

心肌转染缺氧诱导因子 1 α 对大鼠心肌梗死的保护作用

牛铁生¹, 齐国先², 付 鹏¹, 孙英贤¹

(1. 中国医科大学盛京院心内科, 辽宁省沈阳市 110023; 2. 中国医科大学第一临床学院心内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 缺氧诱导因子; 心肌梗死; 基因转染

[摘要] 目的 评价心肌内注射缺氧诱导因子 1 α 进行基因转染对大鼠心肌梗死的保护作用。方法 选择雄性大鼠 72只进行实验, 将实验分为转染腺病毒缺氧诱导因子 1 α 组, 转染空质粒对照组和假手术组。每组以术后的不同时间处死, 取材分 3、7、14天三个亚组, 每个亚组 8只。建立心肌梗死模型。当左前降支被结扎后, 在室游离壁的三个不同部位分别注射 50 μ g腺病毒缺氧诱导因子 1 α 质粒和 50 μ g的空质粒。假手术组不结扎左前降支。观察缺氧诱导因子 1 α 的基因表达、心肌毛细血管密度和大鼠心肌梗死面积。结果 缺氧诱导因子 1 α 组与对照组相比, 心肌组织中缺氧诱导因子 1 α 基因表达明显增强, 梗死区毛细血管密度明显增加 ($P < 0.01$), 心肌梗死面积分别为 $23.85\% \pm 2.25\%$ 和 $38.74\% \pm 3.12\%$, 心肌梗死面积明显减少 ($P < 0.01$)。结论 心肌内注射缺氧诱导因子 1 α 进行基因转染可以增加缺氧诱导因子 1 α 基因表达, 增加心肌毛细血管生成, 明显减少心肌梗死面积, 对大鼠心肌梗死起保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Impact of Gene Transfection of Hypoxia Inducible Factor 1 α to Acute Myocardial Infarction of Rat

NIU Tie-Sheng, QI Guo-Xian, FU Peng and SUN Ying-Xian

(Department of Cardiology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

[KEY WORDS] Hypoxia-inducible Factor-1 α ; Myocardial Infarction; Gene Transfection

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the impact of gene transfection of hypoxia inducible factor 1 α to acute myocardial infarction of rat. **Methods** 72 healthy male Wistar rats weighing 250~350 g were divided into three groups: hypoxia inducible factor 1 α gene transfection group (HIF-1 α group), control group and sham-operation group. Each group was divided into 3 d, 7 d and 14 d subgroups. There are 8 rats in each subgroup. After the ligation of LCA, the total 50 μ g plasmid HIF-1 α and null plasmid were injected into the infarct zone at three locations in HIF-1 α group and control group respectively. The sham-operation group did not undergo ligation of left anterior descending coronary. The mRNA expression of HIF-1 α and capillary density were detected. The myocardial infarction size was measured. **Results** Capillary density increased significantly in HIF-1 α group compared with the control group ($P < 0.01$). The mRNA expression of HIF-1 α increased significantly in HIF-1 α group compared with the control group ($P < 0.01$), while the myocardial infarction size decreased significantly ($23.85\% \pm 2.25\%$ vs $38.74 \pm 3.12\%$; $P < 0.01$). **Conclusion** The gene transfection of hypoxia inducible factor 1 α in myocardium of rat can reduce infarction size and enhance angiogenesis in acute myocardial infarction of rat.

缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)是细胞在缺氧条件下产生的核蛋白^[1]。在心肌缺氧条件下, 细胞核产生 HIF-1 α 与靶基因缺血反应元件 (hypoxia-response elements, HRE)的 HIF-1 α 结合点结合, 促进其转录, 引起细胞对缺氧的一系列反应^[1,2]。急性心肌缺血与心肌梗死的 HIF-1 α 的表达增加, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial

growth factor, VEGF)表达亦增加^[3-5]。缺血预处理可以使 HIF-1 α 的表达增加, 对心肌细胞具有保护作用。但转染腺病毒 HIF-1 α 是否对心肌梗死具有保护作用尚不十分清楚, 本实验将对急性心肌梗死模型大鼠进行心肌内注射腺病毒 HIF-1 α , 观察 HIF-1 α 对心肌梗死有何影响。

