

# 缺氧诱导因子 1 $\alpha$ 对缺氧条件下大鼠心肌细胞糖酵解的影响

党永明 黄跃生 周军利 张家平 颜洪 张铭

**【摘要】** 目的 观察缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )对缺氧状态下大鼠心肌细胞糖酵解的影响。  
**方法** 常规分离、培养大鼠心肌细胞,分为单纯缺氧组:使用无糖培养基在低氧混合气体(体积分数 94% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、1% O<sub>2</sub>)中培养;HIF-1 $\alpha$ 抑制组:先利用 RNA 干扰技术构建 HIF-1 $\alpha$  蛋白低表达的细胞模型,再作上述缺氧培养。两组细胞均设缺氧前(常规培养)及缺氧 1、3、6、12、24 h 6 个时相点,采用生物化学方法检测细胞中糖酵解关键酶己糖激酶(HK)、磷酸果糖激酶(PFK)、乳酸脱氢酶(LDH)的活性以及培养上清液中乳酸(LA)的含量。  
**结果** (1) HK、PFK 活性:与缺氧前比较,两组心肌细胞两酶活性均呈先升高后下降的变化趋势。单纯缺氧组两酶活性峰值分别为(159 ± 13)、(298 ± 44) U/g。HIF-1 $\alpha$ 抑制组两酶活性在缺氧 1、3、6 h 时均明显低于单纯缺氧组(P < 0.05 或 0.01),其峰值分别为(133 ± 55)、(188 ± 55) U/g。(2) LDH 活性、LA 含量:与缺氧前(92 ± 12) U/g 比较,单纯缺氧组细胞 LDH 活性缺氧后显著升高,6 h 时达高峰(2 568 ± 125) U/g(P < 0.01),随后逐渐下降;各时相点培养上清液中 LA 含量也成倍增加。HIF-1 $\alpha$ 抑制组细胞的 LDH 活性于缺氧 3 h 时达峰值(2 125 ± 126) U/g,明显高于缺氧前(P < 0.01);培养上清液中 LA 含量亦较缺氧前增高(P < 0.01),但增幅较小。  
**结论** 缺氧条件下大鼠心肌细胞中 HIF-1 $\alpha$  高表达是细胞糖酵解持续增强的直接原因,此为心肌细胞应对缺氧环境的重要内源性保护机制。

**【关键词】** 缺氧; 心肌; 糖酵解; RNA 干扰; 缺氧诱导因子 1 $\alpha$

**An experimental study on the influence of hypoxia induction factor-1 $\alpha$  on the glycolysis of the rat myocardial cell under hypoxic condition** DANG Yong-ming, HUANG Yue-sheng, ZHOU Jun-li, ZHANG Jia-ping, YAN Hong, ZHANG Ming. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China  
 Corresponding author: HUANG Yue-sheng, Email: yshuang@public.cta.ai.an, Tel: 023-68754173

**【Abstract】** **Objective** To investigate the influence of hypoxia induction factor-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ) on glycolysis of rat myocardial cell under hypoxic condition. **Methods** The myocardial cells of the rats were routinely isolated and cultured. The cells were divided into single hypoxia (H) and HIF-1 $\alpha$  inhibiting (I) groups. The cells in H group were cultured in glucose-free medium with mixed low-oxygen gas [1% O<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (v/v)]. While the cells in I group were cultured with low-oxygen gas after the cell model of low expression of HIF-1 $\alpha$  protein constructed by RNAi technique. The cells in both groups were all observed before hypoxia (routine culture) and at the time points of 1, 3, 6, 12 and 24 hours of hypoxia. The LA (lactate acid) content in the supernatant of the culture and the activity of the key enzymes in glycolysis such as hexokinase (HK), phosphofructokinase (PFK) and lactate dehydrogenase (LDH) of both groups of cells were determined at all the time points. **Results** (1) After hypoxia, the HK and PFK activities of the rat myocardial cells in H and I groups were obviously increased at the beginning and decreased thereafter when compared with that before hypoxia. While the activities of HK and PFK in H group at 1, 3 and 6 hours after hypoxia were evidently higher than those in I group (P < 0.05 or 0.01), and the peak activity of them in H and I groups was 159 ± 13 U/g vs 133 ± 55 U/g, and 298 ± 44 U/g vs 188 ± 55 U/g, respectively. (2) Compared with normal control (92 ± 12 U/g), the LDH activity of the cells in H group after hypoxia increased significantly, reaching the peak at 6 hours after hypoxia (2 568 ± 125 U/g, P < 0.01), and it decreased thereafter, while that in I group peaked at 3 hours after hypoxia (2 125 ± 126 U/g, P < 0.01). The LA content in the culture supernatant in H group increased significantly after hypoxia with the passage of time, while that in I group increased in smaller magnitude (P < 0.01). **Conclusion** High expression of HIF-1 $\alpha$  in the rat myocardial cells after hypoxia could directly cause continuous enhancement of cell glycolysis, which was beneficial to the protection of myocardial cells under hypoxic condition.

