文章编号:1000-5404(2008)18-1733-03

论著

局灶性脑缺血再灌注后大鼠脑组织 HIF-1α 表达的观察

罗开俭[1],陶 陶[1],邓 进[1],叶 兰[2] (贵阳医学院:[1]附属医院急救医学教研室,[2]药理学教研室,贵阳 550004)

摘 要:目的 探讨局灶性脑缺血再灌注后大鼠脑组织缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)的表达及意义。**方法** 制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,动物分为缺血2 h再灌注6 h、1、2、3、4 d及假手术对照组。应用免疫组化法检测HIF-1α蛋白、原位杂交及RT-PCR法检测HIF-1α mRNA的表达变化。**结果** 免疫组化及原位杂交法检测显示:大鼠缺血再灌注6 h,缺血侧脑组织梗死灶周边HIF-1α及HIF-1α mRNA阳性反应已出现,随再灌注时间的延长阳性表达增强,一直持续到第3天,第4天显著下降;RT-PCR检测HIF-1α mRNA在6 h后已有表达,随再灌注时间的延长,HIF-1α mRNA的表达呈上升的趋势,在第3天达高峰,第4天显著下降。**结论** 脑缺血再灌注损伤可以诱导HIF-1α表达增强,提示HIF-1α对缺血性脑损伤有保护作用。

关键词: 局灶性脑缺血;缺氧诱导因子-1α
中图法分类号: R394;R741.02;R743.32 **文献标识码:** A

Expression of HIF-1α after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats

LUO Kai-jian[1], TAO Tao[1], DENG Jin[1], YE Lan[2] ([1]Department of Emergency, The Affiliated Hospital, [2]Department of Pharmacology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

Abstract: Objective To study the expression of hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1α) and HIF-1α mRNA after focal cerebral ischemia reperfusion in rats. Methods Adult male SD rats were divided into six groups: sham operation group, 5 groups of ischemia/reperfusion (the rats undergoing 2-hour ischemia and then 6-hour, 1-day, 2-day, 3-day and 4-day reperfusion), with 6 rats in each group. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) was set up in male SD rats according to Longa' method. The cerebral tissues were analyzed with immunohistochemical methods. The level of HIF-1α protein by immunohistochemical methods and the level of HIF-1α mRNA by in situ hybridization and RT-PCR were detected in the brain tissues. Results HIF-1α protein expression started at 6 h after reperfusion, increased remarkably on day 1, reached the peak on day 3, then declined markedly on day 4. HIF-1α mRNA increased at 6 h after reperfusion, peaked on day 3, then declined on day 4. HIF-1α expression was mainly in the periphery of infarcted area at each time point. Conclusion High expression of HIF-1α during focal cerebral ischemia/reperfusion in the rat brain tissues, suggests that HIF-1α has neuroprotective effect against cerebral ischemic injury.

Key words: focal cerebral ischemia; hypoxia inducible factor-1α

缺血性脑血管病是一个复杂的病理过程,其中半暗带保护、缺血耐受、再灌注损伤、细胞凋亡已成为研究的热点问题。缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是低氧应答过程中起重要作用的转录因子,参与机体的病理生理过程,在缺血性脑血管病中通过多种机制发挥着重要的神经保护作用[1,2],对HIF-1的研究,将使人们对缺血性脑血管病的病理机制有更深入的了解,本研究就HIF-1α在大鼠局灶性脑缺血再灌注后其蛋白及基因的表达及变化进行观察,以探讨脑缺血后HIF-1α表达的意义,为缺血性脑血管病的治疗提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

成年雄性Sprague-Dawley大鼠,清洁级,体质量200~250 g,购自贵阳医学院实验动物中心。按随机数字表法分成假手术对照组及实验组,实验组又分为缺血2 h再灌注6 h、1、2、3、4 d,每组均为6只。

1.2 局灶性脑缺血模型制备

局灶性脑缺血模型制备参照文献[3],动物麻醉,固定、分

基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长基金(2006)60号
Supported by the Nomarch Funds for Excellent Sci & Tech Teachers of Guizhou Province (2006)
作者简介:罗开俭,男,贵州省织金县人,副主任医师,主要从事脑血管病方面的研究。电话:(0851)6504595, E-mail:GY96999@163.com.
通信作者:陶 陶,电话:(0851)6740612;E-mail:ttdoc603@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-06-05;修回日期:2008-07-02

