

• 论著 •

低氧诱导因子-1 α 在大鼠心肌梗死中的表达及其意义杜林林¹, 王朝晖²

(1. 温州医学院附属第一医院急诊内科, 浙江 温州 325000;

2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院心血管研究所, 湖北 武汉 430022)

【摘要】 目的: 观察低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 在梗死心肌中 mRNA 表达水平的变化。方法: 结扎 SD 大鼠冠状动脉左前降支制备心肌梗死模型。36 只大鼠随机分为对照组(6 只)和模型组(30 只), 模型组于冠状动脉结扎后 24 h、48~72 h 和 1 周时分别取左心室心肌梗死区及非梗死区组织, 用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 HIF-1 α mRNA 的表达。结果: 模型组不同时间点 HIF-1 α 在梗死区心肌中 mRNA 表达水平均明显升高, 且与非梗死区心肌比较差异均有显著性(P 均 <0.01), 在缺血 1 周内持续在高水平, 模型组非梗死区域心肌组织与对照组 HIF-1 α mRNA 水平比较差异无显著性(P 均 >0.05)。结论: HIF-1 α mRNA 在心肌梗死区的高表达是心肌对缺血和缺氧导致心肌坏死的一种分子水平的反应。

【关键词】 低氧诱导因子-1 α ; 缺氧; 心肌梗死; 基因表达

中图分类号: R256.22; Q344.13 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2006)06-0367-03

Expression of hypoxia inducible factor - 1 α in rats with acute myocardial infarction DU Lin-lin¹, WANG Zhao-hui². 1. Department of Emergency Internal Medicine, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China; 2. Department of Cardiovascular Internal Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei, China

【Abstract】 **Objective:** To explore the mRNA level expression of hypoxia inducible factor - 1 α (HIF-1 α) in rats with acute myocardial infarction (AMI). **Methods:** Myocardial infarction model was replicated by ligating left anterior descending branch of coronary artery in SD rats. Thirty-six rats were randomly divided into control group ($n=6$) and model group ($n=30$). Semi-quantity reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to test the mRNA level expression of HIF-1 α in heart tissue of infarction and non-infarction areas at 24 hours, 48-72 hours and 1 week after ligation. The SPSS 11.5 software was applied to analyze the data; analysis of variance, paired t test and two samples t test for levels of HIF-1 α mRNA. **Results:** The expression of HIF-1 α mRNA was elevated in infarction area compared with non-infarction area in model group at different time points, and differences were obviously significant (all $P<0.01$) and remained high level in 1 week after ischemia. The HIF-1 α mRNA expression level had no differences in different stages in non-infarction area in model group compared with that of control group (all $P>0.05$). **Conclusion:** The high level of HIF-1 α mRNA expression happens at early AMI in infarction area. It is an early molecular marker of hypoxia and ischemia induced cardiac muscle apoptosis in myocardia infarction.

【Key words】 hypoxia inducible factor - 1 α ; hypoxia; myocardial infarction; gene expression

缺氧可导致组织细胞代谢障碍和细胞坏死等病理、生理过程, 可能有很多的影响因子和调节机制参与。有研究发现, 在低氧情况下培养的细胞和器官缺血、缺氧动物模型中, 低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor - 1 α , HIF-1 α) mRNA 表达明显升高^[1,2]。冠心病心肌梗死也是一个始动因素, 为缺血和缺氧的病理过程, 其中 HIF-1 α 表达的状态如何

尚未见国内文献报道。本实验通过建立大鼠心肌梗死模型, 观察 HIF-1 α mRNA 在缺血、缺氧心肌中的表达。

1 材料与方法

1.1 大鼠心肌梗死模型的建立: 36 只 SD 大鼠, 平均体重(160 $\pm$ 15)g, 购自华中科技大学同济医学院实验动物中心, 大鼠适应环境 1 周后, 按随机数字表法分为对照组(6 只)和模型组(30 只)。结扎大鼠冠状动脉(冠脉)左前降支制备大鼠心肌梗死模型: 用

