

Dll4 和 VEGFR 在氧诱导视网膜病小鼠模型中的表达及意义

刘王凯¹, 苏毅华², 李晓瑜¹, 李易娟¹, 黄越芳¹, 余慕雪¹, 庄思齐^{1*}

(中山大学附属第一医院 1.儿科, 2.眼科, 广东广州 510080)

摘要:【目的】为了分析 Dll4、VEGFR-1、VEGFR-2 在视网膜新生血管中的表达,探讨 Notch1-Dll4 信号通路在氧诱导视网膜病小鼠新生血管形成中的作用。【方法】选用鼠龄 7 d 的 C57BL/6J 新生鼠 30 只,分成实验组和对照组。实验组 15 只,在氧浓度为(75±2)%的密闭容器中生长 5 d,回到室内正常空气中;对照组 15 只,在室内正常空气中生长。两组各取产后 7 d (7 d post-partum, p7)、p12、p17 新生鼠 5 只,摘除眼球,取视网膜提取 RNA,以 RT-PCR 方法检测 Dll4、VEGFR-1、VEGFR-2 在视网膜中 mRNA 的表达。【结果】RT-PCR 结果显示,在 p7 和 p12 时间点时,两组间 VEGFR-1 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$);在 p17 时间点时,两组间 VEGFR-1 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$),实验组表达量低于对照组;VEGFR-2 在各时间位点两组间表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$);在 p7 时间点时,两组间 Dll4 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$);在 p12 和 p17 时间点时,两组间 Dll4 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.05$),实验组表达量低于对照组;实验组不同时间点 VEGFR-1、Dll4 的表达,随着时间的延长而下降 ($P < 0.05$, $P < 0.05$);VEGFR-2 的表达,随着时间的延长而升高 ($P < 0.05$);对照组不同时间点的 VEGFR-2 表达随着时间延长而增加 ($P < 0.05$),而 VEGFR-1 和 Dll4 的表达均不随时间变化而变化 ($P > 0.05$, $P > 0.05$);Dll4 的表达与 VEGFR-1 的表达呈正相关关系,相关系数 $r = 0.905$, $P < 0.001$;而 Dll4 与 VEGFR-2、VEGFR-1 与 VEGFR-2 之间不存在相关关系。【结论】Notch1-Dll4 信号通路可能参与了 VEGF 调控视网膜新生血管生成的过程,Dll4 在氧诱导视网膜病小鼠新生血管的形成中表达受到抑制,对 VEGF 未能进行有效负反馈调控;VEGFR-1 的表达受到抑制,且与 Dll4 表达存在正相关关系;VEGFR-2 可能不是视网膜新生血管形成过程中 VEGF 表达的主要受体。

关键词: Dll4; VEGFR; 早产儿视网膜病; 新生血管; 动物模型

中图分类号: R72 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2015)06-0857-07

Expression of Dll4 and VEGFR with Their Significance in Mice Model of Oxygen-Induced Retinopathy

LIU Wang-kai¹, SU Yi-hua², LI Xiao-yu¹, LI Yi-juan¹, HUANG Yue-fang¹, YU Mu-xue¹, ZHUANG Si-qi^{1*}

(1.Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2.Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: ZHUANG Si-qi; E-mail: suesq@126.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the role that Notch1-Dll4 signal pathway played in the oxygen-induced retinal neovascularization of mice by analyzing the expression of Dll4, VEGFR-1, and VEGFR-2 in retinal neovascularization. 【Methods】 Thirty 7-day-old C57BL/6J mice were divided into oxygen-induced retinopathy group and control group. In oxygen-induced retinopathy group, 30 mice were exposed to (75 ± 2) % oxygen for 5 days and then back to room air. In control group, 15 mice were raised in room air. Five mice were taken from each group at p7(7 d post-partum), p12, and p17, respectively, and then used the retinas to extract RNA. mRNA expression of Dll4, VEGFR-1 and VEGFR-2 was detected in retinas by RT-PCR. 【Results】 There was no statistically significant differences in VEGFR-1 expression between these two groups in p7 and p12 ($P > 0.05$). VEGFR-1 expression of oxygen-induced retinopathy group was lower than the control group ($P < 0.05$). There was no statistically significant differences in VEGFR-2 expression between these two groups in each timing ($P > 0.05$). Dll4 expression between the two groups was

