

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2006)14-05-0382-05

低氧诱导因子在低氧中对人外周血内皮祖细胞分化的影响

姜 萌, 王长谦, 王彬尧, 黄定九

(上海第二医科大学附属仁济医院心内科, 上海市 200001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 低氧诱导因子 1 α ; 氧分压降低; 内皮祖细胞; 内皮细胞; 细胞扩增

[摘要] 目的 研究低氧诱导因子 1 α 在体外氧化压降低环境中对人外周血内皮祖细胞向血管内皮细胞分化的影响。方法 密度梯度离心法分离人外周血内皮祖细胞, 电穿孔技术转染低氧诱导因子 1 α 质粒, 计算转染效率; 逆转录聚合酶链反应测定常氧和低氧环境中低氧诱导因子 1 α 、1 β 及其血管内皮生长因子 mRNA 在质粒转染前后表达变化。Western blot 检测转染前后低氧诱导因子 1 α 蛋白表达, 流式细胞术测定细胞膜表面抗原决定簇、荧光报告蛋白空质粒或低氧诱导因子 1 α 质粒转染组转后的组间差异, 一氧化氮酶法鉴定各组血管内皮生长因子依赖性一氧化氮的释放活性, 镜下观察细胞形态及分化程度。结果 质粒转染效率约 20%; 转染 20 h, 低氧诱导因子 1 α mRNA 在常氧中及低氧中均有表达, 表达程度与氧浓度无关 ($P > 0.05$); 低氧及转染低氧诱导因子 1 α 基因诱导血管内皮生长因子表达上调 ($P < 0.05$); 1 β 亚基表达在各组中无明显差异 ($P > 0.05$)。1% 低氧 3 h 低氧诱导因子 1 α 蛋白开始表达, 6 h 时表达成倍增加, 12 h 达高峰, 24 h 表达回到基线水平。流式细胞仪检测发现, 转染后常氧下孵育 3 天, 转 pEGFP 组 CD31⁺ 细胞占总细胞数 40.2% \pm 4.3%, 低氧诱导因子 1 α 组占 53.8% \pm 3.7% ($P < 0.05$); 孵育 10 天后转 pEGFP 组 CD31⁺ 细胞占 51.8% \pm 3.5%, 低氧诱导因子 1 α 组占 66.2% \pm 6.6% ($P < 0.05$)。转染后低氧下孵育 3 天, 转 pEGFP 组 CD31⁺ 细胞占总细胞数 46.8% \pm 3.5%, 低氧诱导因子 1 α 组占 60.2% \pm 5.0% ($P < 0.05$); 孵育 10 天, 转 pEGFP 组 CD31⁺ 细胞占 59.0% \pm 3.5%, 低氧诱导因子 1 α 组占 76.1% \pm 1.9% ($P < 0.05$)。低氧较常氧易促一氧化氮释放, 转染低氧诱导因子 1 α 基因使一氧化氮释放增加, 释放含量与血管内皮生长因子刺激量成正比, 随刺激时间延长而增加 ($P < 0.01$)。低氧环境加快内皮祖细胞向内皮细胞分化、扩增, 低氧诱导因子 1 α 质粒转染同样促进内皮祖细胞分化。结论 低氧诱导因子 1 α 质粒能有效地应用于转录水平进行基因干扰治疗, 并在低氧环境中增效, 有助于促进内皮祖细胞向内皮细胞分化, 为进一步诱导体内血管新生、治疗缺血性心脏病提供了更广阔的治疗选择。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Hypoxic Inducible Factor 1 α Gene Regulated Human Endothelial Progenitor Cells from Peripheral Blood in Hypoxia

JIANG Meng, WANG Chang-Qian, WANG Bin-Yao, and HUANG Ding-Jiu

(Department of Cardiovascularity, Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200001, China)

[KEY WORDS] Hypoxic Inducible Factor-1; Hypoxia; Endothelial Progenitor Cell; Endothelial Cell; Cell Proliferation

