

大鼠视网膜缺血性再灌注中 HIF-1 α 与 SDF-1 的表达意义

曲来强, 张文芳, 鲁建华, 刘 瑜

作者单位: (730030) 中国甘肃省兰州市, 兰州大学第二医院眼科
作者简介: 曲来强, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。
通讯作者: 张文芳, 女, 博士, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师,
甘肃省医学会眼科专业委员会主任委员, 研究方向: 眼底病。
zhangwf888@163. com
收稿日期: 2010-09-07 修回日期: 2010-10-27

Expression and significance of HIF-1 α and SDF-1 in retinal ischemia-reperfusion in rats

Lai-Qiang Qu, Wen-Fang Zhang, Jian-Hua Lu, Yu Liu

Department of Ophthalmology, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Correspondence to: Wen-Fang Zhang, Department of Ophthalmology, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. zhangwf888@163. com

Received: 2010-09-07 Accepted: 2010-10-27

Abstract

• AIM: To investigate the expression pattern and correlation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) in the ischemic retinopathy and retinal ischemia-reperfusion.

• METHODS: In order to analyze the correlation and expression between HIF-1 α and SDF-1 in retinal ischemia-reperfusion model, immunohistochemical method was used.

• RESULTS: In the control group, HIF-1 α and SDF-1 were not expressed or slightly expressed, while that in retinal ischemia-reperfusion group began to express immediately after carotid artery ligation, ascended at 6 hour, reached peak at 12 hour, and decreased gradually after 24 hours.

• CONCLUSION: HIF-1 α and SDF-1 expression are closely relate to retinal ischemia-reperfusion injury, and have a collaborative relationship.

• KEYWORDS: retina; ischemia-reperfusion; hypoxia; HIF-1 α ; SDF-1; correlation

Qu LQ, Zhang WF, Lu JH, et al. Expression and significance of HIF-1 α and SDF-1 in retinal ischemia-reperfusion in rats. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(12):2265-2267

摘要

目的: 探讨缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 和基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) 在缺血性视网膜疾病及视网膜缺血再灌注 (retinal ischemia-reperfusion, RIR) 发展中的表达规律及二者的相互关系。

方法: 应用免疫组织化学的方法分析 HIF-1 α 和 SDF-1 在视网膜缺血再灌注模型中的表达及其关系。

结果: 在对照组中 HIF-1 α 和 SDF-1 未见表达或轻微表达, 视网膜缺血性再灌注组 0h 开始表达, 6h 表达增强, 12h 表达最强, 24h 表达减弱, 以后随着时间推移表达逐渐下降。

结论: HIF-1 α 和 SDF-1 表达与视网膜缺血再灌注中视网膜功能损伤密切相关, 同时二者具有协同相关性。

关键词: 视网膜; 缺血再灌注; 低氧; 缺氧诱导因子-1 α ; 基质细胞衍生因子-1; 相关性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.12.011

曲来强, 张文芳, 鲁建华, 等. 大鼠视网膜缺血性再灌注中 HIF-1 α 与 SDF-1 的表达意义. *国际眼科杂志* 2010;10(12):2265-2267

