

• 临床研究 •

[文章编号] 1007-3949(2008)16-11-0896-03

外周血炎症细胞缺氧诱导因子 1 α 表达水平与冠心病病情有关

陈宋明, 黄贤生, 郑文玲, 陈书盈, 王东明

(汕头大学医学院附属第一医院心血管内科, 广东省汕头市 515041)

[关键词] 内科学; 缺氧诱导因子 1 α ; 冠心病; 外周血; 炎症细胞

[摘要] 目的 探讨缺氧诱导因子 1 α 在冠心病患者外周血炎症细胞中的表达水平及其临床意义。方法 选择经冠状动脉造影确诊的冠心病患者 120例为研究对象, 其中急性心肌梗死、不稳定型心绞痛及稳定型心绞痛患者各 40例。另选冠状动脉造影未发现冠状动脉明显病变的患者 40例为对照组。逆转录聚合酶链反应检测缺氧诱导因子 1 α mRNA 表达水平, Western blotting 技术检测缺氧诱导因子 1 α 蛋白表达水平。结果 各组患者中缺氧诱导因子 1 α mRNA 水平无明显差异, 但蛋白表达水平冠心病组明显高于对照组, 特别是不稳定型心绞痛和急性心肌梗死患者缺氧诱导因子 1 α 蛋白表达水平明显升高。缺氧诱导因子 1 α 蛋白表达水平随病情加重而升高。结论 缺氧诱导因子 1 α 蛋白表达水平可能是反应冠心病严重程度的一个主要指标。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Correlation Between Expression of Hypoxia Inducible Factor-1 α and Coronary Heart Disease

CHEN Song-Ming HUANG Xian-Sheng ZHENG Wen-Ling CHEN Shu-Ying and WANG Dong-Ming

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou 515041, China)

[KEY WORDS] Hypoxia Inducible Factor-1 α ; Coronary Heart Disease; Peripheral Blood; Inflammatory Cell

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the changes and significance of expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in patients with coronary artery disease (CAD). **Methods** 120 patients with CAD, including 40 acute myocardial infarction (AMI), 40 unstable angina pectoris (UAP), and 40 stable angina pectoris (SAP), were selected in this study with 40 cases with normal coronary artery serving as controls. The mRNA and protein expression of HIF-1 α in monocytes and lymphocytes isolated from subjects were examined by semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting. **Results** There was no significant difference in HIF-1 α mRNA expression between CAD patients and the controls. The protein expression of HIF-1 α was significantly stronger in patients with CAD than in controls, and the expression levels increased with the severity of the disease. **Conclusion** HIF-1 α protein may be useful marker to reveal severity of CAD.

缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α)) 是缺氧诱导的转录激活因子, 能调节细胞内氧的平衡。它不仅编码血管生成因子的表达, 增加组织氧的供给, 还能增加缺氧组织对缺氧耐受性的蛋白质表达^[1]。HIF-1 α 参与了很多疾病过程, 在冠心病中也可能起重要作用。研究发现, 在冠心病患者缺血心肌可以见到 HIF-1 α 的高表达^[1], 动物实验也发现 HIF-1 α 可缩小心肌梗死面积^[2]。然而, HIF-1 α 表达水平与冠心病严重性的相关性却未见报道。因此, 本试验将通过检测不同阶段冠心病

病患者外周血单核细胞和淋巴细胞中 HIF-1 α mRNA 及蛋白表达水平, 试图阐明 HIF-1 α 表达水平与冠心病严重程度的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本试验收集自 2006 年 7 月至 2007 年 10 月在汕头大学医学院附属第一医院心内科行冠状动脉造影确诊为冠心病的住院病人 120 例为研究对象, 其中男性 96 例, 女性 24 例, 平均年龄 59.4 ± 10.8 岁。120 例患者中, 稳定型心绞痛 (stable angina pectoris, SAP 组) 40 例, 不稳定型心绞痛 (unstable angina pectoris, UAP 组) 40 例, 急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI 组) 40 例。诊断标准参照叶任高主编的第六版本科内科学教材^[3]。另外, 选择 40 例经