离并手术,结扎颈外动脉分支起始处、颈总动脉近心端和冀腭动脉的近心端,在颈总动脉分叉切口处剪一小口,把头端蘸有清漆的4-0外科尼龙线向颈内动脉端插入,行右侧大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)手术,继续向前推进直到感觉有轻微阻力,即约18 mm,提示已到大脑中动脉的起始部。2 h后缓慢退出尼龙线即可实施再灌注。动物苏醒后观察其体态及行为,以判断MCAO模型成功。假手术组:插入尼龙线后马上抽出,余步骤同手术组。

1.3 免疫组织化学检测HIF-1α的表达

石蜡切片,常规脱蜡至水,3% H_2O_2 室温孵育10 min,滴加正常山羊血清封闭,滴加适当比例稀释的一抗(按1∶200稀释,Santa Cruz)用PBS代替一抗作阴性对照,4 ℃湿盒过夜,PBS漂洗,滴加生物素化二抗工作液,37 ℃孵育,PBS漂洗,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 ℃孵育,PBS漂洗,DAB显色,常规复染,二甲苯透明,中性树胶封片。

结果判定:阳性细胞为细胞质或细胞核呈棕黄色。

1.4 原位杂交检测脑组织HIF-1α mRNA的表达

缺氧诱导因子原位杂交检测试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司,所用探针为经地高辛标记的针对HIF-1α基因的多相寡核苷酸探针。探针序列为:5′-TTATGAGCTTGCTCATCAGTTGCCACTTCC-3′;5′-CTCAGTTTGAACTAACTGGACACAGTGTGT-3′;5′-GGCCGCTCAATTTATGAATATTATCATGCT-3′;操作步骤按试剂盒说明书进行。结果判定:阳性细胞细胞质或细胞核呈棕黄色。

1.5 RT-PCR法检测脑组织HIF-1α mRNA的表达

将大鼠断头取脑,取梗死灶周围组织在1‰的DEPC水中稍作漂洗,立即放入细胞冻存管中,液氮中保存备用。

按Trizol(Invitrogen)试剂盒说明书提取组织总RNA。

应用Primer Design软件设计引物,HIF-1α:被扩增的cDNA引物长466 bp,上游5′-ACAGTGGTACTCACAGTCGG-3′,下游5′-CCCTGCAGTAGGTTTCTGCT-3′;β-actin(作内参照):被扩增的cDNA引物长402 bp,上游5′-GCCACTGCCGCATCCTCT-3′,下游5′-CTCCTGCTTGCTGATCCACAT -3′。

采用Promega RT-PCR一步法成套试剂盒。RT-PCR反应条件为94 ℃,5 min 1个循环;94 ℃ 45 s;60 ℃ 45 s;72 ℃ 1 min,25个循环;72 ℃ 10 min,1个循环。

采用琼脂糖电泳观察PCR产物,电泳后的琼脂糖凝胶板经凝胶成像处理系统拍摄图像,记录积分光密度值。

产物的含量=HIF-1α扩增产物的光密度值/β-actin扩增产物的光密度值×100%。

1.6 图像分析

采用北航(CM-2000B)图像分析系统进行定量分析,自动记录相应脑区阳性细胞光密度值。在每张切片随机选取10个高倍视野进行图像分析,各组所选部位相同。

1.7 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 10.0统计软件,组间比较采用重复测量的单因素方差分析。

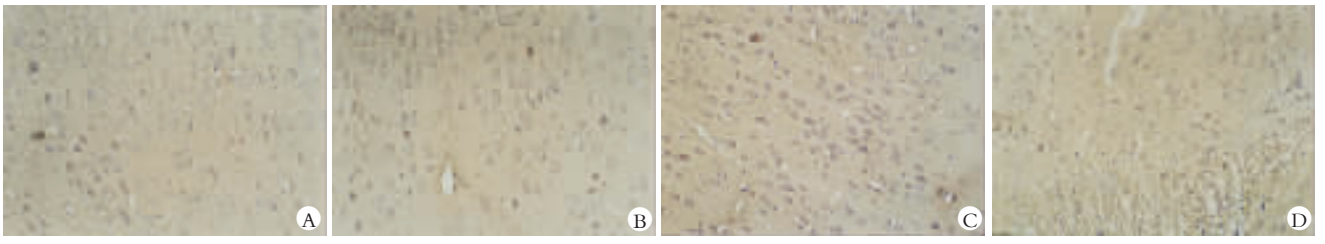
2 结果

2.1 免疫组织化学检测HIF-1α蛋白的表达

假手术对照组大鼠偶见HIF-1α阳性细胞表达,因表达量太少无法进行图像分析。脑缺血再灌注组在再灌注6 h时已观察到HIF-1α的弱阳性表达,随再灌注时间的延长阳性表达增强,一直持续到3 d,第4天显著下降。缺血再灌注1、2、3、4 d分别与缺血再灌注6 h相比有统计学差异($P<0.05$, $P<0.01$)。阳性细胞主要表达于细胞核,也有部分细胞质表达(表1,图1)。

