

文章编号: 1000-5862(2017)02-0155-05

香烟烟雾法肺动脉高压小鼠模型肺组织 HIF-1 α 和 Nrf2 表达

陈云芳¹, 王 胜², 钱自亮^{3*}

(1. 北京大学深圳研究生院化学学院, 广东 深圳 518055;

2. 广州医科大学附属第一医院研究所, 广州呼吸疾病研究所, 广东 广州 510120;

3. 中山大学第八附属医院, 广东 深圳 518033)

摘要: 以香烟烟雾熏烟法建立肺动脉高压(PAH)小鼠模型,将C57B6J小鼠随机分为对照组和模型组,每组10只,对照组小鼠不作任何处理,模型组采用香烟处理:每天2次,每次2h,10支/h,6d/周,连续6个月的建模方法;使用小鼠右心室压力测定仪(BIOPAC Systems, MP150)测定小鼠右心室压力(RVSP);将肺小动脉进行胶原纤维染色(Van-Gieson法),结合Image Pro Plus软件分析,测量肺小动脉血管的中层壁厚和肺小动脉血管的外径,计算肺小动脉厚度的变化;利用Western Blot法检测Nrf2和HIF-1 α 蛋白在肺组织的表达。结果表明:1)与对照组相比,模型组小鼠右心室压力明显增加,肺小动脉血管壁明显增厚,管腔变狭窄,右心室与体重的比值显著增加;2)与对照组相比,模型组小鼠肺组织HIF-1 α 蛋白表达明显增加,而Nrf2蛋白表达明显减少。研究结果意味着:HIF-1 α 与Nrf2在香烟烟雾法建立的肺动脉高压小鼠肺组织中表达异常。

关键词: 肺动脉高压; 吸烟; 低氧诱导因子1 α ; 转录因子NF-E2相关因子2

中图分类号: Q 813; R 73-3 文献标志码: A DOI: 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2017.02.09

0 引言

肺动脉高压是一种以肺血管收缩和血管重构为主要特点的难治性疾病^[1-2],其5年生存率仅为25%,其病因、病理过程一直受到极大的关注,但目前仍然未完全阐明。许多临床和实验资料证实,吸烟是许多肺疾病和心脑血管及肺内恶性肿瘤的主要病因之一^[3-4]。香烟的烟雾及微粒中含有多种有害成分^[5-6],这些有害物质随吸烟动作以烟雾的形式进入人体肺部,破坏机体的氧化/抗氧化平衡^[7],导致慢性支气管炎^[8]、肺气肿等肺损伤,最终往往导致肺动脉压力升高甚至死亡^[9]。HIF-1(低氧诱导因子-1, Hypoxia Inducible Factor-1)是体内与低氧密切相关的重要的转录因子^[10-11]。有研究表明,HIF-1 α 的表达水平与肺组织的炎症程度呈正相关,有可能参与了肺动脉高压的发生发展过程^[12]。Nrf2(核转录因子红细胞系-2相关因子-2, Nuclear factor erythroid-2 Related Factor 2)是机体内源性抗氧化应

激的重要转录因子之一^[13],可诱导II相解毒酶以及相关抗氧化蛋白的表达,来对抗外界炎症等因素对机体造成的损伤。然而,对它们在肺部疾病如肺动脉高压中的作用及表达的变化依然不清楚。本研究采用香烟烟雾的方法建立小鼠肺动脉高压模型,并观察肺动脉高压病程中的Nrf2和HIF-1 α 的表达的变化,希望有助于了解Nrf2和HIF-1 α 在肺动脉高压发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

雄性C57B6J小鼠:6~8周,21~26g,均由广东省实验动物中心提供。动物所经过(AAALAC,国际实验动物管理评鉴及认证协会)认证。本实验遵守实验动物福利伦理原则,动物处理程序经过三峡大学第一临床医学院伦理委员会认证。Nrf2、HIF-1 α 、 β -Tubulin抗体均购自abcam。

