

大鼠心肌缺血再灌注后不同时间点心脏及肝脏中 HIF-1、VEGF 的表达

吴冬鸣¹, 唐 燕², 韩 艺³, 白文莉², 谢利平², 刘 振², 孟国梁², 季 勇^{2*}

(¹淮南市第四人民医院肝病科, 江苏 淮安 223002; ²南京医科大学病理生理学系, 动脉粥样硬化中心, 江苏省心血管病分子干预重点实验室, 江苏 南京 210029; ³南京医科大学第一附属医院老年科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 探讨大鼠心肌缺血再灌注后不同时间点心脏和肝脏中缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的变化。方法: 结扎雄性成年 SD 大鼠冠状动脉左前降支, 缺血 30 min, 再灌注 6 h(I_{30min}R_{6h})或 24 h(I_{30min}R_{24h}), real-time PCR 法检测心肌组织中 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 水平, Western blot 法检测心肌以及肝脏组织中 HIF-1 α 、HIF-1 β 和 VEGF 蛋白表达的改变。结果: 与假手术组相比, I_{30min}R_{6h} 组心肌中 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 和蛋白水平明显增加, 但 I_{30min}R_{24h} 组无明显变化。心肌组织中 HIF-1 β 蛋白水平及肝脏中 HIF-1 α 、HIF-1 β 和 VEGF 蛋白水平在不同再灌注时间点无明显改变。结论: 心肌缺血再灌注影响心肌 HIF-1 和 VEGF 的表达, 但对肝脏中 HIF-1 和 VEGF 的表达无影响, 且其对心肌 HIF-1 和 VEGF 表达的影响与再灌注时间相关。

[关键词] 心肌; 缺血再灌注; HIF-1; VEGF

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)08-1047-05

The expression of HIF-1 and VEGF in myocardium and liver after myocardial ischemia reperfusion injury

WU Dong-ming¹, TANG Yan², HAN Yi³, BAI Wen-li², XIE Li-ping², LIU Zhen², MENG Guo-liang², JI Yong^{2*}

(¹Department of Hepatopathy, the Fourth People's Hospital of Huai'an City, Huai'an 223002; ²Department of Pathophysiology, NJMU, Key Laboratory of Cardiovascular Disease and Molecular Intervention, Atherosclerosis Research Centre, Nanjing 210029; ³Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of hypoxia-inducible factor 1(HIF-1) and vascular endothelial growth factor(VEGF) in myocardium and liver after myocardial ischemia reperfusion injury. **Methods:** Adult male SD rats were subjected to 30 min myocardial ischemia by ligation of the left anterior descending coronary artery and 6 h (I_{30min}R_{6h}) or 24h (I_{30min}R_{24h}) reperfusion. The protein expression of HIF-1 α , HIF-1 β and VEGF in myocardium and liver were examined by Western blot, and the mRNA levels of HIF-1 α and VEGF were determined by real-time PCR. **Results:** Compared with sham group, both protein and mRNA levels of HIF-1 α and VEGF were increased in the ischemic region of myocardium in I_{30min}R_{6h}, but unaffected in I_{30min}R_{24h}. The level of HIF-1 β was not different in myocardium among the three groups. But compared with sham group, there were no differences of the protein expression of HIF-1 α , HIF-1 β or VEGF in liver after myocardial I_{30min}R_{6h} or I_{30min}R_{24h}. **Conclusion:** The expression of HIF-1 α and VEGF in myocardium were affected in myocardial ischemia reperfusion injury whereas not changed in liver. The affection was associated with the time of reperfusion.

[Key words] myocardium; ischemia reperfusion; HIF-1; VEGF

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(8): 1047-1051]

随着临床上经皮冠状动脉介入、冠状动脉搭桥

以及溶栓治疗的广泛应用, 心肌缺血再灌注损伤已经成为阻碍缺血心肌从再灌注疗法中获得最佳疗效的主要难题^[1]。这种损伤可以诱导心肌细胞凋亡, 增加心肌梗死面积, 从而解释了急性心梗患者在进行有效的心肌再灌注之后病死率仍高达 10% 的原因^[2]。

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30971256); 江苏省高校自然科学研究重大项目(10KJA310033)

