论著

文章编号:1000-5404(2011)10-1040-04

心肺复苏后大鼠脑组织精脒/精胺-N1-乙酰基转移酶2与HIF-1α表达的动态变化规律

曾维威,张献全 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肿瘤科)

【摘要】 **目的** 研究心肺复苏后大鼠脑组织中精脒/精胺-N1-乙酰基转移酶2(spermidine/spermine-N1-acetyltransferase2, SSAT2)与缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1α)表达的动态变化规律,分析二者相关性。**方法** 88只成年SD大鼠随机数字表法分为正常对照组($n=8$)、假手术组($n=40$)和心肺复苏组($n=40$)。其中假手术组和心肺复苏组再分为1、8、24、48、72 h 5个亚组,每亚组8只。采用RT-PCR、Western blot法分别检测脑组织中HIF-1α mRNA和HIF-1α、SSAT2蛋白的表达。**结果** SSAT2的表达在复苏后明显降低,1 h[(0.314±0.027), $P<0.01$]表达最低,随后逐渐升高($P<0.01$),至72 h[(0.731±0.024), $P>0.05$]时回升到正常对照组水平(0.736±0.02),而假手术组SSAT2的表达与正常对照组相比无显著变化($P>0.05$)。HIF-1α mRNA的表达在复苏后1 h[(0.245±0.021), $P<0.05$]时降低,但8 h[(0.430±0.019), $P<0.05$]时明显增强,后24 h[(0.387±0.018), $P<0.05$]、48 h[(0.385±0.019), $P<0.05$]下降,至72 h时回落到正常对照组水平(0.343±0.022);但HIF-1α蛋白在复苏后1 h[(0.755±0.012), $P<0.01$]显著增高,随后逐渐下降($P<0.01$),至72 h[(0.033±0.002), $P<0.01$]时仅轻度增高,而在正常对照组和假手术组未能检测出HIF-1α表达。SSAT2表达与HIF-1α表达在复苏后72 h内呈负性相关($r=-0.945$, $P<0.01$),SSAT2表达与HIF-1α mRNA表达在复苏后8~48 h呈负相关($r=-0.614$, $P=0.01$)。**结论** 在心肺复苏后一定时间内,大鼠脑组织SSAT2表达减弱,HIF-1α mRNA及蛋白表达增加,两者呈负相关表达,提示SSAT2对HIF-1α蛋白、HIF-1α mRNA可能起负性调节作用。

【关键词】 精脒/精胺-N1-乙酰基转移酶2;缺氧诱导因子-1α;心搏骤停后综合征;心肺脑复苏

【中图法分类号】 R654.1;R322.11;R329.26 【文献标志码】 A

Expression correlation between spermidine/spermine-N1-acetyltransferase 2 and hypoxia inducible factor-1α in cerebral cortex of rat after cardiopulmonary resuscitation

Zeng Weiwei, Zhang Xianquan (Department of Oncology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the expression correlation between spermidine/spermine-N1-acetyltransferase 2 (SSAT2) and hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) in the cerebral cortex of rat after cardiopulmonary resuscitation (CPR). **Methods** Eighty-eight adult SD rats were randomized into a control group ($n=8$), a sham operation group ($n=40$), and a CPR group ($n=40$). The sham operation group and CPR group each were further divided into 1, 8, 24, 48, and 72 h subgroups ($n=8$). In the CPR group, cardiac arrest (CA) was induced by bolus injection of 4℃ 10% potassium chloride solution through the external jugular vein, and cardiopulmonary resuscitation began 5 min after CA. The mRNA expression of HIF-1α and the protein expression of SSAT2 and HIF-1α in cerebral cortex were measured by RT-PCR and western blotting in 1, 8, 24, 48, and 72 h after return of spontaneous circulation (ROSC). **Results** The protein expression of SSAT2 in the CPR group decreased markedly in 1 h after ROSC (0.314±0.027, $P<0.01$), then increased gradually, and returned to the normal level in 72 h after ROSC (0.731±0.024, $P>0.05$), and that in the sham operation group showed no significant difference from that in the control group (0.736±0.02) ($P>0.05$). The mRNA expression of HIF-1α in the CPR group decreased in 1 h after ROSC (0.245±0.021, $P<0.05$), reached the peak level in 8 h after ROSC (0.430±0.019, $P<0.05$), decreased in 24 and 48 h after ROSC (0.387±0.018, $P<0.05$; 0.385±0.019, $P<0.05$), and returned to the normal level in 72 h after ROSC (0.343±0.022, $P>0.05$). The protein expression of HIF-1α in the CPR group increased significantly in 1 h after ROSC (0.755±0.012, $P<0.01$), then decreased gradually, and was weakly positive in 72 h after

