

· 论 著 ·

HIF-1 α 在缺氧性心搏骤停大鼠的表达和变化研究*杜 伟¹, 虎琼华², 宋孟龙², 张献全^{2 Δ}

(重庆医科大学附属第二医院:1. 感染科;2. 肿瘤科 400010)

摘要:目的 探讨缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 在缺氧性心搏骤停大鼠肺脏和脑组织的表达变化。方法 将 45 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组, 分别为 CO 中毒心搏骤停组(CO 中毒组)、气管夹闭窒息性心搏骤停组(气管夹闭组)和对照组。大鼠心搏骤停模型制备成功后, 免疫荧光和 ELISA 检测 HIF-1 α 在大鼠心搏骤停 15 min 时血浆、肺和脑组织中的表达和变化情况。结果 CO 中毒组及气管夹闭组血浆 HIF-1 α 水平明显增加, 且显著高于对照组($P < 0.01$), 其中 CO 中毒组明显高于气管夹闭组($P < 0.05$)。CO 中毒组及气管夹闭组肺组织 HIF-1 α 表达明显高于对照组($P < 0.05$), 其中 CO 中毒组高于气管夹闭组($P < 0.05$); CO 中毒组大脑皮层 HIF-1 α 表达明显高于对照组和气管夹闭组($P < 0.05$), 但气管夹闭组与对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 HIF-1 α 在缺氧性心搏骤停早期表达明显增强, 其表达强度与缺氧程度、快慢速度等相关, 可作为评价心搏骤停预后的参照指标。

关键词: 缺氧诱导因子 1, α 亚基; 缺氧; 心搏骤停; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.08.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)08-0735-02

Study on expression of HIF-1 α in rats with hypoxic cardiac arrest*Du Wei¹, Hu Qionghua², Song Menglong², Zhang Xianquan^{2 Δ}

(1. Departments of Oncology; 2. Department of Oncology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of hypoxic-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in rats with hypoxic cardiac arrest. **Methods** Forty-five male Sprague Dawley (SD) rats were divided randomly into three groups, CO group in which hypoxic cardiac arrest caused by CO poisoning, occlusion group in which hypoxic cardiac arrest caused by tracheal occlusion and the normal control group. The samples of blood, lung and brain were taken after 15 min when hypoxic cardiac arrest rats models were duplicated, the expression of HIF-1 α was measured by immunofluorescence and ELISA. **Results** The levels of HIF-1 α in plasma were significantly higher in both hypoxic cardiac arrest groups than that in control group ($P < 0.01$), and it was higher in CO group than that in occlusion group ($P < 0.05$). The expression of HIF-1 α was increased significantly in experimental group than that in control group ($P < 0.05$) both in lung and brain, and it was also higher in CO group than that in occlusion group in the lung tissue ($P < 0.05$), but there was no difference between occlusion group and control group in brain ($P > 0.05$). **Conclusion** The expression of HIF-1 α is increased in the early stage in rats with hypoxic cardiac arrest, and the intensity of expression is related with the severity and speed of hypoxic, so it is a valuable marker to predict prognosis of rats with hypoxic cardiac arrest.

Key words: hypoxic-inducible factor 1, alpha subunit; anoxia; cardiac arrest; rat

心搏骤停是临床上的常见急危重症之一, 发病突然, 经及时有效的心肺复苏, 约 30%~60% 患者自主循环恢复, 但随后发生的复苏后综合征造成的多个器官功能损害, 仅有 10% 的患者病情痊愈出院, 少数患者由于大脑缺氧严重, 虽经各种方式抢救, 但还是丧失认知功能, 造成严重的社会经济问题^[1-2], 因此探讨心肺复苏后器官缺氧状况的早期诊断和预后评价的指标非常重要。缺氧诱导因子-1 α (hypoxic inducible factor-1 α , HIF-1 α) 是哺乳动物机体功能在缺氧条件下一个非常重要的转录调节因子, 是目前已知的细胞缺氧的惟一感受器, 因此其改变被认为是机体缺氧发生病理生理改变的始动环节^[3]。近年的研究显示, HIF-1 α 还参与多种炎症介质的产生, 在全身炎症反应综合征、多器官功能障碍综合征等多种疾病病理生理过程中起非常重要的作用^[4]。

