

缺氧诱导因子 1 α 及其相关基因在腹主动脉瘤中的表达

杨 军¹, 胡新华², 张 强², 张宏伟³

(中国医科大学附属第一医院 1. 骨科, 2. 血管外科, 辽宁省沈阳市 110001; 3. 营口市中心医院普外科)

[关键词] 外科学; 缺氧诱导因子 1 α 在腹主动脉瘤中的表达; Northern blot 和 Western blot 检测; 缺氧诱导因子 1 α ; 腹主动脉瘤; 血管内皮生长因子; 促红细胞生成素

[摘要] 为了研究缺氧诱导因子 1 α 及其相关基因在腹主动脉瘤中的表达, 选取腹主动脉瘤标本 22 例, 以 5 例正常腹主动脉作对照, 检测缺氧诱导因子 1 α mRNA 及蛋白的表达, 检测血管内皮生长因子及促红细胞生成素的表达及微血管密度。结果发现, 腹主动脉瘤组织中缺氧诱导因子 1 α mRNA 及蛋白表达明显高于正常腹主动脉 ($P < 0.01$); 血管内皮生长因子和促红细胞生成素表达亦明显增强 ($P < 0.01$)。缺氧诱导因子 1 α 表达主要分布在腹主动脉瘤中层血管平滑肌细胞及外膜处, 与血管内皮生长因子和促红细胞生成素的分布部位基本一致。腹主动脉瘤中微血管密度明显增加 ($P < 0.01$)。结果提示, 缺氧诱导因子 1 α 在腹主动脉瘤发病过程中可能发挥重要作用, 其作用机制可能是通过调控血管内皮生长因子和促红细胞生成素的表达而实现的。

[中图分类号] R6

[文献标识码] A

The Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Related Genes in Abdominal Aorta Aneurysm

YANG Jun¹, HU Xir-Hua², ZHANG Qiang², and ZHANG Hong-Wei³

(1. Department of Orthopaedics, 2. Department of Vascular Surgery, First Affiliated Hospital, China Medical University, Liaoning 110001, China; 3. Department of General Surgery, Yingkou Central Hospital)

[KEY WORDS] Hypoxia-Inducible Factor-1 α ; Abdominal Aortic Aneurysm; Vascular Endothelial Growth Factor; Erythropoietin; Microvessel Density; Animal Model

[ABSTRACT] **Aim** To study the expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and related genes in abdominal aorta aneurysm (AAA). **Methods** 22 AAA specimens were collected and 6 normal abdominal aorta tissue were used as control. Northern blot was used to evaluate the expression of HIF-1 α mRNA. Western blot and immunohistochemistry method was used to determine the expression of HIF-1 α , vascular endothelial growth factor (VEGF) and erythropoietin (EPO). Microvessel density (MVD) was also studied. **Results** The expression of HIF-1 α was significantly higher in AAA than that in normal abdominal aorta ($P < 0.01$). The expression of VEGF and EPO were also higher in AAA ($P < 0.01$). Most of the positive cells located in VSMC and adventitia of AAA. The MVD counts were higher in AAA. **Conclusion** HIF-1 α may have an important role in the onset of AAA, which may be obtained by promoting the expression of VEGF and EPO.

腹主动脉瘤(abdominal aorta aneurysm, AAA)是一种潜在的致死性疾病,在 65 岁以上老年人中发病率高达 2%~9%^[1],其确切发病机制目前仍不清楚,多种因素可能参与了这一疾病过程^[2]。缺氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是近几年发现的参与调节机体氧自稳平衡的核心调控因子,调控一系列缺氧反应基因的表达,而且在感受缺氧、传递缺氧信号过程中发挥重要作用,但是 HIF-1 在 AAA 中的表达规律国内外均未见报道。因此,我们研究 HIF-1 α 及其相关基因包括血管内皮生长因子

