

· 论 著 ·

缺氧对肠上皮细胞缺氧诱导因子 1 α 活化影响的实验研究

李牧 王裴 刘琛 陈传莉 王凤君



【摘要】 目的 了解缺氧对肠上皮细胞缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)活化的影响。 **方法** 将肠上皮细胞分为常氧处理(正常对照)、缺氧(设缺氧 1、2、6、12、24 h)及缺氧+寡霉素处理(分别用浓度为 5、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 寡霉素处理 1 h,再缺氧 6 h)。采用蛋白质印迹法检测 HIF-1 α 蛋白表达,免疫荧光法观察 HIF-1 α 向细胞核转位的情况。 **结果** 与正常对照(0.08 \pm 0.07)相比较,缺氧 1 h 肠上皮细胞 HIF-1 α 蛋白表达(0.52 \pm 0.30)即显著升高($P < 0.05$),6 h 达峰值(2.37 \pm 1.08, $P < 0.05$),同时 HIF-1 α 向细胞核转位也明显增加。寡霉素呈剂量依赖性地抑制缺氧引起的肠上皮细胞 HIF-1 α 蛋白表达增加,用 5、10、20 及 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 寡霉素处理的缺氧肠上皮细胞 HIF-1 α 蛋白表达量分别为 1.62 \pm 0.96、1.48 \pm 0.56、1.08 \pm 0.36 及 0.58 \pm 0.11,均较单纯缺氧 6 h(2.67 \pm 1.38)显著降低($P < 0.05$),HIF-1 α 向细胞核转位也被抑制。 **结论** 呼吸链抑制剂寡霉素可抑制缺氧肠上皮细胞 HIF-1 α 活化,线粒体呼吸链可能在其发生机制中具有重要作用。

【关键词】 缺氧; 寡霉素类; 缺氧诱导因子 1 α ; 肠上皮细胞

Effect of hypoxia on hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) activation in intestinal epithelial cells LI Mu, WANG Pei, LIU Chen, CHEN Chuan-li, WANG Feng-jun. 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: WANG Feng-jun, Email: wangfj@mail.tmmu.com.cn, Tel: 023-68754176

【Abstract】 Objective To investigate the effect of hypoxia on HIF-1 α activation in intestinal epithelial cells. **Methods** Intestinal epithelial cells were randomly divided into normal control group, hypoxia group and hypoxia plus oligomycin group (oligomycin group). In hypoxia group, the cells were exposed to hypoxia for 1, 2, 6, 12 and 24 h. In oligomycin group, the cells were treated with oligomycin in concentration of 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 1 h prior to 6-hour hypoxic exposure. HIF-1 α protein expression was assayed by western blot method. Nuclear translocation of HIF-1 α was detected by immunofluorescence analysis. **Results** Compared with that in control group(0.08 \pm 0.07), HIF-1 α protein expression in hypoxia group increased significantly at 1 h (0.52 \pm 0.30, $P < 0.05$), and reached the peak value (2.37 \pm 1.08, $P < 0.05$) at 6 h. Nuclear translocation of HIF-1 α was also induced by hypoxia. HIF-1 α protein expression in oligomycin group in the concentration of 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of oligomycin was 1.62 \pm 0.96, 1.48 \pm 0.56, 1.08 \pm 0.36 and 0.58 \pm 0.11 respectively, which was significantly lower than that only after exposure to hypoxia for 6 h (2.67 \pm 1.38, $P < 0.05$). The nuclear translocation of HIF-1 α induced by hypoxia was also obviously inhibited by oligomycin pretreatment. **Conclusion** Oligomycin, a specific inhibitor of respiratory chain, inhibits HIF-1 α activation, which suggests that mitochondria respiratory chain may play an important role in aforementioned process.

【Key words】 Hypoxia; Oligomycins; Hypoxia-inducible factor1 α ; Intestinal epithelial cells

缺氧诱导因子 1 (HIF-1)通过调控与缺氧反应相关的靶基因转录,在机体缺氧反应中起重要作用。严重烧伤后早期缺血缺氧时 HIF-1 α mRNA 及蛋白水平升高,并对缺血缺氧时细胞能量代谢及葡萄糖

转运具有重要调控作用^[1-3]。本文旨在了解缺氧对肠上皮细胞 HIF-1 α 蛋白表达及其细胞核转位的影响,探讨缺氧肠上皮细胞 HIF-1 α 活化的发生机制。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

