

低氧对大鼠肝肾组织内红细胞生成素和低氧诱导因子-1 α 基因表达的影响

陈伟 陈家佩 葛世丽 从玉文 付小兵

【摘要】 目的 观察急性低氧和间断低氧习服对大鼠肝、肾组织内红细胞生成素(EPO)及其调控蛋白低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)基因表达的影响。**方法** 用低压舱模拟高原低氧环境,进行 3 000 m 2 周、5 000 m 2 周低氧训练,使大鼠达到低氧习服状态后,采用 Northern 斑点杂交研究间断低氧习服前后,8 000 m 4 h 低氧处理的大鼠肝、肾组织内 EPO 和 HIF-1 α 基因表达的变化。**结果** 与常氧对照组相比,急性低氧处理的大鼠肝、肾组织内 EPO 基因表达都明显增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而间断低氧习服后,同样的低氧处理的大鼠肝、肾组织中 EPO 基因表达都明显低于急性低氧组($P<0.01$),EPO mRNA 含量与常氧对照组水平差异不显著($P>0.05$)。急性低氧处理的大鼠肝组织中 HIF-1 α 基因表达水平明显高于常氧对照组和间断低氧习服组(P 均 <0.01),而在不同处理的肾组织中,该基因表达水平差异不明显(P 均 >0.05)。**结论** 急性低氧能够刺激肝、肾组织内 EPO 基因表达;而间断低氧习服的大鼠耐低氧能力明显增强,肝、肾组织内 EPO 基因表达水平可恢复到常氧对照组水平。HIF-1 α 在低氧影响 EPO 基因表达的过程中可能起着重要的调节作用。

【关键词】 低氧,急性; 间断低氧习服; 红细胞生成素; 低氧诱导因子-1 α

中图分类号: Q786;R594.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-0603(2004)01-0009-04

Effects of acute hypoxia and intermittent hypoxic acclimatization on erythropoietin and hypoxia-inducible factor-1 α gene expression in rat hepatic and renal tissues CHEN Wei*, CHEN Jia-pei, GE Shi-li, CONG Yu-wen, FU Xiao-bing. * PLA Key Laboratory for Burn and Repair, 304 th Hospital, Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To explore the effects of acute hypoxia and intermittent hypoxic acclimatization on gene expression of erythropoietin (EPO) and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in rat hepatic and renal tissues. **Methods** Twenty-four rats (weight was 180 to 220 g) were divided into three groups: normal control group (NC), intermittent hypoxic acclimatization (IH) and acute hypoxia groups (AH). Gene expression of EPO and HIF-1 α were examined with Northern dot blot method. **Results** As compared with NC group, the levels of EPO gene expression in rat hepatic and renal tissues in AH group were both significantly elevated ($P<0.05$ or $P<0.01$). In IH group, the contents of EPO mRNA in hepatic and renal tissues were apparently decreased versus AH group ($P<0.01$), whilst were not differently elevated in comparison with group NC ($P>0.05$). In hepatic tissue from AH group, the content of HIF-1 α mRNA were more than those in NC group and IH group, while the levels of gene expression of HIF-1 α were no substantial change in renal tissues from different groups (all $P>0.05$). **Conclusion** Hypoxic acclimatization can inhibit the increment of EPO gene expression induced by acute hypoxia in rat hepatic and renal tissues, in which HIF-1 α may play important roles.

【Key words】 acute hypoxia; hypoxic acclimatization; erythropoietin; hypoxia-inducible factor-1 α

CLC number: Q786;R594.3 **Document code:** A **Article ID:** 1003-0603(2004)01-0009-04

氧是人体以及其它哺乳动物维持生存的一种重要因素,低氧能够引起机体代谢紊乱,组织损伤^[1,2]。血液内红细胞是氧的运输载体,而红细胞生成主要由红细胞生成素(erythropoietin, EPO)调控。机体

