

# 低氧诱导因子在兔慢性缺血心肌中的表达趋势\*

徐夏红<sup>1</sup>, 王强<sup>2</sup>, 董红燕<sup>1\*</sup>, 姜波<sup>2</sup>, 张中明<sup>2</sup>

(1 徐州医学院神经生物学研究中心, 江苏 徐州 221002; 2 徐州医学院附属医院胸心外科, 江苏 徐州 221002)

**摘要:**目的 探讨低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )在兔缺血心肌的表达趋势。方法 建立兔缺血心肌动物模型,于冠状动脉结扎前及术后第 2、4、6、8、10、12周取各组动物缺血区心肌组织,采用荧光定量逆转录-聚合酶链反应(Q-RT-PCR)法测定心梗区 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达;应用免疫组化及 Western Blot法测定 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达。结果 与非缺血组相比,兔心肌缺血早期 HIF-1 $\alpha$  表达水平显著增高 ( $P < 0.01$ ), HIF-1 $\alpha$  mRNA 及蛋白分别于第 2 及第 4 周达到高峰,持续约 2~4 周后,于第 8 周再次升高,并随之开始持续缓慢降低,但在缺血后第 12 周仍高于正常心肌表达量。结论 HIF-1 $\alpha$  的表达与心肌梗死区氧供关系密切,在心肌缺血早期,高表达 HIF-1 $\alpha$  参与了维持氧稳态及对低氧代谢的适应,在慢性缺氧期,随着 HIF-1 $\alpha$  调控多种下游靶基因表达,增加组织氧供使其表达渐显著降低。

**关键词:**低氧诱导因子;心肌缺血;基因表达;兔

**中图分类号:** Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2065(2010)01-0028-03

## The trend of the expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ in ischemic rabbit myocardium subjected to long-term ischemia

XU Xiaohong<sup>1</sup>, WANG Qiang<sup>2</sup>, DONG Hongyan<sup>1\*</sup>, JIANG Bo<sup>2</sup>, ZHANG Zhongming<sup>2</sup>

(Center of Neurobiology Research, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China; 2 Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002)

**Abstract:** Objective To investigate the trend of the expression of exogenous HIF-1 $\alpha$  gene in rabbit myocardium subjected to long-term ischemia. Methods Animal models of myocardial ischemia were established with ligation of the left anterior descending coronary artery in China white rabbits ( $n=42$ ). The animals were divided into 7 groups according to different time points of ischemia. Myocardium from ischemic locus in each rabbit was obtained under anaesthesia at the corresponding (2nd, 4th, 6th, 8th, 10th and 12th) weeks. Expression of HIF-1 $\alpha$  was assayed by immunohistochemical staining, real-time fluorescent quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-Q-PCR) and western blot respectively. Results From the onset of ischemia, there was a significant increase in exogenous HIF-1 $\alpha$  mRNA and protein levels with a bimodal pattern of elevation; the levels of HIF-1 $\alpha$  mRNA and protein reached their first peaks at the 2nd and 4th weeks ( $P < 0.01$ ) respectively, and subsequently decreased. The deuto-peaks occurred at the 8th week ( $P < 0.05$ ) of ischemia, followed by a decrease until the nadir at the 12th week, at which the HIF-1 $\alpha$  expression levels still remained higher than the pre-ischemia levels ( $P < 0.01$ ). Conclusion The expression of exogenous HIF-1 $\alpha$  is closely related to the oxygen supply in the infarcted loci. During the early stage of ischemia, upregulated HIF-1 $\alpha$  is involved to maintain tissue oxygen homeostasis, while during chronic hypoxia, HIF-1 $\alpha$  regulates the expressions of down-stream target genes and enhances myocardial oxygen supply, which in turn downregulates the expression of HIF-1 $\alpha$ .