1 材料与方法

1.1 分组及转染

选择体重 250~350 g 的雄性 Wistar 大鼠 72只, 12~14周龄, 由中国医科大学附属盛京医院动物部提供。将实验分为转染腺病毒 HIF-1 α 的 HIF-1 α 组, 转染空质粒对照组和假手术组, 每组以术后的不

[收稿日期] 2009-04-15 [修回日期] 2009-05-21

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目 (20062106)

[作者简介] 通讯作者牛铁生, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的基因治疗, 联系电话为 024-25944351, E-mail为 syniuts@yahoo.com.cn; 齐国先, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的防治, E-mail为 qigx2002@medmail.com.cn; 付鹏, 博士, 讲师, 研究方向为冠心病防治, E-mail为 fupeng990926@yahoo.com.cn

同时处死取材分 3、7、14 天三个亚组, 每个亚组 8 只。Ad-HIF-1 α 和 Ad-null 由 Genzyme 生物公司提供, 滴度为 4×10^{13} PFU/L。然后采用文献 [4] 方法建立心肌梗死模型。当左前降支被结扎后, 在左室游离壁的三个不同部位分别注射 50 μ g Ad-HIF-1 α 和 50 μ g Ad-null 然后关胸缝合。假手术组不结扎左前降支。

1.2 心肌组织形态学观察及梗死面积测量

转染 3、7、14 天后, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 经原切口下一肋间开胸, 迅速取材心脏, 去除左心房、右心房及右心室, 冲洗, 4% 多聚甲醛溶液固定, 沿左室长轴由心尖至心底做厚切片, 将左室分为 6 片, 石蜡包埋后做 5 μ m 切片, 行 HE 染色, 染色心肌切片采用多媒体彩色病理图文分析系统进行图像分析, 自动测量每层心肌梗死面积占该层心肌总面积的百分比, 计算总心肌梗死面积 (Ai) 占左室心肌总面积 (A) 的百分比 (Ai/A) $\times 100\%$ 。

1.3 免疫组织化学染色检测

标本经 4% 多聚甲醛固定后石蜡包埋切片, 将切片常规脱蜡至水, 滴加 30 mL/L H₂O₂ 作用 10 min 灭活内源性过氧化物酶, 并进行微波修复。加 10 mL/L 羊血清 PBS 封闭后, 依次滴加 CD34 一抗 (武汉博士德公司提供, 4℃过夜)、生物素标记的羊抗小鼠 IgG (工作浓度 1: 200) 及 SABC (均按照 SABC 检测试剂盒内的说明书进行)。加 DAB 显色, 苏木素复染后脱水、透明, 封片观察结果, 胞核或胞质染呈棕黄色为阳性。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。CD34 抗显示毛细血管, 胞核或胞质染呈棕黄色为阳性。每个切片计算 3 个视野、心肌为横切面的毛细血管数量, 取平均值计算得毛细血管密度。

1.4 逆转录聚合酶链法测定缺氧诱导因子 1 α 和血管内皮生长因子 mRNA 表达

转染 HIF-1 α 的 HIF-1 α 组和对照组分别在 3、7、14 天测定 HIF-1 α mRNA、VEGF mRNA 表达; 假手术组在第 7 天测定。Trizole (GIBCO 公司) 液提取总 RNA, 操作均按说明书进行。紫外分光光度计 (A₂₆₀/A₂₈₀) 检测 RNA 纯度。逆转录反应 (TaKaRa 公司产品): 总 RNA 1 μ L (1 g/L), 5 \times MMLV Buffer 2 μ L, dNTP mixture 0.5 μ L, Oligo dT Primer 0.5 μ L, RNase Inhibitor 0.25 μ L, MMLV RTase 0.25 μ L, RNase Free H₂O 0.5 μ L, 50℃反应 10 min。合成的 cDNA 在 -20℃保存用于 PCR。HIF-1 α 上游引物: 5'-GGT GCT AAC AGA TGA TGG TGA C-3', 下游引物: 5'-GGC TCA TAA CCC ATC AAC T-3',