*通讯作者, E-mail: yongji@njmu.edu.cn

缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)作为缺氧转录反应的主要转录因子,参与细胞对缺氧微环境的适应性反应,在细胞缺氧后调节中起核心作用^[3]。HIF-1主要以异源二聚体 HIF-1 α 和 HIF-1 β 的形式存在。HIF-1 α 在非低氧细胞中几乎不表达,在缺氧条件下表达明显增加,而 HIF-1 β 几乎在所有细胞中广泛表达且不受氧张力的影响^[4-5]。HIF-1 可通过调控血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,进而影响局部氧供应和侧支血管的发生,在缺血再灌注损伤中发挥着重要的调节作用^[6-7]。Lee 等^[8]报道心肌梗死或急性心肌缺血的患者,在冠状动脉手术中行心室活检发现 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 及蛋白的表达都是增加的。此外,用过表达 HIF-1 α 的腺病毒感染大鼠心肌细胞可以减少缺血再灌注诱导的细胞死亡。目前在心肌缺血再灌注不同时间点心肌组织中 HIF-1 和 VEGF 水平的变化尚未阐明。

本实验在大鼠心肌缺血 30 min 再灌注 6 h 或 24 h 后,检测心肌及肝脏中 HIF-1 α 、HIF-1 β 和 VEGF 的变化,从而明确 HIF-1 和 VEGF 在心肌缺血再灌注过程中的变化情况。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物及分组

雄性 SD 大鼠,体重 220~260 g,由南京医科大学实验动物中心提供。于 12 h 明暗交替,室温 18℃~23℃的动物房内饲养。大鼠分为 3 组,分别为假手术组(Sham)、缺血 30 min 再灌注 6 h 组(I_{30min}R_{6h})、缺血 30 min 再灌注 24 h 组(I_{30min}R_{24h})。

1.1.2 主要试剂

兔抗大鼠 HIF-1 α 、VEGF 抗体(美国 Santa Cruz 公司)、HIF-1 β 抗体(美国 Cell Signaling 公司);小鼠抗大鼠 GAPDH 抗体(上海康成);辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠、羊抗兔 IgG (美国 Santa Cruz 公司);TRIzol、逆转录试剂盒、SYBR Green Master Mix (日本 TaKaRa 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的建立

本实验主要采用经典结扎冠状动脉左前降支再松开的方法建立大鼠心肌缺血再灌注损伤模型^[9]。雄性 SD 大鼠经 10%水合氯醛 3.5 ml/kg 麻醉后,固定,暴露气管,用内直径 2 mm 的导管从口咽部进行气管插管,插入后立即与啮齿类动物呼吸机连

接,进行人工通气。潮气量为 8 ml,呼吸比为 2:1,呼吸频率 70 次/min。沿胸骨纵向往剪开皮肤,用止血钳钝性分离肌肉,暴露胸骨左侧第 3~5 肋,于胸部左侧第 4 肋间打开胸腔,剪开心包膜,用自制的拉钩固定胸廓,充分暴露心脏,从左心耳下方进针,肺动脉圆锥下方出针,用 6/0 医用缝合线结扎前降支 30 min 后松开,逐层缝合胸腔。假手术组除不结扎冠状动脉左前降支外,其余步骤与手术组相同。再灌注 6 h 或 24 h 后,留取结扎线下的心肌和肝脏,于-80℃保存。

1.2.2 蛋白提取

取大鼠心脏结扎线以下的左心室心肌组织或肝脏组织 30 mg,修剪后加入 0.5 ml TBS(pH 7.4)匀浆,4℃、5 000 r/min,离心 10 min,弃上清。沉淀中加入 300 μ l Lysis buffer^[10],冰上孵育 30 min。4℃、12 000 r/min,离心 10 min,取上清 BCA 法测定蛋白浓度,剩余留于-80℃保存备用。

1.2.3 Western blot 分析

采用 3%的浓缩胶和 10%的分离胶行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。每孔上样蛋白量 60 μ g,75 V 恒压电泳约 30 min 后,转为 110 V 恒压电泳约 90 min,至溴酚蓝指示剂完全消失。用半干法将蛋白条带转移至 PVDF 膜上,于含 5%脱脂奶粉的 TBS-T 中,室温孵育 2 h,阻断 PVDF 膜上的非特异性蛋白结合位点。封闭结束后将膜置于杂交袋内,分别与抗 HIF-1 α 、HIF-1 β 、VEGF、GAPDH 的一抗在 4℃孵育过夜。洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗,室温下孵育 2 h;洗膜,ECL 显色。

1.2.4 实时定量 PCR(real-time PCR)

