

## · 实验研究 ·

# 外源性脯氨酸羟化酶对人 RPE 细胞中缺氧诱导因子通路的负向调节作用

马昱 唐少华 姜燕荣 石璇

100044 北京积水潭医院眼科(马昱、唐少华);100034 北京大学人民医院眼科(姜燕荣、石璇)

通信作者:石璇,Email:shxoph@sina.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.03.009

**【摘要】** **背景** 目前抗 VEGF 药物的应用已广泛用于眼部新生血管性疾病的治疗,但有部分患者的疗效并不理想,因此研究 VEGF 的上游基因缺氧诱导因子-1(HIF-1)及其限速酶脯氨酸羟化酶(PHDs)在新生血管形成中的作用具有重要的临床意义。**目的** 探讨外源性 PHDs 在 HIF-1 激活通路中的负性调节作用。**方法** 用 HeLa 细胞提取 RNA,采用逆转录 PCR 法从 cDNA 克隆 PHD<sub>1</sub>、PHD<sub>2</sub> 和 PHD<sub>3</sub>,通过限制性内切酶构建 pFLAG-PHD<sub>1</sub>、pFLAG-PHD<sub>2</sub> 和 pFLAG-PHD<sub>3</sub> 质粒并通过基因测序进行鉴定。分别将人 RPE 细胞株(ARPE-19)在体积分数 21% O<sub>2</sub>(常氧组)、1% O<sub>2</sub>(低氧组)和缺氧模拟剂(CoCl<sub>2</sub>,缺氧组)条件下进行培养,将 pFLAG-PHD<sub>1</sub>、pFLAG-PHD<sub>2</sub> 和 pFLAG-PHD<sub>3</sub> 质粒分别转染至培养的 ARPE-19 细胞中,pFLAG-CMV2 转染作为空白对照。采用 Western blot 法测定和比较转染细胞在不同氧环境培养下 PHD<sub>1</sub>、PHD<sub>2</sub> 和 PHD<sub>3</sub> 蛋白的表达强度;采用双荧光素酶报告系统评估各组细胞中 HIF-1 的转录活性。**结果** Western blot 法检测显示常氧组、低氧组和缺氧组 ARPE-19 细胞中均有 PHD<sub>1</sub>、PHD<sub>2</sub> 和 PHD<sub>3</sub> 蛋白的表达,各组细胞中 PHD<sub>2</sub> 的表达条带均强于 PHD<sub>1</sub> 和 PHD<sub>3</sub> 蛋白,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。pFLAG-CMV2 转染后常氧组细胞中内源性 HIF-1 活性反应低,低氧组和缺氧组细胞中 HIF-1 的转录活性明显升高,与空白对照组相比,pFLAG-PHD<sub>1</sub>、pFLAG-PHD<sub>2</sub>、pFLAG-PHD<sub>3</sub> 转染后常氧组细胞中内源性 HIF-1 活性反应无明显变化( $F = 0.48, P > 0.05$ ),而低氧或缺氧组细胞中 HIF-1 活性明显下降,与空白对照组比较差异均有统计学意义( $F = 24.30, 112.67, 均 P < 0.05$ )。相同培养条件下,pFLAG-PHD<sub>2</sub> 转染后细胞中 HIF-1 活性明显低于 pFLAG-PHD<sub>1</sub> 和 pFLAG-PHD<sub>3</sub> 转染细胞,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。**结论** PHDs 对人 RPE 细胞中 HIF-1 的激活通路有明显的负向调节作用,其对低氧细胞和缺氧细胞中 HIF-1 转录活性的抑制作用明显强于常氧细胞,其中 PHD<sub>2</sub> 抑制 HIF 调节通路的作用明显强于 PHD<sub>1</sub> 和 PHD<sub>3</sub>。

**【关键词】** 细胞缺氧;血管内皮生长因子;基因表达调控;缺氧诱导因子-1;脯氨酸羟化酶/代谢;人;转录因子;视网膜色素上皮细胞

**基金项目:** 首都卫生发展科研专项(2014-3-4086)

**Negative regulation of exogenous prolyl-4-hydroxylase domain proteins on hypoxia-inducible factor pathway in human RPE cells** Ma Yu, Tang Shaohua, Jiang Yanrong, Shi Xuan