(vascular endothelial growth factor, VEGF)及促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)在 AAA 中的表达,探讨其在 AAA 发病中的作用及意义。

1 材料和方法

1.1 组织来源

22 例肾下腹主动脉瘤组织标本均取自我院血管外科住院并经腹手术患者,其中男 15 例,女 7 例,年龄 53~74 岁,平均 66.8 岁,动脉瘤直径 5.2~12.0 cm,平均 7.2 cm。腹主动脉对照组 5 例,取自本院住院并行腹主动脉一股动脉或髂动脉人工血管旁路移植术患者,年龄、性别构成与腹主动脉瘤组相仿。标本均取自腹主动脉(瘤)前壁。取部分标本去除粥样斑块并迅速置于液氮中冻存,备 Northern 杂交和 Western blot 使用;剩余标本 10% 中性甲醛固

[收稿日期] 2003-11-12 [修回日期] 2004-05-25

[基金项目] 国家自然科学基金(30371401)资助

[作者简介] 杨军,血管外科博士,讲师,现从事血管外科方面的研究, E-mail 为 yangjun35@hotmail.com。胡新华,血管外科博士,讲师,主要从事血管外科方面的研究,本文通讯作者。张强,教授,博士生导师,主要从事血管外科的基础和临床研究。

定、梯度酒精脱水、二甲苯透明后石蜡包埋。

1.2 Northern 杂交

1.2.1 总 RNA 提取 采用 Trizol 试剂抽提总 RNA。取液氮中保存的动脉瘤或动脉组织 200 mg 分别放在陶瓷研钵中液氮低温环境下碾碎成粉末, 加入 Trizol 试剂匀浆, 离心后取上清液经氯仿抽提后再经等体积异丙醇沉淀, 75% 酒精清洗 2 次、离心, DEPC 水溶解沉淀, 紫外分光光度仪测定吸光度值 (A_{260}/A_{280}), 甲醛变性凝胶电泳检测 28 s、18 s rRNA 条带。

1.2.2 cDNA 探针制备 首先将 mRNA 逆转录为 cDNA, 根据 HIF-1 α 在 GenBank 的序列 (NM_001530) 设计引物, F 为 5'-TGC TCA TCA GTT GCC ACT TC-3', R 为 5'-CCA AGC AGG TCA TAG GTG GT-3', 进行 PCR 扩增, 扩增产物长度为 542 bp。扩增产物构建 pBluescript 载体, 然后采用 Prime- α Gene 随机引物标记试剂盒 (Promega 公司) 进行 α -³²P-dCTP 标记。

1.2.3 Northern 杂交 取 30 μ g 总 RNA 经 1% 琼脂糖—甲醛凝胶变性电泳分离, 然后采用毛细管法将凝胶上的 RNA 转移到硝酸纤维素滤膜, 凝胶成像系统上摄像, 真空炉 80 $^{\circ}$ C 干烤 0.5 h。42 $^{\circ}$ C 条件下, 用含有 50% 甲酰胺、6 $\times$ SSC、5 $\times$ Denhardt 溶液、0.5% SDS、100 g/L 变性鲑精 DNA 的杂交液进行预杂交 3 h, 再加入 α -³²P-dCTP 标记的 cDNA 探针进行杂交 16~18 h, 杂交膜先后经 2 $\times$ SSC (0.5% SDS)、2 $\times$ SSC (0.1% SDS)、0.1 $\times$ SSC (0.5% SDS)、0.1 $\times$ SSC 分别漂洗, -70 $^{\circ}$ C 放射自显影 48 h 后洗片。凝胶自动成像系统上对 X 线片摄像, 分析各条带吸光度值, 与对应的 28 s rRNA 条带吸光度比较, 半定量分析结果以二者比值表示。

