

HIF 在心肌缺血再灌注中的作用 *

范新明 周 鸣 彭建强 郭 莹

(湖南师范大学第一附属医院湖南省人民医院心内科 湖南 长沙 410005)

摘要 缺氧诱导因子(HIF)是参与缺氧转录反应调控的转录调控因子,HIF 的活化在缺氧时细胞中保护起重要作用,HIF 及 HIF 依赖的基因如诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、血红素氧合酶(HO-1)的激活可减轻心脏的缺血-再灌注损伤,HIF 调节的基因表达可能介导了缺血预处理和缺血后处理的保护作用。本文对 HIF 在心肌缺血再灌注损伤中的保护作用予以综述。

关键词 缺氧诱导因子 缺血再灌注 缺血预处理 缺血后适应

中图分类号:R543.3 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)20-3994-03

Role of hypoxia-inducible factor in myocardial ischemia-reperfusion*

FAN Xin-ming, ZHOU Ming, PENGJian-qiang, GUO Ying

(Department of Cardiovascular,Hunan Provincial People's Hospital, Changsha, 410005,China)

ABSTRACT: Hypoxia-inducible factor (HIF) is the principal regulator of cellular transcriptional responses to hypoxia. HIF activation plays an essential role in triggering cellular protection when oxygen deprivation. Activation of HIF and HIF dependent gene such as iNOS and HO-1 should confer protection against ischemia-reperfusion (I/R) injury, gene expression regulated by HIF should mediate protection conferred by ischemic preconditioning and postconditioning. This article reviewed the protection of HIF on myocardial ischemia-reperfusion (I/R) injury.

Key words: Hypoxia-inducible factor; Ischemia-reperfusion; Ischemic preconditioning; Ischemic postconditioning

Chinese Library Classification(CLC): R543.3 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)20-3994-03

组织缺血后尽早恢复血流是防治缺血性损伤的基本措施,再灌注具有生理和病理意义,表现出两重性:多数情况下,恢复血流可使缺血组织和器官的功能结构得以修复,患者病情得到控制,但是有时也可使病情加重,不仅没使组织器官功能恢复,反而使缺血所致的功能和代谢障碍及结构破坏进一步加重,这种现象或病理过程称为缺血-再灌注损伤。HIF 是参与缺氧转录反应调控的主要转录因子,当缺氧时,HIF 的活化在触发细胞保护、调节代谢起着重要的作用。HIF 是一组转录因子,调节近 200 种对缺氧和/或缺血有适应性反应的基因的表达^[1]。因此,探讨 HIF-1 的心肌保护作用机制对研究缺血性心血管疾病有重要意义。

1 缺氧时 HIF 的调节

HIF 是缺氧应答中起重要作用的转录因子,HIF-1 是由 120KD 的 α 亚基和 91~94KD 的 β 亚基组成的异源二聚体,在细胞中呈组成性表达。 β 亚基(ARNT)的表达不依赖氧, α 亚基表达的蛋白的稳定性受细胞内氧浓度的调节。在常氧环境下 α 亚基通过一个叫氧依赖降解结构域(ODD)肽段上的保守的脯氨酸残基的羟化作用而降解, α -酮戊二酸依赖的脯氨酰羟化酶(PHDs)催化这种反应过程,此外还需要氧气、铁、 α -酮戊二酸、抗坏血酸。因此,常氧环境下 HIF 的活性处于低水平的状态。缺氧时 PHDs 的活性被抑制, α 亚基储积,与 β 亚基

异二聚体化后开始转录。因此 HIF-1 α 在维持氧的平衡中起重要的作用。目前已知 HIF-1 有 HIF-1 α 和 HIF-2 α 两种亚型, α 亚基的两种亚型具有高度的序列同源性。表型的差别表明 HIF-1 α 和 HIF-2 α 具有重要和独特作用,任何一种亚基的种系缺失将导致胚胎期死亡^[2]。

HIF 依赖性的糖酵解基因的表达可以增强糖的无氧酵解加快 ATP 的产生提供保护。而其它的机制也可能起作用。例如,生存到出生的 HIF-2 α 种系缺失的小鼠显示多种器官功能障碍,伴有抗氧化酶的低表达和过度的细胞氧化应激的迹象^[3]。这表明 HIF-2 α 有增强细胞抗氧化的能力,在缺血-再灌注时细胞的生存起重要的作用。同样地,HIF 依赖的基因如血红素氧化酶-1(HO-1)可以通过影响氧化应激反应改善缺血-再灌注时细胞的生存^[4]。其它受 HIF 调节的基因有诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和环氧化酶-2(COX-2),这两者都能提高大鼠抗缺血的能力。HIF 依赖性基因如血管内皮生长因子(VEGF)调节局部氧的供应,调节侧枝血管的发生,在缺血-再灌注中也可能起重要作用^[4,5,6]。目前,影响细胞在缺血-再灌注中生存或死亡的 HIF 的激活的特殊机制还不是很清楚,可能涉及多条抗氧化能力、血管发生的通路和细胞死亡通路和抗凋亡通路。

