文章编号:1000-5404(2007)10-0869-03

论著

牛磺酸对模拟急性高原低氧大鼠小肠组织 HIF-1α 及 HIF-1β 表达的影响

白 雪,糜漫天,陈 芳 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 探讨牛磺酸对模拟高原缺氧大鼠小肠组织 HIF-1α 及 HIF-1β 表达的影响。**方法** 动物经基础饲料或添加牛磺酸饲料喂养 7 d 后,利用低压舱分别模拟 4 500 m 及 5 500 m 海拔高度高原缺氧,分别在高原缺氧处理后第 2、6、12、24、48、72 h 处死动物,剪取小肠组织,RT-PCR 检测 HIF-1α、HIF-1β mRNA 表达,Western blot 检测 HIF-1α 蛋白表达。**结果** 缺氧条件下 HIF-1α、HIF-1β 表达明显增强,在缺氧 12 h 时达到峰值,随后逐渐减弱;添加牛磺酸组在各时相点的表达相对于未加牛磺酸组显著增强。**结论** 牛磺酸能够显著增强高原缺氧大鼠小肠组织 HIF-1α、HIF-1β 的表达。

关键词: 高原缺氧;牛磺酸;HIF-1α;HIF-1β
中图法分类号: R322.45;R364.4;R977.4 **文献标识码**: A

Effect of taurine on expressions of HIF-1α and HIF-1β in intestinal tissue of rats exposed to hypobaric hypoxia

BAI Xue, MI Man-tian, CHEN Fang (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of taurine on expression of HIF-1α and HIF-1β in the intestinal tissue of rats exposed to hypobaric hypoxia. **Methods** Totally 208 adult SD rats were randomly divided to raise at 500-meter, simulated 4 500-meter and simulated 5 000-meter altitude, and subdivided by forage: taurine supplementation (intervention) or normal forage (control). After taurine nutritional intervention for 7 d, the rats were respectively exposed to 500-meter, simulated 4 500-meter and 5 500-meter altitude. The expressions of HIF-1α and HIF-1β in the intestinal tissues were determined by RT-PCR and Western blotting in 2, 6, 12, 24, 48, 72 h after exposure to hypoxia. **Results** After exposure to hypoxia simulated in hypobaric chamber, the expressions of HIF-1α and HIF-1β in intestinal tissues increased obviously, peaked at 12 h after hypoxia, then declined. They were higher in taurine supplementation rats at each time point than that in control rats. **Conclusion** Taurine nutritional intervention can increase the expressions of HIF-1α and HIF-1β in the intestinal tissues of rats exposed to simulated high-altitude hypoxia.

Key words: high-altitude hypoxia; taurine nutritional intervention; HIF-1α; HIF-1β

急性高原缺氧会引起明显的胃肠反应,严重时会出现胃、肠黏膜糜烂、坏死、出血、溃疡形成和溃疡复发,甚至可发生溃疡穿孔[1,2]。缺氧诱导因子-1(HIF-1)是机体在低氧应答时诱导基因表达和恢复细胞内环境稳定的一个核心调节因子,对于机体适应缺氧环境和减轻缺氧损伤具有极重要作用。牛磺酸(taurine)对高原缺氧造成的脑损伤、心肌损伤以及视网膜损伤等均具有良好的防护作用[3,4]。本研究运用低压氧舱模拟不同高度高原缺氧环境,观察高原缺氧状况下大鼠小肠组织 HIF-1α 及 HIF-1β 表达变化,并探讨牛磺酸对 HIF-1α 及 HIF-1β 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

清洁级成年 SD 大鼠 208 只,体质量(200±50)g,雄性,由本校大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。动物分为平原对照组(C)、平原牛磺酸组(Tau)、4 500 m 缺氧组(45H)、4 500 m 缺氧+牛磺酸组(45HT)、5 500 m 缺氧组(55H)和 5 500 m 缺氧+牛磺酸组(55HT)6 组,C 组与 Tau 组每组 8 只,

基金项目:全军"十一五"专项项目(06Z028)
Supported by the Research Project of the "Eleventh Five-Year Plan" of PLA (06Z028)
作者简介:白 雪(1978-),女,山东省泰安市人,硕士研究生,医师,主要从事营养与疾病方面的研究。电话:(023)68752291
通讯作者:糜漫天,电话:(023)68752292
收稿日期:2006-09-11;修回日期:2006-11-14