1.3 Western blot 检测

配制细胞裂解液, 剪碎组织后机械匀浆, 4 $^{\circ}$ C 低温 12 000 r/min 离心 10 min。考马氏亮蓝 R250 染色法测总蛋白质浓度, 将各组蛋白浓度调到同一水平。制备 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 每孔加蛋白样品 100 μ g, 电泳后通过半干式电转移仪 (美国 Bio-Rad 公司) 将蛋白转到硝酸纤维素滤膜。丽春红 S 染色确定转膜情况并标记蛋白 Marker 位置。5% 脱脂奶粉 TBS 缓冲液封闭, 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜; 一抗 1: 1000 稀释, 室温下摇 2 h 后 TBS 洗膜 3 次; 按 1: 1000 加入过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG-HRP 60 min, TBS 洗 3 次后加入 ECL 2~3 min, 暗室显影 2 min 后冲洗胶片。凝胶成像分析系统上摄像分析, 计算出吸光度值。HIF-1 α 、VEGF、EPO 和 GAPDH 抗体均为 Santa Cruz 公司产品 (兔 IgG 多抗)。

1.4 HE 染色及免疫组织化学染色

石蜡标本切片, 厚 4 μ m, 常规脱蜡至水, 行 HE 染色, 随机选取 10 个 400 倍视野, 参照文献 [3] 计数炎性细胞和中膜平滑肌细胞。

常规 SP 法染色, AEC 或 DAB 显色。PBS 代替一抗作阴性对照。400 $\times$ 镜下观察, 计数单位视野内阳性细胞数占总细胞数百分比, 辅以计算机图像分析。同时进行抗 CD34 免疫组织化学染色 (SABC 法) 检测微血管密度 (microvessel density, MVD), 以染色阳性的内皮细胞作为微血管的标志, 首先在低倍镜 (100 倍) 下寻找高血管密度区, 即“热点”, 然后在高倍镜下计数 5 个视野中微血管的数目并取平均值。抗 HIF-1 α 、VEGF 及 EPO 抗体均为 Santa Cruz 公司产品 (兔 IgG 多抗, 工作浓度 1: 100), SP 试剂盒为美国 Zymed 公司产品, 均购于北京中山生物技术有限公司。CD34 抗体购于武汉博士德公司 (兔 IgG 多抗, 工作浓度 1: 100)。

1.5 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数比较采用 t 检验, 两个率比较采用 χ^2 检验。两组变量的关系采用直线相关分析。

2 结果

2.1 Northern 杂交

腹主动脉瘤及对照组 A_{260}/A_{280} 均 > 1.8 , 电泳结果见图 1 (Figure 1)。在 4 kb 处可见 HIF-1 α mRNA 表达。以腹主动脉瘤或对照组的积分光密度值与其相应的 28 s rRNA 条带进行比较, 腹主动脉瘤的表达量显著高于对照组 ($P < 0.01$; 表 1 和图 2, Table 1 and Figure 2)。

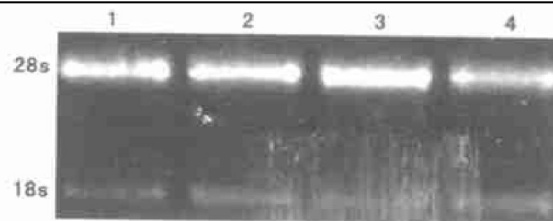


图 1. 总 RNA 甲醛变性电泳图 1 和 3 为对照组, 2 和 4 为腹主动脉瘤组织。

Figure 1. The electrophoregram of total RNA

2.2 Western blot 蛋白印迹

Western blot 可见腹主动脉瘤中 HIF-1 α 表达较强, 在 120 kDa 处可见明显蛋白表达条带, 对照组表达较少, 二者差异显著 ($P < 0.01$)。VEGF、EPO 在腹主动脉瘤中表达亦较多 (图 3, Figure 3)。

