论著

文章编号:1000-5404(2012)15-1518-05

# Ad-HIF-1α-Trip肌肉注射对大鼠缺血肢体血管新生和血液灌注的影响

李明琰[1],何文凯[1,3],陈建威[2],王月刚[3],吴平生[3] (510120 广州,广州医学院第一附属医院心内科[1];510630 广州,暨南大学附属华侨医院心内科[2];510512 广州,南方医科大学附属南方医院心内科[3])

[摘要] **目的** 研究重组腺病毒低氧诱导因子-1α三突变体(the recombinant adenovirus containing the triple-point mutants HIF1-α gene,Ad-HIF-1α-trip)基因对大鼠缺血后肢血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor ,VEGF)表达、血管新生及血流灌注的影响。**方法** 48只2月龄雄性Wistar大鼠(体质量0.200~0.250 kg)建立急性左后肢缺血模型,应用随机数字表法随机分成4组($n$=12):生理盐水组(Saline组),腺病毒空载体组(Ad-Null组)、重组腺病毒低氧诱导因子-1α组(Ad-HIF-1α)、Ad-HIF-1α-trip组。分别在建模后即刻肌注生理盐水、Ad-Null、Ad-HIF-1α、Ad-HIF-1α-trip 0.5 ml,病毒滴度$4\times10^9$PFU。术后7 d,行Real-time PCR检测缺血组织HIF-1α及VEGF的表达情况。术前及基因转染后即刻、7、14、28 d对大鼠后肢进行对比超声(contrast enhanced ultrasound, CEU)检查,基因转染后28 d处死动物行病理切片CD31免疫组化微血管密度(microvascular density, MVD)计数。**结果** 基因转染后7 d,在mRNA水平HIF-1α及VEGF在Ad-HIF-1α-trip组大鼠缺血后肢肌肉组织中表达最强[HIF-1α:(2.576±0.019);VEGF:(2.498±0.031),$P<0.05$];CEU结果显示:Ad-HIF-1α-trip组基因转染后大鼠缺血后肢血流灌注改善明显优于其他各组{基因转染28 d A×β标化值:Saline *vs* Ad-Null *vs* Ad-HIF-1α *vs* Ad-HIF-1α-trip:[(0.529±0.045) *vs* (0.535±0.062) *vs* (0.642±0.056) *vs* (0.895±0.049),$P<0.05$];CD31免疫组化示:转染后28 d,Ad-HIF-1α-trip组缺血后肢肌肉组织MVD计数明显优于其他各组[Saline *vs* Ad-Null *vs* Ad-HIF-1α *vs* Ad-HIF-1α-trip:(82.316±19.258) *vs*( 89.662±21.374) *vs* (175.248±31.736) *vs* (213.426±48.073),$P<0.05$]}。**结论** Ad-HIF-1α-Trip在大鼠缺血肢体肌肉组织能有效表达,促进缺血肢体的血管新生及血流灌注。