[收稿日期] 2008-06-19 [修回日期] 2008-09-26

[基金项目] 广东省科技厅资助项目 (2008B030301241)

[作者简介] 陈宋明, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 从事冠心病的基础及临床研究, Email 为 csm1002@126.com。王东明, 硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 从事心律失常的临床及基础研究。黄贤生, 硕士, 主治医师, 从事冠心病的基础和临床研究。

冠状动脉造影未发现冠状动脉狭窄的患者为对照组。所有研究对象采血前 4 周内无明确感染病史, 肝肾功能不全、肿瘤和中风患者被排除。同时记录冠心病危险因素如高血压病、糖尿病、高脂血症和吸烟等。按参考文献 [4] 收集标本, 分离单个核细胞及冻存细胞。

1.2 逆转录多聚酶链反应检测细胞内缺氧诱导因子 1 α mRNA 的表达

采用 invitrogen 公司 Trizol 试剂, 严格按照试剂说明步骤抽提所分离的单个核细胞总 RNA, 使用 Eppendorf 分光光度计测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 的比值; 通过 OD₂₆₀ 值计算出抽提的 RNA 量; 并进行 RNA 电泳检测抽提 RNA 的完整性。按照 invitrogen 公司两步法进行逆转录, 同时进行内参基因的扩增 (β -actin)。引物序列如下: HIF-1 α 上游 5'-TTA TCA TGC TTT GGA CTC TG -3', 下游 5'-CCA GCA AAG TTA AAG CAT CA -3', 产物长度 348 bp β -actin 上游 5'-TCC TCC CTG GAG AAG AGC TA -3', 下游 5'-TCAGGAGGAGCA ATGATC TTG -3', 产物长度 281 bp。反应条件为: 95℃变性 10 s $\rightarrow$ 95℃退火 5 s $\rightarrow$ 60℃延伸 20 s 共 40 个循环。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 利用光密度计以 β -actin 为参照检测各光带的灰度值, Quantity One 4.4.0 软件分析实验数据。

1.3 Western blotting 检测缺氧诱导因子 1 α 蛋白的表达

裂解细胞提取总蛋白, 制备 10% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶, 每孔上样量 50 μ g 常规电泳、转膜、封闭, 一抗 (稀释度 1: 200 鼠抗 HIF-1 α 单克隆抗体) 及相应二抗 (稀释 1: 500 兔抗鼠) 37℃ 孵育 1 h。采用北京中山试剂公司的发光试剂进行化学发光。结果扫描进计算机, 用 Sigma pro 自动图像分析软件对 HIF-1 α 光带进行分析, 以 HIF-1 α 蛋白带的灰度峰值代表 HIF-1 α 的表达量。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 11.0 软件对数据进行单因素方差分析或 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况及临床特征

对照组、SAP、UAP 和 AMI 各组患者年龄、性别以及高血压病、糖尿病、血脂异常、吸烟情况见表 1。可见组间各指标均未见明显差异 ($P > 0.05$)。

表 1 各组一般情况及临床特征

临床资料	对照组	SAP 组	UAP 组	AMI 组
年龄 (岁)	59.7 $\pm$ 6.3	61.5 $\pm$ 7.4	59.8 $\pm$ 6.8	61.4 $\pm$ 8.9
男/女 (例)	29/11	30/10	31/9	28/12
高血压 (例)	15	17	18	16
糖尿病 (例)	7	7	9	8
高脂血症 (例)	16	14	16	17
吸烟 (例)	18	17	20	19

2.2 外周血单核细胞和淋巴细胞缺氧诱导因子 1 α mRNA 和蛋白表达水平

冠心病患者与对照组外周血单核细胞和淋巴细胞 HIF-1 α mRNA 表达水平无明显差异, 冠心病患者各组之间 HIF-1 α mRNA 表达水平也无明显差异 (表 2 和图 1, $P > 0.05$)。UAP 和 AMI 组患者外周血单核细胞和淋巴细胞 HIF-1 α 蛋白表达水平明显升高, 分别是对照组的 1.42 倍和 1.63 倍 (表 2 和图 2, $P < 0.05$)。