其余4组每组48只，分2、6、12、24、48、72 h共6个时相点。C组和45H、55H组喂食基础饲料，Tau组、45HT、55HT组在基础饲料基础上添加2.4%的牛磺酸进行喂食，各组自由进食饮水。动物分组喂养7 d后，45H、45HT、55H、55HT 4组分别置于低压氧舱模拟海拔4 500 m和5 500 m高度进行高原缺氧处理，减压速度为100 m/min。减压至实验设定的高度后，维持此高度。按设计的条件进行缺氧处理，分别在2、6、12、24、48、72 h后将动物迅速移出并取材。

1.2 主要试剂

牛磺酸购于北京世纪维他生物技术有限公司，Trizol分离试剂、Erasol购于华氏生物技术公司，M-MuLV逆转录酶、Oligo-(dT)18、*Taq* DNA聚合酶购于Promega公司，PCR marker购于北京天为时代科技公司，蛋白分子质量标准为Fermentas产品，苯甲基磺酰氟(PMSF)购于Merck公司，PVDF膜为OSMONES产品，DAB购于北京中山生物技术有限公司，兔抗鼠β-actin、SP-9001试剂盒兔S-P Ki购于Santa Cruz公司，兔抗鼠HIF-1α购于博士德。

1.3 指标检测

1.3.1 小肠组织总RNA的提取 C组与Tau组动物在其他缺氧组进行模拟高原缺氧时处死取材，其余4组分别在高原缺氧处理后第2、6、12、24、48、72 h取8只大鼠处死检测指标。制备组织匀浆，利用Trizol试剂抽提，常规提取总RNA。

1.3.2 RT-PCR检测HIF-1α、HIF-1β mRNA表达 常规逆转录及PCR反应。引物应用Primer 5.0引物设计软件设计，由重庆升博生物技术公司合成。HIF-1α、HIF-1β及内参照β-actin引物序列、退火温度及产物长度见表1。扩增的反应参数为94 ℃、5 min，94 ℃、45 s，Tm、45 s，72 ℃、1 min，共30个循环，72 ℃延长10 min。反应结束后，各取5 μl PCR扩增产物，以含0.5 μg/ml溴化乙啶的1.2%琼脂糖凝胶进行电泳，紫外透射仪下进行观察，并用凝胶成像系统进行照相。

表1 PCR引物序列及退火温度

名称	引物序列	产物长度(bp)	退火温度(℃)
β-actin	上游：5′-AAGTCCCTCACCCTCCCAAAAG-3′	100	57.2
	下游：5′-AAGCAATGCTGTCACCTTCCC-3′		
HIF-1α	上游：5′-CTGATTGCATCTCCACCTTCTACC-3′	344	57.4
	下游：5′-TTCCAAGAAAGCGACATAGTAGGG-3′		
HIF-β	上游：5′-CACTGGGTCCCACCATTGCTTCT-3′	258	60.0
	下游：5′-GTCGCCGCCGCTCTATTTCACTA-3′		

1.3.3 小肠组织总蛋白的提取 常规制备小肠组织匀浆，加入200 μl预冷至0 ℃的细胞总蛋白提取裂解液，冰上放置30 min，4 ℃、15 000 r/min离心15 min，将上清液转移至1.5 ml离心管中，于 −20 ℃保存。Lowry法利用核酸蛋白检测仪测定蛋白质含量。

1.3.4 Western blot检测HIF-1α蛋白表达 各取蛋白样品100 μg上样，10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)，转膜，与一抗(1∶100)4 ℃孵育过夜；二抗(1∶20)37 ℃振摇1 h；DAB避光显色3～5 min，至理想条带出现。

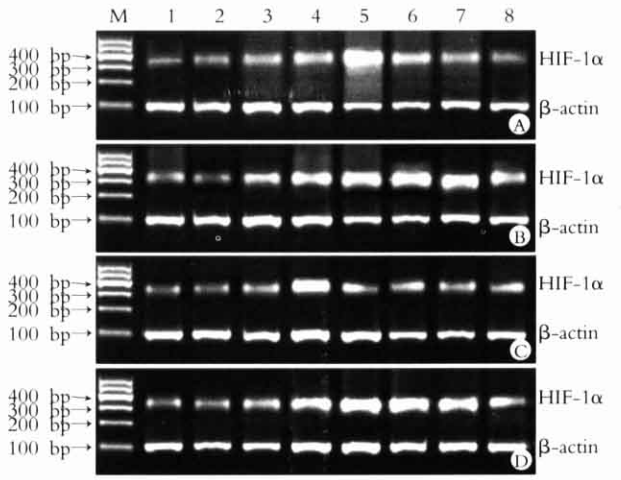
1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 牛磺酸对缺氧大鼠小肠组织HIF-1α mRNA表达的影响