收稿日期: 2016-10-15

基金项目: 国家自然科学基金(30971166)和深圳市科技计划基础研究(JCYJ20140416094256880)资助项目。

通信作者: 钱自亮(1964-)男,湖南隆回人,主任医师,博士,主要从事疼痛的机制与治疗研究。E-mail: Ziliangqian16@163.com

1.2 模型制备与实验方法

1.2.1 模型制备 C57B6J 小鼠随机分为对照组和模型组, 每组 10 只. 模型组小鼠置于自制熏烟箱中进行被动吸烟(香烟: 红玫, 广东中烟工业有限公司出品). 香烟处理为每天 2 次, 上下午各一次, 每次 2 h(每小时换气 5~10 min), 上下午间隔 3~4 h, 10 支/h 6 d/周, 连续 6 个月. 正常对照组小鼠不作任何处理. 实验过程中, 每周记录小鼠的体重变化.

1.2.2 右心室压力测定 麻醉小鼠后, 使用小鼠右心室压力测定仪(BIOPAC Systems, MP150) 测定小鼠右心室压力(RVSP).

1.2.3 右心室形态的变化 处死小鼠后, 取出心脏, 用剪刀剪去心房部分以及游离的大血管, 然后再沿着房室间隔将右心室剪下, 称质量, 并计算右心室质量与体质量之比.

1.2.4 肺组织病理组织学观察及肺动脉形态学变化 肺组织用 4% 多聚甲醛和 4% 蔗糖溶液各固定 24 h, PBS 冲洗后石蜡包埋, 切片进行 HE 染色, 对直径在 50~100 μm 以内的肺小动脉进行胶原纤维染色(Van-Gieson 法), 应用 Image Pro Plus 软件对图像进行分析, 方法如下: 测量肺小动脉血管的中层壁厚(用 MT 表示), 以及肺小动脉血管的外径(用 ED 表示), 并按照公式按公式 $MT\% = MT/ED \times 100\%$ 来计算肺小动脉血管的中层厚度占管腔直径的百分比, 以此反映肺小动脉厚度的变化, 计算出均数.

1.2.5 Nrf2 和 HIF-1 α 在肺组织中的表达情况 用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷 PBS 洗涤小鼠肺组织, 洗涤 3 次, 每个样品加入 1 mL 准备好的细胞裂解液, 置于冰上裂解 30 min, 收集裂解产物, 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 12 000 rpm 离心 15 min, 收集上清冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 待用. 应用 western blot 方法检测肺组织中 Nrf2 和 HIF-1 α 蛋白的含量.

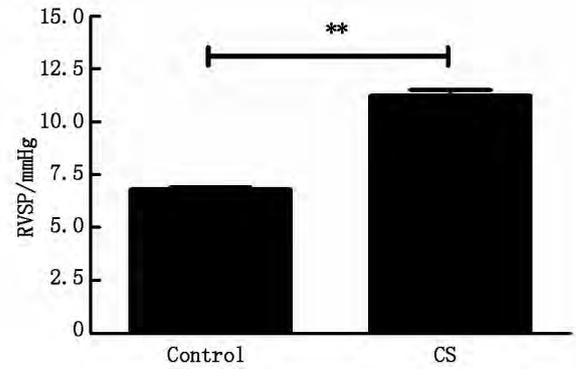
1.3 统计学分析

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 来表示. 应用 Student-t 分析方法对对照组和模型组的均数进行分析比较. 以 $p < 0.05$ 来判断差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 右心室收缩压(RVSP)的变化

熏烟 6 个月后, 对照组小鼠 RVSP 为 (6.78 ± 0.11) mmHg, 熏烟组小鼠 RVSP 较对照组小鼠明显增加, 为 (11.22 ± 0.29) mmHg, $p < 0.01$ (见图 1).