在低氧条件下生活一段时间后,血液内 EPO 浓度显著升高,通过血液循环,与骨髓内的红系造血祖细胞细胞膜上的 EPO 受体特异性结合,促进红细胞的成熟和释放进入血液,提高血液内红细胞数量^[3-5]。机体合成和分泌 EPO 的主要部位是肾脏,由肾小管外周间质细胞形成,而肾外 EPO 主要来源是肝脏^[6]。在 EPO 基因 3'-端旁侧序列上存在低氧诱导增强子,是转录因子结合位点。在这些反式作用因子中,低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)尤为重要^[7-9]。本研究旨在探讨低氧习服后 EPO 基因的表达变化规律及其调节机制,以期揭

基金项目:国家自然科学基金重点课题资助项目(39730190);国家重点基础研究规划项目(G1999054204)

作者单位:100037 北京,解放军第三〇四医院全军创伤修复重点实验室(陈伟,付小兵);军事医学科学院放射医学研究室(陈伟,陈家佩,葛世丽,从玉文)

作者简介:陈伟(1972-),男(汉族),安徽省安庆市人,医学博士,助理研究员,从事低氧生理和创伤修复机制的研究,发表论文 50 余篇。

示红系造血系统低氧习服的部分奥秘。

1 材料与方法

1.1 动物与分组:24 只国家卫生 2 级 Wistar 大鼠,合格证号 BDW98012,雌雄各半,体质量170~220 g,由军事医学科学院实验动物中心提供。动物随机分为 3 组,即常氧对照组(NC, $n=8$)、急性低氧组(AH, $n=8$)和间断低氧习服组(IH, $n=8$)。

1.2 动物处理:NC 组呼吸室内空气,常氧室温饲养;AH 组大鼠置于低压氧舱内,模拟海拔 8 000 m 高度低氧 4 h;IH 组大鼠置于模拟海拔 3 000 m 高度的低压氧舱内,4 h/d,持续 14 d,再置于模拟海拔 5 000 m 高度,4 h/d,持续 14 d,最后与 AH 组大鼠一起置于模拟海拔 8 000 m 高度低氧 4 h 后,处死大鼠,取肝、肾组织,并立即置于液氮内保存备用。

1.3 肝、肾组织的总 RNA 提取:用 Trizol 试剂(Gibcol 公司)一步法提取 NC 组和不同低氧处理大鼠的肝、肾组织中的总 RNA 后,用紫外分光分析和凝胶电泳检测所提取总 RNA 的质量和浓度。

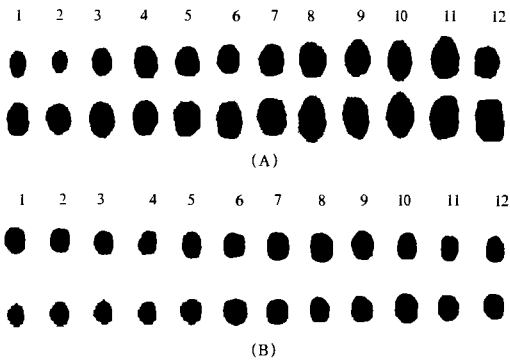
1.4 Northern 杂交:EPO 和 HIF-1 α 探针经扩增、回收、纯化后,用随机引物标记法标记探针。每份 RNA 样品,取 30 μ g 变性、电泳、转膜,紫外交联仪内固定后,将膜放入预杂交液内 65 $^{\circ}$ C 5 h。将含有 p³²-dATP 的探针加入 6.2 ml 杂交 A 液内 100 $^{\circ}$ C 变性后,加入 5.24 ml 杂交 B 液内 65 $^{\circ}$ C 预热。弃杂交管内的预杂交液加入杂交液,杂交仪内过夜。室温洗膜 2 min,60 $^{\circ}$ C 15 min 洗膜 2 遍。滤纸吸干后,将膜置-65 $^{\circ}$ C 放射自显影 24 h。

1.5 结果分析与统计学处理:用凝胶图像分析系统(UVP-GDS800,英国)对目的基因的 Northern 杂交结果进行灰密度测定。基因表达量是以目的基因的灰密度值与 β -actin 基因的灰密度值的比值表示。借助 SAS 软件对结果进行统计学处理,各组结果均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