Department of Ophthalmology, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100044, China (Ma Y, Tang SH); Department of Ophthalmology, The People's Hospital of Peking University, Beijing 100034, China (Jiang YR, Shi X)

Corresponding author: Shi Xuan, Email: shxoph@sina.com

**【Abstract】** **Background** Anti-VEGF drugs are generally applied in the treatment of ocular neovascular diseases. However, the therapy effect is unsatisfactory in some patients. Studying the effect of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), a upstream regulatory gene of VEGF, and its limiting enzyme prolyl-4-hydroxylase domain proteins (PHDs) is of important clinical significance. **Objective** This study was to investigate the negative regulation of exogenous PHDs on HIF-1 pathway in human RPE cells. **Methods** pFLAG-PHD<sub>1</sub>, pFLAG-PHD<sub>2</sub> and pFLAG-PHD<sub>3</sub> plasmids were constructed by extracting RNA from HeLa cell line and cloning PHD<sub>1</sub>, PHD<sub>2</sub> and PHD<sub>3</sub> using reverse transcription PCR with restriction enzyme. The plasmids were identified by gene sequencing. ARPE-19 cells were cultured at 21% O<sub>2</sub> (normoxia group), 1% O<sub>2</sub> (hypoxia group), or in hypoxia-mimicking agents (CoCl<sub>2</sub>, anoxia group), respectively, and then were transfected with plasmids encoding FLAG-tagged PHD<sub>1</sub>, PHD<sub>2</sub>, PHD<sub>3</sub> and pFLAG-CMV2 transfected cells served as blank control. The expressional intensities of PHD<sub>1</sub>, PHD<sub>2</sub> and PHD<sub>3</sub> in the cells

were detected and compared among different groups by using Western blot assay. The transcriptional activity of HIF-1 in the cells was evaluated with dual luciferase reporter assay. **Results** Western blot assay showed that PHD<sub>1</sub>, PHD<sub>2</sub> and PHD<sub>3</sub> all were expressed in ARPE-19 cells in the normoxia group, hypoxia group and anoxia group. The expression was strong in PHD<sub>2</sub> protein and was weak in PHD<sub>3</sub> protein, a statistically significant difference was found between PHD<sub>2</sub> protein expression and PHD<sub>1</sub> or PHD<sub>3</sub> expressions (all at  $P < 0.05$ ). Endogenous HIF-1 activity was elevated in pFLAG-CMV transfected cells in the hypoxia group and anoxia group than that in the normoxia group. Compared with pFLAG-CMV transfected cells, no obvious change was seen in the endogenous HIF-1 activity in the normoxia group, however, HIF-1 activity was declined in the hypoxia group and anoxia group after pFLAG-PHD<sub>1</sub>, pFLAG-PHD<sub>2</sub> or pFLAG-PHD<sub>3</sub> transfection. Under the same oxygen environment, HIF-1 activity was lower in the pFLAG-PHD<sub>2</sub> transfected cells than that in the pFLAG-PHD<sub>1</sub> or pFLAG-PHD<sub>3</sub> transfected cells (both at  $P < 0.05$ ).

**Conclusions** PHDs play a negative regulation to HIF-1 activating pathway in human RPE cells, especially in hypoxia and anoxia cells. Among PHDs proteins, PHD<sub>2</sub> presents the strongest inhibition on HIF-1 activating pathway.

**[Key words]** Cell hypoxia; Vascular endothelial growth factors; Gene expression regulation; Hypoxia-inducible factor-1; Procollagen-proline dioxygenase/metabolism; Humans; Transcription factors; Epithelial cells, retinal