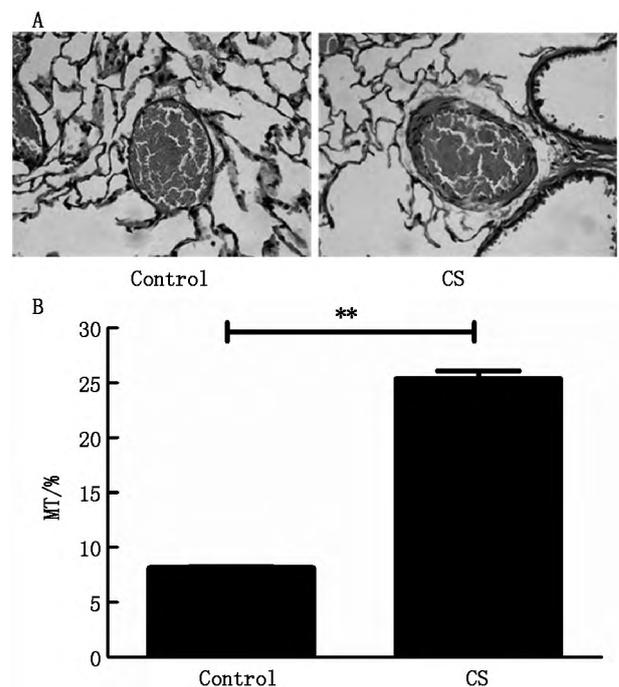


** : $p < 0.01$.

图 1 熏烟 6 个月后小鼠右心室压力的变化.

2.2 熏烟小鼠的肺组织病理学改变和肺动脉中层厚度的变化

相对于正常组小鼠, 模型组小鼠肺组织病理学结果显示, 肺小动脉血管壁明显增厚, 管腔狭窄(见图 2(A)), 表明有血管重塑的发生. VG 染色结果显示, 熏烟小鼠 $MT\%$ 为 25.40 ± 0.69 , 明显高于对照组小鼠的 8.16 ± 0.12 , $p < 0.01$ (见图 2(B)), 提示其管腔已经变得狭窄.



** : $p < 0.01$.

图 2 A) 肺组织 HE 染色, HE $\times 400$; B) 肺动脉中层厚度的变化

2.3 右心室肥厚程度变化

熏烟 6 个月后, 相对于对照组小鼠, 熏烟小鼠右心室与体质量的比值为 0.00079 ± 0.00002 , 较对照组 0.00058 ± 0.00002 有显著增加, $p < 0.01$ (见图 3).

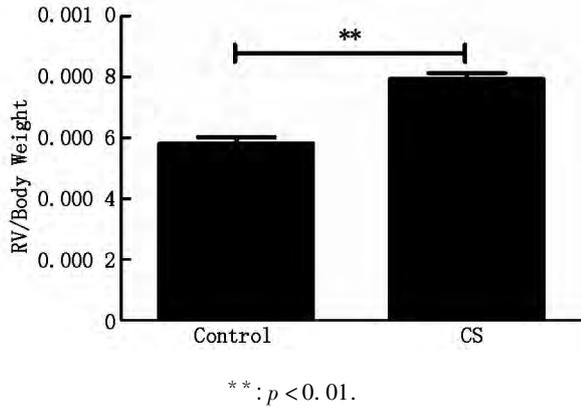


图 3 2 组小鼠右心室肥厚程度的比较

2.4 小鼠肺组织中 Nrf2 和 HIF-1 α 的表达

在对照组小鼠, HIF-1 α 蛋白表达极低, 而在 PAH 模型组小鼠肺组织, HIF-1 α 蛋白水平明显增加(见图 4), 说明长期熏烟可能造成了小鼠肺部相对低氧的环境, 促进了 HIF-1 α 的表达. 另一方面, 相对于对照组小鼠, PAH 模型组小鼠肺组织中 Nrf2 的含量明显减少(见图 4), 说明在熏烟 6 个月后, 小鼠体内抗氧化因子受到明显的抑制, 表明机体的氧化抗氧化系统已受到严重损伤而无法修复.