【通信作者】 张献全,电话:(023)63693309,E-mail:xqzhang@yahoo.com

ROSC (0.033 ± 0.002, $P < 0.01$). The protein expression of HIF-1α was not detected in the control group and sham operation group. The protein expression of SSAT2 was negatively correlated with the protein expression of HIF-1α within 72 h after ROSC ($r = -0.945$, $P < 0.01$) and the mRNA expression of HIF-1α between in 8 h and 48 h after ROSC ($r = -0.614$, $P = 0.01$). **Conclusion** The protein expression of SSAT2 decreases after ROSC, while the mRNA and protein expression of HIF-1α increases, indicating that SSAT2 may regulate the mRNA and protein expression of HIF-1α negatively.

[Key words] spermidine/spermine-N1-acetyltransferase 2; hypoxia inducible factor-1α; cardiopulmonary resuscitation; post-cardiac arrest syndrome

Corresponding author: Zhang Xianquan, Tel: 86-23-63693309, E-mail: xqzhang@yahoo.com

心搏骤停(cardiac arrest, CA)是临床上常见的急危重症之一。近年来随着对心搏骤停的认识和复苏手段的提高,心肺复苏取得不少进展,但目前国内外心搏骤停患者复苏后的死亡率仍居高不下[1-2],这与心搏骤停复苏后发生的心搏骤停后综合征有关,其中最主要的是全脑缺血缺氧性损伤和炎症反应[3]。缺氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1α)是机体缺氧调节和炎症反应的"开关"[4-5],在脑缺血缺氧性损伤的病理生理变化过程中起重要作用[6-8]。在生理情况下,产生的 HIF-1α 在精脒/精胺-N1-乙酰基转移酶 2(spermidine/spermine-N1-acetyltransferase 2, SSAT2)的参与下迅速降解[9],但大鼠心肺复苏后脑组织 SSAT2 与 HIF-1α 的关系目前尚不明确。本研究观察心搏骤停复苏后大鼠脑组织中 SSAT2、HIF-1α 蛋白水平的改变及 HIF-1α 基因的表达情况,探讨 SSAT2 与 HIF-1α 蛋白及基因表达的关系,探寻通过 SSAT2 调控 HIF-1α 的可能性,为心搏骤停综合征的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

兔抗大鼠 HIF-1α(Abcam,英国),兔抗大鼠 SSAT2(Protein-Tech Group,美国),β-actin(北京四正柏生物科技有限公司),HRP 标记羊抗兔(联科生物),ECL 试剂盒(凯基生物),总 RNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司),逆转录试剂盒(大连宝生物工程有限公司),G:box 凝胶成像系统(Gene 公司,美国),小动物呼吸机(上海奥尔科特公司),多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂)。

1.2 实验动物与分组

SPF 级 SD 大鼠 88 只,雌雄不拘,2 月龄,体质量(266 ± 22) g,购于重庆医科大学动物实验中心。采用随机数字表法分 3 组,正常组 8 只,假手术组和心肺复苏组各 40 只,其中假手术组和心肺复苏组分别根据手术后和复苏后 1、8、24、48、72 h 又分为 5 个亚组,每亚组 8 只。假手术组只进行气管内插管和动静脉穿刺,不诱导心搏骤停。各组根据相应时间点取脑组织(实验中取脑组织之前出现死亡,再进行补充实验,保证每个时间点 8 只大鼠)。

1.3 心搏骤停复苏模型的建立[10]

