

HIF-1 与 VEGF 在翼状胬肉中的表达及意义

李明渊 唐仁泓

Expression and significance of HIF-1 and VEGF in pterygium

Li Mingyuan, Tang Renhong. Department of Ophthalmology, Xiangya Third Hospital of Central South University, Changsha 410013, China

Abstract Objective It has been well-known that vascular endothelial growth factor(VEGF) is an important stimulating factor in pathogenesis of neovascularization and a target factor of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1). So HIF-1 is a main regulating factor of tumor neovascular formation. This study was to investigate the effect and relationship between HIF-1 and VEGF in pathogenesis of pterygium. **Methods** The 32 pterygium specimen was obtained during the operation and the 11 normal conjunctival specimen was collected during cataract extraction and strabismus correcting surgery. The mass pathological examination was performed under the optical microscope. The expression of HIF-1 and VEGF in pterygium and normal conjunctiva was examined using immunohistochemistry and the positive rate was calculated by the scoring strain intensity and numbers of positive cells. **Results** The squamous metaplasia, a lots of inflammatory cells, fibroblasts and new blood vessels were seen under the optical microscope in pterygium specimen. The positive rate of HIF-1 was 62.5% in pterygium(score:8.90 ± 0.86) and was 9.1% in normal conjunctiva(score:4.30 ± 0.79), and the positive rate of VEGF was 84.8% in pterygium(score:9.90 ± 0.89) and 18.2% in normal conjunctiva(score:4.80 ± 0.87), showing significant differences in the expressions of HIF-1 and VEGF between pterygium and normal conjunctiva. The expression of HIF-1 was positively correlated with that of VEGF in pterygium($r = 0.389, P = 0.037$). **Conclusion** The high expression of HIF-1 and VEGF in pterygium suggests that HIF-1 and VEGF may play an important role in the development of pterygium. The expression of HIF-1 is positively correlated with VEGF in pterygium, which indicate that HIF-1 might participate in the regulation of VEGF.

Key words hypoxia inducible factor-1; VEGF; pterygium

摘要 目的 研究缺氧诱导因子-1(HIF-1)与血管内皮生长因子(VEGF)在翼状胬肉组织中的表达及其相关性。**方法** 采用免疫组织化学法研究 HIF-1 与 VEGF 分别在 32 例翼状胬肉与 11 例人正常球结膜组织中的表达。**结果** 32 例翼状胬肉中 HIF-1 的阳性表达率为 62.5% (20/32), VEGF 的阳性表达率为 84.8% (27/32), 11 例正常结膜组织中 HIF-1 的阳性表达率为 9.1% (1/11), VEGF 的阳性表达率为 18.2% (2/11), 正常球结膜与翼状胬肉组织中 HIF-1 与 VEGF 的表达差异有统计学意义, 且翼状胬肉中 HIF-1 与 VEGF 的表达呈正相关($P < 0.05$)。**结论** HIF-1 及 VEGF 在翼状胬肉中高表达, 提示其可能参与了翼状胬肉的发生和发展。HIF-1 与 VEGF 在翼状胬肉中的表达呈正相关, 提示在翼状胬肉中 HIF-1 可能参与了对 VEGF 的调控。

关键词 缺氧诱导因子-1; 血管内皮生长因子; 翼状胬肉

分类号 R 777.33 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)03-0214-04

翼状胬肉是一种常见的眼表疾病, 发病机制至今尚未完全明确。缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 是普遍存在于细胞内的缺氧应答调控因子, 参与多种促血管生成因子的基因转录, 促进血管生成^[1-2]。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是目前已知在新生血管形成过程

中最重要的刺激因子, 同时又是 HIF-1 重要的靶因子。故 HIF-1 被认为是肿瘤血管生成环节中的核心调控因子^[3]。本研究通过测定翼状胬肉与人正常球结膜组织中 HIF-1 与 VEGF 的表达探讨两者在翼状胬肉的发生发展中的意义。

1 资料与方法

1.1 资料

作者单位: 410013 长沙, 中南大学湘雅三医院眼科
 通讯作者: 唐仁泓 (Email: trh_1@126.com)

1.1.1 一般资料 收集 2006 年湘雅三医院眼科确诊为原发性翼状胬肉的标本 32 例,翼状胬肉均为进行期,其中男 18 例,女 14 例;年龄 40~70 岁,平均 52.5 岁。正常对照组 11 例,取白内障手术患者球结膜 3 例、斜视手术患者球结膜 8 例,均取得患者同意。

