

## 缺氧诱导因子 1 alpha 在急性心肌缺血中的表达规律

李志刚<sup>1</sup>, 王江峰<sup>2</sup>, 成建定<sup>1</sup>, 陈玉川<sup>2</sup>

(1. 中山大学法医系, 广东 广州 510080; 2. 广东省警官学院, 广东 广州 510230)

**摘要:**【目的】研究心肌缺血状态下 HIF-1 的表达规律及其在死亡之后 48 h 的动态变化。【方法】建立 SD 大鼠急性心肌缺血模型。随机将大鼠分为正常对照组、假手术组、急性心肌缺血试验组和窒息组。用免疫组化、RT-PCR 和 Western blot 检测心肌缺血及死亡后 HIF-1 的表达规律。【结果】术后 30 min 缺血心肌中开始出现 HIF-1 mRNA 表达上调, 4~6 h 达高峰, 至术后 48 h 仍维持此高水平; 蛋白质的表达相对滞后, 于术后 2 h 开始被检测到, 之后表达进行性上升, 至 12 h 达高峰后维持在高水平; 其它各组 HIF-1 检测均为阴性。大鼠术后 48 h 处死, 死亡后 48 h 内均可检测到 HIF-1 mRNA 和蛋白质的表达, 但表达呈进行性下降趋势; 其他各组均未检测到 HIF-1 表达。【结论】HIF-1 可作为一个早期心肌缺血的敏感的辅助诊断指标, 并用于急性心肌缺血缺氧性死亡和其他原因(例如窒息)缺氧造成的死亡的鉴别。

关键词: 心肌缺血; 猝死; 窒息; HIF-1

中图分类号: R89

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)03-0306-04

## Regularity of Hypoxia-inducible Factor 1 Alpha Expression in Acute Myocardial Ischemia

LI Zhi-gang<sup>1</sup>, WANG Jiang-feng<sup>2</sup>, CHENG Jian-ding<sup>1</sup>, CHEN Yu-chuan<sup>2</sup>

(1. Department of Forensic Science, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Forensic Science, Guangdong Police College, Guangzhou 510230, China)

**Abstract:** 【Objective】 This study was to observe the regularity of HIF-1 expression in acute myocardial ischemia and its dynamic changes after death in 48 hours. 【Methods】 SD rats were used to build the animal model of acute myocardial ischemia. The rats were randomly divided into normal control group, pseudo surgery group, surgery group and asphyxia group. Immunohistochemistry, RT-PCR and Western blot were used to investigate the expression of HIF-1. 【Results】 The expression of HIF-1 mRNA was began to elevate obviously in ischemic cardiac muscle at 30 min after surgery and reached its peak at about 4-6 hours. Till 48 hours after surgery, the expression still maintained this level. The expression of HIF-1 protein lagged behind the mRNA. The protein was begun to be detected at 2 hours after surgery. Its level increased gradually and reached its peak at 12 hours after surgery and maintained this level. The expression of HIF-1 could not be detected in the other groups. The animals were killed at 48 hours after surgery. The mRNA and protein of HIF-1 could be detected till 48 hours after death. Their levels decreased gradually. The expression of HIF-1 could not be detected in the other group. 【Conclusions】 HIF-1 was a sensitive marker for early acute myocardial ischemia and could be used to help the diagnosis of sudden death due to acute myocardial ischemia. It could also be used to distinguish the sudden death causes between acute myocardial ischemia and others such as asphyxia.

Key words: myocardial ischemia; sudden death; HIF-1; asphyxia

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(3):306-309]

急性心肌缺血是临床上常见的急症, 也是最常见的猝死原因之一。由于心肌缺血发生后往往需要 6~12 h 才能出现心肌梗死的典型病理学变

化, 故在发病 6 h 内死亡的患者很难明确死因<sup>[1]</sup>。在实际工作中, 有相当一部分死者既无明显的外部特征, 又无典型的冠心病的病理改变, 很难判断

收稿日期: 2005-12-20

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(036628); 广东省医学科学基金资助项目(B2004027)