**【Key words】** Hypoxia; Myocardium; Glycolysis; RNA interference; Hypoxia induction factor-

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(30430680);国家杰出青年科学基金资助项目(30125040);国家重点基础研究发展规划资助项目(2005CB522601);创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放课题基金资助项目  
 作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室  
 通信(讯)作者:黄跃生,Email:yshuang@public.cta.cq.cn,电话:023-68754173

1 $\alpha$

缺血缺氧是严重烧伤后最基本的病理生理改变<sup>[1]</sup>,导致心肌细胞功能、组织氧利用及能量代谢出现障碍,是引发“休克心”的重要因素<sup>[2]</sup>。缺氧后心肌细胞内糖酵解功能加强,有效地改善了缺氧状态下的能量供应。缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia induction factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )是维持细胞和全身氧稳态的重要调节因子<sup>[3]</sup>,也是缺氧研究的重点<sup>[4]</sup>,它可能在严重烧伤后心肌细胞对缺血缺氧的反应中起关键作用,而其具体的作用及其机制尚未明了。笔者以往观察到,严重烫伤大鼠心肌组织 HIF-1 $\alpha$  mRNA 及其蛋白表达水平均显著增高<sup>[5]</sup>;另有报道称 HIF-1 $\alpha$ 能调控糖酵解关键酶基因的表达<sup>[6]</sup>,故笔者推测缺氧后 HIF-1 $\alpha$  表达量增加可能与糖酵解增强有关。本实验中笔者运用 RNA 干扰(RNA interference)技术<sup>[7]</sup>,建立缺氧条件下大鼠心肌细胞 HIF-1 $\alpha$  蛋白低表达模型,进而探讨缺氧对心肌细胞糖酵解的影响。

材 料 与 方 法

1. 主要试剂与仪器:无糖及含糖 DMEM/F12 培养基、标准胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;5-溴-2-尿嘧啶脱氧核苷 (BrdU) 购自美国 Sigma 公司;Line Silence<sup>TM</sup> RNA 干扰试剂盒购自美国绿阳公司;还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、醛缩酶、磷酸甘油脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸果糖、磷酸烯醇式丙酮酸环己胺盐、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na) 均购自美国 Sigma 公司;D<sup>+</sup>葡萄糖、丙酮酸钠、腺苷二磷酸 (ADP)、腺苷三磷酸 (ATP)、氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>) 购自美国 Ameresco 公司;乳酸 (LA) 及乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒为南京建成生物工程公司产品。RIPA 细胞裂解液<sup>[8]</sup>为自行配制。DU27 型紫外分光光度计为美国 Beckman 公司产品。

2. 心肌细胞原代分离、培养:选用出生后 1~2 d 的 SD 大鼠(第三军医大学实验动物中心) 48 只,参照文献<sup>[7]</sup>分离心肌细胞,接种、培养于 24 孔培养板中。