1.1.2 主要试剂 兔抗人 HIF-1 多克隆抗体(美国 Santa cruz 公司);兔抗人 VEGF 多克隆抗体、SABC 免疫组织化学染色试剂盒(武汉博士德公司);DAB 试剂盒(福州迈新公司)。

1.2 方法

1.2.1 标本处理 翼状胬肉组织切取后,立即漂洗,除去表面血迹后置于 AF 液(80% 乙醇:40% 甲醛 = 9:1)中固定。48 h 后脱水、石蜡包埋,4~5 μm 连续切片,每块组织取 4 张切片。标本经苏木精-伊红染色,于光学显微镜下观察翼状胬肉与人的正常球结膜标本的组织学表现。

1.2.2 免疫组织化学染色 兔抗人 HIF-1 及兔抗人 VEGF 免疫组织化学反应按照常规染色步骤进行。阴性对照:用 0.01 mol/L PBS 替代一抗,其余同上,排除二抗的非特异性染色(二抗为通用型试剂盒 pv 9000 内抗体,购自北京中杉金桥公司)。用已知的 HIF-1 和 VEGF 表达强阳性的组织切片作为阳性对照,以 PBS 替代一抗作为阴性对照。以在细胞浆内或胞核内出现棕黄色颗粒,且其着色强度高于背景非特异性染色者判定为阳性,然后按阳性细胞比例将 0、1%~25%、26%~50%、51%~75%、76%~100% 分别计为 0~4 分;再按染色强度将无、弱、中、强分别计为 0~3 分,最

后综合两部分得分^[4]。如某片有 25% 弱阳性(1×1)、50% 中等阳性(2×2)及 25% 强阳性(1×3),则总分为 1+4+3=8。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行分析,HIF-1 和 VEGF 在正常球结膜组与翼状胬肉组表达的眼数和表达率的比较采用 χ^2 检验。HIF-1 与 VEGF 在正常球结膜中和翼状胬肉中的表达评分以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的比较采用独立样本的 *t* 检验。HIF-1 及 VEGF 在翼状胬肉组织中表达的相关性采用 Pearson 直线相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常球结膜和翼状胬肉的苏木精-伊红染色的组织学表现

正常球结膜光镜下可见上皮层和基质层。上皮层由复层鳞状上皮细胞构成。基质层为疏松的结缔组织,其间有散在的毛细血管,少许成纤维细胞(图 1)。翼状胬肉可见上皮层复层鳞状上皮化生明显,头部浅层基质层由较多成纤维细胞和大量新生血管伴有炎性细胞浸润(图 2)。

2.2 HIF-1 及 VEGF 免疫组织化学染色的组织学改变

HIF-1 在人正常球结膜的表达为阴性(图 3);在翼状胬肉上皮层细胞有阳性表达,可见棕黄色颗粒分布于上皮细胞胞浆内(图 4)。VEGF 在人的正常球结膜的表达为弱阳性(图 5);在翼状胬肉上皮层细胞、血管内皮细胞以及成纤维细胞有阳性表达(图 6)。阴性对照见图 7。

