文章编号:1000-5404(2009)12-1189-04

论著

缺氧诱导因子-1α在紫绀型先心病患儿心肌中的表达

蹇 朝,马瑞彦,王 咏,陈劲进,陈 林,钟前进,王学锋,肖颖彬 (第三军医大学新桥医院全军心血管外科中心,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨紫绀型先心病患儿心肌细胞中缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α,HIF-1α)蛋白和mRNA的表达和意义。**方法** 入选进行手术矫治的先心病患儿28例,其中紫绀型先心病患儿16例,非紫绀型先心病患儿12例。取手术中切除的右室流出道心肌组织作为标本,采用Western blot和RT-PCR分别检测HIF-1α蛋白及mRNA在心肌组织中的表达情况,并用免疫组化染色检测HIF-1α在心肌细胞中的分布。**结果** 紫绀组患儿术前血氧饱和度明显低于非紫绀组($P<0.01$);与非紫绀组相比,紫绀组患儿HIF-1α蛋白表达明显增高($P<0.001$),而mRNA表达无统计学意义($P>0.05$)。免疫组化结果表明,HIF-1α主要分布在心肌细胞细胞质中,在细胞核内也有分布。**结论** 在紫绀型先心病患儿心肌细胞中,HIF-1α表达增加,HIF-1α可能参与慢性缺氧状态下心肌代谢的适应性调节。

关键词: 紫绀型先心病;HIF-1α;代谢的适应调节
中图法分类号: R322.11;R341;R725.411 **文献标识码:** A

Expression of hypoxia inducible factor-1α in the myocardium of infants with cyanotic congenital heart defects

JIAN Zhao, MA Rui-yan, WANG Yong, CHEN Jing-jin, CHEN Lin, ZHONG Qian-jin, WANG Xue-feng, XIAO Ying-bin (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the protein and mRNA expression of hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) in the myocardium of infants with cyanotic congenital heart defects and the related significance. Methods A total of 28 children with cyanotic ($n=16$) or acyanotic cardiac defects ($n=12$) were investigated. Samples from the right ventricular myocardium taken immediately after aortic clamping were studied for protein and mRNA expression. Results Immunohistochemistry revealed HIF-1α expression both in the cytoplasm and nucleus. Protein level of HIF-1α increased significantly ($P<0.001$) in patients with cyanotic as compared with that in patients with acyanotic congenital heart disease and inversely correlated with the degree of hypoxemia. No difference was found in HIF-1α mRNA expression between the two groups ($P>0.05$). Conclusion Chronic hypoxemia may be associated with the induction and stabilization of the transcription factor HIF-1α. Thus, stabilization of HIF-1α and induction of the adaptive hypoxia response could particularly participate in myocardial adaptive metabolic effects in children with congenital cardiac defects and chronic hypoxemia.

Key words: cyanotic congenital heart defect; hypoxia-inducible factor-1α; adaptive metabolic effect

深入研究紫绀型先心病的病理生理改变以及慢性缺氧条件下心肌细胞的自我调节和适应机制,将有望提高紫绀型复杂性先心病的临床治疗水平。缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α,HIF-1α)作为细胞在缺氧应激下自身调节的主要因子之一,其在心血管系统中的重要作用[1,2]逐渐引起关注,HIF-1α被认为在心脏发育和心功能维持上有不可替代的作用。近年来,HIF-1α在慢性心肌缺血及急性心肌梗死中已有广泛研究[3,4],但有关其在紫绀型先心病中的作用研究甚少。HIF-1α是细胞适应慢性缺氧环境的关键调节因子,因此,深入研究HIF-1α在慢性缺氧心肌中的作用可能有重要的临床意义。本研究将观察HIF-1α蛋白和mRNA在慢性缺氧心肌中的表达情况,旨在探