收稿日期: 2015-08-30

作者简介: 刘王凯, 硕士, 主治医师, E-mail: kaidoctor@126.com; * 庄思齐, 通信作者, 主任医师, 硕士生导师, 中山大学附属第一医院儿科学科带头人、儿科教研室主任, E-mail: suesq@126.com

nearly the same in p7 ($P > 0.05$), and the expression of oxygen-induced retinopathy group became lower in p12 and p17 ($P < 0.05$, $P < 0.05$). As time went on, the expression of VEGFR-1 and Dll4 decreased in each timing ($P < 0.05$, $P < 0.05$), and that of VEGFR-2 increased ($P < 0.05$) in oxygen-induced retinopathy group. In control group, the expression of VEGFR-1 and Dll4 protein did not change a lot from p7 to p17 ($P > 0.05$, $P > 0.05$), and that of VEGFR-2 increased ($P < 0.05$). It showed positive correlation between Dll4 and VEGFR-1, $r = 0.905$, $P < 0.001$. There was no correlativity between Dll4 and VEGFR-2, or between VEGFR-1 and VEGFR-2. 【Conclusion】 Notch1 - Dll4 signaling pathway may be involved in the regulation of VEGF in the process of retinal angiogenesis. The expression of Dll4 was inhibited in oxygen-induced retinopathy mice during the formation of neovascularization, so it failed to show negative feedback regulation to VEGF. The expression of VEGFR-1 was inhibited in oxygen-induced retinopathy mice and has a positive correlation with Dll4. EGFR-2 may not be the main receptor that VEGF expressed in retinal angiogenesis process.

Key words: Dll4; VEGFR; retinopathy of prematurity; neovascularization; animal model

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(6):857-863]

早产儿视网膜病 (retinopathy of prematurity, ROP) 是一种视网膜血管增殖性疾病, 其主要病理改变是视网膜新生血管的形成^[1]。由于视网膜新生血管的发病机制目前尚未完全明确, 临床上缺乏针对发病机制的治疗方法, 因此视网膜新生血管的发病机制一直是早产儿视网膜病变的研究热点^[2]。视网膜血管的发育受多种因素的调控, 其中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是目前发现的最强的促血管生长因子, 对视网膜新生血管的形成有着重要的调控作用。Notch 信号通路在无脊椎动物和脊椎动物中广泛存在, 该信号通路包括 Notch 受体、配体、CSL 蛋白等, 其中 Delta 样配体 4 (delta-like ligand 4, Dll4) 是人类 Notch 配体中的重要一种。Notch1-Dll4 信号通路在视网膜血管发育过程中起到负反馈调节 VEGF 的生物学效应。但在早产儿视网膜病变中 Notch1-Dll4 信号通路是否受到抑制, 及其对 VEGF 的调节作用究竟如何, 目前研究甚少。本研究拟通过检测 Dll4、血管内皮细胞生长因子受体 1 (vascular endothelial growth factor receptor1, VEGFR1) 及血管内皮细胞生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor2, VEGFR2) 在氧诱导视网膜病小鼠模型中的表达, 探讨 Notch1-Dll4 信号通路在早产儿视网膜病变中的作用, 并分析其对 VEGF 的调节作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物和仪器

1.1.1 实验动物 选用 7 日龄健康 C57BL/6J 幼新生鼠 60 只, 雌雄不限, 体质量约 3~4 g, 和哺乳母鼠一起喂养, 全部为 SPF 级动物, 由中山大学北

校区实验动物中心提供。

1.1.2 实验仪器 手术显微镜(蔡司公司, 德国); 配数码相机光学显微镜 (Leica 公司, 德国); ABI 7500 全自动荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国); 自制密封容器: 50 cm × 25 cm × 20 cm 大小, 容器盖设有 3 个圆形孔, 一孔为出气孔, 一孔插入氧气管, 另一孔与控氧仪相连, 鼠笼放置于容器内。实验室为清洁动物房, 室温保持 23℃, 湿度约 60%。