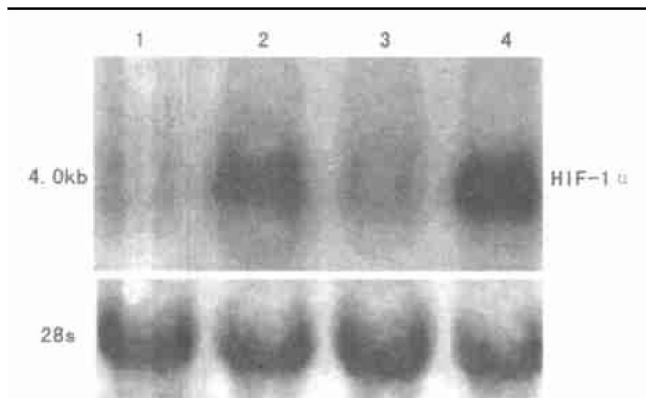


图 2. 缺氧诱导因子 1α mRNA 的 Northern 印迹 1 和 3 为对照组, 2 和 4 为腹主动脉瘤组织。

Figure 2. The Northern blot of HIF-1α mRNA

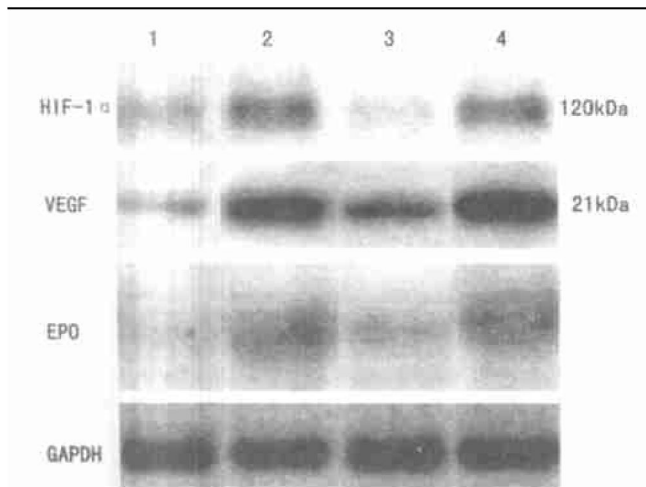


图 3. 缺氧诱导因子 1α、血管内皮生长因子和促红细胞生成素的 Western blot 蛋白印迹 1 和 3 为对照组, 2 和 4 为腹主动脉瘤组织。

Figure 3. The western blot of HIF-1α, VEGF and EPO

2.3 HE 染色及免疫组织化学染色

免疫组织化学染色可见腹主动脉瘤组织中较多 HIF-1α 表达, 阳性细胞百分率与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。腹主动脉瘤中 MVD 计数明显多于对照组 ($P < 0.01$; 表 1, Table 1)。HIF-1α 阳性细胞主要分布于动脉瘤的中层血管平滑肌细胞或外膜附近; EPO 在腹主动脉瘤中层 VSMC 表达较多, 表现为细胞浆或细胞核染成红色; VEGF 在外膜处表达稍多。HIF-1α 表达与 VEGF 和 EPO 表达呈显著正相关 (r 值分别为 0.783 和 0.634, $P < 0.01$)。从表 2 (Table 2) 可见, 腹主动脉瘤直径越大或炎性细胞浸润程度越高, 中层 VSMC 数目越少, HIF-1α、VEGF 及 EPO 表达越强, 微血管密度越高。腹主动脉瘤中 MVD 计数与 VEGF 及 HIF-1α 表达呈正相关 (r 值分别为 0.645 和 0.728, $P < 0.01$)。

表 1. 缺氧诱导因子 1α 及相关基因表达或微血管密度等变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The expression of HIF-1α, related genes or changes of MVD