3. 实验分组及 RNA 干扰模型的构建:将心肌细胞分为单纯缺氧组、HIF-1 $\alpha$  抑制组。(1)单纯缺氧组细胞设缺氧前(常规培养)及缺氧 1、3、6、12、24 h 6 个时相点,每时相点 5 孔。缺氧条件为:改用无糖 DMEM/F12 培养基,置于 37℃、体积分数 94% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、1% O<sub>2</sub> 环境中培养<sup>[7]</sup>。(2)HIF-1 $\alpha$  抑制组

细胞先参照文献<sup>[9]</sup>构建 RNA 干扰模型:按 Line Silence<sup>TM</sup> RNA 干扰试剂盒说明书操作,通过筛选特异性有效降解 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 并将其大量人工合成后,用于转染 HIF-1 $\alpha$  抑制组心肌细胞。随后筛选转染成功的细胞,同上设缺氧前及缺氧后各时相点并作相同处理。

4. 糖酵解关键酶活性的检测:取缺氧前及各缺氧时相点的两组心肌细胞,常规消化。调整细胞密度为 3 × 10<sup>6</sup>/ml,加入预冷的 RIPA 细胞裂解液,重新悬浮细胞。冰浴 15 min, 4℃, 13 200 × g 离心 30 min。取上清,(1)参照杜传书等<sup>[10]</sup>的方法检测己糖激酶 (HK) 的活性;(2)磷酸果糖激酶 (PFK) 活性的检测按 Kemerer 等<sup>[11]</sup>的方法进行;(3)采用常规比色法,按试剂盒说明书测定 LDH 的活性。

5. LA 含量的检测:收集各组细胞各时相点的培养上清液,以常规比色法测定。

6. 统计学处理:结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 10.0 统计软件包进行单因素方差分析。

结 果

1. 心肌细胞 HK 活性的变化:与缺氧前相比,给予缺氧处理后,单纯缺氧组心肌细胞内 HK 活性立即显著升高,缺氧 1 h 达高峰 ( $P < 0.01$ ), 3、6 h 变化不大, 12、24 h 大幅下降但仍然高于缺氧前 ( $P < 0.05$ )。HIF-1 $\alpha$  抑制组细胞 HK 活性也于缺氧 1 h 达高峰 ( $P < 0.01$ ),但增高幅度较低,此后逐渐下降, 1、3、6、24 h 均明显低于单纯缺氧组 ( $P < 0.05$  或 0.01)。见表 1。

表 1 两组心肌细胞 HK 活性的变化 (U/g,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Changes in HK activity in rat myocardiocyte in the two groups before and after hypoxia (U/g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	孔数	缺氧前	缺氧时间 (h)				
			1	3	6	12	24
单纯缺氧组	30	50	159	139	143	79	82
		$\pm 31$	$\pm 13^*$	$\pm 44^*$	$\pm 20^*$	$\pm 12^\Delta$	$\pm 21^\Delta$
HIF-1 $\alpha$ 抑制组	30	54	133	86	63	65	35
		$\pm 14$	$\pm 55^{**}$	$\pm 25^{**}$	$\pm 11^*$	$\pm 13$	$\pm 10^{*\Delta}$

注:与单纯缺氧组比较, \*  $P < 0.05$ , #  $P < 0.01$ ; 与组内缺氧前比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\star P < 0.01$

2. 心肌细胞 PFK 活性的变化:缺氧 1、3 h,单纯缺氧组心肌细胞 PFK 活性约为缺氧前的 3 倍 ( $P < 0.01$ );缺氧 6~24 h 逐渐下降。与之相比, HIF-1 $\alpha$  抑制组 PFK 活性在各缺氧时相点均较低,其中缺氧