1.2 实验方法

1.2.1 氧诱导视网膜病小鼠新生血管模型的模型的建立 选用 7 日龄健康 C57BL/6J 幼新生鼠 30 只, 雌雄不限, 随机分成实验组和对照组。对照组 ($n = 15$ 只) 与哺乳母鼠一起置于普通鼠笼内, 于正常空气环境饲养。实验组 ($n = 15$ 只) 与哺乳母鼠一起置于普通鼠笼内, 放入自制密封容器内, 接入 100% 湿润医用纯氧气, 氧气的流量控制在 0.5 ~ 1 L/min, 用控氧仪持续监测容器内氧浓度, 使容器内氧浓度保持在 $(75 \pm 2)\%$ 。在此高氧环境中持续饲养 5 d, 生后第 12 天回到室内正常空气环境中饲养。两组各取 15 只新生鼠, 均于生后第 17 天以断颈法处死, 摘除眼球, 制作石蜡切片, 每只眼收取 10 张切片, 光学显微镜下观察, 计数每只眼球切片中突破视网膜内界膜的血管内皮细胞的平均核数, 在计数新生血管内皮细胞核时仅计算与视网膜内界膜有紧密联系的血管内皮细胞核。统计分析平均每张切片突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞核数。

1.2.2 RT-PCR 检测 VEGFR1、VEGFR2、Dll4 mRNA 在视网膜新生血管中的表达 设计好 VEGFR-1、VEGFR-2、Dll4 特异性引物。两组各取 7、12、17 d 新生鼠 5 只 (计为 p7, p12, p17), 以断颈法处死, 摘除眼球, 取视网膜提取 RNA, 一步法

荧光定量 PCR 反应,同时以 TBP 作为内参基因。

①引物设计合成:GenBank 上查找目的基因 mRNA 序列,在 CDS 区用 Primer express 2.0 软件设计特异性引物,序列如下(5'-3'):VEGFR1-F:CCGCGTCTTGCTCACCAT;VEGFR1-R:AAACTCAGTTCAGGCACTTTT;VEGFR2 -F:CTGTGGTTCTGCGTGGAG;VEGFR2 -R:AATCTGAAGGTTGTATTTGC;DLL4 -F:ACTG CTGCTGGCGGTACT;DLL4 -R:AAGGTTGCCTGGAAGTGC;TBP -F:GGGAAGATCTGAGTACTGAAGAA;TBP -R:CCCTGAGCATAAGGTGGAA。②提取总 RNA。③一步法荧光定量 PCR 反应,荧光定量仪 ABI 7500 全自动荧光定量 PCR 仪,反应结束后,由电脑自动分析并计算目的基因结果。

1.3 统计学分析

应用 SPSS19.0 对所有数据进行统计分析,计量资料以(均数 ± 标准差)表示,不同时间点两组间 3 种因子表达量的比较采用两独立样本 *t* 检验;计数资料用百分比表示,不同时间点两组间 3 种因子表达量的比较采用卡方检验,同一因子不同时间点比较采用趋势检验。各组因子 mRNA 表达相关性分析采用 Pearson 法。取 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 氧诱导视网膜病小鼠新生血管模型成功建立

新生小鼠眼球石蜡切片经 HE 染色后,光镜下可清楚地辨明视网膜的各层结构。15 只对照组小鼠 30 只眼 300 张切片中,仅在 10 张切片中见

到突破视网膜内界膜的新生血管内皮细胞(图 1A),平均每张切片中新生血管内皮细胞核数为(1.1 ± 1.5)个。15 只实验组小鼠 30 只眼 300 张切片中,可见较多突破内界膜的血管内皮细胞,单独或成簇出现(图 1B),平均每张切片中新生血管内皮细胞核数为(44.6 ± 19.1)个,与对照组比较,差异有统计学意义($t = 14.523, P < 0.001$)。