扩增产物片段长度为 478 bp。VEGF 引物: 5'-CAA TGA TGA AGC CCT GGA GTG-3'; 5'-GTC TGC GGA TCT TGG ACA AAC 3' 537 bp。 β -actin 为内参照, 上游引物 5'-AAG AGA GGC ATC CTC ACC CT-3', 下游引物 5'-TAC ATG GCT GGG GTG TTG AA-3', 扩增产物片段长度为 208 bp (上述引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成)。PCR 扩增 (TaKaRa 公司产品): PCR 反应体系 (25 μ L), 加入 cDNA 2 μ L, cDNA Dilution Buffer 8 μ L, 2 \times RealTime RT-PCR mix 12.5 μ L, dH₂O 0.5 μ L。扩增条件为 94℃预变性 30 s, 94℃变性 10 s \rightarrow 60℃退火 1 min \rightarrow 68℃延伸 1 min, 30 个循环, 68℃延伸 7 min, 4℃保存。采用自动电泳凝胶成像分析仪 (Fluor2STM Multimager, BIO2RAD 公司) 及图像分析软件 (PDQuest, BIO2RAD 公司) 对电泳条带进行灰度分析, 以 β -actin 作为内参照, 计算 HIF-1 α 积分灰度值/ β -actin 积分灰度值, 所得值为 HIF-1 α mRNA 相对表达值。

1.5 血管内皮生长因子含量测定

分别在第 3、7、14 天处死大鼠前眶静脉采血 0.5 mL, 用 VEGF 试剂盒测定 VEGF 含量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS10.0 软件进行统计学处理, 所有资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察结果

心肌梗死 3 天后, 梗死区心肌纤维溶解断裂, 细胞淡染, 大量炎细胞浸润, 心肌梗死 3 天梗死区与正常组织交界明显 (图 1)。

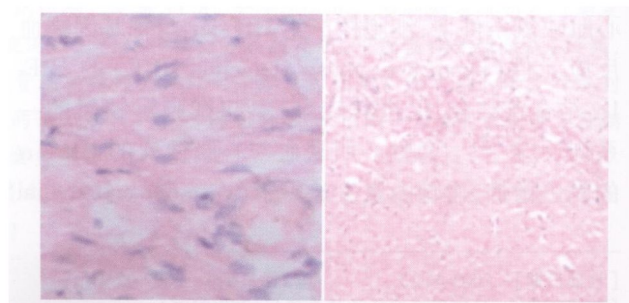


图 1 心肌梗死 3 天后心肌 HE 染色结果 左为心肌梗死 3 天后梗死区心肌 HE 染色 ($\times 400$), 右为心肌梗死 3 天后梗死区与正常组织交界区 ($\times 100$)。

2.2 心肌梗死面积测量

转染后 14 天, HIF-1 α 组 (A i/A) ($23.85\% \pm 2.25\%$) 明显小于对照组 ($38.74\% \pm 3.12\%$), 差异有显著性 ($P < 0.01$)。

2.3 免疫组织化学结果

在对照组, 梗死 3、7、14 天心肌组织断裂, 心肌梗死区阳性的毛细血管较少; 注射 HIF-1 α 质粒 3 天后心肌梗死区阳性的毛细血管未见有明显增加, 与对照组比较差异无显著性; 7 天时心肌梗死区可见有大量的 CD34 染色阳性的毛细血管, 对照组比较差异有显著性 ($P < 0.01$); 14 天时更加明显 ($P < 0.01$; 图 2 表 1)。转染 HIF-1 α 组与对照组梗死 3

天后即显示胞核或胞质呈棕黄色, 表明 HIF-1 α 表达增多, HIF-1 α 组比同一时间转染空质粒的对照组更明显 (图 3A、图 3B), 假手术组无 HIF-1 α 表达 (图 3C)。

表 1 术后各时间点各组毛细血管密度情况 (个/mm², $\bar{x} \pm s$)

