文章编号:1000-5404(2010)04-0319-05

论著

缺氧诱导因子-1α对失血性休克大鼠肠系膜上动脉血管环舒张反应性的调控作用

陈 垦,刘良明 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所第二研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨缺氧诱导因子-1α(Hypoxia-inducible factor-1, HIF-1α)对失血性休克大鼠内皮依赖性和内皮非依赖性血管舒张反应性的影响。**方法** 208只SD大鼠随机分为正常对照组、休克组和寡霉素(Oligomycin,HIF-1α特异性拮抗剂)处理组,休克组和寡霉素处理组又分为休克即刻、0.5、1、2、3、4 h 6个时相点;取肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA)制成血管环,分别观察休克后和注射寡霉素后对硝普钠(sodium nitroprusside,SNP,内皮非依赖性舒张剂)和乙酰胆碱(acetylcholine, Ach,内皮依赖性舒张剂)诱导的舒张反应性变化。RT-PCR法分析HIF-1α mRNA的表达变化规律。**结果** 各休克组SMA血管环对低浓度SNP(10^{-9}、10^{-8}、10^{-7} mol/L)的舒张反应性降低;寡霉素可进一步降低其最大舒张反应。休克后血管对Ach的舒张反应性呈下降-上升-再下降的趋势,即在休克即刻有一短暂降低,随后呈代偿性增加,休克2 h达峰值,2 h后呈下降趋势;使用寡霉素后,血管对Ach的舒张反应性在休克早期(休克即刻~休克1 h)显著下降($P<0.01$),而在休克晚期(休克2~4 h)呈上升趋势。与正常组相比,休克后HIF-1α mRNA的表达增加;与休克早期内皮依赖的舒张反应呈正相关($r=0.984$,$P<0.05$),而与休克晚期的呈负相关($r=-0.999$,$P<0.05$),与内皮非依赖的舒张反应性没有相关性。**结论** 内皮依赖性血管舒张反应在休克早期存在代偿性回升,晚期失代偿降低;内皮非依赖性血管舒张反应在休克后呈持续降低。HIF-1α在休克后内皮非依赖性和内皮依赖性舒张反应性的调节中均具有重要作用。

[关键词] 失血性休克;血管;缺氧诱导因子-1α;舒张反应

[中图法分类号] R331.32;R605.971;R341 **[文献标志码]** A

Effect of hypoxia-inducible factor-1α on vascular relaxation reactivity following hemorrhagic shock in rats

Chen Ken, Liu Liangming (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 2, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) on endothelium-dependent and -independent vascular relaxation reactivity following hemorrhagic shock in rats. **Methods** Two hundred and eight SD rats were randomly divided into normal control group, shock control group and oligomycin group. Shock control and oligomycin groups were further divided into 0, 0.5, 1, 2, 3, and 4 h groups after hemorrhagic shock. Superior mesenteric artery (SMA) was used to compare the changes in vascular response to sodium nitroprusside (SNP) and acetylcholine (Ach) with or without administration of oligomycin, a kind of specific HIF-1α blocking agent, and to determine the expression of HIF-1α mRNA by RT-PCR. **Results** The vascular reactivity of SMA to SNP in each shock group was significantly decreased at lower concentrations (10^{-9}, 10^{-8} and 10^{-7} mol/L) of SNP and oligomycin further depressed the response of SMA to SNP. The response of SMA to Ach in shock groups was transiently decreased after shock, and then began to increase during the compensatory period of shock, reached its peak at 2 h after shock, and then decreased again. The response of SMA to Ach decreased significantly in early hemorrhagic shock (0 to 1 h, $P<0.01$) and increased in late hemorrhagic shock (2 to 4 h) after administration of oligomycin. HIF-1α mRNA expression increased in a time-dependent manner and reached its peak at 4 h following shock, which was positively correlated with endothelium-dependent vascular relaxation reactivity in early hemorrhagic shock ($r=0.984$, $P<0.05$), negatively corre-

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2005CB522601);国家自然科学基金重点项目(30830053)

[通信作者] 刘良明,电话:(023)68757421,E-mail: liangmingliu@yahoo.com

lated with late hemorrhagic shock and did not correlate with endothelium-dependent vascular relaxation reactivity ($r = -0.999$, $P < 0.05$). **Conclusion** Endothelium-dependent vascular relaxation reactivity increases in early hemorrhagic shock and decreases in late hemorrhagic shock. Endothelium-independent vascular relaxation reactivity decreases markedly following hemorrhagic shock. HIF-1α plays an important role in regulation of endothelium-dependent and independent vascular relaxation reactivity following hemorrhagic shock.

