

论著·基础研究

## 分化抑制蛋白-1 基因缺失对眼底新生血管生成的抑制作用

姚怡芸<sup>1\*</sup>, 倪冬青<sup>2\*</sup>, 苏婷<sup>1</sup>, 隋爱玲<sup>1</sup>, 姚艺璇<sup>1</sup>, 朱艳吉<sup>1</sup>, 谢冰<sup>1</sup>

1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院眼科, 上海 200025; 2. 福建省厦门市陆军第 73 集团军医院质量感染控制科, 厦门 361000

**[摘要]** **目的**·研究分化抑制蛋白-1 (inhibitor of differentiation 1, ID1) 在眼底新生血管生成过程中的作用。**方法**·建立氧诱导的视网膜新生血管 (OIR)、激光光凝诱导的脉络膜新生血管 (CNV) 以及过表达血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) (*Rho-VEGF*) 转基因小鼠模型。通过免疫荧光染色和实时荧光定量 PCR 测定 OIR 小鼠模型及 *Rho-VEGF* 转基因小鼠模型视网膜内 ID1 的定位及 mRNA 含量。采用 *ID1* 基因敲除 (*ID1*<sup>-/-</sup>) 小鼠, 按上述 3 种模型诱导视网膜新生血管形成, 比较 *ID1* 基因缺失对视网膜、视网膜下及脉络膜新生血管生成面积、数量的影响, 探究 ID1 在新生血管形成过程中的作用及对相关因子如低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )、VEGF 以及血管内皮生长因子受体 1/2 (vascular endothelial growth factor receptor 1/2, VEGFR1/2) 表达的影响。**结果**·在已建立的 OIR 小鼠、*Rho-VEGF* 转基因小鼠和 CNV 小鼠这 3 种眼底新生血管模型中, 与正常对照组相比, *ID1*<sup>-/-</sup> 小鼠的眼底新生血管面积均显著减小 ( $P<0.05$ )。在 *ID1*<sup>-/-</sup> 小鼠中, HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 以及 VEGFR1 的表达皆受到抑制。**结论**·ID1 在缺氧或氧化损伤期间, 促进 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 和 VEGFR1 的表达, 从而促进眼底视网膜和脉络膜新生血管的生成。

**[关键词]** 分化抑制蛋白-1; 眼底新生血管生成; 低氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 血管内皮生长因子; 血管内皮生长因子受体 1

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.04.005 **[中图分类号]** R774.1 **[文献标志码]** A

### Effect of inhibitor of differentiation 1 deficiency on ocular neovascularization

YAO Yi-yun<sup>1\*</sup>, NI Dong-qing<sup>2\*</sup>, SU Ting<sup>1</sup>, SUI Ai-ling<sup>1</sup>, YAO Yi-xuan<sup>1</sup>, ZHU Yan-ji<sup>1</sup>, XIE Bing<sup>1</sup>

1. Department of Ophthalmology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 2. Department of Quality Control, The 73rd Group Army Hospital, Xiamen 361000, China

**[Abstract]** **Objective**·To study the effect of inhibitor of differentiation 1 (ID1) on ocular neovascularization. **Methods**·The oxygen-induced retinal neovascularization (OIR), laser-induced choroidal neovascularization (CNV) and over-expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) (*Rho-VEGF*) transgenic mice were established. The localization and mRNA level of ID1 in retina of OIR mice and *Rho-VEGF* transgenic mice were determined by immunofluorescence staining and quantitative real-time PCR. Mice deficient in *ID1* (*ID1*<sup>-/-</sup>) were used to induce retinal neovascularization in accordance with the above three models, and to compare the changes of ID1 on the number of retinal, subretinal and choroidal neovascularization areas. In order to explore the role ID1 in neovascularization, the numbers and areas of retinal, subretinal and choroidal neovascularization in the mice models with or without *ID1* deficiency were compared. Its effect on the related factors, i.e. hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), VEGF and vascular endothelial growth factor receptor 1/2 (VEGFR1/2) were also observed. **Results**·Mice deficient in *ID1* showed a significant reduction in the area of neovascularization in these three models ( $P<0.05$ ). Mice lacking *ID1* showed reduced levels of HIF-1 $\alpha$ , VEGF and VEGFR 1. **Conclusion**·ID1 promotes the expression of HIF-1 $\alpha$ , VEGF and VEGFR1 in the retina and choroidal neovascularization during hypoxia and oxidative injury.

**[Key words]** inhibitor of differentiation-1 (ID1); ocular neovascularization; hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ); vascular endothelial growth factor (VEGF); vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1)

分化抑制蛋白家族 (inhibitor of differentiation or DNA binding) 简称 ID 类蛋白, 包含 4 种 ID 蛋白, 即 ID1、ID2、ID3、ID4, 其共同特点是具有能够与碱性螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 蛋白 (如 E 盒) 结合的高度保守的 HLH 结构域<sup>[1]</sup>。在细胞的增殖、分化

以及肿瘤的生长过程中, ID 类蛋白具有非常关键的作用。缺乏 ID1、ID3 蛋白的肿瘤, 除了出现早期分化, 同时也出现预期之外的血管生成障碍<sup>[2]</sup>。自 1971 年, 有学者<sup>[3]</sup>在血管生成的研究领域提出肿瘤的生长需要并且依赖血管生成这一假说后, 通过拮抗血管内皮生长因子 (vascular

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81570853) (National Natural Science Foundation of China, 81570853)。

**[作者简介]** 姚怡芸 (1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: yunsherry@126.com。倪冬青 (1963—), 女, 副主任护师, 学士; 电子信箱: xcqxb@163.com。\* 为共同第一作者。