人肠上皮细胞株 HT29 由第三军医大学复合伤研究所赠送,缺氧培养箱购自美国 Billups-Rothernberg 公司,DMEM 培养基及胰蛋白酶分别购自美国 Gibco 和 BBI 公司,寡霉素购自美国 ALEXIS 公司,

基金项目:国家自然科学基金(30571923、30670952);教育部留学回国人员启动基金(2006-331)

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

通讯作者:王凤君,Email:wangfj@mail.tmmu.com.cn,电话:023-68754176

抗人 HIF-1 α 抗体购自美国 Upstate 公司, 得克萨斯红标记二抗由美国 Calbiochem 公司提供, Slowfade 试剂盒购自美国 Molecular Probes 公司, 鼠尾胶原、4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 及抗 β 肌动蛋白抗体为美国 Sigma 公司产品, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗为美国 Southern Biotech 公司产品, 增强型化学发光检测试剂盒购自美国 Pierce 公司, 蛋白测定试剂盒、小型垂直电泳仪、电转仪及 ChemiDoc XRS 型凝胶图像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司, 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜购自美国 MILIPORE 公司。蛋白质印迹相关试剂甘氨酸、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、四甲基乙二胺、Tris 购自上海生工生物工程技术有限公司。TCS SPS 型激光共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、分组与处理

细胞采用 DMEM 培养液常规培养, 以 3.5×10^5 个/孔接种至 6 孔板, 或接种于置有盖玻片 (以 1 g/L 鼠尾胶原预先包被) 的 12 孔板。细胞分别进行常氧处理 (正常对照)、缺氧处理 (缺氧时间分别为 1、2、6、12 及 24 h) 以及缺氧 6 h + 寡霉素处理 (缺氧前 1 h 分别加入浓度为 5、10、20 及 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的寡霉素, 再缺氧 6 h)。缺氧时将细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中, 持续通入含体积分数 1% O_2 、5% CO_2 及 94% N_2 混合气体 (重庆朝阳气体厂) 培养。

1.2.2 肠上皮细胞 HIF-1 α 蛋白表达的检测

采用本室常规蛋白质印迹法^[4], 以冷磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗细胞, 加入上样缓冲液裂解细胞并超声破碎, 12 000 $\times g$ 离心 5 min。用蛋白测定试剂盒测定上清液蛋白含量后, 进行 75 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳并转移至 PVDF 膜。以 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入抗人 HIF-1 α 抗体 (抗体稀释度 1:1000) 或 β 肌动蛋白抗体 (抗体稀释度 1:5000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (TBST) 洗膜 4 次后加入 HRP 标记二抗 (抗体稀释度 1:5000), 室温孵育 1 h。TBST 洗膜 4 次, 加入化学发光液, 采用图像分析系统采集发光信号, 经 Quantity One 软件行密度分析, 以 HIF-1 α 与内参照 β 肌动蛋白吸光度比值作为目的蛋白的表达量。

1.2.3 肠上皮细胞 HIF-1 α 核转位的检测

根据上述研究结果, 选择引起缺氧肠上皮细胞 HIF-1 α 蛋白表达最低的 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 寡霉素进行此项实验。采用免疫荧光法, 用预冷 PBS (含 1 mmol/L CaCl_2) 漂洗生长于盖玻片的细胞, 10 g/L 多聚甲醛固定 30

min, PBS 漂洗 5 min, 加入含 50 mmol/L NH_4Cl 的 PBS, 室温孵育 15 min。PBS 漂洗后加入含 25 g/L 牛血清白蛋白 (BSA)、1 g/L Triton X-100 的 PBS, 室温孵育 15 min。加入抗人 HIF-1 α 抗体 50 μL (抗体稀释度 1:200), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 漂洗 3 min 并重复 4 次, 加入 50 μL 含 DAPI (稀释度 1:2000) 的得克萨斯红标记二抗 (抗体稀释度 1:50), 室温孵育 1 h。PBS 漂洗 3 min 重复 4 次, 在洁净载玻片上滴加适量 Slowfade 液, 将盖玻片有细胞面向下浸在 Slowfade 液中, 封片。用激光共聚焦显微镜观察照相。

1.3 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件, 多组间比较采用 one-way ANOVA 分析, 两两比较采用 t 检验。相关分析采用线性回归分析。