[ABSTRACT] Aim To test the hypothesis that exogenous administration of HIF1 α could enhance the differentiation of endothelial progenitor cells (EPC) in hypoxia in vitro. Methods EPC were isolated from human peripheral blood by density gradient centrifugation. We transfected overexpressed HIF1 α to EPC in normoxia/hypoxia by electroporation and measured the transfection efficiency. HIF1 α , HIF1 β (ARNT), vascular endothelial growth factor (VEGF), nitric oxide (NO) level were measured with RT-PCR, Western blot, flow cytometry or Elisa. EPC morphology were also observed. Results Approximately 20% pEGFP+ cells were observed after 36 h transfection. Compared with normoxia, the expression of both HIF1 α mRNA and ARNT mRNA was not at all augmented in response to hypoxic stimulus ($P > 0.05$). In contrast, VEGF mRNA expression was significantly up regulated under hypoxia ($P < 0.05$). HIF1 α western blot showed hypoxia stabilization of HIF1 α protein was induced at 3 h, 6 h and 12 h in hypoxia while the expression of HIF1 α protein was undetectable at 24 h in hypoxia. After 6-13 days cultured in 21% or 1% oxygen pressure, fluorescence trace experiments revealed that CD31⁺ EPC could be generated more efficiently from overexpressed HIF1 α in hypoxia than that of pEGFP transfected EPC ($P < 0.05$) (53.8% \pm 3.7% vs 40.2% \pm 4.3% under normoxia at d6; 66.2% \pm 6.5% vs 51.8% \pm 3.5% under normoxia at d13; 60.2% \pm 5.0% vs 46.8% \pm 3.5% under hypoxia at d6; 76.1% \pm 1.9% vs 59.0% \pm 3.5% under hypoxia at d13). A time kinetic NO was measured by Elisa Kit which was markedly enhanced by HIF1 α in hypoxia ($P < 0.01$). EPC differentiation was also observed by cell morphology. EPC differentiation and proliferation was more rapid in overexpressing of HIF1 α group in hypoxia than in normoxia.

[收稿日期] 2005-03-08 [修回日期] 2006-01-29

[基金项目] 国家自然科学基金(30170365)

[作者简介] 姜萌, 博士研究生, 医师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, 联系电话 021-64086519, E-mail 为 jiangmeng0919@163.com。

通讯作者王长谦, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, E-mail 为 changqianwang@hotmail.com。王彬尧, 主任医师, 教授, 博士研究生导师。

Conclusions Hypoxia is ideal for EPC differentiation and proliferation. Overexpressing of HIF1 α is important for exploring HIF1-dependent processes and for hypoxia induced pathophysiological events. Moreover, HIF1 α transfection was found to give a prospected way to do the insight research on ischemic treatment in vivo.

低氧诱导因子 1(hypoxic inducible factor-1, HIF1)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,对环境中的氧浓度十分敏感,随着缺氧时间延长,HIF1 α 蛋白量也相应增加;一旦缺氧改善,HIF1 α 水平迅速下降^[1]。近年来的基础研究显示 HIF 基因在缺血部位表达水平上调^[2,3],提示 HIF 基因的表达可能与缺血后局部低氧,诱导内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)扩增、促血管新生改善缺血有关。HIF1 主要通过 HIF1 α 亚基调节,在低氧时 HIF1 α 由胞浆转移至胞核,与 HIF1 β (ARNT) 亚基二聚化,再与相应基因如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、VEGF 受体 2 的启动子结合而促进其表达。因此在低氧中研究 HIF1 α 过表达对于观察 EPC 的 HIF 依赖效应及诱导其向内皮细胞分化、促血管新生有临床指导意义。目前也未见有关 HIF1 α 基因转染内皮祖细胞,同时进行不同氧浓度下对细胞分化扩增的报道,本研究拟对此进行探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