取 SD 大鼠称质量,以 3.5% 水合氯醛(1 ml/100 g)腹腔麻醉,固定于手术台上,经口气管内插管,用红外线灯照射维持温度,室温控制为 30 ℃。分离右侧颈外静脉、股静脉和股动脉,将 24G 留置针插入颈外静脉,股静脉用 22G 留置针,股动脉置入 24G 留置针并接压力转换器。将针式电极夹在大鼠四肢上,接上多道生理信号采集处理系统,监测Ⅱ导联心电图和动脉血压。监测生命体征 15 min。生命体征平稳后,经颈外静脉弹丸式注射 4 ℃的 10% 氯化钾(7 mg/100 g),再注射 0.2 ml 生理盐水以保证氯化钾完全进入右心房。心搏骤停标准为动脉压波形消失且平均动脉压 < 20 mmHg,心电图示窦性心律消失,出现室颤波或心搏停止。心跳呼吸停止 5 min 后,接上小动物呼吸机,常氧下行机械通气,通气频率 80 次/min,潮气量为 6 ml/kg。同时,在剑突上方 1 ~ 2 cm 处进行胸外按压,按压频率为 200 次/min 左右,深度约为大鼠胸廓前后径的 1/3。经右侧股静脉注射肾上腺素(0.02 mg/kg)。自主循环恢复(return of spontaneous circulation, ROSC)定义为未胸外按压时,出现自主心律,平均动脉压 > 60 mmHg 且持续 10 min。若胸外按压 30 min 时,仍未出现自主循环,则停止按压。

1.4 检测指标

1.4.1 Western blot 法检测 HIF-1α 及 SSAT2 蛋白表达 取脑组织约 100 mg,加入裂解液提取总蛋白,BCA 法测总蛋白量。取 20 μl 蛋白上样充分变性,根据目的蛋白分子量选择合适的 SDS-PAGE 分离胶,电泳分离,转膜。5% 脱脂奶粉常温下封闭 1 h,分别加入一抗 HIF-1α(1∶1 000)、SSAT2(1∶800)、β-actin(1∶5 000),4 ℃孵化过夜,TBST 洗涤,再加入二抗(1∶5 000),室温孵化 1 h,洗涤,ECL 化学发光显影。

1.4.2 RT-PCR 检测 HIF-1α mRNA 表达 提取总 RNA,紫外分光光度计测总 RNA 量,合成 cDNA。引物设计:HIF-1α(454 bp)上游 5′-ACAGGATTCCAGCAGAC-3′,下游 5′-AAAGCGACATAGTAGGG-3′;β-actin(183 bp)上游 5′-CGTTGACATCCGTAAAGAC-3′,下游 5′-TGGAAGGTGGACAGTGAG-3′。PCR 反应条件:94 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s(β-actin),57 ℃ 30 s(HIF-1α),72 ℃ 30 s,30 个循环,72 ℃ 5 min。取 PCR 产物 5 μl 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶系统上以目的基因与内参基因的灰度值进行分析。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,组间比较用单因素方差分析以及 Spearman 秩相关分析,两两比较用 LSD-t 检验。