0 引言

缺血性视网膜病变 (ischemic retinopathy) 是由于视网膜的微循环功能障碍导致的一类常见疾病, 视网膜中央静脉阻塞 (缺血性)、糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 皆属缺血缺氧性病变, 为了补偿组织氧代谢的不平衡性, 视网膜的各种组织细胞会产生过多的细胞因子 (HIF-1 α , SDF-1, MMP 和 VEGF), 这些异常表达的细胞因子会使功能上不完备的新生血管增生无序化, 严重时皆可发生病理性新生血管 (pathologic neovascularization, PN)。新生血管的产生由于其结构和功能的缺陷, 会导致视网膜、玻璃体积血, 视网膜增殖性病变、新生血管性青光眼, 严重者可出现视网膜脱离等病变, 最终造成不可逆视力丧失^[1,2]。其中 HIF-1 α 和 SDF-1 在整个疾病过程中发挥了重要作用, 通过检测缺血性再灌注模型中视网膜 HIF-1 α 和 SDF-1 的表达及两者之间表达的相互关系, 探讨 HIF-1 α 和 SDF-1 在缺血性视网膜病变发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 选择 40g/L 多聚甲醛 (武汉博士德生物工程有限公司), 兔抗大鼠 HIF-1 α mAb (Bioworld 公司), 兔抗大鼠 SDF-1 mAb (Bioworld 公司), 免疫组织化学 SABC 试剂盒, DAB 显色试剂盒 (Bioworld 公司), 裂隙灯显微镜 (德国 Zeiss), HMIAS-2000 图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司), 免疫组化所需相关设备均由甘肃医学院病理教研组提供。

1.2 方法 SPF 级成年 Sprague Dawley (SD) 大鼠 56 只 (甘肃医学院实验动物中心提供), 纳入实验前经裂隙灯检查眼前后节均正常, 雌雄不限, 体质量 200 ~ 250g。将大鼠随机分为两组: 假手术组 (对照组) 0, 6, 12, 24, 48, 72 和 144h 组, 每组 2 只; 缺血再灌注 0, 6, 12, 24, 48, 72 和 144h 组, 每组 6 只。对动物的处置符合视觉和眼科学研究学会规范和要求。采用结扎左侧颈总动脉的方法造成视网膜缺血, 再松开结扎线使得视网膜恢复供血从而达到制作缺血再灌注模型制作的目的^[3,4]。将 SD 大鼠用 100g/L 水合氯醛麻醉过量后处死, 立即摘取左侧眼球, 保留视神经大约 0.5 ~ 1mm, 置于 40g/L 多聚甲醛磷酸缓冲液 (pH 7.4) 内 4 $^{\circ}$ C 固定 24h。沿角膜缘做一小切口, 剪除整个角膜, 取出晶状体, 清除玻璃体, 流水反复缓慢冲洗标本。梯度乙醇

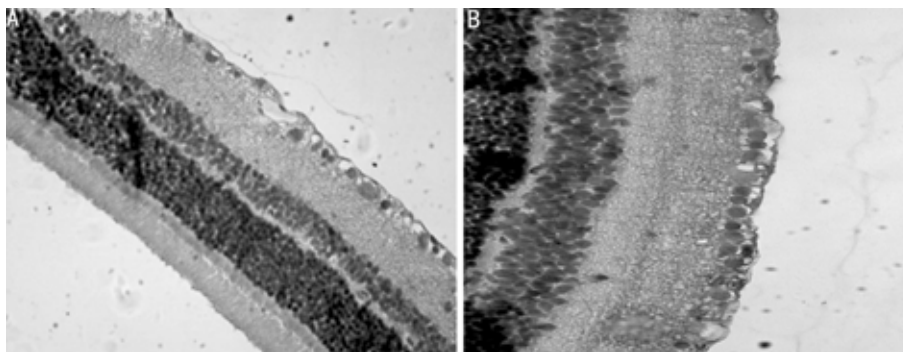


图1 SDF-1和HIF-1α在大鼠视网膜缺血再灌注损伤12h表达 A;SDF-1;B:HIF-1α。

表1 HIF-1α和SDF-1表达的变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

t/h	HIF-1α		SDF-1	
	Control	RIR	Control	RIR
0	0.052 ± 0.006	0.485 ± 0.003 ^b	0.483 ± 0.016	0.783 ± 0.012 ^b
6	0.057 ± 0.007	0.923 ± 0.012 ^b	0.472 ± 0.011	0.976 ± 0.024 ^b
12	0.073 ± 0.001	2.684 ± 0.076 ^{b,d}	0.451 ± 0.009	1.689 ± 0.078 ^{b,d}
24	0.087 ± 0.005	1.923 ± 0.045 ^b	0.398 ± 0.018	1.429 ± 0.048 ^b
48	0.082 ± 0.004	1.616 ± 0.025 ^b	0.523 ± 0.023	1.215 ± 0.063 ^b
72	0.063 ± 0.003	1.283 ± 0.085 ^b	0.590 ± 0.015	0.986 ± 0.026 ^b
144	0.074 ± 0.005	0.967 ± 0.069 ^b	0.464 ± 0.014	0.852 ± 0.098 ^b