**[通信作者]** 谢冰, 电子信箱: brinkleybing@126.com。



endothelial growth factor, VEGF) 抑制新生血管生成, 致使肿瘤细胞缺乏氧和营养物质的理论被广泛接受; 但是, 在缺氧细胞中 ID 类蛋白的表达是否被调节, 至今未知<sup>[4]</sup>。在眼底病研究中, *Rho-VEGF* (rhodopsin promoter-VEGF) 转基因小鼠模型、氧诱导的视网膜新生血管 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 和激光光凝诱导的脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 小鼠模型等经常用来模拟年龄相关性黄斑变性、早产儿视网膜病变及眼组织胞质菌病综合征等眼部疾病中眼新生血管的生成。OIR 小鼠模型在眼科领域使用的各种动物模型中最为普遍<sup>[5]</sup>。在此模型建立的过程中, 高氧抑制正常视网膜血管的形成, 故而出现了非灌注区, 诱导分泌产生 VEGF 及其他的促血管生成因子, 导致一系列下游的级联反应, 最终视网膜产生病理性的新生血管。CNV 是来自脉络膜的病理性新生血管, 异常新生血管会突破 Bruch 膜长入视网膜下间隙, 其病理特点为血管通透性增高引起出血和渗漏, 而 CNV 模型则利用激光光凝机械性地破坏小鼠眼底导致其 Bruch 膜断裂, 模拟了年龄相关性黄斑变性的发病过程, 并且造模方法简便、快速、可靠<sup>[6-7]</sup>。*Rho-VEGF* 转基因小鼠所带的 *Rho* 启动子能诱导视网膜色素上皮细胞内的 VEGF 高表达, 导致视网膜血管从深层的毛细血管床到达视网膜下间隙, 形成视网膜下新生血管<sup>[8-10]</sup>。本文应用这 3 种眼底新生血管小鼠模型, 探究模型中 ID1 含量变化; 利用内皮细胞标志物血小板内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) 和视神经节细胞标志物 Brn3<sup>[11]</sup> 染色分析 ID1 定位; 同时, 运用 *ID1* 基因敲除 (*ID1*<sup>-/-</sup>) 小鼠, 对 ID1 在眼底新生血管生成中的作用以及相关因子如低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )、VEGF 及血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠, 购于上海灵畅生物科技有限公司, 生产许可证号为 SCXK 沪 (2013-0018), 使用许可证号为 SYXK 沪 (2011-0113)。*ID1*<sup>-/-</sup> 小鼠、*Rho-VEGF* 转基因小鼠皆以 C57BL/6 为遗传背景, 由美国 Johns Hopkins University 实验室赠送。动物饲养条件符合《实验动物管理条例》, 动物实验操作均符合上海交通大学医学院的动物伦理条例。

### 1.2 研究方法

#### 1.2.1 建立 OIR 和 CNV 小鼠模型

(1) 建立 OIR 小鼠模型 将新生 7 d (postnatal day 7, P7) 的 C57BL/6 小鼠与同窝哺乳母鼠放于密闭的箱子中喂养 5 d, 氧箱内的氧浓度为 75%, 期间保持饲料、水充足。5 d 后, 取出小鼠及母鼠放回正常氧浓度中继续喂养。

(2) 建立 CNV 小鼠模型 参照相关文献<sup>[12]</sup>在避光环境下, 将 4 ~ 6 周的雌性 C57BL/6 小鼠腹腔内注射 3.5% 水合氯醛 (1.5 ~ 2 mL)。麻醉后角膜滴 1% 托吡卡胺, 用激光对视网膜后极部 3 点、9 点、12 点位置进行光凝。激光参数设置为光斑大小 100  $\mu\text{m}$ 、能量 120 mW、持续时间 0.1 s。激光后的 Bruch 膜破裂, 若干天后促使脉络膜长出新生血管。

1.2.2 免疫荧光染色法标记 ID1、PECAM-1、HIF-1 $\alpha$  及 Brn3 将 P17 的 OIR 小鼠及其正常对照小鼠、P21 的 *Rho-VEGF* 小鼠及其正常对照小鼠、造模 2 周后的 CNV 小鼠及其正常对照小鼠用颈椎脱臼法处死, 摘出带有视神经纤维的完整眼球, 填充 OCT 包埋剂将眼球固定于方型模具中, 保存于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱。利用切片机将冰冻眼球切成 10  $\mu\text{m}$  厚度的切片, 用 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 固定 10 min, 5% 牛血清封闭 1 h。各自孵育一抗 (兔抗小鼠 ID1 多克隆抗体, Santa Cruz Biotechnology; 大鼠抗小鼠 PECAM-1 多克隆抗体, Pharmingen; 兔抗小鼠 HIF-1 $\alpha$  多克隆抗体, Novus Biologicals; 山羊抗小鼠 Brn3 多克隆抗体, Santa Cruz Biotechnology), 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。再各自室温避光孵育二抗 (Cy3 标记的驴抗兔 IgG 荧光二抗, 1:800, Jackson 实验室; FITC 标记的驴抗大鼠及驴抗山羊 IgG 荧光二抗, 1:500, Biosource International) 1 h, 用 DAPI 细胞核染色液 (1:50, 碧云天) 在室温避光下孵育 5 min。在孵育、染色的过程中均用 PBST 即含有 0.25% 聚乙二醇辛基苯基醚 100 (Triton X-100) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤。最后, 滴上抗荧光淬灭剂, 盖玻片封片后于荧光显微镜下观察。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 测定视网膜中各因子的 mRNA 表达 将 P15 的 OIR、*Rho-VEGF* 小鼠与正常对照小鼠, 以及 *ID1*<sup>-/-</sup> 与 *ID1*<sup>+/+</sup> 小鼠处死, 无菌剥离出视网膜, 用 TRIzol (Molecular Research Center) 及相关试剂提纯视网膜中的总 RNA。冰上测量 RNA 相关浓度及纯度后, 通过 RNA 反转录试剂盒 (Promega) 将 RNA 反转录为 cDNA, 利用 PCR 仪 (Roche Applied Bioscience) 进行实时荧光定量 PCR。*ID1* 上游引物为 5'-TACGACATGAACGGCTGCTA-3', 下游引物为 5'-GTGGTCCCCGACTTCAGACTC-3'; *VEGF*<sub>164</sub> 上游引物