[Key words] hemorrhagic shock; blood vessel; hypoxia-inducible factor-1α; relaxation reactivity

Supported by the key Basic Research Program of China (973 Program, 2005CB522601) and the Key Program of National Natural Science Foundation of China (30830053).
Corresponding author: Liu Liangming, Tel: 86-23-68757421; E-mail: liangmingliu@yahoo.com

失血性休克(hemorrhagic shock)是临床常见的危急重症,可继发于严重创伤、骨折、消化道大出血等多种情况。当失血性休克进入失代偿后期,即为重症或者不可逆性休克(irreversible shock)。目前,重症休克或者不可逆性休克的救治仍没有较为满意的手段,患者病死率较高,这是失血性休克治疗和复苏研究亟待解决的问题。而重症休克难以逆转的一个重要原因是,处于失代偿期休克的血管低反应性状态(vascular hyporeactivity)导致血管对于活性药物低反应性或者无反应性,血压不能有效提升、组织灌注无法改善[1,2]。因此,近年来,对于休克失代偿期的血管低反应性机制研究日益深入,试图通过有效改善血管低反应性状态的形成和发展来提高失血性休克的救治率。而缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是目前为止发现的唯一一个在缺氧状态下发挥特异性调节活性的HIF亚型,其α亚基广泛参与了哺乳动物细胞对低氧的特异性应答。本实验室前期研究[3-5]证实,HIF-1α对失血性休克血管收缩反应性的调节中有重要的作用,但HIF-1α是否参与失血性休克后血管的舒张反应调节尚不清楚。本研究旨在探讨HIF-1α在失血性休克后血管舒张反应性调节中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

RNA保存液(荷兰Qiagen公司),RNA提取液(Tripure,美国Roche公司),RT-PCR试剂盒(大连TaKaRa公司),乙酰胆碱(acetylcholine, Ach,美国Sigma公司),硝普钠(sodium nitroprusside, SNP,北京双鹤现代医药技术有限责任公司),寡霉素(Oligomycin,美国Sigma公司),去甲肾上腺素(noradrenaline, NE,上海禾丰制药有限公司),配制Krebs-Henseleit重碳酸盐缓冲液(K-H液)的试剂均为国产分析纯,其组成成分为:NaCl 118 mmol/L、KCl 4.7 mmol/L、$NaHCO_3$ 25 mmol/L、KH_2PO_4 1.03 mmol/L、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.45 mmol/L、$CaCl_2$ 2.5 mmol/L、葡萄糖11.1 mmol/L,pH值为(7.4±0.5)。

Power lab八道生理记录仪及压力传感器(澳大利亚AD公司),恒温离体器官灌流槽(西班牙Letica公司),血管张力计算机软件(Powerlab chart v 4.2,澳大利亚AD公司),VDS-CL凝胶扫描成像系统(美国Amersham公司),PCR仪(PTC-200,美国Bio-Rad公司),核酸蛋白测定仪(美国Thermo公司)。

1.2 动物分组及处理

清洁级SD大鼠208只,雌雄不拘,体质量(270±30)g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。动物分为正常对照组、休克组和寡霉素处理组,其中,休克组和寡霉素处理组均分为休克即刻(0 h)、0.5、1、2、3、4 h 6个亚组。正常对照组和各亚组均选用大鼠16只,8只用于Ach反应性测定、8只用于SNP反应性测定。所有动物分组采用随机数字表法。大鼠实验前12 h均禁食,可以自由饮水。正常对照组大鼠不予特殊处理,麻醉活杀后,制备血管环。参照文献[6],给药组大鼠于实验前4 h腹腔注射寡霉素(9 μg/kg)。