作者简介:蹇 朝,男,四川省苍溪县人,硕士研究生,主要从事紫绀型先心病病理生理改变方面的研究。电话:(023)68774607,E-mail:zjian918@yahoo.com
通信作者:肖颖彬,E-mail:xiaoyb@vip.sina.com
收稿日期:2009-02-11;修回日期:2009-03-04

讨 HIF-1α 在慢性缺氧心肌中的表达及作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料与分组

研究经本院伦理委员会批准,在术前征得患儿家属同意并签署知情同意书。以入院后经我院经验丰富的心脏彩超技师复查的心脏多普勒彩超为主要诊断标准,如有行心室造影检查,则以造影检查结果作为确诊标准。常温环境不吸氧 1 h 以上测四肢血压和血氧饱和度。按照以下纳入标准:非紫绀组,平均血氧饱和度 >95% 且四肢血氧饱和度差异小于等于 2%,临床诊断为室间隔缺损合并右室流出道狭窄,术中行室间隔缺损修补术,同时行右室流出道疏通术;紫绀组,平均血氧饱和度 <85% 且四肢血氧饱和度差异≤2%,临床诊断为法洛四联症或室间隔缺损合并肺动脉闭锁Ⅰ型或Ⅱ型,术中需要行右室流出道疏通术。根据以上纳入标准,入选 2008 年 1 -7 月在本科行手术治疗的先心病患儿 28 例,其中男性 15 例,女性 13 例,纳入非紫绀组 12 例,紫绀组 16 例,平均年龄 12.5(12.5 ±3.8)个月,术前心脏彩超提示平均射血分数为 61% [(61.0 ±3.5)%],所有患儿入院后病史、查体和实验室检查排除心脏合并畸形、唐氏综合征及其他系统病变。入组患儿临床资料见表 1。

表 1 紫绀组和非紫绀组患儿临床资料 ($\bar{x} \pm s$)

	非紫绀组	紫绀组
性别(女/男)	7/5	6/10
手术时年龄(月)	15.6 ±4.1	10.1 ±3.2
临床诊断	VSD + RVOS (n =12)	TOF(n =13) VSD + PA(n =3)
术前血氧饱和度(%)	97.0 ±1.5	78.5 ±3.5[a]
血红蛋白(g/dl)	12.5 ±2.3	15.6 ±3.5[a]
射血分数(%)	65.0 ±4.0	63.0 ±2.5

a: P <0.05,与非紫绀组比较;VSD:室间隔缺损;RVOS:右室流出道狭窄;TOF:法洛四联症;PA:肺动脉狭窄

1.2 方法

1.2.1 标本的采集 常规麻醉、开胸建立体外循环,取手术中切除的右室流出道心肌组织作为标本,并将其分为两部分,一部分立即放入液氮中冻存,用于 Western blot 检测 HIF-1α 蛋白表达和 RT-PCR 检测 HIF-1α mRNA 表达;另一部分即放入 10% 福尔马林溶液中固定,用于免疫组化检测 HIF-1α 蛋白在心肌细胞中的分布。

1.2.2 免疫组化对 HIF-1α 在心肌中的定位 心肌组织固定后用石蜡包埋,常规切片 4 μm 厚度。一抗为兔抗人 HIF-1α 多克隆抗体(购自 Santa Cruz, USA),稀释浓度为1∶200,二抗为生物素标记的辣根过氧化物酶山羊抗兔 IgG 抗体(北京中山科技有限公司),染色步骤按照试剂盒说明书进行,阴性对照为用磷酸盐缓冲液代替一抗。显微镜观察 HIF-1α 的阳性着色部位分布及其密度变化。

1.2.3 Western blot 在液氮中取出冻存的心肌组织,取 100 mg 溶解于缓冲液中制成匀浆,离心 30 min 后取上清液测定蛋白质含量。各标本取等量蛋白质样品于 95 ℃加热 5 min 后,加入 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳,将蛋白质从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶转移到聚二氟乙烯滤膜上,在脱脂奶粉磷酸缓冲液中封闭 1 h 。随后,加入兔抗人 HIF-1α 多克隆抗体(购于 Santa Cruz, USA),置 4 ℃摇床过夜,以 β-actin 为内参。再加入山羊抗兔 IgG 37 ℃孵育 1 h,化学发光试剂显色,X 线片感光显影,测定目的条带和内参条带灰度值。将目的条带和内参条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达含量。