作者简介: 李志刚(1975-), 男, 江苏徐州人, 博士生, 讲师; 陈玉川, 教授, 导师, 通讯作者。E-mail: zglixzmc@gmail.com

是急性心肌缺血性猝死还是其他原因如窒息引起的死亡。寻找一个相对特异的心肌缺血诊断指标将为解决这一难题带来希望。研究发现, 缺氧诱导因子1 alpha(Hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF-1)是一个对缺氧非常敏感的指标, 它在心肌急性缺血后数分钟即有基因表达上调, 之后出现蛋白质表达上调, 而且如果诱因反复存在, 其表达将持续升高, 而在非缺氧状态下心肌表达水平很低<sup>[2]</sup>, 这一特点可鉴别缺氧与非缺氧性因素, 可望用于死因的判断。由于死亡之后细胞破裂及基因和蛋白质降解可能出现表达水平改变, 因此能否将其用于死亡之后的死因辅助判断尚不清楚。本研究通过建立大鼠心肌急性缺血的动物模型, 以了解心肌缺血状态下 HIF-1 alpha 的表达规律及其在大鼠死亡后 48 h 的动态变化, 为 48 h 之内的死亡原因鉴别奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及分组

雄性成年 SD 大鼠, 体质量 240~280 g, 购自中山大学北校区动物繁殖中心。动物分为 4 组: 正常对照组; 假手术组(只开胸不结扎冠状动脉); 急性心肌缺血组; 窒息组。本实验分两阶段进行。第一阶段, 假手术组、急性心肌缺血组动物按不同时间点分手术后 15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h、48 h 组, 每组 6 只。第二阶段将 4 组动物随机分为处死后 5 min、2 h、6 h、12 h、24 h、48 h 组, 每组 6 只。动物处死后置于 21℃ 恒温光照培养箱中。除窒息组外均采用拉颈断髓方法处死, 处死前均给予 30 mg/kg 戊巴比妥腹腔麻醉。

### 1.2 试剂

HIF-1 Western blot 多克隆抗体 (NB 100-479) 购自 Novus Biologicals, Inc. HIF-1 免疫组化试剂、链霉素亲和素-生物素-过氧化酶复合物法(SABC)免疫组化染色试剂盒、3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒均购自晶美生物工程公司, RT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司。

### 1.3 大鼠急性心肌缺血模型的建立

建立方法详见参考文献[3]。

### 1.4 常规 HE 染色

取各组大鼠心室前壁心肌组织, 使用 40 g/L 多聚甲醛固定、常规方法进行 HE 染色。

### 1.5 免疫组织化学

石蜡切片常规脱蜡, 30 mL/L 双氧水 10 min 阻断内源性过氧化物酶, 蒸馏水洗 3 次, 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液微波抗原修复, PBS 冲洗 2 次, 滴加 50 g/L 牛血清白蛋白封闭液置室温 20 min; 加 HIF-1 兔多克隆抗体(稀度 1 100), 空白对照用 PBS 取代一抗, 4℃ 冰箱过夜; PBS 冲洗 3 次, 滴加生物素标记的二抗置室温 20 min, PBS 洗 3 次, 滴加 SABC 置室温 20 min, PBS 洗 4 次; DAB 显色, 苏木素复染。以心肌细胞核出现棕黄色颗粒为阳性。

### 1.6 RNA 提取及 RT-PCR

按照 Invitrogen 公司 RT-PCR 试剂盒操作步骤提取大鼠心肌总 RNA, 进行 RT-PCR 扩增。HIF-1 的引物序列为 5'-TTA TCA TGC TTT GGA CTC TG-3'; 5'-CCA GCA AAG TTA AAG CAT CA-3'。扩增 cDNA 片段长度为 380 bp。-actin: 5'-CAT CTC TTG CTC GAAGTC CA-3', 5'-ATC ATG TTT GAGACC TTC AAC A-3', 可扩增长度 308 bp 的 cDNA 片段。反应体系 50 μL, 循环参数: 94℃ 3 min 预变性, 94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 36 个循环, 最后以 72℃ 延伸 5 min。扩增产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳分离, 紫外透视分析仪观察后摄片, 凝胶图像分析系统对 PCR 的产物半定量。半定量采用的公式为: (每个条带的灰度值-背景的灰度值) × 条带面积。