1.3 失血性休克模型的建立与血管环的制备

实验当日用戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,右侧股动脉插管并连接血压计,肝素钠500 U/kg抗凝,稳定10 min后开始放血,使平均动脉压(MAP)于10~15 min内平稳降至30 mmHg,维持至相应休克时相点后活杀大鼠,无菌条件下取肠系膜上动脉(SMA)主干,清除周围结缔组织,制成2~3 mm长的血管环,用作血管舒张反应性测定;其余血管组织用RNA保存液浸泡,置于-70 ℃,各组随机选择6个SMA组织标本用作RT-PCR。

1.4 检测指标

1.4.1 血管对SNP或Ach舒张反应性的测定 将血管环悬挂于一对不锈钢丝上,一端置于固定柱上,另一端与肌张力换能器相连,放入注有K-H液的离体器官灌流浴槽中,持续充入95% O_2和5% CO_2混合气体,给予初张力0.5 g,37 ℃恒温孵育2 h,每20分钟换液1次,待张力曲线平稳后,以NE(终浓度为10^{-6} mol/L)预收缩血管环至稳定的平台期,分别依次加入终浓度为10^{-9}、10^{-8}、10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol/L的SNP或Ach,观察不同程度休克SMA血管环的舒张反应。舒张程度计算方法为:血管环舒张程度=Ach或SNP作用后张力下降幅度/NE预收缩后张力上升的幅度×100%[7]。用SNP或Ach的最大舒张程度评价血管舒张反应性。

1.4.2 RT-PCR半定量检测HIF-1α mRNA表达变化 采用Tripure提取各组大鼠SMA组织总RNA,采用核酸蛋白测定仪测定RNA纯度及浓度,$D(260)/D(280)$为1.7~2.0方可用于实验。逆转录前RNA统一定量为1.0 μg。引物设计如下:

HIF-1α（498 bp）：上游 5′-GGTGCTAACAGATGATGGTGAC-3′，下游 5′-GGCTCATAACCCATCAACTCAG-3′；β-actin（207 bp）：上游 5′-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3′，下游 5′-CCCATACCCACCATCACACC-3′。PCR 反应条件为：变性温度 94 ℃，退火温度分别为 58 ℃和 62 ℃，延伸温度 72 ℃，循环 34 和 30 次。取 PCR 产物 5 μl，1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，以目的条带与内参带的光密度之比为标准评价结果。

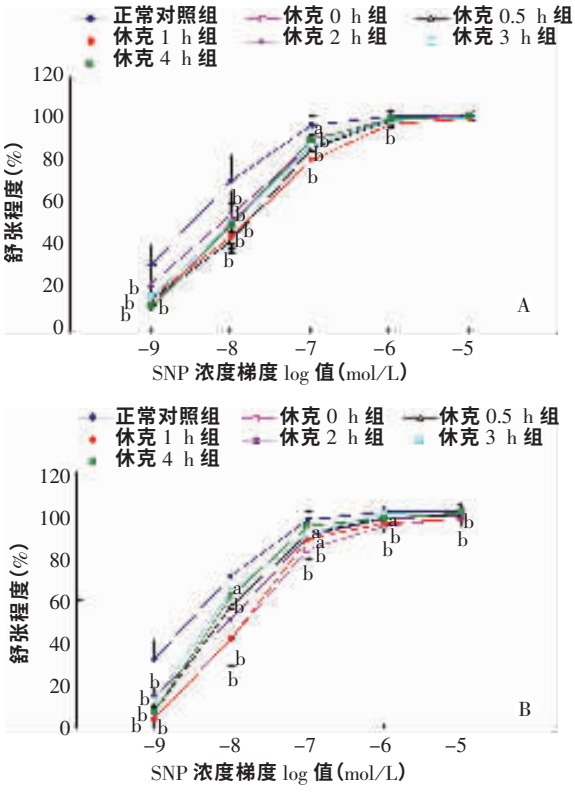
1.5　统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组间均数比较行双因素方差分析，各组均数间的两两比较行 LSD（least significant difference）t 检验，并采用 Pearson 相关分析。

