

# 低氧条件下沉默HIF-1 $\alpha$ 与TNF- $\alpha$ 、IL-6的相关性研究及人真皮微血管内皮细胞生物学行为的变化

罗 鸿 桂福强 刘 洪\* 张 矛 赵 渝

(重庆医科大学附属第一医院血管外科, 重庆 400016)

**摘要** 该文探讨了低氧条件下沉默缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )与肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素-6(interleukin-6, IL-6)的相关性及人真皮微血管内皮细胞生物学行为的变化。采用三气培养箱培养人真皮微血管内皮细胞,根据时间和氧浓度分组,确定最适培养时间及缺氧浓度。同时,构建靶向HIF-1 $\alpha$ 的腺病毒并感染人真皮微血管内皮细胞,分为对照组、空载组和沉默组。应用RT-PCR和Western blot检测HIF-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6的mRNA和蛋白质水平。Transwell检测细胞迁移能力,流式细胞技术观察细胞凋亡及细胞周期变化。结果显示,缺氧条件下,HIF-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6的表达随缺氧时间延长而增加,随氧浓度降低而增加。与对照组相比,沉默组的细胞迁移能力( $P<0.01$ )及周期( $P<0.01$ )均明显抑制,细胞凋亡明显增加( $P<0.01$ )。与对照组相比,沉默组TNF- $\alpha$ 和IL-6的mRNA和蛋白质水平均减少( $P<0.01$ )。由此可见,缺氧条件下,HIF-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6的表达呈时间依赖性和氧浓度递减依赖性。人真皮微血管内皮细胞HIF-1 $\alpha$ 的表达与炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6具有明显的正相关。沉默HIF-1 $\alpha$ 后,能明显抑制细胞增殖,抑制细胞迁移,促进细胞凋亡。

**关键词** 缺氧诱导因子;人真皮微血管内皮细胞;静脉性溃疡;生物学行为;炎症因子

## The Relationship among HIF-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ and IL-6 and the Change of the Biological Behavior of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells after Silencing HIF-1 $\alpha$ Gene under Hypoxia

Luo Hong, Gui Fuqiang, Liu Hong\*, Zhang Mao, Zhao Yu

(Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** This work is aimed to study the relationship among hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) and observe the change of the biological behavior of human dermal microvascular endothelial cells (HDMECs) after silencing HIF-1 $\alpha$  gene under hypoxia. A three-gas incubator was used to cultured the HDMECs, which were grouped by the time and oxygen concentration to determine the optimum culture time and hypoxia concentration. Meanwhile, adenovirus targeting HIF-1 $\alpha$  was constructed and infected HDMECs. The HDMECs were divided into control group, non-HIF-1 $\alpha$ -siRNA group and HIF-1 $\alpha$ -siRNA group. RT-PCR and Western blot were then used to detect the mRNA and protein levels of HIF-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  and IL-6, respectively. The cell migration ability was detected by Transwell, and apoptosis and cycle changes were observed by flowcytometry.

收稿日期: 2017-08-14 接受日期: 2017-10-30

重庆市卫生计生委医学科研项目(批准号: 20141002)资助的课题

\*通讯作者: Tel: 023-89011232, E-mail: liuhong6261@163.com

Received: August 14, 2017 Accepted: October 30, 2017

This work was supported by Chongqing Family Planning Commission for Medical Research (Grant No.20141002)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-89011232, E-mail: liuhong6261@163.com

网络出版时间: 2018-01-08 17:25:54

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180108.1725.008.html>

Under hypoxia, the gene expressions of *HIF-1 $\alpha$* , *TNF- $\alpha$*  and *IL-6* increased with the increase of hypoxia time, and increased with the decrease of oxygen concentration. Compared with the control group, the cell migration ability ( $P<0.01$ ) and the cycle ( $P<0.01$ ) of the HIF-1 $\alpha$ -siRNA group were significantly inhibited, and the apoptosis was significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with the control group, the mRNA and protein levels of *TNF- $\alpha$*  and *IL-6* genes in HIF-1 $\alpha$ -siRNA group were decreased ( $P<0.01$ ). So, under hypoxia, the gene expressions of *HIF-1 $\alpha$* , *TNF- $\alpha$*  and *IL-6* were in time dependent and oxygen concentration decreasing dependent manner. The expression of HIF-1 $\alpha$  in HDMECs was positively related to inflammatory factors TNF- $\alpha$  and IL-6. Silencing *HIF-1 $\alpha$*  can obviously inhibit cell proliferation, inhibit cell migration and promote apoptosis.