分 组	3 天	7 天	14 天
对照组	365 \pm 23	435 \pm 68 ^a	492 \pm 45 ^a
HIF-1 α 组	376 \pm 25	826 \pm 44 ^{ab}	938 \pm 67 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$ 与 3 天组比较; b 为 $P < 0.01$ 与对照组比较。

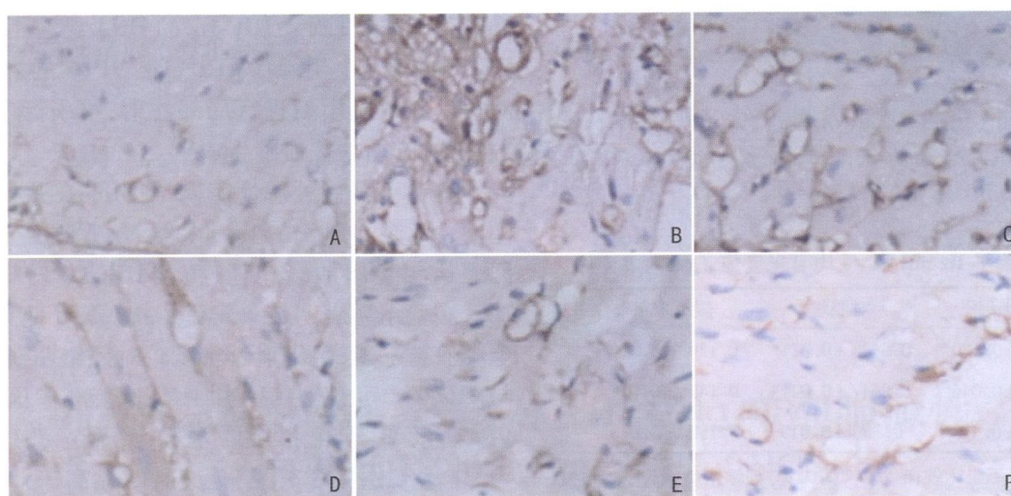


图 2. 梗死区阳性的毛细血管免疫组织化学结果 ($\times 400$) A 为注射 HIF-1 α 3 天, B 为注射 HIF-1 α 7 天, C 为注射 HIF-1 α 14 天, D 为注射 Ad-null 3 天, E 为注射 Ad-null 7 天, F 为注射 Ad-null 14 天。



图 3. 梗死区 HIF-1 α 表达免疫组织化学染色 ($\times 400$) A 为注射 Ad-HIF-1 α 3 天 HIF-1 α 表达, B 为注射 Ad-null 3 天 HIF-1 α 表达, C 为假手术组 3 天 无 HIF-1 α 表达。

2.4 血管内皮生长因子含量测定

血中 VEGF 含量在急性心肌梗死模型中, 3、7 天升高, 14 天才恢复, 而 HIF-1 α 组比对照组在 3、7 天升高更显著 ($P < 0.01$; 表 2)。

2.5 逆转录聚合酶链法测定缺氧诱导因子 1 α 和血管内皮生长因子 mRNA 表达

转染腺病毒 HIF-1 α 基因的心肌组织中第 3 天

即可测出 478 bp 的 HIF-1 α 及 537 bp VEGF 转录产物, 第 7、14 天检测仍有表达, 对照组的心肌组织虽有表达, 但相对于转染腺病毒 HIF-1 α 基因的心肌组织表达明显较弱; 而假手术组无明显表达。各组的 VEGF mRNA 和 HIF-1 α mRNA 平均吸光度值见表 3、表 4。

表 2 术后各时间点血管内皮生长因子含量的测定 (ng/L)

