

网络出版时间: 2019-6-10 17:48 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190606.1643.012.html>

HIF-1 α 对大鼠内皮细胞通透性的影响及作用机制

蒋智永¹, 胡子健², 孟承颖¹, 黄海良³, 段声梁¹, 蒋薇¹, 王欢¹, 余又新¹, 孙业祥¹, 方林森¹, 胡德林¹

摘要 目的 探讨低氧诱导因子-1 (HIF-1 α) 对大鼠主动脉内皮细胞通透性的影响及作用机制。方法 构建 HIF-1 α 干扰及过表达载体, 应用 Lipofectamine 2000 转染原代大鼠主动脉内皮细胞, 浓度为 200 μ g/ml 遗传霉素 (G418) 筛选稳转细胞株, 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 和 Western blot 检测 HIF-1 α 、内皮素-1 (ET-1)、内皮素受体 A (ETA)、内皮素受体 B (ETB) 和闭锁小带 (ZO-1) 的表达; 应用 ET-1 信号通路抑制剂 BQ123 及 BQ788 预处理 HIF-1 α 过表达细胞株 1 h, RT-PCR 和 Western blot 检测 HIF-1 α 、ET-1、ETA、ETB 和 ZO-1 的表达。细胞膜通透性实验检测单层内皮细胞膜通透系数变化。结果 与转染短发夹 RNA-阴性对照组 (shRNA-NC 组) 相比, 转染 shRNA-II 组 HIF-1 α 、ET-1、ETA、ETB mRNA 和蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。ZO-1 的表达则明显升高 ($P < 0.01$)。与转染 GV230 组比较, 稳转 GV230/HIF-1 α 组 HIF-1 α 、ET-1、ETA、ETB mRNA 和蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$)。ZO-1 的表达则明显降低 ($P < 0.01$)。同时细胞膜通透性系数亦明显升高 ($P < 0.01$)。应用 BQ123 和 BQ788 处理能够抑制 HIF-1 α 诱导的 ETA 和 ETB 表达、增强 ZO-1 的表达, 同时细胞膜通透性系数明显降低 ($P < 0.01$)。结论 HIF-1 α 可通过上调 ET-1 的表达进而增加大鼠主动脉内皮细胞的通透性, HIF-1 α /ET-1 信号轴在调控烧伤大鼠血管通透性方面具有重要作用。

关键词 大鼠; 内皮细胞; 血管通透性; 缺氧诱导因子-1 α

中图分类号 R 332; R 977.6; R 322.12

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)07-1061-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.07.012

烧伤早期组织缺血缺氧是血管通透性改变的重要机制, 大量的炎症因子及转录因子参与其中, 而缺

氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α) 在烧伤休克早期血管通透性增加中占有重要位置; 此外烧伤早期血管通透性改变主要发生在微静脉和毛细血管, 微静脉由内皮细胞、周静脉、基底膜及少量平滑肌组成, 而内皮细胞在血管通透性改变中起着重要作用, 因此, 研究血管通透性的变化及其调控机制对烧伤休克的防治以及预防烧伤早期组织器官损害均有重要意义。然而, 烧伤后血管内皮细胞通透性变化的作用机制及调控途径目前尚不清楚, 该实验以原代大鼠主动脉内皮细胞为研究对象, 通过探讨 HIF-1 α /内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 信号通路的调控作用以期为进一步阐明烧伤早期血管通透性改变的机制及烧伤的临床治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 原代大鼠主动脉内皮细胞购自武汉原生原代生物医药科技有限公司; RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 反转录试剂盒购自美国 Thermo Fish 公司; RT-PCR 试剂盒购自大连 TakaRa 公司; 细胞培养基购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清购自美国 Gibco 公司; RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒购自杭州碧云天生物技术研究所; 磷酸甘油醛脱氢酶 (reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、HIF-1 α 、ET-1、内皮素受体 A (endothelin receptor A, ETA)、ETB 和闭锁小带 (zonula occludens, ZO-1) 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; PCR 引物购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 应用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 g/ml 的链霉素、pH 7.4 的 RPMI1640 的培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养原代大鼠主动脉内皮细胞, 隔天换液, 观察细胞生长状况, 当细胞汇合度约为 90% 时, 进行消化、传代、种板, 按 1×10^5 /孔接种于 6 孔细胞培养板。继续培养细胞至汇合度为 80% 时, 将培养基更换为无血清 RPMI1640 培养基, 进行后续实验。