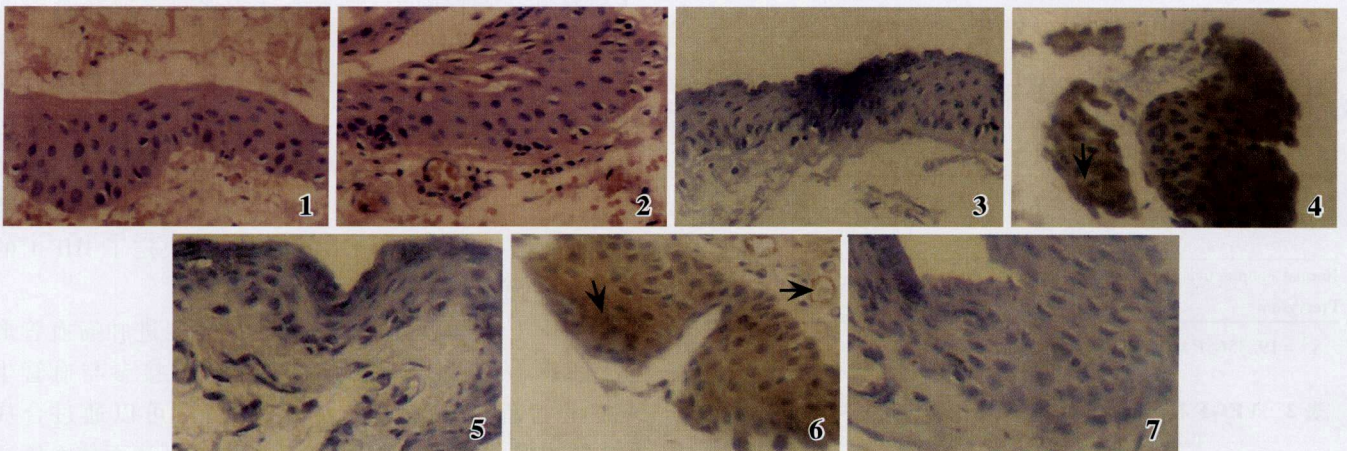


图 1 正常球结膜苏木精-伊红染色($\times 400$) **图 2** 翼状胬肉苏木精-伊红染色($\times 400$) **图 3** HIF-1 在人的正常球结膜中的阴性表达($\times 400$) **图 4** HIF-1 主要在翼状胬肉上皮层细胞有阳性表达,棕黄色阳性颗粒主要分布于上皮细胞胞浆内(箭头)($\times 400$) **图 5** VEGF 在人的正常球结膜中的阴性表达($\times 400$) **图 6** VEGF 在翼状胬肉中的表达主要在上皮层细胞,棕黄色阳性颗粒主要分布于上皮细胞胞浆内(箭头)($\times 400$) **图 7** 阴性对照未见阳性着色($\times 400$)

Fig. 1 HE staining of the normal bulbar conjunctiva($\times 400$) **Fig. 2** HE staining of pterygium($\times 400$) **Fig. 3** HIF-1 is not expressed in normal bulbar conjunctiva($\times 400$) **Fig. 4** HIF-1 shows the positive brown stain in cytoplasm of epithelial lining cells in pterygium tissue(arrow)($\times 400$)

Fig. 5 VEGF is absently expressed in normal bulbar conjunctiva($\times 400$) **Fig. 6** Immunohistochemical staining of VEGF shows the brown positive products in cytoplasm of epithelial lining cells(arrow)($\times 400$) **Fig. 7** No positive staining is seen in negative control specimen($\times 400$)

2.3 HIF-1 和 VEGF 在人正常球结膜与翼状胬肉组织中的表达及其相关性

HIF-1 在对照组中有 1 例弱阳性(为 55 岁的外斜患者),阳性率为 9.1% (1/11),在翼状胬肉组有 20 例阳性表达,阳性率为 62.5% (20/32),两组间表达水平差异有统计学意义($\chi^2 = 19.356, P = 0.01$) (表 1)。VEGF 在对照组有 2 例弱阳性(1 例 HIF-1 表达弱阳性的患者和 1 例 50 岁的白内障患者),阳性率为 18.2% (2/11),在翼状胬肉组有 27 例阳性表达,阳性率为 84.8% (27/32),两组间表达水平的差异有统计学意义($\chi^2 = 35.938, P = 0.01$) (表 2)。HIF-1 及 VEGF 在正常结膜组和翼状胬肉组表达的评分见表 3。经 Pearson 相关分析发现翼状胬肉中 HIF-1 与 VEGF 蛋白的表达呈正相关($r = 0.389, P = 0.037$) (图 8)。

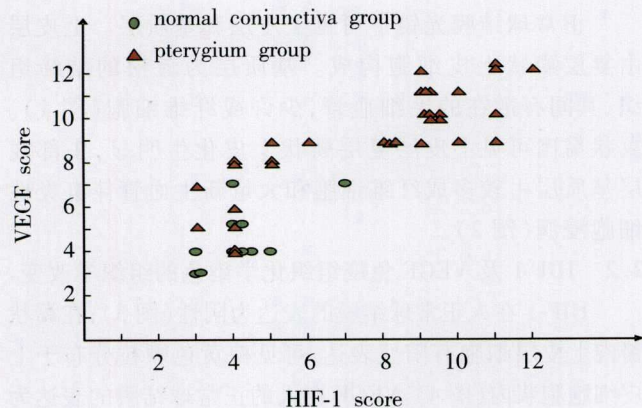


图 8 HIF-1 和 VEGF 在正常结膜组和翼状胬肉组表达关系的散点图

Fig. 8 The scatter plot of the expression of HIF-1 and VEGF in normal conjunctiva and pterygium

表 1 HIF-1 在人正常球结膜及翼状胬肉组织中的表达频数
Table 1 The eyes of HIF-1 expression in normal and pterygium specimen

Group	n	Number of HIF-1 expression				Positive rate (%)
		-	+	++	+++	
Normal conjunctiva	11	10	1	0	0	9.1
Pterygium	32	12	13	6	1	62.5