2　结果

2.1　失血性休克大鼠 SMA 血管环内皮非依赖性舒张反应的变化规律及寡霉素的作用

与正常对照组相比，各休克组大鼠 SMA 血管环对 SNP 的舒张反应性表现为量-效曲线右移，对 SNP 的反应性具有不同程度的下降，特别在低浓度（10^{-9}、10^{-8} mol/L）SNP 刺激时降低较为明显（$P<0.01$），但在高浓度时各组间无差异（$P>0.05$）。见图 1。

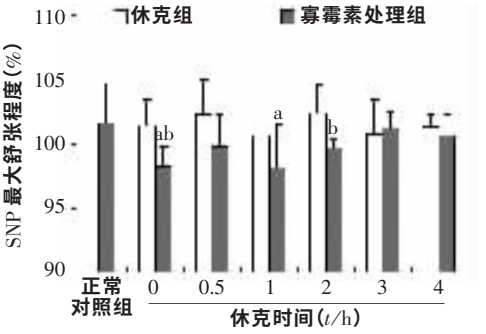


a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与同一浓度的正常对照组比较

A：休克组；B：寡霉素处理组

图 1　失血性休克大鼠 SMA 血管环 SNP 舒张反应的变化

由图 1 可见，休克组和寡霉素处理组均在给予 10^{-5} mol/L SNP 时到达最大舒张反应。与休克组比较，寡霉素处理组的非内皮依赖性最大舒张反应于休克早期（休克 0 ~ 1 h）降低，其中休克即刻（0 h）和 1 h 组降低明显（$P<0.01$），在休克 1 h 到达最低，其后逐渐上升，休克后期各组与寡霉素处理组无差异（图 2）。