1.2.2 载体构建 HIF-1 α 干扰、过表达及其阴性对照组载体均由上海吉凯基因化学技术有限公司构

2019-03-04 接收

基金项目: 2015 年度第二批安徽省自然科学基金项目 (编号: 1508085SMH231); 安徽省 2018 年度重点研究与开发计划项目 (编号: 1804h08020230)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院烧伤科, 合肥 230022

² 安徽医科大学第一临床医学院 2018 级临床医学, 合肥 230022

³ 安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230022

作者简介: 蒋智永, 男, 硕士研究生;

胡德林, 男, 主任医师, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hdl0522@163.com

表1 HIF-1 α 干扰序列

编号	5'	茎	环	茎	3'
shRNA-I	Ccgg	aaCCAGTTGAATCTTCAGATA	CTCGAG	TATCTGAAGATTCAACTGGTT	TTTTTg
shRNA-II	Ccgg	gaGCCTTAACCTATCTGTCAC	CTCGAG	GTGACAGATAGCTTAAGGCTC	TTTTTg
shRNA-III	Ccgg	ctCCATTACCTGCCTCTGAAA	CTCGAG	TTTCAGAGGCAGGTAATGGAG	TTTTTg

建,干扰载体分别标记为短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA-I)、shRNA-II、shRNA-III 和短发夹 RNA 阴性对照组 (short hairpin RNA negative control group, shRNA-NC), 干扰序列见表 1。过表达载体标记为 GV230/HIF-1 α 和 GV230。

1.2.3 细胞转染及稳转细胞株筛选 按 1×10^6 /孔将细胞接种于 6 孔细胞培养板,继续培养细胞至汇合度为 70%~80%,使用 Lipofectamine 2000 并参照其说明书分别将 HIF-1 α 干扰及过表达载体转染至原代大鼠主动脉内皮细胞,同时设置阴性对照组。6 h 后更换为含 200 μ g/ml 遗传霉素 G418 (geneticin, G418) 的细胞培养基筛选稳转细胞株。同时,抑制剂组 BQ123 和 BQ788 先于 GV230/HIF-1 α 1 h 加入细胞培养基。

1.2.4 RT-PCR 应用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,参照细胞总 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA。以总 RNA 为模板,参照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。以 cDNA 为模板,使用 ABI7500 RT-PCR 仪检测相关基因的表达。RT-PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C、5 s; 60 $^{\circ}$ C、34 s,设置循环数为 40。以 β -actin 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较分析各基因表达,PCR 引物序列见表 2。

表2 RT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
β -actin	F: CCCGCGAGTACAACCTTCTTG	71
	R: GTCATCCATGGCGAAGCTGGTG	
HIF-1 α	F: TCCATTTTTCAGCTCAGGACACT	181
	R: GGTAGGTTTCTGTAAGTGGGTCT	
ET-1	F: CGTTGCTCCTGCTCCTCC	163
	R: GGTCTGTGGTCTTTGTGGG	
ZO-1	F: TCCAGTCCCTTACCTTTTCGC	202
	R: CGGCAATGACACTCCTTCG	
ETB	F: GATGATGCCTAGCACGAACA	211
	R: GACGCCACCCACTAAGACC	
ETA	F: ACTGGTGCTCTTTGGATTTC	137
	R: ACGCTGCTTGAGGTGTTCC	

1.2.5 Western blot 从 RIPA 细胞裂解物中提取细胞的总蛋白。用 BCA 方法定量后,将样品以 50 μ g/孔的剂量进行电泳和膜转化。转移完成后,5% 脱脂奶粉在室温下密封 1.5 h, TBST 洗涤 3 min,每

种蛋白抗体根据抗体说明书操作,在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,每次用 TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。相应的次级抗体在室温下孵育 1.5 h, TBST 每次洗涤 3 次,每次洗涤 10 min, ECL 发光、显影。Quantity One 灰度分析软件检测各目的蛋白灰度值,以 β -actin 为内参计算其相对表达量。