2.2 RT-PCR 检测 VEGFR1、VEGFR2、Dll4 mRNA 在视网膜新生血管中的表达

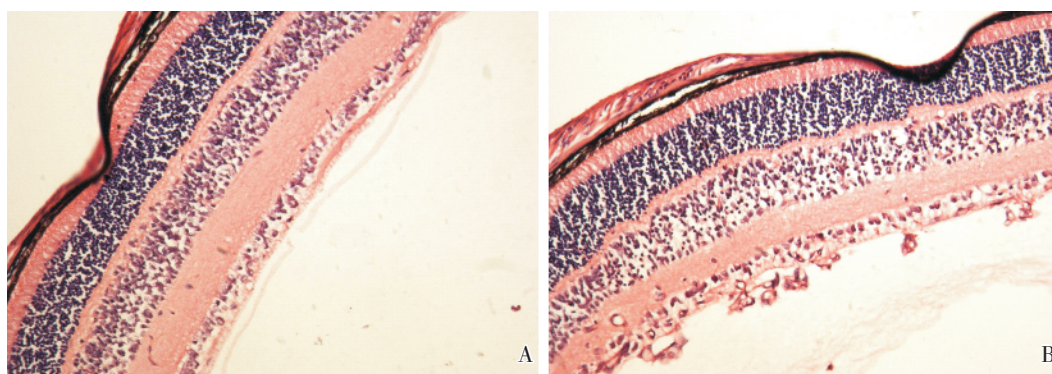
2.2.1 VEGFR-1 mRNA 在小鼠视网膜的表达 RT-PCR 结果显示,VEGFR-1 mRNA 在小鼠视网膜可检测到表达,在 p7 和 p12 时间点时,两组间 VEGFR-1 表达差异无统计学意义($P > 0.05$);在 p17 时间点时,两组间 VEGFR-1 表达差异有统计学意义($P = 0.022$),实验组表达量要远低于对照组(表 1)。

表 1 实验组和对照组 VEGFR-1 在不同时间点的表达比较

Table 1 Expression of VEGFR-1 in the experimental and control group at different time points ($\bar{x} \pm s$)				
Group	<i>n</i>	p7	p12	p17
Experimental	5	0.836 ± 0.315	0.286 ± 0.086	0.208 ± 0.048
Control	5	0.780 ± 0.682	0.252 ± 0.115	0.380 ± 0.127
<i>t</i>		0.167	0.530	-2.834
<i>P</i>		0.872	0.610	0.022

2.2.2 VEGFR-2 mRNA 在小鼠视网膜的表达

RT-PCR 结果显示,VEGFR-2 mRNA 在小鼠视网膜可检测到表达,VEGFR-2 在两组间各时间点的表达差异无统计学意义($P > 0.05$,表 2)。



A: control group; B: Experimental group; 200 ×

图 1 对照组和实验组视网膜 HE 染色

Fig.1 HE staining of the retina in the control and experimental group

表 2 实验组和对照组 VEGFR-2 在不同时间点的表达比较

Group	n	P7	P12	P17
Experimental	5	0.102 ± 0.030	0.560 ± 0.208	0.586 ± 0.165
Control	5	0.102 ± 0.128	0.758 ± 0.284	1.060 ± 0.534
t		<0.001	-1.256	-1.897
P		1.000	0.244	0.094

2.2.3 Dll4 mRNA 在小鼠视网膜的表达 RT-PCR 结果显示, Dll4 mRNA 在小鼠视网膜可检测到表达, 在 p7 时间点时, 两组间 Dll4 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在 p12 和 p17 时间点时, 两组间 Dll4 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 实验组表达量低于对照组(表 3)。

表 3 实验组和对照组 Dll4 在不同时间点的表达比较

Group	n	P7	P12	P17
Experimental	5	0.278 ± 0.128	0.058 ± 0.022	0.060 ± 0.020
Control	5	0.290 ± 0.207	0.100 ± 0.029	0.168 ± 0.089
t		-0.110	-2.585	-2.656
P		0.915	0.032	0.029