**Key words:** hypoxia-inducible factor; myocardial ischemia; gene expression; rabbit

低氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 是调节血管新生的重要细胞生长因子,参与多种缺血缺氧性疾病的病理生理过程<sup>[1]</sup>。它主要通过一系列缺氧反应靶基因的特定结合位点——缺氧反应元件 (hypoxic response element, HRE) 结合,精确地调控下游多种重要的调节血管新生基因的表达,从而有效地改善缺血缺氧组织及器官的功能。

低氧状态下, HIF-1 $\alpha$  基因表达迅速上调,但在长期的缺血心肌中 HIF-1 $\alpha$  的表达及变化趋势,国内外鲜见研究报道。本研究在动物整体水平,探讨在较长期心肌梗死过程中,内源性 HIF-1 $\alpha$  基因的表达水平及变化趋势,旨在为深入研究 HIF 在心肌梗死病理生理中的作用,探讨其对下游基因的调控作用提供实验依据<sup>[2]</sup>。

\* 基金项目:国家自然科学基金(30672081);江苏省教育厅重点资助项目(03KJA320140)

\* 通讯作者, E-mail: xzhdy@yahoo.com.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料和动物

1.1.1 实验动物 健康纯种中国大耳白兔,雌雄不限,共 42只,体重 2~2.5(2.3±0.15)kg 由徐州医学院实验动物中心提供。

1.1.2 实验材料 Q-RT-PCR 试剂盒(上海基康公司), Trizol 裂解液(北京鼎国生物公司), KOD DNA 聚合酶及 ReverTra Ace 逆转录酶(Toyobo Company, Japan); HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体(小鼠抗兔, Chemicon Company, USS); SP 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒(北京中山生物公司)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 心肌缺血动物模型的制作 动物麻醉后,胸部正中切口开胸,显露心脏。显露左冠状动脉的左室降支。在其中上 1/3 交界处以 6/0 无损伤丝线缝扎。结扎点下方及心尖部可见局部心肌颜色青紫,确认局部心肌缺血后关胸。常规饲养,术后连续 3 天肌肉注射青霉素 20 万 U 预防感染。

1.2.2 实验分组 根据缺血时间差异,将动物模型随机分为 6 组(每组 6 只)。分别于缺血后第 2、4、6、8、10、12 周再次开胸,快速取缺血标记区心肌组织;对照组(6 只)取正常左心室心肌。获取的心肌组织分别以液氮保存(Q-RT-PCR 及 Western-blot)及 10% 中性甲醛固定,待测。

### 1.2.3 HIF-1 $\alpha$ 表达检测指标

1.2.3.1 心肌 SP 免疫组化染色 心肌组织常规石蜡包埋、切片。甲醇-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭内源性过氧化物酶,0.03% TritonX-100 处理切片 10 min, PBS 冲洗,加入小鼠抗兔 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体(1:150) 4 $^{\circ}$ C 过夜;加羊抗小鼠 IgG-AP 二抗,37 $^{\circ}$ C、30 min, PBS 冲洗 3 次;DAB 显色后,光镜下观察,出现棕黄色及棕褐色颗粒为染色阳性。

1.2.3.2 Q-RT-PCR 检测 内参参  $\beta$ -actin (102 bp), 采用试剂盒自带引物(美国 A&B 及上海基康公司); HIF1 $\alpha$  (89 bp) 上游引物: 5'-CAT GCC CCA GAT TC AAGATCA-3', 下游引物: 5'-TGG-TAG GC TC AG GT GA ACTCTG-3'; 荧光探针: 5'(FAM)-FCAGCAAGTCCTTCTGATGGAAGCACCAP-(TAMRA)p-3'。PCR 实验方法参照试剂盒说明书进行,采用 A&B7300 实时荧光定量 PCR 仪进行检测。

1.2.3.3 Western-blot 检测 每组取 100 mg 心肌组织, Lowry 法测定蛋白浓度。采用蛋白免疫印迹法:将蛋白提取液加入 1/3 体积 4 $\times$ 蛋白处理液, 10%

SDS-PAGE 电泳;半干电转移法(电转条件为 3.0 mA/cm<sup>2</sup> 转 40 min)电转至孔径为 0.45  $\mu$ m 硝酸纤维素膜。加入封闭液,室温封闭 3 h。分别加入一抗(小鼠抗兔 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体, 1:300), 4 $^{\circ}$ C 过夜;洗膜,加入羊抗小鼠 IgG-AP, (1:100) 室温 2 h, NBT/BCIP 显色,将所得显色条带进行扫描、半定量分析。

