维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0807-04

FK228 抑制鼠视网膜新生血管的机制研究

吕 轲[1],李 立[2],彭艳丽[2]

(1. 武汉爱尔眼科医院,武汉 430063;2. 重庆医科大学附属第二医院眼屈光矫治中心,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨组蛋白去乙酰化酶抑制剂(Histone deacetylase inhibitor,HDACI)FK228 抑制视网膜新生血管形成的机制。方法:将鼠龄为 7d 的 C57BL/6J 幼鼠置于 75%浓度的氧环境中连续生活 5d,建立高氧诱导的血管增生性视网膜病变幼鼠模型。随机分为正常对照组、给氧对照组及治疗组(幼鼠玻璃体腔内注射 FK228 250ng,对侧眼注射相同体积的二甲基亚砜溶液作为对照)。并采用免疫组织化学法检测缺氧诱导因子 α 亚基(Hypoxia-inducible factor-1α,HIF-1α)和血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF),观察 FK228 抑制视网膜新生血管的机制。结果:(1)空白组和治疗组的 HIF-1α 免疫细胞阳性率没有明显差异($P>0.05$)。对照组与空白组和治疗组这两组的 HIF-1α 免疫细胞阳性率均有明显差异($P<0.05$)。(2)空白组和治疗组的 VEGF 免疫细胞阳性率没有明显差异($P>0.05$)。对照组与空白组和治疗组这两组的 VEGF 免疫细胞阳性率均有明显差异($P<0.05$)。结论:FK228 抑制视网膜新生血管形成的机制可能与其抑制 HIF-1α 活性从而下调 VEGF 的表达有关。

【关键词】组蛋白去乙酰化酶抑制剂;视网膜新生血管;HIF-1α;VEGF

【中国图书分类法分类法】R774 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-06

The mechanism research of inhibitory effects of FK228 on retinal neovascularization

LV Ke, et al

(*Department of Ophthalmology, Aier Ophthalmology Hospital of Wuhan*)

【Abstract】*Objective*: To explore the mechanism of the inhibitory effects of FK228 on retinal nevoascularization. *Methods*: One-week-old C57BL/6J mice were put into the environment with 75% oxygen for 5 days to establish models of vascular proliferation retinopathy. These mice were divided into normal control, high oxygen control and treatment groups (One eye of each mouse received an intravitreal injection of 250ng of FK228, and the same volume of DMSO(dimethylsulfoxide) was injected into the other eye of the mice both in these two groups as a control). Hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) and vascular endothelial growth factor(VEGF)expression were examined by immunohistochemistry. The inhibitory effects of FK228 on retinal nevoascularization were evaluated. *Results*: (1)There was no significant difference in HIF-1α positive rate between normal group and treatment group($P>0.05$); HIF-1α positive rate of control groups was higher than that in normal group and treatment group with significant difference among them($P<0.05$). (2)There was no significant difference in VEGF positive rate between normal group and treatment group($P>0.05$); VEGF positive rate in control groups was higher than that in normal group and treatment group with significant difference among them($P<0.05$). *Conclusions*: The mechanism of inhibitory effects of FK228 on retinal neovascularization is associated with the fact that FK228 inhibits activities of HIF-1α and deduce number of VEGF.

【Key words】 Histone deacetylase inhibitor; Retinal neovascularization; Hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α); Vascular endothelial growth factor(VEGF)

视网膜新生血管性疾病是致盲的主要原因之一,既往多认为缺血缺氧的视网膜可产生某些因子刺激新生血管生成,并已发现了主要的刺激因子是 VEGF。近年来在缺氧信号转导机制的分子生物学研究中,缺氧状态下缺氧诱导因子 -1(Hypoxia-inducible factor-1,HIF-1)可激活 VEGF 表达,最终导致大量新生血管生成。FK228,一种特异性的HDACI,