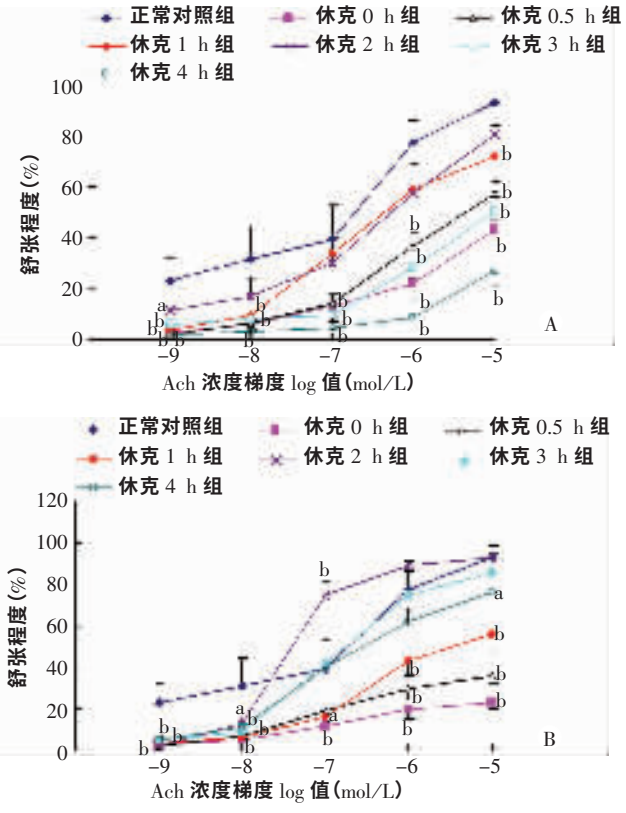


a：$P<0.01$；与正常对照比较；b：$P<0.01$，与同时间点休克组比较

图 2　寡霉素对失血性休克大鼠血管 SNP 最大舒张反应的影响

2.2　失血性休克大鼠 SMA 血管环内皮依赖性舒张反应性的变化规律及寡霉素的作用

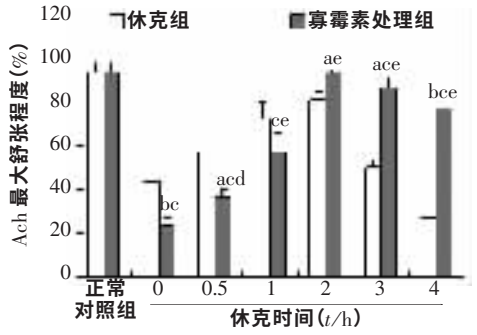
与正常对照组比较，各休克组大鼠 SMA 血管环对 Ach 的舒张反应性量-效曲线均明显右移，以休克 4 h 反应性最差（图 3）。如图 4 所示，休克大鼠 SMA 血管环的最大舒张反应在休克 0 h 达到较低水平，其后逐渐升高，于休克 2 h 达到峰值，并与正常组无差异（$P>0.05$），其后逐步下降，以休克 4 h 最差。



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与同一浓度的正常对照组比较

A：休克组；B：寡霉素处理组

图 3　失血性休克大鼠 SMA 血管环 Ach 舒张反应的变化



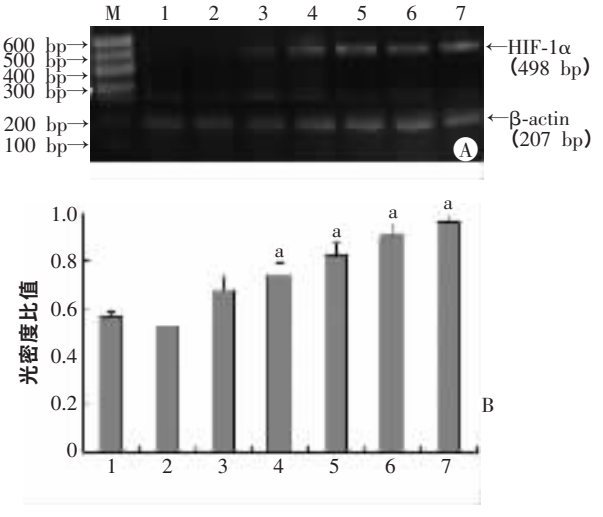
a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与正常对照组比较; c: $P<0.01$; 与同时间点的休克组比较; d: $P<0.05$, e: $P<0.01$, 与寡霉素处理组休克0 h比较

图4 寡霉素对失血性休克大鼠血管Ach最大舒张反应的影响

由图3可见,休克组和寡霉素处理组均在给予10^{-5} mol/L Ach时达到最大舒张反应。与休克组比较,寡霉素使休克大鼠SMA血管环最大舒张反应先降低后上升再降低的趋势更加明显:休克0、0.5 h和1 h的寡霉素处理组最大舒张反应分别下降了45.94%、37.22%和21.81%,休克0、0.5 h组显著低于休克组,而休克2、3、4 h的寡霉素处理组最大舒张反应分别上升了13.24%、41.25%和64.37%,均显著高于休克组($P<0.01$)。

2.3 失血性休克后HIF-1α mRNA的表达变化规律及与舒张反应性的关系

如图5所示,正常对照组SMA组织低表达HIF-1α,与之相比,休克1、2、3、4 h组均明显升高,在休克4 h达到最高,为正常对照组的1.71倍($P<0.01$)。在休克2 h之前的早期,HIF-1α mRNA的变化趋势与Ach诱导的内皮依赖性的舒张反应程度呈正相关($r=0.984$, $P<0.05$);而在休克2 h到4 h与之呈负相关($r=-0.999$, $P<0.05$);其与SNP诱导的非内皮依赖性舒张反应程度无相关性。



M: 标准; 1: 正常对照组; 2~7: 分别为休克0、0.5、1、2、3、4 h组
A: RT-PCR结果; B: 定量分析结果 a: $P<0.01$, 与正常对照组比较