1.3 统计学处理 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示;应用 SigmaPlot 软件对 Western-blot 条带进行灰度分析, SPSS 11.5 统计软件进行数据统计。各组之间差异的比较采用 One-way ANOVA 方差分析, P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 梗死区心肌组织 HIF-1 $\alpha$  mRNA 基因表达 荧光实时定量 PCR 显示, 各组均可见 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达, 随缺血时间的延长, HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达呈先增加后减少趋势;缺血第 2 周, 心肌 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达均显著高于缺血 4~12 周 (P<0.01) (图 1)。缺血前仅见微量表达, 与其相比, 缺血后 2 周 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达至峰值 (P<0.01); 缺血 4~6 周, HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达依次降低, 第 8 周其表达略高于 6 周, 形成第 2 峰值; 第 12 周表达最低, 但仍然高于缺血前水平。与缺血前相比, 缺血后各时间点 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达均显著增加 (P<0.05 或 P<0.01)。

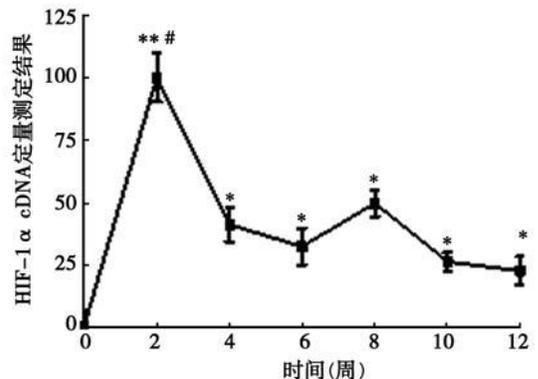


图 1 缺血心肌 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达测定结果  
与缺血前比较: \* P<0.05, \*\* P<0.01; 与缺血第 4~12 周比较: # P<0.01

2.2 梗死心肌免疫组化染色结果 免疫组化染色测定显示, 缺血前, 心肌组织未见 HIF-1 $\alpha$  阳性细胞; 与之相比, 缺血后第 4 周, 心肌组织内可见较多呈棕黄色染色阳性细胞(图 2)。

2.3 Western-blot 测定结果 梗死区心肌组织 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达呈先增加后降低趋势。心肌缺血

后 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达明显增高, 4 周后表达最强, 形成第 1 峰, 而后逐渐下降, 至第 8 周形成表达第 2 峰后再次下降, 随后, HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平随缺血时间延长而逐渐降低。在 12 周至最低水平, 但仍然高于缺血前水平 ( $P < 0.05$ )。统计分析显示, 缺血后各时间点 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达均显著高于缺血前水平 ( $P < 0.01$ ); 缺血第 4 周, 心肌 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达均显著高于缺血 2、6、8、10 及 12 周 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。

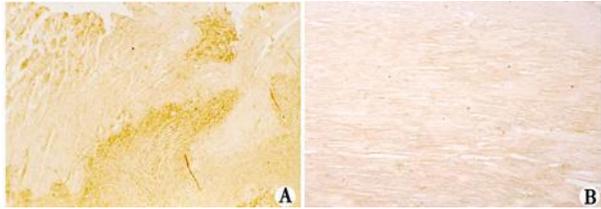


图 2 梗死心肌免疫组化染色结果 (DAB 染色,  $\times 100$ )

A. 缺血第 4 周, 心肌组织可见较多阳性细胞, 胞质染色较深; B. 缺血前心肌组织未见典型阳性细胞

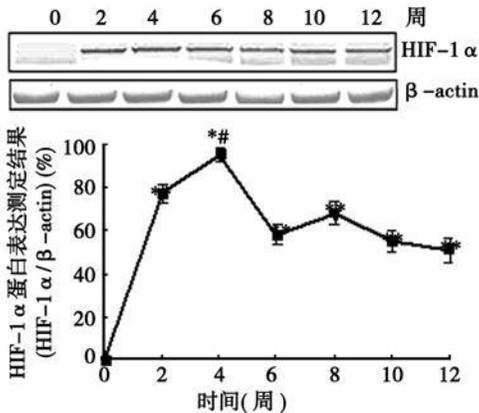


图 3 缺血心肌 HIF-1 蛋白表达测定结果

与缺血前比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与缺血第 2 周及第 6~12 周比较: #  $P < 0.05$