**Fund program:** Capital Health Research and Development Special Project (2014-3-4086)

脉络膜新生血管膜、增生性 DR 等眼部新生血管性疾病严重危害视力,其原发病因虽然不同,但 VEGF 在新生血管的形成过程中均发挥关键作用,因此抗 VEGF 药物在眼部新生血管性病变的治疗中广泛使用。眼科临床工作中发现,部分新生血管性疾病患者采用抗 VEGF 疗法效果并不理想,故 VEGF 的上游基因,缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, *HIF-1*) 的作用也逐渐受到关注。研究表明,在缺氧情况下, HIF-1 在细胞内可促进 *VEGF*<sup>[1-2]</sup>、促红细胞生成素 (erythropoietin, *EPO*) 和葡萄糖载体蛋白-1 (*Glut-1*) 等多个靶基因的表达<sup>[3]</sup>。脯氨酸羟化酶 (prolyl-4-hydroxylase domain, PHD) 是调节 HIF-1 活性的限速酶,目前发现 PHDs 有 3 种异构体,即 PHD<sub>1</sub>、PHD<sub>2</sub> 和 PHD<sub>3</sub>,其在不同组织不同细胞中的表达均不同,且位于特定细胞的特定位置,决定了这些组织对 HIF-1 的反应活性也有很大差异<sup>[3-4]</sup>。RPE 细胞在体外低氧条件下 PHD<sub>2</sub> 和 PHD<sub>3</sub> 蛋白表达持续增高,而 PHD<sub>1</sub> 表达保持不变<sup>[5]</sup>。在氧诱导视网膜病变 (oxygen induced retinopathy, OIR) 鼠模型中通过抑制 PHD<sub>1</sub> 可抑制常氧下 HIF-1 $\alpha$  降解,进一步阻止常氧下诱导的血管的闭锁<sup>[6]</sup>。目前这 3 种异构体在人 RPE 细胞中对 HIF-1 的调节作用鲜有报道,而这些作用可能与脉络膜和 RNV 形成有关。本研究中观察体外培养的人 RPE 细胞在不同状态下 PHDs 对 HIF-1 激活通道的调节作用。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 人 RPE 细胞株 (ARPE-19) 购自美国

ATCC 公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基、脂质体转染 Lipofectamine<sup>®</sup> LTX Plus<sup>™</sup> 试剂 (美国 Invitrogen 公司); 逆转录 PCR 扩增试剂盒、DNA marker V (上海莱枫生物科技有限公司); 限制性内切酶 *AflIII*/*KpnI*、*EcoRI*/*SmaI*、*PvuII*/*BamHI*、*SmaI*/*BglIII*、T4 DNA 连接酶 (加拿大 Fermentas 公司); pFLAG-CMV (美国 Kadak 公司); 鼠抗 FLAG 抗体 (A9469) (美国 Sigma 公司); 鼠抗  $\alpha$ -actin 抗体 (ab54723) (美国 Abcam 公司); 羊抗鼠二抗 (ab186695)、ECL 显色剂 (美国 Amersham 公司); 双荧光素酶检测试剂盒、PGL4.26 质粒 (美国 Promega 公司)。PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); CK40 倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司); 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); 高速低温离心机 (德国 Heraeus 公司); 乏氧培养箱 (英国 Rs Biotech 公司); Infinite<sup>®</sup> M200 PRO 光栅型多功能微孔板检测仪 (瑞士 Tecan 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 质粒载体的构建及细胞转染 通过 Hela 细胞提取 RNA, 采用逆转录 PCR 法从 cDNA 克隆 PHD<sub>1</sub>、PHD<sub>3</sub> 和 PHD<sub>2</sub>, 通过限制性内切酶 *AflIII*/*KpnI*、*EcoRI*/*SmaI* 及 T4 DNA 连接酶到 pFLAG-CMV2, 构建成 pFLAG-PHD<sub>1</sub>、pFLAG-PHD<sub>2</sub> 和 pFLAG-PHD<sub>3</sub>。PCR 产物均通过基因测序进行验证。

1.2.2 细胞培养和转染 ARPE-19 细胞在含体积分数 10% 小牛血清的 DMEM 培养液中进行培养, 并加入 50 U/ml (商品单位) 青霉素。用质量分数 25% 胰蛋白酶消化, 置于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养并传代, 选取对数生长期细胞进行验证。将 ARPE-19 细胞系接种于 24 孔细胞培养板中, 细胞贴壁生长约