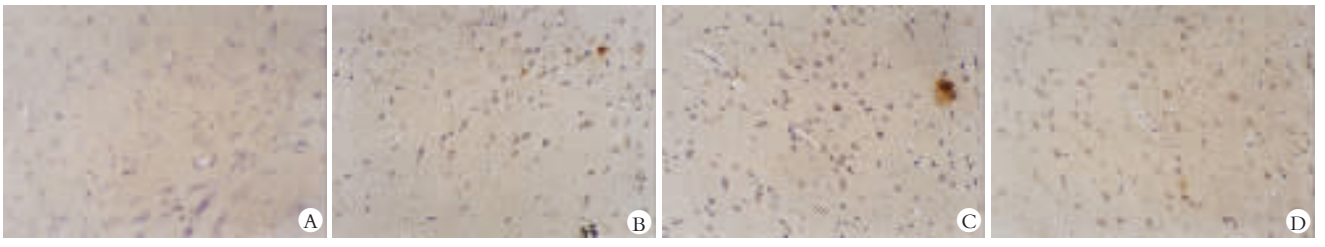
2.2 原位杂交检测脑组织HIF-1α mRNA的表达

假手术对照组大鼠脑组织HIF-1α mRNA表达较弱,无法行图像分析。脑缺血再灌注后6 h已有HIF-1α mRNA的阳性细胞,随再灌注时间的延长,HIF-1α mRNA的表达呈上升的趋势,第3天达高峰,第4天显著下降。缺血再灌注1、2、3、4 d、分别与缺血再灌注6 h相比有统计学差异($P<0.05$, $P<0.01$)。阳性细胞的表达也主要在细胞核,也有部分细胞质表达(表1,图2)。



A:脑缺血再灌注后6 h;B:脑缺血再灌注后1 d;C:脑缺血再灌注后2 d;D:脑缺血再灌注后3 d

图1 局灶性脑缺血再灌注后免疫组织化学检测大鼠脑组织缺血半暗带HIF-1α蛋白的表达 (SABC×200)



A:脑缺血再灌注后6 h;B:脑缺血再灌注后1 d;C:脑缺血再灌注后2 d;D:脑缺血再灌注后3 d

图2 局灶性脑缺血再灌注后原位杂交检测大鼠脑组织缺血半暗带HIF-1α mRNA的表达 (SABC×200)

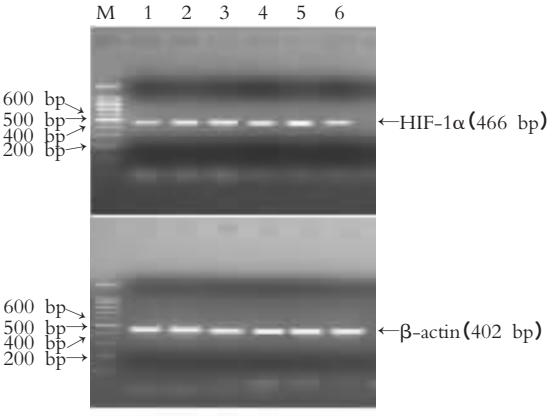
表 1　大鼠局灶性脑缺血再灌注后 HIF-1α 蛋白及 HIF-1α mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1α 蛋白	HIF-1α mRNA
缺血再灌注 6 h	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01
缺血再灌注 1 d	0.24 ± 0.03[a]	0.25 ± 0.02[a]
缺血再灌注 2 d	0.25 ± 0.02[a]	0.27 ± 0.03[a]
缺血再灌注 3 d	0.27 ± 0.04[a]	0.33 ± 0.04[a]
缺血再灌注 4 d	0.20 ± 0.02[b]	0.21 ± 0.03[b]

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与缺血再灌注 6 h 组比较

2.3　RT-PCR 检测脑组织 HIF-1α mRNA 的表达结果

从电泳结果可见,假手术对照组 HIF-1α mRNA 有较弱表达,脑缺血再灌注组 6 h 已开始明显上升,随再灌注时间的延长,HIF-1α mRNA 的表达呈上升的趋势,第 3 天达高峰, 第 4 天显著下降。缺血再灌注 1、2、3、4 d 分别与缺血再灌注 6 h 相比差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 3。