1.2.6 单层内皮细胞膜通透系数检测 将各组内皮细胞按 1×10^5 /孔接种于 24 孔 Transwell 小室,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养 8 h 待其形成细胞单层。双层小室的顶室加入 FITC-albumin,底室加入 D-Hank's 液,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 孵育 45 min 并抽吸双室的顶部和底部腔室液体。在荧光分光光度计波长为 488 nm 下测定各样品荧光强度 (optical density, OD) 值 OD488 nm,计算单层内皮细胞膜通透系数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,每组实验均单独重复 3 次,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较数据之间差异性采用 T 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIF-1 α shRNA 有效序列筛选 将 3 条 HIF-1 α shRNA 分别转染原代大鼠主动脉内皮细胞 24 h 后 RT-PCR 和 Western blot 分别检测 HIF-1 α 的表达,同时设置 shRNA-NC 组作为对照组。结果显示: shRNA-I、shRNA-II 和 shRNA-III 的干扰效率分别为 (67.14 $\pm$ 7.28) %、(83.55 $\pm$ 9.16) % 和 (52.84 $\pm$ 6.48) %。shRNA-I、shRNA-II 和 shRNA-III 组分别和 shRNA-NC 比较 ($T = 22.222$, $P < 0.001$; $T = 24.449$, $P < 0.001$; $T = 15.278$, $P < 0.001$) , shRNA-II 的干扰效率最高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$) ,见图 1。

2.2 HIF-1 α 低表达及过表达对细胞膜通透性相关蛋白表达的影响 分别将 shRNA-II 及 GV230/HIF-1 α 转染原代大鼠主动脉内皮细胞,应用浓度为 200 μ g/ml G418 筛选 4 周,构建稳转细胞株。应用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测 HIF-1 α 、ET-1、ETA、ETB 和 ZO-1 mRNA 和蛋白表达水平的变化。检测结果显示:与 shRNA-NC 组相比,稳转 shRNA-II 组 HIF-1 α ($T = 22.73$, $P < 0.001$)、ET-1 ($T = 17.99$,

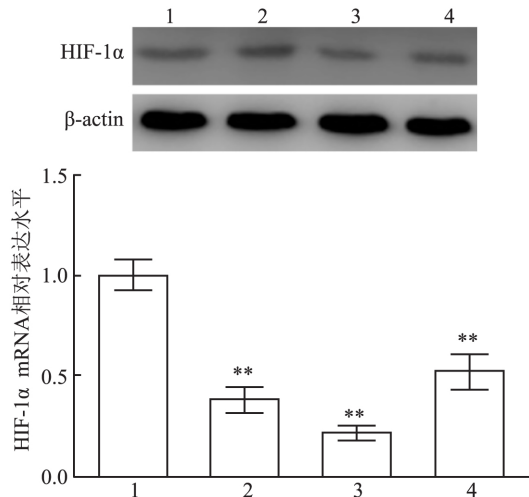


图1 转染不同 shRNA 对 HIF-1α 表达的影响

1: 转染 shRNA-NC 组; 2: 转染 shRNA-I 组; 3: 转染 shRNA-II 组; 4: 转染 shRNA-III 组; 与 shRNA-NC 组比较: ** $P < 0.01$

$P < 0.001$), ETA ($T = 11.27$, $P = 0.004$) 和 ETB ($T = 23.19$, $P = 0.001$) mRNA 和蛋白表达均明显降低, 而 ZO-1 ($T = 12.46$, $P = 0.002$) 则显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 2A、2B。与转染 GV230 组比较, 稳转 GV230/HIF-1α 组 HIF-1α ($T = 13.23$, $P = 0.002$)、ET-1 ($T = 14.86$, $P = 0.001$)、ETA ($T = 14.86$, $P = 0.001$) 和 ETB ($T = 27.29$, $P =$

0.001) mRNA 和蛋白表达显著升高, 而 ZO-1 ($T = 16.17$, $P < 0.001$) 则显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 2C、2D。

2.3 HIF-1α 过表达对大鼠主动脉内皮细胞通透性系数的影响 分别检测 GV230 组和 GV230/HIF-1α 组样品的荧光强度值 (OD488 nm), 并将 GV230 组细胞通透系数均一化为 100%, 计算 GV230/HIF-1α 组单层内皮细胞膜通透性系数。结果显示, 与 GV230 组比, GV230/HIF-1α ($T = 6.765$, $P < 0.001$) 组细胞通透性系数明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 3。