作者介绍:吕 轲(1979-),男,硕士,研究方向:眼底病。

通讯作者:李 立,男,教授,E-mail:liliyanke@sina.com。

基金项目:重庆市科技项目[2004]54 号。

维普资讯 http://www.cqvip.com

已被发现具备抑制 HIF-1α 活性的功能[1],并且作为抗肿瘤制剂已开始进入临床研究[2]。本研究通过建立高氧诱导的视网膜新生血管动物模型,玻璃体腔注射 FK228,探讨其抑制视网膜新生血管形成的机理。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物:鼠龄为 7d 的健康 C57BL/6J 幼鼠 90 只,雌雄不限,幼鼠未断奶,与哺乳母鼠共同饲养,系清洁级动物,由重庆医科大学实验动物中心提供。

实验用药及主要试剂:(1)FK228(日本藤泽药品);(2)兔抗 HIF-1α 抗体、兔抗鼠 VEGF 多克隆抗体、即用型 SABC 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒及 PBS 缓冲液购自武汉博士德公司。

1.2 方法

分组:将鼠龄为 7d 健康的 C57BL/6J 幼鼠 90 只,随机分成 3 组:空白组(n=30),对照组(n=30),治疗组(n=30)。

动物模型的制作:空白组新生鼠与哺乳母鼠一起在正常空气环境中饲养。对照组和治疗组新生鼠与哺乳母鼠一起置于密闭容器内,氧气的流量控制在 1.5L/min,使容器内氧气浓度为 75% ± 2%,期间用测氧仪间断监测容器内的氧浓度,每天 4 ~ 6 次,每 1d 打开 1 次氧箱更换垫料、加食、换水、替换母鼠。在此高氧环境中饲养 5d 后回到正常空气环境中饲养。

给药方法:取幼鼠均麻醉后进行玻璃体腔注射,于生后第 7d FK228(250ng/0.5μl,经预实验筛选的最佳药物浓度)对照组注射相同体积的二甲基亚砜溶液作为对照(注:FK228 只能溶于有机溶剂中,药物注射均在造模前进行)。

病理标本的制作:空白组及对照组分别取 10 只幼鼠,治疗组取 20 只幼鼠,均于生后第 17d 颈椎脱臼处死,摘除眼球并标记方向。具体方法为:固定,摘除的眼球放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 24h;脱水、透明,梯度酒精脱水、二甲苯透明;浸蜡,切片:连续切片,厚度 6μm,尽量避开视乳头周围,切片方向平行于角膜至视乳头的矢状位平面;贴片,将切片在温水中展平整后用载玻片贴上。

免疫组织化学染色:采用 SP 法,操作按说明进行。用 PBS 代替一抗做阴性对照,镜下观察视网膜细胞以胞浆出现棕黄色颗粒为阳性细胞。高倍镜下取 4 个不同的靠近内界膜

表 1 不同组视网膜细胞中 HIF-1α 蛋白阳性表达细胞的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	HIF-1α
空白组	20	22.71 ± 1.59
对照组	20	40.18 ± 9.70*
治疗组	30	24.81 ± 2.50**

*P < 0.01,与空白组、治疗组比;**P > 0.05 与空白组比

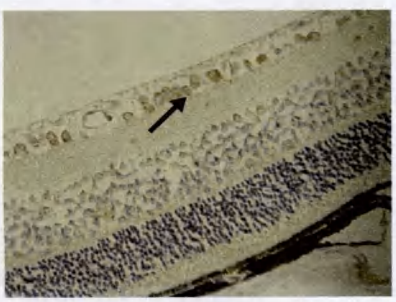


图 1 空白组 C57BL/6J 幼鼠 HIF-1α 蛋白的低表达(DAB×200)

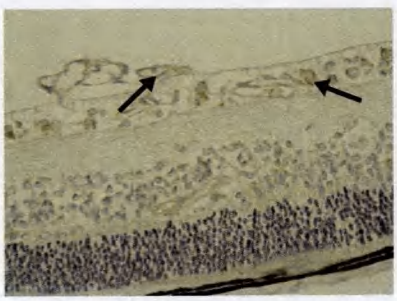


图 2 对照组 C57BL/6J 幼鼠 HIF-1α 蛋白的高表达(DAB×200)