为 5'-CAGGCTGCTGTAACGATGAA-3', 下游引物为 5'-AATGCTTTCTCCGCTCAGAA-3'; *VEGFR1* 上游引物为 5'-GAGCTAAAAATCTTGACCCACATTG-3', 下游引物为 5'-CAGTATTCAACAATCACCATCAGAG-3'; *VEGFR2* 上游引物为 5'-CACCTGCCAGGCCTGCAA-3', 下游引物为 5'-GCTTGGTGACGGCGCCTA-3'; *HIF-1 $\alpha$*  上游引物为 5'-CCACAGGACAGTACAGGATG-3', 下游引物为 5'-TCAAGTCGTGCTGAATAATACC-3'; 亲环蛋白 A (cyclophilin A) 上游引物为 5'-CAGACGCCACTGTCGCTTT-3', 下游引物为 5'-TGTCTTTGGAACCTTGTCTGCAA-3'。根据 PCR 获得的熔解曲线和扩增曲线, 分析结果的可靠性后输出 Ct 值, 以 cyclophilin A 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算各因子相对表达水平。

**1.2.4 Western blotting 检测 HIF-1 $\alpha$  表达** 将通过 OIR 造模后的 P13 *IDI<sup>-/-</sup>* 与 *IDI<sup>+/+</sup>* 小鼠处死, 剥离出干净视网膜, 置入预冷且含有 10 mmol/L Tris、0.5% Triton X-100、50 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、proteinase cocktail 的裂解液 (pH 值 7.2) 中。视网膜置于冰上, 4  $^{\circ}\text{C}$  超声波下粉碎 4 s。测定蛋白浓度, 对蛋白浓度进行定量并制成上样样品。将变性后的蛋白样品加于已凝固的 10% 浓度的 SDS-PAGE 凝胶中, 电泳完毕后将凝胶中的样品转到 PVDF 膜上, 用含有 0.01% Tween-20 的 TBST 配制 5% 的脱脂奶粉中浸泡 1 h, 封闭非特异性抗原。4  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育兔抗小鼠 HIF-1 $\alpha$  抗体 (1:1 000, Novus Biologicals), 用 TBST 液漂洗 3 次后, 孵育于 HRP 标记的山羊抗兔抗体 (1:5 000, Amersham-Pharmacia Biotech) 1 h 后, 漂洗、曝光、显影。

**1.2.5 OIR 小鼠 PECAM-1 染色及视网膜新生血管观察** *IDI<sup>-/-</sup>*、*IDI<sup>+/+</sup>* 及 *IDI<sup>+/+</sup>* 小鼠通过 OIR 造模后, 利用 PECAM-1 对视网膜表面的新生血管进行特异性染色。在体式显微镜下, 使用 Harvard 微量注射器向 P17 小鼠玻璃体腔内注射 1  $\mu\text{L}$  的抗 PECAM-1 抗体 (Pharmingen)。12 h 后用颈椎脱臼法处死小鼠, 完整摘出眼球后, 角膜上剪一小口, 浸泡于 4% 多聚甲醛中固定 90 min, 剥离出完整视网膜并漂洗, 避光孵育二抗 (Alexa 488 标记的荧光二抗 IgG, 1:500, Invitrogen) 40 min 后再次漂洗, 并将视网膜展开、平铺于载玻片上。荧光显微镜下观察、拍照, 用 Image Pro Plus 软件比较不同组别的小鼠视网膜新生血管的面积。

**1.2.6 CNV 小鼠心脏灌注及 CNV 观察** 对 4 ~ 6 周的 *IDI<sup>-/-</sup>*、*IDI<sup>+/+</sup>* 及 *IDI<sup>+/+</sup>* 小鼠建立激光光凝 CNV 模型 2 周后, 将麻醉后小鼠剪开前胸皮肤, 暴露心脏。将质量浓度为 50 mg/mL 的葡聚糖荧光素钠 (Sigma-Aldrich) 用 1 mL 针筒缓慢注射进小鼠左心室中, 待观察到小鼠眼球微微发黄后处死小鼠。取出小鼠眼球, 避光环境下完整剥离出脉络膜, 将脉络膜展开, 平铺于载玻片上。荧光显微镜下观察激光斑导致的 CNV, Image Pro Plus 软件分析比较每块 CNV 大小并进行统计分析。

**1.2.7 建立与 *IDI<sup>-/-</sup>* 或 *IDI<sup>+/+</sup>* 小鼠杂交的 *Rho-VEGF* 转基因小鼠及视网膜观察** 将 *IDI<sup>-/-</sup>* 小鼠与 *Rho-VEGF* 转基因小鼠杂交, 其携带 *Rho-VEGF* 基因的 *IDI<sup>-/-</sup>* 后代再与 *IDI<sup>-/-</sup>* 小鼠杂交得到携带 *Rho-VEGF* 基因的 *IDI<sup>-/-</sup>* 后代。在 P21 时用 3.5% 水合氯醛麻醉具有 *Rho-VEGF* 基因的 *IDI<sup>-/-</sup>* 小鼠和 *IDI<sup>+/+</sup>* 小鼠, 以及正常对照组, 剪开其前胸皮肤后暴露心脏, 用质量浓度为 50 mg/mL 的荧光素钠对小鼠进行心脏灌注, 待观察到小鼠眼球微微发黄后处死小鼠并取出小鼠眼球, 避光环境下剥离出完整视网膜并平铺于载玻片上。荧光显微镜下观察视网膜下新生血管并拍照, Image Pro Plus 软件分析比较视网膜下新生血管芽的数目和新生血管的总面积, 并进行统计分析。