### 1.7 蛋白质的提取及 Western blot

取 50 mg 心肌组织, 碾碎后加入 1 mL 细胞裂解液超声粉碎, 4℃, 15 000 r/min (r=9.8 cm) 离心 15 min, 取上清用 Bicinchoninic acid (BCA) 试剂盒测蛋白质浓度。取相同质量的蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 含 50 g/L 牛血清白蛋白的 TBS 室温封闭 1 h, 加入 HIF-1 多克隆抗体, 4℃ 摇床过夜, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的 IgG 二抗(1 1000)杂交, 洗膜后显色, 凝胶成像分析系统扫描分析。

## 2 结果

### 2.1 常规 HE 染色

假手术组大鼠心肌细胞呈短柱状, 有分枝, 排列整齐而紧密, 组织间无水肿, 染色清晰, 结构完整, 胞浆中横纹清楚, 细胞质均匀呈粉红色, 细胞核致密清晰可见, 圆形或卵圆形, 呈蓝色(图 1)。

心肌缺血后 4 h 组, 见缺血区心肌细胞水肿明显, 部分细胞出现坏死, 核消失, 心肌纤维成波

浪状改变。心肌间质水肿出血,有较多中性粒细胞浸润(图 2)

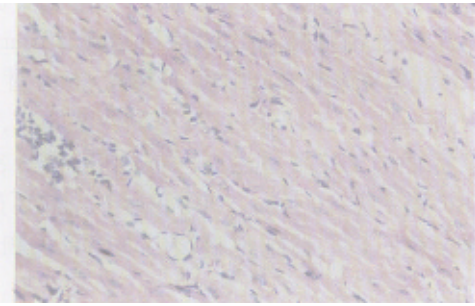


图 1 假手术组手术后 4 h 大鼠心肌组织 HE 染色

Fig.1 Pseudo surgery group myocardium tissue of 4 h after surgery(HE stain,  $\times 200$ )

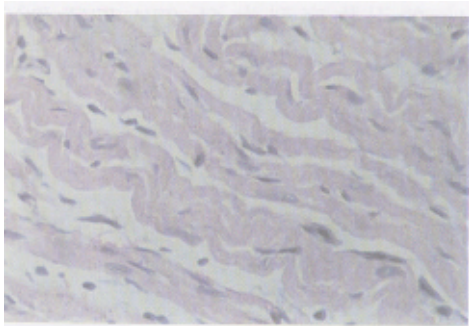


图 2 心肌缺血后 4 h HE 染色

Fig.2 Surgery group myocardium tissue of 4 h after surgery(HE stain,  $\times 400$ )

## 2.2 HIF-1 免疫组化染色

正常对照组、假手术组心肌细胞和血管内皮细胞均未见 HIF-1 的表达(图 3)。心肌缺血后 2 h 和 4 h 心肌细胞核内均出现棕黄色染色(图 4)。

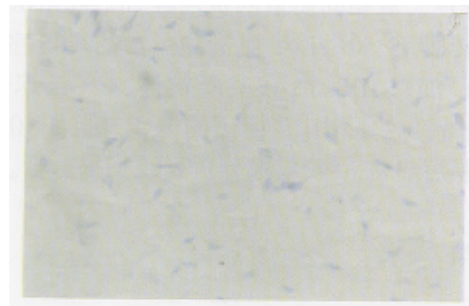


图 3 假手术组术后 4 h 心肌组织 HIF-1 免疫组化染色

Fig.3 Pseudo surgery group myocardium tissue of 4 h after surgery(immunohistochemistry stain,  $\times 400$ )