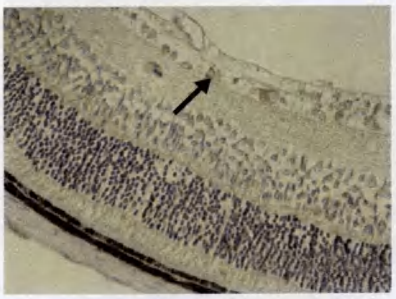


图 3 治疗组 C57BL/6J 幼鼠 HIF-1α 蛋白的低表达(DAB×200)

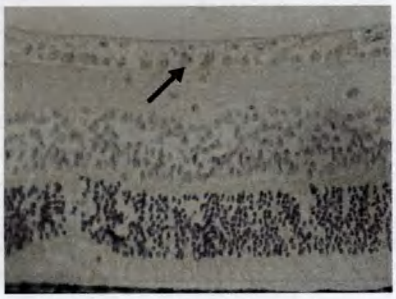


图 4 空白组 C57BL/6J 幼鼠 VEGF 蛋白的低表达(DAB×200)



图 5 对照组 C57BL/6J 幼鼠 VEGF 蛋白的高表达(DAB×200)



图 6 治疗组 C57BL/6J 幼鼠 VEGF 蛋白的低表达(DAB×200)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 不同组视网膜细胞中 VEGF 蛋白阳性表达细胞的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	VEGF
空白组	20	1.40 ± 0.06
对照组	20	2.63 ± 0.70*
治疗组	30	1.46 ± 0.08**

*$P < 0.01$,与空白组、治疗组比;**$P > 0.05$ 与空白组比

的视野,每区计数 100 个细胞,并统计其中阳性细胞数;由两个人分别计数,取平均值,若两人计数结果相差 10%以上则重新计数。结果按以下公式:阳性细胞数 / 细胞总数 × 100%。

统计学分析:各组之间 HIF-1α 和 VEGF 水平的比较采用单因素方差分析(ANOVAS)及两两比较的 SNK 法检验,数据用$\bar{x} \pm s$ 表示。对所得数据资料采用 SPSS10.0 统计软件分析,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 HIF-1α 免疫组化结果

HIF-1α 蛋白主要分布于视网膜神经节细胞层和突破内界膜的新生血管,阳性染色呈棕色或棕黄色(见图 1 ~ 3)。各组视网膜组织中 HIF-1α 表达情况见表 1,通过完全随机设计的方差分析得 F=54.012,$P < 0.01$。即按照 $\alpha = 0.05$ 检验标准。各组间有显著性差别。再对各组作进一步的两两比较,采用 SNK 法($\alpha = 0.05$),得知对照组和治疗组以及空白组均有显著性差别($P < 0.05$)。空白组和治疗组之间没有显著性差别(P=0.316 > 0.05)。

2.2 VEGF 免疫组化结果

VEGF 蛋白主要分布于视网膜内界膜附近、神经节细胞层和内核层细胞胞浆和(或)胞膜,阳性染色呈棕色或棕黄色(见图 4 ~ 6)。各组视网膜组织中 VEGF 表达情况见表 2,通过完全随机设计的方差分析得 F=57.859,$P < 0.01$。即按照 $\alpha = 0.05$ 检验标准。各组间有显著性差别。再对各组作进一步的两两比较,采用 SNK 法($\alpha = 0.05$),得知对照组和治疗组以及空白组均有显著性差别($P < 0.05$)。空白组和治疗组之间没有显著性差别(P=0.693 > 0.05)。

