

· 实验研究 ·

DNA 损伤标志物 γ H2AX 在氧诱导视网膜新生血管形成中的作用

李若琳 陈楠 孟丽丽 朱虹

250355 济南大学医学与生命科学学院 山东省医学科学院 山东省眼科研究所(李若琳);
266071 青岛,山东省医学科学院 山东省眼科研究所 山东省眼科学重点实验室-省部共建
国家重点实验室培育基地(陈楠、孟丽丽、朱虹)

通信作者:陈楠,Email:chennandongdong@126.com

DOI:10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2017.10.005

【摘要】 背景 氧浓度变化诱导产生视网膜新生血管,并导致细胞 DNA 损伤反应。以往认为促血管生成因子过度表达是血管新生的原因,但 DNA 损伤是否与视网膜新生血管有关尚不清楚。**目的** 探讨参与 DNA 损伤修复的磷酸化蛋白 γ H2AX 与小鼠视网膜血管新生的关系。**方法** 应用 72 只 17 日龄 C57BL/6J 小鼠按照随机数字表法随机分为正常对照组、氧诱导视网膜病变(OIR)模型组、OIR 阳性对照组和 OIR 阴性对照组,每组 18 只。视网膜铺片免疫荧光法对比观察视网膜新生血管形态学变化及 γ H2AX 表达情况。将人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)分为正常对照组、低氧模型对照组、阳性干扰组和阴性干扰组。细胞处理后 12 h,采用免疫荧光法比较并分析各组 γ H2AX 的表达情况,采用 Western blot 法定量检测各组 γ H2AX 的表达。**结果** 正常对照组、OIR 模型组、OIR 阳性对照组和 OIR 阴性对照组 17 日龄小鼠视网膜新生血管面积和无灌注区面积比较,总体差异均有统计学意义($F=437.62, 93.05$, 均 $P<0.01$),其中 OIR 模型组和 OIR 阴性对照组小鼠视网膜新生血管面积和无灌注区面积均较正常对照组明显增大;OIR 阳性对照组小鼠视网膜新生血管面积和无灌注区面积均较 OIR 模型组和 OIR 阴性对照组明显减小,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。17 日龄小鼠视网膜 γ H2AX 焦点团聚集出现情况与新生血管和无灌注区面积大小变化趋势相一致。正常对照组、低氧模型对照组、阳性干扰组和阴性干扰组 HUVECs 中 γ H2AX 焦点阳性细胞百分数比较,差异有统计学意义($F=64.97, P<0.01$),其中低氧模型对照组和阴性干扰组 γ H2AX 焦点阳性细胞百分数均较正常对照组明显增大,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);阳性干扰组均较低氧模型对照组和阴性干扰组明显减小,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。各组 HUVECs 间 γ H2AX 的表达量与免疫荧光趋势相一致。**结论** 缺氧环境下, γ H2AX 在小鼠视网膜血管和体外培养的 HUVECs 中均大量表达。 γ H2AX 的表达与视网膜血管新生有关。低氧诱导的 DNA 损伤修复反应可能与视网膜血管新生有一定关系。

【关键词】 视网膜; 新生血管; 人脐静脉血管内皮细胞; γ H2AX**基金项目:** 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目 (BS2010YY064)**Effect of DNA damage marker γ H2AX in the process of oxygen-induced retinal neovascularization** Li

Ruolin, Chen Nan, Meng Lili, Zhu Hong

Shandong Eye Institute, School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250355, China (Li RL); Shandong Academy of Medical Sciences, Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, China (Chen N, Meng LL, Zhu H)

Corresponding author: Chen Nan, Email: chennandongdong@126.com

[Abstract] Background Changes in the concentration of oxygen induced retinal neovascularization and DNA damage repair response. Overexpression of angiogenic factors is the main reason of angiogenesis. Whether the DNA damage related to retinal neovascularization is unclear. **Objective** This study was to study the role of DNA damage marker γ H2AX in the process of retinal neovascularization of mouse. **Methods** Seventy-two 17-day-old C57BL/6J mice were randomly classified into normal control group, oxygen induced retinopathy (OIR) model group, OIR positive control group and OIR negative control group, 18 for each group. The retinal tissue were obtained from