2 心肌缺血时 HIF 的活化

冠心病是临床上最常见的疾病之一,已有很多对急性心肌

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目(30570073)

作者简介 范新明(1974-)男,硕士,主要研究方向 心血管病学,电话:15802631537 E-mail:hnsylxfxm@163.com

△通讯作者 郭莹(1956-)女,硕士研究生导师,教授,主要研究方向 心血管病学,电话:0731-82278165 E-mail:guoying@gmail.com

(收稿日期:2011-02-12 接受日期:2011-03-06)

梗死缺氧反应的研究。Lee 等^[7]等发现有心肌梗死或急性心肌梗死病理学证据的病人在冠状动脉搭桥外科手术中行心室活检,活检标本中 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 和蛋白的表达和翻译是增加的。在大鼠实验中,已经观察到暴露于全身性缺氧时 HIF-1 α 被普遍诱导,在冠状动脉发生闭塞后梗死边缘的心肌组织 HIF-1 α 也有表达。持续 4 周时间,在围梗死地带, HIF 依赖性蛋白如血红素氧合酶(HO-1)和谷氨酰胺-1(Glut-1)也同样检测到表达上调。Kido 等^[5]运用一个在心肌中 HIF- α 组成性过表达的转基因小鼠模型,冠状动脉闭塞 24 小时后梗死面积没有进一步扩大,到第 4 周,他们观察到梗死面积缩小和心功能改善。免疫组化分析表明在围梗死地带 HIF- α 和它的下游调控基因 VEGF 和 iNOS 表达都增加。在相关的研究,Detel^[8]等发现,培养的大鼠心肌细胞暴露于 3 小时缺氧环境接着 14 小时正常氧环境导致 VEGF, Glut-1, Glut-4, 和 iNOS mRNA 表达的增加。用设计过表达 HIF-1 α 的腺病毒感染培养的大鼠心肌细胞也得到相似的 mRNA 表达的增加并减少缺血-再灌注诱导的细胞死亡。这些研究表明 HIF 依赖的基因表达在心肌缺血-再灌注时有改善细胞存活的作用。

3 HIF-1 α 通过诱导 iNOS 减轻缺血再灌注损伤

HIF-1 可能是通过触发特定的保护基因的活性抗缺血-再灌注损伤。诱导型一氧化氮合酶(iNOS)是已知的 HIF-1 下游靶点,并且已经证实了在急性和慢性心脏病中有心脏保护作用^[9]。在一项研究中,用 siRNA 沉默鼠类微血管内皮细胞脯氨酸羟化酶(PDH)的表达,结果发现 HIF-1 α 稳定蛋白随时间和剂量依赖性增加, iNOS mRNA 信号也相应增加^[10]。用 siRNA 组成物处理完整的鼠类心脏,在随后的缺血-再灌注中,梗死面积和心功能障碍都得到改善。在 iNOS 基因敲除的小鼠中没有这种作用^[10]。Xi^[11]等用 Langendorff 灌注模型做相似的研究中,发现用氯化钴选择性激活 HIF-1 α 能减少梗死面积,在氯化钴注射后 1 小时内 HIF-1 α 的 DNA 结合活性显著增加,在 iNOS 敲除的小鼠,没有这种氯化钴限制梗死的效应,再一次证实了 iNOS 在 HIF 心脏保护通路中的重要作用。

4 HO-1 在 HIF-1 α 介导的心脏保护作用中的作用

通过 HIF-1 α 的激活,血红素氧合酶(HO-1)的表达增加^[6]。HO-1 降解血红素产生一氧化碳(CO)和胆红素,两者都可能具有抗氧化和/或抗炎作用。过表达心脏特异性 HO-1 的转基因小鼠心脏显示能显著的减少心肌梗死面积,减轻缺血-再灌注损伤。在缺氧时能上调 HO-1 表达的质粒系统同样有心脏保护作用^[12]。几项在探讨 HIF-1 保护效应的研究都聚焦于 HO-1 在这种反应中所起的作用。Pachori 等^[13]用包含缺氧反应元件的启动子的质粒诱导 HO-1 在大鼠缺血时过表达,分别于心脏、后肢、肝门静脉注射这种物质使得心脏、后肢、肝脏缺血-再灌注损伤减轻。在另外一项实验中,兔子用二甲氧乙二酰甘氨酸(DMOG)治疗,DMOG 是 PHD 抑制剂,在常氧时能稳定 HIF- α 。这些动物表明能增加心脏 HO-1 的表达,同时减少心肌梗死的面积和促进缺血-再灌注后功能恢复。有趣的是,血浆 IL-8 和心肌髓过氧化物酶活性也同样降低。在人类微血管内皮细胞, TNF- α 依赖 IL-8 促进活性,随着 DMOG 剂量的增加