**Keywords** hypoxia inducible factor; human dermal microvascular endothelial cells; venous ulcer; biological behavior; inflammatory factors

下肢静脉溃疡是一种常见的下肢慢性疾病, 欧美国发病率为1.0%~2.0%<sup>[1]</sup>, 我国为0.4%~1.3%<sup>[2]</sup>, 并随着年龄的增加而增高<sup>[3]</sup>, 年龄大于65岁人群中发病率高达5.0%<sup>[4]</sup>。慢性静脉溃疡的具体发生机制非常复杂, 至今尚未完全阐明, 但研究证实, 慢性静脉功能不全导致静脉高压是溃疡发生的病理生理基础<sup>[5]</sup>。在下肢静脉溃疡中, 静脉高压引起皮肤微循环改变、组织缺氧、炎性因子释放(如白介素类、肿瘤坏死因子等), 从而导致静脉溃疡的形成<sup>[6]</sup>。

临床上, 通过经皮氧分压测量发现溃疡周围组织氧分压低于正常组织, 提示溃疡周围存在缺氧现象<sup>[7]</sup>。在缺氧环境中, 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )发挥着重要调控作用, 在细胞代谢<sup>[8-9]</sup>和炎症反应<sup>[10]</sup>等方面都起着重要的调控作用。

人真皮微血管内皮细胞(human dermal microvascular endothelial cells, HDMECs)是衬附于皮肤微血管内壁的一种细胞<sup>[11]</sup>, 参与构成组织与血液之间的屏障<sup>[12]</sup>, 是皮肤微循环功能障碍影响的第一靶细胞。HDMECs通过释放炎性细胞因子和趋化因子, 在炎症形成中扮演着关键的角色<sup>[13]</sup>。肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )作为一个炎性细胞因子, 作用于毛细血管内皮细胞后, 能导致白细胞募集、血栓形成及组织硬化等炎性反应。白介素-6(interleukin-6, IL-6)有许多炎性免疫功能, 在静脉溃疡的炎性反应形成中也发挥着重要作用。

目前, HIF-1 $\alpha$ 在下肢静脉溃疡中的研究报道甚少。因此, 我们通过模拟低氧环境培养人真皮微血管内皮细胞, 用腺病毒沉默HIF-1 $\alpha$ 基因, 检测细胞中HIF-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6等基因的表达变化, 以探讨缺氧条件下HIF-1 $\alpha$ 与TNF- $\alpha$ 、IL-6的相互关系; 同时, 观察沉默HIF-1 $\alpha$ 后人真皮微血管内皮细胞生物学行

为的变化, 进而探讨静脉性溃疡发生的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

HDMECs购自北京北纳创联生物技术研究院; 三气培养箱、CO<sub>2</sub>培养箱均购自美国Thermo公司; Trizol、逆转录试剂盒购自日本TaKaRa公司; PCR引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司; BCA蛋白质浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制胶试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 兔抗人HIF-1 $\alpha$ 抗体、兔抗人IL-6、兔抗人TNF- $\alpha$ 抗体购自沈阳万类生物科技有限公司; 山羊抗兔二抗购自武汉博士德生物工程有限公司; 腺病毒购自武汉维诺赛生物科技有限公司。

### 1.2 细胞株

细胞培养基由10%新生小牛血清和RPMI 1640组成, 37 °C条件下置于含有21% O<sub>2</sub>及5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。