## 1.3 统计学分析

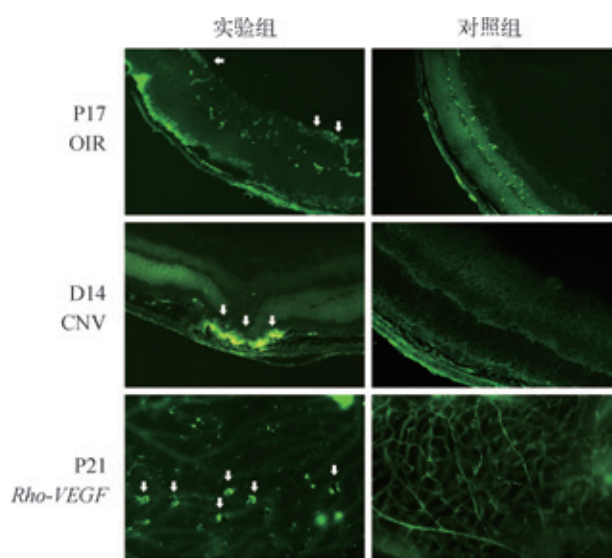
采用 SAS 9.0 统计软件分析数据, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 2 组之间比较采用 Student's *t* 检验, 多组之间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功建立 3 种眼底新生血管小鼠模型

在正常对照组 P17 小鼠的视网膜中, 标记新生血管的 PECAM-1 仅少量存在于视网膜中层, 为视网膜结构血管染色。在 P17 的 OIR 小鼠视网膜内层则出现大量 PECAM-1 标记的视网膜新生血管。与同龄正常小鼠相比, 在造模 2 周后的 CNV 小鼠模型中, 可见激光斑诱导的 PECAM-1 标记的脉络膜新生血管。与 P21 正常小鼠相比, P21 的 *Rho-VEGF* 转基因小鼠可见较多视网膜下新生血管。以上结果证明这 3 种模型建立成功且有效 (图 1)。





注: 箭头所示为 3 种小鼠模型中的眼底新生血管。

图 1 OIR、CNV 和 *Rho-VEGF* 小鼠以 PECAM-1 标记的眼底新生血管的观察 ( $\times 20$ )

Fig 1 Observation of ocular neovascularization of OIR, CNV and *Rho-VEGF* mice by PECAM-1 ( $\times 20$ )

## 2.2 OIR 小鼠模型中观察 ID1、HIF-1 $\alpha$ 与 PECAM-1、Brn3 染色

在 P17 正常对照小鼠的视网膜中, ID1 贯穿视网膜内层, 与 PECAM-1 标记的少量结构血管染色有关, 但叠加后发现 ID1 并不与内皮细胞共染。在 P17 的 OIR 小鼠视

网膜内层发现 ID1 阳性染色增多, 但同样不与 PECAM-1 共染。若 P17 的 OIR 小鼠眼球的冰冻切片不孵育 ID1 一抗, 只进行二抗染色, 则无法观察到 ID1 阳性染色, 而相同位置的切片仍可观察到大量 PECAM-1 染色。通过视神经节细胞标志物 Brn3 染色后, 可以观察到在正常对照小鼠视网膜中, ID1 与视神经节细胞存在共定位。在 P17 的正常对照小鼠的视网膜内层, HIF-1 $\alpha$  染色极少, 但与 PECAM-1 少量阳性染色无密切关系。但在 P17 的 OIR 小鼠视网膜表面及内层, HIF-1 $\alpha$  阳性染色区域较正常对照组增多, 但叠加后发现其与 PECAM-1 所染的内皮细胞并不共染。当不孵育 HIF-1 $\alpha$  一抗, 只进行二抗染色, 则无法观察到 HIF-1 $\alpha$  阳性染色, 而相同位置的切片仍可观察到大量 PECAM-1 染色代表的新生血管 (图 2)。

## 2.3 *Rho-VEGF* 转基因小鼠模型中观察 ID1 与 PECAM-1 染色

*Rho-VEGF* 转基因小鼠在 P21 时, 由于 VEGF 增多而在视网膜下隙形成大量的新生血管。P21 的 *Rho-VEGF* 小鼠的视网膜荧光染色结果显示, 视网膜内丛状层的 ID1 阳性染色增多, 但与 PECAM-1 无共染。在 P21 的 *Rho-VEGF* 小鼠的视网膜中, HIF-1 $\alpha$  的荧光染色贯穿整个视网膜, 但主要存在于视网膜内层 (图 2)。