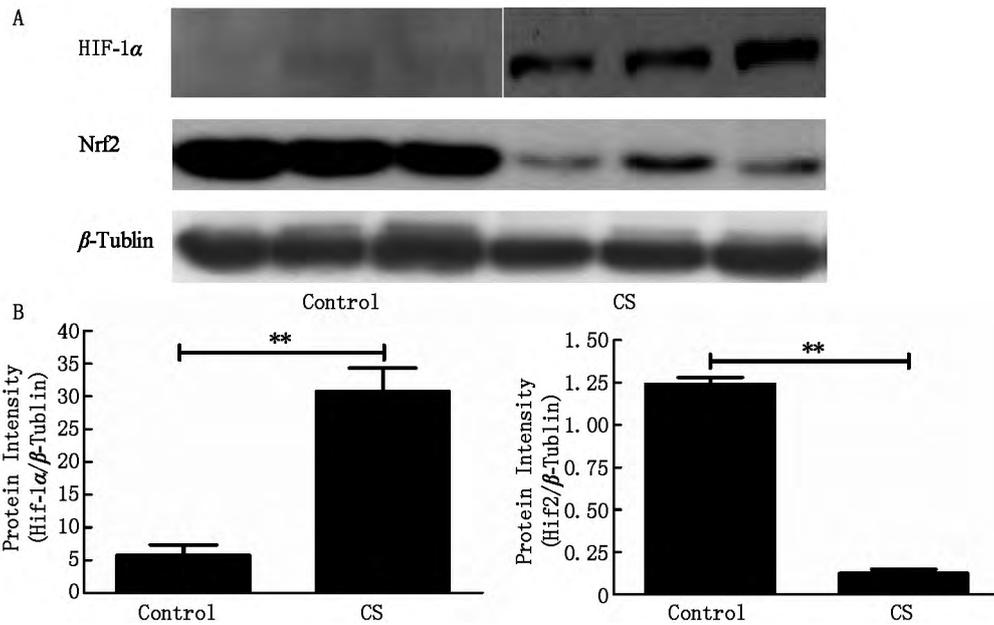


图 4 western 检测各组肺组织中 Nrf2 和 HIF-1 α 的表达

3 讨论

流行病学调查表明, 肺动脉高压(PAH) 在临床上极为常见^[14], 而且恶性程度极高, 在人群中的发病率仅次于高血压和冠心病, 5 年生存率只有 25%. 血管收缩和血管重构是构成肺动脉高压的主要病理基础: 血管收缩是功能性的改变, 即导致血压升高; 而血管重构则是组织器质性的改变, 它最终会导致右心室肥厚甚至肺功能衰竭^[15].

有研究表明, PAH 的发生与吸烟有密切的联系. 长期吸入烟草中含有的多种有害成分和各种粉尘颗粒, 可导致慢性支气管炎、肺气肿等肺损伤, 最终往往导致肺动脉压力升高甚至死亡^[16]. 鉴于吸烟和 PAH 的相关性, 建立熏烟相关的 PAH 动物模型是研究 PAH 发生发展过程的重要途径. 目前已有研

究应用联合脂多糖滴鼻和熏烟的方法建立模型来模拟患者因感染而造成的急性加重并导致肺动脉压力升高的临床表现, 亦有应用单纯熏烟的方法建立 PAH 模型来研究熏烟与肺动脉高压的关系. 在本研究中, 以小鼠作为研究对象, 应用单纯长期熏烟的方法建立 PAH 模型, 结果发现, 熏烟 6 个月后, 小鼠右心室压力与对照组相比明显增高, 肺动脉管壁明显增厚, 右心室明显肥厚, 表明熏烟诱导的 PAH 模型建立成功.

HIF-1(低氧诱导因子-1, Hypoxia Inducible Factor-1) 是体内与低氧相关的重要的转录因子, 广泛存在于哺乳动物和人体内, 是目前研究缺氧性疾病的热门分子之一^[17-18]. 有研究表明, HIF-1 α 的表达水平与肺组织的炎症程度呈正相关, 并可能参与了气道重塑和肺动脉高压的形成^[19]. 但对于 HIF-1 α 与肺部疾病的关系的研究目前还只是停留在急性炎症

方面,而关于 HIF-1 α 在慢性炎症性疾病如肺动脉高压中的作用目前仍然不清楚.在本研究中,检测了肺动脉高压小鼠肺组织中 HIF-1 α 的表达,结果表明,在对照组小鼠肺组织中,HIF-1 α 蛋白的表达极低,而在 PAH 模型组小鼠肺组织中,HIF-1 α 蛋白的表达明显增多,提示 HIF-1 α 在慢性炎症性疾病如肺动脉高压中有重要作用.