p(HA) HIF1 α 质粒由美国哈佛大学 HF. Bunn 教授惠赠,荧光报告质粒 pEGFP 由华山医院王钦红博士提供,质粒抽提试剂盒分别由申能博采公司和 Qiagen 公司提供,淋巴细胞分离液购自 Bioscience 公司,60 mm 培养皿购自 Falcon 公司。凝胶成像系统购自 Pharmacia Biotech,Trizol 购自 Invitrogen 公司,电转仪购自 Bio-Rad 公司,电转液购自 Opti-Mem,小鼠抗人 HIF1 α 抗体购自 Sigma 公司,多克隆羊抗小鼠 IgG 购自 Santa cruz,CD31-FITC 和小鼠 IgG1-FITC 购自 Caltag Laboratories 公司,EPICS ELITE ESP 型流式细胞仪购自 Beckman-Coulter 公司。

1.2 分组

在正常氧与低氧环境下,实验分为未转染组、转 pEGFP 和转 HIF1 α 3 组,低氧环境为 1% O₂、5% CO₂ 和 94% N₂,温度 37℃;常氧环境为 21% O₂、5% CO₂ 和 74% N₂,温度 37℃。

1.3 白膜的制备

取自正常献血者的 10 单位全血(200 mL)经 2 次离心法制备白膜:第一次 22℃ 2.1 kr/min 离心 14 min 去除红细胞;第二次 22℃ 280 r/min 离心 10 min

去除富含血小板的血浆,剩下的即为白膜层细胞。

1.4 内皮祖细胞的制备

将制备的白膜层细胞用 PBS 对倍稀释,层叠于淋巴性细胞分离液上,2 kr/min 离心 20 min,吸取细胞环,PBS 洗涤 2 次后,将获得的外周血单个核细胞重悬于 M199 培养基中,加至 3 mL,37℃ 5% CO₂ 孵箱孵育 1 h 后,上清继续培养,加入 VEGF 30 μ L/皿和 bFGF 24 μ L/皿,37℃,5% CO₂ 孵箱孵育 3 天后,弃未贴壁细胞,贴壁细胞富含 EPC^[3,4],常氧或低氧环境继续孵育。

1.5 细胞转染

将分离扩增 3 天的 EPC 细胞行电穿孔转染,条件为电压 280 V,电容 1 mF,电极杯 4 mm。荧光报告质粒 pEGFP 和质粒 HIF1 α 各 10 μ g/次,电转液 400 μ L,细胞数 10⁶,转后孵育。转染 36 h 后流式细胞仪 509 nm 检测。

1.6 引物设计

所有引物由上海鼎国生物公司合成。引物序列为 HIF1 α 上游 5'-CCA TTA GAA AGC AGT TCC GC-3',下游 5'-TGG GTA GGA GAT GGA GAT GC-3',引物长度 194 bp; VEGF 上游 5'-GAG GGC AGA ATC ATC ACG-3',下游 5'-GGA ACG CTC CAG GAC TTA T-3',引物长度 400 bp; ARNT 上游 5'-GCT GGG TTA CTG CTG CTT-3',下游 5'-AGG GCT TCG TAT TTG GTT-3',引物长度 250 bp; β -actin 上游 5'-GTC TTT GCG GAT GTC CAC-3',下游 5'-AAA CTG GAA CGG TGA AGG-3',引物长度 432 bp; 上游 5'-GGG TCA GAA GGA TTC CTG TG-3',下游 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3',引物长度 230 bp。

1.7 逆转录聚合酶链反应检测

在转染 20 h 后,检测 3 组在常氧中及低氧中 HIF1 α 、ARNT、VEGF mRNA 表达水平。RNA 抽提法及 RT-PCR 根据 QIAGEN 公司一步法试剂盒使用手册。RT-PCR 反应条件为 50℃ 30 min 反转录,95℃ 温育 15 min 后,94℃ 变性 45 s \rightarrow 55℃ 退火 45 s \rightarrow 72℃ 延伸 1 min,循环 28 次后,72℃ 再延伸 15 min。