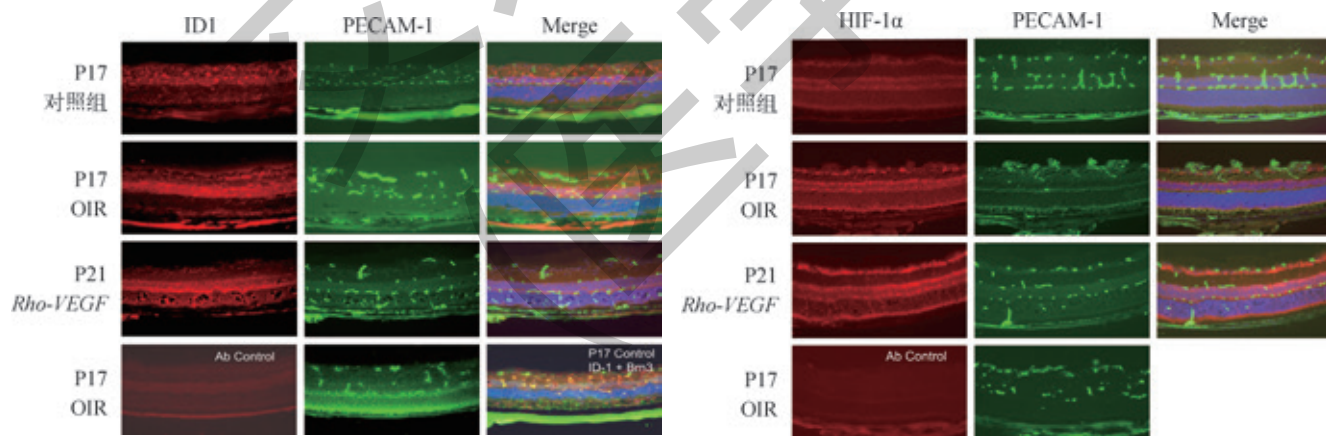


图 2 OIR、*Rho-VEGF* 小鼠中视网膜免疫荧光标记 ID1、PECAM-1、HIF-1 $\alpha$  和 Brn3 ( $\times 20$ )

Fig 2 Immunofluorescent staining for ID1, PECAM-1, HIF-1 $\alpha$  and Brn3 in OIR and *Rho-VEGF* mice retina ( $\times 20$ )

## 2.4 OIR 和 *Rho-VEGF* 小鼠模型中观察视网膜的 ID1 mRNA 表达

与 P15 的正常对照组小鼠比较, OIR 小鼠和 *Rho-VEGF*

转基因小鼠的视网膜中 ID1 mRNA 含量均明显增高 ( $P=0.046$ ,  $P=0.002$ ) (图 3)。



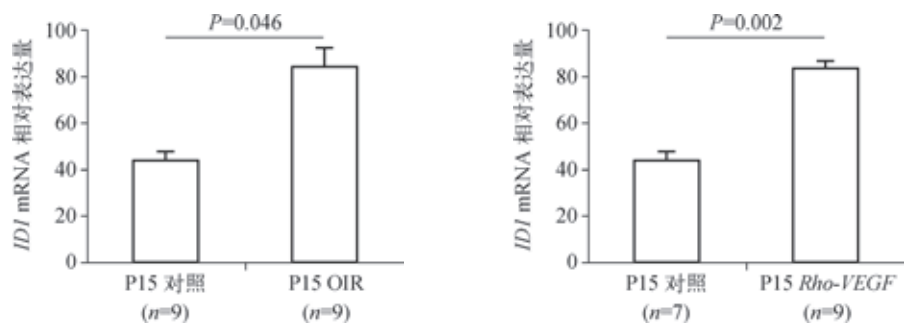
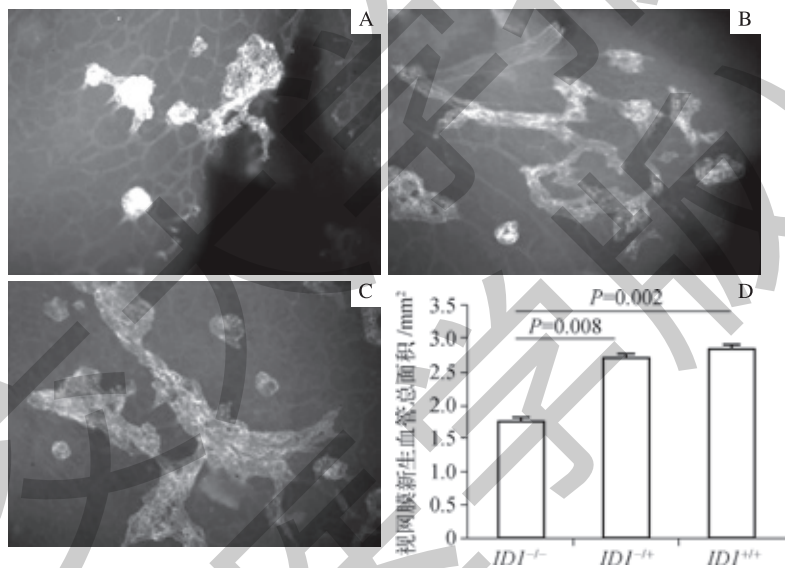


图3 OIR和Rho-VEGF小鼠的视网膜内ID1 mRNA含量比较  
Fig 3 Comparison of ID1 mRNA in retina of OIR and Rho-VEGF mice