the 4 groups, the retinal patch immunofluorescence was used to observe and compare the area of retinal neovascularization and non-perfusion region and γ H2AX expression of the four groups. The human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were classified into normal control group, hypoxia model control group, positive interference group and negative interference group. The cells from the 4 groups were obtained 12 hours after treatment, the expression of the γ H2AX from different HUVECs groups were compared by immunofluorescence. Western blot was performed to detect the expressions of the γ H2AX from different HUVECs groups. **Results** The retinal patch immunofluorescence showed that the OIR model was successfully established. The area of retinal neovascularization and the area of non-perfusion region among the 4 groups had statistical significances ($F=437.62, 93.05$, both at $P<0.01$). The area of retinal neovascularization and non-perfusion region in OIR model group and OIR negative control group was larger than that in the normal control group. The non-perfusion region was smaller in the OIR positive control group than that in the OIR model group and OIR negative control group (both at $P<0.01$). The appearance of the retinal γ H2AX focus congestion was consistent with the area of neovascularization and non-perfusion in the 17-day-old mouse. The difference of γ H2AX positive percentage in the four groups of HUVECs was statistically significant ($F=64.97, P<0.01$). The percentages of γ H2AX positive cells in the hypoxia model control group and negative interference group were significantly higher than that in the normal control group (both at $P<0.01$). The percentage of γ H2AX positive cells in the positive interference group was lower than that in the hypoxia model control group and negative interference group (both at $P<0.01$). **Conclusions** γ H2AX is abundant in OIR neovascularization. Inhibiting the formation of γ H2AX may reduce the OIR neovascularization.

[Key words] Retina; Neovascularization; Human umbilical vein endothelial cells; γ H2AX

Fund program: Shandong Province Research Award Foundation to Outstanding Young Scientist (BS2010YY064)

视网膜新生血管性疾病存在共同的病理基础,即视网膜血管闭塞和组织缺氧。视网膜含有大量的多不饱和脂肪酸,而且摄氧量高于其他组织,使得视网膜对于氧化应激更加敏感。促血管新生因子的高表达是促进视网膜新生血管形成的重要原因之一^[1-2]。组织缺氧时,低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)表达增加,并上调多种促血管新生因子,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) A、血管紧张素 I、纤溶酶原激活物抑制物 1 等的表达,从而刺激新生血管生成。低氧同时能够诱导组织 DNA 损伤修复反应^[3-5]。低氧和再氧合作用会刺激组织产生大量活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS), ROS 可以直接攻击生物大分子 DNA/RNA 进而诱发 DNA/RNA 损伤应激反应,如 DNA 双链断裂^[6]。在 DNA 损伤修复反应早期,组蛋白 2A 变体 H2AX 快速磷酸化并生成 γ H2AX^[7-8],并标记损伤的 DNA 双链,促进局部 DNA 修复因子和染色体重塑因子的募集,从而维持基因组的稳定性^[9-11]。低氧诱导的 DNA 损伤修复反应和血管新生之间是否有关联,目前尚不十分清楚。研究发现, γ H2AX 参与了肿瘤的血管新生^[11]。 γ H2AX 是否与视网膜的血管新生有关尚不清楚。本实验观察 γ H2AX 在低氧模型动物以及体外培养细胞中的表达,同时观察其与视网膜新生血管形成有无关联。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和细胞 清洁级健康成年 C57BL/6J 小鼠(北京维通利华公司)饲养于山东省眼科研究所动物实验中心。人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)取自山东省眼科研究所眼科重点实验室细胞保藏中心。本研究经山东省眼科研究所伦理委员会审核批准,实验动物的使用遵循 ARVO 关于实验动物使用的规定。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM/F12 培养液、胎牛血清、羊抗鼠 GAPDH 抗体(美国 Invitrogen 公司);咖啡因、CoCl₂(美国 Sigma-Aldrich 公司);Isolectin B4 抗体(1:150)(美国 Vector 公司);抗 γ H2AX 抗体(1:100, ab26350)(英国 Abcam 公司);TRITC 标记山羊抗小鼠二抗(1:150, FL-1201)(北京中杉金桥生物技术有限公司);辣根过氧化物(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗小鼠二抗、ECL 发光试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司)。BX60 荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 氧诱导视网膜病变模型的建立 健康清洁级成年 C57BL/6J 小鼠按雌雄 1:1 合笼。参照文献[12]的方法取成年小鼠所生的幼鼠构建氧诱导视网膜病变

(oxygen induced retinopathy, OIR) 动物模型。将出生第 7 天的幼鼠与哺乳母鼠一起置于同一氧体积分数为 $(75 \pm 2)\%$ 的密闭氧箱中饲养 5 d, 然后取出小鼠至标准环境下饲养。若出氧箱后幼鼠视网膜后极部血管消退, 随后周边新生血管出现并逐渐向后极部生长, 则认为建模成功。