按照 TRIzol 标准提取总 RNA,逆转录成 cDNA,采用荧光定量 PCR 仪进行循环扩增。20 μ l 反应体系中加入上下游引物各 1 μ l,SYBR Green Mix 10 μ l,模板 2 μ l,DEPC 水 6 μ l。温度循环条件为:95℃预变性 10 min,95℃变性 15 s,60℃退火 1 min,循环 40 次。引物序列为:HIF-1 α (上游 5'-ACTGATTG-CATCTCCACCTTCT-3';下游 5'-TCGCTTCCTCTGACATTCT-3'),VEGF(上游 5'-TGCACCCACGACGAAGGG-3';下游 5'-TCACCGCCTTGGCTTGTCACAT-3'),以 18 s 基因(上游 5'-GTAACCCGTTGAA-CCCCATT-3';下游 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3')作为内参照。

1.3 统计学方法

用凝胶图象处理系统 Image J 分析目标带的分子量和光密度值。利用 Prism 5.0 统计软件进行资料

分析,各组计量资料均以均数 ± 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示。根据 Bartlett's test 作方差齐性检验,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验法。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌缺血再灌注后心肌组织中 HIF-1 水平的变化

结扎大鼠冠状动脉左前降支 30 min 再灌注 6 h 或 24 h 后,检测心肌组织中 HIF-1 α 、HIF-1 β 水平的变化。与假手术组相比,I_{30min}R_{6h} 组心肌组织中 HIF-1 α mRNA 和蛋白表达水平明显增加,I_{30min}R_{24h} 组无明显变化(图 1A、B),而 HIF-1 β 蛋白水平在各组中没有明显变化(图 1C)。

2.2 心肌缺血再灌注后心肌组织中 VEGF 水平的变化

检测心肌缺血 30 min 再灌注 6 h 或 24 h 损伤模型心肌组织中 VEGF 水平的改变。结果发现,I_{30min}R_{6h} 组心肌组织中 VEGF mRNA 和蛋白表达较假手术组明显增加,I_{30min}R_{24h} 组无明显变化(图 2)。

2.3 心肌缺血再灌注损伤后肝脏组织中 HIF-1 蛋白水平的变化

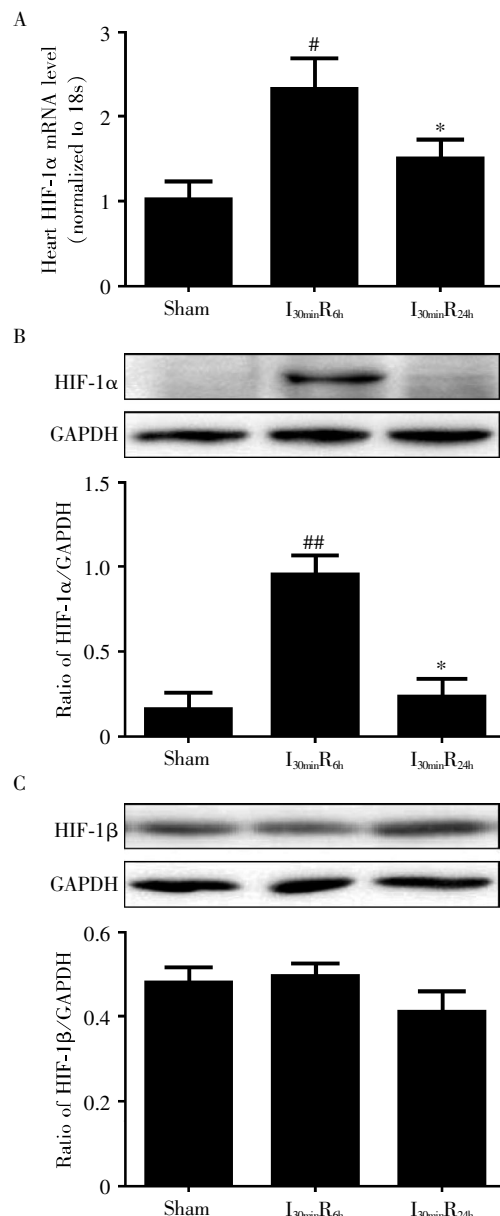
为了研究心肌缺血再灌注损伤是否会影响肝脏中相关蛋白水平的变化,我们检测了心肌缺血 30 min 再灌注 6 h 或 24 h 后肝脏组织中 HIF-1 的蛋白水平。如图 3 所示,I_{30min}R_{6h} 及 I_{30min}R_{24h} 组肝脏中 HIF-1 α 、HIF-1 β 蛋白水平均未发生明显改变。

