

兔骨骼肌生理性缺血对缺氧诱导因子-1 α 的表达和血管内皮生长因子释放的影响*

项洁¹ 吴鑫¹ 陆晓² 励建安^{2,3}

摘要

目的:验证生理性骨骼肌缺血训练上调血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达与骨骼肌局部缺血产生的缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)有关,进一步探讨VEGF的上游调控机制。

方法:成年雄性新西兰大白兔随机分成:①心肌缺血再灌注组(I/R组, n=6);②假手术组(Sham组, n=6),步骤同I/R组,但仅穿线,不牵拉;③骨骼肌缺血+I/R组(n=6),在心肌I/R之前先实施反复骨骼肌缺血/再灌注。ELISA检测外周血中VEGF的表达,Western blot检测肢体肌肉处HIF-1 α 的表达。

结果:与Sham组相比,心肌I/R组及骨骼肌缺血+I/R组都可促进外周血中VEGF的释放,且后者的作用更显著,骨骼肌缺血+I/R组与心肌I/R组相比对VEGF的释放有显著性差异($P < 0.05$);与Sham相比,骨骼肌缺血+I/R组可以上调HIF-1 α 的表达($P < 0.05$),而I/R组相对于Sham组HIF-1 α 的表达无明显的变化($P > 0.05$),且骨骼肌缺血+I/R组与I/R组相比对HIF-1 α 的表达有显著性差异($P < 0.05$)。

结论:骨骼肌生理性缺血可导致局部HIF-1 α 的高表达,同时对应着外周VEGF的表达增高,且较单纯的心肌缺血水平更高,推测外周VEGF的高表达与缺血局部骨骼肌释放HIF-1 α 有关。

关键词 血管内皮生长因子;缺氧诱导因子-1 α ;心肌缺血再灌注

中图分类号:R685,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2016)-10-1055-05

Effects of physiological ischemia on the expression of hypoxia inducible factor, alpha and release of vascular endothelial growth factor in rabbits skeletal muscles/XIANG Jie, WU Xin, LU Xiao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(10): 1055—1059

Abstract

Objective: To verify the underlying mechanism that repeated physiological skeletal muscle ischemia training can promote the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) via upregulating hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in rabbit ischemic skeletal muscle.

Method: Clean level male white rabbits of New Zealand, weight 2.2—2.5kg, were randomly divided into the following groups: Sham (n=6), myocardial ischemia/reperfusion (I/R, n=6), skeletal muscle ischemia+I/R (n=6). The right hind legs of rabbit were ligated to block femoral artery blood by manual tourniquet ring, till the pulse of femoral artery disappeared, lasting for five minutes, and then loosened for five minutes, four times cycles. Subsequently, we collected the serum and the limb muscle to detect the release of VEGF and the expression of HIF-1 α , respectively.

Result: Myocardial I/R and skeletal muscle ischemia+I/R could promote the expressions of VEGF compared with shame group ($P < 0.05$), and VEGF was more obvious in skeletal muscle ischemia+I/R group than those in the I/R group ($P < 0.05$). The expression of HIF-1 α had no significant difference between shame group and I/

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.10.002

*基金项目:国家自然科学基金项目(81472164);徐州市科技项目(XM13B060)

1 徐州医学院附属医院康复医学科,徐州,221002; 2 南京医科大学附属第一临床学院康复医学科; 3 通讯作者

作者简介:项洁,女,主任医师; 收稿日期:2015-08-22

R group ($P > 0.05$). However, the level of HIF-1 α was increased in skeletal muscle ischemia+I/R compared with I/R group ($P < 0.05$).