[关键词] Ad- HIF-1α-trip;血管新生;血流灌注
[中图法分类号] R394.1; R364.12; R364.3 [文献标志码] A

# Effects of Ad-HIF-1α-Trip transfer on angiogenesis and blood perfusion in a rat model of hind limb ischemia

Li Mingyan[1], He Wenkai[1,3], Chen Jianwei[2], Wang Yuegang[3], Wu Pingsheng[3] ([1]Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong Province, 510120; [2]Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou, Guangdong Province, 510630; [3]Department of Cardiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510512, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of the recombinant adenovirus containing the triple-point mutants HIF1-α gene (Ad-HIF-1α-trip) on the expression of VEGF, the angiogenesis and the blood perfusion in the rat model of ischemic hind limb. **Methods** After ligation of left femoral artery, totally 48 male Wistar rats were randomly divided into 3 control groups ($n$ = 12 in each group) and model group ($n$=12). The control groups were subjected with normal saline (0.5 ml), Ad-Null ($4\times10^9$PFU) or Ad-HIF-1α ($4\times10^9$PFU) respectively by intramuscular injection. The model group was subjected with Ad-HIF-1α-trip($4\times10^9$PFU). The expression of HIF-1α and VEGF at mRNA level in the ischemic skeletal muscle were detected by real-time PCR in 7 d after gene transfer. The changes of blood perfusion of the ischemic hind limb were detected by contrast enhanced ultrasonography (CEU) before operation, immediately and on the 7th, 14th and 28th day after gene transfer. The microvascular density (MVD) of the ischemic hind limb were observed through immunohistochemistry of CD31. **Results** On the 7th day after gene transfer, the expression of HIF-1α and VEGF at mRNA level was more significant in the Ad-HIF-1α-trip group than other groups

[基金项目] 广州医学院博士基金(2010C43);广东省自然科学基金(S2011010003151)
[通信作者] 李明琰,电话:(020)83062739,E-mail:lmychg@126.com

(HIF-1α: 2.576 ± 0.019; VEGF: 2.498 ± 0.031, $P < 0.05$). CEU revealed better blood perfusion in Ad-HIF-1α-Trip group than in other groups (the standardized value of A × β28 days after gene transfer: Saline *vs* Ad-Null *vs* Ad-HIF-1α *vs* Ad-HIF-1α-trip: 0.529 ± 0.045 *vs* 0.535 ± 0.062 *vs* 0.642 ± 0.056 *vs* 0.895 ± 0.049, $P < 0.05$). Immunohistochemical assay for CD31 showed the MVD of Ad-HIF-1α-trip was more denser than other groups in 28 d after gene transfer (Saline *vs* Ad-Null *vs* Ad-HIF-1α *vs* Ad-HIF-1α-trip: 82.316 ± 19.258 *vs* 89.662 ± 21.374 *vs* 175.248 ± 31.736 *vs* 213.426 ± 48.073, $P < 0.05$). **Conclusion** Ad-HIF-1α-Trip is efficiently expressed in the ischemic skeletal muscle, and improves the angiogenesis and blood perfusion of the ischemic limb effectively.

[**Key words**] Ad-HIF-1α-trip; angiogenesis; blood perfusion

Supported by the Doctorial Foundation of Guangzhou Medical College (2010C43) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (S2011010003151). Corresponding author: Li Mingyan, Tel: 86-20-83062739, E-mail: lmychg@126.com

随着老龄化社会的到来及代谢性疾病的增多,下肢缺血性疾病的发病率呈现增高趋势。常规药物治疗对于一些重症患者效果不佳。外科搭桥及介入治疗虽近年来发展迅速,但并不适合于所有患者及被患者普遍接受。故而,有必要寻找新的治疗途径。HIF-1α是一个在胚胎发育和众多病理生理过程中发挥重要功能的上游基因。近年来HIF-1α作为一个调控血管新生的上游基因引起了越来越多的重视,尤其是三突变体在理论上能更有效促进下游基因持久、稳定表达从而诱发和促进血管新生[1]。本研究通过肌肉注射的方式,外源性给予大鼠缺血后肢重组腺病毒低氧诱导因子-1α三突变体(the recombinant adenovirus containing the triple-point mutants HIF1-α gene, Ad-HIF-1α-trip),探讨其对缺血组织中促血管生成基因VEGF表达的影响、对缺血肢体的促血管新生作用和对血流灌注的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与动物