RT-PCR结果显示，平原对照组大鼠小肠组织HIF-1α mRNA表达很弱，Tau组表达微强于C组。缺氧各组HIF-1α mRNA表达在缺氧2 h即开始增强，45H组在缺氧12 h HIF-1α mRNA表达达到高峰，在24、48、72 h表达逐渐降低；55H组在缺氧6 h HIF-1α mRNA表达最强，随后逐渐降低；45HT组与55HT组也显示出相同的表达趋势，但各时相点的表达相对于未加牛磺酸组明显增强($P<0.05$)。见图1。



A：45H组；B：45HT组；C：55H组；D：55HT组 M：标准；1：平原对照组；2：平原牛磺酸组(Tau)；3－8：分别为高原缺氧处理后第2、6、12、24、48、72 h

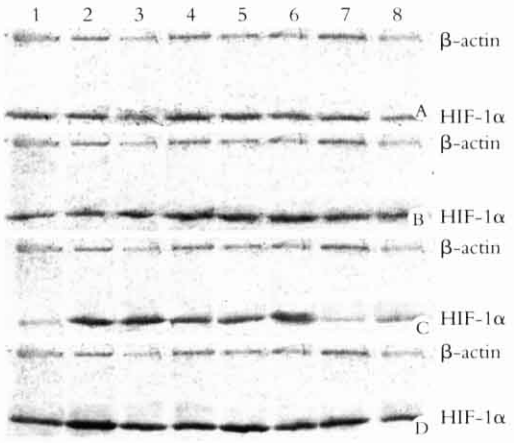
图1 各组大鼠小肠组织HIF-1α mRNA表达的PCR检测结果

2.2 牛磺酸对缺氧大鼠小肠组织HIF-1α蛋白表达的影响

对HIF-1α蛋白表达的Western blot检测结果显示：C组与Tau组HIF-1α蛋白表达很弱；45H组和45HT组在缺氧处理后HIF-1α蛋白表达明显强于C组和Tau组；55H组和55HT组在缺氧早期表达开始增强，后期逐渐减弱。45HT组与55HT组与未加牛磺酸组相比各时相点的表达均有增加($P<0.05$)。见图2。

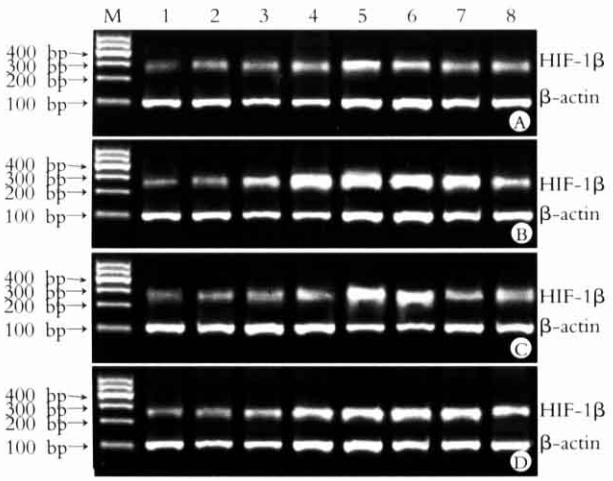
2.3 牛磺酸对缺氧大鼠小肠组织HIF-1β mRNA表达的影响

HIF-1β mRNA的RT-PCR结果与HIF-1α mRNA的结果类似。C组与Tau组HIF-1β mRNA表达均很弱；缺氧各组HIF-1β mRNA表达在缺氧2 h即开始增强，12 h表达达到高峰，随后逐渐降低，在6、12、24 h呈强表达；45HT组与55HT组也显示相同的表达趋势，但各时相点的表达相对于未加牛磺酸组明显增强($P<0.05$)。见图3。



A:45H 组；B:45HT 组；C：55H 组；D：55HT 组　1：平原对照组；2－7：分别为高原缺氧处理后第 2、6、12、24、48、72 h；8：平原牛磺酸组(Tau)

图 2　各组大鼠小肠组织 HIF－1α 蛋白表达的 Western blot 检测结果



A：45H 组；B：45HT 组；C：55H 组；D：55HT 组　M：标准；1：平原对照组；2：平原牛磺酸组(Tau)；3－8：分别为高原缺氧处理后第 2、6、12、24、48、72 h