1.2.2 药物配制 将 5 mmol 咖啡因溶解于 50 ml 的双蒸水中, 配制成浓度为 100 mmol/L 的贮存液, 并将其置于 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 的滤过滤器中过滤及除菌, 然后置于 -20°C 冰箱内保存备用, 临用前采用双蒸水稀释至 10 mmol/L。

1.2.3 实验动物和细胞分组 取出生后在正常氧体积分数及室内标准环境下饲养的 18 只小鼠作为正常对照组, 取造模成功的 54 只幼鼠按照随机数字表法分为 3 个组, 每组 18 只, 其中 OIR 模型组幼鼠眼部不给予任何干预, 阳性对照组幼鼠在出氧箱后 6 h 内行右眼 10 mmol/L 咖啡因 0.1 μl 玻璃体腔注射, 阴性对照组幼鼠右眼玻璃体腔注射双蒸水 0.1 μl 。将 HUVECs 接种至 24 孔板 L-多聚赖氨酸细胞爬片上, 用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 进行培养。正常对照组细胞进行常规培养, 低氧模型对照组在细胞完全培养液中加入终浓度为 200 μmol 的 CoCl_2 , 阳性干扰组在细胞完全培养液中加入终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 CoCl_2 和 2 mmol/L 咖啡因, 阴性干扰组在细胞完全培养液中加入终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 CoCl_2 和等容积不含咖啡因的溶剂。

1.2.4 免疫荧光法检测各组幼鼠视网膜新生血管的生长情况及 γH2AX 的表达分布 正常对照组和 OIR 模型组分别取 12 日龄和 17 日龄小鼠各 6 只, 颈椎脱臼法处死小鼠, 摘取眼球, 质量分数 2% 多聚甲醛固定 2 h; 手术显微镜下去除角膜、虹膜、晶状体和玻璃体, 剥除巩膜和脉络膜, 完整分离视网膜, PBS 漂洗 4 次, 每次 20 min, PBS+体积分数 0.15% 牛血清白蛋白+体积分数 0.1% Tween 20 在室温下封闭 12 h; 加入 Isolectin B4 抗体 (1:150) 4°C 孵育过夜, PBS 漂洗 4 次, 每次 20 min, 行视网膜铺片、封片。分别取各组 17 日龄幼鼠 6 只眼球进行视网膜铺片免疫荧光双染色, 常规染 Isolectin B4, 加入抗 γH2AX 抗体 (1:100) 4°C 孵育过夜, PBS 漂洗 4 次, 每次 20 min, 加入山羊抗小鼠 IgG/TRITC 二抗 (1:150), 铝箔包裹避光, 室温孵育 2~5 h, 常规视网膜铺片、封片。于荧光显微镜下观察, Image J 软件对条带密度及面积等参数进行定量分析。

1.2.5 免疫荧光技术检测各组 HUVECs 中 γH2AX 的表达 将生长状态良好的 HUVECs 接种于 24 孔板

的 L-多聚赖氨酸细胞爬片上进行培养, 处理后 12 h 收集细胞爬片。将收取的细胞爬片置于载玻片上, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 用体积分数 5% Triton 透化 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 采用 0.15% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h, 加入抗 γH2AX 抗体 (1:100) 4°C 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入 TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗, 室温下湿盒内孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, DAPI (1:1 000) 染核 10 min, 封片, 计数细胞中 γH2AX 焦点阳性百分数, 每组计数 40 个细胞核, 实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 法检测各组 HUVECs 中 γH2AX 的表达 收集各组细胞, 常规提取细胞总蛋白。SDS-PAGE 电泳 (质量分数 5% 积层胶, 质量分数 12% 分离胶) 分离蛋白样本, 转印至 PVDF 膜, 质量分数 5% 脱脂奶粉封闭, 分别加入抗 γH2AX 抗体 (1:1 000) 和 GAPDH (1:5 000) 4°C 孵育过夜; PBS 漂洗, 加入 HRP 标记的山羊抗鼠二抗 (1:2 000), PBS 漂洗, ECL 化学发光法显色, Gel-Del 凝胶成像系统进行扫描并拍照, Image J 软件对条带密度及面积等参数进行定量分析。以 GAPDH 为内参照, 计算各组细胞中 γH2AX 的相对表达量, 实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标数据经 W 检验均呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组小鼠视网膜新生血管面积百分比、无灌注区面积百分比以及 HUVECs 中 γH2AX 阳性细胞百分数和 γH2AX 蛋白相对表达量比较均采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠视网膜血管形态学观察