1.2.4 RT-PCR 用 Trizol 一步法提取心肌组织总 RNA。取 2 μg 总 RNA 用逆转录试剂盒合成 cDNA 第 1 链。检索基因库中人体 HIF-1α 的 cDNA 序列。上游 5′-GCACAGACATCTGCCAGGGAGC-3′, 位点 411, 下游 5′-GCCTGTGAAGTCCTCAAAGCCC-3′,位点 757,片段大小为 172 bp ,退火温度:63 ℃。以 β-actin 为内参。在总反应体系中加入目标基因和内参基因上下游引物各 0.1 μmol/L,加去离子水至 25 μl。在反应结束后取 PCR 产物 5 μl 2% 琼脂糖凝胶上电泳,用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行分析。与内参基因表达的条带灰度值相比为目的基因的相对表达含量。

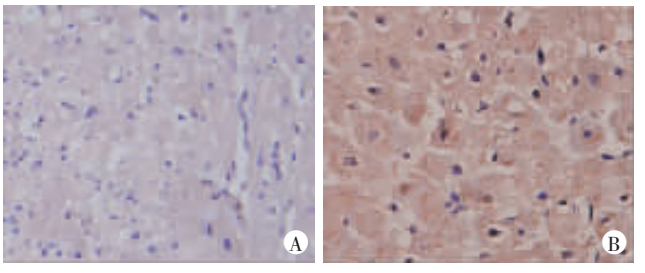
1.3 统计学分析

所有数据采用统计软件 SPSS 11.0 分析,数值均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。HIF-1α 蛋白表达和血氧饱和度之间的关系用直线相关分析。

2 结果

2.1 心肌组织中 HIF-1α 表达的定位

免疫组化的特异性染色,HIF-1α 蛋白阳性染色棕褐色颗粒,主要定位于心肌细胞细胞质中,而在细胞核内也可见其表达。紫绀组蛋白强度和密度较非紫绀组均有显著增加,后者未见明显阳性表达。见图 1。



A:非紫绀型先心病患儿心肌中未见明显 HIF-1α 表达; B:紫绀型先心病患儿心肌细胞细胞质和细胞核中均见 HIF-1α 表达

图 1 免疫组化检测 HIF-1α 在慢性缺氧心肌中的表达 (SABC ×400)

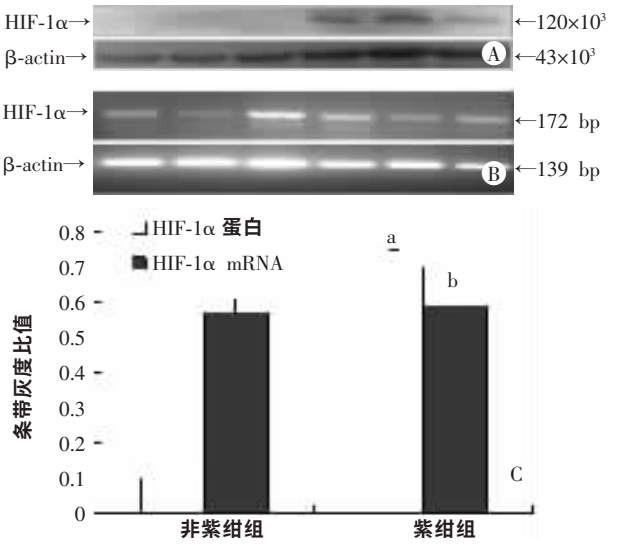
2.2 心肌组织中 HIF-1α 蛋白表达的变化

HIF-1α Western blot 蛋白特异性条带见图 2A,表达量的统计差异见图 2C。与非紫绀组相比,紫绀型先心病患儿心肌细胞中 HIF-1α 蛋白表达水平明显增加[条带灰度比值:紫绀组(0.70 ±0.05)与非紫绀组(0.10 ±0.02),P <0.001]。HIF-1α 蛋白含量与血氧饱和度关系成明显的负相关 (r = -0.72,P < 0.01)。