2 结果

2.1 缺氧引起肠上皮细胞 HIF-1 α 蛋白表达增加

正常对照的肠上皮细胞 HIF-1 α 蛋白水平极低 (0.08 ± 0.07)。缺氧 1 h 表达立即增加 (0.52 ± 0.30), 明显高于正常对照 ($P < 0.05$); 缺氧 6 h 达高峰 (2.37 ± 1.08 , $P < 0.05$)。随后 HIF-1 α 蛋白表达虽有所降低, 但缺氧 24 h (1.71 ± 0.52) 仍明显高于正常对照 ($P < 0.05$)。见图 1。

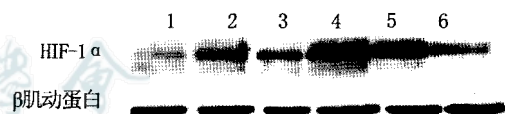


图 1 缺氧引起肠上皮细胞缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 蛋白表达增加。1. 正常对照 (常氧处理); 2. 缺氧 1 h; 3. 缺氧 2 h; 4. 缺氧 6 h; 5. 缺氧 12 h; 6. 缺氧 24 h

2.2 寡霉素抑制缺氧肠上皮细胞 HIF-1 α 蛋白表达

缺氧 6 h 肠上皮细胞 HIF-1 α 蛋白表达 (2.67 ± 1.38) 增加, 明显高于正常对照 (0.03 ± 0.03 , $P < 0.05$, 图 2)。用 5、10、20 及 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 寡霉素处理 1 h 后再缺氧 6 h, 肠上皮细胞 HIF-1 α 蛋白表达分别为 1.62 ± 0.96 、 1.48 ± 0.56 、 1.08 ± 0.36 及 0.58 ± 0.11 , 均显著低于单纯缺氧 6 h ($P < 0.05$)。寡霉素浓度与 HIF-1 α 蛋白水平呈显著负相关 ($r = -0.89$, $P < 0.01$), 随着寡霉素浓度的增加, HIF-1 α 蛋白水平逐渐降低。见图 3。

2.3 寡霉素抑制缺氧肠上皮细胞 HIF-1 α 核转位

正常肠上皮细胞核仅见极弱的 HIF-1 α 蛋白表达, 即 HIF-1 α 较少发生核转位; 缺氧 6 h 肠上皮细胞核 HIF-1 α 蛋白表达明显增加, 即缺氧明显引起肠

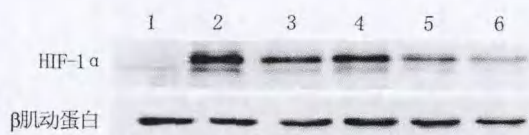


图 2 寡霉素抑制缺氧肠上皮细胞缺氧诱导因子 1α (HIF-1α) 蛋白表达。1. 正常对照 (常氧处理); 2. 缺氧 6 h; 3. 缺氧 6 h + 5 μg/mL 寡霉素处理; 4. 缺氧 6 h + 10 μg/mL 寡霉素处理; 5. 缺氧 6 h + 20 μg/mL 寡霉素处理; 6. 缺氧 6 h + 40 μg/mL 寡霉素处理

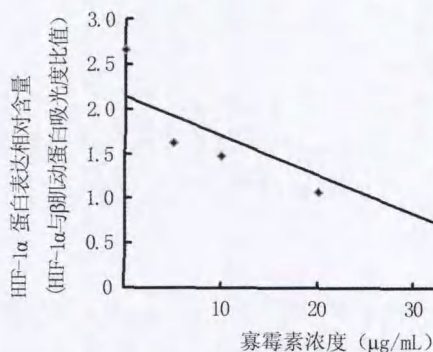


图 3 寡霉素与缺氧肠上皮细胞缺氧诱导因子 1α (HIF-1α) 蛋白表达的量效关系

上皮细胞 HIF-1α 向细胞核转位。以 40 μg/mL 寡霉素处理后再缺氧 6 h 的肠上皮细胞, 细胞核 HIF-1α 蛋白表达较单纯缺氧 6 h 时明显减少, 即寡霉素能明显抑制缺氧后肠上皮细胞 HIF-1α 向细胞核转位。见图 4。

3 讨论

机体对缺氧的适应性反应涉及多种分子机制, 许多调节因子参与缺氧病理生理过程的调节, HIF-1 在其中居关键地位, 是维持细胞内和全身氧稳态的重要转录因子。HIF-1 由 HIF-1α 及 HIF-1β 2 个亚基构成, 前者的表达受氧浓度调控而后者不受影响。因此, HIF-1α 亚基的表达和活性, 决定了 HIF-1 的生物学活性。缺氧时, 细胞 HIF-1α 蛋白稳定性增加, 转位进入细胞核, 与 HIF-1β 形成二聚体, 结合在靶基因调控序列的缺氧反应元件上, 诱导靶基因的表达, 这些靶基因的表达产物介导了机体对缺氧的一系列反应, 如糖酵解增强、红细胞生成及血管生成等^[5]。