正常对照组小鼠出生第 12 天, 视网膜血管已部分达锯齿缘, 血管分层生长, 但较稀疏; 随日龄增长, 视网膜血管逐渐由中央向周边、由浅层向深层生长; 出生第 17 天时视网膜血管生长更加密集, 3 层血管清晰可见, 呈树枝状分布, 走行自然。OIR 模型组出生第 12 天小鼠视网膜中央出现大片无灌注区, 仅周边区域可见稀疏的浅层血管; 出生第 17 天视网膜可见大量的新生血管, 部分迂曲呈团状, 并逐渐向后极部生长。OIR 阴性对照组出生后第 17 天的小鼠视网膜新生血管情况较 OIR 模型组无明显区别。OIR 阳性对照组出生后第 17 天的小鼠视网膜血管走行基本正常, 可见少量的新生血管和小面积的无灌注区 (图 1)。

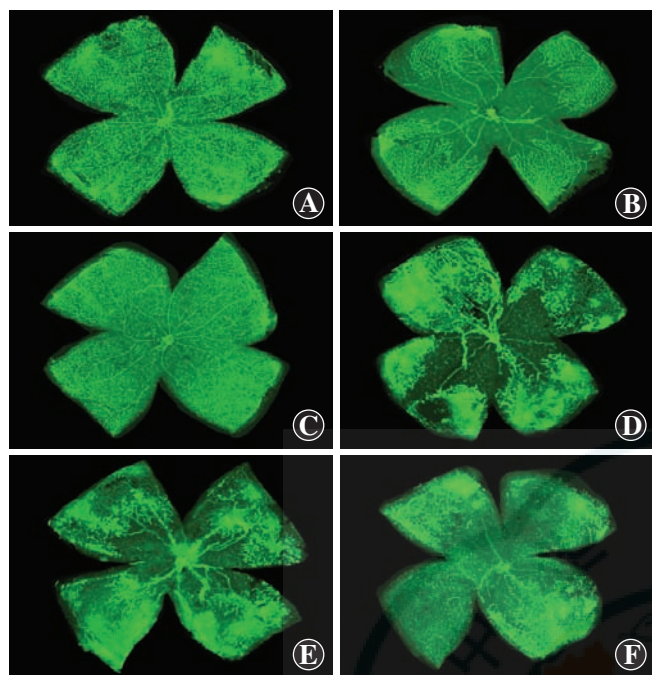


图1 荧光显微镜下观察各组视网膜铺片图像 (Isolectin B4, $\times 40$)

A: 正常对照组 12 日龄小鼠视网膜血管范围已部分达锯齿缘, 血管分层生长, 但较稀疏 B: OIR 模型组 12 日龄小鼠视网膜中央出现大片的无灌注区, 仅周边区域可见稀疏的浅层血管 C: 正常对照组 17 日龄小鼠视网膜血管生长更加密集, 呈树枝状分布, 走行自然 D: OIR 模型组 17 日龄小鼠视网膜可见大量的新生血管, 部分迂曲呈团状 E: OIR 阴性对照组 17 日龄小鼠视网膜新生血管情况与 OIR 模型组无差别 F: OIR 阳性对照组 17 日龄小鼠视网膜血管走行基本正常, 可见少量的新生血管和小面积的无灌注区

2.2 各组小鼠视网膜新生血管面积百分比和无灌注区面积百分比比较

正常对照组、OIR 模型组、OIR 阴性对照组和 OIR 阳性对照组小鼠视网膜新生血管面积百分比分别为 $(0.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(33.40 \pm 2.17)\%$ 、 $(32.54 \pm 1.73)\%$ 和 $(7.51 \pm 0.59)\%$, 无灌注区面积百分比分别为 $(0.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(21.42 \pm 1.77)\%$ 、 $(24.34 \pm 3.52)\%$ 和 $(10.37 \pm 0.63)\%$, 4 个组间小鼠视网膜新生血管面积及无灌注区面积总体比较差异均有统计学意义 ($F = 437.62, 93.05$, 均 $P < 0.01$), 其中 OIR 模型组、OIR 阴性对照组小鼠视网膜新生血管面积百分比和无灌注区面积百分比均较正常对照组明显增大; OIR 阳性对照组小鼠视网膜新生血管面积百分比和无灌注区面积百分比均较 OIR 模型组和 OIR 阴性对照组明显减小, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); OIR 模型组和 OIR 阴性对照组小鼠视网膜新生血管面积百分比和无灌注区面积百分比比较, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (图 2, 3)。

