

网络出版时间: 2019-3-22 16:45 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190321.1437.015.html

## HIF-1 $\alpha$ 介导大鼠血管内皮细胞 ET-1 及其受体表达的机制研究

孟承颖<sup>1</sup>, 胡德林<sup>1</sup>, 余又新<sup>1</sup>, 周舜英<sup>1</sup>, 梁荣<sup>2</sup>, 段声梁<sup>1</sup>, 蒋智永<sup>1</sup>, 蒋薇<sup>1</sup>, 王欢<sup>1</sup>, 孙业祥<sup>1</sup>, 方林森<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨低氧诱导因子-1(HIF-1)在大鼠血管内皮细胞中介导内皮素-1(ET-1)及其受体表达的作用及机制。方法 在大鼠内皮细胞中过表达或 siRNA 干扰 HIF-1 $\alpha$  的表达,过表达分为空白组、GV230 组、GV230/HIF-1 $\alpha$  组,siRNA 干扰分为空白组、shRNA-NC 组、shRNA/HIF-1 $\alpha$  组。应用 Real-time PCR、Western blot 法检测 HIF-1 $\alpha$ 、ET-1、ETA、ETB 的 mRNA 和蛋白表达水平。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 Real-time PCR 的基因表达水平,采用 GraphPad Prism 5.0 软件对结果进行统计处理。采用 Quantity one 灰度分析软件分析 Western blot 的蛋白表达水平。应用单因素的方差分析比较多组之间均数的差异,各组之间的两两比较采用 LSD 法。结果 与空白组和 GV230 组相比,GV230/HIF-1 $\alpha$  组的细胞中 ET-1、内皮素受体 A(ETA)、内皮素受体 B(ETB) mRNA 和蛋白表达水平显著增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与空白组和 shRNA-NC 组相比,shRNA/HIF-1 $\alpha$  组的细胞中 ET-1、ETA、ETB mRNA 和蛋白表达水平显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。空白组和 GV230 组/shRNA-NC 组的 ET-1、ETA、ETB mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 HIF-1 $\alpha$  介导血管内皮细胞中 ET-1 及其受体表达,参与低氧条件下血管通透性变化。

**关键词** 低氧诱导因子-1;内皮细胞;内皮素-1

**中图分类号** R 332; R 977.6; R 322.12

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2019)03-0413-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.015

血管内皮细胞早期损害主要表现为血管通透性增加,这是血管内皮细胞损害后早期组织水肿、体液外渗的重要病理生理基础<sup>[1]</sup>。血管通透性增加引起一系列病理生理改变,如组织器官的缺血低氧、烧伤隐性休克等,其中缺血低氧是最早出现的病理生理改变<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>显示,大量的转录因子参与低氧条件下细胞及机体的各种反应,其中低氧诱导因

子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)被认为是最重要的转录因子,HIF-1 广泛存在人体的组织和细胞内,是由 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  组成的异源二聚体,其生物活性主要由 HIF-1 $\alpha$  亚基决定。HIF-1 $\alpha$  亚基是氧调节蛋白,被称为“低氧基因表达的总开关”,对氧浓度高度敏感,研究<sup>[4]</sup>表明,低氧刺激下 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达水平可显著上调,并增加 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达水平和稳定活性,随着氧浓度增加,HIF-1 $\alpha$  蛋白会快速降解,而 HIF-1 $\beta$  则对氧浓度的敏感性较低,其表达与低氧与否关系不明显。

研究<sup>[5]</sup>显示,HIF-1 调控的信号途径及蛋白表达可能是造成血管通透性增加的潜在因素。HIF-1 介导的相关基因主要包括血管内皮生长因子(VEGF)、血管新生基因、内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、磷酸果糖激酶等能量代谢基因等,其中介导 ET-1 及其受体的作用近年来已经成为研究的热点。主要由血管内皮细胞合成和分泌的 ET-1 是一种缩血管的多肽类物质,其产生由多种因素影响。研究<sup>[6]</sup>显示,ET-1 的分泌受内皮细胞的缺血低氧强烈刺激,并且会进一步加重局部和全身循环的损害。由此可见,HIF-1 可能通过介导 ET-1 的表达水平而发挥对低氧应激刺激的反应。该实验将通过大鼠血管内皮细胞体外培养,建立单层血管内皮细胞模型,运用质粒过表达或 siRNA 干扰技术建立 HIF-1 $\alpha$  高表达和 HIF-1 $\alpha$  低表达,应用 Real-time PCR、Western blot 法检测 HIF-1、ET-1、内皮素受体 A(endothelin receptor A,ETA)、内皮素受体 B(endothelin receptor B,ETB)的 mRNA 和蛋白表达水平,明确 HIF-1 $\alpha$  在介导血管内皮细胞中 ET-1 及其受体表达中的作用及机制,为防治创伤后血管通透性增加提供可借鉴的依据。