作者简介: 杜林林(1977-), 女(汉族), 湖北潜江人, 硕士, 主治医师。

戊巴比妥钠 30 mg/kg 和质量分数为 20% 的乌拉坦 (200 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 同时行气管插管, 接小动物呼吸机给予通气。行左侧开胸术, 打开心包, 用 5-0 丝线在左心耳下 1~2 mm 处结扎左前降支近端。模型成功标志为: 心电图 ST 段弓背向上抬高或出现病理性 Q 波; 直视下可见被结扎血管供应区心肌变为苍白色或发生区域性运动障碍。对照组重复上述步骤, 但不结扎冠脉。两组大鼠接受相同饲养。术后给青霉素 100 kU 肌肉注射 (肌注) 预防感染。

1.2 标本采集与保存: 模型组分别于结扎后 24 h、48~72 h、1 周时, 对照组于 1 周内用 20% 的乌拉坦麻醉大鼠。打开胸腔, 迅速取出心脏, 置于 4 °C 预冷生理盐水中漂洗除去血液, 小心切除右心耳和右心室, 留取左心室梗死区域及非梗死区域的心肌。

1.3 半定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR): 取模型组各时间点梗死区、非梗死区和对照组心肌组织块约 100 mg, 分别用生理盐水冲洗, 置于匀浆器内, 加 0.5 ml Trizol 试剂 (购自 MBI 公司) 进行匀浆, 按试剂盒说明书提取各组心肌组织总 RNA, 进行变性甲醛凝胶电泳, 鉴定 RNA 完整性。再用焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的双蒸水 50 μ l 稀释, 提取的总 RNA 即刻完成逆转录, 逆转录产物 cDNA 置于 -20 °C 保存, 试剂均购自 Promega 公司。HIF-1 α 引物由 Invitrogen 公司合成, 序列为: 5'-TCCAA-GAAAGCGACATAG-3' (正义链), 5'-CATCTC-CACCTTCTACCC-3' (反义链), 扩增产物长度为 336 bp。内参照 β -肌动蛋白 (β -actin) 引物序列为: 5'-GAAGCATTTGCGGTGGACCAT-3' (正义链), 5'-TCCTGTGGCATCCACCAAACT-3' (反义链), 扩增产物长度为 315 bp。HIF-1 α 的 PCR 反应体系 (25 μ l): ddH₂O 16.5 μ l、10 mmol/L dNTPs 0.5 μ l、10 $\times$ 缓冲液 2.5 μ l、5'-引物 0.5 μ l、3'-引物 0.5 μ l、25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μ l、cDNA 2.0 μ l、Taq DNA 聚合酶 (1 U/ μ l) 0.5 μ l。 β -actin 的反应体系 (25 μ l): ddH₂O 14.5 μ l、10 mmol/L dNTPs 1.0 μ l、10 $\times$ 缓冲液 3.0 μ l、25 mmol MgCl₂ 2.0 μ l、5'-引物 0.5 μ l、3'-引物 0.5 μ l、cDNA 2.0 μ l、Taq DNA 聚合酶 1.5 μ l。将 PCR 产物于质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 50 ml 琼脂糖中加溴化乙锭 (EB) 2.0 μ l。Tanon GIS 凝胶成像系统作密度指数分析。不加 cDNA 的 PCR 为阴性对照, β -actin PCR 扩增产物为内参照。HIF-1 α 相对 mRNA 水平表达量的判定: 以各 HIF-1 α 电泳条带密度指数与相对的内参照 β -actin 密度指数比来表示。

1.4 统计学分析: 采用 SPSS 11.5 软件处理数据。HIF-1 α mRNA 水平表达以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行方差齐性检验, 配对 *t* 检验和两样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