Conclusion: Skeletal muscle ischemia can promote the expressions of HIF-1 α in local limb muscle and further accelerate the release of VEGF in the serum.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, Xuzhou Medical College Affiliated Hospital, Xuzhou, 221000

Key word vascular endothelial growth factor; hypoxia-inducible factor-1 α ; myocardial ischemia/reperfusion

冠心病的治疗除了支架植入、冠脉搭桥,还有促进缺血心肌自身侧支循环形成或开放,达到改善心肌血供的治疗方法。尤其对于无法选择支架或搭桥的患者,促进缺血心肌侧支循环有着重大意义。在众多的促血管新生因子中,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最重要的因子,它刺激生理/病理的新生血管形成。前期大量基础研究揭示长时程反复的可控的骨骼肌缺血训练即生理性缺血训练(physiological ischemia training, PIT)可以上调VEGF的表达,通过动员内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)归巢到缺血心肌,促进缺血心肌侧支循环的形成,最终实现“生物搭桥”^[1-4]。这些研究观察了长时程生理性缺血训练后VEGF的表达规律及EPCs归巢现象,而对骨骼肌缺血如何导致循环中VEGF释放的机制尚不明确。

有研究发现缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)在缺血性疾病发病机制中起着重要作用^[5],HIF-1 α 通过绑定低氧反应元(hypoxia response element, HRE)来激活VEGF转录^[6-7]。已经证实:低氧刺激通过HIF-1 α 进入细胞核来上调VEGF的mRNA及蛋白的表达^[8-11]。

本实验目的在于探讨生理性缺血训练导致远隔VEGF的上游调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雄性新西兰大白兔,体重2.2—2.5kg,清洁级,由徐州医学院实验动物中心提供。动物饲养均采用实验室饮食、饮水标准方案;饲养环境为温度、湿度、亮度控制的房间。实验方案遵循美国NIH公布的实验动物使用指南。

1.2 动物模型制备

将兔背部固定于兔手术台架上,同时固定头部。耳缘静脉备皮,2%利多卡因局麻耳缘静脉周围皮肤,放置静脉留置针备用。用3%戊巴比妥钠(约1ml/kg)通过耳缘静脉缓慢注射麻醉动物,注射过程中持续给予心电监护,防止呼吸抑制。颈部、胸前及双下肢手术部位备皮;针形电极插入四肢皮下,连接多导电生理仪以便记录心律、ST段抬高时间及幅度等^[12]。胸部备皮、消毒后,选取前正中中线为切口,逐层切开皮肤、皮下组织及肌层,充分暴露左侧3、4肋骨,用小止血钳夹断后,钝性分离。钳夹肋间内肌和肋间外肌,结扎胸廓内动脉。沿胸骨左缘游离出3cm左右的纵行切口,双侧用拉钩撑开;小心剪开纵隔胸膜,防止气胸;止血钳小心提起壁层心包膜,剪开后充分暴露心脏。寻找心脏左室支,观察其走形、长度,以左心耳下缘与心尖连线中点为结扎部位。以眼科5个0针线沿与动脉走形垂直的方向在左室心肌内穿线。用细硅胶管套线,束紧后紧贴硅胶管上端用止血钳夹紧线。观察心肌颜色由红色变成暗灰色,心电图可见T波高尖、ST段上抬($\geq 0.15\text{mV}$)缺血40min(见图1)。阻断血流前应充分抗凝,以1:250U肝素以500U/kg通过耳缘静脉弹丸式注射。缺血40min后,松开止血钳,去掉硅胶管,发现发绀区心肌颜色恢复正常,2min内心电图恢复正常为再灌注,再灌注120min。