### 1 材料与方法

**1.1 主要材料** TRIzol 试剂、PCR 试剂盒、DNA Marker、反转录试剂盒、ECL 超敏发光试剂盒(美国 Thermo Fish 公司);引物用 Primer Premier 5.0 软件设计(由上海生工技术有限公司合成);荧光定量 PCR 试剂、光谱彩虹预染蛋白 Marker、山羊抗小鼠

2018-11-15 接收

基金项目: 2015 年度第二批安徽省自然科学基金项目(编号: 1508085SMH231);安徽省 2018 年度重点研究与开发计划项目(编号: 1804h08020230)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院烧伤科,合肥 230022

<sup>2</sup>安徽省肥西县上派镇中心卫生院烧伤科,肥西 231200

作者简介: 孟承颖,女,硕士研究生;

胡德林,男,主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: hdl0522@163.com

IgG( CW0102)、山羊抗兔 IgG( CW0103)、兔抗山羊( CW0105)(北京康为世纪生物科技有限公司); RIPA 细胞裂解液(强)、BCA 蛋白质定量试剂盒、Western blot 聚丙烯酰胺凝胶试剂盒、RPMI1640 培养基、新生小牛血清、0.2 μm 和 0.45 μm PVDF 膜、GV230 质粒(上海吉凯基因化学技术有限公司)。根据 GenBank 中的 HIF-1α( NM\_024359) 基因编码序列,参考 siRNA 的设计原则,设计并合成 shRNA,利用 Ambion 公司 siRNA 在线设计软件分别在 3 个与 HIF-1α 无同源性的插入序列形成发夹,最后为 siRNA 作用链的反向重复序列。AgeI 和 EcoR I 酶切位点在合成的 DNA 两端分别引入(上述 3 条寡核苷酸链由上海吉凯基因公司合成)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠血管内皮细胞的原代培养 取清洁级 SD 大鼠主动脉放入 D-Hanks 液中,清洗干净暴露的内膜面。用含 0.1% 胶原酶溶液使血管内皮细胞离散下来,然后酶的作用被等量的含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液终止。收集消化后的酶溶液离心,弃上清液,留取内皮细胞悬浮液。用 RPMI1640 培养液在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下培养 3~4 d 更换培养液,待细胞生长至 80%~90% 融合时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代 3~5 代细胞用于下一步实验。

1.2.2 细胞转染

1.2.2.1 GV230 质粒转染至大鼠血管内皮细胞 过表达实验分为三组:空白组、GV230 组、GV230/HIF-1α 组。转染前将 PCR 扩增后的大鼠 HIF-1α 基因与 GV230 质粒载体连接形成重组质粒,提取并鉴定,形成 HIF-1α 高表达细胞系。转染的具体操作为:分别将 20 pmol 的 HIF-1α 真核表达载体溶解于终体积为 50 μl 的 cDNA Transfection 中涡旋 5 s 和 2.6 μl 转染试剂稀释到终体积为 50 μl 的 cDNA Transfection Buffer 中涡旋 10 s。将稀释好的转染试剂加入到核酸溶液中,涡旋 3 s,室温孵育 15 min。900 μl 培养基加入上述复合物中,吹打混匀。吸弃原有细胞培养基,用无菌 PBS 洗涤细胞 3 次,然后加入上述混合好的培养基,细胞培养箱中继续培养,6 h 后更换为含筛选抗生素的培养基。

1.2.2.2 GV248 质粒转染至大鼠血管内皮细胞 siRNA 干扰实验分为:空白组、shRNA-NC 组、shRNA/HIF-1α 组(包括 1、2、3 个干扰序列)。转染前需要首先设计和合成 shRNA,连接 shRNA 与质粒 GV248,并转化大肠杆菌 JM109,筛选出有效的重组质粒,形成 HIF-1α 低表达细胞系。转染的具体操作