^bP < 0.01 vs对照组, ^dP < 0.01 vs其他时段。

脱水和二甲苯透明后,常规石蜡包埋。将包埋好的眼球标本,以平行于视神经矢状轴且以其为平面的视网膜进行连续切片6~8张,厚约5μm,置于防脱切片上,60℃温箱烤片过夜。HE染色,光镜观察各组视网膜内层组织结构的变化。另将切片放于防脱切片上,70℃温箱烤片2h备用,脱蜡前再相同条件烤片15min。切片常规脱蜡,热修复抗原,行免疫组织化学测定。染色步骤严格按照说明书进行,二氨基联苯胺(DAB)显色,脱水、透明、封片。每次染色均做阳性和阴性对照,用已知的HIF-1α和SDF-1阳性切片作对照,用PBS代替一抗做阴性对照。参照文献[5,6]的方法,以细胞质或核内出现棕黄色或褐色着色颗粒为阳性反应。每个时间点分别选取3张切片,每张切片随机选取5个200倍的视野进行观察,采用HMIAS-2000高清晰度彩色医学图文分析系统,在视网膜阳性表达区域计算平均吸光度值来定量测定HIF-1α和SDF-1的表达含量。

统计学分析:应用SPSS 11.5统计分析软件包进行数据处理,图表制作使用Sigma Plot 10.0软件。根据数据特征采用t检验,两正态变量的相关性采用Pearson法,数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SDF-1和HIF-1α的表达 SDF-1在细胞质染呈棕黄色或褐色为阳性(图1A)。从SDF-1的平均吸光度(A)来看,SDF-1在整个视网膜缺血再灌注损伤模型中的表达呈一个抛物线性,0h时表达已经出现;6h时表达已经开始明显升高,主要染色部位在视网膜内层的小血管周围;12h时SDF-1出现了表达最高峰,染色区域主要是在视网膜的节细胞和内核层的胞质中;24h后已经出现缓慢下降,整个视网膜都可见染色阳性细胞,尤其是在外核层(表1)。在损伤组织中HIF-1α在细胞核染为棕黄色表示阳性,在对照组和正常组中未见HIF-1α表达,仅在靠近视网膜的

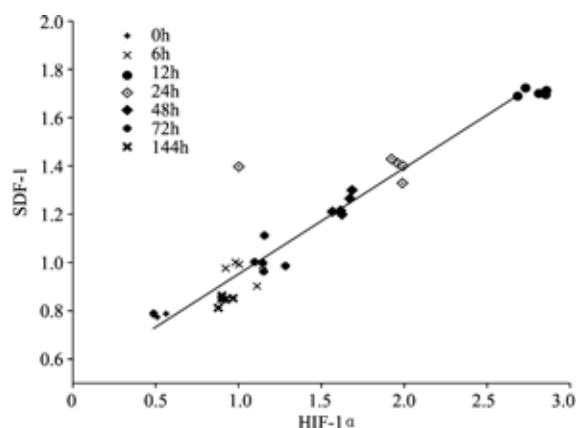


图2 HIF-1α与SDF-1表达的相关性。

巩膜处有轻微表达。HIF-1α主要表达在视网膜的节细胞层和内核层的细胞核中,再灌注0h仅见轻微表达,再灌注6h可见HIF-1α表达明显增加,12h时出现表达最高峰(图1B),24h后表达逐渐下降。