### 3 讨论

HIF 是一种 DNA 结合蛋白, 由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚单位组成的异源二聚体。在常氧条件下, HIF-1 $\alpha$  易被泛素-蛋白酶体复合途径所降解; 而在低氧环境下, HIF-1 $\alpha$  基因表达迅速上调, HIF-1 $\alpha$  降解过程被阻断, HIF-1 $\alpha$  蛋白降解的减缓可导致 HIF-1 $\alpha$  的堆积。因此, HIF-1 $\alpha$  蛋白表达量的多少可在一定程度上反映组织的氧供情况<sup>[3-4]</sup>。

HIF-1 $\alpha$  作为一种氧特异性依赖的转录因子, 在多种缺血缺氧性疾病过程中发挥了重要的调节作用。Semenza 等<sup>[5]</sup>发现, 缺氧可诱导 HIF 表达, 后者可与 EPO<sup>3'</sup>端增强子第一部分及 HRE 特异性结合, 调控多种基因的低氧诱导表达, 而当恢复常氧后,

HIF 的 DNA 活性迅速丧失, 蛋白迅速被分解。在生理条件下, 低氧是诱导产生 HIF-1 $\alpha$  及维持其活性的主要因素<sup>[6]</sup>。

本实验发现, 在兔心肌缺血模型中, 缺血心肌局部 HIF-1 $\alpha$  即迅速表达升高, HIF-1 $\alpha$  mRNA 及蛋白分别在第 2 周及第 4 周达到高峰; 随之其表达量逐渐下降, 持续约 2~4 周。在缺血第 8 周, HIF-1 $\alpha$  mRNA 及蛋白表达再次升高, 并随之开始持续缓慢地降低, 在第 12 周, HIF-1 $\alpha$  仍然显著高于缺血前水平。可见, 在心肌缺血缺氧急性期, 为维持低氧状态下的氧稳态, 参与梗死心肌的应激与自我保护, HIF-1 $\alpha$  大量快速地转录并持续表达; 而后随着其调控多种下游基因表达或提高细胞对低氧代谢的适应及改善组织氧供, 使其表达逐渐降低。Denise 等<sup>[7]</sup>认为, 在亚急性及慢性缺血期, HIF-1 $\alpha$  的低水平表达, 与心梗区的细胞增殖、血管再生及微循环改善等有关。

本实验结果显示, 缺血第 8 周, HIF-1 $\alpha$  mRNA 及蛋白表达高于第 6 周, 形成较低的第 2 表达峰, 可能因为模型动物手术 6 周后, 动物疼痛症状减轻, 其活动量加大、心肌耗氧量显著增多, 而局部缺血心肌的相对性缺氧导致再次上调 HIF 的表达。

### 参考文献:

- [1] Pugh CW, Ratcliffe PJ. The von hippel-lindau tumor suppressor hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation and cancer pathogenesis[J]. *Semin Cancer Biol* 2003, 13(1): 83-89.
- [2] 张中明, 姜波, 董红燕, 等. 低氧反应元件对低氧复氧状态下心肌细胞转染人血管内皮生长因子 165 基因表达的调控作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(12): 1510-1512.
- [3] Bruck RK. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor[J]. *Genes & Dev* 2003, 17(21): 2614-2623.
- [4] Qaum T, Xu Q, Jousseaume AM, et al. VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, 42(10): 2408-2413.
- [5] 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(12): 5447-5454.
- [6] Huang LE, Bunn HF. Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance[J]. *Biol Chem*. 2003, 278(22): 19575-19578.
- [7] Chen DA, Sutphin PD, Yen SE, et al. Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  [J]. *Mol Cell Biol* 2005, 25(15): 6415-6426.

收稿日期: 2009-06-22 修回日期: 2009-10-09

本文编辑: 程春开