与 1.2.3.1 相同。

1.2.3 Real-time PCR 检测过程 应用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,以总 RNA 为模板合成 cDNA 第一链;以 cDNA 为模板,使用 ABI7500 Real-time PCR 仪检测各组细胞 HIF-1α、ET-1、ETA、ETB 的基因表达。Real-time PCR 反应程序为:95 °C 5 s;60 °C 34 s,设置循环数为 40。以 β-actin 作为内参,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法比较分析各基因表达,引物序列及扩增产物长度见表 1。

表 1 PCR 引物序列及扩增产物长度

引物	引物序列(5'-3')	扩增产物长度(bp)
β-actin	F: CCCGCGAGTACAACCTTCTTG R: GTCATCCATGGCGAAGCTGGTG	71
HIF-1α	F: TCCATTTTCAGCTCAGGACACT R: GGTAGGTTTCTGTAAGTGGGTCT	181
ET-1	F: CGTTGCTCCTGCTCCTCC R: GGTCTGTGCTCTTTGTGGG	163
ETA	F: ACTGGTGGCTCTTTGATTC R: ACGCTGCTTGAGGTCTTCG	137
ETB	F: GATGATGCCTAGCAGCAACA R: GACGCCACCCACTAAGACC	211

1.2.4 Western blot 检测 采用 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白,使用 BCA 法进行各组总蛋白定量,按 50 μg/孔的量加样,SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭。然后,参考说明书进行一抗孵育、二抗孵育,4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。相应二抗室温孵育 1.5 h,3 次 TBST 洗膜,每次 10 min。最后,使 ECL 试剂盒在 PVDF 膜上显色曝光。采用 Quantity one 灰度分析软件分析目的蛋白灰度值,以 β-actin 为内参计算其相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 软件对结果进行统计处理,采用描述数据的集中趋势,应用单因素的方差分析比较多组之间均数的差异,各组之间的两两比较采用 LSD 法,以 P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠血管内皮原代细胞培养结果 图 1 为大鼠血管内皮原代细胞培养 1~4 d 的结果。镜下可见细胞向四周伸出细长的突起,部分细胞间出现连接,细胞呈现“多角形”,细胞核呈椭圆状。

2.2 HIF-1α 的过表达及干扰效果分析 HIF-1α 过表达后,空白组、GV230 组、GV230/HIF-1α 组之间 HIF-1α 的 mRNA( F = 11.983, P = 0.003) 和蛋白

表达水平( $F = 23.015, P < 0.001$ ) 差异有统计学意义。LSD 两两比较结果显示, GV230/HIF-1 $\alpha$  组的 HIF-1 $\alpha$  的 mRNA 和蛋白表达水平显著高于空白组和 GV230 组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而空白组和 GV230 组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。反之, siRNA 干扰后空白组、shRNA-NC 组、shRNA/HIF-1 $\alpha$  组之间 HIF-1 $\alpha$  的 mRNA ( $F = 31.992, P < 0.001$ ) 和蛋白表达水平( $F = 10.850, P = 0.004$ ) 差异有统计学意义。shRNA/HIF-1 $\alpha$  组的 HIF-1 $\alpha$  的 mRNA 和蛋白表达水平显著低于空白组和 shRNA-NC 组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而空白组和 shRNA-NC 组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见图 2。

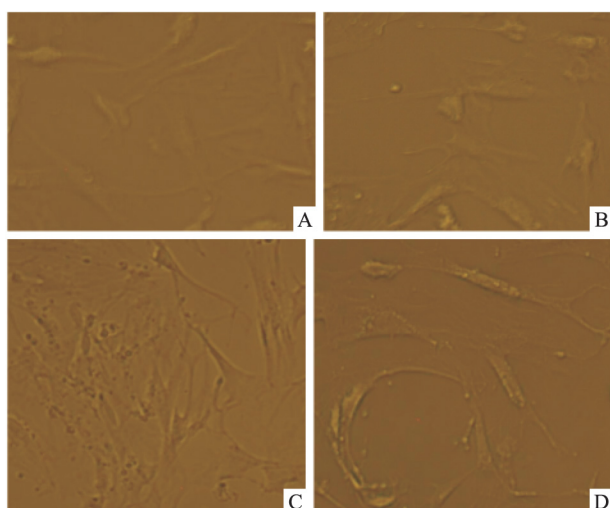


图1 大鼠血管内皮原代细胞培养 1~4 d 的结果 ×400  
A: 1 d; B: 2 d; C: 3 d; D: 4 d

**2.3 HIF-1 $\alpha$  介导血管内皮细胞 ET-1 及其受体表达分析** 与空白组和 GV230 组相比, GV230/HIF-1 $\alpha$  组的细胞中 ET-1、ETA、ETB mRNA 和蛋白表达水平显著增高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 而空白组和 GV230 组相比 ET-1、ETA、ETB mRNA 和蛋