2.4 阻断 HIF-1α/ET-1 信号通路对相关蛋白表达和细胞通透性的影响 联合应用浓度分别为 10 nmol/L 的 BQ123 和 1 nmol/L 的 BQ788 预处理稳转 GV230/HIF-1α 大鼠主动脉内皮细胞 1 h, RT-PCR 和 Western blot 分别检测 HIF-1α、ET-1、ETA、ETB 和 ZO-1 mRNA 和蛋白表达。同时, 荧光分光光度计检测各组荧光强度值。结果显示, BQ123 和 BQ788 能够抑制 HIF-1α 诱导的 ETA 和 ETB 表达、增强 ZO-1 的表达, 单层细胞膜通透性系数降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 4、5。

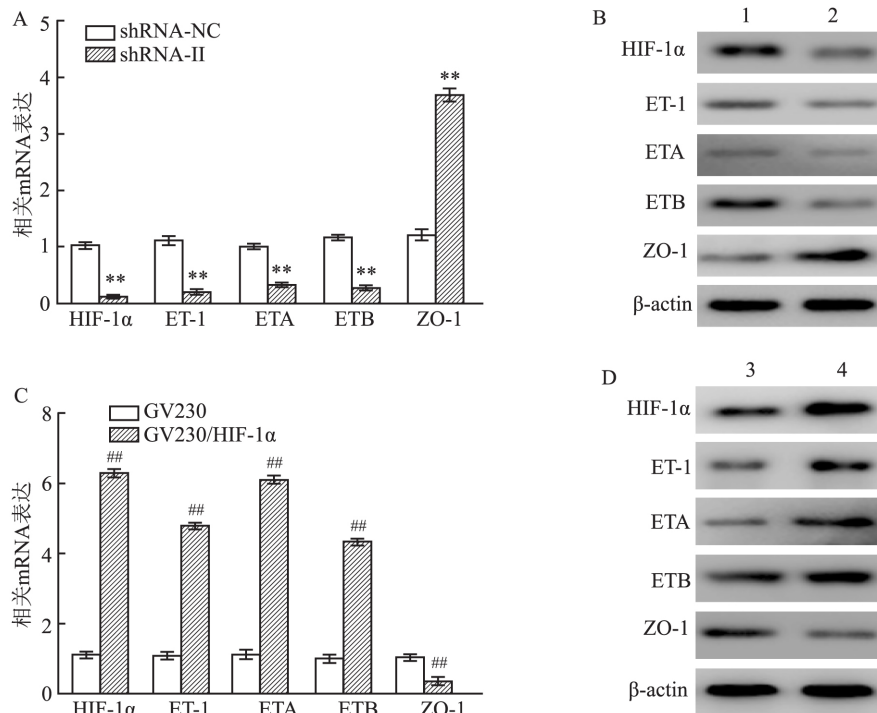


图2 干扰及过表达 HIF-1α 对细胞膜通透性相关基因表达的影响

A: HIF-1α 干扰后相关 mRNA 表达; B: HIF-1α 干扰后相关蛋白质表达; C: HIF-1α 过表达后相关 mRNA 表达; D: HIF-1α 过表达后相关蛋白质表达; 1: 转染 shRNA-NC 组; 2: 稳转 shRNA-II 组; 3: 转染 GV230 组; 4: 稳转 GV230/HIF-1α 组; 与 shRNA-NC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 GV230 组比较: ## $P < 0.01$