排除标准:①麻醉、手术中或术后意外死亡;②手术中止血钳夹紧完成后,心电图未见缺血改变;③松开止血钳,去掉硅胶管后心电图仍不能恢复正常。

1.3 骨骼肌可控性缺血处理方法

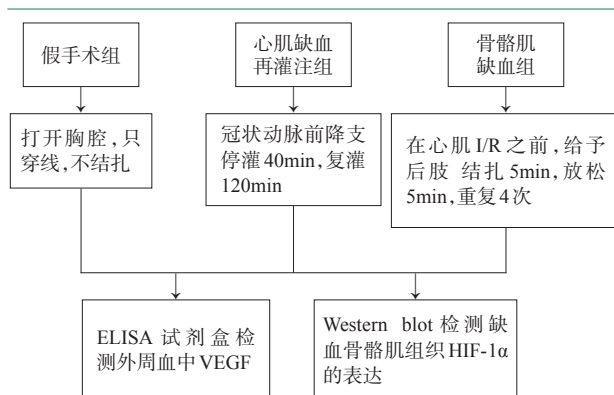
止血带环结扎兔右后肢阻断股动脉血流,每次环扎以环扎以下体温下降、皮肤变紫,环扎下方摸不到股动脉搏动为主,通过超声多普勒证明血流的中断,持续5min,松开5min,循环4次。

1.4 实验动物分组

随机分为以下几组:①心肌缺血再灌注组(I/R组, $n=6$);②假手术组(Sham组, $n=6$),步骤同I/R组,但仅穿线,不牵拉;③骨骼肌缺血组(骨骼肌缺血+I/R, $n=6$),在心肌I/R之前先实施骨骼肌缺血:阻断血流持续5min,松开5min,循环4次。

实验流程:见图1。

图1 实验动物分组及处理流程图



1.5 外周血中VEGF测定

采用ELISA法(上海西塘公司)测定外周血VEGF含量,具体操作步骤依照试剂盒说明书进行,读取各孔的OD值。进行相应统计处理。

1.6 Western blot检测缺血骨骼肌HIF-1α蛋白表达

取各组兔右后肢骨骼肌组织,按细胞及组织总蛋白抽提试剂盒说明书提取组织蛋白;BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量;将提取的蛋白进行SDS-PAGE电泳;转膜;脱脂奶粉封闭1h;将封闭过的膜加入一级抗体4℃过夜,抗原抗体结合。TBST洗膜3次,每次5min。HIF-1α抗体及β-actin(稀释倍数1:1000)覆于膜上,4℃过夜。加入碱性磷酸酶标记的羊抗兔IgG抗体(北京中杉金桥生物公司),室温孵

育膜1h。TBST洗膜3次,每次5min,加入显色剂(NBT/BCIP显色试剂盒),反应达到要求后流水洗涤终止反应。取出条带,并用Image J分析软件分析每个特异条带灰度值。

1.7 统计学分析

使用GraphPad Prism 5.0分析软件,计量资料以均数±标准差表示,两组间比较采用 t 检验,多组间的比较采用单因素方差分析或者两因素方差分析。

2 结果

2.1 兔结扎左室支前后心电图的变化

结扎心肌左室支前,ST段在基线以下;当结扎心室左前降支造成心肌缺血时,心电图显示ST段明显的抬高,超过基线水平。见图2。

2.2 缺血处骨骼肌HIF-1α表达及外周血中VEGF释放的影响

与Sham组相比,心肌I/R组及骨骼肌缺血+I/R组都可促进外周血中VEGF的释放,且后者的作用更显著(VEGF: 1931.00 ± 65.92 vs 1277.00 ± 57.36 , $P < 0.05$, 2665.00 ± 82.50 vs 1277.00 ± 57.36 , $P < 0.01$);骨骼肌缺血+I/R组与心肌I/R组有显著性差异(VEGF: 2665.00 ± 82.50 vs 1931.00 ± 65.92 , $P < 0.05$)。见表1,图3。

与Sham组相比,骨骼肌缺血+I/R组可以上调HIF-1α的表达(3.35 ± 0.08 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$),而I/R组相对于Sham组HIF-1α的表达无明显的变化(1.26 ± 0.07 vs 1.00 ± 0.00 , $P > 0.05$),且骨骼肌缺血+I/R组与I/R组相比对HIF-1α的表达有显著性差异(3.35 ± 0.08 vs 1.26 ± 0.07 , $P < 0.05$)。见表1,图3。