## 2.3 HIF-1 mRNA 的表达

RT-PCR 检测正常对照组、假手术组心肌细胞 HIF-1 的表达均为阴性。心肌缺血后 30 min 开始可以被检测到,之后其表达升高,至 4-6 h 达

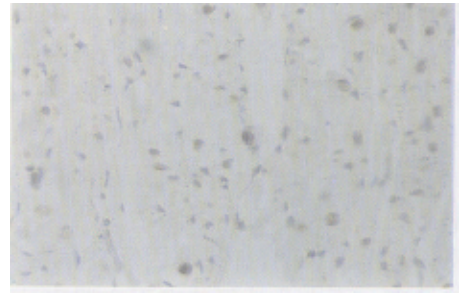


图 4 心肌缺血后 4 h HIF-1 免疫组化染色

Fig.4 Surgery group myocardium tissue of 4 h after surgery(immunohistochemistry stain,  $\times 400$ )

到高峰,然后维持在较高的表达水平。在心肌缺血后各时间点电泳条带的相对灰度值分别是(均数 $\pm$ 标准差) 0(15 min)、441 $\pm$ 48(30 min)、672 $\pm$ 58(1 h)、743 $\pm$ 27(2 h)、841 $\pm$ 41(4 h)、890 $\pm$ 46(6 h)、739 $\pm$ 66(8 h)、775 $\pm$ 57(12 h)、681 $\pm$ 85(24 h)和 751 $\pm$ 371(48 h)。大鼠死亡后 48 h 内均可检测到其表达,但水平呈进行性下降趋势。死亡后各时间点电泳条带的相对灰度值分别是 1557 $\pm$ 208(5 min)、1450 $\pm$ 120(2 h)、880 $\pm$ 103(6 h)、702 $\pm$ 112(12 h)、609 $\pm$ 86(24 h)、538 $\pm$ 84(48 h)。正常对照组、假手术组、窒息组处死后 5 min 均未检测到 HIF-1 的表达。

## 2.4 HIF-1 蛋白质的表达

正常对照组、假手术组大鼠心肌均未检测出 HIF-1 的表达,HIF-1 于心肌缺血后 2 h 开始可以被检测到,之后表达水平进行性上升,至 12 h 达到高峰,之后持续维持在高水平。在心肌缺血后各时间点电泳条带的相对灰度值分别是:0(15 min)、0(30 min)、0(1 h)、152 $\pm$ 20(2 h)、181 $\pm$ 15(4 h)、245 $\pm$ 20(6 h)、285 $\pm$ 26(8 h)、416 $\pm$ 31(12 h)、387 $\pm$ 40(24 h)和 404 $\pm$ 40(48 h)。大鼠心肌缺血后 48 h 处死,发现 HIF-1 蛋白质变化规律与 mRNA 相似,处死后 48 h 内各时间点均可检测到 HIF-1 蛋白的表达,电泳条带的相对灰度值分别是 834 $\pm$ 29(5 min)、780 $\pm$ 45(2 h)、704 $\pm$ 32(6 h)、642 $\pm$ 37(12 h)、566 $\pm$ 41(24 h)、487 $\pm$ 38(48 h)。而正常对照组、假手术组和窒息组均未检测到表达。

## 3 讨论

心脏性猝死往往有原发性心脏疾病和心肌缺血、缺氧的病理基础,而心肌的缺血、缺氧可导致

一系列代谢和基因水平改变, 这些改变可能有助于鉴定心肌缺血、缺氧性疾病和由此引起的死亡。在疾病诊断方面, 已有不少的相关研究报道, 如外周血肌钙蛋白、肌红蛋白、心肌酶、VEGF的表达等<sup>[1,4]</sup>, 但这些指标均存在敏感性、特异性差和时间滞后的缺点, 且主要用于临床疾病诊断, 目前尚无一个可在死亡之后进行诊断的指标。

HIF-1是在缺氧诱导的细胞核提取物中发现的一种DNA结合蛋白分子, 由HIF-1与HIF-1以异源二聚体形式存在。HIF-1是氧依赖性降解, 正常氧浓度条件下, HIF-1泛素化后迅速降解, 故正常情况下难以检测到, 而在缺氧状态下, HIF-1蛋白降解减少, 大量集聚并转移到细胞核中, 诱导VEGF表达和其他一系列机体的缺氧反应<sup>[5,6]</sup>。尽管HIF-1已被证实为缺血、缺氧性损伤中最重要的信号转导途径之一<sup>[7]</sup>, 但对其在急性心肌缺血中的表达变化规律研究较少<sup>[8,9]</sup>, 而将它应用于法医死因鉴定更鲜有报道。

