

论著·实验研究

HIF-1 α 干扰 RNA 抑制早产儿视网膜病小鼠 模型视网膜新生血管形成的研究

许惠卓 刘双珍 熊思齐 夏晓波

(中南大学湘雅医院眼科,湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 探讨特异性抑制缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的表达对早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)小鼠模型视网膜新生血管的抑制作用。方法 新生 C57BL/6J 小鼠 48 只,随机分为实验组和对照组(每组 24 只),采用 Smith 方法制备 ROP 模型。生后 12 d 时实验组玻璃体腔注射 HIF-1 α 特异性小片段干扰 RNA 表达载体 pSUPER^{H1-siHIF-1 α} ,同时对对照组玻璃体注射空载体。Western blot 检测两组小鼠视网膜 HIF-1 α 和血管内皮生长因子(VEGF)的表达, FITC-Dextran 荧光照影视网膜铺片和组织切片观察两组小鼠视网膜新生血管和新生血管内皮细胞核数目的差异。结果 实验组小鼠 HIF-1 α 和 VEGF 的表达较对照组明显下降($P < 0.01$);实验组突破视网膜内界膜血管内皮细胞核数较对照组明显减少($P < 0.01$)。结论 特异性抑制 HIF-1 α 能有效抑制 ROP 视网膜新生血管的形成。 [中国当代儿科杂志, 2011, 13(8):680-683]

[关键词] 缺氧诱导因子 1 α ; 早产儿视网膜病变; RNA 干扰; 视网膜新生血管; 小鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)08-0680-04

HIF-1 α siRNA reduces retinal neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity

XU Hui-Zhuo, LIU Shuang-Zhen, XIONG Si-Qi, XIA Xiao-Bo. Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Xia X-B, Email: xiAXB21@163.com)

Abstract: Objective To study the inhibition effect of HIF-1 α specific siRNA expression vector pSUPER^{H1-siHIF-1 α} on retinal neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity (ROP). **Methods** The mouse model of ROP was prepared by the method Smith described. Forty-eight ROP mice were randomly divided into two groups: an experimental group that was intravitreally injected with pSUPER^{H1-siHIF-1 α} and a control group that was injected with pSUPER retro vector. The levels of HIF-1 α and vascular endothelia growth factor (VEGF) in the retina were examined by Western blot. The retinal neovascularization was evaluated by angiography using FITC Dextran and quantitated histologically. **Results** The levels of HIF-1 α and VEGF in the retina in the experimental group were reduced 90% and 65% respectively compared with those in the control group. Meanwhile, the number of retinal neovascular endothelial nucleus outbreaking the inner limit membrane in the experimental group was significantly reduced compared with that in the control group. **Conclusions** The development of retinal neovascularization of ROP can be markedly inhibited by RNA interference targeting HIF-1 α .

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(8):680-683]

Key words: Hypoxia inducible factor-1 α ; RNA interference; Retinopathy of prematurity; Retinal neovascularization; Mice

早产儿视网膜病变(retinopathy of prematurity, ROP)是发生在早产儿和低体重儿的一种严重的致盲性眼病,与吸氧有密切的关系。ROP致盲的病理机制关键在于视网膜新生血管的形成^[1-2]。已有研究表明,血管形成与多种生长因子有关,如血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β)、白细胞介

素-1(interleukin, IL-1)、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein, MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)等有关^[3]。其中 VEGF 是与血管形成最为密切的细胞因子,实验证明,抑制 VEGF 信号途径能有效抑制新生血管的形成^[4-5]。HIF-1 是细胞在缺氧等条件下产生的具有转录活性的核蛋白,是调控 VEGF 表达变化的重要

