

低氧诱导因子-1 与低氧预处理诱导的脑缺血耐受

张维波¹ 黄俊山²

1990 年, 日本学者发现, 短暂的、轻微的脑缺血可对 1—7d 后的再次严重的脑缺血产生部分保护作用, 此现象被称为脑缺血耐受(cerebral ischemic tolerance, CIT)现象, 而提前给予的短暂性缺血则称为缺血预处理。近年来的研究表明, 不单是缺血预处理, 其他多种预处理方式均可诱导脑缺血耐受。低氧预处理(hypoxia preconditioning, HP)作为一种干预措施, 已被证实能使脑组织产生缺血耐受。

低氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是缺氧诱导细胞产生的一种具有 DNA 结合活性的蛋白因子, 在缺氧时, HIF-1 通过与靶基因特定序列 DNA 结合进而调控它们的转录与表达, 维持机体氧的自我平衡与氧稳态。近年国内外的研究表明 HIF-1 与低氧预处理诱导的脑缺血耐受关系密切, 现就这方面的研究进展做如下综述。

1 HIF-1 结构特点及分布

HIF-1 是 1992 年 Semenza 等^[1]在低氧的肝细胞癌细胞株 Hep3B 细胞的核提取物中发现的一种蛋白质分子, 能特异性地结合于红细胞生成素(erythropoietin, EPO)基因增强子的寡核苷酸序列, 促进其转录。以后又观察到该因子对多种低氧反应性基因的转录都有调控作用, 并可能参与对低氧反应的其他信号转导过程。

HIF-1 由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚基以二聚体形式组成。HIF-1 α 的相对分子量为 120kD; HIF-1 β 的相对分子量为 91—94kD。HIF-1 的 α 和 β 亚单位均为转录因子的碱性螺旋环螺旋/PAS(bHLH/PAS)家族的成员, 均包含 bHLH 结构域和 PAS 结构域。

HIF-1 α 是低氧诱导的, HIF-1 β 则属构建型表达, 不受低氧诱导。其中 HIF-1 α 亚基为 HIF-1 所特有, 是 HIF-1 的调节及活性亚基。HIF-1 α 全长 826 个氨基酸, 氨基端方向依次碱性区域、HLH 和 PAS, 共同构成转录因子 DNA 结合结构域(DNA-binding domain, DBD)。碱性区域和 HLH 介导与 DNA 的结合, 其中 1—166 氨基酸残基为二聚体形成所必需, 1—390 氨基酸残基完整才能与 DNA 达到最适结合。HIF-1 α 羧基端为两个相对独立的反式激活结构域(transactivation domain, TAD), 二者被抑制结构域(inhibitory domain, ID)隔开。在常氧条件下, ID 抑制 HIF-1 α 的反式激活作用。HIF-1 α 中部为氧依赖的降解结构域(oxygen-dependent degradation, ODD), 控制其常氧降解。ODD 对调节 HIF-1 活性起中心作用, 去除此区域后, HIF-1 α 能自发地异二聚化、DNA 结合和反式活化。HIF-1 β 可与其他 bHLH 蛋白形成二聚体, 其作用可能与 HIF-1 的稳定性及二聚体化引起的活性构象转变有关。

HIF-1 在组织细胞中分布广泛, Wiener 等^[2]对正常人器官标本行 Northern 杂交显示, 在心脏、脑、胎盘、肺、肝、骨骼肌、肾和胰腺均有 HIF-1 α 和 HIF-1 β mRNA 表达, 并且在成

人大脑、白细胞、胰岛、胎盘、视网膜和子宫的 cDNA 文库中均存在。在小鼠各组织中, HIF-1 α 的表达以肾、心、胸腺最高, 肝、脾、肺、睾丸次之, 骨骼肌最低^[3]。在不同的组织细胞中 HIF-1 具有不同的作用。