1~12 h 时差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 两组心肌细胞 PFK 活性的变化  
(U/g,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Changes in PFK activity in rat myocardiocyte in the two groups before and after hypoxia (U/g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	孔数 (个)	缺氧 前	缺氧时间(h)				
			1	3	6	12	24
单纯缺氧组	30	102	269	298	256	133	90
		$\pm 31$	$\pm 13^\Delta$	$\pm 44^\Delta$	$\pm 20$	$\pm 12$	$\pm 21$
HIF-1 $\alpha$ 抑制组	30	89	188	157	98	65	75
		$\pm 14$	$\pm 55^{*\Delta}$	$\pm 25^{**}$	$\pm 11^*$	$\pm 13^*$	$\pm 10$

注:与单纯缺氧组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与组内缺氧前比较, #  $P < 0.05$ ,  $\Delta P < 0.01$

3. 心肌细胞 LDH 活性及细胞培养上清液中 LA 含量的变化:单纯缺氧组心肌细胞缺氧 1 h 时, LDH 活性即显著高于缺氧前, 缺氧 6 h 时达到高峰, 随后逐渐下降但仍显著高于缺氧前 ( $P < 0.01$ ); 其培养液中 LA 的含量也随缺氧时间的延长而大幅增加 ( $P < 0.01$ )。HIF-1 $\alpha$  抑制组心肌细胞 LDH 活性在缺氧 3 h 时达峰值, 其后逐渐下降, 12、24 h 接近单纯缺氧组水平 ( $P > 0.05$ ); 与单纯缺氧组相比, 其培养液中 LA 的含量增高幅度较小, 缺氧 3~24 h 时差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。见表 3、4。

表 3 两组心肌细胞 LDH 活性的变化  
(U/g,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 3 Changes in LDH activity in rat myocardiocyte in the two groups before and after hypoxia (U/g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	孔数 (个)	缺氧 前	缺氧时间(h)				
			1	3	6	12	24
单纯缺氧组	30	92	599	1 488	2 568	1 364	1 149
		$\pm 12$	$\pm 35^*$	$\pm 106^*$	$\pm 125^*$	$\pm 99^*$	$\pm 89^*$
HIF-1 $\alpha$ 抑制组	30	12	754	2 125	1 622	1 298	978
		$\pm 10$	$\pm 28^*$	$\pm 126^{**}$	$\pm 95^{**}$	$\pm 69^*$	$\pm 129^*$

注:与单纯缺氧组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与组内缺氧前比较, #  $P < 0.01$

表 4 两组心肌细胞培养上清液中 LA 含量的变化  
( $\mu\text{mol/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 4 Changes in LA content in culture supernatant in the two groups before and after hypoxia ( $\mu\text{mol/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数 (个)	缺氧 前	缺氧时间(h)				
			1	3	6	12	24
单纯 缺氧组	30	0.64	2.35	6.02	12.03	25.24	36.58
		$\pm 0.11$	$\pm 0.24^\Delta$	$\pm 0.89^\Delta$	$\pm 3.01^\Delta$	$\pm 10.25^\Delta$	$\pm 5.54^\Delta$
HIF-1 $\alpha$ 抑制组	30	0.56	1.21	3.28	8.24	16.97	25.8
		$\pm 0.13$	$\pm 0.75$	$\pm 0.65^{*\Delta}$	$\pm 2.38^{*\Delta}$	$\pm 6.39^{*\Delta}$	$\pm 6.99^{*\Delta}$

注:与单纯缺氧组比较, \*  $P < 0.05$ , #  $P < 0.01$ ; 与组内缺氧前比较,  $\Delta P < 0.01$

## 讨 论

在氧供充分的正常生理情况下, 葡萄糖在多数细胞内经有氧化及氧化磷酸化生成大量 ATP。ATP 通过 ATP/ADP 易位酶的作用, 由线粒体释放出, 扩散进入利用能量的部位, 高能磷酸键被 ATP