2.2.4 两组三种 mRNA 不同时间点的表达进行趋势检验 实验组 VEGFR-1、Dll4 的表达, 随着时间的延长而下降 ($P < 0.05$); VEGFR-2 的表达, 随着时间的延长而升高 ($P < 0.05$; 表 4)。对照组的 VEGFR-2 表达随着时间延长而增加 ($P = 0.001$), 而 VEGFR-1 和 Dll4 的表达均不随时间变化而变化 ($P = 0.145$ 和 $P = 0.168$, 表 4)。

2.2.5 三种 mRNA 表达的相关性分析 Dll4 的表

达与 VEGFR-1 的表达呈正相关关系, 相关系数 $r = 0.905$, $P < 0.001$; 而 Dll4 与 VEGFR-2、VEGFR-1 与 VEGFR-2 之间不存在相关关系 ($r = -0.181$ 或 -0.265 , $P = 0.338$ 或 0.157)。

3 讨论

3.1 对氧诱导视网膜病小鼠动物模型的评价

ROP 的病因尚未完全明确, 目前认为根本原因是早产儿视网膜发育未成熟, 在吸氧等外因作用下, 视网膜血管增生导致 ROP。而低出生体质量、早产和吸氧是公认的高危因素^[1-4], 吸氧更是作为诱发 ROP 的主要外在因素被广泛应用于动物模型实验中。本实验参照了 Smith 等^[5]在 1994 年研究成功的氧诱导视网膜病小鼠模型进行简化调整, 我们将小鼠置于 $(75 \pm 2)\%$ 的高氧中 5 d 后, 回到正常空气环境中, 成功制备了与 Smith 研究相类似的视网膜病小鼠模型。实验结果表明, 该模型的视网膜血管增生改变与人类早产儿视网膜病相似, 且可对小鼠视网膜新生血管进行定量研究, 对研究早产儿视网膜病的发病机制及药物治疗提供了较好的实验对象。Connor 等^[6]和 Charrad 等^[7]发现, 7 日龄小鼠在持续高氧 5 d 后即生后第 12 天出现部分视网膜血管闭塞伴 VEGF 表达明显减弱, 而回到正常空气环境中在生后第 17 天时新生血管增生达到高峰, 同时伴 VEGF 表达显著增强, 故本实验选择生后第 7、12、17 天为取样检测的时间位点。

3.2 VEGFR-1、VEGFR-2 在小鼠视网膜中的表达分析

ROP 的发病机制目前认为主要是视网膜血管发育不全和新生血管形成^[8]。大量研究均证实 VEGF 在 ROP 新生血管形成过程中在基因水平发

表 4 两组三种 mRNA 不同时间点的表达进行趋势检验

Table 4 Trend test of three kinds of mRNA expression in two groups at different time points

Group	Factor	n	p7	p12	p17	F	P
Experimental	VEGFR-1	5	0.836 ± 0.315	0.286 ± 0.086	0.208 ± 0.048	27.129	<0.001
	VEGFR-2	5	0.102 ± 0.030	0.560 ± 0.208	0.586 ± 0.165	24.538	<0.001
	Dll4	5	0.278 ± 0.128	0.058 ± 0.022	0.060 ± 0.020	20.795	0.001
Control	VEGFR-1	5	0.780 ± 0.682	0.252 ± 0.115	0.380 ± 0.127	2.424	0.145
	VEGFR-2	5	0.102 ± 0.128	0.758 ± 0.284	1.060 ± 0.534	18.010	0.001
	Dll4	5	0.290 ± 0.207	0.100 ± 0.029	0.168 ± 0.089	2.156	0.168

生了显著变化,提示 VEGF 对 ROP 视网膜新生血管的形成可能起着决定性的作用^[9-11]。VEGF 与其受体结合后产生活性,VEGF 受体包括 VEGFR-1、VEGFR-2 和 VEGFR-3^[12]。