构建Ad-HIF-1α-trip,突变的3个位点分别为将HIF-1α氧依赖降解结构域(oxygen-dependent degradation domain, ODDD)第402位的脯氨酸(Pro)密码子CCA突变为丙氨酸(Ala)密码子GCA,564位的脯氨酸(Pro)密码子CCC突变为丙氨酸(Ala)密码子GCA,将HIF-1α转录激活区(transactivation domain, TAD)区第803位的天冬酰胺(Asn)密码子AAT突变为丙氨酸(Ala)密码子GCA。Ad-HIF-1α-trip在HEK293A细胞中扩增,氯化铯密度梯度离心、透析纯化后滴度达到$2.0 \times 10^{13}$ PFU/ml(本课题组完成)。小鼠抗大鼠CD31抗体(Serotec公司)、DMEM-HG干粉培养基、新生牛血清、胰蛋白酶等(广州威佳);造影剂全氟丙烷人血白蛋白注射剂(全氟显,南方医院药学基地提供);Sequoia512超声仪(Siemens,德国);声学造影图像分析软件(美国弗吉尼亚大学研制);实时荧光定量PCR仪(ABI-7200型,美国);PCR仪(Biometra,美国);雄性Wistar 2月龄大鼠48只,体质量0.200~0.250 kg[南方医科大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(粤)2007-0016]。

### 1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒的扩增、纯化、滴度测定 HEK293A细胞培养生长至约70%汇合度,更换新鲜完全培养基,加入腺病毒原液,37℃ 5% $CO_2$培养箱中培养。待大部分(>90%)细胞出现病变效应(48~72 h),加入最小体积(一般为原始体积的1/10)病毒保存溶液重悬细胞。-80 ℃/37 ℃反复冻融细胞3次。转入无菌离心管中,台式离心机上3 000 r/min离心5 min,收集上清,分装,置-80 ℃保存备用。氯化铯密度梯度离心进行重组腺病毒的纯化。通过$D(260)$ nm(VP/ml)和终点稀释法(PFU/ml)进行滴度测定。

1.2.2 重组腺病毒DNA的提取和鉴定 取200 μl病毒扩增液,使用病毒基因组DNA提取试剂盒进行重组腺病毒DNA的提取。取所提取DNA液进行突变体HIF-1α基因的PCR鉴定。PCR产物送公司进行广州英俊生物公司进行基因测序。

1.2.3 急性后肢缺血模型的制备 大鼠禁食水4 h,2%的戊巴比妥钠溶液(50 mg/kg)腹腔注射麻醉。严格无菌操作,左后肢大腿腹股沟韧带中点下方做纵形切口,暴露并游离股深动脉及其分支,将股深动脉全长及其分支结扎、切断,远端至腘动脉和大隐动脉分叉处。

1.2.4 基因转染 48只雄性Wistar大鼠建模后按随机数字表法分成4组($n = 12$):Saline组、Ad-Null组、Ad-HIF-1α组、Ad-HIF-1α-trip组。分别在术后即刻肌注生理盐水、Ad-Null、Ad-HIF-1α、Ad-HIF-1α-trip 0.5 ml,病毒滴度稀释为$4 \times 10^9$ PFU/ml。方法为沿已离断股动脉内外侧肌群5点(内侧3点,外侧2点)分次肌肉注射进行基因转染,每次0.1 ml。Saline组按同样方法肌注生理盐水。

1.2.5 Real-time PCR 术后第7天,每组按照随机数字表法随机取3只实验大鼠行Real-time PCR。过量麻醉处死动物,在缺血后肢基因转染部位取材,用逆转录试剂盒合成cDNA作为PCR模板,进行Real-time PCR。目的基因HIF-1α、VEGF,内参18sRNA,所设计的引物针对HIF-1α及VEGF基因能进行良好扩增。HIF-1α基因上游引物5′- GTGGATTACCACAGCTGA-3′,下游引物5′-GCTCAGTTAACTTGATCCA-3′,115 bp;VEGF基因上游引物5′-ATGCCGGTTCCAACCAGAA-3′,下游引物5′-GTGGAGGAGCGAGCTGAA-3′,240 bp;18S RNA上游引物5′-CCTGGATACCGCAGCTAGGA-3′,下游引物5′- GCGGCGCAATACGAATGCCCC-3′,112 bp。荧光定量PCR反应参数:95 ℃ 10 min 1个循环;95 ℃ 15 s, 60 ℃ 15 s, 72 ℃ 30 s, 共40个循环。