本研究发现, 在手术后30 min开始, 缺血心肌中HIF-1 mRNA表达明显上调, 至4~6 h达高峰, 并维持高水平至48 h。蛋白质的表达相对滞后, 但在心肌缺血的早期(缺血后2 h)病理尚无典型的形态学变化时即可检测出, 这与Kido等<sup>[9]</sup>的报道基本一致。提示HIF-1是反映缺氧的一个敏感的指标, 其升高与缺氧的时间相关, 有望用于心肌梗塞的辅助诊断。在死亡后48 h仍能检测出HIF-1 mRNA和蛋白表达, 而相应的正常对照组均为阴性。这进一步验证了这一推测并提示HIF-1可作为一个早期心肌缺血性猝死的敏感的辅助诊断指标。

本研究分别建立了窒息死亡的大鼠模型和急性心肌缺血猝死的大鼠模型, 进一步比较了HIF-1 mRNA及其蛋白质在两种动物模型中的表达情况。结果表明, 心肌缺血组在死亡后48 h内仍可检测到HIF-1 mRNA及其蛋白质的表达, 而在窒息死亡组则检测不到HIF-1 mRNA及其蛋白质的表达。窒息组不表达的原因可能是由于窒息无慢性心肌缺血、缺氧的基础, 其引起的死亡时间非常短, 仅数分钟之内生命活动完全停止, 机体来不及对缺氧进行调节反应, 或者HIF-1的反应强度尚不足以被检测出来, 故结果均为阴性。本研究结果与Pampin<sup>[10]</sup>报道的在急性心肌梗死患者尸检的

HIF-1免疫组化结果一致。本结果提示, HIF-1可以用于窒息和急性心肌缺血性死亡的辅助鉴别, 为其用于法医临床的死因鉴定提供了实验室基础。

#### 参考文献:

- [1] PURANIK R, CHOW C K, DUFLOU J A, et al. Sudden death in the young[J]. *Heart Rhythm*, 2005, 2(12):1277-1282.
- [2] LU M J, CHANG H, CHANG C C, et al. Temporal and spatial expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor in a rat model of myocardial ischemia with or without reperfusion [J]. *J Formos Med Assoc*, 2005, 104(10): 707-714.
- [3] 陈红霞, 高英茂, 邢鲁军. 动物模型参考文献急性大鼠心肌梗死实验模型的制备[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2005, 14(1): 70-73.
- [4] 陈建国, 徐小虎, 姚青松, 等. VEGF免疫组化染色在冠心病猝死诊断中的应用[J]. *法医学杂志*, 2000, 16(1): 6-7.
- [5] LEE J W, BAE S H, JEONG J W, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1): its protein stability and biological functions[J]. *Exp Mol Med*, 2004, 36(1): 1-12.
- [6] 苏莉, 朱旭阳, 汪静宇, 等. 大鼠弥漫性脑损伤后脑组织HIF-1的变化规律[J]. *法医学杂志*, 2005, 21(4): 244-246.
- [7] KASUNO K, TAKABUCHI S, FUKUDA K, et al. Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(4): 2550-2558.
- [8] MASON S D, HOWLETT R A, KIM M J, et al. Loss of skeletal muscle HIF-1-alpha results in altered exercise endurance[J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(10): e288.
- [9] KIDO M, DU L, SULLIVAN C C, et al. Hypoxia-inducible factor 1-alpha reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(11):2116-2124.
- [10] PAMPIN J B, GARCIA RIVERO S A, OTERO CEPEDA X L, et al. Immunohistochemical expression of HIF-1-alpha in response to early myocardial ischemia[J]. *J Forensic Sci*, 2006, 51(1): 120-124.

(编辑 黄小延)