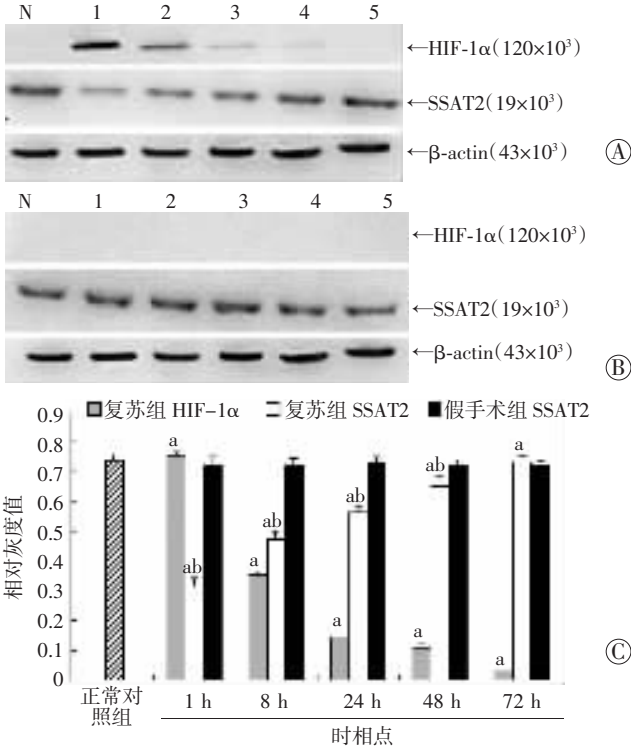
2 结果

2.1 心搏骤停复苏模型的总体情况

复苏组40只大鼠，其中8只自主循环未恢复而造成复苏不成功直接死亡，复苏后24 h内死亡2只，48、72 h后各死亡1只。为了保证每个时间点有8只大鼠，进行了补充实验。

2.2 Western blot检测脑组织中HIF-1α、SSAT2蛋白表达

各组中HIF-1α、SSAT2蛋白特异性条带见图1A、B，表达量的统计差异见图1C。HIF-1α蛋白在正常对照组和假手术组中未检测出，在复苏后1 h[(0.755±0.012)，$P<0.01$]呈强阳性表达，随后表达逐渐减弱，至72 h[(0.033±0.002)，$P<0.01$]时仅呈弱阳性表达。SSAT2蛋白在复苏后1 h[(0.314±0.027)，$P<0.01$]表达最低，后逐渐增强，至72 h[(0.731±0.024)，$P>0.05$]时回升到正常对照组表达水平；假手术组SSAT2蛋白表达与正常对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)，假手术组中各时间点的SSAT2蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。复苏组中，HIF-1α蛋白与SSAT2蛋白表达经Spearman相关分析呈负性相关($r=-0.945$，$P<0.01$)。见图2。



A：正常对照组与复苏组Western blot检测结果　N：正常对照组；1～5：复苏组1、8、24、48、72 h；B：正常对照组与假手术组Western blot检测结果　N：正常对照组；1～5：假手术组1、8、24、48、72 h；C：定量分析　a：$P<0.01$，同组各时间点比较；b：$P<0.01$，与正常对照组比较

图1　各组大鼠脑组织中HIF-1α、SSAT2蛋白表达

2.3 RT-PCR检测脑组织中HIF-1α mRNA表达

各组中HIF-1α mRNA特异性条带见图3A、B，表达量的统计差异见图3C。与正常对照组比较：HIF-1α mRNA在复苏后1 h时表达显著减弱($P<0.05$)，8 h表达最高($P<0.05$)，24、48 h表达下降($P<0.05$)，至72 h时回落到正常表达水平($P>0.05$)；HIF-1α mRNA在假手术后8 h表达增加($P<0.01$)，1、24、48、72 h表达差异无统计学意义($P>0.05$)。在复苏后8～48 h，SSAT2蛋白表达与HIF-1α mRNA表达经Spearman相关分析呈负相关($r=-0.614$，$P<0.01$)。见图4。

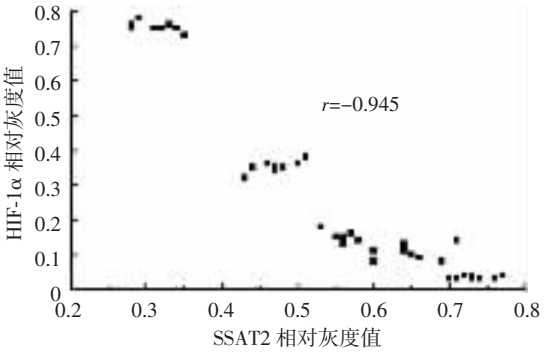
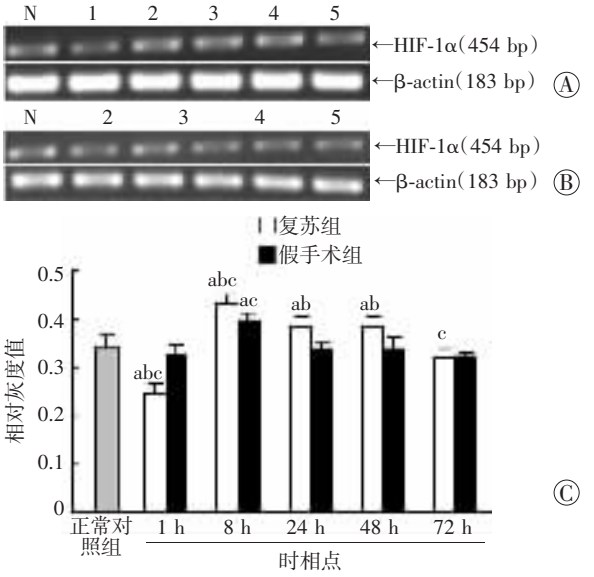