1.2.6 对比超声检查 选缺血侧及健侧镜像位置大鼠后肢为检查部位,术前、术后即刻及7、14、28 d进行检查。实验鼠用戊巴比妥钠溶液麻醉后,四肢固定于鼠板上。穿刺尾静脉后留置套管针,将超声探头(17L5)固定于双侧后肢上,超声灌注成像采用2次谐波成像技术,探头发射和接收频率分别为7.0、14.0 MHz,机械指数(mechanical index, MI)为0.18,超声发射间隔(pulsing interval, PI)时间设定500 ms。使用微量泵经尾静脉持续注射微泡($5\times10^6$/min),骨骼肌充盈达最大显影强度后立即给予高机械指数2~3S破坏微泡,采集本底图像后持续超声造影至骨骼肌达最大超声显影。全部声学造影图像存于CD盘备脱机分析。

在同一受试大鼠缺血侧和健侧镜像位置取尽量大的感兴趣区,依指数方程 $Y=A\times(1-e^{-\beta\tau})$,声学造影图像分析软件绘出感兴趣区的视频强度与灌注时间的关系曲线,给出A值和β值[2-3]。其中A代表最大微泡浓度,反映微血管容积;β代表造影剂充填速度,反映微循环血流速度;A×β反映微循环血流量[1]。为减少光线、实验对象自身微循环血流情况的影响,用患侧与健侧A×β的比值(标化值)进行组间对比。

1.2.7 免疫组化CD31染色 术后28 d,经腹腔戊巴比妥钠过量麻醉处死动物,取转染部位及其附近肌肉(避免取材肉芽组织)进行免疫组化CD31染色,计数MVD。根据Weidner评判标准,内皮细胞呈棕色或棕黄色为CD31阳性,以被染成棕色或棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞簇作为1个血管计数。先于40倍显微镜下观察切片,选择微血管分布最多的5个区域,然后于200倍镜下计数MVD,取平均数作为该例的MVD值。

### 1.3 统计学方法

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据应用SPSS 13.0统计软件处理,多个时间点组间对比采用双因素方差分析,同一时间点组间对比采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 重组腺病毒的扩增

病毒液感染HEK293A细胞约24 h,出现少量细胞开始变圆,培养基颜色开始微黄;48 h时约50%细胞变成圆球形,部分圆球形的细胞聚合在一起呈葡萄串状;72 h时90%以上的细胞成圆球形,大量葡萄串状聚合,大多数细胞脱离底壁,漂浮在培养液中(图1)。

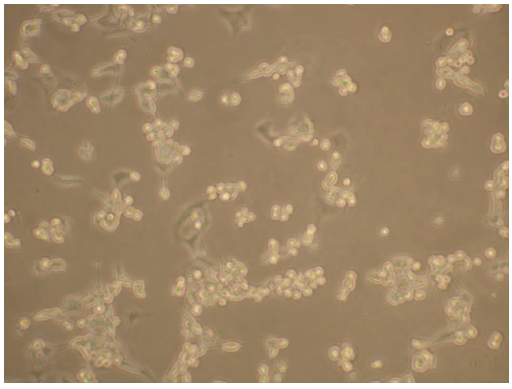
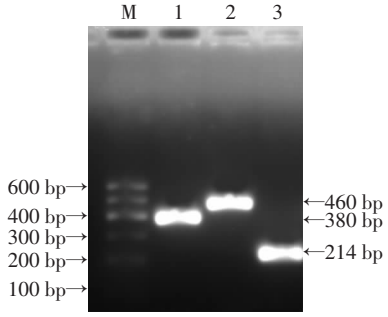