VEGFR-1 表达于血管内皮细胞,是维持新生儿视网膜的血管的关键^[13],VEGFR-1 可竞争性与 VEGF 结合,减少 VEGF 与 VEGFR-2 的结合,作为 VEGFR-2 的负调节剂。本实验发现,VEGFR-1 mRNA 的表达在 p7 和 p12 时间点时,两组间 VEGFR-1 表达差异无统计学意义,在 p17 时间点时,VEGFR-1 表达实验组低于对照组。趋势检验提示,实验组 VEGFR-1 mRNA 的表达,随着时间的延长而下降,在 p17 达到谷底,其变化与 VEGF 的表达恰恰相反,与 Dll4 的表达一致。对照组的 VEGFR-1 表达不随时间变化而变化。实验结果与文献相似,说明在视网膜血管发育的早期 VEGFR-1 起着维持血管生存的作用,而在 ROP 组出现了 VEGFR-1 的表达下降,说明随着 VEGF 的显著增加,VEGFR-2 等受体与 VEGF 的结合增加,抑制了 VEGFR-1 的表达;而 VEGFR-1 mRNA 蛋白的表达变化趋势与 Dll4 的表达一致,提示了可能是 Notch1-Dll4 信号通路的抑制下调了 VEGFR-1 的表达。

Donabue 等^[14]的研究显示,在 ROP 小鼠模型中,高氧环境时 VEGF 和 VEGFR-2 的表达降低,而回到相对低氧环境时两者表达皆明显升高。在本实验中我们发现,在实验组及对照组,两组间 VEGFR-2 mRNA 的表达也随着时间的延长而升高。对 VEGFR-2 mRNA 在不同时间点的表达进行趋势检验,发现 VEGFR-2 的表达随着时间的延长而升高,在第 17 天达到高峰,与文献报道的 VEGF 的表达高峰相同^[7],说明 VEGFR-2 是血管内皮 VEGF 表达的受体,它的表达随着 VEGF 的升高而升高。但 VEGFR-2 mRNA 的表达在两组间各时间点的表达差异无统计学意义,这一点与既往研究不同,考虑可能与动物数量较少、样本不足影响了统计结果有关。

3.3 Notch1-Dll4 在小鼠视网膜中的表达及其意义

Notch 信号通路包括 Notch 受体、配体、CSL 蛋白(CBF-1、Suppressor of Hairless、Lag-1)等。Notch 受体有 4 种,分别为 Notch 1~4^[15]。人类 Notch 配体包括 Delta1、Delta3、Delta4、Jagged1、Jagged2。Notch1-Dll4 信号通路在血管发生中起着重要的调

控作用,Notch1-Dll4 信号通路和 VEGF 共同调控新生血管的发育,可负反馈抑制 VEGF 的表达^[16]。Hellstrom 等^[17]发现,Notch1-Dll4 信号通路可抑制小鼠视网膜新生血管内皮尖端细胞的生成并减少新生血管的形成。

本实验中 RT-PCR 结果显示,Dll4 mRNA 在小鼠视网膜可检测到表达,在 p7 时间点时,两组间 Dll4 表达差异无统计意义;在 p12 和 p17 时间点时,两组间 Dll4 表达差异有统计学意义,实验组表达量低于对照组。趋势检验同样可发现实验组 Dll4 的表达随着时间的延长而下降,而对照组 Dll4 的表达不随时间变化而变化。实验结果显示,在 ROP 小鼠中 Dll4 的表达明显低于对照组,这提示了 Dll4 在氧诱导视网膜病小鼠新生血管中的表达受到抑制,不能对 VEGF 的过度表达进行有效负反馈调控,从而导致大量新生血管的形成。它提示了 Notch1-Dll4 信号通路在 ROP 小鼠新生血管的形成中受到抑制,也提示了在 ROP 的形成过程中,VEGF 大量表达却没有受到有效抑制的原因可能就在于 Notch1-Dll4 信号通路的被抑制。既往研究显示,VEGF 可促使 Dll4 mRNA 的表达增加^[18],对肿瘤血管注射高浓度的 VEGF 可引起血管内皮的尖端细胞中 Dll4 表达升高^[19],相反地,如果阻断肿瘤中 VEGF 的表达,其血管内皮细胞中 Dll4 的表达明显下降^[20]。在缺氧的环境下,Dll4 在肿瘤新生血管中的表达上调,可能是缺氧引起 VEGF 的大量增加而诱导 Dll4 表达升高,也可能是通过 Dll4 启动子上的缺氧反应元件 HRE 和 HIF1- α 直接上调 Dll4 的表达^[21]。另外,Notch 信号途径可受自身的反馈调节及其他因子如 Ras、wnt 等的调节^[22]。在本实验中,显然 VEGF 的上升并不能引起 Dll4 的有效上调,其上调受到抑制的原因是否与低氧引起的 Dll4 的上游调节因子改变有关?这些尚有待下一步的实验研究证实。