2 HIF-1 的活性调节及其靶基因

HIF-1 的生物活性由 α 亚基决定, HIF-1 α 的表达严格地受细胞氧浓度的调节, HIF-1 α 表达和活性调节发生在多个水平上: mRNA 的转录、蛋白质的翻译、核定位、异二聚化以及反式激活等。HIF-1 靶基因的启动子或增强子上都含有一个核心序列为 5'-TACGTGCT-3' 的缺氧应答元件(hypoxia response element, HRE), HIF-1 通过与 HRE 结合而诱导靶基因的表达, 目前发现了 30 多种 HIF-1 的靶基因, 分布于全身多种组织细胞, 而这些基因的蛋白产物的功能涉及血管生成、能量代谢、红细胞生成、血管舒缩反应、细胞增殖和存活以及血管重塑等。

3 HIF-1 与低氧预处理诱导的脑缺血耐受

预低氧处理可诱导机体内源性调节机制, 对抗随后的脑缺血性损害, 保护机制涉及多方面的病理生理变化, 包括多种基因的表达、不同转录因子的激活和众多因子的参与。近年研究表明, HIF-1 与脑缺血耐受的形成关系密切。低氧可能通过上调 HIF-1 的表达及活性, 从而诱导其靶基因的表达, 诱导脑缺血耐受的形成。

3.1 脑组织低氧预处理后 HIF-1 的上调与脑缺血耐受形成

Bergeron 等^[4]给予新生大鼠预低氧处理(8%O₂, 3h), 能明显减轻随后的脑缺血损伤, 同时观察到预低氧后 HIF-1 α mRNA 水平及 HIF-1 α 和 HIF-1 β 蛋白水平在整个脑组织中明显提高, 研究者为了明确 HIF-1 在脑缺血耐受中的作用, 用 DFX 和 CoCl₂ (在体外已证实 DFX 和 CoCl₂ 能提高 HIF-1 的表达及活性)预处理新生大鼠后, 亦能诱导 HIF-1 的表达和减轻随后的脑缺血损伤, 因此认为 HIF-1 参与了预低氧诱导的脑缺血耐受的形成。Bernaudin 等^[5]给予成年小鼠预低氧处理(8%O₂, 6h), 24h 后永久性阻塞左侧大脑中动脉造成永久性局灶性脑缺血。与对照组相比, 预低氧组的梗死体积明显减轻。但当预低氧处理后 72h 再给予脑缺血处理, 脑梗死体积减轻程度将变得不明显。研究者还观察到给予更短时间(1h 或 3h)的低氧预处理后, 能同样明显地减轻 24h 后脑缺血造成的梗死体积。三种强度的缺氧都能诱导 HIF-1 α 的核内表达及提高 EPO 和血管内皮生长因子(vascular endothe-

1 福建医科大学, 福州, 350004

2 福州市第一医院

作者简介: 张维波, 男, 硕士研究生

收稿日期: 2006-09-04

lial growth factor, VEGF) 的 mRNA 和蛋白水平。同时观察到 EPO 和 VEGF 蛋白表达的时间与脑缺血耐受的时间相一致。作者认为, 预低氧通过 HIF-1 诱导 EPO 和 VEGF 等蛋白的表达参与脑缺血耐受的形成。Liu 等^[6]的实验表明, 预低氧的神经保护作用, 可能是因为缺氧导致活性氧(reactive oxygen species, ROS) 的产生, ROS 能使 HIF-1 α 和 EPO 的表达域值下降, 从而在随后的致死性缺氧时, HIF-1 α 和 EPO 能大量表达, 发挥神经保护作用。高晓群等^[7]的研究表明, 缺氧预处理能使脑缺血再灌注后脑组织中 HIF-1 α 的表达明显高于单纯缺血再灌注组及假手术组。与缺血再灌注组相比, 预低氧组大鼠行为明显改善, 脑屏障通透性较低, 脑水肿较轻。推测 HIF-1 参与了脑缺血耐受。