1.8 Western bolt 检测

内皮祖细胞(EPC)在培养 3 h、6 h、12 h 和 24 h 后,取 20 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并转移至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶室温封闭 1 h,分别加入小鼠抗人 HIF1 α (1:250)或 β -actin(1:5 000)。4℃ 过夜,0.05% Tween 20 的 TBS 漂洗 3 次,每次 7 min,分别加

入相应的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗 (HIF1 α 为 1:2 000, β -actin 为 1:6 000)。室温孵育 1 h, 0.05% Tween 20 的 TBS 漂洗 3 次, 每次 7 min, 增强化学发光显色系统显色。

1.9 流式细胞仪检测

培养 3 d 后的 EPC, 置于常氧或低氧环境培养 3 ~ 10 天后, 流式细胞仪检测 EPC-EC 扩增含量的组间变化。吸取 106 培养细胞, 加入 5 μ L FITC-CD31 单克隆抗体, 避光孵育 15 min, 加入 0.5 mL PBS, 以前向散射和侧向散射的 dot-plot 二维图区分细胞群, 开窗于淋巴细胞群, 作荧光检测。

1.10 一氧化氮含量检测

各组细胞培养 10 天后, 分别用 1、10 和 50 μ g/L VEGF 刺激 2~5 天后, 按照晶美一氧化氮试剂盒说明书。酶法测定培养基上清中 NO 含量, 观察其在常氧及低氧中的分泌水平。

1.11 统计方法

定量参数以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析, $P < 0.05$ 代表结果有显著性差异。

2 结果

2.1 低氧诱导因子 1 α 转染效率

转 pEGFP 和 HIF1 α 质粒均为 3 kb, 转染同批 EPC, 条件相同, 可认为转染效率相同。转染 36 h 后, 流式细胞仪检测, HIF1 α 转染效率为 20%。

2.2 低氧诱导因子 1 α 转染效果

2.2.1 基因检测 培养 3 d 后行质粒转染, 分别孵育 20 h 后, 检测发现, HIF1 α mRNA 在常氧及低氧下均存在, 其表达与氧浓度无关 ($P > 0.05$), 无论低氧或常氧下, 转染 HIF1 α 基因均可使 HIF1 α mRNA 表达增加 ($P < 0.05$); ARNT 在细胞内结构性存在, 其表达不受转染 HIF1 α 基因及低氧环境影响 ($P > 0.05$); VEGF 在低氧诱导下表达上调, 转染 HIF1 α 基因进一步促进其表达 ($P < 0.05$, 图 1)。

2.2.2 蛋白检测 常氧时未检测到 HIF1 α 蛋白表达, 1% 低氧时蛋白表达与时间有关: 低氧 1 h 蛋白开始出现, 3 h 逐步增加, 6 h 成倍增加, 12 h 达高峰, 24 h 蛋白基本不出现。低氧中转染 HIF1 α 基因 12 h 后 HIF1 α 蛋白含量较同期明显增加 (图 2)。