24 h 且达到 80% 以上融合时更换为 Opti-MEM 无血清培养液, 分别将 pFLAG-PHD<sub>1</sub>、pFLAG-PHD<sub>2</sub>、pFLAG-PHD<sub>3</sub>、空白对照 pFLAG-CMV 各 2.50 μg 与 2.51 μl Plus 加入 150.00 μl Opti-MEM 培养液混合。另取 1.5 ml EP 管加入 Opti-MEM 培养液与 LXT 试剂混合在室温下孵育 5 min, 然后进行充分混合, 室温下静置 30 min。在培养板每孔培养液中加入 300 μl 质粒/脂质体混合液对细胞进行转染。将转染后的各组细胞分为 3 个组, 低氧组细胞置于含体积分数 1% O<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养, 缺氧组细胞在培养液中添加 200 μmol CoCl<sub>2</sub>, 常氧组细胞置于含 21% O<sub>2</sub> 的培养箱中继续培养 24 h。

1.2.3 Western blot 法检测细胞中 PHDs 蛋白的表达

细胞培养结束后迅速取出, 弃培养液。用预冷的 PBS 冲洗, 迅速收集细胞置于冰上, 加入细胞裂解液提取总蛋白, 采用 Bradford 法测定蛋白的表达。Western blot 法分离蛋白, 转至 PVDF 膜, 依次加入一抗 (1:2000)、二抗 (1:500), 曝光显像获得蛋白条带图像。α-actin 作为内参, 采用 ImageJ 1.4 软件采集计算蛋白条带的灰度值, 并比较 PHD<sub>1</sub>、PHD<sub>2</sub> 和 PHD<sub>3</sub> 蛋白的表达情况。

1.2.4 双荧光素报告基因活性测定评估 HIF-1 的转录活性 含 35 bp (5' -CCACAGTGCATACGTGGGCTCC AACAGTCTCTT-3') 的低氧反应元件 (hypoxia-responsive element, HRE) 来源于人 VEGF 增强子, 6 倍 HRE 由 DNA 连接酶连接, 并在 pGL4.26 质粒的 HindIII 位点插入制备成 6 倍 HRE-Luc, 并经 DNA 测序检验。取对数生长期的 ARPE-19 细胞在培养箱中继续培养 24 h, 待细胞达到 80% 以上融合时更换为 Opti-MEM 无血清培养基, 在 1.5 ml EP 管中分别配置重组质粒 50 μg pFLAG-PHD<sub>1</sub> 混合液、pFLAG-PHD<sub>2</sub> 混合液与 pFLAG-PHD<sub>3</sub>, 并分别添加载体 6 倍 HRE-Luc、内参质粒 pCMX, 进行瞬时转染。转染细胞亚分组同 1.2.2。细胞培养 24 h 后按说明书行双荧光素酶活性检测。将细胞裂解液加入到黑色不透光 96 孔板并置于多功能酶标仪中, 测量萤火虫荧光素发光值; 加入 100 ml Stop&Glo Reagent, 测得的海肾荧光素发光值, 并以 2 个发光值的比值作为衡量 HRE 启动子活性的依据, pFLAG-CMX 作为空白对照校正转染细胞的质粒总量从而消除由于细胞数目及转染效率等不同所带来的组间差异。

1.3 统计学方法

采用 SAS 9.2 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示。ARPE-19 细胞中 PHD<sub>1</sub>、PHD<sub>2</sub> 和 PHD<sub>3</sub> 蛋白表达以及

不同氧环境下细胞中 HIF-1 转录活性的比较采用单因素方差分析, 各组间两两比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养细胞的形态学表现

转染的第 3 代 ARPE-19 细胞处于对数生长期, 呈集落样生长, 可见清晰、透明的圆形细胞核, 细胞覆盖率约为 80%, 细胞内黑色素颗粒较培养初期减少 (图 1)。