各组 HIF-1 α mRNA 表达水平见表 1 和图 1。配对 *t* 检验提示, 冠脉结扎后 24 h、48~72 h、1 周后梗死区心肌 HIF-1 α mRNA 表达水平明显高于非梗死区心肌和对照组心肌 (P 均 < 0.01), 但冠脉结扎后不同时间点梗死区心肌 HIF-1 α mRNA 的表达水平差异无显著性 (P 均 > 0.05), 模型组非梗死区与对照组比较差异也无显著性 (P 均 > 0.05)。

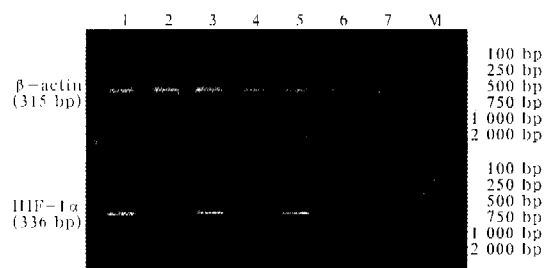
表 1 各组 HIF-1 α mRNA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expression of HIF-1 α mRNA level in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	HIF-1 α mRNA 的表达水平		
		梗死区	非梗死区	
模型组	24 h	10	0.725 $\pm$ 0.034 *	0.353 $\pm$ 0.026 #
	48~72 h	10	0.730 $\pm$ 0.029 *	0.370 $\pm$ 0.032 #
	1 周	10	0.729 $\pm$ 0.033 *	0.361 $\pm$ 0.035 #
对照组	6	0.366 $\pm$ 0.041		

注: 与对照组比较; * $P < 0.01$; 与本组同时点梗死区比较;

$P < 0.01$



1~7 依次为模型组 1 周梗死区、非梗死区,
48~72 h 梗死区、非梗死区,
24 h 梗死区、非梗死区, 对照组; M: Marker

图 1 HIF-1 α mRNA 和 β -actin 的 PCR 扩增产物电泳图

Figure 1 Electrophoretogram of HIF-1 α mRNA and β -actin PCR amplification products

3 讨论

HIF-1 最早于 1992 年在 Hep3 B 细胞中发现, 当时是作为一种能被低氧诱导、具有与红细胞生成素 (EPO) 基因增强子结合活性的核蛋白因子来进行研究的^[3]。近年来人们发现, HIF-1 是一个很重要的转录因子, 其含有 α 和 β 两个亚基。正常情况下, α 亚基与 β 亚基存在于胞浆中; 缺氧时, α 亚基进入胞核启动目的基因, 转录由它所调控的基因产物, 包括参与糖代谢的酶 (磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶、烯醇化酶) 及各种生长因子, 如血管内皮生长因子

(VEGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、EPO、诱生型一氧化氮合酶(iNOS)和环氧合酶(COX)等^[4],从而可使红细胞生成增加、新生血管形成和糖酵解加强等。

Semenza^[5]的研究表示,无论是在体内还是体外的缺氧模型中,第一个上调的基因为 HIF-1 基因。本研究中所采用的是通过结扎冠脉左前降支引起供血区域心肌缺血、缺氧,建立大鼠心肌梗死模型。RT-PCR 检测发现,心肌梗死区 HIF-1 α mRNA 表达明显高于非梗死区和正常心肌,提示心肌对缺血和缺氧导致心肌坏死时可能有一种分子水平的应激反应。我们的研究还发现,在心肌持续缺氧情况下,HIF-1 α 可保持 1 周的升高水平。Chavez 等^[6]的研究显示,HIF-1 α 在低氧发生后表达即迅速上调,在持续低氧状态下可维持 14 d 不降低,21 d 后恢复正常;当氧浓度恢复时,HIF-1 α 可迅速下降。我们推测,当心肌梗死发生后,随着侧支循环的建立,缺氧得到改善,HIF-1 α 可能会在一定时间内逐渐下降。关于这一点有待于我们进一步研究。

