破内界膜的内皮细胞核明显增加,可见新生血管断面,内界膜下的细胞增殖,排列紊乱。免疫组化结果显示 ROP 组视网膜节细胞层和内核层 VEGF 的表达明显增强,明显高于正常眼组,视网膜新生血管芽细胞核数与视网膜中 VEGF 含量呈正相关。本实验结果证实 ROP 与视网膜组织缺氧,VEGF 的含量增高、视网膜新生血管的形成密切相关。与国内外视网膜缺氧下 VEGF 刺激新生血管形成的报告一致[2~5]。

1992 年 Semenza 发现了组织或细胞低氧后,生成低氧诱导因子(Hypoxia inducible factor,HIF),其中 HIF-1 α 亚类可调控包括 VEGF 在内的许多基因的表达[6],在视网膜新生血



视网膜血管收缩变窄(× 400)

图 1 B 组 12 d 视网膜铺片



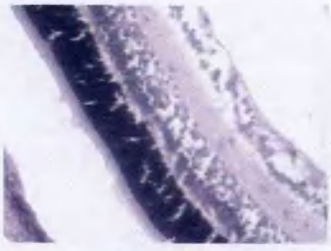
视网膜大量新生血管形成(× 400)

图 2 B 组 17 d 视网膜铺片



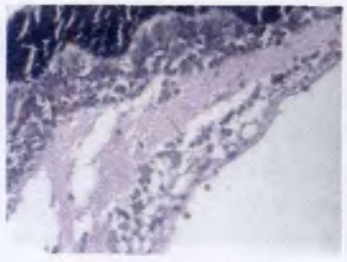
血管形态全部正常(× 400)

图 3 A/A1 组 17 d 视网膜铺片显示



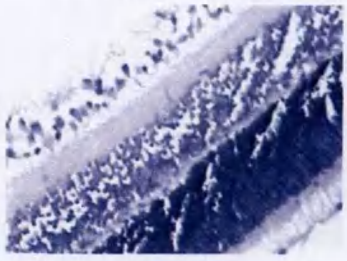
极少见视网膜新生血管芽(× 400)

图 4 A 组视网膜 HE 染色



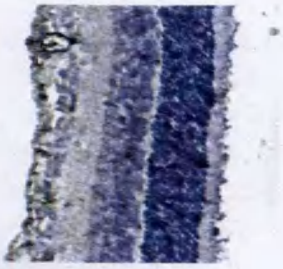
可见较多视网膜新生血管芽(× 400)

图 5 B 组视网膜 HE 染色



视网膜新生血管芽数量较 B 组明显减少(× 400)

图 6 B1 组视网膜 HE 染色



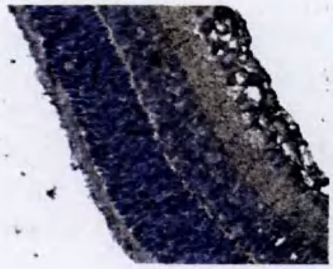
视网膜节细胞层和内核层可见少许 VEGF 阳性细胞(× 400)

图 7 A 组 VEGF 免疫组化 疫组化染色



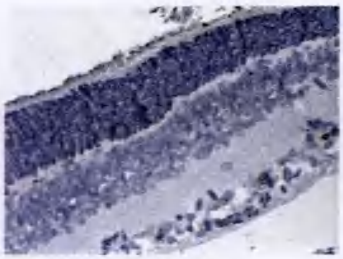
视网膜节细胞层和内核层 VEGF 阳性细胞数量明显增多(× 400)

图 8 B 组 VEGF 免疫组化



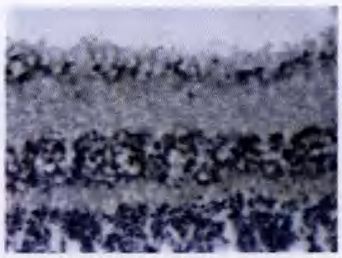
视网膜节细胞层和内核层 VEGF 阳性细胞数量较 B 组减少(× 400)

图 9 B2 组 VEGF 免疫组化染色



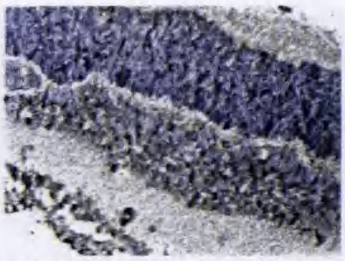
无 HIF1a 阳性细胞的表达(×400)

图 10 A 组 HIF-1α 免疫组化



视网膜节细胞层和内核层 HIF-1α 阳性细胞表达细胞核着色呈棕黄色(×400)

图 11 B 组 HIF-1α 组化



视网膜节细胞层和内核层 HIF1α 阳性细胞数量较 B 组减少 细胞核着色呈淡黄色(×400)