2.3 各组小鼠视网膜中 γ H2AX 的表达分布

免疫荧光双染色结果显示, 正常对照组 17 日龄小

鼠视网膜中未见明显的 γ H2AX 焦点团, 血管走行自然; OIR 模型组 17 日龄小鼠视网膜周边新生血管区可见大量 γ H2AX 焦点聚集成团状, 团块较大, 数量较多; OIR 阴性对照组 17 日龄小鼠与 OIR 模型组相比, 视网膜 γ H2AX 焦点团无明显差异; OIR 阳性对照组 17 日龄小鼠较 OIR 模型组视网膜 γ H2AX 焦点团密度减小, 同时团块大小也明显变小 (图 4)。

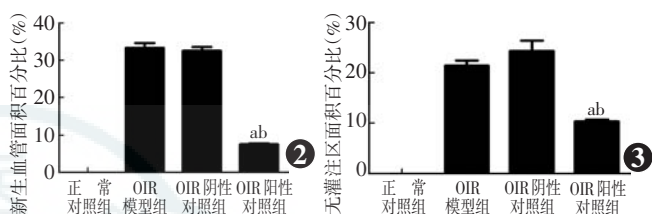


图2 各组小鼠视网膜新生血管面积百分比比较 $F = 437.62, P < 0.01$

与 OIR 模型组比较, $^a P < 0.01$; 与 OIR 阴性对照组比较, $^b P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 6$) OIR: 氧诱导视网膜病变

图3 各组小鼠视网膜无灌注区面积百分比比较 $F = 93.05, P < 0.01$

与 OIR 模型组比较, $^a P < 0.01$; 与 OIR 阴性对照组比较, $^b P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 6$) OIR: 氧诱导视网膜病变

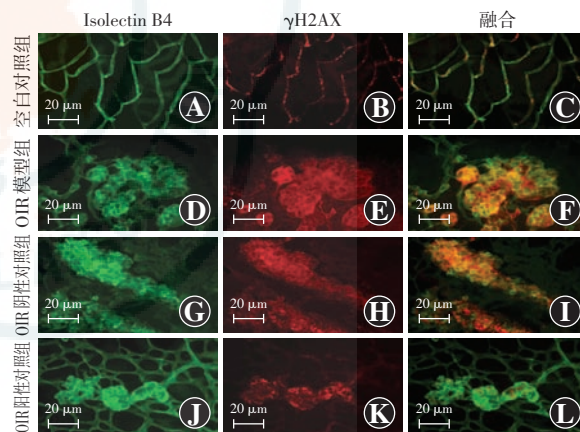


图4 荧光显微镜下观察各组 17 日龄小鼠视网膜中 γ H2AX 的表达分布 ($\times 400$, 标尺 = $20 \mu\text{m}$) OIR 模型组和 OIR 阴性对照组视网膜周边新生血管区可见大量 γ H2AX 焦点聚集成团状, OIR 阳性对照组视网膜 γ H2AX 焦点团密度减小, 正常对照组视网膜未见明显的 γ H2AX 焦点团 OIR: 氧诱导视网膜病变

2.4 各组 HUVECs 中 γ H2AX 阳性细胞百分数比较

正常对照组、低氧模型对照组、阳性干扰组和阴性干扰组细胞中 γ H2AX 焦点阳性细胞百分数分别为 $(9.44 \pm 0.32)\%$ 、 $(53.34 \pm 5.85)\%$ 、 $(29.91 \pm 1.71)\%$ 和 $(58.77 \pm 7.62)\%$, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 64.97, P < 0.01$), 其中低氧模型对照组和阴性干扰组 γ H2AX 焦点阳性细胞百分数较正常对照组明显增大, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 阳性干扰组较低氧模型对照组和阴性干扰组明显减小, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 阳性干扰组与正常对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 5, 6)。