分 组	3天	7天	14天
HIF-1 α 组	7.4 \pm 0.3 ^{ab}	5.5 \pm 0.8 ^{ab}	1.2 \pm 0.5 ^a
对照组	4.8 \pm 0.7 ^a	3.3 \pm 0.9 ^a	1.0 \pm 0.4
假手术组	0.8 \pm 0.3	0.6 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2

a为 $P < 0.01$, 与假手术组比较; b为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

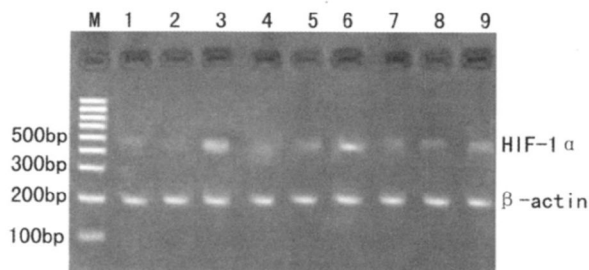


图 4 缺氧诱导因子因子 1 α mRNA 表达 M 为 marker 1、4、7 分别为假手术组 3、7 天和 14 天, 2、5、8 分别为对照组 3、7 天和 14 天, 3、6、9 分别为 HIF-1 α 组 3、7 天和 14 天。

表 3 缺氧诱导因子 1 α mRNA 平均吸光度值 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

时间	HIF-1 α 组	对照组	假手术组
3天	1.296 \pm 0.120 ^{ab}	0.341 \pm 0.021 ^a	0.156 \pm 0.016
7天	0.792 \pm 0.046 ^{ab}	0.251 \pm 0.021 ^a	0.147 \pm 0.018
14天	0.246 \pm 0.023 ^{ab}	0.153 \pm 0.019	0.150 \pm 0.013

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.01$, 与假手术组比较。

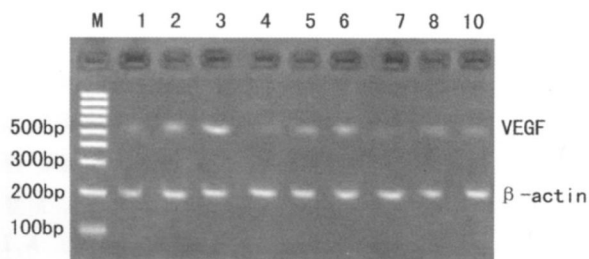


图 5 血管内皮生长因子 mRNA 表达 M 为 marker 1、4、7 分别为假手术组 3、7 天和 14 天, 2、5、8 分别为对照组 3、7 天和 14 天, 3、6、9 分别为 HIF-1 α 组 3、7 天和 14 天。

表 4 血管内皮生长因子 mRNA 平均吸光度值 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

时 间	HIF-1 α 组	对照组	假手术组
3天	1.337 \pm 0.058 ^{ab}	0.397 \pm 0.028 ^b	0.132 \pm 0.014
7天	0.797 \pm 0.049 ^{ab}	0.281 \pm 0.013 ^b	0.135 \pm 0.012
14天	0.250 \pm 0.032 ^{ab}	0.130 \pm 0.011 ^c	0.129 \pm 0.015

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.01$, 与假手术组比较。

3 讨论

HIF-1 α 是心肌缺血后一系列分子反应的启动因子之一, 也可作为心肌急性缺血的时间标志。在心肌缺氧条件下, 细胞核产生 HIF-1 α 与靶基因缺血反应元件的 HIF-1 α 结合点结合, 使其转录, 从而促进 HIF-1 α 下游区靶基因血红素加氧酶、促红细胞生成素、血管内皮生长因子、葡萄糖转运蛋白-1、葡萄糖转运蛋白 3 的转录。心肌缺血后 HIF-1 α 及 VEGF 等基因的表达, 可促使缺血心肌形成新生血管产生代偿性适应^[3]。研究证实, 细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated protein kinases, ERK) 是促进细胞存活, 抑制凋亡的重要细胞信号转导途径, 它通过调节 HIF-1 α 的 DNA 结合活性, 上调 VEGF 的表达。用编码 HIF-1 α /VP16 的裸露 DNA 对兔后肢缺血模型进行局部注射, 可引起 VEGF 的表达增加, 增加了血管生成^[6]。