[收稿日期]2011-06-01; [修回日期]2011-06-25

[基金项目]国家自然科学基金(30471853)。

[作者简介]许惠卓,男,博士,副教授。

[通信作者]夏晓波,教授。

因子, VEGF 在低氧环境下组织中的表达是通过 HIF-1 α 诱导的^[6-7]。本课题组前期已构建装有 HIF-1 α 小片段 RNA 的质粒 pSUPER^{H1-siHIF-1 α} , 通过转染 pSUPER^{H1-siHIF-1 α} 能有效抑制血管内皮细胞中 VEGF mRNA 和 HIF-1 α 蛋白质的表达^[8-9]。但是 VEGF 信号途径与 ROP 发生的关系目前研究较少, 因此本研究拟建立 ROP 小鼠模型, 通过玻璃体腔注射 pSUPER^{H1-siHIF-1 α} , 应用 Western blot 方法检测了 VEGF 和 HIF-1 α 的表达变化, 并观察视网膜新生血管的变化, 以期为临床治疗 ROP 提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

C57BL/6J 小鼠由中国科学院上海实验动物中心提供, 阳离子脂质体 (lipofectamineTM 2000, LF2000) 购自 Invitrogen 公司, 羊抗 VEGF 多克隆抗体购自 R&D 公司, 羊抗 HIF-1 α 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, 小鼠抗 β -actin 单克隆抗体和 FITC-Dextran (分子量 2×10^6) 购自 Sigma 公司。

1.2 pSUPER^{H1-siHIF-1 α} 真核表达载体的构建

根据人类基因库中人 HIF-1 α 基因 (NM_001530) 的 mRNA 序列设计小干扰 RNA 作用靶点, 其靶序列为 AAGAGGTGGATATGTCTGG (1214-1232)。化学合成 64nt 的 sh-HIF-1 α (HIF-1 α 小发夹 RNA) 寡核苷酸序列: 正义链 5'-GATC-CCCAAGAGGTGGATATGTCTGGTTCAAGAGACCAGA-CATATCCACCTCTTTTTTTGGAAAA, 反义链 5'-AGCTTTTCCAAAAAAGAGGTGGATATGTCTGGTCTC-TTGAACCAGACATATCCACCTCTTGGG。sh-HIF-1 α 正义链和反义链退火形成双链模板。采用 Hind III 和 Bgl II 双酶切 pSUPER. retro 质粒, 将线性化的 pSUPER. retro 质粒与退火形成的双链模板体外连接, 经转化、筛选阳性克隆后抽提重组的 pSUPERH1-siHIF-1 α 载体。并经测序鉴定 pSUPERH1-siHIF-1 α 载体中连接上的 sh-HIF-1 α 寡核苷酸模板的准确性。

1.3 ROP 模型制作和玻璃体腔注射 pSUPER^{H1-siHIF-1 α}

新生 C57BL/6J 小鼠 48 只随机分为对照组和实验组 (每组 24 只), 参照 Smith 等方法^[10] 制作小鼠 ROP 模型: 小鼠出生 7 d 时 (P7) 连同母鼠放入氧箱喂养, 氧浓度为 (75 \pm 2)%, 5 d 后将新生小鼠 (P12) 及母鼠移至常氧浓度饲养; 于 P12 时, 1% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔内注射麻醉小鼠, 显微镜下

自角膜缘后 0.5 mm 处刺入微量进样器, 将 1 μ L 脂质体 - 质粒混合物 (1 μ L 500 ng/ μ L pSUPER^{H1-siHIF-1 α} : 1 μ L LF2000) 注入实验组小鼠玻璃体腔内, 同时对照组注射空载体。每组于注射后 12 h 处死 6 只取视网膜用于检测 HIF-1 α ^[9]; 于 P17 处死剩余 18 只, 分别取视网膜用于检测 VEGF、视网膜铺片 FITC-Dextran 荧光照影和细胞核计数。

1.4 Western blot 方法检测两组小鼠视网膜 HIF-1 α 和 VEGF 的表达

于注射后 12 h (P12) 处死动物, 摘除眼球取视网膜置于 1.5 mL EP 管内, 加入 100 μ L 组织裂解液, 冰上研磨裂解视网膜组织 30 min; 14000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min; 用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。取变性的蛋白 20 μ g/孔, 用 10% SDS-PAGE 胶进行电泳; 恒压下将蛋白转至 PVDF 膜, 2.5% 牛血清白蛋白封闭 1 h, 分别加入稀释的 HIF-1 α (1:100), VEGF-A (1:500), β -actin (1:4000), 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBST 洗膜 3 次, 加入对应的 1:10000 HRP 标记 IgG, 孵育 1 h。PBST 洗膜 3 次, 暗室内 ECL 发光法检测目的条带, Kodak X 光胶片曝光, 显影及定影; 胶片扫描后, 用 Eagle eye II 图像分析仪进行灰度分析, 以 β -actin 做内对照进行校正, 计算目的蛋白的相对表达量。计算方法: 目的蛋白质相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值/ β -actin 条带灰度值。