酶水解, 导致能量大量释放, 同时生成 ADP、无机磷酸和  $H^+$ 。当氧和底物供给充分时, ATP 的水解产物 ADP、无机磷酸和  $H^+$  重新进入线粒体, 生成 ATP 和  $CO_2$ 。当氧供受限时, 细胞会利用葡萄糖供能, 此时每消耗 1 mol 氧所产生的 ATP 比利用其他底物产生的 ATP 多, 即缺氧细胞以葡萄糖作为底物可更有效地利用氧<sup>[3,4]</sup>。糖酵解的 3 个限速酶 HK、PFK、丙酮酸激酶(PK)所催化的不可逆反应, 是糖酵解过程中的主要环节。HIF-1 $\alpha$  下游靶基因中有一类是糖酵解关键酶(如 HK、PFK、PK、LDH 等)基因。

本研究结果显示, 缺氧初期, 单纯缺氧组心肌细胞 HK、PFK、LDH 活性均增高, 其培养上清液中糖酵解终产物 LA 含量增加; 且各指标的变化与缺氧时间密切相关。这表明缺氧可启动糖酵解, 这种作用与对酶活性的别构调节以及酶蛋白含量的增加有关, 提示烧伤后缺血缺氧引起的糖代谢的重要改变之一即是糖酵解途径被激活, 成为能量的主要来源。

RNA 干扰是一种在转录水平上进行的特异性基因阻断技术, 指 dsRNA 分子在 mRNA 水平上关闭相应序列基因的表达或使其沉默的过程。笔者以往的研究表明, 严重烧伤后心肌组织、细胞内 HIF-1 $\alpha$  表达增强<sup>[5]</sup>。本研究中, 笔者应用 RNA 干扰技术抑制大鼠心肌细胞表达 HIF-1 $\alpha$ , 然后给予缺氧刺激, 结果显示, HIF-1 $\alpha$  抑制组心肌细胞糖酵解受到了一定程度的抑制。由此表明 HIF-1 $\alpha$  在缺氧后糖酵解加强过程中起关键作用。其机制可能为: 低氧分压使 HIF-1 $\alpha$  降解减少, 其蛋白水平增加, 活性增强, 进入细胞核后活化, 启动下游 HK、PFK、LDH、PK 等糖酵解关键酶基因的表达, 从而增加了上述关键酶的生物活性, 使得糖酵解供能加强, 细胞得以维持生存。这也是 HIF-1 $\alpha$  调节缺氧心肌能量代谢的主要方式, 可见 HIF-1 $\alpha$  具有细胞保护作用。

在严重缺氧条件下, 细胞能量缺乏, 可利用无氧酵解(糖酵解)产生能量。但这是一种低效的产能方式, 仅能在有限的时间内维持细胞存活, 其不利影响是酸性代谢产物(尤其是 LA)增多, 导致酸中毒, 进而损伤细胞结构和功能。加强糖酵解所能提供的能量是暂时的、有限的, 持续、过度的糖酵解会使细胞严重受损甚至死亡。但在缺氧条件下, 如果没有糖酵解参与能量供应, 细胞将提前走向死亡。所以, 在严重烧伤后心肌细胞因缺氧而出现能量供应障碍时, 只有加强糖酵解快速供能, 在赢得宝贵治疗时间的同时结合其他调理措施, 如积极抗休克、改善心肌氧供、恢复血流灌注量、减少 LA 堆积等, 才能达到



保护心脏的目的。

参 考 文 献

- 黎鳌,主编. 烧伤治疗学. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,1995. 83 - 125.
- 黄跃生. 重视缺血缺氧与细胞因子在“休克心”发生机制中的作用. 中华烧伤杂志,2002,18:261 - 262.
- Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. J Appl Physiol, 2000, 88: 1474 - 1480.
- Amato G, Bronwyn GS, Randall SJ. HIF-1 as a target for drug development. Nat Rev Drug Discov, 2003,2:803 - 811.
- 党永明,黄跃生,陈丽峰. 大鼠重度烫伤后早期心肌组织内缺氧诱导因子-1 $\alpha$  表达的变化. 中华烧伤杂志,2003,19:263 - 266.
- Tammy MC, Julian L. Hypoxia causes downregulation of protein and RNA synthesis in noncontracting mammalian cardiomyocytes. Circul