2.3 心肌组织中 HIF-1α mRNA 表达改变

HIF-1α RT-PCR mRNA 特异性条带见图 2B,表达量的统计差异见图 2C。与非紫绀组相比,紫绀型先心病患儿心肌细胞中 HIF-1α mRNA 表达水平无明显差异[条带灰度比值:紫绀组

(0.57 ±0.04)与非紫绀组(0.59 ±0.04),$P>0.05$]。



A:Western blot 检测 HIF-1α 蛋白表达;B: RT-PCR 检测 HIF-1α mRNA 表达;C:HIF-1α 蛋白和 mRNA 统计差异　条带灰度比值采用数值 $\bar{x}\pm s$ 表示,a: $P<0.001$,b: $P>0.01$,与非紫绀组比较

图 2　非紫绀组和紫绀组 HIF-1α 蛋白和 mRNA 表达电泳结果

3　讨论

紫绀型先心病包括法洛四联症、左室发育不全、大动脉转位、Ebstein 畸形和三尖瓣闭锁等畸形,因为影响了患儿的血液正常氧合能力,是导致婴幼儿死亡的重要原因之一[5]。紫绀型先心病患儿除了心脏畸形导致的心脏负荷增加外,还要面临慢性系统性缺氧导致的缺氧应激。既往大量的动物和人体实验均证实,慢性缺氧会导致机体三磷酸腺苷合成减少,并影响着其他代谢过程[6,7]。因此,研究心肌在慢性缺氧下的自身适应和代谢调节,可能为先心病治疗尤其是紫绀型先心病的治疗提供新的策略。

细胞内的氧平衡对于细胞正常的发挥功能是至关重要的,氧含量的细微变化即会导致细胞能量代谢受损,所以细胞本身具有精细的氧平衡调节和自我保护机制。在这些机制中,HIF-1α 是细胞内氧浓度最重要的感受分子和效应分子之一[8]。当细胞处于正常氧浓度下,合成的 HIF-1α 很快即被泛素依赖性途径降解,其半衰期仅有 3 ~ 5 min[9]。而在缺氧条件下,HIF-1α 稳定性增加,并能够转移至细胞核内与稳定表达于细胞核内的 HIF-1β 结合,形成 HIF 复合物,后者作为转录活性因子,与靶基因的启动子区域结合,促进靶基因表达,进而发挥缺氧条件下的细胞保护作用[10]。既往研究表明,HIF-1α 在局部缺氧的肿瘤、缺血心肌中均有表达[11]。而我们观察到,在紫绀型先心病患儿心肌中 HIF-1α 稳定性较非紫绀组增强,在细胞质和细胞核内均有表达,且表达程度与患儿术前血氧饱和度呈负相关。而 RT-PCR 结果提示,2 组间 HIF-1α mRNA 表达无显著差异。以上结果提示,HIF-1α 在慢性缺氧性心肌中表达增强可能因为稳定性增强而非转录增加所致。

既往报道,在急性心肌梗死区域边缘的心肌细胞内 HIF-1α 的表达增加,也有研究表明,HIF-1α 有助于缩小梗死区域,改善心脏功能[12],这些研究结果提示 HIF-1α 可能在心肌细胞代谢调节、应激适应和心肌重构中有重要作用。究其原因,HIF-1α 作为转录活性因子,通过上调多种细胞因子的表达,如血管内皮生长因子(endothelial cell growth factor, VEGF)、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)等,增加新生血管形成、组织供氧,继而发挥缺血缺氧时对心肌的保护效应[13]。最新研究表明,HIF-1α 参与缺血再灌注损伤中的心肌保护,部分缺失 HIF-1α 将导致对心肌的保护作用完全丧失。但是其作用机制有待于进一步研究[14]。本研究结果证实了 HIF-1α 在紫绀型先心病患儿心肌中表达增高,这一结果可能为进一步研究紫绀型先心病心肌细胞的代谢适应提供理论和实验依据。