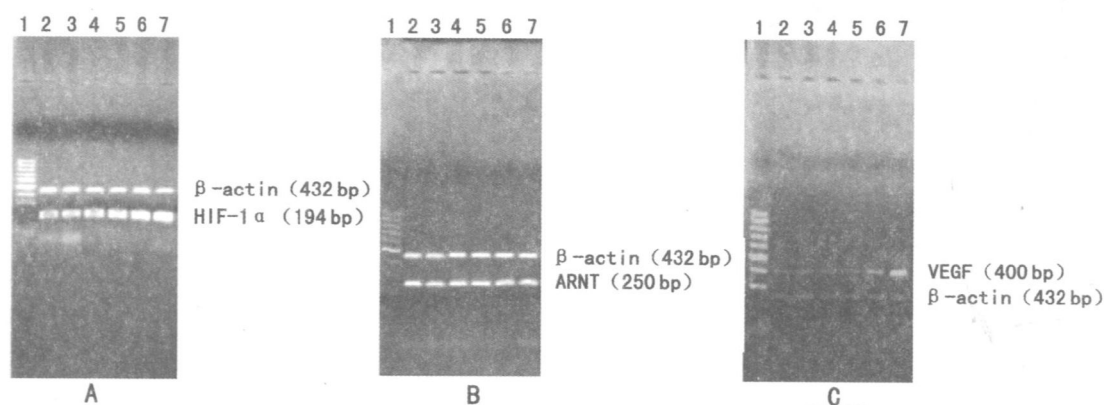


图 1. 低氧诱导因子及血管内皮生长因子的 mRNA 测定 A 为 HIF1 α , B 为 ARNT, C 为 VEGF。泳道 1 为 100 bp Marker, 泳道 2、4 和 6 为常氧环境, 泳道 3、5 和 7 为低氧环境, 泳道 2 和 3 为未转染组, 泳道 4 和 5 为转 pEGFP 组, 泳道 6 和 7 为转 HIF1 α 组。

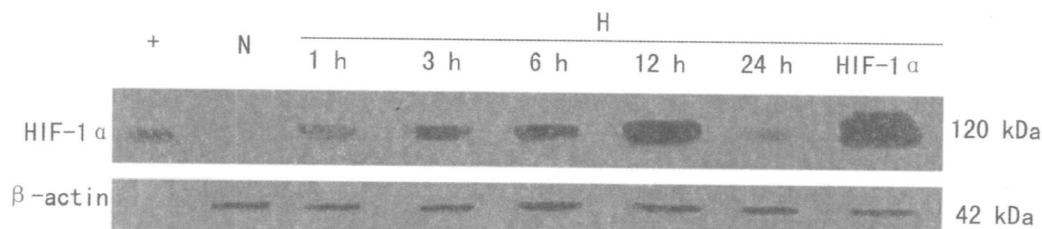


图 2. 低氧诱导因子 1 α 的 Western blot 检测 常氧及低氧中 HIF1 α 的表达。+ 为阳性对照, N 为常氧环境, H 为低氧环境, β -actin 为内参。

2.3 内皮祖细胞的功能检测

2.3.1 细胞表型 CD31 检测结果 转染后 EPC 表面抗原决定簇 CD31 $^{+}$ 的检测结果显示见表 1。可见各

组细胞在常氧环境与低氧环境比较, CD31 $^{+}$ 细胞百分比的差异有显著性统计学意义 ($P < 0.05$)。说明 1% 低氧环境较常氧环境更能促进 EPC 分化、扩增,

转染 HIF1 α 基因进一步加速诱导细胞分化(表 1)。

表 1. 转染后 CD31⁺ 细胞占细胞总数百分比 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分 组	常氧环境		低氧环境	
	第 3 天	第 10 天	第 3 天	第 10 天
未转染	40.7% \pm 4.2%	51.3% \pm 5.3%	44.2% \pm 7.5%	65.4% \pm 5.0% ^c
转 pEGFP	40.2% \pm 4.3%	51.8% \pm 3.5%	46.8% \pm 3.5% ^c	59.0% \pm 3.5% ^c
转 HIF1 α	53.8% \pm 3.6% ^a	66.2% \pm 6.5% ^a	60.2% \pm 5.0% ^{ac}	76.1% \pm 1.9% ^{ac}

a 为 $P < 0.05$, 与未转染组比较; c 为 $P < 0.05$, 与常氧环境比较。

2.3.2 一氧化氮含量检测结果 不同浓度 VEGF 刺激内皮细胞后 NO 释放含量与 VEGF 刺激量成正比; 1% 低氧及转染 HIF1 α 基因诱导 NO 释放, NO 含