1.5 FITC-Dextran 荧光照影视网膜铺片和新生血管内皮细胞核计数

1% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔内注射麻醉 P17 小鼠 (6 只/组), 打开胸腔, 用 1 mL 注射器抽取 FITC-Dextran (50 mg: 1 mL 4% 多聚甲醛) 0.5 mL 灌注左心室后, 迅速摘除眼球。在手术显微镜下, 在 1 \times PBS 液体中, 沿角巩缘剪开眼球, 去除眼前部组织及晶状体, 用自制的玻璃棒小心娩出视网膜, 放射状剪开, 铺于滤纸上, 放入 4% 多聚甲醛中浸泡 5 min, 然后从滤纸上剥离视网膜铺于干净的载玻片上, 铺平, 滴 2% 明胶, 盖上盖玻片, 置于荧光显微镜下观察并照相。

小鼠眼球经 4% 多聚甲醛固定, 梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 通过角膜平行视神经作眼球矢状系列切片 (6 μ m 厚), 含视神经的切片除外, 每眼随机抽取 8 张切片, 苏木精-伊红 (HE) 染色。显微镜下计数突破内界膜的血管内皮细胞核数, 取平均内皮细胞数作为每眼的细胞核数, 用于统计分析^[10]。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析, 结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。计量资料采用单因素方差

分析,组间比较采用 *Dunnnett-t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠视网膜 HIF-1 α 和 VEGF 的表达

本研究发发现实验组视网膜 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达均明显低于对照组,表达量分别下降了 90% 和 65% ($P < 0.01$),见图 1~2。

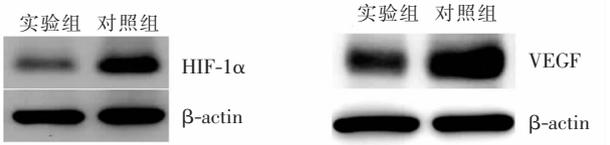


图1 两组 HIF-1 α 和 VEGF 的表达 (Western blot)

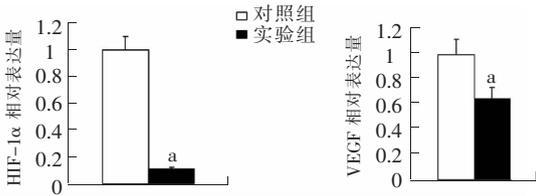


图2 两组 HIF-1 α 和 VEGF 的表达 ($n = 6$) a:与对照组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 两组荧光照影视网膜铺片

对照组视网膜大血管不规则扩张,行走迂曲,视盘周围毛细血管闭塞,可见大片无灌注区,周边部正常毛细血管网消失,可见新生血管丛,伴荧光渗漏。实验组整个视网膜血管网状结构基本可见,中央区视网膜血管迂曲及不规则扩张较对照组明显减轻,视盘周围毛细血管无灌注区明显减少,周边部毛细血管网基本正常,新生血管丛明显减少。见图 3。

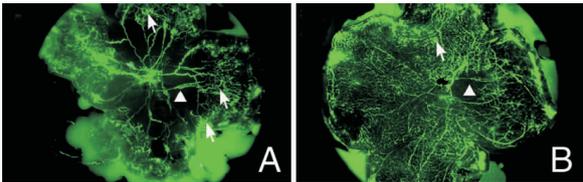


图3 荧光照影视网膜铺片 (FITC-Dextran, $\times 4$) 实验组 (图 B) 较对照组 (图 A) 视网膜中央毛细血管无灌注区 (三角形标记所示) 范围明显缩小,新生血管丛 (箭头标记所示) 明显减少,周边毛细血管网基本正常。