本研究在制备气管夹闭和 CO 中毒两种缺氧性心搏骤停大鼠模型的基础上, 检测 HIF-1 α 在血浆、肺和脑组织的变化情况, 探讨 HIF-1 α 在心搏骤停诊断和预后评价中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物及分组, 成年雄性 SD 大鼠 45 只, 体重 200~250 g (重庆医科大学实验动物中心提供, SPF 级)。随机分为 CO 中毒心搏骤停组(CO 中毒组)、气管夹闭心搏骤停组(气管夹闭组)和对照组, 每组 15 只。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备 参照 Yeh 等^[5] 和 Chen 等^[6] 的方法并略有改进制备缺氧性心搏骤停大鼠模型。实验大鼠术前禁食 12 h, 自由饮水, 以 10% 水合氯醛 (3 mg/kg) 腹腔注射麻醉。动物仰卧固定于手术台上, 心电图监护标准肢体导联监测大鼠心电图变化情况, 左颈动脉置管, 接压力换能器, 显示动脉波形。气管夹闭心搏骤停大鼠模型采用气管切开置管, 接小动物呼吸机, 于呼气末夹闭气管插管致呼吸停止。CO 中毒心搏骤停模型采用把大鼠放入已充满 99.99% CO 的透明密封罐的方法, 操作过程中保持充气状态并于密闭后计时。心电图显示心室颤动、停搏或电机械分离时于心搏骤停计时点, 15 min 时从心

尖部取血 2 mL 离心后收集血浆储存用于 ELISA 检测,取左下肺及右侧大脑皮质液氮中速冻后,置 -70 °C 保存用于免疫荧光检查,对照组直接留取上述标本进行检查。

1.2.2 ELISA 检测血浆 HIF-1 α 的含量变化 参照 ELISA 试剂盒(ADL 公司)说明书检测 HIF-1 α 的含量,即在包被单抗的微孔中依次加入上述分离到的血浆、生物素化的抗人 HIF-1 α 抗体、HRP 标记的亲合素,经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色,在过氧化物酶的催化和酸的作用下最终呈黄色。样品中的 HIF-1 α 含量与颜色的深浅呈正相关,通过酶标仪在 450 nm 波长下测定平均光密度值(OD 值),计算样品 HIF-1 α 的浓度。

1.2.3 HIF-1 α 的免疫荧光染色 主要试剂为兔抗大鼠 HIF-1 α 多克隆抗体(Abcam 公司)、二抗和免疫组化 ABC 试剂盒(北京中山生物公司)。采用冷冻切片方式,参照文献[7],具体步骤为冷冻切片经 PBS 漂洗、Triton X-100 溶液处理、10% 山羊血清封闭后,加入合适浓度的一抗(抗体用含 1.5% 山羊血清的 PBS 稀释),4 °C 孵育过夜后复温 30 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min,加入二抗,37 °C 孵育 30 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min,加 1 μ g/mL DAPI 室温孵育 10 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。用抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜进行观察,摄像,图像分析软件进行半定量分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ELISA 测定血浆 HIF-1 α 含量变化 见表 1。

表 1 各组血浆 HIF-1 α 的含量比较

组别	<i>n</i>	HIF-1 α ($\bar{x} \pm s$, ng/mL)
CO 中毒组	15	4.391 7 \pm 1.865 3 \blacktriangle^*
气管夹闭组	15	2.289 0 \pm 0.942 7 \blacktriangle
对照组	15	0.274 1 \pm 0.119 7

\blacktriangle : $P < 0.01$, 与对照组比较; * : $P < 0.05$, 与气管夹闭组比较。

2.2 免疫荧光检测大鼠肺和大脑组织中 HIF-1 α 的表达和变化 HIF-1 α 在对照组大鼠肺和大脑组织中有少量表达(插 I 图 1a、b);在气管夹闭组肺组织表达增强,但大脑组织增强不明显(插 I 图 1c、d);在 CO 中毒组肺和大脑组织表达都增强(插 I 图 1e、f),见表 2。