本试验采用外源性腺病毒 HIF-1 α 进行心肌内注射, 可使心肌 HIF-1 α mRNA 及 VEGF mRNA 基因表达明显增加, 表明腺病毒 HIF-1 α 转染心肌成功。实验结果表明转染 HIF-1 α 14 天可见有明显的毛细血管形成, 毛细血管密度较对照组明显增多, 这与 HIF-1 α 可以明显增加 VEGF 的基因表达使 VEGF 水平升高相关。本研究显示, HIF-1 α 组 VEGF 含量在第 3 天、第 7 天时明显高于对照组, 而 VEGF 主要通过和血管内皮细胞特异性受体结合, 对血管内皮细胞具有强大的促进内皮细胞增殖、促血管生成作用; 同时, VEGF 通过刺激血管内皮细胞的游走进一步建立新的血管网^[7]。VEGF 基因转录起始点上游大约 1 kb 的 5' 侧翼区域有 28 bp 的 HRE, 包括 HIF-1 α 结合共有区域和共有区域 3' 端的序列。VEGF 基因的 HIF-1 α 结合点序列 5'-CA-CAG-3' 和 5'-TACGTGGG-3'。HIF-1 α 结合点和上游的激活蛋白-1 结合点共同构成 HRE, 诱导 VEGF 对缺氧的反应, 增加血管生成, 使血液到达缺氧部位。最近的研究表明 HIF-1 α 参与了缺血预处理的心肌保护作用。目前认为缺血预处理是最为有效的内源性保护机制^[7], 但其机理十分复杂, 涉及到众多内源性保护蛋白的参与, 究竟哪一种是关键性物质, 至今尚不明确。鉴于缺血时 HIF-1 α 的表达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, 被认为是内源性保护机制的始动因子和共同途径, 因而可以设想缺血预处理可能是通过 HIF-1 α 表达及其促进下游相关基因的转录和表达来发挥保护效应的^[8]。已有实验证据

表明 HIF-1 α 在心肌与脑缺血损伤的缺血预处理保护效应中均起着关键的作用^[9]。

转染 HIF-1 α 14天后, 转染组心肌梗死的面积明显小于对照组, 表明外源性 HIF-1 α 能明显地减少心肌梗死面积, 对心肌梗死具有保护作用。这与 HIF-1 α 增加 VEGF 的基因表达, 促进毛细血管形成, 增加侧支循环, 挽救严重缺血的濒临坏死心肌有关。同时 HIF-1 α 增加诱导型 NO 合成酶编码基因、葡萄糖载体蛋白 1 和包括乳酸脱氢酶、磷酸果糖激酶、3-磷酸甘油脱氢酶等糖酵解酶编码基因表达, 从而舒张血管, 减轻损伤, 保护心肌细胞, 进而减少心肌梗死面积。相信随着研究的深入, HIF-1 α 将在心血管系统疾病中有广泛的应用前景, 并可能是心肌缺血、心肌梗死基因治疗的新策略。

[参考文献]

- [1] Huang LE, Arany Z, Livingston DM, et al. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization

of its α subunit [J]. *Biol Chem*, 1996 **271**(11): 32 253-259

- [2] Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia [J]. *Physiol Rev*, 1996 **76**(3): 839-885
- [3] 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): 528-528
- [4] 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]. *Cardiovascular Res* 2002 **54**(3): 576-583
- [5] Lee PJ, Jiang BH, Chin H, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia [J]. *Biol Chem*, 1997 **172**(9): 5 375-381
- [6] Vincent KA, Shyu KG, Luo Y, et al. Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1 α /VP16 hybrid transcription factor [J]. *Circulation*, 2000 **102**(18): 2 255-261
- [7] Thomas KA. Vascular endothelial growth factor: a potent and selective angiogenic agent [J]. *Biol Chem*, 1996 **271**(2): 603-606
- [8] 牛铁生, 齐国先, 付鹏, 等. 缺血预适应对急性心肌梗死缺氧诱导因子 1 α 表达的影响及蛋白激酶 C 信号通路的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008 **16**(10): 796-800
- [9] Xi L, Taher M, Yin C. Cobalt chloride induces delayed cardiac preconditioning in mice through selective activation of HIF-1 α and AP21 and NO S signaling [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004 **287**(6): H 2 369-375

(此文编辑 李小玲)