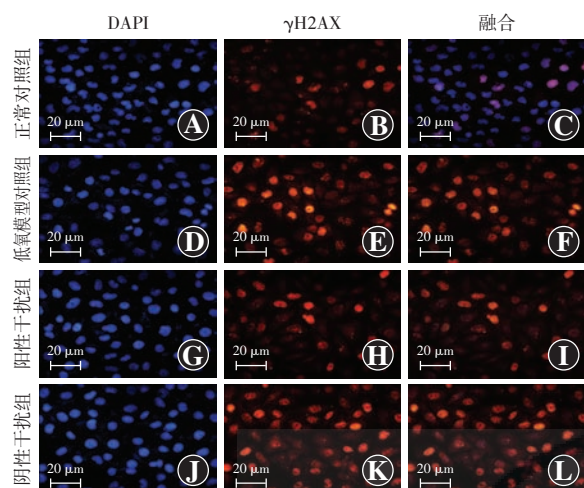


图 5 荧光显微镜下观察各组 HUVECs 中 γ H2AX 的表达 ($\times 400$, 标尺 = 20 μ m) 低氧模型对照组和阴性干扰组 γ H2AX 阳性表达细胞较多, 阳性干扰组 γ H2AX 阳性表达细胞减少, 正常对照组 γ H2AX 阳性表达细胞较少

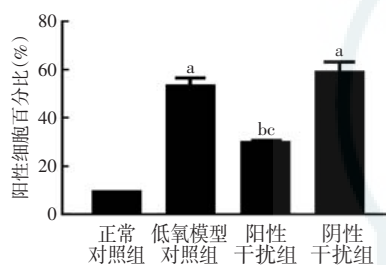


图 6 各组 HUVECs 中 γ H2AX 阳性细胞百分数比较 $F = 64.97, P < 0.01$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.01$; 与低氧模型对照组比较, $^b P < 0.01$; 与阴性干扰组比较, $^c P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 6$)

2.5 各组 HUVECs 中 γ H2AX 蛋白相对表达量比较

Western blot 法检测结果显示, 正常对照组、低氧模型对照组、阳性干扰组和阴性干扰组 γ H2AX 蛋白相对表达量分别为 0.445 ± 0.083 、 0.797 ± 0.074 、 0.567 ± 0.059 和 0.777 ± 0.015 , 总体比较差异有统计学意义 ($F = 21.76, P < 0.01$), 其中低氧模型对照组和阴性干扰组 γ H2AX 蛋白相对表达量均较正常对照组明显增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 与低氧模型对照组和阴性干扰组比较, 阳性干扰组 γ H2AX 蛋白相对表达量明显减少, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 低氧模型对照组与阴性干扰组以及正常对照组与阳性干扰组 γ H2AX 蛋白相对表达量比较, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (图 7, 8)。

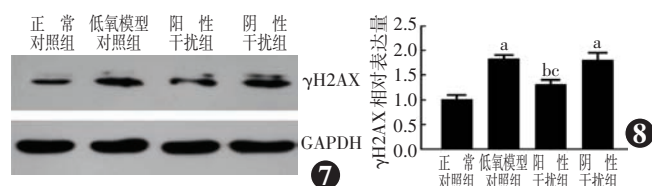


图 7 Western blot 法检测各组 HUVECs 中 γ H2AX 蛋白的表达

图 8 各组 HUVECs 中 γ H2AX 蛋白相对表达量比较 $F = 21.76, P < 0.01$. 与正常对照组比较, $^a P < 0.01$; 与低氧模型对照组比较, $^b P < 0.01$; 与阴性干扰组比较, $^c P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 6$)

3 讨论

γ H2AX 是第 139 位丝氨酸磷酸化的组蛋白 H2AX, 已被普遍认为是 DNA 双链断裂的分子标志。在损伤发生的同时, 位于 H2AX 第 139 位的丝氨酸残基被快速磷酸化生成 γ H2AX, 并在 DNA 双链断裂位点形成簇集点, 随后募集其他 DNA 损伤反应蛋白和 DNA 修复相关蛋白进行修复, 且大量的 γ H2AX 围绕在损伤部位, 使得抗 γ H2AX 的抗体检测 DNA 双链断裂成为可能^[13-15]。 γ H2AX 定位于 DNA 双链断裂处, 执行一系列细胞损伤反应, 包括细胞周期检查点^[16], 以使细胞有足够的时间修复损伤。

目前, 定量检测 γ H2AX 主要有免疫荧光、Western blot 及流式细胞术 3 种方法^[17-19]。免疫荧光法检测灵敏度较高, 操作较为简便, 是目前研究 γ H2AX 的常用方法; 而 Western blot 实验通常用于对免疫荧光的实验结果进行验证; 流式细胞技术可结合细胞周期来分析 γ H2AX 水平的变化, 常用来评估 DNA 损伤与细胞周期之间的关系^[20]。本实验中采用免疫荧光和 Western blot 法对 γ H2AX 进行观察研究。