2.1 不同低氧处理对大鼠肾组织 EPO 和 HIF-1 α 基因表达的影响:在所有被检测的不同低氧处理大鼠肾组织内,EPO 和 HIF-1 α 基因都有表达。如表 1 所示,与 NC 组相比,急性低氧后,大鼠肾组织内 EPO 基因表达水平显著升高($P<0.01$),表达水平是 NC 组的 1.61 倍。间断低氧习服后,肾组织中 EPO 基因的 mRNA 含量降低到与 NC 组相近的水平,灰密度比值是 NC 组的 1.20 倍,相互间差异不显著($P>0.05$,见图 1A)。在急性低氧和间断性低氧习服的大鼠肾组织中,HIF-1 α 基因的表达水平

分别是 NC 组的 1.22 倍和 1.19 倍,HIF-1 α 基因表达呈升高的趋势,但相互间差异不显著($P>0.05$,见图 1B)。在不同处理的大鼠肾组织中,作为内参的 β -actin 基因都有表达,并且该基因的表达水平的变化没有显著性差异($P>0.05$)。



注:1~4 为 NC 组,5~8 为 IH 组,9~12 为 AH 组

图 1 不同低氧处理对大鼠肾组织中 EPO(A)和 HIF-1 α (B)基因表达的影响

Fig. 1 Effects of acute hypoxia and intermittent hypoxic acclimatization on gene expression of EPO (A) and HIF-1 α (B) in renal tissues

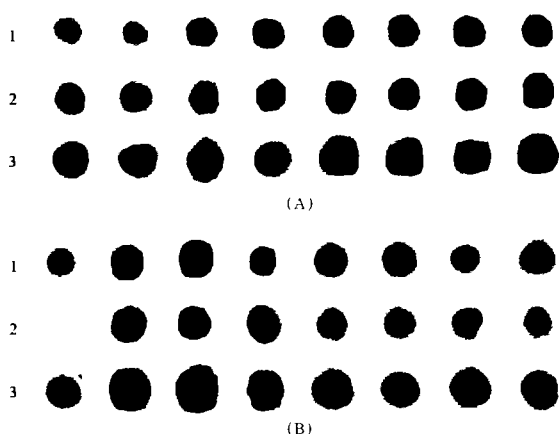
2.2 不同低氧处理对大鼠肝组织 EPO 和 HIF-1 α 基因表达的影响:如表 1 所示,经过 3 000 m 2 周、5 000 m 2 周低氧训练后,再经 8 000 m 4 h 的 IH 组大鼠肝组织内,EPO 基因 Northern 杂交结果的灰密度比值是 AH 组大鼠的(59.0 $\pm$ 12.2)%,基因表达明显降低($P<0.05$),是 NC 组的(121.7 $\pm$ 25.2)%,两者间差异不显著($P>0.05$,见图 2A)。与 NC 组相比,急性低氧的大鼠肝组织内 HIF-1 α 基因表达显著升高;而间断低氧习服后,大鼠肝组织内 HIF-1 α 基因表达水平明显低于 AH 组($P<0.01$),而与 NC 组大鼠的表达水平相接近,相互间差异不显著($P>0.05$,图 2B)。在不同处理的大鼠肝组织中,作为内参的 β -actin 基因都有表达,且其表达水平的变化无显著性差异($P>0.05$)。

表 1 不同低氧处理对大鼠肝、肾组织内 EPO 和 HIF-1 α 基因表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Tab. 1 Effects of acute hypoxia and intermittent hypoxic acclimatization on gene expression of EPO and HIF-1 α in rat hepatic and renal tissues($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	肾组织		肝组织	
	EPO	HIF-1 α	EPO	HIF-1 α
NC 组	18.6 $\pm$ 5.1	22.6 $\pm$ 6.8	14.3 $\pm$ 4.8	16.2 $\pm$ 3.1
IH 组	22.4 $\pm$ 3.5	27.0 $\pm$ 9.1	17.4 $\pm$ 3.6	13.4 $\pm$ 3.3
AH 组	29.9 $\pm$ 4.2* $\Delta\Delta$	27.6 $\pm$ 8.3	29.5 $\pm$ 4.2** Δ	24.7 $\pm$ 4.4** $\Delta\Delta$

