

# 氧诱导鼠视网膜病变中低氧诱导因子-1 $\alpha$ 和血管内皮生长因子的表达

李雯霖, 张莉, 张越骊, 钟晖, 王莉, 吴进

基金项目: 中国广东省深圳市科技计划资助项目(No. 200802060)  
作者单位: (518026) 中国广东省深圳市儿童医院眼科  
作者简介: 李雯霖, 博士, 主任医师, 研究方向: 视网膜。  
通讯作者: 李雯霖. wenlinli6688@126.com  
收稿日期: 2010-03-17 修回日期: 2010-05-06

## Expression of HIF-1 $\alpha$ and VEGF in an animal model of oxygen-induced retinopathy of prematurity

Wen-Lin Li, Li Zhang, Yue-Li Zhang, Hui Zhong, Li Wang, Jin Wu

**Foundation item:** Shenzhen Science and Technology Plan Project, Guangdong Province, China(No. 200802060)

Department of Ophthalmology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518026, Guangdong Province, China

**Correspondence to:** Wen-Lin Li. Department of Ophthalmology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518026, Guangdong Province, China. wenlinli6688@126.com

Received: 2010-03-17 Accepted: 2010-05-06

### Abstract

• **AIM:** To explore the expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in an animal model of oxygen-induced retinopathy of prematurity (ROP).

• **METHODS:** An animal model of oxygen-induced ROP was established, Western-blot analysis was performed to detect the expression of HIF-1 $\alpha$  in retinae, and the picture was analyzed by computer image analysis meter, ELISA was performed to detect the expression of VEGF in retinae.

• **RESULTS:** Compared with normal control group, the expression of HIF-1 $\alpha$  gradually increased in retinae in the fifth day, the tenth day, and the fifteenth day in hypoxia condition in the oxygen - induced rats ( $P < 0.01$ ), in a dose-dependent manner. The expression of VEGF was respectively  $381.5 \pm 3.1$ ,  $431.8 \pm 1.3$  and  $443.9 \pm 1.2$  ng/L in retinae in the fifth day, the tenth day, and the fifteenth day in hypoxia condition in the oxygen-induced rats. Compared with normal control group, the expression of VEGF in all experimented groups was significantly increased ( $P < 0.01$ ).

• **CONCLUSION:** The expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF is up-regulated in the oxygen-induced ROP.

• **KEYWORDS:** retinopathy of prematurity; hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ; vascular endothelial growth factor

Li WL, Zhang L, Zhang YL, et al. Expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in an animal model of oxygen-induced retinopathy of prematurity. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010; 10(6): 1056-1057

### 摘要

**目的:** 探讨 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 在早产儿视网膜病变鼠模型中的表达及意义。

**方法:** 建立氧诱导的早产儿视网膜病变新生鼠模型。Western - blot 检测视网膜 HIF-1 $\alpha$  的表达, 并以计算机图像分析仪进行分析; ELISA 方法检测视网膜 VEGF 的表达。

**结果:** 与正常对照组比较, 视网膜病变组在鼠出氧箱后 5, 10, 15d 视网膜 HIF-1 $\alpha$  表达逐渐增加 ( $P < 0.01$ ), 呈时间依赖关系。视网膜 VEGF 的表达分别为  $381.5 \pm 3.1$ ,  $431.8 \pm 1.3$  和  $443.9 \pm 1.2$  ng/L, 与对照组比较, 均有显著增加 ( $P < 0.01$ )。

**结论:** 氧诱导视网膜病变中的 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 上调。

**关键词:** 氧诱导视网膜病变; 低氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 血管内皮生长因子

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.06.011

李雯霖, 张莉, 张越骊, 等. 氧诱导鼠视网膜病变中低氧诱导因子-1 $\alpha$ 和血管内皮生长因子的表达. 国际眼科杂志 2010; 10(6): 1056-1057