白表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。反之, 与空白组和 shRNA-NC 组相比, shRNA/HIF-1 $\alpha$  组的细胞中 ET-1、ETA、ETB mRNA 和蛋白表达水平显著降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 而空白组和 shRNA-NC 组相比 ET-1、ETA、ETB mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见表 2、图 3。

### 3 讨论

本研究主要证实了 HIF-1 $\alpha$  可介导血管内皮细胞中 ET-1、ETA、ETB mRNA 和蛋白表达水平, 即转载 HIF-1 $\alpha$  高表达质粒的血管内皮细胞中 ET-1、ETA、ETB mRNA 和蛋白表达水平都显著增加, 反之转载 HIF-1 $\alpha$  低表达质粒的血管内皮细胞中 ET-1、ETA、ETB mRNA 和蛋白表达水平都显著降低。本研究结果提示 HIF-1 $\alpha$ /ET-1 可能是人体内组织细胞低氧条件下的一个重要调节通路, 参与调节人体许多重要的生理过程。

HIF 被认为是介导机体低氧反应的重要转录因子, 可以对机体低氧状态进行适应调节, 调控低氧反应基因的表达。HIF 主要在低氧环境下活化, 同时在富氧环境下降解。低氧刺激下, HIF-1 $\alpha$  与 HIF-1 $\beta$  以二聚体的形式在细胞核内与目的基因的某个结合位点结合而参与基因的转录调控, 这是低氧应激反应的最重要的一个环节<sup>[7]</sup>。

ET-1 是迄今为止发现的最强的内源性血管收缩肽, 是 HIF-1 $\alpha$  下游靶基因。研究<sup>[8]</sup>显示, ET-1 启动子区域存在 HIF-1 的结合位点, 在低氧环境下与 HIF-1 $\alpha$  特异性结合, 激活内皮细胞 ET-1, 使 ET-1 表达增加, 从而会进一步激活 ETA 和 ETB 受体, 可能会导致细胞和线粒体内的钙超载, 钙超载会导致细胞膜上的 G 蛋白磷酸化, 进而导致细胞内 cAMP 升高, 最终导致细胞凋亡。同时, ET-1 浓度升高造成血管进一步收缩, 这会导致机体缺血低氧加重, 进而形成级联反应造成机体损伤加重<sup>[9-11]</sup>。

表 2 HIF-1 $\alpha$  介导血管内皮细胞 ET-1 及其受体 mRNA 表达和蛋白表达水平 ( $\mu\text{g/ml } \bar{x} \pm s, n=4$ )

项目	HIF-1 $\alpha$ 过表达					siRNA 干扰				
	空白组	GV230 组	GV230/HIF-1 $\alpha$	F 值	P 值	空白组	shRNA-NC 组	shRNA/HIF-1 $\alpha$ 组	F 值	P 值
mRNA 表达										
ET-1	1.12 ± 0.57	1.35 ± 1.05	1.43 ± 1.18	11.299	0.004	0.38 ± 0.13	0.37 ± 0.18	0.40 ± 0.11	11.928	0.003
ETA	0.84 ± 0.39	1.16 ± 0.62	1.35 ± 0.95	8.293	0.009	0.42 ± 0.12	0.42 ± 0.12	0.38 ± 0.20	5.909	0.023
ETB	28.03 ± 16.08	4.33 ± 1.82	29.58 ± 32.59	4.836	0.037	0.90 ± 0.23	0.77 ± 0.23	0.83 ± 0.13	11.409	0.003
蛋白表达										
ET-1	1.01 ± 0.12	1.02 ± 0.23	1.00 ± 0.03	27.259	<0.001	0.6 ± 0.11	0.32 ± 0.12	0.52 ± 0.20	9.916	0.005
ETA	0.85 ± 0.22	1.44 ± 0.70	0.97 ± 0.24	9.956	0.005	0.55 ± 0.18	0.31 ± 0.10	0.50 ± 0.11	4.895	0.036
ETB	0.14 ± 0.11	0.12 ± 0.02	0.22 ± 0.12	31.617	<0.001	0.21 ± 0.10	0.11 ± 0.10	0.22 ± 0.08	5.771	0.024