表 2 各组大鼠肺和大脑组织 HIF-1 α 表达的 OD 值($\bar{x} \pm s$)

组别	肺组织	大脑组织
CO 中毒组	0.049 40 \pm 0.008 87 $\blacktriangle\blacktriangle^*$	0.029 23 \pm 0.003 65 \blacktriangle
气管夹闭组	0.036 70 \pm 0.005 65 \blacktriangle	0.026 36 \pm 0.005 53
对照组	0.027 26 \pm 0.003 08	0.025 55 \pm 0.003 95

\blacktriangle : $P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle$: $P < 0.01$, 与对照组比较; * : $P < 0.05$, 与气管夹闭组比较。

3 讨 论

HIF-1 α 是一个对低氧敏感的核转录因子,常氧条件下, HIF-1 α 通过泛素化的途径迅速降解。组织缺氧时, HIF-1 α 在体内降解受阻而急剧增加,促使低氧反应基因转录及表达增强,通过调控促红细胞生成素(EPO)产生、糖代谢和血管的生成等多种途径维持机体在缺氧条件下生存^[7-8]。心搏骤停后机体发生缺氧和全身炎症反应,而 HIF-1 α 同时参与这两种病理过程^[9-15],因此 HIF-1 α 对判断心搏骤停大鼠的缺氧程度、缺氧类型和预后具有非常重要的实用价值。

本实验构建了两种缺氧性心搏骤停大鼠模型,其中气管夹

闭组因气道夹闭,氧气无法吸入,血液和组织细胞中的氧气耗竭,属于压力性缺氧;而 CO 中毒组,由于 CO 与血红蛋白的竞争性结合,影响氧气和血红蛋白的结合和解离,同时 CO 还参与细胞内呼吸和其他信号的传导,因此属于包括压力性、血液性、细胞性的混合性缺氧,其较气管夹闭组的缺氧出现得更迅速和更严重。本研究发现在缺氧性心搏骤停早期,大鼠血液中 HIF-1 α 的含量明显高于对照组,而缺氧较严重的 CO 中毒组 HIF-1 α 含量升高更为明显,且高于气管夹闭组,提示 HIF-1 α 含量与缺氧的快慢和严重程度相关,而这些正是决定心搏骤停患者预后的最主要指标。因此随着研究的深入,建立 HIF-1 α 含量与缺氧速度和缺氧程度的相关关系,对早期判断心搏骤停的预后具有非常重要的实用价值。

本研究还发现,心搏骤停早期大鼠肺和大脑组织的 HIF-1 α 表达明显增强,以血管内皮细胞更为明显,同样 CO 中毒组在肺和大脑组织中表达都强于气管夹闭组,更进一步支持 HIF-1 α 表达与缺氧严重程度和快慢速度相关。本研究参照 Yeh 等^[5]选择心搏骤停 15 min 作为检测点是基于大鼠在心搏骤停 15 min 内复苏效果相同,15 min 后成功率非常低,也就是说 15 min 是大鼠心搏骤停进行有效复苏的最长时期,但通过本研究结果认识到 HIF-1 α 的表达与缺氧速度的快慢、缺氧时间的长短和缺氧的严重程度有非常重要的关系,需要进行动态的观察,将在以后的实验中加以完善,尽可能找到他们的动态变化曲线,以使用于临床判断。

参考文献:

- [1] Neumar RW, Nolan JP, Adrie C, et al. Post-Cardiac Arrest Syndrome[J]. *Circulation*, 2008, 118(23): 2452-2483.
- [2] Pircher IR, Stadlbauer KH, Severing AC, et al. A prediction model for out-of-hospital cardiopulmonary resuscitation[J]. *Anesth Analg*, 2009, 109(4): 1196-1201.
- [3] Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway[J]. *Sci STKE*, 2007, 2007(407): cm8.
- [4] Prabhakar NR, Kumar GK, Nanduri J. Intermittent hypoxia-mediated plasticity of acute O₂ sensing requires altered red-ox regulation by HIF-1 and HIF-2[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009(1177): 162-168.
- [5] Yeh ST, Lee HL, Aune SE, et al. Preservation of mitochondrial function with cardiopulmonary resuscitation in prolonged cardiac arrest in rats[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47(6): 789-797.
- [6] Chen MH, Song FQ, Xie L, et al. Dose-response of vasopressin in a rat model of asphyxial cardiac arrest[J]. *Am J Emerg Med*, 2009, 27(8): 935-941.
- [7] Semenza GL. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis [J]. *Blood*, 2009, 114(10): 2015-2019.
- [8] Snyder CM, Chandel NS. Mitochondrial regulation of cell survival and death during low-oxygen conditions[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2009, 648(8): 197-206.
- [9] Tacchini L, Gammella E, De Ponti C, et al. Role of HIF-1 and NF- κ B Transcription Factors in the Modulation of Transferrin Receptor by Inflammatory and Anti-inflammatory Signals[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(30): 20674-20686.

见异常 17 例。

3 讨 论

自 2001 年胶囊内镜获准应用于临床以来,小肠疾病的诊断水平得到了很大的提高。小肠钡餐检查对狭窄性病变和占位性病变有一定诊断价值,但对黏膜和血管病变发现率很低,仅为 0%~5.6%,且定位粗略,无定性作用;选择性动脉造影为有创方式,只对血管病变和血供丰富的肿瘤有诊断价值,在急性出血时诊断率高;传统的推进式小肠镜技术要求高,内镜检查范围小,患者依从性差^[2-3]。由于老年患者有慢性多脏器疾病,尤其是普遍有高血压、冠心病、脑血管疾病,难以承受肠系膜动脉血管造影、小肠镜等有创伤性、痛苦性的检查^[4]。因而,无创性胶囊内镜检查尤其适用于老年患者。国外报道其对小肠病变的诊断率为 60%~63%,敏感性为 94%,阳性预测值为 100%,阴性预测值为 80%,对小肠病变的诊断价值较大^[5-7]。本组在完成 40 例受检患者后认为胶囊内镜操作简便,可获得较清晰的图像,直接观察小肠黏膜,且非常安全,顺应性好,无严重并发症,特别适于不宜做侵入性检查的老年患者。本组 1 例安装有心脏起搏器患者行胶囊内镜检查,结果发现起搏器工作情况和胶囊内镜所获取的图像均未出现任何相互干扰现象。Leighton 等^[8]对 5 例安装有心脏起搏器的患者进行胶囊内镜检查也未发现起搏器工作失常或胶囊内镜图像缺失,表明胶囊内镜检查是安全的^[9]。

本组阳性检出率为 57.5%,与国内文献基本一致^[10-11]。对不明原因腹痛的老年患者检查结果进行分析,小肠糜烂检出率较高,多伴有小肠炎症;而胶囊内镜检查未见明显异常者,考虑存在功能性疾病或其他器官疾病。

老年患者普遍存在胃肠动力减弱的情况,检查时应根据实时监控嘱患者变换体位或肌内注射胃复安控制胶囊内镜在胃内停留时间,从而相对延长小肠检查时间是有必要的^[12]。

胶囊内镜的问世,是消化内镜技术发展史上又一新的里程碑,为消化道无创性检查带来了新的革命。随着电子技术的不断发展,胶囊内镜功能将日臻完善,检查将会越来越普及,越来越简便,内镜检查将不再是一件痛苦和困难的事。随着微型机器人技术的发展,胶囊内镜也将在介入治疗中开辟崭新的一页^[13]。但目前胶囊内镜仍有很大的局限性,如价格昂贵,拍摄图像随机性而不受操纵,不能对可疑病灶进行观察,难以观察较大较远的病灶和扩张的肠壁全周,不能进行活检,图像清晰度依赖于肠道清洁情况等^[14]。而且胶囊内镜虽然对可疑病灶检出率高,但其确诊率低,常需要其他方法证实^[15]。