2.2 HIF-1α和SDF-1的相关性 从HIF-1α和SDF-1的变化趋势相同,HIF-1α和SDF-1具有正相关性(图2)。为了更进一步了解HIF-1α和SDF-1之间密切程度和相关方向,采用Pearson分布法计算二者的相关系数。应用积差相关分析,得出两变量的积差相关系数 $r = 0.979, P = 0.000124 < 0.05$,具有统计学意义。从而证明,HIF-1α和SDF-1不仅在缺血性再灌注中具有相关性,而且两者的依赖关系较为密切。

3 讨论

氧是维持生命活动所必须的物质,氧供减少或利用障碍皆可引起细胞发生代谢、功能和形态结构异常变化。视网膜作为中枢神经系统的一部分,来自于胚胎的原始视杯,结构精细而复杂,代谢极为活跃,微循环功能障碍可能造成视网膜神经细胞变性缺血坏死,对缺血缺氧的耐受性

差^[6]。为了补偿氧代谢的不平衡性,视网膜会产生缺血性级联反应(缺血性再灌注瀑布效应),表现为神经元退行性变、钙超载、氧化性应激和自由基产生^[7]。大量研究表明,缺血性组织还可以上调 HIF-1 α , SDF-1, MMPs 和 VEGF 的表达,这些细胞因子调控造血干细胞和内皮祖细胞迁移归巢及血管新生反应,使结构和功能上不完善的血管增生无序化,促进再生修复以使其达到自我救赎的目的,严重时病理性新生血管可导致视功能受损甚至失明^[8-9]。因此做到尽早恢复缺血组织的血流,又减轻或防止再灌注损伤的发生,是缺血性视网膜疾病的亟待解决的当务之急。缺氧诱导因子 HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个异源二聚体亚单位组成的转录激活因子,广泛存在于哺乳动物和人体内的低氧转录因子,是缺氧组织适应缺氧反应过程最重要途径,调控着下游的众多基因的转录和表达,如血管内皮生长因子 VEGF、细胞凋亡因子 P53、诱导型一氧化氮合成酶 iNOS、胰岛素样生长因子 IGF-1 和促红细胞生成素 EPO 等。DeNiro 等^[10]研究缺血性视网膜疾病时发现,缺氧诱导因子抑制剂 YC-1 [3-(5'-羟甲基-2'-咪唑基)-1 苯甲基引唑]对缺血性视网膜疾病的新生血管具有强烈作用,这一途径的实现主要是通过抑制 VEGF 和 iNOS 基因表达下降来实现的,从反面说明 HIF-1 是缺氧状态下视网膜新生血管性疾病的关键因子。Zhang 等^[11]研究发现在离体培养的 RPE 细胞中,用 HIF-1 α 特异性 siRNA 转染后,RPE 细胞中的 HIF-1 α 及 VEGF 的 mRNA 和蛋白水平表达明显下降,表明将 HIF-1 α 作为治疗靶点对于治疗视网膜缺血缺氧性疾病具有很广泛前景。可见 HIF-1 α 不仅是缺血缺氧条件下视网膜血管性疾病的始动因子,而且对其机制进一步研究必将为血管性疾病治疗和预防提供有力手段。近来基质细胞衍生因子-1(SDF-1)越来越成为眼底病发病机制研究的焦点,为眼底血管性疾病的治疗探索了有益思路。SDF-1 是由两个异构体(SDF-1 α , SDF-1 β)组成的氨基酸多肽趋化因子,趋化因子受体 CXCR4 为其特异受体,通过与表达有特异受体 CXCR4 相应干细胞黏附、迁移和归巢到缺氧部位,参与血管形成和利于组织修复^[12]。在缺血缺氧条件下,造血干细胞可以分化为血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC),然后在 SDF-1 等趋化因子的作用下,参与缺血缺氧组织中新生血管形成。Lerman 等^[13]在研究肿瘤血管发生和损伤组织的修复问题时发现,电离辐射条件下的内皮细胞迁移主要是靠 SDF-1 来实现的,而这一点的实现恰巧是依赖 HIF-1 α 来完成的。既往研究视网膜缺血缺氧性疾病时将 HIF-1 α 和 SDF-1 α 联系起来尚未见报道。我们通过免疫组织方法检测缺血再灌注模型视网膜组织发现 HIF-1 α 和 SDF-1 α 均高表达,与正常组织相比具有统计学意义($P < 0.05$),经过 Pearson 分析二者具有明显的依存关系($r = 0.979$, $P = 0.000124 < 0.05$)。然而仅针对 SDF-1 的治疗限于视网膜新生血管的进一步发展,而对于新生血管的源头不能