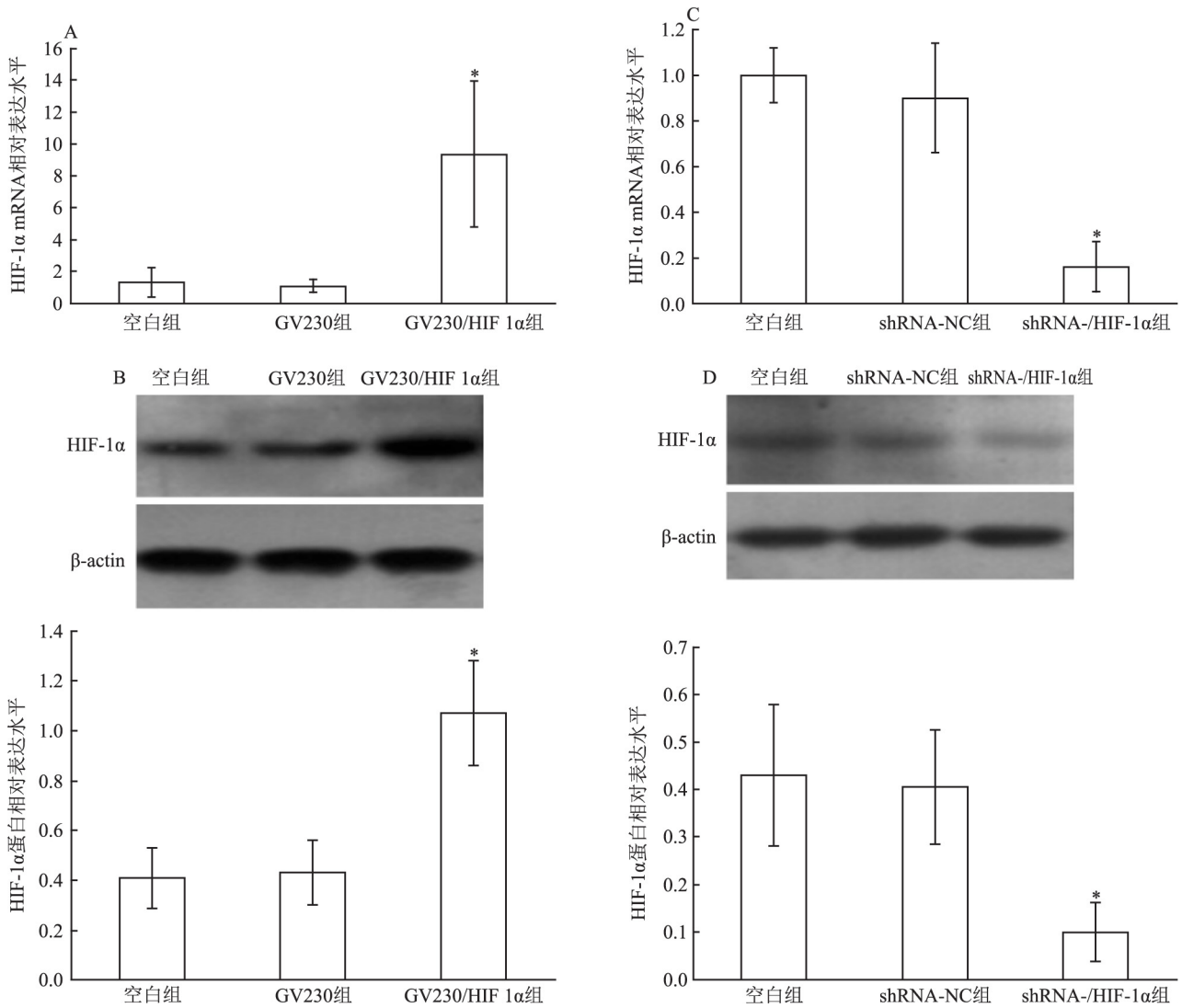


图2 HIF-1α 的过表达及干扰后内皮细胞 HIF-1α mRNA 和蛋白表达水平

A: 过表达后 HIF-1α mRNA 表达比较; B: 过表达后 HIF-1α 蛋白表达比较; C: 干扰后 HIF-1α mRNA 表达比较; D: 干扰后 HIF-1α 蛋白表达比较; 与空白组比较: \* P < 0.05