注:与 NC 组比较:** $P<0.01$;与 IH 组比较: $\Delta P<0.05$,
 $\Delta\Delta P<0.01$



注:1 为 NC 组,2 为 IH 组,3 为 AH 组

图 2 不同低氧处理对大鼠肝组织中 EPO(A)和 HIF-1 α (B)基因表达的影响

Fig. 2 Effects of acute hypoxia and intermittent hypoxic acclimatization on gene expression of EPO (A) and HIF-1 α (B) in hepatic tissues

3 讨论

EPO 是调节红细胞生成的重要细胞因子,低氧能够促进 EPO 基因表达,不同低氧处理主要在转录水平影响 EPO 生成。在哺乳动物体内,肾脏是合成 EPO 的主要器官,肝脏也能够生成 EPO。本研究中发现,急性低氧能够引起大鼠肝、肾组织内 EPO 基因表达明显升高,大鼠经过低氧训练达到低氧习服状态后再经低氧处理 4 h,肝、肾组织内 EPO 基因表达降低到与 NC 组相近的水平。这一变化的机制可能是由于机体到达低氧习服后,机体在从外界获取氧能力增强的同时,提高了细胞对氧的利用率,维持机体生命活动所需要的能量^[10-12],最终导致机体对外界氧压降低的反应敏感性减弱,从而引起肝、肾组织内合成 EPO 量的下降。这一发现与以往的研究报道相似,Milledge 等^[13]发现,人体从平原进入高原 4 500 m 后,机体内 EPO 含量显著升高,持续 22 d 后,EPO 含量下降至平原对照组水平。

在低氧诱导 EPO 基因表达有关的顺式调节元件中,位于 EPO 基因 3'-端旁侧序列上的低氧诱导增强子的作用十分重要。该低氧诱导增强子由 50 bp 组成,其核苷酸序列有高度同源性,其中含有 HIF-1 特异性结合位点^[14-16]。低氧能够促进 HIF-1 与增强子结合后,上调 EPO 基因表达。HIF-1 是一种普遍存在的转录因子,由两种不同亚基(α 、 β)组成异二聚体,其中 β 亚基又称为芳香烃受体核转座子,在细胞内稳定表达,其细胞内含量和生物活性不受外界低氧作用的影响,因此低氧主要是通过 HIF-1 α 调

控 EPO 基因表达^[17-19]。本研究中发现,在肝组织中,不同低氧处理引起 HIF-1 α 和 EPO 基因表达的变化趋势相近似;而在不同低氧处理的大鼠肾组织内,HIF-1 α 基因表达差异不明显。这表明,在急性低氧和间断低氧习服过程中,肝组织内 HIF-1 在 EPO 基因表达变化的过程中可能起着重要的调节作用;而在肾组织内,除 HIF-1 外,可能还存在有其它调控因子和因素影响着 EPO 基因表达,具体机制将是我們下一步研究的方向。

参考文献:

- 1 付小兵,杨银辉,孙晓庆,等.激活内源性 bFGF 对肠缺血-再灌注所致肝肾及肠道损伤的保护作用[J].中国危重病急救医学,2000,12(2):69-72.
- 2 蒋礼先,付小兵,孙同柱,等.缺血-再灌注肌肉损伤中程序性细胞死亡的研究[J].中国危重病急救医学,1998,10(8):473-475.
- 3 Prass K, Scharff A, Ruscher K, et al. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin[J]. Stroke, 2003,34(8):1981-1986.
- 4 Cai Z, Manalo D J, Wei G, et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury[J]. Circulation, 2003, 108(1):79-85.
- 5 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]. J Neurosci, 2002, 22(23):10291-10301.
- 6 Jelkmann W, Hellwig-Burgel T. Biology of erythropoietin[J]. Adv Exp Med Biol, 2001, 502:169-187.
- 7 Obara N, Imagawa S, Nakano Y, et al. Suppression of erythropoietin gene expression by cadmium depends on inhibition of HIF-1, not stimulation of GATA-2[J]. Arch Toxicol, 2003, 77(5):267-273.
- 8 Figueroa Y G, Chan A K, Ibrahim R, et al. NF-kappaB plays a key role in hypoxia-inducible factor-1-regulated erythropoietin gene expression[J]. Exp Hematol, 2002, 30:1419-1427.
- 9 Huang L E, Arany Z, Livingston D M, et al. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its subunit[J]. J Biol Chem, 1996, 271(50):32253-32259.
- 10 蔡明春,柳君泽,吴利平,等.急、慢性低氧对大鼠脑线粒体蛋白翻译合成的影响[J].中国病理生理杂志,2002,18(9):1038-1041.
- 11 Heinicke K, Prommer N, Cajigas J, et al. Long-term exposure to intermittent hypoxia results in increased hemoglobin mass, reduced plasma volume, and elevated erythropoietin plasma levels in man[J]. Eur J Appl Physiol, 2003, 88(6):535-543.
- 12 Schmidt W. Effects of intermittent exposure to high altitude on blood volume and erythropoietic activity[J]. High Alt Med Biol, 2002, 3(2):167-176.
- 13 Milledge J S. Serum erythropoietin in human at high altitude and its relation to plasma renin[J]. J Appl Physiol, 1985, 59:360.
- 14 Ameri K, Burke B, Lewis C E, et al. Regulation of a rat VL30 element in human breast cancer cells in hypoxia and anoxia; role of HIF-1[J]. Br J Cancer, 2002, 87(10):1173-1181.
- 15 Michel G, Minet E, Mottet D, et al. Site-directed mutagenesis

- studies of the hypoxia - inducible factor - α DNA - binding domain[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1578(1 - 3): 73 - 83.
- 16 Stolze I, Berchner - Pfannschmidt U, Freitag P, *et al.* Hypoxia - inducible erythropoietin gene expression in human neuroblastoma cells[J]. Blood, 2002, 100(7): 2623 - 2628.
- 17 Kvietikoval I, Wenger R H, Marti H H, *et al.* The hypoxia - inducible factor - 1 DNA recognition site is cAMP - responsive [J]. Kidney Int, 1997, 51: 564 - 566.
- 18 Iyer N V, Kotch L E, Agani F, *et al.* Cellular and developmental control of O_2 homeostasis by hypoxia - inducible factor 1 α [J]. Genes, 1998, 12: 149 - 162.
- 19 Maxwell P H, Pugh C W, Ratcliffe P J. The pVHL - hIF - 1 system. A key mediator of oxygen homeostasis[J]. Adv Exp Med Biol, 2001, 502: 365 - 376.
- (收稿日期: 2003 - 10 - 12 修回日期: 2003 - 12 - 22)
(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

机械通气治疗急性中毒致呼吸衰竭 32 例

李嘉嘉

【关键词】 中毒; 急救; 呼吸衰竭; 机械通气

中图分类号: R605. 973 文献标识码: B 文章编号: 1003 - 0603(2004)01 - 0012 - 01

急性中毒导致呼吸衰竭在临床上很常见, 最有效的办法是机械通气(MV)治疗。我科 2000 年 1 月—2001 年 12 月抢救此类患者 32 例, 报告如下。

1 病例与方法

1.1 病例: 32 例患者中男 20 例, 女 12 例; 年龄 12~35 岁; 中毒药物: 有机磷农药中毒 20 例, 镇静安眠药中毒 8 例, 毒鼠强中毒 4 例。

1.2 治疗方法: 常规洗胃、导泻、灌肠、大量补液利尿、使用特殊解毒剂治疗, 纠正酸碱和电解质紊乱。对出现呼吸困难、紫绀的危重患者, 给予面罩给氧, 动脉血氧分压(PaO_2) <60 mm Hg(1 mm Hg = 0.133 kPa), 动脉血二氧化碳分压($PaCO_2$) >60 mm Hg, 呼吸频率 >35 次/min 或 <8 次/min, 立即气管插管行 MV 治疗。