TNF- α 蛋白分泌减少, TNF- α 诱导的通过微血管内皮细胞层的多形核细胞迁移也显著减少^[6]。这些发现提示激活的 HIF 可能通过 HO-1 的表达发挥抗炎作用而减轻缺血损伤。

5 HIF 在预适应(Preconditioning)中的作用

缺血预适应(ischemic preconditioning, IPC)简称预适应,是短时间缺血应激使机体组织对随后更长时间缺血-再灌注损伤产生明显保护作用的一种适应机制。其保护作用是机体产生了某些活性物质增强了细胞或组织器官对不良刺激的耐受性或适应性。触发这种保护作用的机制还不完全清楚,目前认为与来自线粒体的 ROS 和线粒体的 ATP 依赖的钾通道的开放有关。一些研究表明增加 ROS 信号肽导致 KATP 通道的开放^[14],而另外一些研究表明 KATP 通道的开放导致 ROS 产物的增加,ROS 产物介导随后的保护作用^[15]。缺氧本身导致线粒体 ROS 产物的增加和随后的 HIF-1 α 的激活^[16]。所以,可能是 ROS 信号肽在触发阶段诱导 HIF 依赖的基因表达而产生保护作用。

在缺血或缺血-再灌注背景下,可以推测是活化的 HIF-1 α 通过其作用于下游靶基因影响血管紧张度、血管发生、糖酵解代谢产生保护作用。实际上,多种 HIF 依赖的基因如 iNOS、环氧化酶-2(COX-2)和 HO-1^[17]都涉及到了缺血预适应后期的保护机制。

缺血预适应的保护作用需要基因转录和新的蛋白翻译,可以推测 HIF 介导的保护作用在触发刺激和致死性应激之间是需要一定时间来完成的。就这而言, HIF 的活性是需要致死性缺血刺激之前预先刺激激活的。因此, HIF 参与 IPC 的即刻/早期保护作用是不太可能的。然而,近来的证据表明 HIF 还是可以影响立即/早期预处理的。Cai 等^[18]用野生型小鼠和 HIF-1 α +/- 杂合鼠作为实验对象,短时间的缺血之后接着 30 分钟的持续缺血。缺血-再灌注后野生型小鼠的梗死面积扩大,心功能恶化,但 HIF-1 α +/- 的杂合小鼠心脏没有这种现象。这些研究强烈的暗示 HIF-1 α 经 IPC 而获得的即刻保护作用,这种即刻的保护作用未必是由于 HIF 依赖的基因的急性活化产生的。另外,在 HIF-1 α +/- 的心脏减少一系列 HIF 调节的基因的组成性表达可能破坏它们激活或传递应对急性预处理应激必需信号的能力。例如, Cai 等^[18]注意到如果线粒体的氧化信号在 HIF-1 α +/- 杂合子动物被抑制,则有可能破坏它们缺血预适应的能力。

6 HIF 在缺血后适应中(postconditioning)的作用

缺血后适应(PostC)是指心肌缺血后,开始再灌注时进行数次短暂缺血/再灌注循环的处理方法。PostC 自从 2003 年 Zhao^[19]等报道以来,已经被证明是一种利用自然保护作用抗心肌缺血-再灌注损伤新的策略。当前, PostC 的心脏保护在不同的实验室和不同的物种(包括人类)得到了很好的证实^[20]。PostC 诱导的心脏保护作用的机制与繁多的细胞、亚细胞对再灌注损伤的适应反应有关,包括腺苷受体的内源性刺激、生存激酶的激活、KATP 通道的开放、细胞内的减毒作用、线粒体钙的聚集、还有线粒体通透性转变孔的开放^[21,22,23]。

Huan-Xin Zhao 等^[24]研究证明了 PostC 能减少梗死面积,

降低血浆 CK 活性,减少凋亡。随同这些变化,HIF-1 α 和 iNOS 的表达显著上调,HIF-1 α 和梗死面积呈直线负相关,说明了 HIF-1 α 在调节心肌损伤中的作用。与 HIF-1 α 减少梗死面积相符,其他由缺血再灌注诱导的有害效应如 CK 活性、细胞凋亡指数、caspase-3 活性被抑制。DMOG 已经证明在缺血前给予能很好的上调 HIF-1 α 的表达,在 PostC 之前给予 DMOG,HIF-1 α 和 iNOS 的表达进一步提高,DMOG 和 PostC 在上调 HIF-1 α 具有叠加效应,支持 HIF-1 α /iNOS 介导的信号通路在 PostC 中的心肌保护作用。