3.2 HIF-1 通过对靶基因转录的调控参与脑缺血耐受形成

HIF-1 是一种转录因子, 通过对靶基因转录的调控, 使组织细胞保持氧稳态及耐受低氧状态。在低氧预处理后, HIF-1 可能通过下列机制诱导脑缺血耐受形成。

3.2.1 促进 EPO 的分泌: 以往研究表明, EPO 是 HIF-1 的一个重要的靶基因。预低氧后, HIF-1 促进 EPO 的分泌, 发挥脑保护作用。Prass 等^[8]研究表明, 低氧预处理能减轻随后的短暂局灶性脑缺血梗死灶, 在实验中观察到预低氧脑组织 HIF-1 与 DNA 结合的活性和 EPO 表达明显增加, 当脑室注入一种可溶性 EPO 受体后, 将明显降低预低氧对脑组织的保护作用。从而认为, 内生的 EPO 在低氧诱导的脑缺血耐受中发挥了重要作用。Bernaudin 等^[5]在成年小鼠局灶性脑缺血前 24h, 先予常压低氧预处理, 发现脑梗死体积明显减少。在低氧预处理脑组织中可见核内 HIF-1 α 过量表达, EPO mRNA 及其蛋白水平均增高, 表明 HIF-1 及其靶基因 EPO 参与了脑缺血耐受的形成。Bernaudin 等^[9]用低氧(8%O₂, 3h)预处理新生小鼠, 发现低氧预处理脑组织总 HIF-1 α 和核内 HIF-1 α 均增加, HIF-1 β 核易位增加, EPO mRNA 增加。

EPO 对损伤脑组织发挥保护作用。其机制可能包括以下几个方面: ①抗凋亡作用: MCA 结扎后腹腔注射 EPO, 24h 后脑梗死体积不仅明显减小, 而且在缺血区 TUNEL 标记的阳性细胞数明显减少^[10]。在大脑全脑缺血的模型中, 海马内注射 EPOR 中和内源性 EPO 可导致神经元的广泛凋亡。EPO 的抗凋亡作用可能与受体 EPOR 结合后激活 JAK-2-PI3K-Akt 信号通路, 引起 Bad 磷酸化失活, 促进细胞存活有关^[11]。另有研究表明, EPO 与其受体 EPOR 结合后, 可激活 JAK-2, 磷酸化 I κ B, 活化转录因子 NF- κ B, 进而转录一系列神经保护基因, 抑制 NMDA 或 NO 诱导的神经元凋亡^[12]; ②抑制自由基生成作用: 蒙古鼠双侧颈动脉结扎 5min 后进行灌注, 缺血后腹腔或脑室内注射 rhEPO 能降低缺血后脑组织中丙二醛(Malondialdehyde, MDA)水平、抑制 NO 合成、减轻脑水肿、减少 CA1 神经元丢失^[13]; ③拮抗兴奋性毒性作用: 在皮质与海马的原代培养中, 用 rhEPO 预处理, 能预防谷氨酸导致的细胞死亡, 其效果与 rhEPO 的剂量成正比^[14]。

3.2.2 促进 VEGF 的分泌: VEGF 基因的启动子区域含有 HIF-1 反应性元件, 缺氧条件下处于激活状态, 直接诱导 VEGF 表达^[15]。Bernaudin 等^[5]在成年小鼠局灶性脑缺血前 24h, 先予常压低氧预处理, 发现脑梗死体积明显减少。在低

氧预处理脑组织中可见核内 HIF-1 α 过量表达, VEGF mRNA 和蛋白水平均增高, 表明 HIF-1 及其靶基因 VEGF 参与了脑缺血耐受的形成。一个研究小组对新生及成年小鼠予以低氧处理后, 均发现 VEGF mRNA 表达的上调^[9, 16]。推测缺氧通过 HIF-1 促进 VEGF 的分泌, 从而防止或减轻后续的缺血性脑损伤。