2.4 心肌缺血再灌注损伤后肝脏组织中 VEGF 蛋白水平的变化

图 4 显示,I_{30min}R_{6h} 和 I_{30min}R_{24h} 组肝脏中 VEGF 蛋白水平没有发生明显改变,提示短时间的心肌缺血再灌注损伤并不会影响肝脏中相关蛋白水平。

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤是指在心肌血供中断一定时间内恢复血供,原缺血心肌发生较血供恢复前更严重的损伤或进一步的功能障碍,即心肌得到血液再灌注后,不仅功能没有得到恢复,心肌损伤反而加重,出现心律失常、梗死面积扩大等现象。心肌缺血再灌注损伤可导致心肌细胞损伤和心脏功能受损,严重影响疾病的预后。在心血管疾病治疗过程中,许多常用和新发展的治疗策略都不可避免地存在心肌缺血再灌注损伤,如急性心肌梗死溶栓术、经皮冠状动脉血管成形术、冠状动脉搭桥术、体外循环、心

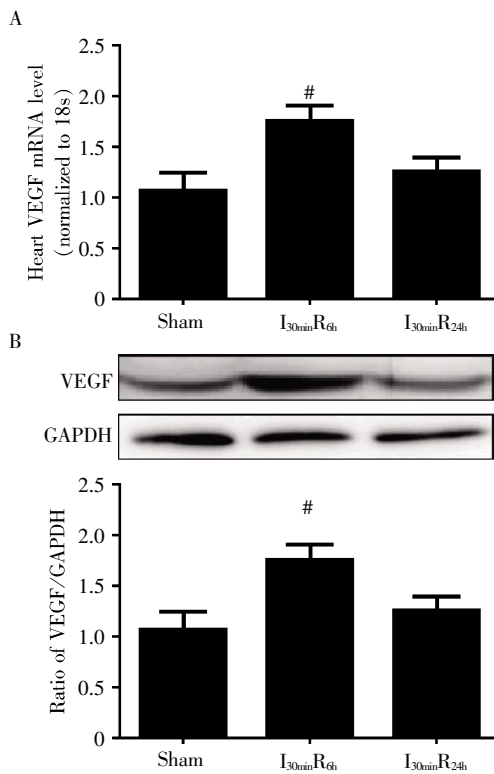


A: I/R 后心肌中 HIF-1 α 的 mRNA 水平; B: I/R 后心肌中 HIF-1 α 蛋白水平; C: I/R 后心肌中 HIF-1 β 蛋白水平。与 Sham 组比较, # $P < 0.05$, $n = 5$; ## $P < 0.01$, $n = 6$; 与 I_{30min}R_{6h} 组比较, * $P < 0.05$, $n = 6$ 。
图 1 大鼠心肌缺血再灌注损伤后心肌组织中 HIF-1 α 、HIF-1 β 水平的变化

Figure 1 The expression of HIF-1 α , HIF-1 β in myocardium of rats subjected ischemia reperfusion injury

内直视手术和心脏移植术等。因此研究心肌缺血再灌注损伤的机制对于提高缺血性心血管疾病的疗效有着十分重要的意义。

HIF 是在心肌氧平衡中起关键作用的转录因子,它可以通过调节多种靶基因的表达介导细胞缺氧反应,从而保护组织免受缺血损伤^[11]。HIF 有 α 和 β 两种亚基,其中 HIF-1 α 在细胞对缺氧应激的反应中起关键作用^[12-13]。在正常情况下, HIF-1 α 合成后