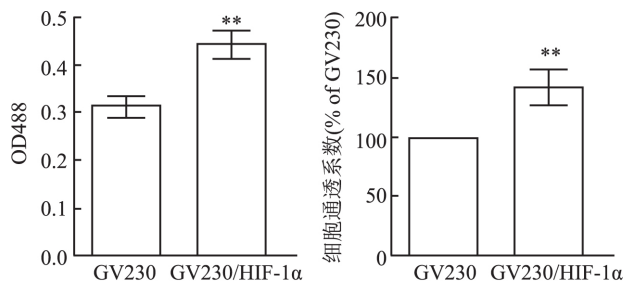


图3 HIF-1α过表达对内皮细胞通透性系数的影响
与GV230组比较: ** $P < 0.01$

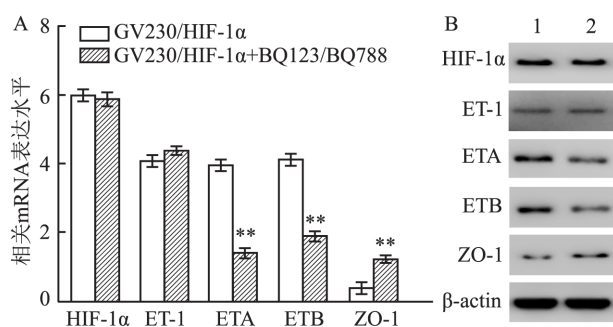


图4 阻断HIF-1α/ET-1信号通路
对相关蛋白的mRNA及蛋白质表达影响

A: 阻断HIF-1α/ET-1信号通路相关mRNA表达; B: 阻断HIF-1α/ET-1信号通路相关蛋白质表达; 1: GV230/HIF-1α组; 2: GV230/HIF-1α+BQ123/BQ788组; 与GV230/HIF-1α组比较: ** $P < 0.01$

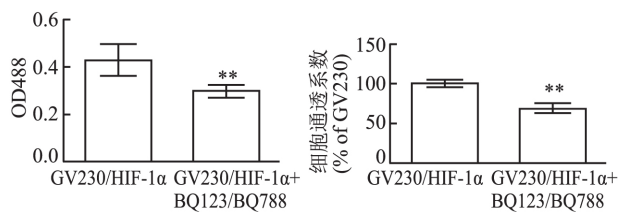


图5 阻断HIF-1α/ET-1信号通路对细胞膜通透性影响
与GV230/HIF-1α组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

细胞通透性改变是炎症反应、组织缺氧以及细胞代谢障碍等多种疾病的重要病理过程。烧伤早期血管通透性改变受多种因素调节,而内皮细胞损伤占有重要地位^[1],内皮细胞在组织和血管中起生理屏障作用^[2-3]。这道屏障允许小分子物质通过,禁止大分子物质通过;而大分子物质通过细胞链接、细胞上的窗孔和跨细胞途径跨越细胞通过内皮细胞屏障到达组织中,大量血浆样液体及高分子物质从血管内渗出血管外,引起血容量骤减造成休克发生和发展。而机体缺氧更使血管通透性增加,这样反复形

成恶性循环^[4]。烧伤早期血管活性物质及炎症介质释放改变了血管结构,从而改变血管通透性^[5]。但是至今为止,烧伤早期血管通透性改变发生的具体机制仍不明确^[6],因而临床更无有效的预防治疗手段来降低血管通透性。

HIF-1α是一种异源二聚体转录因子并广泛分布于人体内,它由120 ku的HIF-1α和91~94 ku的HIF-1β两个亚单位组成^[7]。正常情况下,机体合成的HIF-1蛋白很快失去活性,HIF-1蛋白只有在机体缺氧条件下才能具有活性。其中α亚基决定着HIF-1的调控活性,被激活的HIF-1α通过增加与下游基因的缺氧反应元素结合,从而调控多种转录因子的转录和翻译^[8]。

ET-1是内皮细胞分泌的血管活性肽,具有强烈的缩血管作用,而烧伤早期由于机体缺氧ET-1高度表达,研究^[9]表明ET-1可以通过与其相应受体结合而发挥各种生物活性,而ET-1启动子的某位点可以结合HIF-1,从而促进内皮细胞ET-1表达的激活,ET-1在炎症反应方面有重要作用,如刺激中性粒细胞和巨噬细胞释放各种促炎因子,导致失控性炎症反应,结果导致血管内皮细胞损伤加重^[10],通透性增加,组织缺氧加重细胞损伤,形成恶性循环导致多器官功能障碍综合征^[11]。

研究^[12-14]显示当大鼠缺血缺氧时,HIF-1α、ET-1、ETA、ETB mRNA和蛋白表达水平均显著升高,提示HIF-1α可能参与了主动脉内皮细胞通透性的调控,但是其作用机制尚未阐明。

本研究结果显示HIF-1α能明显提高细胞膜通透性系数,应用ET-1信号通路抑制剂预处理HIF-1α过表达细胞株后细胞膜通透性系数则明显降低,该结果进一步证明HIF-1α促进血管内皮细胞通透性升高的可能性,同时说明,HIF-1α/ET-1信号轴在调控烧伤大鼠血管通透性方面具有重要作用。

参考文献

- [1] 景炳文. 毛细血管内皮细胞膜结构与血管通透性[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2013, 8(5): 461-3.
- [2] 吴洁, 张伟金, 黄巧冰. 肌球蛋白轻链激酶介导内皮细胞屏障功能变化的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(3): 572-6.
- [3] 唐富波, 白晓东, 胡森. 烧伤对血管内皮细胞屏障的影响及其保护药物的研究进展[J]. 感染、炎症、修复, 2015, 16(4): 239-41.
- [4] Liu C, Shui C L, Wang Q, et al. Mechanism of hif-1α mediated hypoxia-induced permeability changes in bladder endothelial cells[J]. Braz J Med Biol Res, 2017, 51(2): e6768.