指 标	对照组 ($n = 5$)	腹主动脉瘤 ($n = 22$)
HIF-1α mRNA	0.8% $\pm$ 0.3%	2.3% $\pm$ 0.8% ^a
HIF-1α	14.4% $\pm$ 6.3%	36.8% $\pm$ 11.2% ^a
VEGF	6.0% $\pm$ 2.5%	25.9% $\pm$ 13.8% ^a
EPO	11.4% $\pm$ 4.5%	29.2% $\pm$ 8.4% ^a
中层 VSMC	77.5% $\pm$ 11.2%	48.2% $\pm$ 16.5% ^a
MVD (/HP)	6.4% $\pm$ 2.6%	22.6% $\pm$ 8.3% ^a

a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 2. 临床病理指标与缺氧诱导因子 1α 及相关基因表达或微血管密度变化的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The comparison between clinical pathology and HIF-1α, related genes or MVD

临床和病理指标	n	HIF-1α	VEGF	EPO	中层 VSMC	MVD (/HP)
腹主动脉瘤直径						
5.0~ 8.0 cm	13	29.8% $\pm$ 9.6%	21.6% $\pm$ 11.8%	20.2% $\pm$ 6.2%	59.0% $\pm$ 14.0%	19.4% $\pm$ 6.4%
8.1~ 11.0 cm	5	39.3% $\pm$ 12.8% ^a	29.2% $\pm$ 12.4% ^a	30.6% $\pm$ 10.0% ^a	37.0% $\pm$ 12.8% ^a	24.5% $\pm$ 8.5% ^a
> 11 cm	4	52.0% $\pm$ 16.2% ^a	33.9% $\pm$ 15.0%	40.6% $\pm$ 12.8% ^{ab}	28.4% $\pm$ 12.6% ^{ab}	26.6% $\pm$ 11.8% ^b
炎性细胞浸润						
iv	6	21.2% $\pm$ 9.3%	18.5% $\pm$ 7.0% ^b	16.6% $\pm$ 6.9%	65.2% $\pm$ 18.5%	15.5% $\pm$ 4.7% ^b
㊶	8	32.5% $\pm$ 8.7% ^{ab}	26.0% $\pm$ 8.5% ^{ab}	25.5% $\pm$ 7.0% ^{ab}	48.3% $\pm$ 12.0% ^{ab}	21.5% $\pm$ 5.9% ^{ab}
㊷	5	41.9% $\pm$ 11.8% ^{ab}	30.6% $\pm$ 10.0% ^b	32.6% $\pm$ 8.2% ^{ab}	35.5% $\pm$ 13.2% ^{ab}	28.0% $\pm$ 8.2% ^{ab}
㊸	3	54.2% $\pm$ 10.2% ^{ab}	35.5% $\pm$ 13.0% ^b	47.3% $\pm$ 10.6% ^{ab}	29.0% $\pm$ 10.5% ^b	35.5% $\pm$ 9.8% ^{ab}
对照组	5	14.4% $\pm$ 6.3%	6.0% $\pm$ 2.5%	11.4% $\pm$ 4.5%	77.5% $\pm$ 11.2%	6.4% $\pm$ 2.6%

a: $P < 0.01$, 与同指标前一组比较; b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

缺氧诱导因子 1(HIF-1)是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的一种转录因子,是机体维持氧自稳平衡的核心调控因子,调控一系列缺氧反应基因的表达,在感受缺氧、传递缺氧信号过程中发挥重要作用^[4]。HIF-1是由HIF-1 α 和HIF-1 β 两种亚基组成的异二聚体,其中HIF-1 α 受缺氧信号的调控,而HIF-1 β 在细胞内稳定表达^[5]。HIF-1 α 感受缺氧信号后,自身被迅速激活,进入核内与其他转录因子协同作用并结合到缺氧相关基因的调控元件,调控相关基因的表达,以维持细胞和机体的氧自稳平衡及能量代谢平衡,如EPO、VEGF、糖酵解的酶类、转铁蛋白及受体、血红素氧合酶等基因的转录均受到HIF-1 α 的调控,其在缺氧信号转录中的核心地位逐渐被人们认识,而缺氧是许多疾病发病过程中的重要病理生理因素。