3 讨 论

视网膜新生血管性病变的发病机制及其治疗一直是眼底病领域关注的热点。现有的研究表明:新生血管形成是一极其复杂的生物学过程,在体外模型上的主要步骤包括血管基底膜上酶的降解;内皮细胞的趋化、迁移;内皮细胞的有丝分裂;内皮细胞和周细胞相互作用、血管腔形成等。VEGF 是近年来确定的一种具有自分泌和旁分泌机制的生长因子,是目前发现的对内皮细胞最具选择性的有丝分裂原[3]。在迄今已发现的多种新生血管刺激因子中,它是唯一与缺氧关系密切,并能特异的促进血管内皮细胞分裂的因子[4,5]。正常状态下,VEGF 分泌量较低,在缺氧或某些病理状态下,视网膜细胞的 VEGF mRNA 表达明显增高。

在前期实验研究中我们应用 FK228 玻璃体腔内注射观察高氧致血管增生性视网膜病变的小鼠动物模型的影响。结果表明 FK228 治疗组小鼠视网膜铺片未见明显的无灌注区及新生血管形成,血管形态基本正常,血管内皮细胞计数显示突破内界膜的内皮细胞明显减少。说明 FK228 能在体内有效抑制视网膜新生血管的发生。但是 FK228 抑制视网膜新生血管的分子机制目前不甚明了,我们应用免疫组织化学法检测 HIF-1α 和 VEGF,观察 FK228 抑制视网膜新生血管的机制。

近年来在缺氧信号转导机制的分子生物学研究中,HIF-1 逐渐引起了人们的高度关注。HIF-1 是细胞在缺氧条件下产生的核蛋白,它作为转录因子与靶基因结合,促进其转录,从而使机体产生一系列缺氧适应反应。结构分析表明,HIF-1 是一种异源二聚体蛋白质复合物转录因子,由 HIF-1α 和 HIF-1β 2 个蛋白质亚基组成,HIF-1β 亚基在细胞内稳定表达,在 HIF-1 中主要起结构性的作用;HIF-1α 则是主要的功能亚基,受缺氧信号的调控,其羧基端是感受缺氧信号的活性调控区段,含有一个氧依赖降解结构域(ODD)和 2 个转录激活结构域(TAD-N 和 TAD-C),HIF-1 的活性主要由 HIF-1α 的蛋白质水平和活性决定[6]。

能被 HIF-1 诱导的基因具备如下共同特点,即基因启动子或增强子内有 1 个小于 100bp 的 DNA 序列,称为缺氧反应元件(Hypoxia-response element, HRE),介导细胞对缺氧的反应。VEGF 也属于上述靶基因之列,其转录起始点上游具有 HRE 结构,可被 HIF-1 激活而表达增多[7]。缺氧时,细胞通过其膜上的氧感应因子(Oxygensensor)激活某一信号,此信号通过蛋白磷酸化作用后传递给 HIF-1α 基因上游的调控子第 V 因子。使 HIFmRNA 表达增加。HIF 激活 VEGF 和 VEGF-1(flt-1)基因。VEGF-2(flt/

维普资讯 http://www.cqvip.com

FDR)基因也相继激活。VEGF 和VEGFR 结合引起血管内皮细胞增殖和诱导新生血管形成以适应缺血缺氧反应。

在视网膜新生血管病变中,各种原发病因引起的视网膜缺血缺氧,也正是通过上述途径激活了VEGF 表达,最终导致大量新生血管生成。由此可见,如果能抑制 HIF-1(主要是 α 亚基)活性,便可阻断缺氧信号转导通路,缺氧刺激下的 VEGF 表达和随后的新生血管反应都可明显得到抑制。

FK228 是一种环行四肽类 HDAC 抑制剂,可以抑制 HDAC 的去乙酰化作用。主要作用的机制是抑制 HDAC,阻断由于 HDAC 募集功能紊乱而导致的基因表达受抑制,从而达到治疗的目的。并且作为抗肿瘤制剂已开始进入临床研究。