在体、体外实验均证实 VEGF 能减轻脑缺血后脑组织损伤^[17-18]。VEGF 可促进缺血后毛细血管侧支循环的形成, 使血流迅速恢复, 增加氧张力, 防止组织缺血性坏死; 此外, VEGF 尚可直接保护神经元, Matsuzaki 等^[19]研究表明, VEGF 与其受体 Flk-1 结合后, 通过激活 PI3K/Akt 和 MEK/ERK 信号通路而对抗谷氨酸的神经毒性作用, Jin 等^[18]的研究中, 在体外制作脑缺血模型, 发现 VEGF 对缺血神经元有明显的保护作用, 这可能与 VEGF 结合其受体 VEGF-2 后, 激活 PI3K/Akt 信号通路有关。

3.2.3 促进葡萄糖转运与糖酵解: 葡萄糖转运蛋白-1(glucose transporter-1, GLUT-1)、GLUT-3 及一些糖酵解相关酶, 如醛缩酶(aldolase, ALD)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)的编码基因均为 HIF-1 的靶基因。缺氧可能通过 HIF-1 诱导糖酵解酶和葡萄糖转运蛋白的表达, 促进葡萄糖的转运和糖酵解, 维持能量代谢, 保护脑组织。Jone 等^[20]用低氧预处理新生大鼠后, 发现缺氧可引起新生大鼠 HIF-1 表达和活性增加, GLUT-1 基因及其蛋白表达上调, 但只见 ALD、PFK 和 LDH 蛋白水平增加而未见这些糖酵解酶的 mRNA 增加。因此, 在预低氧后, 这些糖酵解酶的增加, 是否依赖 HIF-1 的转录调控, 或存在其他机制, 尚待明确。同时发现, CoCl₂ 亦可诱导 HIF-1 表达, 但该过程不引起 GLUT-1 基因及其他一些糖酵解相关靶基因的表达增加, 提示 CoCl₂ 预处理与预低氧诱导的脑缺血耐受机制有所不同。

3.2.4 促进 P450 2C11 表达: 细胞色素 P450 2C11 是星形胶质细胞中表达的一种花生四烯酸(arachidonic acids, AA)环氧化物酶, 它能使 AA 代谢为环氧二十碳三烯酸(epoxyeicosatrienoic acids, EETs)。Alkayed 等^[21]的研究表明 P450 2C11 参与了缺血预处理诱导的脑缺血耐受。随后他们的研究^[22]证实预低氧处理体外培养的星形胶质细胞后, 低氧通过氧敏感因子 HIF-1 诱导 P450 2C11 的表达, 并明显减轻随后氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)造成的星形胶质细胞的损伤, 这种保护作用可被一种环氧化物酶抑制剂 MS-PPOH 减弱, 研究者还发现 EETs 也能减轻 OGD 造成的星形胶质细胞的损伤。提示预缺氧通过 HIF-1 上调 P450 2C11 的表达, 从而增加 AA 的代谢产物 EETs 而保护星形胶质细胞。在脑组织中, 星形胶质细胞起着重要作用, 对星形细胞的保护, 能为神经元提供一个稳定的周围环境, 星形胶质细胞还可分泌一些神经营养和保护因子保护神经元。由此可以推测, P450 2C11 可能参与了预低氧诱导的脑缺血耐受的形成。

肾上腺髓质素(adrenomedullin, AM)的编码基因也是 HIF-1 的靶基因, 给予新生和成年大鼠预缺氧处理均能诱导 AM mRNA 表达的上调^[9, 16], AM 是一种血管扩张肽, 有研究表

明, AM 能减轻大鼠的缺血性脑损伤。此外, HIF-1 还诱导一些促进细胞凋亡的基因如 P53, 它们与低氧诱导的脑缺血耐受的关系如何, 尚待明确。随着研究的不断深入, 将有更多的 HIF-1 靶基因被发现, 并将发现更多的 HIF-1 靶基因以不同的方式参与预低氧诱导的脑缺血耐受。