M:DNA 标准; 1 – 6:分别为对照组、脑缺血再灌注 6 h, 1、2、3、4 d 组

图 3　局灶性脑缺血再灌注后大鼠脑组织在不同时间点 RT-PCR 检测 HIF-1α mRNA 的表达

3　讨论

HIF-1 最先由 Semenza 等[4]在缺氧诱导的细胞核提取物中发现,能与人红细胞生成素基因 3′增强子序列结合,促进其转录,是一种异二聚体结合 DNA 的蛋白质因子,主要由 HIF-1α、HIF-1β 2 个亚基组成。HIF-1 的生物学功能主要取决于 HIF-1α 亚基的蛋白质水平和活性。Semenza[1]研究发现 HIF-1 在防治心肌梗死和脑缺血的过程中起重要作用,通过基因或药物手段调节 HIF-1 活性可阻止这些疾病的发展。

HIF-1α 在缺氧缺血性脑损伤中起着重要作用[5]。无论是在全身缺氧、脑半球性缺血、脑局灶性缺血时,脑组织中都发现有 HIF-1α 的激活。在成年大鼠永久性大脑中动脉结扎后[6],HIF-1α mRNA 在缺血半影区明显上调,在缺血后 7.5 h 即可观察到,缺血后 19 ~ 24 h 达高峰,与此相适应,在 HIF-1α mRNA 表达增加的缺血半影区,脑血流量局灶性减少,推测可能是由于脑血流量的减少,减少了氧供,从而导致 HIF-1α mRNA 的诱导产生增加。此外 Sharp 等[7]发现,在局灶性脑缺血中,HIF-1α 表达区域均出现血流量下降,揭示脑缺血后 HIF-1α 表达区域即是梗死周围慢性缺氧的区域。我们的研究结果亦显示:在局灶性脑缺血再灌注 6 h 时免疫组化已观察到 HIF-1α 的弱阳性表达,随再灌注时间的延长表达逐渐增强,一直可持续到 3 d,以梗死灶周围的半暗带最多,原位杂交及 RT-PCR 检测到的 HIF-1α mRNA 于再灌 6 h 也有弱阳性表达,随再灌注时间的延长,其表达均呈上升趋势,第 3 天达高峰, 第 4 天显著下降。HIF-1α 蛋白和 mRNA 的表达变化相平行。HIF-1α 表达的增强对缺血性脑损伤有保护作用,其作用机制是:脑组织缺血缺氧均可导致脑缺血半暗带 HIF-1α mRNA 的表达增加,进而诱导糖酵解基因的表达,促进无氧代谢;诱导血管内皮生长因子的表达,促进血管生成;诱导一氧化氮合酶及血红素氧化酶的表达而发挥扩张血管的作用;并能激活红细胞生成素基因的表达,促使红细胞生成增加,提高其携氧能力,从而使缺氧的组织细胞保持氧稳定和耐受低氧状态[8]。

总之,本研究表明脑缺血再灌注损伤可以诱导 HIF-1α 表达增强,提示 HIF-1α 对缺血性脑损伤有保护作用,从而为缺血性脑血管病的治疗提供新的途径。我们可通过基因或药物手段调节 HIF-1 的活性来对缺血性脑损伤产生神经保护作用,这是我们下一步将要进行研究的课题。

参考文献:

[1] Semenza G L. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology[J]. Trends Mol Med, 2001, 7(8): 345 – 350.
[2] Semenza G L. HIF-1 and human disease: one highly involved factor [J]. Genes Dev,2000, 14(16): 1983 – 1991.
[3] Longa E Z,Weinstein P R,Carlson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989,20 (1): 84 – 91.
[4] Semenza G L, Wang G L. A nuclear factor induced by hypoxia *via* de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation[J]. Mol Cell Biol, 1992, 12(12): 5447 – 5454.
[5] Kietzmann T, Knabe W, Schmidt-Kastner R. Hypoxia and hypoxia- inducible factor modulated gene expression in brain: involvement in neuroprotection and cell death[J]. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2001, 251(4): 170 – 178.
[6] Bergeron M, Yu A Y, Solway K E, *et al*. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain[J]. Eur J Neurosci , 1999, 11(12):4159 – 4170.
[7] Sharp F R, Lu A, Tang Y, *et al*. Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia[J], J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(7): 1011 – 1032.
[8] Matsuda T, Abe T, Wu J L, *et al*. Hypoxia-inducible factor-1alpha DNA induced angiogenesis in a rat cerebral ischemia model[J]. Neurol Res, 2005, 27(5): 503 – 508.

(编辑　王小寒)