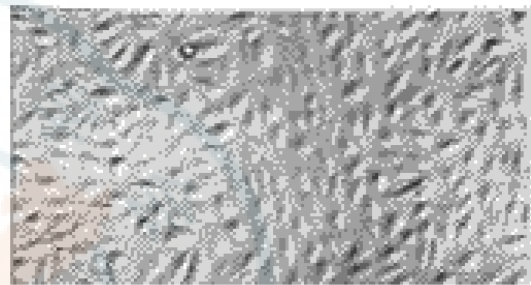


图 1 第 3 代人 RPE 细胞显微镜下表现

2.2 各组细胞中 PHD<sub>1</sub>、PHD<sub>2</sub> 和 PHD<sub>3</sub> 蛋白的表达比较

常氧组、低氧组和缺氧组细胞中 PHD<sub>1</sub>、PHD<sub>2</sub> 和 PHD<sub>3</sub> 蛋白条带均清晰, 其中常氧组、低氧组和缺氧组细胞中 PHD<sub>2</sub> 的表达条带最强。常氧组、低氧组和缺氧组细胞中 PHD<sub>1</sub>、PHD<sub>2</sub> 和 PHD<sub>3</sub> 相对表达量的总体比较差异均有统计学意义 (F = 55.00、58.00、85.00, 均 P < 0.01), 其中 PHD<sub>1</sub> 和 PHD<sub>3</sub> 相对表达量的差异均明显低于 PHD<sub>2</sub>, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.05) (图 2, 表 1)。

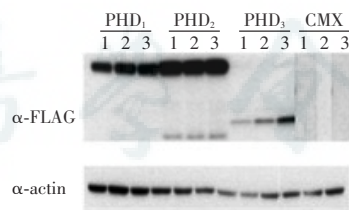


图 2 Western blot 法检测各组 ARPE-19 细胞中 PHD<sub>1</sub>、PHD<sub>2</sub> 和 PHD<sub>3</sub> 蛋白的表达 PHD<sub>2</sub> 在常氧组、低氧组及缺氧组细胞中表达条带强于 PHD<sub>1</sub> 和 PHD<sub>3</sub> CMX: 空白对照; 1: 常氧组; 2: 低氧组; 3: 缺氧组 PHD: 脯氨酸羟化酶

表 1 各组 ARPE-19 细胞中 PHD<sub>1</sub>、PHD<sub>2</sub> 和 PHD<sub>3</sub> 蛋白表达灰度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

蛋白类型	样本量	常氧组	低氧组	缺氧组
PHD <sub>1</sub>	3	0.93 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.19 <sup>a</sup>
PHD <sub>2</sub>	3	1.82 ± 0.25	2.00 ± 0.12	2.49 ± 0.15
PHD <sub>3</sub>	3	0.31 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.17 <sup>a</sup>
F		55.00	58.00	85.00
P		<0.01	<0.01	<0.01

注: 与各自的 PHD<sub>2</sub> 表达值比较, <sup>a</sup>P < 0.05 (单因素方差分析, LSD-t 检验) PHD: 脯氨酸羟化酶

### 2.2 各目的质粒载体的基因序列验证

pFLAG-PHD<sub>1</sub>、pFLAG-PHD<sub>2</sub>、pFLAG-PHD<sub>3</sub> 及 6 倍 HRE-Luc 的测序序列与设计片段一致。

### 2.3 各质粒载体的基因活性

空白对照的 pFLAG-CMX 转染 ARPE-19 细胞后,常氧组细胞中内源性 HIF-1 活性反应低,低氧组和缺氧组细胞中 HIF-1 的转录活性明显升高,而 pFLAG-PHD<sub>1</sub>、pFLAG-PHD<sub>2</sub>、pFLAG-PHD<sub>3</sub> 转染 ARPE-19 细胞后,常氧组细胞中内源性 HIF-1 活性反应与 pFLAG-CMX 转染后接近,差异无统计学意义 ( $F = 0.48, P > 0.05$ ); pFLAG-PHD<sub>1</sub>、pFLAG-PHD<sub>2</sub>、pFLAG-PHD<sub>3</sub> 转染后低氧组及缺氧组细胞中 HIF-1 活性与空白对照组相比明显下降,差异均有统计学意义 ( $F = 24.30、112.68$ , 均  $P < 0.05$ )。PHD<sub>2</sub> 的抑制作用与 PHD<sub>1</sub> 及 PHD<sub>3</sub> 比较,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ),低氧组和缺氧组 PHD<sub>1</sub> 与 PHD<sub>3</sub> 的抑制作用比较差异均无统计学意义 ( $P = 0.35、0.17$ ) (表 2)。