- [5] 乐 飞,金惠铭. 促血管生成素-1 与血管通透性调节[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(10): 1929-32.
- [6] 黄巧冰. 内皮细胞屏障与烧伤后血管通透性的关系及机制[J]. 中华烧伤杂志, 2007, 23(5): 324-6.
- [7] Geng J, Wang L, Qu M, et al. Endothelial progenitor cells transplantation attenuated blood-brain barrier damage after ischemia in diabetic mice *via* HIF-1 α [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 163.
- [8] Zhang J, Zeng Y Q, Zhang J, et al. Triphenylamine ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by down-regulating ERK1/2-NF- κ B and JAK/STAT signaling pathways [J]. *J Neurochem*, 2015, 133(1): 104-12.
- [9] 韦 利,金 松 程明勋,等. ET-1、5-HT 在下肢深静脉血栓患者的水平及临床意义[J]. 黑龙江医药科学 2018, 41(3): 60-2.
- [10] 周锐华,鄢文海,孙永华. 烧伤后血管内皮细胞的损伤与治疗[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2009, 4(3): 346-51.
- [11] 张晓军 刘 健 万 磊,等. 佐剂关节炎大鼠滑膜组织 HIF-1 α 和 VEGF 及 CD34 表达上调促进血管新生[J]. 细胞与分子免疫学杂志 2015, 31(8): 1053-6.
- [12] Yan J, Zhang Z, Shi H. HIF-1 is involved in high glucose-induced paracellular permeability of brain endothelial cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(1): 115-28.
- [13] Dai J, Sun C, Yao Z, et al. Exposure to concentrated ambient fine particulate matter disrupts vascular endothelial cell barrier function via the IL-6/HIF-1 α signaling pathway [J]. *Febs Open Bio*, 2016, 6(7): 720-8.
- [14] 刘志国,徐冰心,李建忠,等. 液体复苏时机对烫伤休克大鼠内脏血管通透性的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2005, 14(10): 811-3.

Effects and mechanism of HIF-1 α on the permeability of rat endothelial cells

Jiang Zhiyong¹, Hu Zijian², Meng Chengying¹, et al

(¹Dept of Burn, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Clinical Medicine, First Clinical Medical College, Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effects and mechanism of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) on the permeability of rat aortic endothelial cells. **Methods** Interference and overexpression vector of HIF-1 α was transfectant into rat aortic endothelial cells by Lipofectamine 2000 respectively. Rat aortic endothelial cells were cultured at a concentration of 200 μ g/ml G418. The expressions of HIF-1 α , endothelin-1 (ET-1), endothelin receptor A (ETA), endothelin receptor B (ETB) and zonula occludens (ZO-1) were detected by Real-time PCR and Western blot. The signal transduction inhibitor BQ123 and BQ788 was applied to discover the activity changes of HIF-1 α /ET-1 signal. Meanwhile, the membrane permeability coefficient of the monolayer endothelial cells was examined. **Results** Compared with the control group, the levels of HIF-1 α and ET-1 in the scalded rats were significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.01$). Compared with the control group, the mRNA and protein expression levels of HIF-1 α , ET-1, ETA and ETB were significantly decreased in the transfected HIF-1 α interfered group ($P < 0.01$), while the expression of ZO-1 was obviously increased ($P < 0.01$). The results of transfection of the HIF-1 α overexpression vector group were reversed. At the same time, the cell membrane permeability coefficient was significantly increased ($P < 0.01$), and the cell membrane permeability coefficient was decreased after treatment with BQ123 and BQ788. It could inhibit the expression of ETA and ETB induced by HIF-1 α and enhance the expression of ZO-1, and the permeability coefficient of cell membrane was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** HIF-1 α can increase the permeability of rat aortic endothelial cells by up-regulating the expression of ET-1, and the HIF-1 α /ET-1 signal axis plays an important role in regulating vascular permeability in burned rats.

Key words rat; endothelial cells; vascular permeability; HIF-1 α