HIF-1α 稳定性增加是机体在经历缺氧应激时自身保护的重要机制,可能在慢性缺氧的心肌中也具有重要的保护作用。巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)作为 HIF-1α 的下游调节因子[15],联系着系统性炎症反应和心肌代谢保护,也许是 HIF-1α 发挥心肌保护效应的重要介导因子。进一步研究 HIF-1α 与 VEGF、EPO 及 MIF 等因子之间的关系,以及其在心肌保护中作用的具体机制,可能为改善紫绀型先心病的临床治疗提供新的策略。

参考文献:

[1] Krishnan J, Ahuja P, Bodenmann S, *et al*. Essential role of developmentally activated hypoxia-inducible factor 1alpha for cardiac morphogenesis and function[J]. Circ Res, 2008, 103(10): 1139 - 1146.

[2] Koivunen P, Hirsila M, Remes A M, *et al*. Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF[J]. J Biol Chem, 2007, 282(7): 4524 - 4532.

[3] Parisi Q, Biondi-Zoccai G G, Abbate A, *et al*. Hypoxia inducible factor-1 expression mediates myocardial response to ischemia late after acute myocardial infarction[J]. Int J Cardiol, 2005, 99(2): 337 - 339.

[4] Lavine K J, Ornitz D M. Shared circuitry: developmental signaling cascades regulate both embryonic and adult coronary vasculature[J]. Circ Res, 2009, 104(2): 159 - 169.

[5] Driscoll D J. Evaluation of the cyanotic newborn[J]. Pediatr Clin North Am, 1990, 37(1): 1 - 23.

[6] Najm H K, Wallen W J, Belanger M P, *et al*. Does the degree of cyanosis affect myocardial adenosine triphosphate levels and function in children undergoing surgical procedures for congenital heart disease?[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000, 119(3): 515 - 524.

[7] Wittnich C, Torrance S M, Carlyle C E. Effects of hyperoxia on neonatal myocardial energy status and response to global ischemia[J]. Ann Thorac Surg, 2000, 70(6): 2125-2131.
[8] Semenza G L. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O_2 homeostasis[J]. Curr Opin Genet Dev, 1998, 8(5): 588-594.
[9] Huang L E, Gu J, Schau M, *et al*. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain *via* the ubiquitin-proteasome pathway[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(14): 7987-7992.
[10] Semenza G L. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology[J]. Trends Mol Med, 2001, 7(8): 345-350.
[11] Jürgensen J S, Rosenberger C, Wiesener M S, *et al*. Persistent induction of HIF-1alpha and -2alpha in cardiomyocytes and stromal cells of ischemic myocardium[J]. Faseb J, 2004, 18(12): 1415-1417.
[12] Kido M, Du L, Sullivan C C, *et al*. Hypoxia-inducible factor 1-alpha reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse[J]. J Am Coll Cardial, 2005, 46(11): 2116-2124.
[13] Semenza G L. O_2-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1[J]. J Appl Physiol, 2004, 96(3): 1173-1177.
[14] Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, *et al*. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha[J]. Cardiovasc Res, 2008, 77(3): 463-470.
[15] Baugh J A, Gantier M, Li L, *et al*. Dual regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in hypoxia by CREB and HIF-1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 347(4): 895-903.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)12-1192-01