研究表示,HIF-1 所影响的下游产物如 VEGF 等产生是长久的,在肿瘤组织中发现 HIF-1 表达与血管再生具有明显的相关性^[7]。本研究结果显示,梗死区心肌缺血、缺氧状态时出现 HIF-1 的高表

达,可能成为心肌梗死后促进梗死区血管再生和糖代谢改变、增加心肌对缺氧的耐受性、改善心肌重构的有利始动因素。

参考文献:

- [1] Ozaki H, Yu A Y, Della N, et al. Hypoxia inducible factor - 1 α is increased in ischemic retina; temporal and spatial correlation with VEGF expression[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40: 182 - 189.
- [2] 陈伟, 陈家佩, 葛世丽, 等. 低氧对大鼠肝肾组织内红细胞生成素和低氧诱导因子-1 α 基因表达影响[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 9 - 12.
- [3] Semenza G L, Wang G L. 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: 5447 - 5454.
- [4] Semenza G L. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3: 721 - 732.
- [5] Semenza G L. Hypoxia inducible factor - 1: master regulator of O₂ homeostasis[J]. Curr Opin Genet Dev, 1998, 8: 588 - 594.
- [6] Chavez J C, Agani F, Pichiule P, et al. Expression of hypoxia inducible factor - 1 alpha in the brain of rats during chronic hypoxia[J]. J Appl Physiol, 2000, 89: 1937 - 1942.
- [7] Giatromanolaki A, Harris A L. Tumour hypoxia, hypoxia signalling pathways and hypoxia inducible factor expression in human cancer[J]. Anticancer Res, 2001, 21: 4317 - 4324.

(收稿日期: 2006-03-07 修回日期: 2006-10-10)

(本文编辑: 李银平)

• 消息 •

2005 年《中国科技期刊引证报告》(核心版)中 各医药学类期刊影响因子较高的前 10 种期刊排序表

学科	排序	期刊名称	影响因子	学科	排序	期刊名称	影响因子
药理学类	1	中国药理学通报	0.895	眼科学、 耳鼻喉科 学科类	1	中华眼科杂志	1.031
	2	中国药房	0.784		2	中华耳鼻喉科杂志	0.979
	3	ACTA PHARMACOLOGICA SINICA	0.733		3	中华眼底病杂志	0.675
	4	药物不良反应杂志	0.729		4	眼科新进展	0.495
	5	药学报	0.670		5	国际眼科杂志	0.489
	6	药物流行病学杂志	0.584		6	临床耳鼻喉科杂志	0.466
	7	中国药理学杂志	0.557		7	中国耳鼻喉咽喉底外科杂志	0.365
	8	中国新药与临床杂志	0.540		8	中国耳鼻喉咽喉头颈外科	0.339
	9	中国药物依赖性杂志	0.510		9	中国斜视与小儿眼科杂志	0.319
	10	中国药科大学学报	0.503		10	眼外伤职业眼病杂志	0.295
妇产科学、 儿科学类	1	中华儿科杂志	1.347	口腔医学类	1	中华口腔医学杂志	0.778
	2	中华妇产科杂志	1.121		2	口腔正畸学	0.464
	3	实用儿科临床杂志	0.874		3	口腔颌面修复学杂志	0.456
	4	中华围产医学杂志	0.716		4	口腔医学	0.438
	5	中国实用妇科与产科杂志	0.691		5	实用口腔医学杂志	0.404
	6	实用妇产科杂志	0.579		6	中华老年口腔医学杂志	0.397
	7	中国实用儿科杂志	0.567		7	中华口腔颌面外科杂志	0.393
	8	中国儿童保健杂志	0.453		8	牙体牙髓牙周病学杂志	0.350
	9	临床儿科杂志	0.439		9	口腔医学研究	0.341
	10	现代妇产科进展	0.425		10	口腔颌面外科杂志	0.306