另一方面,在机体内,Nrf2/ARE 通路是机体用以对抗外来物质以及氧化损伤的关键环节.Nrf2 可通过与抗氧化基因的转录元件 ARE(抗氧化反应元件,Antioxidant Response Element)相互作用,诱导 II 相解毒酶以及相关抗氧化蛋白的表达,从而抵抗外界炎症等因素对机体造成的损伤.也有研究表明^[20] 缺氧可抑制 Nrf2 的表达,进而抑制 Nrf2 相关的抗氧化基因的表达.在本研究中,检测了对照组及 PAH 模型组小鼠肺组织中 Nrf2 蛋白的含量,发现肺动脉高压小鼠肺组织中 Nrf2 含量较对照组小鼠明显降低,表明长期熏烟可能已经严重损害了机体的抗氧化系统,这可能进一步促进了肺动脉压的发生发展.但对于 Nrf2 与 HIF-1 α 是否有关联以及其关系如何仍然不清楚.

长期熏烟后,小鼠体内 Nrf2 表达显著下降,而 HIF-1 α 则明显升高,推测 Nrf2 与 HIF-1 α 在熏烟造成的肺动脉高压的发生发展的进程中发挥了重要作用:一方面,长期熏烟可能造成了肺部相对缺氧的环境,从而使得 HIF-1 α 的表达异常升高,导致血管壁增厚,压力升高;另一方面,长期熏烟可能严重损害了体内的抗氧化系统,抑制了 Nrf2 及其下游抗氧化基因的表达,使得机体无法对抗氧化损伤,从而进一步促进了病情的进展.但 HIF-1 α 与 Nrf2/ARE 通路在肺动脉高压病程进展中的具体作用仍然有待进一步的研究.

4 参考文献

- [1] 朱锋,熊长明.肺动脉高压研究进展[J].心血管病学进展,2011,32(2):167-170.
- [2] 荆志成.我国肺动脉高压专家共识阐释[J].中国实用内科杂志,2007,27(4):246-249.
- [3] 翁心植.慢性肺心病研究成果和待解决的问题[J].中华内科杂志,1994,11:725-727.
- [4] 程显声,李景周,张珍祥,刘国华,华毅,李清.吸烟与慢性阻塞性肺疾病发病率的关系[J].中华结核和呼吸杂志,1999(5):290-292.
- [5] 卢纯惠.吸烟烟气中的有害成分[J].环境与健康杂志,1987(4):40-41.
- [6] 朱坐峰.香烟烟雾中的有害成分及其危害性的探究.空中英语教室:社会科学版,2010(12):164-167.
- [7] Domej W, Oetl K, Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD: implications and relevance for treatment[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2014, 17(9): 1207-1224.
- [8] 高儒.吸烟与慢性支气管炎[J].承德医学院学报,1989(3):151-153.
- [9] Ebrahimi H, Sahebigh M H, Ghofranipour F, et al. Experiences of adult smokers from the concepts of smoking: A content analysis[J]. Iran J Nurs Midwifery Res, 2014, 19(6): 550-557.
- [10] López-Hernández BI, Ceña V, Posadas I. The endoplasmic reticulum stress and the HIF-1 signaling pathways manage the neuronal damage during chemical hypoxia[J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(11): 2838.
- [11] Zhang Jing, Sattler M, Tonon G, et al. Targeting angiogenesis via a c-Myc/hypoxia-inducible factor-1 α -dependent pathway in multiple myeloma[J]. Cancer Res, 2009, 69(12): 5082-5090.
- [12] Tao Hongchen, Luo Wenjun, Pei Houshuang, et al. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 α in patients with chronic obstructive pulmonary disease and smokers with normal lung function[J]. Xibao Yufen Zimian Yixue Zazhi, 2014, 30(8): 852-855.
- [13] Choi B H, Kang K S, Kwak M K. Effect of redox modulating NRF2 activators on chronic kidney disease[J]. Molecules, 2014, 19(8): 12727-12759.
- [14] Jansa P, Jarkovsky J, Al-Hiti H, et al. Epidemiology and long-term survival of pulmonary arterial hypertension in the Czech Republic: a retrospective analysis of a nationwide registry[J]. BMC Pulm Med, 2014, 15: 14-45.
- [15] Freund-Michel V, Khoyarattee N, Savineau J P, et al. Mitochondria: roles in pulmonary hypertension[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 55: 93-97.
- [16] Wright J L, Zhou S, Churg A. Pulmonary hypertension and vascular oxidative damage in cigarette smoke exposed eNOS(-/-) mice and human smokers[J]. Inhal Toxicol, 2012, 24(11): 732-740.
- [17] Shi Dingbo, Guo Wei, Chen Wangbin, et al. Nicotine promotes proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells by regulating α 7AChR, ERK, HIF-1 α and VEGF/PEDF signaling[J]. Plos One, 2012, 7(8): e43898.
- [18] Guo Lili, Li Lin, Wang Weiqiang, et al. Mitochondrial reactive oxygen species mediates nicotine-induced hypoxia-inducible factor-1 α expression in human non-small cell lung cancer cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(6): 852-861.