图2　复苏组大鼠脑组织SSAT2与HIF-1α相关分析



A：正常对照组与复苏组RT-PCR检测结果　N：正常对照组；1～5：复苏组1、8、24、48、72 h；B：正常对照组与假手术组RT-PCR检测结果　N：正常对照组；1～5：假手术组1、8、24、48、72 h；C：定量分析　a：$P<0.05$，与正常对照组比较；b：$P<0.05$，与假手术组同时间点比较；c：$P<0.05$，与同组其他时间点比较

图3　各组大鼠脑组织HIF-1α mRNA表达

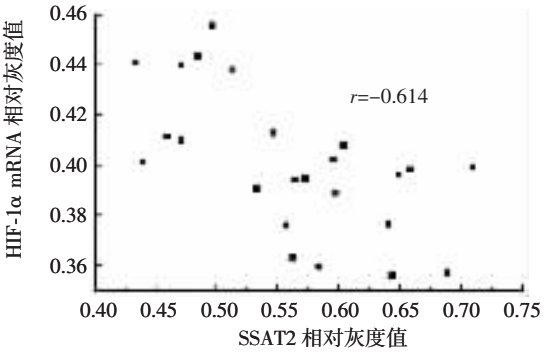


图4　复苏组大鼠脑组织SSAT2与HIF-1α mRNA相关分析

3 讨论

本实验通过颈外静脉注射冰氯化钾来诱导大鼠心搏骤停,采用改良的深静脉导管为气管导管进行无创气管内插管,对气道损伤小,便于后期的恢复。其特点是诱导时间短且不超过16 s,停跳5 min的方法能成功复制大鼠心搏骤停心肺复苏模型[11],能较好地模拟心搏骤停复苏引起的全身病理生理改变。该模型稳定可靠,操作简便易行,可重复性好,组织损伤小,对后续的研究影响较少。

本研究显示复苏组中HIF-1α蛋白在复苏后1 h时呈强阳性表达,后逐渐降低,至72 h时仅呈弱阳性表达,而SSAT2在复苏后1 h时明显下降,后逐渐升高,至72 h时回升到正常水平。提示SSAT2蛋白表达降低时,HIF-1α蛋白表达升高,经相关分析可知SSAT2与HIF-1α蛋白表达水平在复苏后72 h内呈负性相关。我们认为本研究发现的SSAT2与HIF-1α这种负相关与SSAT2参与HIF-1α代谢有关。HIF-1α在常氧下被脯氨酰羟化酶所羟化,被羟化的HIF-1α与VHL、Elongin C结合,再与E3泛素化蛋白连接酶相结合,引起HIF-1α高效泛素化及被蛋白酶体降解[9]。SSAT2与HIF-1α、VHL和Elongin C之间存在相互作用,通过稳定VHL和Elongin C的相互作用的途径来实现HIF-1α高效泛素化及受蛋白酶体降解[12]。缺氧时,脯氨酰羟化酶受抑制,HIF-1α降解减少,其稳定性增加,表达就增加。本研究观察到复苏后1 h时HIF-1α蛋白表达呈强阳性,与Chavez等[6-7]报道一致。SSAT2蛋白表达下降,对VHL与Elongin C的相互作用的稳定作用减弱,HIF-1α氧依赖途径泛素化的降解受抑制,HIF-1α表达增加,这可能是SSAT2蛋白对HIF-1α蛋白表达的负性调节机制。Baek等[12]报道SSAT2对HIF-1α mRNA表达无作用。而本研究观察到在复苏后8~48 h时SSAT2蛋白表达降低,而HIF-1α mRNA表达增加,经相关分析得出SSAT2蛋白表达与HIF-1α mRNA表达在复苏后8~48 h呈负相关,提示SSAT2对HIF-1α mRNA表达可能有负调节作用,但其调节机制目前尚不清楚,需进一步研究。复苏后72 h,SSAT2恢复至正常水平,机体又不存在缺氧,HIF-1α还可检测出,可能存在其他机制参与HIF-1α的调节,如胰岛素样生长激素-1[6],有待进一步研究。