$\chi^2 = 19.356, P = 0.01 (\chi^2 \text{ test})$

表 2 VEGF 在人正常球结膜及翼状胬肉组织中的表达频数
Table 2 The eyes of VEGF expression in normal and pterygium specimen

Group	n	Number of VEGF expression				Positive rate (%)
		-	+	++	+++	
Normal conjunctiva	11	9	2	0	0	18.2
Pterygium	32	5	13	10	4	84.8

$\chi^2 = 35.938, P = 0.01 (\chi^2 \text{ test})$

表 3 HIF-1 与 VEGF 在正常球结膜中和翼状胬肉中的表达评分($\bar{x} \pm s$)

Table 3 The score of expression of HIF-1 and VEGF in different groups($\bar{x} \pm s$)

Group	n	HIF-1	VEGF
Normal conjunctiva	11	4.30 ± 0.79	4.80 ± 0.87
Pterygium	32	8.90 ± 0.86	9.90 ± 0.89
t		-12.932	-13.165
P		0.01	0.01

(Student's t test)

3 讨论

VEGF 是目前研究发现的功能最强的促新生血管生成因子,在正常结膜上皮组织中表达微弱或不表达^[5]。缺氧可以诱导 VEGF 大量表达,研究表明缺氧对 VEGF 的调控表现在以下几个方面:(1) HIF-1 α 能够启动 VEGF 的转录,表达增加,在肿瘤细胞的能量代谢、新血管生成、促进肿瘤增生和转移中起重要作用;(2) 缺氧时 VEGF mRNA 的稳定性增加;(3) HIF-1 α 可上调 VEGF 受体 Flt-1 的转录,使其大量表达,增强了 VEGF 的生物学效应^[6]。

本研究结果表明,32 例翼状胬肉中 VEGF 的阳性率为 84.8%,较正常组(18.2%)明显增加,与近期的一些研究^[7-8]结果相符,提示 VEGF 可能是通过新生血管的形成促进了翼状胬肉的发生与发展。但翼状胬肉中 VEGF 表达增加的机制尚不清楚。

HIF-1 是 1992 年由 Semenza 等^[9]在低氧的肝癌细胞株 Hep3B 的细胞核提取物中发现的一种 DNA 结合蛋白,是介导细胞对缺氧的微环境进行适应性反应的关键性转录调控因子,能激活许多缺氧反应性基因的表达。HIF-1 主要以异源二聚体的形式存在,由 α 亚基和 β 亚基组成。正常氧浓度环境下 α 亚基通过激活泛素-蛋白酶途径,作用于 HIF-1 α 氧依赖降解区域,使其迅速降解,半衰期 < 5 min,很难被检测到;而缺氧状态下 α 亚基不被降解,因而认为 HIF-1 α 是特异性氧调节亚单位,为 HIF-1 所特有,决定了 HIF-1 的活性^[10],而 HIF-1 β 是构成性表达。

HIF-1 的重要生物学作用之一是促进肿瘤血管生成。HIF-1 α 通过介导转录相关基因直接参与血管生成的全过程:(1) 血管生成启动阶段,可以通过合成 NO 使血管舒张,上调 VEGF 及配体的表达而使血管通透性增加;(2) 在进展阶段,通过上调金属蛋白水解酶而降解细胞外基质,VEGF 诱导血管内皮细胞迁徙和增生,同时在血管生成素-2 的参与下,形成结节状或锥体状血管芽;(3) 形成阶段,在 VEGF、血管生成素-1 及整合素的作用下,单个血管芽生长变形形成血管腔,

并与邻近血管芽相互吻合成血管网;(4)塑形及改造阶段,通过血小板衍生生长因子、血管生成素-1 等,使血管平滑肌或其他细胞迁移包绕新生血管,产生细胞外基质,从而形成完整的血管壁结构,其中 HIF-1 对 VEGF 的表达调控相当重要^[1-2]。VEGF 是目前已知在新生血管形成过程中最重要的刺激因子,同时也是 HIF-1 重要的靶基因,故 HIF-1 被认为是肿瘤血管生成环节中的核心调控因子^[3]。

本研究中,HIF-1 在 32 例翼状胬肉组织中的阳性表达率为 62.5%,较正常组(9.1%)明显提高,同时 VEGF 的表达也增高,结合翼状胬肉有大量新生血管这一主要特征,我们推测 HIF-1 和 VEGF 对翼状胬肉新生血管生成可能起一定的作用,从而促进翼状胬肉的发生和发展。