2.3 新生血管内皮细胞计数

对照组突破视网膜内界膜的血管内皮细胞计数

为 48 ± 5 个,实验组突破视网膜内界膜的血管内皮细胞计数为 18 ± 5 个,两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.001$),见图 4~5。

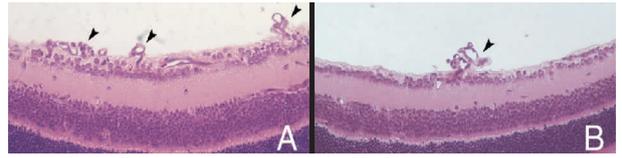


图4 新生血管内皮细胞计数 (HE, $\times 200$) 实验组 (图 B) 较对照组 (图 A) 突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核 (箭头所示) 的数目明显减少。

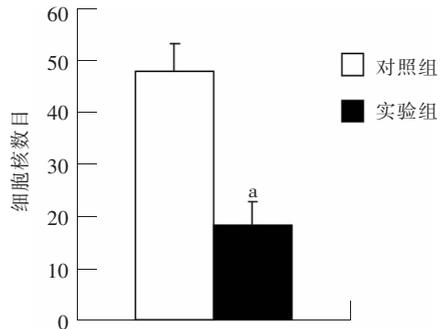


图5 新生血管内皮细胞计数 ($n = 6$) a:与对照组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

Smith 等建立的早产儿视网膜病变动物模型的机制类似于人类早产儿视网膜病变的发病机制。生后 7 d 的小鼠视网膜大血管已基本发育而毛细血管尚未发育成熟,高氧环境可使得未发育成熟的视网膜血管收缩痉挛。5 d 后回到正常氧环境,此时的氧浓度对于视网膜而言即为相对缺氧状态,早期血管通过扩张来代偿,晚期失代偿后导致新生血管形成。小鼠 ROP 模型的主要特点为视网膜中央大片缺血无灌注区和视网膜新生血管的形成,而人类 ROP 的视网膜缺血无灌注区位于周边部。

本研究发发现:玻璃体腔内注射少量的 pSUPER^{H1-siHIF-1 α} 即能有效地抑制 ROP 模型鼠中视网膜新生血管的发生。推断这与下列因素有关:(1)玻璃体腔注射的 pSUPER^{H1-siHIF-1 α} 能成功地进入产生 HIF-1 α 的视网膜“靶”细胞。研究表明 ROP 模型鼠中 HIF-1 α 表达升高的部位主要位于视网膜神经节细胞所在的内层视网膜组织^[11]。而玻璃体腔注射阳离子脂质体包裹的质粒能成功地完成玻璃体腔扩

散、穿透视网膜内界膜、在视网膜组织中扩散等过程,最终被视网膜神经节细胞所吸收并持续表达1月之久^[12]。因此,玻璃体腔注射的 pSUPER^{H1-siHIF-1 α} 能成功地进入产生 HIF-1 α 的视网膜细胞,达到从“源头”切断 HIF-1 α 产生的作用。(2)RNA 干扰的扩增效应。被视网膜细胞所摄取的 pSUPER^{H1-siHIF-1 α} ,通过转录在细胞内产生靶向 HIF-1 α 的 siRNA,siRNA 一方面通过与细胞内的核酶复合物结合降解视网膜细胞内的 HIF-1 α mRNA。另一方面靶向 HIF-1 α 的 siRNA 可作为引物,以细胞内 HIF-1 α mRNA 为模板,在以 RNA 为模板的 RNA 聚合酶(RNA-directed RNA polymerase, RdRP)作用下合成出 HIF-1 α mRNA 的互补链,结果 HIF-1 α mRNA 也变成了双链 RNA。新合成的双链 RNA 在视网膜细胞内 Dicer 酶的作用下被裂解成新的靶向 HIF-1 α 的 siRNA^[13]。通过这个聚合酶链式反应,视网膜细胞内的 HIF-1 α siRNA 数量大量增加,从而产生玻璃体腔内注射少量的 pSUPER^{H1-siHIF-1 α} ,即能起到明显抑制视网膜新生血管发生的效果。