3.4 Dll4 和 VEGFR-1 在小鼠视网膜中的表达相关分析

Jakobsson 等^[23]的研究揭示,Notch1-Dll4 信号通路和 VEGFR 在血管的生成中是一对有力的组合,Dll4 通过调节 VEGFR 的表达最终调控新生血管网的重建和功能形成。Dll4 降低 VEGF 的作用是通过调控 VEGF 受体家族来实现的,研究显示,Notch1-Dll4 信号通路的激活会导致血管内皮细胞中 VEGFR-1 的表达量上升^[24],减弱 VEGF 信号

通路的作用,并抑制新生血管的形成。本实验中我们的结果显示 Dll4 的表达与 VEGFR-1 的表达呈正相关关系,这一点与既往研究相符,提示了血管内皮细胞中 VEGFR-1 的表达与 Notch1-Dll4 信号通路的激活相关,也佐证了 Dll4 在氧诱导视网膜病小鼠新生血管的形成过程中,是通过上调 VEGFR-1 的表达来抑制 VEGF 的表达。

3.5 Dll4 和 VEGFR-2 在小鼠视网膜中的表达相关分析

Taylor 等^[25]在体外培养的血管内皮细胞中发现:VEGFR-2 的表达随着 Notch 通路的激活后会下调。而在 Dll4 基因缺失的血管内皮细胞中可以见到 VEGFR-2 的表达上升,在阻断 Dll4 的内皮细胞中也可观察到类似变化^[26]。本实验中 Dll4 与 VEGFR-2、VEGFR-1 与 VEGFR-2 之间并未显示有相关关系,这一点与既往文献有所不同,考虑原因可能有:①实验动物数量偏少,影响了统计结果;②在 ROP 新生血管形成的过程中,不能排除其他 VEGF 受体表达 VEGF,VEGFR-2 也许未必是 ROP 新生血管形成中 VEGF 表达的关键性受体^[27]。

综上所述,本研究成功建立了氧诱导视网膜病小鼠模型,并采用 RT-PCR 方法对该模型小鼠视网膜中 Notch1-Dll4、VEGFR1、VEGFR2 的表达变化进行观察。实验结果显示,在氧诱导视网膜病小鼠新生血管的形成中 Dll4 的表达受到抑制,这可能是 VEGF 的过度表达未能受到有效负反馈调控、从而导致大量新生血管形成的原因之一;血管内皮细胞中 VEGFR-1 的表达与 Notch1-Dll4 信号通路的激活相关,Dll4 在氧诱导视网膜病小鼠新生血管的形成过程中,可能是通过上调 VEGFR-1 的表达来抑制 VEGF 表达,达到抑制新生血管形成的目的;实验结果也提示,在氧诱导视网膜病小鼠新生血管的形成中,VEGFR-2 可能不是 VEGF 表达的主要受体。由于条件所限,本课题仍有一些需要改进的地方。作者希望对 Notch1-Dll4 信号通路在早产儿视网膜病中的作用研究,能进一步阐明 ROP 的发病机制,为临床防治 ROP 提供可靠的实验基础。

参考文献

[1] Gallo JE, Jacobson L, Broberger U. Perinatal factors associated with retinopathy of prematurity [J]. *Acta*

Pediatr, 1993, 82(9): 829-834.