- [19] Huang Zhichao ,Xu Ran ,Lü Chen ,et al. A chronic obstructive pulmonary disease negatively influences the prognosis of patients with bladder urothelial carcinoma via hypoxia inducible factor-1 α [J]. *Int J Clin Exp Med* 2014 , 7(10) : 3344-3353.
- [20] Kolamunne R T ,Dias I H ,Vernallis A B ,et al. Nrf2 activation supports cell survival during hypoxia and hypoxia/reoxygenation in cardiomyoblasts; the roles of reactive oxygen and nitrogen species [J]. *Redox Biol* ,2013 ,1(1) : 418-426.

The Expression of HIF -1 α and Nrf2 in the Lung of Pulmonary Arterial Hypertension Mice

CHEN Yunfang¹ ,WANG Sheng² ,QIAN Ziliang^{3*}

(1. Peking University Shenzhen Graduate School ,Shenzhen Guangdong 518055 ,China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University ,Guangzhou Institute Of Respiratory Diseases , Guangzhou Guangdong 510120 ,China; 3. The Eight Affiliated Hospital ,Sun Yat-sen University ,Shenzhen Guangdong 518033 ,China)

Abstract: Use cigarette smoke to establish pulmonary hypertension(PAH) mice model ,C57B6J mice were randomly divided into control group and model group ,each group of 10 ,control group don't make any processing ,model group deal with cigarette: 2 times a day ,every time 2 h ,10 piece/h ,6 days/week ,stick to 6 months to establish model; Use the mouse right ventricular pressure tester (BIOPAC Systems ,MP150) measure right ventricular pressure (RVSP) of mice; Use pulmonary arteriole make collagen fiber staining(Van Gieson method) ,combined with the Image Pro Plus software analysis ,Measure pulmonary small arteries middle wall thickness and pulmonary small artery diameter ,calculate the thickness of pulmonary arterioles change; Use Western Blot method to detect Nrf2 and HIF-1 α protein expression in lung tissue. The results showed that: 1) Compared with control mice ,the right ventricular systolic pressure was increased significantly ,the thickening of lung small artery wall and pulmonary stenosis were occurred ,and the ratio of right ventricular /weight was significantly increased in model mice. 2) The expression of HIF-1 α was significantly increased ,while the in the expression of Nrf2 was significantly reduced in model mice compared with control mice. The results mean: HIF-1 α and Nrf2 had an abnormal expression in PAH mice.

Key words: pulmonary arterial hypertension; cigarette; HIF-1 α ; Nrf2

(责任编辑: 刘显亮)