HIF-1 是细胞在缺氧等条件下产生的具有转录活性的核蛋白,它能够与靶基因(如 VEGF)结合,通过调节转录及转录后的调控,使机体产生对缺氧、缺血的适应反应^[14]。VEGF 又名血管通透因子,是血管内皮细胞的特异性有丝分裂原,能使血管内皮细胞变形、移动、分裂增殖,能增加血管的通透性,对血管生成具有重要作用。研究表明 VEGF 在多种视网膜血管性疾病中表达增加,是视网膜新生血管形成的关键因素^[11,15]。Ozaki 等^[11]发现在小鼠早产儿视网膜病变中,由于低氧诱导视网膜 HIF-1 表达增强,HIF-1 进而促使其下游基因 VEGF 表达增强。本研究证明,通过 RNAi 干扰技术抑制 HIF-1 的表达,可下调视网膜 VEGF 的表达,进而抑制视网膜新生血管的发生。这说明在早产儿视网膜病变中,VEGF 的表达与 HIF-1 有着密切的关系,抑制 HIF-1 的表达,可影响视网膜新生血管的发生。

总之,本研究通过 RNA 干扰技术,下调 HIF-1 的表达,可明显抑制早产儿 ROP 小鼠模型视网膜新生血管的发生,为临床治疗早产儿 ROP 提供了新的思路。

[参 考 文 献]

[1] The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity.

An international classification of retinopathy of prematurity [J]. Arch Ophthalmol, 1984, 102(8): 1130-1134.

[2] 李秋平, 王宗华, 陈耀琴, 陈佳, 黄捷婷, 王自珍, 等. 床旁激光治疗早产儿视网膜病变的疗效分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(9): 693-695.

[3] Simó R, Carrasco E, García-Ramírez M, Hernández C. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy [J]. Curr Diabetes Rev, 2006, 2(1): 71-98.

[4] Robinson GS, Pierce EA, Rook SL, Foley E, Webb R, Smith LE. Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(10): 4851-4856.

[5] Bainbridge JW, Mistry A, De Alwis M, Paleolog E, Baker A, Thrasher AJ, et al. Inhibition of retinal neovascularisation by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1 [J]. Gene Ther, 2002, 9(5): 320-326.

[6] Rosmorduc O, Housset C. Hypoxia: a link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease [J]. Semin Liver Dis, 2010, 30(3): 258-270.

[7] Westra J, Molema G, Kallenberg CG. Hypoxia-inducible factor-1 as regulator of angiogenesis in rheumatoid arthritis-therapeutic implications [J]. Curr Med Chem, 2010, 17(3): 254-263.

[8] 许惠卓, 刘双珍, 夏晓波, 熊思齐, 王育科, 李岩, 等. 低氧诱导因子-1 α 干扰 RNA 对血管内皮生长因子 mRNA 表达的抑制作用 [J]. 眼视光学杂志, 2007, 9(4): 228-231.

[9] 熊宇, 夏晓波, 许惠卓, 蒋剑, 宋伟涛, 刘双珍, 等. 干扰 RNA 抑制小鼠视网膜 HIF-1 α 蛋白质的表达 [J]. 国际眼科杂志, 2007, 7(2): 361-364.

[10] Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(1): 101-111.

[11] Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, Yamada H, et al. Hypoxia inducible factor-1 α is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(1): 182-189.

[12] Masuda I, Matsuo T, Yasuda T, Matsuo N. Gene transfer with the intraocular tissues by different routes of administration [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 345(37): 1914-1920.

[13] Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs [J]. Cell, 2001, 107(3): 297-307.

[14] Takahashi R, Tanaka S, Hiyama T, Ito M, Kitadai Y, Sumii M, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α expression and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach [J]. Oncol Rep, 2003, 10(4): 797-802.

[15] Frank RN. Diabetic retinopathy [J]. N Engl J Med, 2004, 350(1): 48-58.

(本文编辑:王庆红)