- [2] Fajolu IB, Rotimi-Samuel A, Aribaba OT, et al. Retinopathy of prematurity and associated factors in Lagos, Nigeria[J]. *Paediatr Int Child Health*, 2015, Jul 13;2046905515Y0000000045. [Epub ahead of print]
- [3] Yau GS, Lee JW, Tam VT, et al. Risk factors for retinopathy of prematurity in extremely preterm Chinese infants [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2014, 93(28): e314.
- [4] Ola DS, Dagfinn A. In search of the optimal oxygen saturation for extremely low birth weight infants: a systematic review and meta-analysis [J]. *Neonatology*, 2011, 100(9): 1-8.
- [5] Smith LEH, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse [J]. *IOVS*, 1994, 35(1): 101-111.
- [6] Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, et al. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(11): 1565-1573.
- [7] Charrad RS, Archer R, Ash JD. Age-dependent severity of oxygen-induced ischemic retinopathy in mice is associated with a higher sustained expression of VEGF [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: E-Abstract 3263-B816.
- [8] Sapielha P, Joyal JS, Rivera JC, et al. Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. [J]. *Clin Invest*, 2010, 120(9): 3022-3032.
- [9] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation [J]. *Nature*, 2000, 407(14): 242-248.
- [10] Lashkari K, Hirose T, Yazdany J, et al. Vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor levels are differentially elevated in patients with advanced retinopathy of prematurity [J]. *Anl J Pathol*, 2000, 156(4): 1337-1344.
- [11] Ali AA, Hussien NF, Samy RM, et al. Polymorphisms of vascular endothelial growth factor and retinopathy of prematurity [J]. *Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 2015, 52(4): 245-253.
- [12] Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(5): 1011-1027.
- [13] Shih SC, Ju M, Liu M, et al. Selective stimulation of VEGFR-1 prevents oxygen-induced retinal vascular

- degeneration in retinopathy of prematurity [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(1): 50-57.
- [14] Donabue SP. Retinopathy of Prematurity [J]. *Br J Ophthalmol*, 2002, 8(10):1071-1084.
- [15] Uyttendaele H, Marazzi G, WuG, et al. Notch4/int3, a mammalian protooncogene, in all endothelial cell specific mammalian Notch gene [J]. *Development*, 1996, 122(7): 2251-2259.
- [16] Hellström M, Phng LK, Gerhardt H. VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting [J]. *Cell Adh Migr*, 2007, 1(3):133-136.
- [17] Hellström M, Phng LK, Hofmann JJ, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis [J]. *Nature*, 2007, 445 (7129): 776-780.
- [18] Yang C, Guo Y, Jadowiec CC, et al. Vascular endothelial growth factor -A inhibits EphB4 and stimulates delta -like ligand 4 expression in adult endothelial cells [J]. *Surg Res*, 2013, 183(1): 478-486.
- [19] Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, et al. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting nonproductive angiogenesis [J]. *Nature*, 2006, 444 (7122): 1032-1037.
- [20] Miles KM, Seshadri M, Ciamporcero E, et al. Dll4 blockade potentiates the anti-tumor effects of VEGF inhibition in renal cell carcinoma patient -derived xenografts[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112371. doi: 10.1371/journal.pone.0112371. eCollection 2014.
- [21] Diez H, Fischer A, Winkler A, et al. Hypoxia-mediated activation of Dll4 -Notch -Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(1):1-9.
- [22] Carmena A, Buff E, Halfon MS, et al. Reciprocal regulatory interactions between the Notch and Ras signaling pathways in the Drosophila embryonic mesoderm[J]. *Dev Biol*, 2002, 244(9):226- 242.
- [23] Jakobsson L, Bentley K, Gerhardt H. VEGFRs and Notch: a dynamic collaboration in vascular patterning [J]. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37 (Pt 6):1233-1236.
- [24] Harrington LS, Sainson RC, Williams CK, et al. Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Microvasc Res*, 2008, 75(2):144-154.
- [25] Taylor KL, Henderson AM, Hughes CC. Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR -2/KDR expression [J]. *Microvasc Res*, 2002, 64(3): 372-383.
- [26] Suchting S, Freitas C, le Noble F, et al. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 27, 104(9): 3225-3230.
- [27] Benedito R, Rocha SF, Woeste M, et al. Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling[J]. *Nature*, 2012, 18, 484(7392):110-114.

(编辑 刘清海)