表 2 不同氧环境下 ARPE-19 中 HIF-1 的转录活性比较( $\bar{x} \pm s$ )

转染蛋白	样本量	常氧组	低氧组	缺氧组
pFLAG-CMX 转染	6	1.000±0.000	1.752±0.494 <sup>a</sup>	1.805±0.909 <sup>a</sup>
pFLAG-PHD <sub>1</sub> 转染	6	1.011±0.153	1.011±0.153 <sup>a</sup>	1.124±0.173 <sup>a</sup>
pFLAG-PHD <sub>2</sub> 转染	6	1.124±0.173	0.524±0.041	0.617±0.057
pFLAG-PHD <sub>3</sub> 转染	6	1.009±0.131	0.842±0.150 <sup>a</sup>	1.124±0.094 <sup>a</sup>
<i>F</i>		0.48	24.30	112.68
<i>P</i>		>0.05	<0.01	<0.01

注:与各自的 pFLAG-PHD<sub>2</sub> 转染比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) HIF:缺氧诱导因子;CMX:空白对照;PHD:脯氨酸羟化酶

### 3 讨论

大量研究表明,视网膜在缺氧条件下能够导致病理性 VEGF 的高表达,在缺氧条件下 RPE 细胞来主要通过稳定 HIF-1 $\alpha$  蛋白质分泌大量 VEGF<sup>[7-10]</sup>。在正常氧分压条件下及有 Fe<sup>2+</sup>、 $\alpha$ -酮戊二酸存在的环境下,PHDs 可催化 HIF-1 $\alpha$  的 N 端氧依赖降解结构域 (oxygen-dependent degradation domain, ODD) 中 2 个关键氨基酸残基 Pro402 和 Pro564 发生羟基化反应,羟基化修饰后的 HIF-1 $\alpha$  迅速与 pVHL 蛋白结合并经泛素蛋白酶途径迅速被降解<sup>[8]</sup>,这一反应的直接结果是导致 HIF-1 $\alpha$  的半衰期仅为 5 min,是细胞在常氧下适应性调节的快速动态途径。

由于视网膜组织中 RPE 细胞是分泌血管生长因子的重要来源,因此本研究中选择 ARPE-19 细胞进行体外培养。缺氧条件是在细胞培养箱中通过改变氧气的体积分数(1% O<sub>2</sub>)或培养液中加入 100 ~ 200  $\mu$ mol

CoCl<sub>2</sub><sup>[9]</sup>。缺氧状态下,PHDs 催化 HIF-1 羟基化的反应受阻,细胞质内 HIF-1 $\alpha$  集聚并转入细胞核,进而与 HIF-1 $\beta$  结合,形成 HIF-1 异二聚体,HIF-1 $\alpha$  的 C-TAD 结构域与 HRE 结合,诱导 VEGF 的表达及新生血管形成<sup>[10-11]</sup>,因此,PHDs 被认为是转录因子 HIF-1 低氧诱导功能的开关。与其他 Fe<sup>2+</sup> 及  $\alpha$ -酮戊二酸依赖的双加氧酶超家族成员一样,PHDs 的作用需要氧分子作为底物,以执行氧分压感知功能。同时,PHDs 对 HIF-1 $\alpha$  的羟基化作用还需要 Fe<sup>2+</sup> 和维生素 C 作为辅助因子,由于 HIF-1 $\alpha$  的 ODD 结构域脯氨酸羟化位点上的 Fe<sup>2+</sup> 结合位点能够被含 Fe<sup>2+</sup> 螯合剂或 Co<sup>2+</sup> 结合,从而封闭与 PHDs 结合的位点,致使 HIF-1 $\alpha$  稳定存在,因此铁螯合剂 CoCl<sub>2</sub> 可以模拟低氧反应,上调细胞内 HIF-1 $\alpha$  的表达,这也是 CoCl<sub>2</sub> 处理后人 RPE 细胞较空白对照组 HIF-1 活性增强的原因。本研究中采用 Western blot 法检测证实 pFLAG-PHDs 能够成功转染至人 RPE 细胞内并能够表达外源性 PHDs 蛋白质,同时 PHD<sub>2</sub> 在人 RPE 细胞中的表达明显强于 PHD<sub>1</sub> 和 PHD<sub>3</sub>。