图5 失血性休克后HIF-1α mRNA的表达变化

3 讨论

缺氧诱导因子-1(Hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是至今为止发现的唯一一个在缺氧状态下发挥特异性调节活性的HIF亚型,是由α亚基和β亚基组成的异二聚体结构。其中,α亚基专一受氧调节,常氧时,存在于细胞质且含量微小;缺氧时,HIF-1α大量蓄积并移入胞核内,与β亚基(芳香烃受体核转位分子, aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT)结合,发挥其作用,后者可以提高HIF-1α的非氧依赖稳定性[8]。HIF-1α广泛参与哺乳动物细胞对低氧的特异性应答,在缺氧诱导的基因表达调节中起关键性的作用,其下游调节基因与红细胞生成、细胞能量代谢、离子代谢、血管舒缩反应、血管生成、细胞周期调控等有关[9]。本实验室前期研究[3-5]发现,HIF-1α在失血性休克血管收缩反应性的调节中有重要的作用,其机制是与HIF-1α调控eNOS、iNOS、HO-1、COX-2、ET-1等下游的基因有关。此外,Cejudo-Martin等[10]在对低氧培养的腹膜巨噬细胞的研究中发现,HIF-1α蛋白大量表达,而同时,一些舒血管的物质,如NO、肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)等表达亦有增加,提示HIF-1α可能依赖对具有舒血管作用的下游分子的合成调节间接诱导血管的舒张。HIF-1α的下游分子VEGF也被证实可通过VEGFR-2/酪氨酸激酶途径诱导NO的释放,造成血管舒张[11]。除了通过上述内皮依赖性的血管舒张调节途径以外,HIF-1α同样可以直接作用于血管平滑肌细胞,通过非内皮依赖途径调节血管舒张。有研究提出,HIF-1α可增加肌浆网的钙离子通道(SERCA2)蛋白的表达,而减少细胞质中的游离钙离子浓度[12],同时可转移细胞质游离钙转移至细胞膜附近,刺激BKCa开放造成膜超极化,二者共同造成血管的舒张。同时,HIF-1α可造成VSMC细胞质内的乳酸堆积[12],这可能是其对血管舒张的另一个作用机制。在失血性休克后,HIF-1α是否对血管舒张反应性同样存在作用?目前尚不清楚。

本实验研究了HIF-1α对失血性休克血管舒张反应的影响,结果显示:①休克后血管对低浓度的SNP(10^{-9}、10^{-8}、10^{-7} mol/L)诱导的非内皮依赖性舒张反应性降低;与未给寡霉素的休克组相比,寡霉素降低了除休克3 h组以外其余各组的最大舒张反应,其中以休克即刻组和休克2 h组降低明显。结果提示HIF-1α对于SNP诱导的非内皮依赖性舒张存在一定的调节作用。②休克后血管对Ach诱导内皮依赖的舒张反

应性显著降低,在休克即刻即到达较低水平,随着休克时相的推移,休克血管对 Ach 的反应性代偿性增加,随后失代偿而致反应性下降。研究表明,在休克 2 h 后,血管内皮即出现不可逆性的损伤。而使用了 HIF-1α 特异性拮抗剂寡霉素后,血管舒张反应性呈现双相性变化:休克早期(休克 2 h 之前)的反应性显著下降,而休克晚期(休克 2 ~ 4 h)反应性上升,休克 2 h 和 3 h 的反应性达到了正常水平。结果提示:①HIF-1α 在休克后内皮依赖的舒张反应性的改变中起到重要的作用;②利用寡霉素拮抗后,休克早期的反应性下降可能是由于休克早期适度量的 HIF-1α 对血管舒张反应性有一定的保护作用;后期过量的 HIF-1α 加重了血管舒张反应性的降低,对血管内皮有损伤作用,这和 HIF-1α mRNA 表达的相关性分析相吻合。在休克早期,HIF-1α 可通过诱导下游分子,如诱生型-氧化氮合酶(inducible-nitro oxide synthase, iNOS)和血红素氧合酶-1(hameoxygenase 1, HO-1)等,代偿性表达增加,释放相应的舒血管物质,逐步代偿,并保持舒张反应性趋于上升趋势;而在休克晚期,其下游的此类血管活性物质或会出现释放失控、积累和作用过度,引起血管床对各种血管舒缩物质的反应麻痹,造成 HIF-α 对血管舒张反应性的负相调节。此外,较多的研究发现,在严重、长期缺氧的情况下,HIF-1α 促进了细胞的凋亡[13-15],而是否对血管壁亦有此作用尚不明确。Papandieou等[15]研究指出,在缺氧条件下,HIF-1α 诱导胞内丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1)表达,阻断三羧酸循环,降低线粒体的氧耗量;这在短期可能对血管功能有一定的代偿作用,而长期势必会造成线粒体功能损伤,血管反应性下降,这可能是 HIF-1α 对血管反应性双相调节的一个原因。