孕36周合并晚期胆囊癌1例

王 琳,王延洲 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

患者,32岁,因孕36周,右上腹痛3+月,发现右上腹包块2+月,于2009年2月14日入西南医院妇产科。末次月经2008年6月7日,预产期2009年3月14日,孕4产2。2008年11月感右上腹痛,外院CT检查:胆囊区及其下方混杂密度肿块占位,以胆囊癌并周围组织广泛侵犯可能性大。2009年2月14日在我院B超:右上腹巨大肿块(12 cm×11 cm),胆总管及肝内胆管扩张,胆囊多发结石。我院CT提示:肝右下叶见巨大混杂密度肿块,向上下生长,境界清楚,最大层面11 cm×14 cm,边缘凹凸不平,中心见液性低密度灶。肝内胆管、肝总管、胆总管扩张,胆囊增大,胆囊内及胆总管内见砂粒状高密度影。2月16日行米索前列醇25 μg阴道上药诱导分娩,17日4:15娩一活男婴,体质量1 865 g,身长45 cm,Apgar评分1 min和5 min分别为5、7分,转入儿科治疗。产妇于2月19日转入肝胆科。于2009年3月6日在全麻下行剖腹探查术,术中见:左肝外叶多个转移结节,大小约2 cm×1 cm。肿块呈类圆型,表面凹凸不平,约15 cm×12 cm,质地较硬,肿块边界不清楚,与右腹壁、第一肝门部、后腹膜、腹腔干动脉致密粘连。胆囊被肿瘤完全包裹,无法辨清。肿瘤与横结肠中段、升结肠、小肠浸润粘连。胰头部可扪及7 cm×6 cm包块,质硬。考虑肿瘤已经腹腔内广泛转移,并与腹腔干动脉紧密粘连,无法进一步手术,仅取活检明确诊断,术后病理诊断:胆囊癌。术后诊断:胆囊癌伴肝脏、腹腔内广泛转移。

讨论

胆囊癌在世界范围内是一类少见的恶性肿瘤,仅在某些地区(东欧、美洲的东部和南部)和种族(西班牙裔美国人和美洲印第安人)高发,中国属中低发区。近年来,胆囊癌发病率在世界范围内呈下降趋势。由于胆囊癌发病率低,病程短且预后差,发现时患者多属晚期,国内外大样本的流行病学研究尚不多见,病因仍不明确。初步的流行病学调查表面胆石症是胆囊癌的一个重要而明确的危险因素,胆囊癌(合并胆石症者)的发病风险随妊娠次数增多而升高[1],因为女性妊娠时,体内雌激素和孕激素水平升高,会引起胆道平滑肌松弛,造成胆囊容积增大;会增加胆汁中胆固醇分泌;会减慢胆汁排空,增加胆道上皮细胞暴露于胆汁中各种可能致癌物的几率和时间;还能改变胆汁酸成分造成胆道上皮细胞损伤[2],这都会促进胆石形成而增加胆囊癌的患病风险。胆囊癌是少数的女性占大多数的非生殖系统恶性肿瘤,提示女性体内激素水平的变化可能在胆囊癌病因学中起一定的作用。妊娠合并胆囊癌极为少见,妊娠时体内分泌大剂量雌激素会刺激胆囊癌快速生长。如果在孕期出现上腹痛,应B超检查肝、胆,必要时CT检查,尽早明确诊断。如果在妊娠早期发现合并胆囊癌,应立即终止妊娠,在妊娠晚期发现胆囊癌,应立即剖宫产取出胎儿,争取手术治疗胆囊癌。

关键词: 妊娠;胆囊癌
中图法分类号: R714.25 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] 张学宏, 高玉堂, Rashid A, 等. 胆囊癌与妊娠关系的全人群病例对照研究[J]. 肿瘤, 2005, 25(2):148-151.
[2] Moerman C J, Berns M P, Bueno-de-Mesquita H B, *et al*. Reproductive history and cancer of biliary tract in women[J]. Int J Cancer, 1994, 57(2): 146-153.

(编辑 栾 嘉)

作者简介:王 琳,女,四川省巴中市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事高危妊娠临床处理方面的研究。电话:(023)68765399

收稿日期:2009-02-15;**修回日期**:2009-04-10