(上接第 736 页)

- [10] 牛铁生,齐国先,付鹏,等. 缺血预适应对大鼠急性心肌梗死缺氧诱导因子-1 α 表达的影响及蛋白激酶 C 信号通路的作用[J]. 中国动脉硬化杂志,2008,16(10):796-800.
- [11] Yeo EJ, Chun YS, Park JW. New anticancer strategies targeting HIF-1[J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(6): 1061-1069.
- [12] Semenza GL. O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1[J]. *J Appl Physiol*, 2004, 96(3):1173-1177.
- [13] 王凡,吴海涛,朱玲玲,等. 低氧诱导因子-1 α 基因修饰后

参考文献:

- [1] 戈之铮,胡运彪,高云杰,等. 胶囊内镜的临床应用[J]. *中华消化杂志*, 2003, 23(1):7-10.
- [2] 柏健鹰,王沂芹,郭红,等. 354 例不明原因消化道出血患者的诊断及病因分析[J]. *重庆医学*, 2009, 38(15):1921-1922.
- [3] 张齐联,年卫东,王化红,等. OMOM 胶囊内镜临床应用的初步评价[J]. *中华消化内镜杂志*, 2005, 22(2):86-89.
- [4] 张洁,王邦茂,曹小沧,等. 胶囊内镜在老年人不明原因的消化道出血诊断中的应用[J]. *中华老年医学杂志*, 2006, 10(25):729-731.
- [5] 刘胜春,姚榛祥. 54 例小肠出血的病因及诊断分析[J]. *重庆医科大学学报*, 2005, 30(1):128.
- [6] Delvaux MM, Saurin JC. Gaud in patients with obscure/overt digestive bleeding: result of a prospective, blinded, multicenter trial[J]. *Gastrointest Endosc*, 2002, 55(5):86-88.
- [7] Lin S, Rockey DC. Obscure gastrointestinal bleeding[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2005, 34(5):679-698.
- [8] Leighton JA, Sharma VK, Srivathsan K, et al. Safety of capsule endoscopy in patients with pacemakers[J]. *Gastrointest ENDOSC*, 2004, 59(8):567-569.
- [9] Lingensfeler T, Ell C. Lower intestinal bleeding[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2001, 15(3):135-153.
- [10] 郭永红,龙利民,王海琴,等. 老年人胶囊内镜检查的临床应用[J]. *中华内镜杂志*, 2007, 13(3):285-286.
- [11] 张子其,陈孝,张建平,等. 胶囊内镜对小肠疾病的诊断价值分析[J]. *中华消化内镜杂志*, 2003, 20(4):227-229.
- [12] 刘淑琴,马金凤,王淑琴,等. 胶囊内镜在老年人胃肠道疾病检查中的临床护理[J]. *护理实践与研究*, 2008, 5(4):57-58.
- [13] 李宜辉,赵晓晏. 小肠镜的应用及其展望[J]. *重庆医学*, 2004, 33(10):1570-1572.
- [14] 张子其. 胶囊内镜在老年患者中的应用[J]. *中华老年医学杂志*, 2005, 24(8):570-571.
- [15] 史芸,钟惠闽. 胶囊内镜的临床应用与评价[J]. *中国医师杂志*, 2007, 9(4):460-462.

(收稿日期:2010-08-10 修回日期:2010-09-18)

的成肌细胞移植治疗心肌梗死的研究[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2008, 10(10):772-774.

- [14] Huang Y, Hickey RP, Yeh JL, et al. Cardiac myocyte-specific HIF-1 alpha deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart[J]. *FASEB J*, 2004, 18(10):1138-1140.
- [15] 杨月霞,黄文新. HIF-1 在缺血缺氧性疾病中的研究进展[J]. *山东医药*, 2010, 50(20):111-114.

(收稿日期:2010-08-10 修回日期:2010-09-23)