量随时间延长而增加, 低氧、50 μ g/L VEGF 刺激 5 天、HIF1 α 基因转染时 eNOS 释放达高峰(表 2)。

2.3.3 转染前后内皮祖细胞形态学观察 常氧下孵育 6 天的未转染 EPC 呈集落样散在分布, HIF1 α 转染细胞在集落边缘已出现毛刺样梭形细胞; 低氧孵育 6 天的未转染 EPC 集落形成较多较快, 集落周围也有梭样细胞分化。常氧下孵育 14 天后, 未转染组的细胞多数贴壁, 部分呈梭样分布, 仍可见散在集落, 同期转 HIF1 α 细胞则贴壁牢固, 部分呈卵石样改变; 低氧孵育 14 天的细胞多呈梭样改变, 细胞扩增明显。说明 1% 低氧及 HIF1 α 基因转染均可加快 EPC 向 EC 的分化、扩增(图 3)。

表 2. 常氧和低氧时不同浓度的血管内皮生长因子刺激下的一氧化氮含量 (ng/L, $n=3$, $\bar{x} \pm s$)

分 组	未转 48 h	未转 5 d	转 HIF48 h	转 HIF5d
常氧 1- VEGF	1.55 \pm 0.56	1.77 \pm 0.58	2.50 \pm 0.63	3.70 \pm 0.32 ^c
常氧 10- VEGF	1.84 \pm 0.33	2.42 \pm 0.48	3.79 \pm 0.61 ^c	4.32 \pm 0.34 ^c
常氧 50- VEGF	2.68 \pm 0.36	4.04 \pm 0.52	4.80 \pm 0.44 ^c	6.20 \pm 0.33 ^c
低氧 1- VEGF	1.94 \pm 0.19	2.69 \pm 0.62	4.0 \pm 0.39 ^{a,c}	5.20 \pm 0.25 ^{ac}
低氧 10- VEGF	2.49 \pm 0.32	2.97 \pm 0.58	5.66 \pm 0.47 ^{ac}	7.80 \pm 0.39 ^{bc}
低氧 50- VEGF	3.19 \pm 0.21	4.46 \pm 0.26	8.20 \pm 0.41 ^{bc}	9.40 \pm 0.43 ^{bc}

1- VEGF、10- VEGF 和 50- VEGF 分别表示 VEGF 浓度是 1 μ g/L、10 μ g/L 和 50 μ g/L。P < 0.05, b 为 P < 0.01, 与常氧环境比较; c 为 P < 0.05, 与同期未转染组相比。

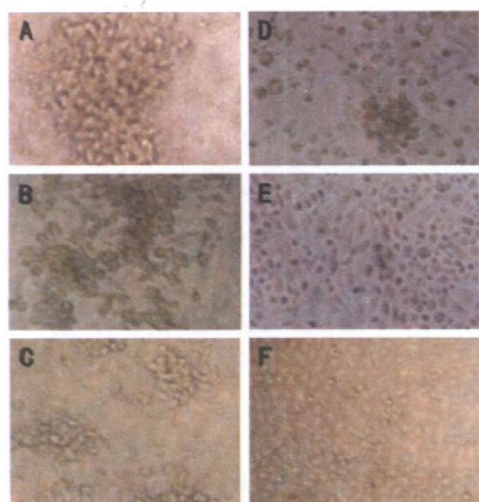


图 3. 低氧诱导因子 1 α 转染后内皮祖细胞形态学鉴定 ($\times 200$) A 为常氧环境培养 6 天的未转染细胞, B 为常氧环境培养 3 天后转 HIF1 α 质粒 3 天, C 为低氧环境培养 6 天的未转染细胞, D 为常氧环境培养 14 天的未转染细胞, E 为常氧环境培养 3 天后转 HIF1 α 质粒 11 天, F 为低氧环境培养 14 天的未转染细胞