图 20 B1 组 HIF-1α 免疫组化

管形成过程中起着重要作用。低氧触发的 HIF-1α 通过转录活化编码 VEGF 基因而刺激血管新生，也能上调 VEGF 受体的表达，从而促进血管新生[8-13]。本实验正常眼（A 组）无 HIF-1α 阳性细胞的表达，而在 ROP 眼（B 组）可见在视网膜缺氧后，视网膜节细胞层和内核层 HIF-1α 阳性细胞表达，并与对应组的 VEGF 表达呈正相关，二者的表达与视网膜新生血管的形成，新生血管芽增生趋势一致，提示 ROP 时，视网膜缺氧可能通过 HIF-1α 途径影响 VEGF 的表达从而调控视网膜新生血管形成。

为了进一步探讨 HIF-1α 在 ROP 发病过程中对 VEGF 及其新生血管形成的作用，本实验选择 HIF-1α 为靶点，采用玻璃体腔局部注射 HIF-1α 反义寡核苷酸（ASODN）来阻断 HIF-1α 的表达。反义寡核苷酸是一类人工合成的短链核苷酸序列，对特定的 DNA 或 RNA 序列有互补作用，它们能相对容易地进入靶细胞，与靶基因的特定 mRNA 序列结合，使该基因的转录和翻译被选择性地抑制，从而达到抑制靶基因表达的目的。本实验中，HIF-1α ASODN 干预组和无干预组及生理盐水对照组相比较，其 HIF-1α 蛋白 VEGF 合成明显受抑制，胞核显棕色的细胞量及程度明显减少，视网膜新生血管受到明显抑制。提示 HIF-1α ASODN 可能与 HIF-1α mRNA 片段互补，阻断 HIF-1α mRNA 的翻译，表达，从而通过对转录和转录后水平的调节，下调 VEGF 的转录活化，减少其表达，从而抑制血管新生。

目前 ROP 的治疗手段主要是以手术治疗为主。常用的冷凝，激光光凝，巩膜环扎术，玻璃体切割术等虽能有效的控制 ROP 病变的发展，保留患者残存的视力，但这些治疗的并发症较多，甚至会改变眼部的正常结构，带来患儿终身的眼部问题如视野缺损、屈光异常等。若能明确新生血管形成及调控因素必将为 ROP 的防治提供新的途径。本实验结果进一步证实了 ROP 发病与视网膜组织相对缺氧有关，而缺氧时可能通过 HIF 上调 VEGF 表达从而引起大量的新生血管形成 ROP 的病理改变。通过玻璃腔注射 ASODN 可以减少 VEGF 表达以及新生血管形成，针对 HIF-1α 调控途径进行干预，可阻断 ROP 的发生发展，将是未来 ROP 防治的可行性途径。目前 HIF-1α 反义寡核苷酸的应用尚处于实验研究阶段，有系列问题尚未解决：如本研究采用的直接注射法，其在人体内的稳定性和安全性有待进一步证实，可否应用其他高效基因表达系统以提高其在人体的转染率等均是我们进一步研究的方向。

参 考 文 献

[1] Smith L E.Pathogenesis of retinopathy of prematurity[J].SeminNeonatol,2003,8(6):469-473.

[2] Aiello L P,Avery R L,Arrigg P G,et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders[J]. N England J Med, 1994,6(331): 1480-1487.

[3] Pierce E A,Avery R L,Fo ley E D,et al.Vascular endothelial growth factor vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1995,11(92):905-909.

[4] Pierce E A,Foley E D,Smith L E. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity[J]. Arch Ophthalmol, 1996,114(10):1219-1228.

[5] 赵世红，何守志.血管内皮生长因子及其受体与眼内新生血管性疾病[J].眼科研究，2003,21(1):103-106.

[6] Semenza G L.HIF-1α :Using two hands to flip the angiogenic swtich [J].Cancer Metastasis Rev,2000,19(1-2):59-65.

[7] 张 琴，韦 红，张晓萍. 早产儿视网膜病变动物模型的简易制备[J].重庆医科大学学报，2008,33(5):588-590.

[8] Risau W.Mechanisms of angiogenesis[J].Nature,1997,10(386): 671-674.

[9] Jean M.How cells endure low oxygen[J].Science,2004,10(303): 1454-1456.

[10] 倪永兵，王 斌，肖继皋. 低氧诱导因子 1 和血管内皮生长因子与血管新生[J].国外医学·生理、病理科学与临床分册，2002,22(3):266-269.

[11] Robbins S G,Rajaratnam V S,Penn J S.Evidence for upregulation and redistribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors Flt-1 and Flk-1 in the oxygen-injured rat retina[J].Growth Factors, 1998,16(1):1-9.

[12] Gerber H P,Condorelli F,Park J,et al. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1,but not Flk-1/KDR,is up-regulated by hypoxia[J].J Biol Chem, 1997,272(38):23659-23667.

[13] International committee for the classification of retinopathy of prematurity.An international classification of retinopathy of prematurity[J].Pediatrics,1984,74(1):127-133.

（责任编辑：关蕴良）