图2 结扎左室支前后心电图上ST段的变化

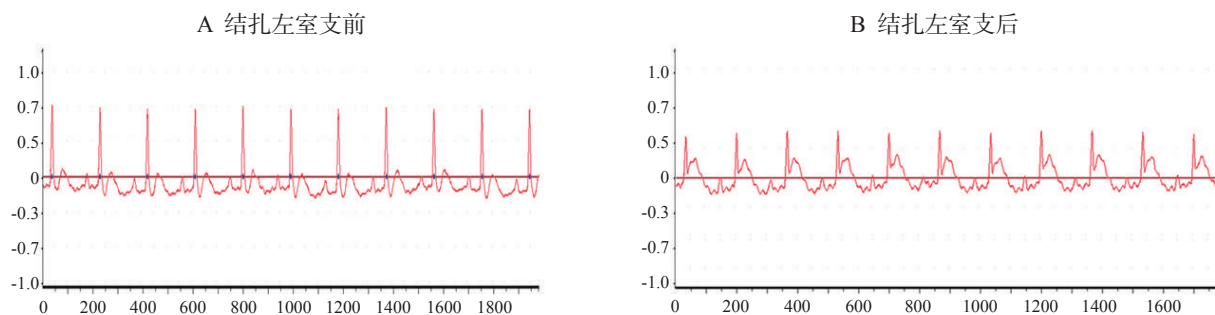
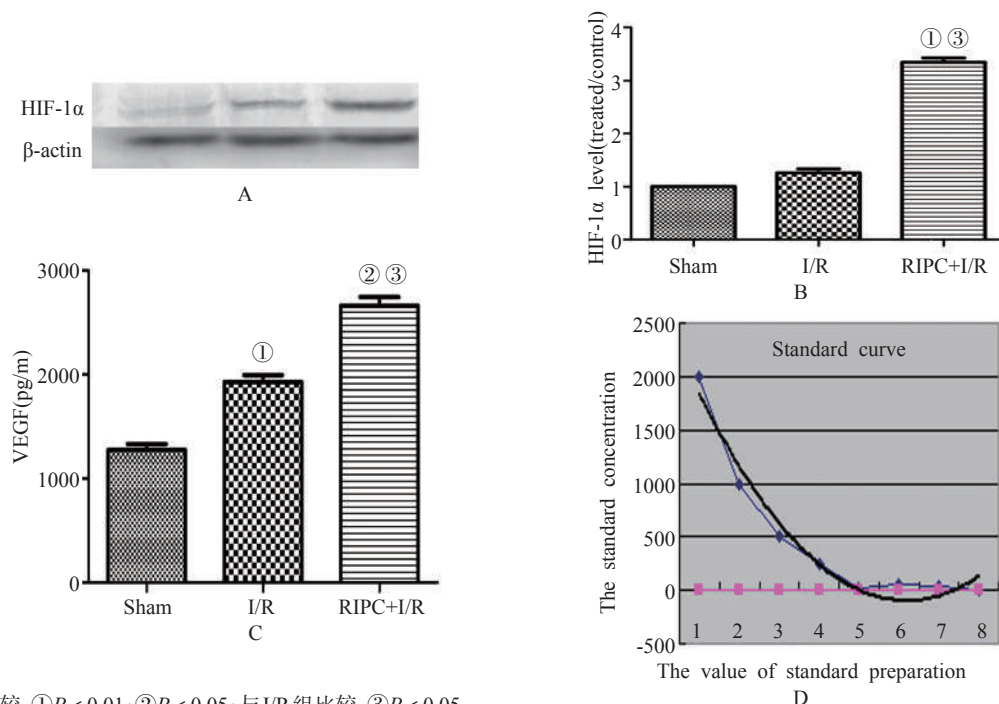