腹主动脉瘤(AAA)形成是一个错综复杂的过程,尤其是动脉粥样硬化所致腹主动脉瘤的发病机制研究最为困难。目前认为,由动脉粥样硬化导致的AAA是由于动脉壁细胞外基质的主要成分,即胶原和弹力蛋白的加速降解而致^[6]。我们的既往研究表明,单核细胞趋化蛋白1反义寡核苷酸可以抑制大鼠实验性腹主动脉瘤的形成^[7]。应用研究HIF-1 α 的表达规律,可能对AAA的防治及发病机制研究有重要意义。在研究中我们发现,腹主动脉瘤组织中HIF-1 α mRNA及蛋白产物表达均较多,提示腹主动脉瘤的发展过程可能同时伴随着局部组织的低氧,缺氧信号调控HIF-1 α 并使其表达增强。HIF-1 α 可以结合到缺氧相关基因的调控元件上启动由其控制

的基因转录和表达,有利于促进组织的存活。我们在实验中证实了腹主动脉瘤中VEGF的蛋白产物表达明显增强,且与HIF-1 α 的表达呈正相关。VEGF是血管生成最重要的促进因子,MVD的增加可以代偿组织的缺氧状态。EPO的表达增加会使红细胞生成增加、提高机体携氧能力,亦是有利于机体的反应^[8]。本研究中,腹主动脉瘤中MVD明显增多,且与VEGF和HIF-1 α 成正相关。这些结果表明腹主动脉瘤形成过程中伴随着HIF-1 α 及多种缺氧相关基因的表达增加,有利于改善AAA的慢性缺血过程,是机体的有益反应。HIF-1 α 的表达促进了机体的代偿功能,由其转录调控的VEGF和EPO等基因表达增强、微血管形成增多。对HIF-1 α 研究的深入,可能为AAA的预防和治疗找到新的干预靶点。

[参考文献]

- [1] Alcorn HG, Wolfson SK Jr, Suttorty-Tyrell K, Kuller LH, O'Leary D. Risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults enrolled in the cardiovascular health study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16** (8): 963-970
- [2] Ailawadi G, Eliason JL, Upchurch GR Jr. Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*, 2003, **38** (3): 584-588
- [3] Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whitemore AD, Knox J, Libby P. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T-lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation*, 1999, **99** (1): 96-104
- [4] Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev*, 1996, **76** (3): 839-885
- [5] Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohn M, et al. HIF Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing. *Science*, 2001, **292** (5516): 464-468
- [6] 吴建秋,景在平. 细胞外基质中的蛋白多糖与腹主动脉瘤. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (1): 74-77
- [7] 杨军,胡新华,张强. 单核细胞趋化蛋白1反义寡核苷酸抑制大鼠腹主动脉瘤的形成. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (2): 131-134
- [8] Thornberry NA, Lazebnik Y. EPOs: Enemies Within. *Science*, 1998, **281** (5381): 1312-1316

(此文编辑 文玉珊)

•读者•作者•编者•

投稿须知: 我刊关于作者署名与作者简介的要求

1 文稿作者应是对文稿内容作出实际贡献者。例如,始终参与了实验设计、实验数据的采集和资料整理等工作,并能对编辑部提出的审改意见进行核修。一篇文稿只有一位第一作者,多位作者,请自排名次。若第一作者为研究生、进修生和初次参与实验研究及写作论文者,应把研究生导师、进修生导师、实验研究指导者或课题负责人作为通讯作者。在我刊,通讯作者与第一作者处于同等地位,因此,第一作者不宜作通讯作者。

2 主要署名作者(第一作者、通讯作者、其他对该文作出主要贡献者)应有简单扼要的介绍,介绍基本情况和学术成就,例如:学历、学位、从事专业、职称、学术身份、发表文章、出版著作及获得成果等。还应写出联系电话和E-mail地址。