4 小结

适度的低氧预处理可诱导脑缺血耐受, 在此过程中, 低氧诱导因子 HIF-1 扮演了重要角色。若能利用基因或药物手段特异地调节 HIF-1 的表达及活性, 将能更加明确 HIF-1 的作用。随着对 HIF-1 和其靶基因研究的不断深入, 将进一步揭示预低氧诱导的脑缺血耐受机制, 为临床防治脑缺血性疾病提供新的思路及途径。

参考文献

- [1] Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation [J]. Mol Cell Biol, 1992, 12: 5447—5454.
- [2] Wiener CM, Booth G, Semenza GL. In vivo expression of mRNA encoding hypoxia inducible factor 1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 225(2): 485—488.
- [3] Luo G, Gu Yz, Jain S, et al. Molecular characterization of the murine Hif-1 alpha locus [J]. Gene Exp, 1997, 6(5): 287—299.
- [4] Bergeron M, Gidday JM, Yu AY, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain [J]. Ann Neurol, 2000, 48(3): 285—296.
- [5] Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, et al. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(4): 393—403.
- [6] Liu J, Purnima N, Fengshan YU, et al. Neuroprotection by hypoxia preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin [J]. Stroke, 2005, 36: 1264—1269.
- [7] 高晓群, 段东晓, 朱红灿, 等. 低氧预处理对缺血再灌注脑组织血脑屏障及缺氧诱导因子-1 α 表达的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26(7): 396—399.
- [8] Prass K, Scharff A, Ruscher K, et al. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin [J]. Stroke, 2003, 34: 1981—1986.
- [9] Bernaudin M, Tang Y, Reilly M, et al. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat [J]. Biological Chemistry, 2002, 227: 39728—39738.
- [10] Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, et al. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 253(1): 26—32.
- [11] Ruscher K, Freyer D, Karsch M, et al. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model [J]. Neurosci, 2002, 22: 10291—10301.
- [12] Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signaling cascades [J]. Nature, 2001, 412(6847): 641—647.
- [13] Calapal G, Marciano MC, Corica F, et al. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation [J]. Eur J Pharmacol, 2000, 401(3): 349—356.
- [14] Morishit AE, Masuda A, Nagao M, et al. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death [J]. Neuroscience, 1997, 76(1): 105—116.
- [15] Forsythe JA, Jiang BH, Lyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1 [J]. Mol Cell Biol, 1996, 16: 4604—4613.
- [16] Tang Y, Pacary E, Freret T, et al. Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult mouse: identification of potential neuroprotective candidates for stroke [J]. Neurobiol Dis, 2006, 21(1): 18—28.
- [17] Yang ZJ, Bao WL, Qiu MH, et al. Role of vascular endothelial growth factor in neuronal DNA damage and repair in rat brain following a transient cerebral ischemia [J]. J Neurosci Res, 2002, 70(2): 140—149.
- [18] Jin KL, Mao X, Greenberg DA, et al. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia [J]. PNAS, 2000, 97: 10242—10247.
- [19] Matsuzaki H, Tamatani M, Yamaguchi A, et al. Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades [J]. FASEB J, 2001, 15: 1218—1220.
- [20] Jones MN, Bergeron M. Hypoxia preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain [J]. J Cereb Flow Metab, 2001, 21(9): 1105—1114.
- [21] Alkayed NJ, Goyagi T, Joh HD, et al. Neuroprotection and P450 2C11 upregulation after experimental transient ischemic attack [J]. Stroke, 2002, 33: 1677—1684.
- [22] Liu M, Alkayed NJ. Hypoxic preconditioning and tolerance via hypoxia inducible factor (HIF) 1 α -linked induction of P450 2C11 epoxide oxygenase in astrocytes [J]. Cerebral Blood Flow Metabolism, 2005, 25(8): 939—948.

更正

本刊 2007 年 22 卷第 2 期 162—164 页刊登的文章《社区康复治疗对脑卒中患者生存质量的影响》: 1.1 排除标准中的文字“新病例为病程不超过 3 个月, 既往病例为病程不超过 1.5 年”有误, 应列在纳入标准中。

特此更正并向读者致歉!