- Res, 2002,90:777 - 783.
- 李晓东,黄跃生,张家平. 机械牵张对缺血缺氧心肌细胞肌球蛋白重链 mRNA 表达的影响. 中华烧伤杂志,2004,20:138 - 140.
- Frederick MA, Roger B, Robert EK, 等,主编. 颜子颖,王海林,译. 精编分子生物学实验指南. 北京:科学出版社,1998. 793.
- 党永明,黄跃生,杨宗城,等. 双链小片段干扰 RNA 抑制缺氧条件下小鼠心肌细胞缺氧诱导因子 1 $\alpha$  表达. 中华烧伤杂志, 2004,20:278 - 280.
- 杜传书,陈路明. 红细胞酶测定法及中国人正常值 X. 己糖激酶. 遗传与疾病,1987,4:200 - 202.
- Kemerer VR, Griffin CC, Brand L. Phosphofructokinase from Escherichia coli. Meth Enzymol,1975,42:91 - 98.

(收稿日期:2005 - 05 - 26)  
(本文编辑:罗 勤)

· 技术与方法 ·

鼓式切皮机固定台架的制作

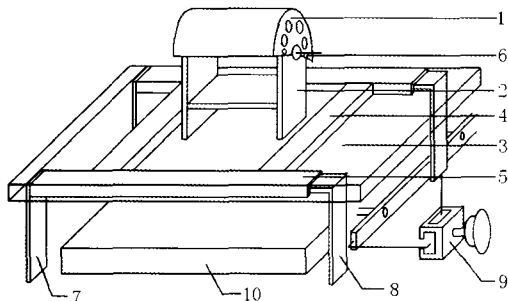
吴学田 张林清 李晓巧 赵学芳

在以往使用鼓式切皮机(又称取皮鼓)制作整张异体(种)皮时,操作者必须左手握持皮鼓手柄,右手行取皮操作<sup>[1]</sup>。由于双手同时反向用力,皮鼓不易固定,皮片容易切破或切取厚度不均匀;操作时劳动强度大,操作者容易疲劳,而且比较费时。为此,笔者针对以往制作大张移植皮过程的不足,研制出一种将取皮鼓固定在手术台上进行取皮的台架。经临床应用,切取异种皮 30 例次,效果满意。现介绍如下。

制作方法:鼓式切皮机固定台架的基本结构见图 1,其部件均采用不锈钢材料制作(图 2)。



图 2 鼓式切皮机固定台架实物图



注: 1. 鼓式切皮机; 2. 支撑架; 3. 操作平台; 4. 底部支撑架; 5. 宽度调节装置; 6. 固定螺丝孔; 7. 固定式连接杆; 8. 可调节连接杆; 9. 手术台连接件; 10. 手术台

图 1 鼓式切皮机固定台架基本结构示意图

操作方法:在皮鼓两个端面的 4 个角处钻直径为 5 mm 的连接孔,用螺丝将其连接固定于支撑架的上端;操作平台底面有 4 个手术台连接杆,其中右侧的两个连接杆可以在一定范围内水平伸缩,可以与不同宽度的手术台配套使用,调整到合适的宽度后以连接件固定,即可进行取皮操作。取皮鼓和固定台架可整体消毒,也可拆卸后单独消毒。

讨论 笔者研制的鼓式切皮机固定台架,从根本上解决了手持式皮鼓取皮固定不好的问题。其优点有:(1)皮鼓固定可靠,不易割破皮片,且切取皮片厚度均匀,提高了取皮质量。(2)减轻了操作者的劳动强度,可以节约 1 倍以上的手术时间,提高工作效率。(3)适用于皮肤软组织完全性撕脱伤时的中厚皮切取。(4)制作成本低廉,实用性强。

参 考 文 献

- 孙永华,孙迎放,主编. 现代烧伤治疗与手术图谱. 北京:人民军医出版社,2003. 143.

(收稿日期:2004 - 12 - 29)  
(本文编辑:苟学萍)

作者单位:261041 潍坊市人民医院烧伤科