本研究选用了心肺复苏后1、8、24、48、72 h 5个时间点来观察心肺复苏后大鼠脑组织中HIF-1α、SSAT2的表达变化情况。主要是基于以下几点,复苏后1 h时,大脑皮层血流量恢复到正常时的16%[10],此时存在严重缺氧[6]。复苏后48 h时,大鼠脑组织不存在缺氧[6]。自主循环恢复后出现血管源性脑水肿,血管源性脑水肿有2个高峰:1个在复苏后数小时,另1个在复苏后24~72 h。

本研究发现心肺复苏后一定时间内大鼠脑组织中,SSAT2表达减弱,而HIF-1α mRNA及HIF-1α蛋白表达增加,SSAT2与HIF-1α蛋白和基因的表达存在负性相关,提示干预SSAT2可影响HIF-1α蛋白和基因的表达。还需要做的是,在心肺复苏后,通过阻断或诱导SSAT2的表达来进一步研究SSAT2对HIF-1α蛋白和基因的表达的作用。预测将来通过干预SSAT2来调控HIF-1α蛋白和基因的表达从而调节心搏骤停后综合征的脑组织缺氧和炎症反应,为提高脑复苏提供新的治疗靶点。

参考文献:

[1] 李亚敏,张宏亮,贺志飚,等. 心肺复苏中基础及进一步生命支持阶段优化实施的探讨[J]. 第三军医大学学报,2010,32(17):1183-1186.

[2] Meaney P A, Nadkarni V M, Kern K B, *et al*. Rhythms and outcomes of adult in-hospital cardiac arrest[J]. Crit Care Med, 2010, 38(1): 101-108.

[3] 沈洪. 心搏骤停复苏后挑战的新对决[J]. 中国危重病急救医学,2009,21(6):321-322.

[4] Semenza G L. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level[J]. Physiology (Bethesda), 2004, 19: 176-182.

[5] Frede S, Berchner-Pfannschmidt U, Fandrey J. Regulation of hypoxia-inducible factors during inflammation[J]. Methods Enzymol, 2007, 435: 405-419.

[6] Chavez J C, LaManna J C. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: potential role of insulin-like growth factor-1 [J]. J Neurosci, 2002, 22 (20): 8922-8931.

[7] Pichiule P, Agani F, Chavez J C, *et al*. HIF-1 alpha and VEGF expression after transient global cerebral ischemia[J]. Adv Exp Med Biol, 2003, 530: 611-617.

[8] Shi H. Hypoxia inducible factor 1 as a therapeutic target in ischemic stroke[J]. Curr Med Chem, 2009, 16(34): 4593-4600.

[9] Semenza G L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1[J]. Physiology (Bethesda), 2009, 24: 97-106.

[10] Crumrine R C, LaManna J C. Regional cerebral metabolites, blood flow, plasma volume, and mean transit time in total cerebral ischemia in the rat[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1991, 11(2): 272-282.

[11] 黄子通,方向韶. 心肺脑复苏动物模型的标准化问题[J]. 中华急诊医学杂志,2009,18(1):11-13.

[12] Baek J H, Liu Y V, McDonald K R, *et al*. Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase 2 is an essential component of the ubiquitin ligase complex that regulates hypoxia-inducible factor 1alpha [J]. J Biol Chem, 2007, 282(32): 23572-23580.

(收稿 2010-11-03 修回 2010-12-29)

(编辑 王 红)