**图1 HEK 293A细胞转染Ad-HIF-1α-trip 72 h病理改变** (LM ×100)




M:标准;1:HIF-1α-Trip402突变位点;2:HIF-1α-Trip564突变位点;3:HIF-1α-Trip803突变位点

**图2 HIF-1α成功突变为HIF-1α-Trip的PCR鉴定**

### 2.2 重组腺病毒的滴度测定

Ad-Null、Ad-HIF-1α、Ad-HIF-1α-Trip纯化后 $D$(260)法测得滴度分别为 $2.6\times10^{13}$、$2.9\times10^{13}$、$3.9\times10^{13}$ VP/ml。终点稀释法测得滴度分别为 $2.2\times10^{12}$、$2.6\times10^{12}$、$3.7\times10^{12}$ PFU/ml。

### 2.3 Ad-HIF-1α-Trip的鉴定

2.3.1 PCR鉴定 Ad-HIF-1α-Trip经扩增、纯化后所携带基因扩增出目的片段;跨突变位点Pro402(引物1、引物2),Pro564(引物3、引物4)、Asn803(引物5、引物6)片段的380、460、214 bp条带存在(图2)。

2.3.2 基因测序 纯化后Ad-HIF-1α-Trip其DNA的PCR测序结果显示:HIF-1α基因的402和564位脯氨酸密码子CCA和CCC分别突变为GCA和GCC,803位天冬酰胺密码子AAT突变为GCT。

### 2.4 Real-time PCR

基因转染7 d缺血后肢骨骼肌HIF-1α及VEGF mRNA相对表达量单因素方差分析结果显示,Ad-HIF-1α-Trip组表达量最高,其次为Ad-HIF-1α组,4组间差异显著($P<0.05$)。多重比较(LSD)结果显示,Ad-HIF-1α-Trip组与Ad-HIF-1α组,Ad-Null组、Saline组差异显著($P<0.05$),Ad-Null组和Saline组无显著差异($P>0.05$)。见表1。

**表1 各组大鼠缺血后肢基因转染后7 d HIF-1α、VEGF的mRNA相对表达量($n=3,\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | HIF-1α | VEGF |
|---|---|---|
| Saline组 | 1.000±0.000 | 1.000±0.000 |
| Ad-Null组 | 1.032±0.007 | 1.025±0.012 |
| Ad-HIF-1α组 | 1.692±0.025[ab] | 1.597±0.032[ab] |
| Ad-HIF-1α-Trip组 | 2.576±0.019[abc] | 2.498±0.031[abc] |

a:$P<0.05$,与Saline组比较;b:$P<0.05$,与Ad-Null组比较;c:$P<0.05$,与Ad-HIF-1α组比较

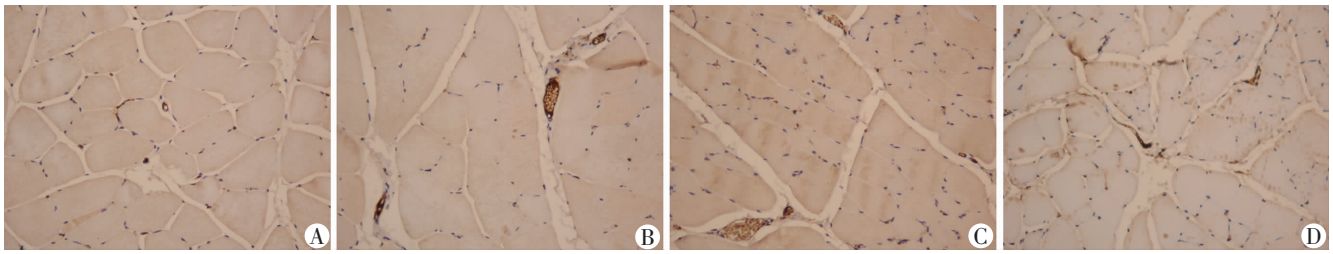
### 2.5 实时对比超声血流定量

术前双后肢血流量基本相等,术后即刻手术肢体血流量约为健侧的20%,组间对比差异无统计学意义。随时间变化,各组患侧A×β值均有所恢复,但Ad-HIF-1α-Trip组血流恢复速度明显快于其他各组,Ad-HIF-1α组次之。在术后28 d,Ad-HIF-1α-Trip组缺血后肢血流量达健侧的90%,明显高于其他各组。组间对比差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