2.5 OIR小鼠模型中观察ID1<sup>-/-</sup>小鼠的视网膜新生血管变化

在OIR模型中,与ID1<sup>+/-</sup>及ID1<sup>+/+</sup>小鼠相比,ID1<sup>-/-</sup>

小鼠的视网膜新生血管面积显著减小,差异具有统计学意义(P=0.008,P=0.002)(图4)。

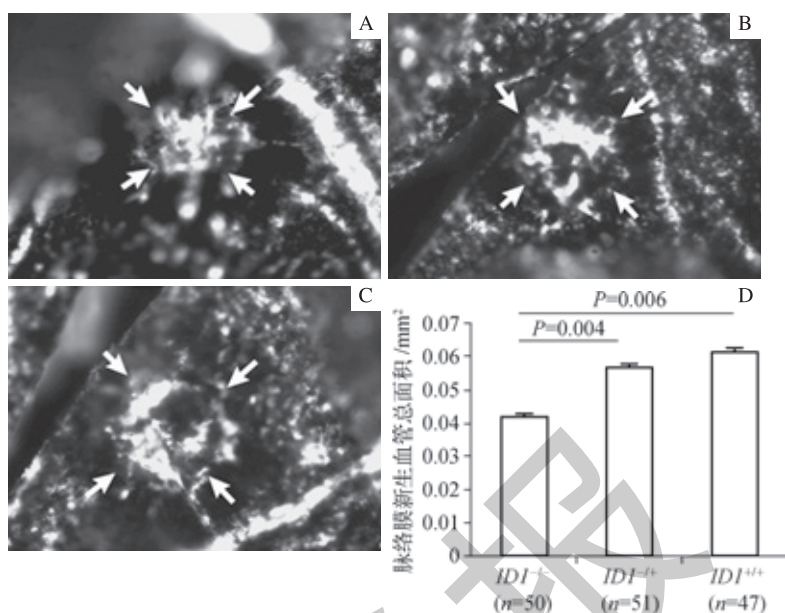


注: A、B、C分别为ID1<sup>-/-</sup>、ID1<sup>+/-</sup>、ID1<sup>+/+</sup>小鼠通过OIR造模后于P17玻璃体腔内注射PECAM-1抗体及其荧光二抗后的视网膜新生血管观察(×20);D为组间比较结果(n=12)。  
图4 OIR小鼠缺失ID1基因后视网膜新生血管面积比较  
Fig 4 Comparison of retinal neovascularization area in OIR mice deficient in ID1

2.6 CNV小鼠模型中观察ID1<sup>-/-</sup>小鼠脉络膜新生血管变化

CNV小鼠模型中,与ID1<sup>+/-</sup>小鼠和ID1<sup>+/+</sup>小鼠相

比,ID1<sup>-/-</sup>小鼠由激光斑诱导形成的脉络膜新生血管面积明显减小,差异具有统计学意义(P=0.040,P=0.006)(图5)。



注: A、B、C 分别为  $ID1^{-/-}$ 、 $ID1^{+/-}$ 、 $ID1^{+/+}$  小鼠通过 CNV 造模, 于 2 周后心脏灌注荧光素钠后的脉络膜新生血管观察 ( $\times 20$ ); D 为组间比较结果。箭头所示为脉络膜新生血管。

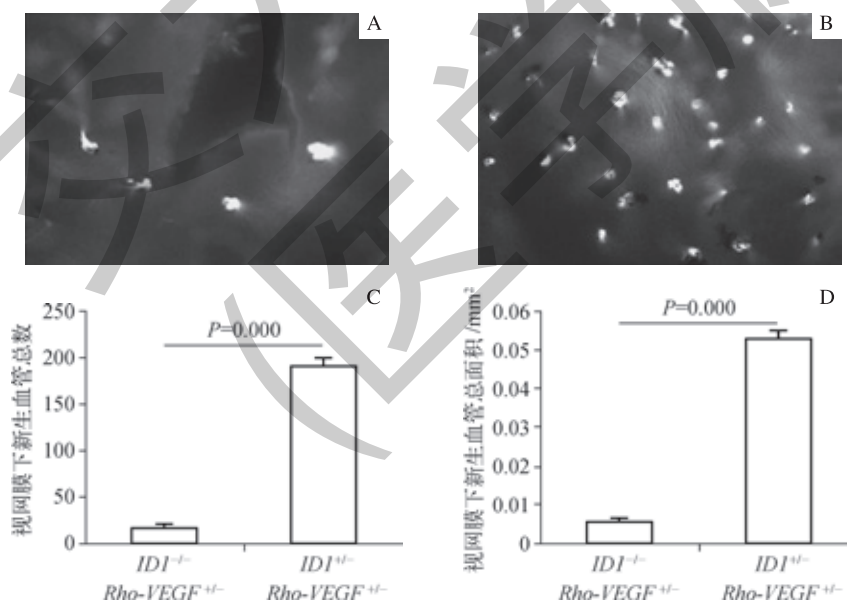
图 5 CNV 小鼠缺失  $ID1$  基因后脉络膜新生血管面积比较

Fig 5 Comparison of choroidal neovascularization area in CNV mice deficient in  $ID1$

## 2.7 $Rho$ - $VEGF$ 小鼠模型中观察 $ID1^{-/-}$ 小鼠的视网膜下新生血管变化

与单纯  $Rho$ - $VEGF$  小鼠相比, 携带  $ID1^{-/-}$  的  $Rho$ - $VEGF$

小鼠视网膜下新生血管芽数量明显减少 ( $P=0.000$ ), 新生血管面积明显减小 ( $P=0.000$ ) (图 6)。



注: A、B 分别为带有  $Rho$ - $VEGF$  基因的  $ID1^{-/-}$  或  $ID1^{+/+}$  小鼠心脏灌注荧光素钠后的视网膜下新生血管观察 ( $\times 20$ ); C、D 为组间比较结果 ( $n=12$ )。

图 6  $Rho$ - $VEGF$  小鼠缺失  $ID1$  基因后视网膜下新生血管面积比较

Fig 6 Comparison of sub-retinal neovascularization area in  $Rho$ - $VEGF$  mice deficient in  $ID1$

## 2.8 OIR 小鼠 $ID1$ 基因缺失对 $VEGF_{164}$ 和 $VEGFR1$ 的 mRNA 表达的影响

OIR 小鼠 P15 时, 将 cyclophilin A 作为内参, 荧光实时定量 PCR 检测  $ID1^{+/+}$  及  $ID1^{-/-}$  小鼠视网膜中  $VEGF_{164}$ 、

$VEGFR1$ 、 $VEGFR2$  的 mRNA 表达水平。结果显示: 与  $ID1^{+/+}$  组小鼠相比,  $ID1^{-/-}$  组小鼠视网膜中  $VEGF_{164}$ 、 $VEGFR1$  的 mRNA 表达水平下降 ( $P=0.018$ ,  $P=0.011$ ), 但  $VEGFR2$  的 mRNA 表达水平并没有明显变化 ( $P=0.320$ ) (图 7)。