3 讨论

低氧诱导因子(HIF1 α) 蛋白在常氧条件极不稳

定, 容易被泛素-蛋白酶系统分解, 半衰期不到 5 min^[5], 因此在常氧下不易检测到 HIF1 α 蛋白。HIF1 α 在常氧下的稳定性不足以激活 HIF1, 仅阻断泛素及蛋白酶降解不足以产生 HIF1 的转录活性, 因此须转入外源性 HIF1 α , 促进其在体内与结构性 ARNT 结合, 产生活性 HIF1。本研究通过转染外源性 HIF1 α 入人外周血 EPC, 观察其在常氧对 EPC 定向分化及成血管活性的影响。

本试验建立了体外 1% 低氧环境, 因为根据 Jiang 等^[6]的报道, 氧浓度下降可以使 HIF1 α 蛋白的稳定性大大增加, 目前认为这与 HIF1 α 羧基端调节蛋白稳定性的结构域有关。低氧的程度直接影响 HIF1 α 蛋白的水平, 如 6% 氧环境可能不出现 HIF1 α 蛋白, 因此本实验室将低氧程度的设定为 1% 低氧, 1% 低氧环境与多数对 HIF1 α 研究的试验条件相符^[7]。HIF1 α 蛋白的出现还存在细胞特异性, 在心肌细胞中, 6% 低氧 1 h 后细胞内 HIF1 α 蛋白阳性, 而肾内皮细胞在 6% 低氧环境培养 1 h 后, HIF1 α 蛋白未检测出^[8]。多数细胞在低氧环境中生长停滞, 但低氧可介导祖细胞的产生和扩增^[9], 但在本研究之前, 尚未有报道关于低氧环境下转基因祖细胞的形

态及功能学改变,因此,本研究转染了外源性 HIF1 α 质粒入人外周血 EPC,比较 EPC 在常氧及低氧环境中定向分化能力的差异及活性。

对于 HIF1 的调节,最初认为在缺氧状态下, HIF1 α 和 ARNT 在 mRNA 和蛋白水平均被上调。但随后大量的实验证实,在明显缺氧状态下,虽然 HIF1 α 和 ARNT 在蛋白水平增加以及与 DNA 结合活性增强,但并未观察到明显的 HIF1 α 和 ARNT 在 mRNA 水平的升高^[10]。本研究在常氧及低氧中对 HIF1 α 基因含量的测定结果同样显示 HIF1 α 在 EPC 内存在,其含量与氧浓度无关。在外源性 HIF1 α 质粒转染后 HIF1 α 基因及蛋白含量均增加,提示质粒有效转入,其下游靶基因 VEGF 含量增加,在低氧中尤为明显,说明在低氧环境下 HIF1 的稳定性增加,与 VEGF 启动子结合,转录活性加强,使 VEGF 等基因表达上调。ARNT 并不受低氧或外源性 HIF1 α 质粒调节,而是在细胞内结构性存在,ARNT 在哺乳动物中的作用主要是与其他 PAS 蛋白如 AhR 或 HIF1 α 亚基二聚化,二聚化形成后与 DNA 结合,相互激动。

Western bolt 结果发现, HIF1 α 蛋白呈氧浓度依赖性,在常氧基本检测不到,而在 1% 的低氧环境或转 HIF1 α 基因 3 h 后,蛋白开始出现,12 h 达高峰,在 24 h HIF1 α 水平又骤降,说明调节细胞内 HIF1 的机制非常复杂,它与氧依赖的信号传递机制密切相关。目前认为调节 HIF1 的可能机制有: ①转录水平的上调和蛋白稳定; ②蛋白的磷酸化; ③氧依赖的 HIF1 α 降解; ④配体的结合能力和在细胞内的定位。正是基于上述机制,在实验中才建立了低氧环境以促进转录水平的上调和蛋白稳定,且避免 HIF1 α 蛋白降解,从而进一步观察 HIF1 α 对 EPC 的影响。