HIF-1α/ET-1 通路在许多疾病的发生发展中发挥重要生理病理作用。研究<sup>[12]</sup>显示,烧伤会损害血管内皮细胞,引起血管通透性改变,这是烧伤早期组织水肿、体液外渗的重要病理生理基础。在烧伤的过程中,内皮细胞会出现严重的缺血低氧,在低氧应激下 HIF-1α/ET-1 的表达显著增高,ET-1 引起血管进一步收缩,进而加重局部和全身循环的损害<sup>[8]</sup>。研究<sup>[13]</sup>表明,糖尿病妊娠患者胎盘组织 HIF-1α/ET-1 表达参与了妊娠结局的发生、发展,临床治疗中应关注以 HIF-1α/ET-1 为靶点的抗糖尿病并发症治疗,积极改善预后。妊娠期糖尿病患者由于血糖升高导致胎盘血管病变,滋养细胞功能异常及绒毛间质纤维化从而引起胎盘缺血低氧,进而刺激胎盘 HIF-1α/ET-1 通路的过度表达,引发胎盘滋养细胞

的应激化反应导致胎盘局部损伤,这可能是妊娠期糖尿病患者不良妊娠结局的风险增大的一个重要原因<sup>[14]</sup>。此外,ET-1 表达增加也可能会引起血管内皮细胞功能障碍和氧化应激,对患者的血液微循环及流变性造成一定影响,容易导致患者出现缺血、低氧甚至水肿等并发症。由于 ET-1 主要分布于心血管内皮细胞系统,因此 HIF-1α/ET-1 与心脑血管疾病的发生发展也存在必然的联系,例如心力衰竭、冠状动脉疾病、原发性高血压、动脉粥样硬化、肺动脉高压、脑梗死等<sup>[15]</sup>。

HIF-1α/ET-1 在血管相关的病理生理学中具有重要的作用,其表达水平包括受体的循环水平和动态平衡变化可以影响很多疾病的发生和发展过程,而且它可以在其合成、受体结合或者胞内信号传导

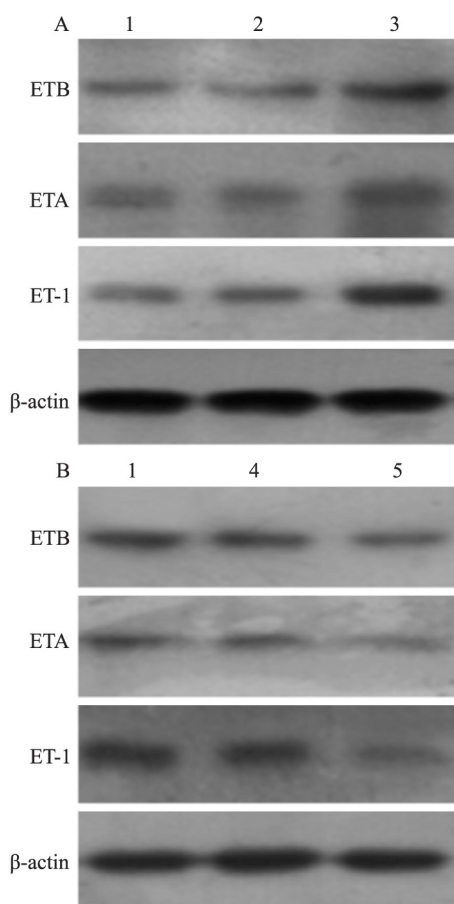


图3 HIF-1 $\alpha$ 的过表达及干扰后内皮细胞 ET-1、ETA、ETB 蛋白表达变化情况

A: 过表达 HIF-1 $\alpha$ ; B: HIF-1 $\alpha$  siRNA 干扰; 1: 空白组; 2: GV230 组; 3: GV230/HIF-1 $\alpha$ ; 4: shRNA-NC 组; 5: shRNA/HIF-1 $\alpha$  组

等各个节点受到其他因子的调控作用。ET-1 受体拮抗剂可缓解血管炎症,降低血管平滑肌细胞分化、钙化。因此,以 HIF-1 $\alpha$ /ET-1 为靶点的 ET-1 受体拮抗剂将会是一类很有前途的新型药物,有望在血管相关疾病的防治方面起到特殊作用。

### 参考文献

[1] Johansson J, Steinvall I, Herwald H, et al. Alteration of leukocyte count correlates with increased pulmonary vascular permeability and decreased PaO<sub>2</sub>: FiO<sub>2</sub> ratio early after major burns [J]. J Burn Care Res, 2015, 36(4): 484-92.