荧光素酶报告基因检测试剂盒以荧光素为底物来检测萤火虫荧光素酶。萤火虫荧光素酶在催化荧光素发生氧化的过程中发出生物荧光,用荧光测定仪可测定释放的生物荧光,当底物达到一定量时,测得的发光量总值与样品的荧光素酶活性成正比,因此可通过测量荧光素酶报告基因的生物荧光间接反映 HIF-1 $\alpha$  与 HRE 的结合情况。本研究中将与 HIF-1 $\alpha$  相结合的 HRE 基因片段通过 6 倍 HRE 插入在萤火虫荧光素酶上游启动子构成 6 倍 HRE-Luc,以放大 HIF-1 $\alpha$  的反应效果,便于观察研究。作为空白对照的 pFLAG-CMX 可反映人 RPE 细胞在常氧、低氧及缺氧条件下内源性 HIF-1 $\alpha$  的转录活性,在低氧及缺氧条件下 HIF-1 $\alpha$  转录活性明显高于常氧组。本研究表明,常氧情况下转染 pFLAG-PHD<sub>1</sub>、pFLAG-PHD<sub>2</sub> 和 pFLAG-PHD<sub>3</sub> 后细胞中的 HIF-1 $\alpha$  活性接近空白对照的 pFLAG-CMX 转染组,说明在常氧状态下 HIF-1 $\alpha$  的活性很低,在转染外源性 PHD<sub>1</sub>、PHD<sub>2</sub> 和 PHD<sub>3</sub> 后对 HIF-1 $\alpha$  负性调节的作用依然有限;而在低氧及缺氧状态下,空白对照 pFLAG-CMX 转染组的 HIF-1 $\alpha$  的活性明显增强。在低氧及缺氧下,pFLAG-PHD<sub>1</sub>、pFLAG-PHD<sub>2</sub> 和 pFLAG-PHD<sub>3</sub> HIF-1 $\alpha$  的活性受到明显抑制,与空白对照组相比差异均有统计学意义,且 PHD<sub>2</sub> 的抑制作用较其他两者更显著,而 PHD<sub>1</sub> 与 PHD<sub>3</sub> 之间的抑制作用比较,差异无统计学意义。

综上所述,在人 RPE 细胞中外源性 PHD<sub>2</sub> 在低氧及缺氧状态下对 HIF-1 的激活通路有明确的负性调节

作用,提示我们 PHD<sub>2</sub> 蛋白可能通过抑制 HIF-1 的活性,抑制 VEGF 的表达,从而为眼部新生血管性疾病的治疗提供新的思路。此外,本研究也提示我们应对其他 HIF 激活通路上的负性蛋白进行深入研究。