### 0 引言

目前, 对早产儿视网膜病变 (retinopathy of prematurity, ROP) 的防治已引起我国眼科界的高度重视。视网膜新生血管形成是 ROP 的特征性病理改变。但 ROP 的发病机制尚未完全阐明。研究表明, 低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在新生血管形成过程中均起着重要的调控作用<sup>[1-4]</sup>。氧诱导视网膜病变鼠模型是 ROP 和其他异常视网膜血管增生性疾病的主要模型之一。我们观察 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 在氧诱导鼠视网膜病变中的表达如下。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 紫外分光光度仪和微量高速制冷离心机 (Beckman, USA), 恒温水浴箱、兔抗鼠 HIF-1 $\alpha$  多克隆抗体、羊抗兔二抗、Western blot 试剂盒和 VEGF ELISA 试剂盒 (晶美生物公司), 新生 Sprague-Dawley (SD) 鼠 ( $n = 48$ ), 随机分为 4 组, 分别为出氧箱后 5, 10, 15d 3 组和对照组, 每组 12 只。对照组为生活在正常氧环境中的幼鼠。将 3 个实验组幼鼠于生后 7d 与同笼的 2 只母鼠一起进入有机玻璃制作的密闭氧箱饲氧, 先将玻璃容器内变为真空状态, 然后接入 1000mL/L 湿润医用纯氧气, 氧气流量控

制在 1.5L/min,使容器内氧分压为(75±2)%,期间用氧浓度测氧仪监测容器内的氧分压,控制室温在(23±2)℃,日光照明,每2d打开玻璃容器更换垫料、加食、换水、替换母鼠。在此高氧环境中饲养5d(即出生后12d),然后返回正常空气环境中饲养,使幼鼠处于相对低氧状态下。

## 1.2 方法

**1.2.1 鼠视网膜 HIF-1 $\alpha$  表达的检测** 于出氧箱后5,10,15d分别取模型组和对照组的4只小鼠处死,显微镜下分离视网膜。细胞裂解仪上裂解视网膜组织。将裂解液低温高速离心(4℃,12 000r/min)15min去除上清液,取2倍体积B缓冲液与沉淀物混合,4℃环境下作用30min,低温高速离心(4℃,15 000r/min)20min。弃核碎片,以小牛血清白蛋白为标准,紫外分光仪定量检测上清液的核蛋白含量。核蛋白液分装,-70℃保存。将提取的核蛋白液,用Bradford法测定样本蛋白质浓度,制胶,在积存胶加样孔内加入等量蛋白质样本和标志物(marker)电泳,而后转移到硝酸纤维素膜上。用封闭液(50g/L脱脂奶粉,10mmol/L Tris,100mmol/L氯化钠,1g/L Tween20,pH7.5)37℃封闭1h后再与1:500鼠抗人Bcl-2 mAb 4℃孵育过夜。充分洗涤后与二抗1:500辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG室温下孵育1h。DAB染色,拍照,再用凝胶图像分析系统分析,蛋白含量以面积×密度表示,以对照组测得值为100计算相对吸光度值。

**1.2.2 视网膜 VEGF 表达的检测** 于出氧箱后5,10,15d分别取模型组和对照组的4只小鼠处死,显微镜下分离视网膜。将4只小鼠视网膜置400 $\mu$ L全蛋白裂解液中,并加入蛋白酶抑制剂,细胞裂解仪上裂解视网膜组织。将裂解液低温高速离心(4℃,12 000r/min)15min去除沉淀物,以小牛血清白蛋白为标准,紫外分光仪定量检测上清液的蛋白含量。上清液分装,-20℃保存待用。上清液用双抗体夹心法(ELISA试剂盒)检测视网膜全蛋白液中VEGF的水平。操作按试剂盒说明书,每个标本行双复孔检测。

统计学分析:所有数据均用SPSS 15.0软件进行统计分析。数据以平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,进行t检验和方差分析(LSD法和q检验),显著性检验以 $P < 0.05$ 有意义。

## 2 结果

**2.1 视网膜 HIF-1 $\alpha$  的表达** 与对照组比较,所有试验组视网膜HIF-1 $\alpha$ 的蛋白表达量分别为120.5±0.6,147.2±0.9和159.5±1.1,相对吸光度值均有显著增加( $P < 0.01$ ),呈时间依赖关系。

**2.2 视网膜 VEGF 的表达** 视网膜病变组在鼠出箱后5,10,15d时视网膜VEGF的表达分别为381.5±3.1,431.8±1.3和443.9±1.2ng/L,与对照组比较,所有试验组均有显著增加( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