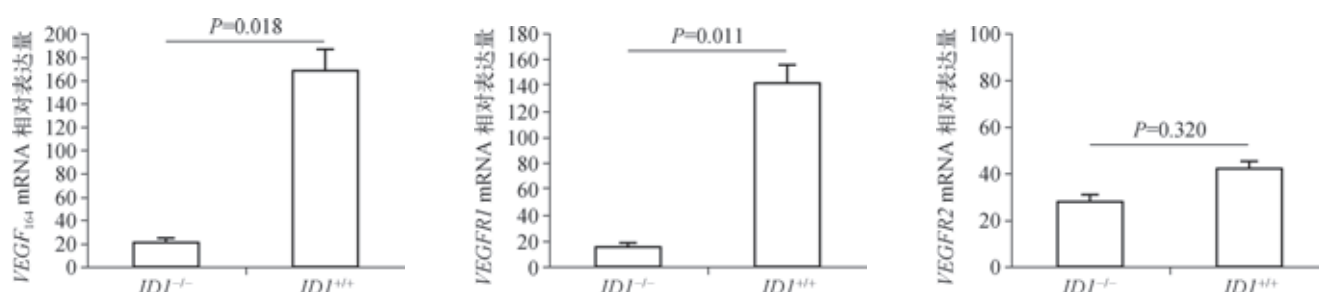


图7 OIR小鼠缺失ID1基因后视网膜内VEGF<sub>164</sub>、VEGFR1、VEGFR2的mRNA含量比较(n=8)

Fig 7 Comparison of mRNA of VEGF<sub>164</sub>, VEGFR1 and VEGFR2 in retina of OIR mice deficient in ID1 (n=8)

## 2.9 OIR小鼠ID1基因缺失对HIF-1α表达的影响

为了验证ID1<sup>-/-</sup>小鼠是否由于缺乏ID1而无法在缺氧环境的诱导下形成视网膜新生血管,分别检测了OIR造模组中ID1<sup>+/+</sup>及ID1<sup>-/-</sup>小鼠的ID1 mRNA表达情况。同时,采用荧光实时定量PCR及Western blotting测定视网膜组织内HIF-1α的mRNA及蛋白表达情况。结果显示:在OIR小鼠模型中,ID1<sup>+/+</sup>和ID1<sup>-/-</sup>两组小鼠的HIF-1α mRNA表达差异无统计学意义(P=0.140);但在蛋白表达水平,ID1<sup>+/+</sup>组小鼠中HIF-1α表达量高于ID1<sup>-/-</sup>组小鼠(P=0.020)(图8)。

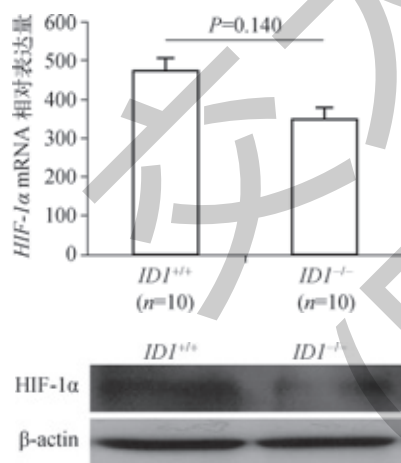


图8 OIR小鼠缺失ID1基因后视网膜内HIF-1α的mRNA和蛋白含量比较

Fig 8 Comparison of HIF-1α mRNA and protein level in retina of OIR mice deficient in ID1

## 3 讨论

血管生成,即从既有血管发展而形成新的血管,在胚胎发育、组织再生以及一些病理过程(如伤口愈合、糖尿病视网膜病变、黄斑变性、风湿性关节炎和银屑病等)中发挥重要作用<sup>[13]</sup>。需特别指出的是,几乎所有的实质性肿瘤皆由新生血管提供氧和营养物质,这对肿瘤的生长

及侵袭是必不可少<sup>[14-16]</sup>。在本研究中,我们证实了在OIR模型中视网膜的ID1表达量增加,并且这种增加可能与VEGF刺激有关。因此,我们利用Rho-VEGF转基因小鼠即VEGF过表达的小鼠,观察到视网膜中ID1的表达量同样也显著增加。PECAM-1和Brn3常用于标记视网膜的新生血管<sup>[17]</sup>和视神经节细胞。PECAM-1是内皮细胞的标志物之一,临床上常用来评估肿瘤新生血管。在正常小鼠和OIR小鼠模型中均可观察到PECAM-1染色,但两者意义有所不同。正常小鼠的PECAM-1染色位于视网膜中外层,代表视网膜结构血管;而OIR模型中PECAM-1染色位于视网膜内层,代表视网膜病理性的新生血管。在OIR模型中,位于视网膜内层的ID1阳性荧光染色增多;在正常对照组视网膜中,ID1与神经节细胞中有阳性染色共染,但与内皮细胞共染极少,表明ID1的分泌可能来源于神经节细胞而非内皮细胞。可观察到Rho-VEGF转基因小鼠视网膜内丛状层ID1阳性染色增加,但与PECAM-1染色无共染。这个结果表明,尽管VEGF过表达后能上调ID1的表达,但VEGF并不是促进ID1分泌的特异或直接原因。

本研究证实将小鼠的ID1基因敲除后,通过氧诱导和VEGF刺激产生的视网膜新生血管显著变少,这提示我们ID1基因的上调可能是促进视网膜血管生成过程的一个重要部分。而且,在ID1<sup>-/-</sup>小鼠的激光光凝诱导脉络膜新生血管模型中,其新生血管面积也明显减少,可推测ID1在脉络膜新生血管形成过程中也起到促进作用。通过对ID1<sup>-/-</sup>小鼠VEGF及相关受体含量的检测,推测ID1是放大循环回路中的一部分,因为VEGF可增加ID1的表达,而ID1也可能促进VEGF及VEGFR1的表达。