PostC 是近年来提出的一种新的减轻再灌注损伤的方法,目前认为 IPC 与 PostC 在心脏保护作用及其机制等方面有许多相似之处。值得重视的是,尽管 IPC 和 PostC 都是通过产生可逆性损伤去诱导机体内源性保护,但前者需要在缺血之前进行以减轻后续组织缺血再灌注损伤,后者则是于再灌注早期进行以减轻组织再灌注损伤,其干预措施在缺血发生之后,因此具有可操作性。动物实验已经证实其确有心肌保护作用,临床亦有报道,但尚需大规模、长期的临床观察。

7 小结

缺血、缺血-再灌注、和慢性缺氧都参与细胞死亡通路导致组织损伤和器官功能障碍。HIF 是细胞对应缺氧反应的主要的调节剂。缺氧时,HIF 促发涉及氧的运输、氧的利用、糖酵解代谢、细胞死亡、细胞存活、和其他能影响细胞在缺血时生存的基因的表达。HIF 的激活能给机体提供保护,在细胞、组织、器官水平上抵抗这种损伤。关于 HIF 在介导细胞和组织应对缺血-再灌注反应中的作用还需要更多的研究,操纵 HIF 活性的能力可能冲击我们对缺血组织损伤的治疗。

参考文献(References)

- [1] Schumacker PT. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)[J]. Crit Care Med, 2005, 33 (12 Suppl): S423-S425
- [2] Hu CJ, Iyer S, Sataur A, Covello KL, Chodosh LA, Simon MC. Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem Cells [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26: 3514-3526
- [3] Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan LJ et al. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in Epas1-/-Mice [J]. Nat Genet, 2003, 35: 331-340
- [4] Semenza GL. Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1[J]. J Clin Invest, 2000, 106: 809-812
- [5] Kido M, Du L, Sullivan CC, Li X, Deutsch R, Jamieson SW 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: 2116-2124
- [6] Ockaili R, Natarajan R, Salloum F, Fisher BJ, Jones D, Fowler III AA et al. HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine Generation [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 289:H542-H548
- [7] Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction[J]. N Engl J Med, 2000, 342: 626-633
- [8] Date T, Mochizuki S, Belanger AJ, Yamakawa M, Luo ZG, Vincent KA et al. Expression of constitutively stable hybrid hypoxia-inducible factor-1alpha protects cultured rat cardiomyocytes against simulated ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 288: C314-C320
- [9] Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection[J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 40: 16-23
- [10] Natarajan R, Salloum FN, Fisher BJ, Kukreja RC, Fowler III AA. Hypoxia inducible factor-1 activation by prolyl 4-hydroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury [J]. Circ Res, 2006, 98: 133-140
- [12] Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Agarwal A, Kasahara H, Qian K et al. A hypoxia-inducible vigilant vector system for activating therapeutic genes in Ischemia[J]. Gene Therapy, 2005, 12: 12: 1163-1170
- [13] Pachori AS, Melo LG, Hart ML, Noiseux N, Zhang L, Morello F et al. Hypoxia-regulated therapeutic gene as a preemptive treatment strategy against ischemia/reperfusion tissue injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 12282-12287
- [14] Lebuffe G, Schumacker PT, Shao ZH, Anderson T, Iwase H, Vanden Hoek TL. ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP Channel [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284: H299-H308
- [15] Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS et al. Opening of mitochondrial KATP channels triggers the preconditioned state by generating free Radicals[J]. Circ. Res., 2000, 87: 460-466
- [16] Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during Hypoxia[J]. Exp Physiol, 2006, 91: 807-819
- [17] Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, Fox-Talbot K, Wang L, Wei C et al. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 α [J]. Cardiovasc Res, 2007, 77
- [18] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic preconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285: H579-H588
- [19] Sivaraman V, Mudalagiri NR, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, Keogh B, Hausenloy DJ, Yellon DM. Postconditioning protects human atrial muscle through the activation of the RISK Pathway[J]. Basic Res Cardiol, 2007, 102: 453-459
- [20] Argaud L, Gateau-Roesch O, Augeul L, Couture-Lepetit E, Loufouat J, Gomez L, Robert D, Ovize M. Increased mitochondrial calcium coexists with decreased reperfusion injury in postconditioned (but not preconditioned) hearts [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294: H386-H391
- [21] Heusch G, Boengler K, Schulz R. Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and Mitochondria[J]. Circulation, 2008, 118: 1915-1919
- [22] Mykityenko J, Reeves JG, Kin H, Wang NP, Zatta AJ, Jiang R, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. Persistent beneficial effect of postconditioning against infarct size: role of mitochondrial K(ATP) channels during reperfusion [J]. Basic Res Cardiol, 2008, 103: 472-484
- [23] Huan-Xin Zhao, et al. Attenuation of myocardial injury by postconditioning: Role of hypoxia inducible factor-1 α [J]. Basic Res Cardiol, 2010, 105:109-118