本研究结果表明, 缺氧除引起肠上皮细胞 HIF-1α 蛋白水平明显升高外, 还诱导 HIF-1α 进入细胞核, 导致肠上皮细胞 HIF-1 活化。这与既往研究的结论^[1-3]是一致的, 即缺氧可使细胞 HIF-1α 发生明显活化。

缺氧引起 HIF-1α 活化的分子机制极其复杂, 线粒体在 HIF-1α 活化调控中可能具有重要作用^[6-7]。有研究表明, 线粒体呼吸链的电子传递是细胞缺氧时 HIF-1α 积聚所必需的^[6-7], 但也有研究持相反观点^[8]。缺氧肠上皮细胞 HIF-1α 的活化是否与线粒体呼吸链有关, 目前尚不清楚。为此, 在观察到缺氧诱导肠上皮细胞 HIF-1α 蛋白水平增加的基础上, 笔者又采用线粒体呼吸链抑制剂寡霉素来探讨缺氧引起肠上皮细胞 HIF-1α 活化机制。结果显示, 寡霉素不仅呈剂量依赖性地抑制缺氧肠上皮细胞 HIF-1α 蛋白水平升高, 还明显抑制它向细胞核转位。这些结果表明, 采用寡霉素阻断线粒体呼吸链能抑制缺氧引起的肠上皮细胞 HIF-1α 活化。提示线粒体呼吸链在缺氧肠上皮细胞 HIF-1α 活化中可能具有重

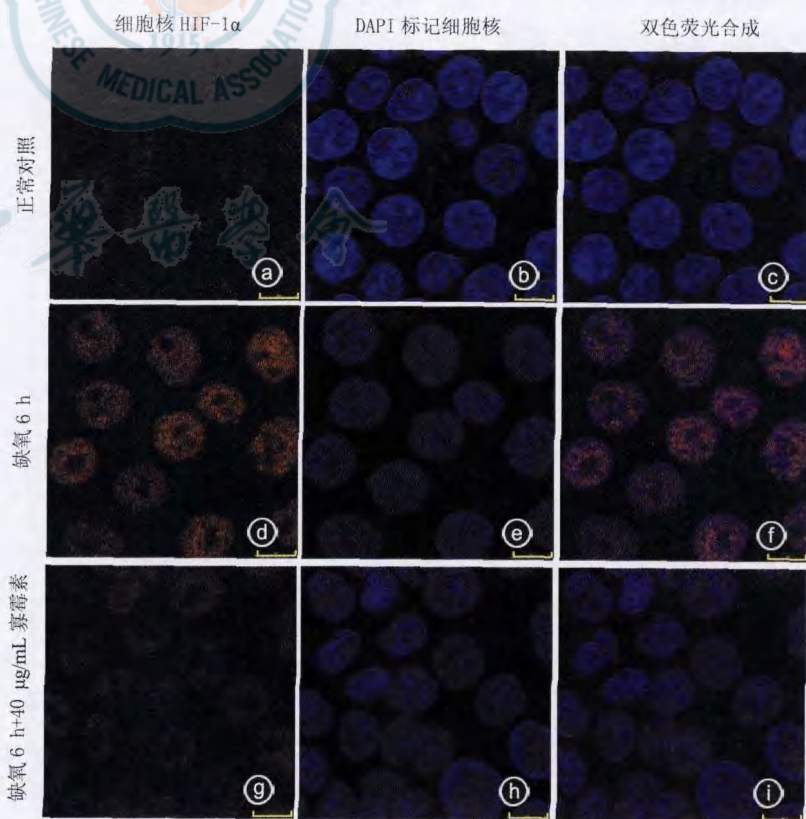


图 4 寡霉素抑制缺氧肠上皮细胞缺氧诱导因子 1α (HIF-1α) 的核转位现象。4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 标记细胞核 (蓝色荧光), 得克萨斯红标记 HIF-1α (红色荧光), 标尺为 10 μm。a. 正常对照细胞核无 HIF-1α 表达; b. 正常对照细胞核; c. a、b 双色荧光叠加; d. 缺氧 6 h 细胞核 HIF-1α 表达阳性增强; e. 缺氧 6 h 细胞核; f. d、e 双色荧光叠加; g. 40 μg/mL 寡霉素处理后缺氧 6 h 细胞核 HIF-1α 表达减弱; h. 40 μg/mL 寡霉素处理后缺氧 6 h 细胞核; i. g、h 双色荧光叠加