目前,对于视网膜中何种细胞特异性分泌HIF-1α并无报道<sup>[18]</sup>。但根据OIR模型中视网膜内层HIF-1α染色增加这一结果,可能说明了大部分的血管新生或增殖发生在视网膜内层。而且,在OIR小鼠模型中,ID1<sup>-/-</sup>小鼠相较于ID1<sup>+/+</sup>小鼠,HIF-1α的mRNA表达差异无统计学意义;



但在蛋白表达水平,  $ID1^{+/+}$  小鼠 HIF-1 $\alpha$  表达高于  $ID1^{-/-}$  小鼠。因此, 可以推测,  $ID1^{-/-}$  小鼠的眼底新生血管生成减少的原因可能是其 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达量不够, 而与 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达量无较大关系。

本研究证实, 在 OIR 模型中视网膜内 ID1 的表达增加, 且可能是受 VEGF 的促进作用影响, 并且通过 3 种眼部新生血管小鼠模型证实了  $ID1$  基因缺失会抑制眼部新生血管。近期, 更多的实验证据支持  $ID1$  发挥类似癌基因的作用, 通过激活各种促生长通路如 MAPK<sup>[19]</sup> 或 PI3K/Akt<sup>[20]</sup>

的活性, 抑制抑癌通路如 p16 (INK4a)/pRB<sup>[21]</sup> 的活性, 以促进肿瘤血管的生长。研究者发现  $ID1$  基因缺失会抑制尼古丁及表皮生长因子 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 诱导的非小细胞肺癌细胞的增殖和迁移<sup>[22]</sup>, 以及内皮细胞导致的新生血管生成过程中 ID1 蛋白尤其重要<sup>[23]</sup>, ID1 会促进内皮细胞中  $\beta 1$  整合素的表达, 进而促进细胞迁移和管形成能力。因此, ID1 在血管新生中的作用及其相关机制将受到更多的关注, 对肿瘤医学及血管新生相关疾病的探究有着重要意义。

### 参 · 考 · 文 · 献

- [1] Benezra R, Davis RL, Lockshon D, et al. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins[J]. Cell, 1990, 61(1): 49-59.
- [2] Benezra R, Rafii S, Lyden D. The Id proteins and angiogenesis[J]. Oncogene, 2001, 20(58): 8334-8341.
- [3] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [4] Nemetski SM, Gardner LB. Hypoxic regulation of Id-1 and activation of the unfolded protein response are aberrant in neuroblastoma[J]. J Biol Chem, 2007, 282(1): 240-248.
- [5] Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(1): 101-111.
- [6] Grossniklaus HE, Kang SJ, Berglin L, et al. Animal models of choroidal and retinal neovascularization[J]. Prog Retin Eye Res, 2010, 29(6): 500-519.
- [7] Campochiaro PA. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases[J]. Prog Retin Eye Res, 2015, 49: 67-81.
- [8] Okamoto N, Tobe T, Hackett SF, et al. Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization[J]. Am J Pathol, 1997, 151(1): 281-291.
- [9] Liu CH, Wang Z, Sun Y, et al. Animal models of ocular angiogenesis: from development to pathologies[J]. FASEB J, 2017, 31(11): 4665-4681.
- [10] Kwak N, Okamoto N, Wood JM, et al. VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(10): 3158-3164.
- [11] Pan L, Yang Z, Feng L, et al. Functional equivalence of Brn3 POU-domain transcription factors in mouse retinal neurogenesis[J]. Development, 2005, 132(4): 703-712.
- [12] Zhu Y, Lu Q, Shen J, et al. Improvement and optimization of standards for a preclinical animal test model of laser induced choroidal neovascularization[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94743.
- [13] Farnsworth RH, Lackmann M, Achen MG, et al. Vascular remodeling in cancer[J]. Oncogene, 2014, 33(27): 3496-3505.
- [14] Mander KA, Finnie JW. Tumour angiogenesis, anti-angiogenic therapy and chemotherapeutic resistance[J]. Aust Vet J, 2018, 96(10): 371-378.
- [15] Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets[J]. Angiogenesis, 2017, 20(4): 409-426.
- [16] Moriya J, Minamino T. Angiogenesis, cancer, and vascular aging[J]. Front Cardiovasc Med, 2017, 24: 65.
- [17] Shen J, Xie B, Dong A, et al. *In vivo* immunostaining demonstrates macrophages associate with growing and regressing vessels[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(9): 4335-4341.
- [18] 李才锐, 胥延, 姜德咏, 等. 早期糖尿病 NOD 小鼠视网膜 HIF-1 的表达[J]. 眼科学报, 2006, 22(2): 107-111.
- [19] Ling MT, Wang X, Ouyang XS, et al. Activation of MAPK signaling pathway is essential for Id-1 induced serum independent prostate cancer cell growth[J]. Oncogene, 2002, 21(55): 8498-8505.
- [20] Su Y, Gao L, Teng L, et al. Id1 enhances human ovarian cancer endothelial progenitor cell angiogenesis via PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B/MMP-2 signaling pathways[J]. J Transl Med, 2013, 11: 132.
- [21] Ouyang XS, Wang X, Ling MT, et al. Id-1 stimulates serum independent prostate cancer cell proliferation through inactivation of p16(INK4a)/pRB pathway[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(5): 721-725.
- [22] Pillai S, Rizwani W, et al. ID1 facilitates the growth and metastasis of non-small cell lung cancer in response to nicotinic acetylcholine receptor and epidermal growth factor receptor signaling[J]. Mol Cell Biol, 2011, 31(14): 3052-3067.
- [23] Qiu J, Wang G, Hu J, et al. Id1-induced inhibition of p53 facilitates endothelial cell migration and tube formation by regulating the expression of beta1-integrin[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 357(1-2): 125-133.

[收稿日期] 2018-12-18

[本文编辑] 吴 洋