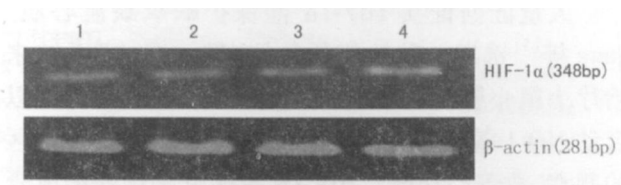


图 1 逆转录聚合酶链反应检测缺氧诱导因子 1 α mRNA 表达 1 为对照组, 2 为稳定型心绞痛组, 3 为不稳定型心绞痛组, 4 为急性心肌梗死组。

表 2 缺氧诱导因子 1 α mRNA 和蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	mRNA	蛋白
对照组	40	49.7 $\pm$ 6.7	30.8 $\pm$ 5.2
SAP 组	40	46.3 $\pm$ 9.1	41.6 $\pm$ 8.7
UAP 组	40	48.8 $\pm$ 5.5	45.3 $\pm$ 9.4 ^a
AMI 组	40	50.7 $\pm$ 9.3	65.6 $\pm$ 8.5 ^a

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

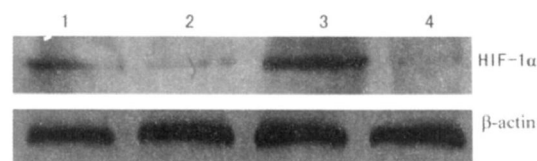


图 2 Western blotting 检测缺氧诱导因子 1 α 蛋白表达水平 1 为不稳定型心绞痛组, 2 为稳定型心绞痛组, 3 为急性心肌梗死组, 4 为对照组。

3 讨论

我们检测不同阶段冠心病患者外周血单核细胞和淋巴细胞 HIF-1 α mRNA 和蛋白表达水平, 结果发现 HIF-1 α 蛋白表达水平在 UAP 和 AMI 组患者明显增多, 而 mRNA 表达水平冠心病患者和非冠心病者无明显差异, 提示 HIF-1 α 蛋白在冠心病进程中可能起重要作用。

HIF-1 α 是细胞暴露于缺氧环境后各种病理和生理反应的重要调节因子。HIF-1 α 在常氧下分解, 在低氧下稳定, HIF-1 α 和 HIF-1 β 都是 HIF-1 的亚单位, HIF-1 β 的表达不受细胞内氧浓度的影响, 而 HIF-1 α 的表达却直接由低氧诱导。缺氧时, HIF-1 α 不被分解, 并启动包括与 HIF-1 β 聚合在内的多个激活步骤。因此, 缺氧下的 HIF-1 α 活性并非决定于 mRNA 水平, 而决定于蛋白的稳定性。这也许就是本研究观察到 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 表达水平不一致的原因。

大量证据证实 HIF-1 α 能保护缺氧缺血心肌。Tang 等^[5]选用一种缺氧诱导的“警示载体”系统来治疗小鼠心肌梗死, 该警示载体在心肌缺血时可以启动 HO-1 等治疗性基因的转录, 明显减少梗死区的凋亡, 改善心功能。HIF-1 α 可通过多种途径改善心肌细胞的成活力^[6], 并能通过增加心肌的灌注改善左心室功能^[7], HIF-1 α 也参与了缺血/再灌注后期心肌保护作用^[8]。人冬眠心肌之所以能在低氧低温情况下生存下来, 与 HIF-1 α 和血管内皮生长因子等保护性因子表达上调有关^[9]。我们的研究发现 UAP 和 AMI 患者比 SAP 和对照组患者表达更多的 HIF-1 α , 提示 HIF-1 α 表达水平随冠心病病情加重而增加, HIF-1 α 表达水平能反应冠心病的严重程度。这与我们前期研究发现血红素氧化酶 1 (一种心血管保护因子) 蛋白表达水平与冠心病冠状动脉病变严重程度相关的变化趋势相类似^[10]。这或许是机体在病情严重情况下的一种自身保护机制, 能表达更多保护因子。提示 HIF-1 α 蛋白表达水平可作为反应冠心病严重程度的指标。