**表 2　各组大鼠缺血后肢在术前及基因转染后即刻、7、14、28 d 时 A×β 标化值**($n=9$, $\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 术前 | 基因转染后即刻 | 基因转染后 7 d | 基因转染后 14 d | 基因转染后 28 d |
|---|---|---|---|---|---|
| Saline 组 | 1.012±0.018 | 0.203±0.037 | 0.328±0.053 | 0.448±0.042 | 0.529±0.045 |
| Ad-Null 组 | 1.021±0.008 | 0.207±0.029 | 0.319±0.039 | 0.451±0.029 | 0.535±0.062 |
| Ad- HIF-1α 组 | 1.009±0.021 | 0.202±0.032 | 0.423±0.047$^{ab}$ | 0.547±0.039$^{ab}$ | 0.642±0.056$^{ab}$ |
| Ad-HIF-1α-Trip 组 | 0.987±0.057 | 0.204±0.042 | 0.506±0.037$^{abc}$ | 0.725±0.039$^{abc}$ | 0.895±0.049$^{abc}$ |

a:$P<0.01$,与 Saline 组比较;b:$P<0.01$,与 Ad-Null 组比较;c:$P<0.01$,与 Ad- HIF-1α 组比较




A:Saline 组;B:Ad-Null 组; C:Ad- HIF-1α 组; D:Ad-HIF-1α-Trip 组

**图 3　各组大鼠缺血后肢在基因转染后 28 d CD31 免疫组化染色观察**　(S-P ×200)

### 2.6　免疫组化 MVD 计数

术后 28 d 缺血后肢基因转染部位肌肉组织 CD31 免疫组化可见,CD31 阳性细胞被染成棕色或棕黄色,散布于肌束间或簇拥成团,Ad-HIF-1α-Trip 组(213.426±48.073)MVD 计数明显多于 Ad-HIF-1α 组 (175.248±31.736)、Saline 组(82.316±19.258)和 Ad-Null 组(89.662±21.374)($P<0.05$)。Saline 组和 Ad-Null 组差异不显著($P>0.05$)。见图 3。

## 3　讨论

治疗性血管新生是近年来缺血性疾病治疗领域的又一概念,它的出现为缺血性疾病的治疗提供了新的途径[4-6]。它是指外源性地向局部组织输送血管生长因子基因或重组蛋白,促进局部缺血组织的血管新生,从而达到改善缺血组织血供和患者预后的目的。近年来,低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)作为促血管生成的上游基因引起了研究者的重视。HIF-1 是细胞对缺氧作出适应性反应的关键性转录因子,在缺氧条件下可稳定表达,参与了血管新生、红细胞生成等病理生理过程[7-8]。HIF-1 由 α 亚单位和 β 亚单位组成,以异源性二聚体的形式存在。HIF-1β 是其结构型表达,与保持 HIF-1 结构的稳定性及二聚化引起活性构象改变有关,不受氧浓度的调节;HIF-1α 是受 $O_2$ 浓度调节的 HIF-1 亚单位,决定 HIF-1 的活性。在低氧情况下,HIF-1α 的表达增强,对下游基因的调控作用亦增强。但在常氧状态下,HIF-1α 的氧依赖性降解区(oxygen dependent degradation domain, ODDD)402 和 564 位脯氨酸容易被脯氨酸羟化酶所羟化,进而启动 HIF-1α 经泛素-蛋白酶体途径降解;TAD 803 位天门冬氨酰在 HIF 抑制因子作用下发生羟基化,阻止 HIF-1α 与转录协同激活因子 CBP/p300 结合,抑制其转录活性[9]。