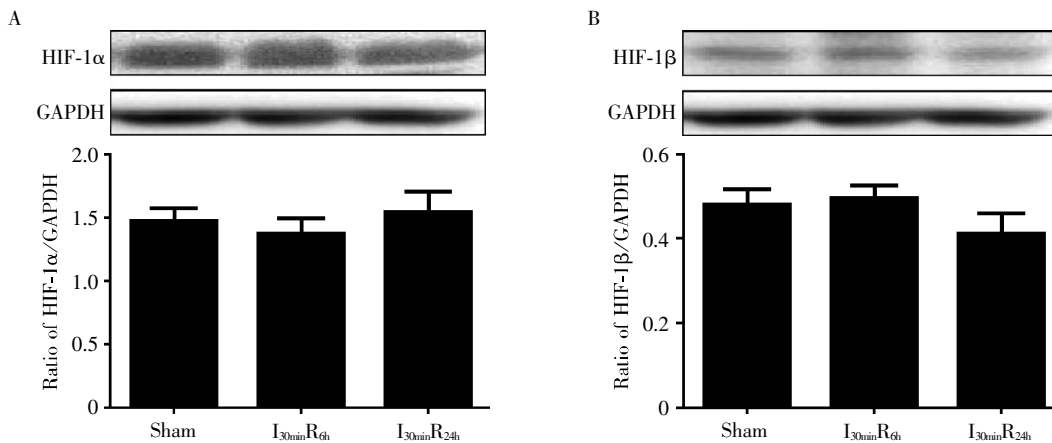
A: I/R 后心肌中 VEGF 的 mRNA 水平; B: I/R 后心肌中 VEGF 蛋白水平。与 Sham 组比较, $^{\#}P < 0.05, n = 6$; 与 I_{30min}R_{6h} 组比较, $^*P < 0.05, n = 5$ 。

图 2 大鼠心肌缺血再灌注损伤后心肌组织中 VEGF 水平的变化

Figure 2 The expression of VEGF in myocardium of rats subjected to ischemia reperfusion injury

通过泛素-蛋白酶体途径很快降解。缺氧时 HIF-1 α 的泛素化水平急剧减少, 翻译后修饰减弱, 从而使 HIF-1 α 的蛋白稳定性和转录激活能力上调, 由于其降解被抑制, 使 HIF-1 α 在胞浆中积聚, 增多的 HIF-1 α 和 HIF-1 β 形成二聚体, 并从胞浆转位至胞核, 进而与其靶基因增强子中的特异序列结合, 增强该基因的表达^[14]。研究显示在缺氧条件下, 机体可以通过上调 HIF-1 α 的表达, 诱导体内一些血管活性物质, 如 VEGF 和内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 的表达, 从而使机体适应缺氧环境^[15]。VEGF 是 HIF-1 α 的下游因子, 是血管生成初期的关键性生长因子, 它可以通过增加侧支循环改善再灌注损伤^[16]。心肌缺血后, 再灌注时间的长短可以影响心肌组织中缺氧相关因子 HIF-1 α 和 VEGF 等的表达, 目前尚无研究报道再灌注不同时间点心肌组织中 HIF-1 α 和 VEGF 水平的变化。

本研究证实了在大鼠心肌缺血再灌注损伤的早期, 缺血心肌组织中 HIF-1 α 、VEGF 蛋白以及 mRNA 可以被诱导表达, 然而, 随着再灌注时间的延长, 缺血心肌组织中 HIF-1 α 、VEGF 蛋白及 mRNA 水平又恢复到与假手术组相当水平。心肌组织中 HIF-1 β 蛋白水平在不同的再灌注时间点均未发生明显变化。心肌缺血 30 min 再灌注 6 h 或 24 h 并不影响肝脏中 HIF-1 α 、HIF-1 β 、VEGF 蛋白水平。以上研究提示, 在再灌注早期, HIF-1 α 表达的增加是对心肌缺



A: I/R 后肝脏中 HIF-1 α 蛋白水平; B: I/R 后后肝脏中 HIF-1 β 蛋白水平, $n = 4$ 。

图 3 大鼠心肌缺血再灌注损伤后肝脏组织中 HIF-1 α 、HIF-1 β 蛋白水平的变化

Figure 3 The expression of HIF-1 α , HIF-1 β protein in liver of rats subjected to subjected to ischemia reperfusion injury

血再灌注损伤的早期应答, 这种应答反应可理解为心肌细胞对心肌缺血早期的多种适应性改变之一, 是对急性心肌损伤的一种有益保护。HIF-1 α 是引发各种缺氧应激蛋白表达的转录因子, 在缺血的适应

性反应中起核心作用, 它可以通过促进下游相关基因, 如 VEGF 等的转录和表达, 增加缺血心肌新生血管的生成, 从而使机体对缺血、缺氧产生代偿性适应反应^[17]。然而再灌注 24 h 后, HIF-1 α 及下游