实验结果显示,空白组 HIF-1α 蛋白呈低表达(22.71 ± 1.59)和治疗组 HIF-1α 蛋白的表达水平(24.81 ± 2.50)均低于对照组(40.18 ± 9.07),差异有统计学意义($P < 0.05$)。同样空白组VEGF 蛋白呈低表达(1.40 ± 0.06)和治疗组 VEGF 蛋白的表达水平(1.46 ± 0.08)低于对照组(2.63 ± 0.7)两者相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。此结果表明在正常空气环境下的空白组鼠视网膜组织中HIF-1α 蛋白和 VEGF 蛋白呈低表达,在高氧环境下其表达明显增高,而给予 FK228 处理后表达下降。证明 FK228 对 HIF-1α 和 VEGF 表达具有抑制作用。另有实验证明,FK228 抑制 HIF-1α 的活性从而降低 VEGF 的转录和翻译水平。You MeiLi 等[1]实验表明,在用 FK228 治疗的实体性肿瘤中,其缺氧区的一些新生的大血管和微血管发生萎缩。

综上所述,在高氧环境下 7d 龄幼鼠视网膜组织中 HIF-1α 和 VEGF 的表达增高,通过一系列复杂的过程使视网膜新生血管增多。FK228 能够通过抑制 HIF-1α 和 VEGF 的活性及表达,明显抑制新生血管的形成。同时,在本实验中,我们在给药时间上与以往研究不一样,即在缺氧之前给予药物干预,从缺氧信号转导通路的起始开始达到最大限度的抑制 VEGF 的表达。虽然其详细机制还不甚明确,但这足以为我们提供一条控制视网膜新生血管的全新的、大有希望的途径。

参 考 文 献

[1] Mie LY,Kim SH,Kim HS,et al. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by FK228,a specific histone deacetylase inhibitor,via suppression of HIF-1α activity[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003;300(1):241-246.

[2] Kosugi H,Iot M,Yamamoto Y,et al. In vivo effect of a histone deacetylase inhibitor,FK228,on human acute promyelocytic leukemia in NOD/Shi-scid/scid mice[J]. Jpn J Cancer Res,2001;92(5):529-536.

[3] Cress WD,Seto E. Histone deacetylases,transcriptional control,and cancer[J]. Cell Physiol,2000;184(1):1-16.

[4] Shima DT,Gougos A,Miller JW,et al. Cloning and mRNA expression of vascular endothelial growth factor in ischemic retinas of maraca fascicularis[J]. Invest Ophthal Vis Sci,1996;37(7):1334-1340.

[5] Malecaze F,Clamens S,Simorre-Pinatel V,et al. Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy[J]. Arch Ophthal,1994;112(11):1476-1482.

[6] 叶 红,金咸容.低氧诱导因子-1 的结构、功能、调节及其与低氧信号转导的关系[J]. 生理科学进展,2001;1(32):62-64.

[7] Damert A,Ikeda E,Risau W. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-induciblefactor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells[J]. Biochem J,1997;327(2):419-423.

(责任编辑:冉明会)

(上接第 802 页)

1998;16(1):62-73.

[10] Monig SP,Baldus SE,Hennecken JK,et al. Expression of MMP-2 associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma[J]. Histopathology,2001;39(4):597-602.

[11] Ichikawa Y,Ishikawa T,Tanaka K,et al. Extracellular matrix degradation enzy- mes:important factors in liver metastasis of colorectal cancer and good targets for anticancer metastasis therapy[J]. Nippon Geka Gakkai Zasshi,2001;102(3):376.

[12] 顾学文,陈月香,肖 琴,等.MMP-2 和 TIMP-2 在胃癌组织中的表达及其意义[J]. 实用癌症杂志,2003;18(1):50-51.

[13] Ueno H,Nakamura H,Inoue M,et al. Expression and tissue localization of memb- rane-types 1,2,and 3 matrix metalloproteinase in human invasive breast carcinomas[J]. Cancer Res,1997;57(10):2055-2060.

[14] Sato H,Seiki M.Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMPs) in tumor metastasis[J]. J Biochem,1996;119(2):209-215.

(责任编辑:关蕴良)