要作用。

寡霉素是一种大环内酯类药物衍生物,它抑制 HIF-1 α 活化的分子机制可能与其抑制线粒体腺苷三磷酸合成酶活性有关^[9]。腺苷三磷酸合成酶是一种膜蛋白复合体,由疏水性 F0 及亲水性 F1 两部分组成。F0 区主要构成质子通道,由 3~4 个亚基组成,其中 1 个亚基为寡霉素敏感蛋白(OSCP)。有研究表明,寡霉素阻断 OSCP 的作用能明显抑制缺氧细胞 HIF-1 α 活化及 HIF-1 靶基因血管内皮生长因子的表达^[10]。目前的研究认为,寡霉素可能通过特异性结合于线粒体 FOF1-腺苷三磷酸合成酶的 OSCP,阻断电子传递,从而抑制缺氧细胞 HIF-1 α 活化^[9],详细的分子机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] 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 α 表达的变化.中华烧伤杂志,2003,19(5):263-266.
- [2] 党永明,黄跃生,周军利,等.缺氧诱导因子 1 α 对缺氧条件下大鼠心肌细胞糖酵解的影响.中华烧伤杂志,2005,21(5):339-342.
- [3] 戚华兵,王凤君,汪仕良.缺氧诱导肝细胞株中葡萄糖转运体 1 表达的变化.中华烧伤杂志,2005,21(1):66-67.
- [4] 王裴,戚华兵,陈传莉,等.高效稳定表达人缺氧诱导因子抑制因子肠上皮细胞株的建立.第三军医大学学报,2008,30(9):876-877.
- [5] Semenza GL. Life with oxygen. Science, 2007, 318(5847): 62-64.
- [6] Mansfield KD, Guzy RD, Pan Y, et al. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation. Cell Metab, 2005, 1(6):393-399.
- [7] Guzy RD, Hoyos B, Robin E, et al. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. Cell Metab, 2005, 1(6):401-408.
- [8] Srinivas V, Leshchinsky I, Sang N, et al. Oxygen sensing and HIF-1 activation does not require an active mitochondrial respiratory chain electron-transfer pathway. J Biol Chem, 2001, 276(25):21995-21998.
- [9] Gong Y, Agani FH. Oligomycin inhibits HIF-1 α expression in hypoxic tumor cells. Am J Physiol Cell Physiol, 2005, 288(5):C1023-1029.
- [10] Lin SK, Shun CT, Kok SH, et al. Hypoxia-stimulated vascular endothelial growth factor production in human nasal polyp fibroblasts: effect of epigallocatechin-3-gallate on hypoxia-inducible factor-1 α synthesis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2008,134(5):522-527.

(收稿日期:2008-06-19)

(本文编辑:莫愚)

· 消息 ·

第四届黎鳌烧伤医学基金奖励评选结果

为鼓励我国青年医务工作者对烧伤医学专业作出突出贡献,经黎鳌烧伤医学基金委员会批准,于 2007 年 5 月开始本次“黎鳌烧伤医学基金”奖励的申报和评审工作。这次评审得到了烧伤学术界各单位和同仁的热情关注和大力支持,目前评审工作已圆满完成,现将评审结果公布如下。

一等奖获得者:

黄跃生 重庆第三军医大学西南医院全军烧伤研究所

夏照帆 上海第二军医大学长海医院全军烧伤研究所

二等奖获得者:

彭毅志 重庆第三军医大学西南医院全军烧伤研究所

郭光华 南昌大学第一附属医院烧伤研究所

三等奖获得者:

胡大海 西安第四军医大学西京医院全军烧伤中心

刘毅 兰州军区兰州总医院烧伤整形科

石富胜 大同北京军区第三二二医院烧伤整形科

黎鳌烧伤医学基金委员会是在黎鳌院士倡议下,由第三军医大学具体承办、经中国科协批准,旨在奖励我国 55 岁以下为烧伤医学事业作出贡献的中青年专家。

“黎鳌烧伤医学基金”每 4 年评选一次,至今已经评选过 4 届,先后有 20 人获奖。希望更多的有志青年能获此殊荣,使祖国的烧伤医学持续发展,更好地服务于社会。

黎鳌烧伤医学基金委员会