综上,本实验结果证实,HIF-1α 与失血性休克血管舒张反应性的调节有密切的关系,对内皮依赖性的血管舒张反应性存在较强的调节作用,其 mRNA 表达量在休克早期与舒张反应性成正相关,而在休克后期成负相关,而对于非内皮依赖性的血管舒张低反应性调节作用不强。HIF-1α 对内皮依赖的血管舒张反应性调节作用强于非内皮依赖的舒张反应性调节作用,是否暗示 HIF-1α 作用位点主要在于内皮细胞或者内皮细胞和平滑肌细胞之间,尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Liu L M, Ward J A, Dubick M A. Hemorrhage-induced vascular hyporeactivity to norepinephrine in select vasculatures of rats and the roles of nitric oxide and endothelin[J]. Shock, 2003, 19(3): 208-214.

[2] Liu L M, Dubick M A. Hemorrhagic shock-induced vascular hyporeactivity in the rat: relationship to gene expression of nitric oxide synthase, endothelin-1, and select cytokines in corresponding organs[J]. J Surg Res, 2005, 125(2): 128-136.

[3] 张瑗, 刘良明. 低血容量性休克大鼠缺氧诱导因子1α的表达及其在血管低反应性发生中的作用[J]. 中华烧伤杂志, 2006, 22(5): 343-346.

[4] 张瑗, 刘良明, 林秀来, 等. 缺氧诱导因子-1α对失血性休克血管反应性的调控作用及机制[J]. 创伤外科杂志, 2007, 9(6): 552-556.

[5] Zhang Y, Ming J, Li T, *et al*. Regulatory effects of hypoxia-inducible factor 1alpha on vascular reactivity and its mechanisms following hemorrhagic shock in rats[J]. Shock, 2008, 30(5): 557-562.

[6] Seo H S, Journe F, Larsimont D, *et al*. Decrease of estrogen receptor expression and associated ERE-dependent transcription in MCF-7 breast cancer cells after oligomycin treatment[J]. Steroids, 2003, 68(3): 257-269.

[7] Ming J, Li T, Zhang Y, *et al*. Regulatory effects of myoendothelial gap junction on vascular reactivity after hemorrhagic shock in rats[J]. Shock, 2009, 31(1): 80-86.

[8] Haddad J J, Harb H L. Cytokines and the regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha[J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(3): 461-483.

[9] Semenza G L. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology[J]. Trends Mol Med, 2001, 7(8): 345-350.

[10] Cejudo-Martin P, Morales-Ruiz M, Ros J, *et al*. Hypoxia is an inducer of vasodilator agents in peritoneal macrophages of cirrhotic patients[J]. Hepatology, 2002, 36(5): 1172-1179.

[11] Brownbill P, McKeeman G C, Brockelsby J C, *et al*. Vasoactive and permeability effects of vascular endothelial growth factor-165 in the term *in vitro* dually perfused human placental lobule[J]. Endocrinology, 2007, 148(10): 4734-4744.

[12] Huang Y, Hickey R P, Yeh J L, *et al*. Cardiac myocyte-specific HIF-1alpha deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart[J]. FASEB J, 2004, 18(10): 1138-1140.

[13] Lee M J, Kim J Y, Suk K, *et al*. Identification of the hypoxia-inducible factor 1 alpha-responsive HGTD-P gene as a mediator in the mitochondrial apoptotic pathway[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(9): 3918-3927.

[14] Malhotra R, Tyson D W, Rosevear H M, *et al*. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a critical mediator of hypoxia induced apoptosis in cardiac H9c2 and kidney epithelial HK-2 cells[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2008, 8: 9.

[15] Papandreou I, Cairns R A, Fontana L, *et al*. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption[J]. Cell Metab, 2006, 3(3): 187-197.

(**收稿**:2009-07-10;**修回**:2009-09-19)

(编辑 汪勤俭)