为了使 HIF-1α 在常氧条件下不发生降解,高效稳定表达,发挥临床所需的促血管生成作用,有必要优化 HIF-1α 基因结构区。在对 HIF-1α 结构进行优化的同时尽量保持其结构的完整性可能会带来更大的临床益处。然而,仅对部分关键位点进行突变不能同时最大限度地提高稳定性和保证其转录活性。正常氧条件下,替代 ODDD 的单个脯氨酸,可产生稳定的蛋白,但转录活性低;替代 CAD 的天门冬氨酸,可增强其转录活性,但蛋白易被分解[10]。如果对 ODDD 的 402、564 位点和 TAD 区的 803 位点进行突变,则可能在保证 HIF-1α 完整性的基础上最大限度地提高其稳定性和转录活性。有离体实验表明,Tal 等[1]将 3 突变的 HIF-1α 基因在体外转染至人脐静脉内皮细胞,结果表明 VEGF 的表达量明显优于双突变型和野生型,缺血区血管的形成情况也优于对照组。

本研究中,我们将扩增、纯化,经 PCR 及基因测序表面联合定点突变成功的 Ad-HIF-1α-trip 通过肌肉注射的方式转染至大鼠缺血后肢,在基因转染后第 7 天,Real-time PCR 方法测定基因转染的局部缺血组织 HIF-1α mRNA 水平,结果显示 Ad-HIF-1α-trip 组 HIF-1α mRNA 的表达量最高,其原因可能为,ODDD 的 Pro564 和 Asn803 同时突变为 Ala564 和 Ala803 后,HIF-1α 降解途径受阻,HIF-1α mRNA 的相对表达量增高;CAD 区 803 位点的突变使得 C-TAD 与 CBP/p300 在常氧状态下的结合不受影响[11],从而引起 HIF-1α 的转录活性的增强,继而蛋白表达水平增高。

下游 VEGF 在 mRNA 水平表达量由高至低分别为 Ad-HIF-1α-trip 组、Ad-HIF-1α 组、Ad-Null 组和 Saline 组,其原因在于 HIF-1α-trip 降解途径受阻引起其在细

胞核内聚集,表达增高。HIF-1α 与 HIF-1β 结合形成 HIF-1 并转移至核内,作用于 VEGF 编码基因,从而促进 VEGF 的表达[12-13]。野生型 HIF-1α 在常氧条件下容易降解失活,因此其激活 VGF 基因的能力明显弱于 HIF-1α-trip。

我们采用对比超声检查来动态观察缺血肢体的血流灌注情况,用缺血侧与健侧 A×β 的比值(标化值)进行组间对比。结果显示:术后 0 d 时,缺血下肢的血流量仅为对侧非缺血下肢血流量的 20% 左右,提示肢体缺血模型构建成功。对比超声对大鼠后肢血流的动态观察发现,随着时间的推移,A 值和 β 值均随着时间由大到小的推移而增加,表明缺血患肢的血流灌注在恢复,同时表明缺血下肢血流的恢复来源于局部微血管密度的增加和局部血流速度的加快,该现象与国外报道一致[14]。但在同一时间点,A×β 标化值由大到小依次为:Ad-HIF-1α-trip 组、Ad-HIF-1α 组、Ad-Null 组和 Saline 组。Ad-HIF-1α-trip 组血流恢复明显优于其他各组,组间对比差异有统计学意义。在基因转染后 28d,Ad-HIF-1α-trip 组缺血侧后肢血流灌注约为健侧的 90%,远远优于其他各组。

MVD 测定是目前对微血管定量分析的主要方法之一。本研究 CD31 免疫组化显示,在基因转染后 28 d,缺血后肢基因转染部位 Ad-HIF-1α-trip 组 MVD 值明显大于 Ad-HIF-1α 组,更大于 Ad-Null 组和 Salien 组。从而进一步表明,Ad-HIF-1α-trip 经过联合点突变结构优化后其促进血管新生及改善缺血部位血流灌注的作用明显增强。