1.3 MV 实施方法: 全部经口气管插管, 其中 8 例气管插管后改为气管切开。采用西门子 900C 型呼吸机。吸氧浓度(FiO_2)0.45~0.60, 吸:呼 = 1:1~2, 潮气量 6~8 ml/kg, 频率 10~22 次/min。另有 4 例患者加用呼吸末正压(PEEP, 3.75 cm H_2O (1 cm H_2O = 0.098 kPa) 通气, 呼吸部分改善后采用同步间歇指令通气(SIMV)或压力支持通气(PSV)。21 例患者停机过程使用 SIMV, 9 例患者用 PSV。常规给气道湿化、雾化, 根据

血气分析结果随时调整呼吸机参数, 监测心功能, 及时发现和处理心律失常及循环障碍。

2 结果

2.1 治疗效果: 使用 MV 后患者发绀迅速消失, 意识淡漠和反应迟钝者好转, 昏迷者在 24 h 内意识转清, 低氧血症、高碳酸血症得以纠正。28 例于 MV 后 2~7 d 自主呼吸恢复, 血气分析正常, 顺利脱机。2 例急性有机磷农药中毒致中间期综合征者由于使用呼吸机时间过长, 产生心理依赖, 经精神疗法和逐渐脱机方法于第 10 d 脱机。1 例由于湿化器加水后盖子未拧紧, 吸入气全部漏出, 患者窒息死亡。1 例毒鼠强中毒者由卫生院转入才确诊, 服药时间过长, 虽全力抢救, 仍死于多器官衰竭(MOF)。

2.2 MV 相关并发症: 气管插管过深造成单肺通气 1 例次, 气管导管脱出 1 例次, 痰液堵塞 10 例次, 气管黏膜糜烂、溃疡 2 例次, 窒息 1 例次, 通气不足 18 例次, 通气过度 21 例次, 呼吸机相关肺炎 23 例次。

3 讨论

急性中毒致呼吸衰竭, 在积极常规治疗的同时, 及时有效的机械通气治疗是抢救成功的关键, 这将大大降低急性中毒的医院病死率。

急性有机磷农药中毒(AOPP)致呼吸肌麻痹(RMP)的呼吸衰竭, 治疗原则仍是采用有效的机械通气, 为抗毒药物的使用赢得时间^[1]; 重复使用足量的复能剂是逆转呼吸肌麻痹的关键; 加强综合治疗可以促进患者恢复。三者应同时

进行, 可明显提高 AOPP 致 RMP 的救治成功率。

镇静安眠药急性中毒致呼吸衰竭在及时给机械通气的同时, 需积极使用纳洛酮、醒脑静、可拉明等催醒剂, 使患者尽快恢复自主呼吸, 减少机械通气的有创性, 促使尽早脱机。

毒鼠强中毒致心肌损害的报道已很多, 但毒鼠强中毒致癫痫持续状态仍是临床棘手的问题。我科在这方面积累了一定经验。如果给予鲁米钠和超大剂量的安定, 抽搐仍难控制, 应立即行气管插管、呼吸机支持呼吸, 在严密监视心电图的情况下, 用硫喷妥钠静脉麻醉, 及时控制抽搐。尽早使用 MV 可以防治抽搐引起的窒息, 可救治癫痫持续状态致脑水肿引起的呼吸衰竭, 可防治静脉麻醉引起呼吸骤停, 也可以纠正酸中毒, 防止其引发 MOF。

为了实施有效的 MV, 预防 MV 相关并发症的发生, 应注意调整导管深度; 防止痰栓阻塞气道; 防止气管黏膜损伤; 预防相关肺炎; 严密监护, 及时行血气分析, 适时调整呼吸参数。

参考文献:

- 1 吴力. 急性有机磷农药中毒致呼吸肌麻痹的机械通气治疗 30 例[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(9): 532.

(收稿日期: 2003 - 09 - 06

修回日期: 2003 - 10 - 29)

(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ①成都地奥: 替波定……………(封二)
- ②北京四环医药: 苏诺……………(封三)

作者单位: 661600 云南省开远市人民医院

作者简介: 李嘉嘉(1967 -), 女(彝族), 云南省开远市人, 主治医师, 从事急诊及重症监护, 发表论文 4 篇。