H2AX 的磷酸化是由磷脂酰肌醇 3-激酶家族成员催化的, 其中包括毛细血管共济失调症突变基因、毛细血管共济失调症突变相关激酶和 DNA 依赖蛋白相关激酶^[21]。咖啡因可通过抑制这 3 种激酶的活性来抑制 γ H2AX 的产生, 其对 3 种激酶的半数抑制浓度为 1 mmol/L^[22-23]。本实验采用浓度为 10 mmol/L 的咖啡因行小鼠玻璃体腔注射, 未出现致死现象。实验结果表明, OIR 模型小鼠视网膜中 γ H2AX 的表达量和表达时段与新生血管生成相一致, 当阻断 γ H2AX 形成时, 视网膜新生血管面积减小, 推测 γ H2AX 与视网膜新生血管的产生有关联。

本研究中进一步采用 HUVECs 进行细胞培养, 从细胞水平对 γ H2AX 的表达进行验证。CoCl₂ 可作为常规的化学低氧模拟剂, 钴离子替代氧感受器血红蛋白中的铁离子, 从而将分子锁定在脱氧的状态^[24-25]。本实验采用浓度为 200 μ mol/L CoCl₂ 建立低氧模型, 结果表明处于低氧状态的 HUVECs 细胞核中 γ H2AX 表达明显增多, 而在细胞中加入咖啡因后, γ H2AX 的表达量明显减少, 与在体研究相一致。

由于体外培养的细胞模拟低氧模型本身对细胞增殖能力有影响, 且阻断 γ H2AX 形成进而阻断 DNA 修复反应的过程中可能更加重细胞凋亡; 再者, 血管新生是多因子多途径的病理过程, 只阻断一种物质的体外实验并不能代表动物模型的相关变化, 故本研究中体

外细胞实验仅证实了低氧下血管内皮细胞存在 DNA 损伤反应及咖啡因可部分阻断 γ H2AX 的生成。

本实验发现在小鼠视网膜和体外培养的内皮细胞均在氧体积分数降低后出现了 γ H2AX 的大量表达。视网膜铺片结果显示, γ H2AX 的表达量与新生血管形成时期有关联, 血管增生旺盛时表达明显增多, γ H2AX 的表达部位与新生血管产生部位相关联。通过用咖啡因阻断 γ H2AX 生成后, 发现 OIR 模型小鼠新生血管也明显减少。咖啡因干预动物只是干扰了 γ H2AX 的形成, 其他条件依然同模型动物, 并未对其他促新生血管因子产生影响, 但咖啡因干预小鼠视网膜新生血管明显少于 OIR 模型组, 说明 γ H2AX 可能有促新生血管作用, 也说明在传统认为的促新生血管因子以外, 可能还存在其他的新生血管形成机制。

本实验表明, 低氧诱导视网膜血管新生和 DNA 损伤修复这 2 种并存的反应之间存在一定关联。DNA 修复蛋白 γ H2AX 作为桥梁将两者联系起来, 其在修复 DNA 的同时具有促血管新生的作用, 这可能是一种过度的细胞修复, 也可能是独立于促血管生成因子以外的另一种视网膜血管新生发生机制。但这只是在模型动物和细胞实验阶段的发现, 其是否同样适用于临床新生血管的发病过程, 以及 γ H2AX 作用于视网膜新生血管形成的具体机制, 均有待进一步研究。