图 3　各组大鼠小肠组织 HIF-1β mRNA 表达的 PCR 检测结果

3　讨论

HIF-1 中的 α 亚基受低氧诱导表达，是调节 HIF-1 活性的功能亚单位，决定 HIF-1 的转录活性及 DNA 结合活性，β 亚基则属构建型表达。在细胞缺血、缺氧时，HIF-1 产生并处于缺氧应答的关键环节，通过调控其下游靶基因的转录、表达，促进机体对缺氧产生一系列的适应反应，这是目前研究比较明确的缺氧诱导基因转录和缺氧信息传递的共同通路。因此被称为缺氧适应调节的管家转录因子[5]。

小肠组织为缺氧敏感组织，血液中氧的水平及弥散入组织的氧浓度，对维持肠黏膜上皮细胞的各种正常代谢起着至关重要的作用，缺氧可对肠黏膜组织造成严重的损伤。研究证明，牛磺酸具有保护心血管系统、调节神经系统、促进消化吸收及解毒等广泛的生理、药理活性[6,7]，同时牛磺酸在体内还具有细胞保护作用，能够抗氧化及清除过量自由基、稳定细胞膜、保持细胞内 Ca^{2+} 稳定等，研究表明，在脑和视网膜组织缺血缺氧中，牛磺酸能降低血小板聚集、拮抗兴奋性氨基酸的神经毒性，具有调节 Ca^{2+} 稳态的作用、减少 NO 和自由基产生、抗脂质过氧化、降低组织缺血中细胞凋亡的发生及影响缺氧诱导因子的表达[3,4]。本研究通过模拟不同海拔高度缺氧状况，对高原缺氧大鼠小肠组织 HIF-1α、HIF-1β 的表达进行了观察，并观察了牛磺酸对 HIF-1α、HIF-1β 表达的影响。研究结果表明，C 组和 Tau 组大鼠小肠组织 HIF-1α、HIF-1β 表达极弱，表明在正常氧环境中，小肠组织内 HIF-1α、HIF-1β 几乎不表达；45H 组和 55H 组 HIF-1α、HIF-1β mRNA 在缺氧 2 h 即开始增强，45H 组在缺氧 12 h HIF-1α mRNA 表达达到高峰，在 24、48、72 h 表达逐渐减弱；55H 组在缺氧 6 h HIF-1α mRNA 表达最强，随后逐渐降低；HIF-1α 蛋白表达及 HIF-1β mRNA 表达也基本与之类似；45HT 组与 55HT 组也显示出相同的表达趋势，但各时相点的表达相对于未加牛磺酸组明显增强，这表明牛磺酸能够有效促进缺氧状况下小肠组织 HIF-1α、HIF-1β 的表达，增强机体对缺氧的适应能力。牛磺酸是否通过 HIF-1 通路调节下游靶基因的表达，从而促进小肠组织对缺氧的适应，减轻缺氧对小肠组织造成的损伤，其作用及机制值得进一步的研究。

参考文献：

[1] 糜漫天，郭长江. 军事营养学[M]. 北京：人民军医出版社，2004：58－61.

[2] Tappenden K A. Provision of phosphorylatable substrate during hypoxia decreases jejunal barrier function[J]. Nutrition, 2002, 18(2): 168－172.

[3] 刘载环，糜漫天，张乾勇，等. 模拟海拔 5 000 m 高原间断性缺氧对大鼠视网膜的损伤及牛磺酸的防护作用[J]. 第三军医大学学报，2004，26(21)：1936－1939.

[4] 祝　芬，马季骅，张培华. 牛磺酸对低氧条件下豚鼠心室肌细胞动作电位和 ATP 敏感性钾电流的影响[J]. 中国病理生理杂志，2005，21(1)：92－95.

[5] Hon W C, Wilson M I, Harlos K, *et al*. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL[J]. Nature, 2002, 417(6892): 975－978.

[6] Hanna J, Chahine R, Aftimos G, *et al*. Protective effect of taurine against free radicals damage in the rat myocardium[J]. Exp Toxicol Pathol, 2004, 56(3): 189－194.

[7] Cetiner M, Sener G, Sehirli A O, *et al*. Taurine protects against methotrexate-induced toxicity and inhibits leukocyte death[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 209(1): 39－50.

（编辑　龙　亮）