图3 HIF-1 α 及外周血中 VEGF 的表达情况

与 Sham 组比较: ① $P < 0.01$; ② $P < 0.05$; 与 I/R 组比较: ③ $P < 0.05$

表1 缺血骨骼肌 HIF-1 α 及外周血中 VEGF 的表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1 α (fold increase)	VEGF(pg/ml)
Sham 组	1.00 $\pm$ 0.00	1277.00 $\pm$ 57.36
I/R 组	1.26 $\pm$ 0.07	1931.00 $\pm$ 65.92 ^②
骨骼肌缺血+I/R 组	3.35 $\pm$ 0.08 ^{②③}	2665.00 $\pm$ 82.50 ^{①③}

与 Sham 组比较: ① $P < 0.01$; ② $P < 0.05$; 与 I/R 组比较: ③ $P < 0.05$

3 讨论

前期关于生理性缺血训练促进缺血心肌侧支循环的研究发现, 心肌缺血刺激不仅使心肌 VEGF 表达增高, 同时也使邻近组织和远隔组织的表达增加^[13-14], 提示缺血刺激不仅导致局部组织 VEGF 增加和血管储备改善, 也可导致远隔组织 VEGF 表达。此外, 另有研究发现骨骼肌生理性缺血训练后 VEGF 的表达显著高于单纯心肌缺血, 表明生理性缺血训练对 VEGF 的表达有超越心肌缺血刺激的独立作用, 提示生理性缺血训练对于远隔的病理性缺血组织侧支循环的形成有远隔效应^[2]。这些研究表明, 生理性缺血训练通过促进缺血组织和远隔组织 VEGF 的表达与释放入外周血, 从而促进缺血组织侧支循环血管的形成, 对缺血组织或器官的循环再

建和功能康复具有重要意义。

然而, 生理性缺血训练促进缺血组织和远隔组织 VEGF 的表达与释放的机制复杂且不明确。因此本研究拟在兔骨骼肌可控性缺血模型和心肌缺血再灌注模型(I/R)的基础上, 探讨外周血中 VEGF 水平升高的上游调控机制。在本研究中我们成功构建了远端缺血预处理(remote ischemic preconditioning, RIPC)模型, 彩超检查显示兔右后腿结扎后的股动脉无血流通; 也成功构建了 I/R 模型, 心电图检测显示兔心脏冠脉左前降支结扎后 ST 段弓背抬高且超过基线水平; 且实验模型兔能良好存活, 为后期研究提供了可靠保障。

有研究发现, 正常的心室组织中 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 无表达, 而在急性缺血期或心肌梗死进展期标本中均可检测到 HIF-1 α 、VEGF mRNA 的表达, 且 HIF-1 α 表达出现在 VEGF 之前^[15]。因此认为 HIF-1 α 是心肌缺血后一系列分子反应的启动因子之一。HIF-1 α 可通过诱导 VEGF 表达来促进心肌层冠脉血管的再生, 增加缺血、缺氧处心肌的冠脉血流量以及心肌的氧供^[16-17]。为了验证兔骨骼肌可控性缺血促进缺血骨骼肌 HIF-1 α 的表达, 进而调控缺血

组织和远隔组织 VEGF 的表达与释放入外周血中,促进缺血/再灌注心脏侧支循环形成和心肌损伤修复。本研究收集实验模型兔的骨骼肌和外周血,检测缺血骨骼肌 HIF-1 α 的表达和外周血中 VEGF 水平。

我们的研究发现,骨骼肌生理性缺血诱导其局部 HIF-1 α 表达上调,IPC+IR 组与 Sham 组及 I/R 组相比较有显著性差异;而 I/R 组与 Sham 组相比较,远处肢体骨骼肌 HIF-1 α 的表达有略微上升趋势,在统计上无显著性差异,其原因可能与心肌缺血引起的全身应激反应有关,导致远隔组织的 HIF-1 α 等与缺血缺氧后循环重建相关的因子表达增加,但其增加表达量有限,不足以达到骨骼肌生理性缺血诱导其表达上调的水平。与 HIF-1 α 表达相对应的是骨骼肌缺血+I/R 组、I/R 组外周血中 VEGF 水平显著高于 Sham 组,且 IPC+I/R 组明显高于 I/R 组。以上研究结果显示,骨骼肌生理性缺血可导致局部 HIF-1 α 的高表达,同时对应着外周血 VEGF 水平升高,且较单纯心肌缺血的外周血 VEGF 水平更高。