HIF-1是细胞在缺氧条件下产生的具有转录活性的核蛋白,它与靶基因结合,通过转录及转录后调控,激活编码葡萄糖转运、糖酵解的酶基因及VEGF等血管形成诱导因子基因。HIF-1作为基因转录的生理调节因子,在缺氧调节中起着关键作用,是缺氧适应和病理反应中的一个中介因子,是多种与红细胞生成、血管生长、血流供应、氧化和能量代谢相关基因转录和表达的一个重要调节因子<sup>[5,6]</sup>。HIF-1 $\alpha$ 是HIF-1的主要异二聚体亚单位,HIF-1 $\alpha$ 通过与一种特异的VEGF的DNA低氧性应答物质连接,促进VEGF的表达。VEGF是一种特异性刺激血管内皮

细胞增殖及新生血管形成的生长因子,是HIF-1介导的转录活化的一个靶点,其在低氧组织中的表达是通过HIF-1 $\alpha$ 诱导的<sup>[7,8]</sup>。修饰过的HIF-1 $\alpha$ 经过基因转染的方法注入缺血组织后,能诱导VEGF以及一些下游基因的表达,最终导致缺血组织的血管新生<sup>[9]</sup>。

我们对氧诱导视网膜病变鼠模型的研究结果显示,相对缺氧后小鼠视网膜病变组在鼠出箱后5,10,15d时视网膜HIF-1 $\alpha$ 的蛋白表达量逐渐增加,所有试验组其HIF-1 $\alpha$ 的相对A值均有显著增加( $P < 0.01$ ),呈时间依赖关系;同时,相对缺氧后小鼠视网膜病变组在鼠出箱后5,10,15d时视网膜VEGF的表达与同龄正常对照组比较,均有显著增加( $P < 0.01$ )。由此可见,相对缺氧后小鼠视网膜病变组HIF-1 $\alpha$ 水平与VEGF表达均高于正常对照组,随着相对缺氧时间的延长,小鼠视网膜HIF-1 $\alpha$ 水平与VEGF表达越高,提示视网膜病变病程越长,视网膜HIF-1 $\alpha$ 与VEGF的含量越高。这与Lukiw和Ozaki等研究结果相似,Lukiw等<sup>[10]</sup>建立小鼠ROP模型,研究发现缺氧后小鼠视网膜细胞HIF-1表达显著增强;Ozaki等<sup>[11]</sup>在氧建立的缺血性视网膜病变的小鼠模型研究中发现,视网膜内HIF-1 $\alpha$ 水平增加,缺氧6h后内核层VEGF mRNA表达构建增强,且持续增高许多天,且结果表明对于缺血性视网膜病变,HIF-1 $\alpha$ 水平的增加与VEGF表达的增强在时间和空间上密切相关。因此我们推测HIF-1 $\alpha$ 介导的VEGF的上调在ROP等缺血缺氧性视网膜病变的发生发展中可能起着重要作用,但其作用机制还有待进一步研究。

## 参考文献

- 1 Arjamaa O, Nikinmaa M. Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res* 2006;83(3):473-483
- 2 He T, Ai M, Zhao XH, et al. Inducible nitric oxide synthase mediates hypoxia-induced hypoxia-inducible factor-1 alpha activation and vascular endothelial growth factor expression in oxygen-induced retinopathy. *Pathobiology* 2007;74(6):336-343
- 3 Wirostko BM. Vascular endothelial growth factor. *Ophthalmology* 2007;114(10):1954-1955
- 4 Dieudonne SC, La Heij EC, Diederens RM. Balance of vascular endothelial growth factor and pigment epithelial growth factor prior to development of proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res* 2007;39(3):148
- 5 Talks KL, Turley H, Gatter KC, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 alpha and HIF-2 alpha in normal human tissues, cancers and tumor associated macrophages. *Am J Pathol* 2000;157:411-421
- 6 Chen C, Pore N. Regulation of glul mRNA by hypoxia inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 2001;276(12):9519-9525
- 7 Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Angiogenesis; how a tumor adapts to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266(3):718-722
- 8 Jin KL, Mao XO, Nagayama T, et al. Induction of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-alpha by global ischemia in rat brain. *Neuroscience* 2000;99(3):577-585
- 9 Vincent KA, Shyu KG, Luo Y, et al. Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1 alpha/VP16 hybrid transcription factor. *Circulation* 2000;102(18):2255-2261
- 10 Lukiw WJ, Gordon WC, Rogaev EI, et al. Presenilin-2 (PS2) expression up-regulation in a model of retinopathy of prematurity and patho-angiogenesis. *Neuroreport* 2001;12(1):53-57
- 11 Ozaki H, Yu AY, Della N, et al. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina; temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(1):182-189