HIF-1 α 在细胞对缺氧的反应中起至关重要的作用, 因此被认为是治疗缺氧相关疾病的新靶点。动物实验已证实 HIF-1 α 缩小心肌梗死面积并促进心肌血管生成^[11], 利用 RNA 干扰技术干扰 HIF-

1 α 表达影响到 HIF-1 α 促进在体血管生成的作用^[11], 这将为促进新生血管形成提供新靶点。HIF-1 α 是否能够直接用于冠心病的预防和治疗, 有待进一步研究。

尽管有很多证据说明 HIF-1 α 的心肌保护作用, 它的促新生血管生成作用却不利于动脉粥样斑块的不稳定性, 甚至可促进动脉粥样硬化的发展^[12], 而且哪种给药途径是安全的仍未明了。因此, HIF-1 α 用于治疗冠心病的目标还需要我们不懈地努力才能实现。

总之, 我们发现冠心病 HIF-1 α 蛋白表达水平明显升高, 并且这种升高与冠心病严重程度有关。我们的结果提示 HIF-1 α 表达水平是反应冠心病严重程度的指标之一, 并可能成为治疗冠心病的新靶点。

[参考文献]

- [1] 马雅奎, 宋剑南. 缺氧诱导因子——一种缺氧条件下被激活的转录因子 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (7): 528
- [2] Shyu KG, Wang MT, Wang BW, et al. Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1 α /VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat [J]. *Cardiovasc Res* 2002; 54 (3): 576-583
- [3] 叶任高. 内科学 (第六版) [M]. 人民卫生出版社, 2004; 5
- [4] Chen SM, Li YG, Wang DM. Study on changes of heme oxygenase-1 expression in patients with coronary heart disease [J]. *Clin Cardiol* 2005; 28 (4): 197-201
- [5] Tang YL, Tang Y, Zhang YC, et al. A hypoxia-inducible vigilant vector system for activating therapeutic genes in ischemia [J]. *Gene Ther* 2005; 12 (15): 1163-1170
- [6] Okuda M. A multidisciplinary overview of cardiogenic shock [J]. *Shock* 2006; 25 (6): 557-570
- [7] HeinIGreen A, Radke PW, Munkonge FM, et al. The efficacy of a master switch gene HIF-1 α in a porcine model of chronic myocardial ischemia [J]. *Eur Heart J* 2005; 26 (13): 1327-332
- [8] Wasserfuhr D, Cetin SM, Yang J, et al. Protection of the right ventricle from ischemia and reperfusion by preceding hypoxia [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2008; 378 (1): 27-32
- [9] Depre C, Kim SJ, John AS, et al. Program of cell survival underlying human and experimental hibernating myocardium [J]. *Circ Res* 2004; 95 (4): 433-440
- [10] 陈宋明, 李玉光, 王东明, 等. 冠心病患者外周血白细胞 HO-1 的表达与冠状动脉病变程度有关 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2004; 12 (5): 581-584
- [11] Zhao W, Wang YS, Hui YN, et al. Inhibition of proliferation, migration and tube formation of choroidal microvascular endothelial cells by targeting HIF-1 α with short hairpin RNA-expressing plasmid DNA in human RPE cells in a co-culture system [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246: 1413-422
- [12] Luque A, Turu M, Juan-Babot O, et al. Overexpression of hypoxia/inflammatory markers in atherosclerotic carotid plaques [J]. *Front Biosci* 2008; 13: 6483-490

(此文编辑 许雪梅)