[2] Yegutkin G G, Helenius M, Kaczmarek E, et al. Chronic hypoxia impairs extracellular nucleotide metabolism and barrier function in pulmonary artery vasa vasorum endothelial cells [J]. Angiogenesis, 2011, 14(4): 503-13.

[3] 赵荣瑞. 缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 的基础研究与临床意义 [J]. 山西医科大学学报, 2006, 37(3): 225-30.

[4] Andrikopoulos P, Kieswich J, Harwood S M, et al. Endothelial angiogenesis and barrier function in response to thrombin require Ca<sup>2+</sup> influx through the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger [J]. J Biol Chem, 2015, 290(30): 18412-28.

[5] 张晓军, 刘健, 万磊, 等. 佐剂关节炎大鼠滑膜组织 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 及 CD34 表达上调促进血管新生 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(8): 1053-6.

[6] Cox R A, Enkhabaatar P, Burke A S, et al. Effects of a dual endothelin-1 receptor antagonist on airway obstruction and acute lung injury in sheep following smoke inhalation and burn injury [J]. Clin Sci (Lond), 2005, 108(3): 265-72.

[7] Suzuki N, Gradin K, Poellinger L, et al. Regulation of hypoxia-inducible gene expression after HIF activation [J]. Exp Cell Res, 2017, 356(2): 182-6.

[8] 台运成. HIF-1/ET-1 途径对大鼠血管内皮细胞通透性的调控作用及机制 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.

[9] 孙改霞, 郭亚雄, 社会博, 等. 失血性休克后的肠淋巴液提高血管通透性的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(8): 1506-12, 1536.

[10] Spinella F, Rosanò L, Del Duca M, et al. Endothelin-1 inhibits prolyl hydroxylase domain 2 to activate hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in melanoma cells [J]. PLoS One, 2010, 5(6): e11241.

[11] Caprara V, Scappa S, Garrafa E, et al. Endothelin-1 regulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and -2 $\alpha$  stability through prolyl hydroxylase domain 2 inhibition in human lymphatic endothelial cells [J]. Life Sci, 2014, 118(2): 185-90.

[12] 戴跃龙, 胡森, 窦永起. 烧伤早期血管内皮屏障损伤机制与保护药物的研究进展 [J]. 感染、炎症、修复, 2016, 17(4): 248-50.

[13] 屈莉红, 荆鲁宁. 胎盘组织缺氧诱导因子-1 $\alpha$  和内皮素-1 表达对糖尿病妊娠的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(20): 44-7.

[14] 杨晓菊, 孙玲玲, 张萌, 等. 糖尿病患者妊娠后胎盘组织缺氧诱导因子-1 $\alpha$  及内皮素-1 的表达及与妊娠结局关系 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2014, 28(1): 15-7.

[15] 王三应, 王国付, 毛根祥, 等. 内皮素-1 与心脑血管疾病研究进展 [J]. 心脑血管病防治, 2016, 16(4): 291-3.

## Hypoxia inducible factor-1 mediates the transactivation of endothelin-1 and its receptors in rat endothelial cells

Meng Chengying, Hu Delin, Yu Youxin, et al

(Dept of Burn, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To examine the molecular mechanism of hypoxia inducible factor-1 mediates the transactiva-

网络出版时间: 2019-3-22 16:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190321.1437.016.html>