参考文献

- [1] Iranmanesh R, Eandi CM, Peiretti E, et al. The nature and frequency of neovascular age-related macular degeneration [J]. *Eur J Ophthalmol*, 2007, 17 (1) : 75-83.
- [2] Dong A, Xie B, Shen J, et al. Oxidative stress promotes ocular neovascularization [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 219 (3) : 544-552. DOI: 10.1002/jcp.21698.
- [3] 薄海, 张红英, 李海英, 等. 低氧复合运动对大鼠骨骼肌解偶联蛋白 3 表达及线粒体功能的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2012, 27 (1) : 16-21. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2012.01.006.
- [4] Bo H, Zhang HY, Li HY, et al. Effect of hypoxia combined exercise training on uncoupling protein 3 expression and mitochondrial function in skeletal muscles of rats [J]. *Chin J Rehabil Med*, 2012, 27 (1) : 16-21. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2012.01.006.
- [5] Biniecka M, Fox E, Gao W, et al. Hypoxia induces mitochondrial mutagenesis and dysfunction in inflammatory arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63 (8) : 2172-2182. DOI: 10.1002/art.30395.
- [6] Ferro E, Visalli G, Civa R, et al. Oxidative damage and genotoxicity biomarkers in transfused and untransfused thalassemic subjects [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53 (10) : 1829-1837. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.592.
- [7] Hammond EM, Giaccia AJ. The role of ATM and ATR in the cellular response to hypoxia and re-oxygenation [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2004, 3 (8-9) : 1117-1122. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.03.035.
- [8] Redon CE, Dickey JS, Bonner WM, et al. γ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin [J]. *Adv Space Res*, 2009, 43 (8) : 1171-1178. DOI: 10.1016/j.asr.2008.10.011.
- [9] Rothkamm K, Horn S. gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure [J]. *Ann Ist Super Sanita*, 2009, 45 (3) : 265-271.
- [10] Redon CE, Dickey JS, Bonner WM, et al. γ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin [J]. *Adv Space Res*, 2009, 43 (8) : 1171-1178. DOI: 10.1016/j.asr.2008.10.011.
- [11] Rankin EB, Giaccia AJ, Hammond EM. Bringing H2AX into the angiogenesis family [J]. *Cancer Cell*, 2009, 15 (6) : 459-461. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.05.004.
- [12] Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35 (1) : 101-111.
- [13] Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139 [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (10) : 5858-5868.
- [14] Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, et al. GammaH2AX and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8 (12) : 957-967. DOI: 10.1038/nrc2523.
- [15] Kinner A, Wu W, Staudt C, et al. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36 (17) : 5678-5694. DOI: 10.1093/nar/gkn550.
- [16] Huen MS, Chen J. Assembly of checkpoint and repair machineries at DNA damage sites [J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35 (2) : 101-108. DOI: 10.1016/j.tibs.2009.09.001.
- [17] Scarpato R, Castagna S, Aliotta R, et al. Kinetics of nuclear phosphorylation (γ -H2AX) in human lymphocytes treated *in vitro* with UVB, bleomycin and mitomycin C [J]. *Mutagenesis*, 2013, 28 (4) : 465-473. DOI: 10.1093/mutage/get024.
- [18] Runge R, Hiemann R, Wendisch M, et al. Fully automated interpretation of ionizing radiation-induced γ H2AX foci by the novel pattern recognition system AKLIDES® [J]. *Int J Radiat Biol*, 2012, 88 (5) : 439-447. DOI: 10.3109/09553002.2012.658468.
- [19] Rothkamm K, Horn S, Scherthan H, et al. Laboratory intercomparison on the γ -H2AX foci assay [J]. *Radiat Res*, 2013, 180 (2) : 149-155. DOI: 10.1667/RR3238.1.
- [20] Wang LH, Pfister TD, Parchment RE, et al. Monitoring drug-induced gammaH2AX as a pharmacodynamic biomarker in individual circulating tumor cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16 (3) : 1073-1084. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2799.
- [21] Banáth JP, Macphail SH, Olive PL. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (19) : 7144-7149.
- [22] Burdak-Rothkamm S, Short SC, Folkard M, et al. ATR-dependent radiation-induced gamma H2AX foci in bystander primary human astrocytes and glioma cells [J]. *Oncogene*, 2007, 26 (7) : 993-1002. DOI: 10.1038/sj.onc.1209863.
- [23] Kao J, Lavaf A, Lan CH, et al. Inhibition of γ -H2AX after ionizing radiation as a biological surrogate of impaired upstream DNA damage signaling and radiosensitivity [J]. *J Cancer Mol*, 2010, 5 (2) : 49-54.
- [24] Vengellur A, Woods BG, Ryan HE, et al. Gene expression profiling of the hypoxia signaling pathway in hypoxia-inducible factor 1alpha null mouse embryonic fibroblasts [J]. *Gene Expr*, 2003, 11 (3-4) : 181-197.
- [25] Hervouet E, Pecina P, Demont J, et al. Inhibition of cytochrome c oxidase subunit 4 precursor processing by the hypoxia mimic cobalt chloride [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344 (4) : 1086-1093. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.04.014.

(收稿日期: 2017-04-22)

(本文编辑: 刘艳 张宇)