发挥应有作用,而对于 SDF-1 上游转录活性因子 HIF-1 的干预或对于两者的共同干预将对整个视网膜新生血管疾病的发展和并发症治疗具有广泛应用前景。随着缺氧-HIF-1 α -SDF-1 α -新生血管生物轴在视网膜缺血性疾病中的研究不断深入,必将为疾病的治疗开辟新的思路,给众多眼疾患者带来福音。但从缺氧-HIF-1 α -SDF-1 α -新生血管生物轴的哪一点切入能最大限度解决新生血管的问题,仍是值得研究的重要课题。

参考文献

- 1 Xia XB, Xiong SQ, Xu HZ, et al. Suppression of retinal neovascularization by shRNA targeting HIF-1 α . *Curr Eye Res* 2008;33(10):892-902
- 2 Limaie Silva R, Shen J, Hackett SF, et al. The SDF-1/CXCR4 ligand/receptor pair is an important contributor to several types of ocular neovascularization. *FASEB J* 2007;21(12):3219-3230
- 3 Zhihua H, Liangdong L, Xiao L, et al. Effect of 3'-Daidzein Sulfonic Sodium on the Anti-oxidation of Retinal Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Adv Exp Med Biol* 2010;664:585-591
- 4 Yoshitake N, Fukui H, Yamagishi H, et al. Expression of SDF-1 α and nuclear CXCR4 predicts lymph node metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008;98(10):1682-1689
- 5 Ogane N, Yasuda M, Shimizu M, et al. Clinicopathological implications of expressions of hypoxia-related molecules in esophageal superficial squamous cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol* 2010;14(1):23-29
- 6 Shurygina IP, Miliutina NP, Pokudina IO, et al. Influence of infrared cold laser radiation emission on free radical processes in various tissues of rats with circulatory cerebral hypoxia. *Aviakosm Ekolog Med* 2009;43(4):51-55
- 7 Oharazawa H, Igarashi T, Yokota T, et al. Protection of the retina by rapid diffusion of hydrogen: administration of hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(1):487-492
- 8 Kamota T, Li TS, Morikage N, et al. Ischemic pre-conditioning enhances the mobilization and recruitment of bone marrow stem cells to protect against ischemia/reperfusion injury in the late phase. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(19):1814-1822
- 9 Kobayashi H, Yasuda S, Bao N, et al. Postinfarct treatment with oxytocin improves cardiac function and remodeling via activating cell-survival signals and angiogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;54(6):510-519
- 10 DeNiro M, Al-Halafi A, Al-Mohanna FH, et al. Pleiotropic effects of YC-1 selectively inhibit pathological retinal neovascularization and promote physiological revascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Mol Pharmacol* 2010;77(3):348-367
- 11 Zhang P, Wang Y, Hui Y, et al. Inhibition of VEGF expression by targeting HIF-1 α with small interference RNA in human RPE cells. *Ophthalmologica* 2007;221(6):411-417
- 12 Hristov M, Weber C. Progenitor cell trafficking in the vascular wall. *J Thromb Haemost* 2009;7(Suppl 1):31-34
- 13 Lerman OZ, Greives MR, Singh SP, et al. Low-dose radiation augments vasculogenesis signaling through HIF-1 dependent and independent SDF-1 induction. *Blood* 2010; prepublished online