## 五味子乙素通过诱导线粒体自噬减轻心肌缺血再灌注损伤

卢长青, 贾合磊, 雷震, 王娟, 任冬冬, 杨敏华, 陈亚奇

**摘要** 目的 探究五味子乙素 (Sch B) 对心肌缺血再灌注 (MI/R) 损伤的作用及其机制。方法 将小鼠随机分为对照 (Sham) 组、Sham + Sch B 组、MI/R model 组和 MI/R model + Sch B 组; MI/R model 组和 MI/R model + Sch B 组采用冠状动脉结扎法复制小鼠 MI/R 模型, Sham + Sch B 组和 MI/R model + Sch B 组给予 Sch B (80 mg/kg/d), 记录小鼠心率, 30 d 后处死小鼠, 试剂盒检测血清乳酸盐脱氢酶 (LDH) 和肌酸激酶 (CK) 的含量; HE 染色检测心肌组织病理情况; qRT-PCR 和 Western blot 法检测线粒体自噬相关分子 mRNA 水平和蛋白表达水平; Western blot 检测腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) / 雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) / ULK1 通路标记蛋白的表达。腺苷酸活化蛋白激酶- $\beta 1$  基因敲除 (AMPK- $\beta 1$  - / -) 小鼠重复上述实验。结果 Sch B 能显著降低 MI/R 小鼠心肌损伤指标 (血清 LDH 和 CK 的含量、心肌梗死面积)、加快 MI/R 小鼠心率, 并改善 MI/R 小鼠心肌病理损伤; 同时, Sch B 能显著升高线粒体自噬标记蛋白环氧化酶 I (COX

I) 和 COX IV 的 mRNA 水平和缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 和 Beclin1 蛋白表达水平; Sch B 还可显著促进 p-AMPK 和 p-ULK1 的表达, 抑制 p-mTOR 的表达。AMPK- $\beta 1$  - / - 小鼠线粒体自噬明显被抑制, 导致心肌梗死面积明显增大, 心率显著降低。结论 Sch B 可通过诱导线粒体自噬减轻小鼠心肌缺血再灌注损伤。

**关键词** 五味子乙素; 缺血再灌注; 线粒体自噬

中图分类号 R 542.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0418-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.016

急性心肌梗死是导致临床心血管病人死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。目前, 利用手术和药物快速有效地恢复冠脉血流是治疗缺血性心血管病的主要方法<sup>[2]</sup>。但心肌恢复血流灌注的同时又会造成心肌缺血再灌注 (myocardial ischemia/reperfusion, MI/R) 损伤, 使心肌损伤进一步加重<sup>[3]</sup>。MI/R 损伤涉及多个细胞及分子机制, 如氧化应激、炎症反应、钙超载及线粒体自噬等<sup>[4-5]</sup>。研究<sup>[6]</sup>表明, 线粒体自噬在 MI/R 损伤过程中发挥着重要的作用, 线粒体自噬功能紊乱可加重小鼠 MI/R 损伤。五味子乙素 (schisan-

2018-12-12 接收

基金项目: 河南省科技攻关计划项目 (编号: 112102310198)

作者单位: 河南省中医院 (河南中医药大学第二附属医院) 急诊科, 郑州 450002

作者简介: 卢长青, 男, 博士, 副教授, 责任作者, E-mail: lcq\_6502@163.com

tion of endothelin-1 (ET-1) and its receptors in rat endothelial cells. **Methods** Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) was over-expressed or depleted in the rat endothelial cells. Overexpression was divided into blank group, GV230 group, GV230/HIF-1 $\alpha$  group, siRNA interference was divided into blank group, shRNA-NC group, shRNA/HIF-1 $\alpha$  group. Real-time PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein levels of HIF-1 $\alpha$ , ET-1, endothelin receptor A (ETA) and endothelin receptor B (ETB). The mRNA expression level was estimated by  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  and analyzed by GraphPad Prism 5.0, and the protein expression level was analyzed by Quantity one. The differences among groups were analyzed by One-Way ANOVA method and LSD. **Results** The mRNA and protein levels of HIF-1 $\alpha$ , ET-1, ETA and ETB were significantly higher in the GV230/HIF-1 $\alpha$  group than that in the blank control group and the GV230 group. The difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). However, the mRNA and protein levels of HIF-1 $\alpha$ , ET-1, ETA and ETB were significantly lower in the shRNA/HIF-1 $\alpha$  group than that in the blank control group and the shRNA-NC group. The difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences on the mRNA and protein levels of HIF-1 $\alpha$ , ET-1, ETA and ETB between the blank control group and the GV230 group or the shRNA-NC group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** HIF-1 $\alpha$  mediates the expression of ET-1 and its receptors in vascular endothelial cells and participates in the changes of vascular permeability under hypoxic conditions.

**Key words** hypoxia-inducible factor 1; endothelial cells; endothelin-1