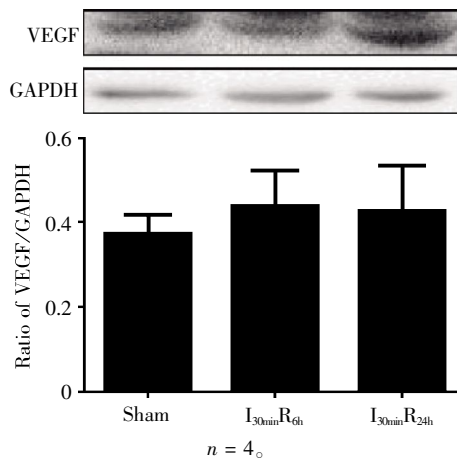


图 4 大鼠心肌缺血再灌注损伤后肝脏组织中 VEGF 蛋白水平的变化

Figure 4 The expression of VEGF protein in liver of rats subjected to subjected to ischemia reperfusion injury

VEGF 的表达相应下调,可能与新生血管生成后使缺氧得到改善有关^[18]。由于心肌缺血再灌注对肝脏血流和代谢的影响有限,所以在心肌缺血再灌注 6 h 或 24 h 过程中肝脏中 HIF-1 和 VEGF 相关蛋白的表达并没有发生改变。

综上所述,心肌缺血再灌注可以影响心肌组织中 HIF-1 α 和 VEGF 的 mRNA 和蛋白水平,从而对心肌缺血再灌注损伤起重要作用,但是并不影响肝脏中相关蛋白的表达水平。

[参考文献]

[1] Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(11): 1121-1135

[2] Ostadal B. The past, the present and the future of experimental research on myocardial ischemia and protection [J]. *Pharmacol Rep*, 2009, 61(1): 3-12

[3] Raphael J, Zuo Z, Abedat S, et al. Isoflurane preconditioning decreases myocardial infarction in rabbits via up-regulation of hypoxia inducible factor 1 that is mediated by mammalian target of rapamycin [J]. *Anesthesiology*, 2008, 108(3): 415-425

[4] Zhao HX, Wang XL, Wang YH, et al. Attenuation of myocardial injury by postconditioning: role of hypoxia inducible factor-1 α [J]. *Basic Res Cardiol*, 2010, 105(1): 109-118

[5] Xie JJ, Liao YL, Yang L, et al. Ultrasound molecular imaging of angiogenesis induced by mutant forms of hypoxia-inducible factor-1 α [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 92(2): 256-266

[6] Jeffrey AP, Mariuxi CM, Yue W, et al. Systemic pretreatment with dimethylallylglycine increases myocardial

HIF-1 α and VEGF production and improves functional recovery after acute ischemia/reperfusion [J]. *Surgery*, 2011, 150(2): 278-283

[7] Loor G, Schumacker PT. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(4): 686-690

[8] Lee SH, Wolf PL, Escudero R, et al. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(9): 626-633

[9] Sun Q, Kang Z, Cai J, et al. Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Exp Biol Med*, 2009, 234(10): 1212-1219

[10] Xie L, Liu Z, Ji Y, et al. Pyridoxine inhibits uncoupled endothelial NOS uncoupling induced by oxidized low-density lipoprotein via the PKC α signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 165(3): 754-764

[11] Mazure NM, Brahim-Hom MC, Berta MA, et al. HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(6): 971-980

[12] Knudsen AR, Kannerup AS, Mortensen FV, et al. Effects of ischemic pre- and postconditioning on HIF-1 α , VEGF and TGF- β expression after warm ischemia and reperfusion in the rat liver [J]. *Comp Hepatol*, 2011, 10(1): 3-9

[13] Zhao T, Zhang CP, Liu ZH, et al. Hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells-role of hypoxia-inducible transcription factor-1 α [J]. *FEBS J*, 2008, 275(8): 1824-1834

[14] Koivunen P, Hirsila M, Remcs AM, et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates; possible links between cell metabolism and stabilization of HIF [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(7): 4524-4532

[15] Ndubuizu OI, Tsipis CP, Li A, et al. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)-independent microvascular angiogenesis in the aged rat brain [J]. *Brain Res*, 2010, 1366: 101-109

[16] Tipoe GL, Lau TY, Nanji AA, et al. Expression and functions of vasoactive substances regulated by hypoxia-inducible factor-1 in chronic hypoxemia [J]. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2006, 4(3): 199-218

[17] Kido M, Du L, Sullivan CC, et al. Hypoxia-inducible factor 1-alpha reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(11): 2116-2124

[18] Li H, Liu F, Lou YL, et al. The expression level of HIF after renal ischemia-reperfusion injury in mice [J]. *Exp Lab Med*, 2011, 29(1): 6-8