研究表明 HIF-1 α 是通过与 VEGF 5' 端增强因子相互作用来实现对 VEGF 的转录调节,从而诱导 VEGF 对缺氧的反应,增加血管生成,使血液到达缺氧部位^[11]。Fang 等^[12]证实,在肿瘤发生早期向血管生成型转变过程中,HIF-1 α 介导了 VEGF 的上调。本研究结果显示 HIF-1 与 VEGF 在翼状胬肉中的表达呈正相关($r=0.389, P=0.037$),提示在翼状胬肉中 HIF-1 可能参与了对 VEGF 的调控。

本研究发现翼状胬肉中 HIF-1 及 VEGF 的表达较正常组均有明显增加,提示 HIF-1 和 VEGF 可能与翼状胬肉关系密切,我们推测在翼状胬肉中,HIF-1 与 VEGF 的作用机制可能为:在翼状胬肉的起始阶段由于某种机制导致球结膜组织缺氧或随着翼状胬肉的不间断生长、体积增大,血供相对不足发生缺氧坏死,诱导 HIF-1 α 过度表达。而 HIF-1 α 能增强其下游靶基因 VEGF 的表达,从而激活了一系列的缺氧转导通路,诱导新血管的生成,从而促进翼状胬肉的发展和浸润。

本研究结果提示 HIF-1 与 VEGF 可能通过促进新生血管生长从而促进翼状胬肉的发生和发展,在翼状

胬肉中 HIF-1 可能参与了对 VEGF 的调控,本实验在一定程度上说明 HIF-1 和 VEGF 与翼状胬肉有密切的关系,两者之间的作用机制有待进一步研究。

参考文献

- 1 Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system[J]. Nat Med, 2003, 9: 677 - 684
- 2 Mazure NM, Brabimi-Horn MC, Pouyssegur J. Protein kinase and the hypoxia inducible factor-1, two switches in angiogenesis[J]. Curr Pharm Des, 2003, 9: 531 - 541
- 3 Huang LE, Gu J, Schau M, et al. Regulation of hypoxia inducible factor-1 alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin proteasome pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (14): 7987 - 7992
- 4 Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers [J]. Am J Pathol, 1996, 148: 1567 - 1576
- 5 孙京华, 张煜昭, 王慧, 等. VEGF 和 PEDF 在实验性大鼠角膜新生血管组织中的动态表达[J]. 眼科新进展, 2006, 26(8): 573 - 576
- 6 Gerber HP, Condorelli F, Park J, et al. Differential transcriptional regulation of the two vascular VEGF receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is upregulated by hypoxia [J]. J Biol Chem, 1997, 272: 23659 - 23667
- 7 Marcovich AL, Morad Y, Sandbank J, et al. Angiogenesis in pterygium: morphometric and immunohistochemical study[J]. Curr Eye Res, 2002, 25: 17 - 22
- 8 van Setten G, Aspiotis M, Blalock TD, et al. Connective tissue growth factor in pterygium: simultaneous presence with vascular endothelial growth factor possible contributing factor to conjunctival scarring [J]. Graefes' Arch Clin Exp Ophthalmol, 2003, 241: 135 - 139
- 9 Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation[J]. Mol Cell Biol, 1992, 12: 5447 - 5454
- 10 田永刚, 许军, 代文杰. 缺氧诱导因子在肿瘤生长中的作用[J]. 国外医学·外科学分册, 2005, 2(2): 133 - 136
- 11 刘诚, 唐维平. HIF-1 α 和 VEGF 与肿瘤病理的关系[J]. 实用临床医学, 2006, 7(5): 154 - 156
- 12 Fang J, Yan L, Shing Y, et al. HIF-1 alpha mediated upregulation of vascular endothelial growth factor, independent of basic fibroblast growth factor, is important in the switch to the angiogenic phenotype during early tumor genesis[J]. Cancer Res, 2001, 61(15): 5731 - 5735

(收稿:2008-04-16 修回:2008-08-22)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

本刊对中英文摘要的写作要求

论著正文前附 300 字内的中文摘要,包括目的、方法、结果、结论四要素,关键词 3~8 个;英文摘要应比中文摘要详细,300 个实词左右。英文摘要的目的部分应概括写出本研究的研究背景和目的;方法部分应写明研究对象的数目、来源、分组情况及所用的研究方法和工具;结果部分应包括研究结果的主要形态学改变、染色的具体形态和具体数据。英文摘要的方法和结果部分内容的描述应用一般过去时态。英文关键词 3~8 个,应与中文关键词一致。

综述的中英文摘要不用四要素的写法,可写成指示性文摘,亦给出中英文关键词各 3~8 个;摘要用第三人称撰写,不用“本文”、“作者”等作主语。

(本刊编辑部)