因此,本研究初步证实了远隔骨骼肌生理性缺血可以促进缺血骨骼肌 HIF-1 α 的表达,并调控下游 VEGF 的表达与释放入外周血中,进而促进缺血组织或器官新生血管的形成。

此外,更详细的作用途径和信号传导通路机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Zheng Y, Lu X, Li J, et al. Impact of remote physiological ischemic training on vascular endothelial growth factor, endothelial progenitor cells and coronary angiogenesis after myocardial ischemia[J]. *Int J Cardiol*, 2014, 177(3):894—901.
- [2] 张庆沙,陆晓,郑瑜.生理性缺血训练促进远隔缺血心肌侧支生成中内皮祖细胞的作用[J].*中国康复医学杂志*,2014,129(6):511—516.
- [3] 苏娟,励建安,沈梅,等.生理性缺血训练促进心肌缺血模型 VEGF 表达的时间规律[J].*康复医学杂志*,2008,23(9):774—776.
- [4] Lin A, Li J, Zhao Y, et al. Effect of physiologic ischemic training on protection of myocardial infarction in rabbits[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2011, 90(2):97—105.
- [5] Wan C, Li J, Yi L. Enhancement of homing capability of endothelial progenitor cells to ischaemic myocardium through physiological ischaemia training[J]. *J Rehabil Med*, 2011, 43(6):550—555.
- [6] Cai Z, Manalo DJ, Wei G, et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury[J]. *Circulation*, 2003, 108(1):79—85.
- [7] Zhang K, Lu J, Mori T, et al. Baicalin increases VEGF expression and angiogenesis by activating the ERK1/2/PGC-1 α pathway[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89(2):426—435.
- [8] Morgan JB, Liu Y, Coothankandaswamy V, et al. Kalkitoxin inhibits angiogenesis, disrupts cellular hypoxic signaling, and blocks mitochondrial electron transport in tumor cells[J]. *Mar Drugs*, 2015, 13(3):1552—1568.
- [9] Tang N, Wang L, Esko J, et al. Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis[J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(5):485—495.
- [10] Lee S, Chen TT, Barber CL, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis[J]. *Cell*, 2007, 130(4):691—703.
- [11] Alig SK, Stampnik Y, Pircher J, et al. The tyrosine phosphatase SHP-1 regulates hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein levels in endothelial cells under hypoxia[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0121113.
- [12] Kharbada RK, Mortensen UM, White PA, et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo[J]. *Circulation*, 2002, 106(23):2881—2883.
- [13] Kumar R, Harris-Hooker S, Kumar R, et al. Correction: co-culture of retinal and endothelial cells results in the modulation of genes critical to retinal neovascularization[J]. *Vasc Cell*, 2012, (4):6.
- [14] 刘元标,励建安,路鹏,等.家兔短暂心肌缺血后 VEGF 蛋白表达的空间规律[J].*中国康复医学杂志*,2004,19(6):422—425.
- [15] Lee SH, Wolf PL, Escudero R, et al. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction[J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(9):626—633.
- [16] Tillmanns J, Rota M, Hosoda T, et al. Formation of large coronary arteries by cardiac progenitor cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(5):1668—1673.
- [17] Liou JY, Shyu KG, Lu MJ, et al. Pericardial fluid and serum levels of vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with or without coronary artery disease[J]. *J Formos Med Assoc*, 2006, 105(5):377—383.