本研究表明,通过肌肉注射的方式外源性给予 Ad-HIF-1α-trip,可使其有效转染至缺血局部并能上调 VEGF 的表达。实时对比超声检查及免疫组化 CD31 染色表明,Ad-HIF-1α-trip 能有效促进缺血肌肉组织的血流灌注及血管新生,该结论同既往[15-16]报道结论一致。本研究为 Ad-HIF-1α-trip 将来应用于缺血性疾病的治疗领域提供了一定的理论支持,但仍需对其致畸及毒副作用进行进一步研究。

## 参考文献:


[1] Tal R, Shaish A, Rofe K, *et al*. Endothelial-targeted gene transfer of hypoxia-inducible factor-1alpha augments ischemic neovascularization following systemic administration[J]. Mol Ther, 2008, 16(12): 1927-1936.

[2] Wei K, Jayaweere A R, Firoozan S, *et al*. Quantification of myocardial blood flow with ultrasound-induced destruction of microbubbles administered as a constant venous infusion[J]. Circulation, 1998, 97(5): 473-483.

[3] Harvey C J, Pilcher J M, Eckersley R J, *et al*. Advances in ultrasound[J]. Clin Radiol, 2002, 57(3): 157-177.

[4] Loinard C, Ginouves A, Vilar J, *et al*. Inhibition of prolyl hydroxylase domain proteins promotes therapeutic revascularization[J]. Circulation, 2009, 120(1): 50-59.

[5] Ahn A, Frishman W H, Gutwein A, *et al*. Therapeutic angiogenesis: a new treatment approach for ischemic heart disease--Part II[J]. Cardiol Rev, 2008, 16(5): 219-229.

[6] 罗开俭, 陶陶, 邓进, 等. 局灶性脑缺血再灌注后大鼠脑组织 HIF-1α 表达的观察[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(18): 1733-1735.

[7] Kaluz S, Kaluzova M, Stanbridge E J. Regulation of gene expression by hypoxia: integration of the HIF-transduced hypoxic signal at the hypoxia-responsive element[J]. Clin Chim Acta, 2008, 395(1/2): 6-13.

[8] Hirota K, Semenza G L. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338(1): 610-616.

[9] Hewitson K S, McNeill L A, Riordan M V, *et al*. Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family[J]. J Biol Chem, 2002, 277(29): 26351-26355.

[10] Lando D, Peet D J, Whelan D A, *et al*. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch[J]. Science, 2002, 295(5556): 858-861.

[11] Ivan M, Kondo K, Yang H, *et al*. HIF alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for $O_2$ sensing[J]. Science, 2001, 292(5516): 464-468.

[12] Bosch-Marce M, Okuyama H, Wesley J B, *et al*. Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia[J]. Circ Res, 2007, 101(12): 1310-1318.

[13] Gustafsson T, Puntschart A, Sundberg C J, *et al*. Related expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 mRNAs in human skeletal muscle[J]. Acta Physiol Scand, 1999, 165(3): 335-336.

[14] Leong-Poi H, Christiansen J, Heppner P, *et al*. Assessment of endogenous and therapeutic arteriogenesis by contrast ultrasound molecular imaging of integrin expression[J]. Circulation, 2005, 111(24): 3248-3254.

[15] Li M, Liu C, Bin J, *et al*. Mutant hypoxia inducible factor-1α improves angiogenesis and tissue perfusion in ischemic rabbit skeletal muscle[J]. Microvasc Res, 2011, 81(1): 26-33.

[16] Xie J, Liao Y, Yang L, *et al*. Ultrasound molecular imaging of angiogenesis induced by mutant forms of hypoxia-inducible factor-1α[J]. Cardiovasc Res, 2011, 92(2): 256-266.


(**收稿**:2012-01-18;**修回**:2012-04-07)

(编辑 栾 嘉)