为进一步观察低氧或外源 HIF1 α 基因对细胞形态的影响,我们比较了在不同氧浓度和不同时间时 EPC/EC 形态差异,同时比较了转染 HIF1 α 质粒前后细胞分化程度的差异。结果提示, EPC 对氧张力敏感,低氧激活 EPC,虽然大多数细胞生长停滞,但 EPC/EC 可扩增。本研究模拟体内低氧环境,阐明多能造血祖细胞在低氧环境中向 EC 定向分化、扩增,并能在转 HIF1 α 细胞中放大上述效应,转 HIF1 α 基因后 EPC 分化速度与低氧诱导后效应相似。

内皮祖细胞(EPC)及 EC 不能单从表型上鉴别,它们具有相似的内皮抗原如 CD31⁺ 抗原决定簇, CD31⁺ 细胞百分比在低氧或 HIF1 α 质粒刺激下升

高,说明有 EPC 活化和 EC 扩增。在功能上发现低氧刺激可增加 NO 含量,常氧环境转染外源性 HIF1 α 质粒可达到与低氧诱导相似的结果。

临床基因治疗已成为诱导血管新生的潜在方法,一种可替代血管生长因子的是应用治疗性转录因子如 HIF1 α ,它可调控多种血管基因的表达。因单基因治疗如 VEGF 在低剂量时刺激血管新生,但增加血管渗透性;在高剂量时仅刺激血管新生。如条件不佳, VEGF 将不能诱导血管新生或仅能诱导无功能、低灌注的毛细血管,且在 VEGF 水平降低后退化,因此缺血将得不到改善。同时, VEGF 的短暂表达不足以诱发及维持有意义的血管反应,尤其在广泛病变中^[11]。因此,在缺血的治疗中,目标是生成有稳定功能的新生血管。EPC 作为细胞移植的载体,通过转基因技术转染 HIF1 α 基因入 EPC,既完成了对 EPC 的体外扩增,弥补外周血 EC 数量的不足的缺陷,又增加了 HIF1 α ^[6] 与 VEGF 启动子 DNA 的结合,增加了其转录活性,并通过多靶基因协同作用,进一步促进 EPC 定向分化,可能改善局部缺血。

[参考文献]

- [1] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system [J]. *Nat Med*, 2003, **9** (6): 677-684
- [2] 杨军, 胡新华, 张强, 张宏伟. 缺氧诱导因子 1 α 及其相关基因在腹主动脉瘤中的表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (5): 507-510
- [3] 姜萌, 王长谦, 王彬尧, 黄定九. 低氧诱导因子促内皮祖细胞活性的可行性研究. *上海第二医科大学学报*, 2005, **25** (11): 1 117-122
- [4] 姜萌, 王长谦, 王彬尧, 黄定九. siRNA 干扰 HIF1 α 抑制人外周血内皮祖细胞分化[J]. *癌症*, 2005, **24** (11): 1 293-300
- [5] Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271** (50): 32 253-259
- [6] Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1 [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271** (30): 17 771-778
- [7] Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, et al. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1 [J]. *Circ Res*, 2003, **93** (11): 1 074-081
- [8] Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, et al. HIF1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia [J]. *FASEB J*, 2001, **15** (13): 2 445-453
- [9] Ramirez-Bergeron DL, Simon MC. Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system [J]. *Stem Cells*, 2001, **19** (4): 279-286
- [10] Filleur S, Courtin A, Ait-Sf Ali S, Guglielmi J, Merle C, Harel-Bellan A, et al. siRNA-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor severely limits tumor resistance to antiangiogenic thrombospondin 1 and slows tumor vascularization and growth [J]. *Cancer Res*, 2003, **63** (14): 3 919-922
- [11] Su H, Arakawa-Hoyt J, Kan YW. Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia response element-regulated gene expression in mouse ischemic heart model [J]. *PNAS*, 2002, **99** (14): 9 480-485

(此文编辑 胡必利)