## 参考文献

- [1] Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1 [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(9): 4604-4613.
- [2] Lu Y, Madu C, Masters J, et al. Development of a novel anti-HIF-1 $\alpha$  screening system coupled with biochemical and biological validation for rapidly selecting potent anti-cancer compounds [J]. *J Cancer*, 2014, 5(6): 417-424. DOI:10.7150/jca.9205.
- [3] Cervera AM, Apostolova N, Luna-Crespo F, et al. An alternatively spliced transcript of the PHD<sub>3</sub> gene retains prolyl hydroxylase activity [J]. *Cancer Lett*, 2006, 233(1): 131-138. DOI:10.1016/j.canlet.2005.03.004.
- [4] Steinhoff A, Pientka FK, Möckel S, et al. Cellular oxygen sensing: Importins and exportins are mediators of intracellular localisation of prolyl-4-hydroxylases PHD<sub>1</sub> and PHD<sub>2</sub> [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 387(4): 705-711. DOI:10.1016/j.bbrc.2009.07.090.
- [5] Forooghian F, Razavi R, Timms L. Hypoxia-inducible factor expression in human RPE cells [J]. *Br J Ophthalmol*, 2007, 91(10): 1406-1410. DOI:10.1136/bjo.2007.123125.
- [6] Huang H, van de Veire S, Dalal M, et al. Reduced retinal neovascularization, vascular permeability, and apoptosis in ischemic retinopathy in the absence of prolyl hydroxylase-1 due to the prevention of hyperoxia-induced vascular obliteration [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(10): 7565-7573. DOI:10.1167/iovs.11-8002.
- [7] Pournaras CJ, Miller JW, Gragoudas ES, et al. Systemic hyperoxia decreases vascular endothelial growth factor gene expression in ischemic primate retina [J]. *Arch Ophthalmol*, 1997, 115(12): 1553-1558. DOI:10.1001/archophth.1997.01100160723009.
- [8] Bruck RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF [J]. *Science*, 2001, 294(5545): 1337-1340. DOI:10.1126/science.1066373.
- [9] Notari L, Miller A, Martínez A, et al. Pigment epithelium-derived factor is a substrate for matrix metalloproteinase type 2 and type 9; implications for downregulation in hypoxia [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(8): 2736-2747. DOI:10.1167/iovs.04-1489.
- [10] Chen MC, Lee CF, Huang WH, et al. Magnolol suppresses hypoxia-induced angiogenesis via inhibition of HIF-1/VEGF signaling pathway in human bladder cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(9): 1278-1287. DOI:10.1016/j.bcp.2013.02.009.
- [11] Imtiyaz HZ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010, 345(6): 105-120. DOI:10.1007/82-2010-74.

(收稿日期:2016-01-19)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

## 本刊对中英文摘要的要求

论著或综述文稿正文请撰写中英文摘要。原创性论著文稿要求为结构性摘要,包括背景(Background)、目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusions) 5 个要素,摘要应能够回答以下问题:(1)为什么进行这项研究。(2)主要用什么方法进行的研究。(3)获得什么主要结果。(4)通过研究得出什么结论等。其中背景部分请概括本课题所涉及的研究内容及亟待解决的问题。目的部分为本课题对上述提出问题设立的目标。方法部分应提供研究对象、样本量、分组情况、各组的干预情况、与研究相适应的观察或检测指标,获得结局指标的手段和设备等。临床研究请说明是前瞻性研究、回顾性研究还是观察性研究。结果部分请客观描述研究的主要发现,包括主要的形态学检查表现、相关的关键性或主要的量化资料以及相应的统计学比较结果,须写明统计学量值及其概率值。结论部分请提出与本研究论据直接相关的、必然的推论,避免得出过度推测性、评价性和扩大化的结论。摘要请用第三人称客观表述,不列图表,不引用文献,不加评论和解释。英文摘要应与中文摘要内容相对应,但为了对外交流的需要,可以略详细。英文摘要应包括论文题名(正体)及全部作者姓名(汉语拼音,姓在前,首字母大写,名在后,首字母大写,双字连写。如:Yin Xiaohui)、标准化的单位名称、城市名称(汉语拼音)、邮政编码及国家名称(全部为斜体)。并请在另起一行处提供通信作者姓名的汉语拼音和 Email 地址,如 *Corresponding author: Yin Xiaohui, Email: xiaohuih@126.com*。专家述评或综述类文稿请撰写指示性中英文摘要,摘要内容应包含研究涉及的概念、研究的目的、综述资料的来源、复习的文献量、研究的新发现或应用领域、综合的结果和结论及其意义等必要的信息。

研究论文为前瞻性研究者应在中英文摘要结束处提供临床试验注册号,以“临床试验注册(Trial registration)”为标题,提供注册机构名称和注册号。前瞻性临床研究的论著摘要应注明遵循 CONSORT 声明(Consolidated Standards of Reporting Trials)(<http://www.consort-standart.org/home>)。

## 欢迎订阅《中华实验眼科杂志》

《中华实验眼科杂志》为中国科技论文统计源期刊、中国中文核心期刊和中国科学引文数据库(CSCD)核心期刊,月刊,96 面,每月 10 日出版,每期定价 16 元,邮发代号:36-13,国内外公开发行,欢迎到各地邮局或直接与本刊编辑部联系订阅。联系电话:0371-65580157。

(本刊编辑部)