### 1.3 腺病毒感染

细胞传代计数接种培养板, 当细胞汇合度达80%~90%时换液, 加入腺病毒, 培养2~3 d, 在荧光显微镜下观察带有绿色荧光蛋白标记的细胞情况。

### 1.4 沉默HIF-1 $\alpha$ 对细胞迁移性的影响

利用Transwell实验检测人真皮微血管内皮细胞对照组、空载组及沉默组的细胞迁移能力。收集各组对数期细胞制备悬液, 24孔板中置入小室, 小室内加入200  $\mu$ L无血清培养基, 小室外加入600  $\mu$ L有血清培养基, 接种细胞于小室中, 每孔细胞计数约 $2\times 10^4$ 个。置入三气培养箱低氧(1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub>)培养24 h, 于倒置显微镜下观察细胞形态及迁移状况并采集图像。

### 1.5 沉默HIF-1 $\alpha$ 对细胞凋亡的影响

培养人真皮微血管内皮细胞,待细胞进入对数期时,将对照组、空载组和沉默组同时置入三气培养箱培养24 h(1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub>),PBS清洗2~3次,加入1 mL胰蛋白酶消化1 min,再加入培养基中和,然后1 000 r/min离心5 min,最后加入1 mL PBS重悬,保存在1.5 mL EP管中,进行细胞凋亡检测,记录检测结果。

### 1.6 沉默HIF-1 $\alpha$ 对细胞周期的影响

培养人真皮微血管内皮细胞,待细胞进入对数期时,将对照组、空载组和沉默组同时置入三气培养箱培养24 h(1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub>),PBS清洗2~3次,加入1 mL胰蛋白酶消化1 min,再加入培养基中和,然后放入低温(4 °C)离心机中1 000 r/min离心5 min,最后加入1 mL预冷的75%乙醇重悬并震荡,保存在1.5 mL EP管中,进行细胞周期检测,记录检测结果。

### 1.7 RT-PCR检测

培养人真皮微血管内皮细胞,待细胞进入对数期时,将对照组、空载组和沉默组同时置入三气培养箱中培养48 h(1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub>)。常规使用Trizol提取总RNA,以日本TaKaRa公司的Premier作为引物进行逆转录反应。以生工生物工程(上海)股份有限公司设计的引物进行扩增反应。引物设计如下。HIF-1 $\alpha$ 上游引物:5'-TGC AAC ATG GAA GGT ATT GC-3',下游引物:5'-TTC ACA AAT CAG CAC CAA GC-3';TNF- $\alpha$ 上游引物:5'-AAC CTC CTC TCT GCC ATC AA-3',下游引物:5'-CTG AGT CGG TCA CCC TTC TC-3';IL-6上游引物:5'-CAC ACA GAC AGC CAC TCA CC-3',下游引物:5'-AGT GCC TCT TTG CTG CTT TC-3';GAPDH上游引物:5'-AAT TGA ATG AGG AGC AGG TCG A-3',下游引物:5'-CCT GTC CTT CTT CGC CTC GTA-3'。PCR反应条件为:95 °C 30 s;95 °C 5 s;60 °C 30 s(39个循环);95 °C 15 s;60 °C 30 s;95 °C 15 s。

### 1.8 Western blot分析

培养人真皮微血管内皮细胞,待细胞进入对数期时,将对照组、空载组和沉默组同时置入三气培养箱中培养48 h(1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub>)。提取各组细胞总蛋白,经变性、电泳、转膜后,5%脱脂牛奶封闭,分别加入兔抗人HIF-1 $\alpha$ (1:500)、TNF- $\alpha$ (1:500)、IL-6(1:1 000)、 $\beta$ -actin(1:2 000)抗体,4 °C

过夜孵育,TBST清洗3次,每次10 min,加入山羊抗兔二抗(1:3 000),室温孵育2 h,TBST清洗3次,每次10 min,ECL发光液显影,观察结果,采用Fusion-Capt软件进行目的条带灰度值分析。

### 1.9 统计学分析

均采用SPSS 20.0进行分析。两组间的比较采用成组的 $t$ 检验。实验定量资料均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,其他数据采用单因素方差分析进行统计学分析,以 $P<0.05$ 作为显著性指标,所有实验至少重复3次。

## 2 结果

### 2.1 不同缺氧时间对HIF-1 $\alpha$ 及IL-6、TNF- $\alpha$ 基因表达的影响

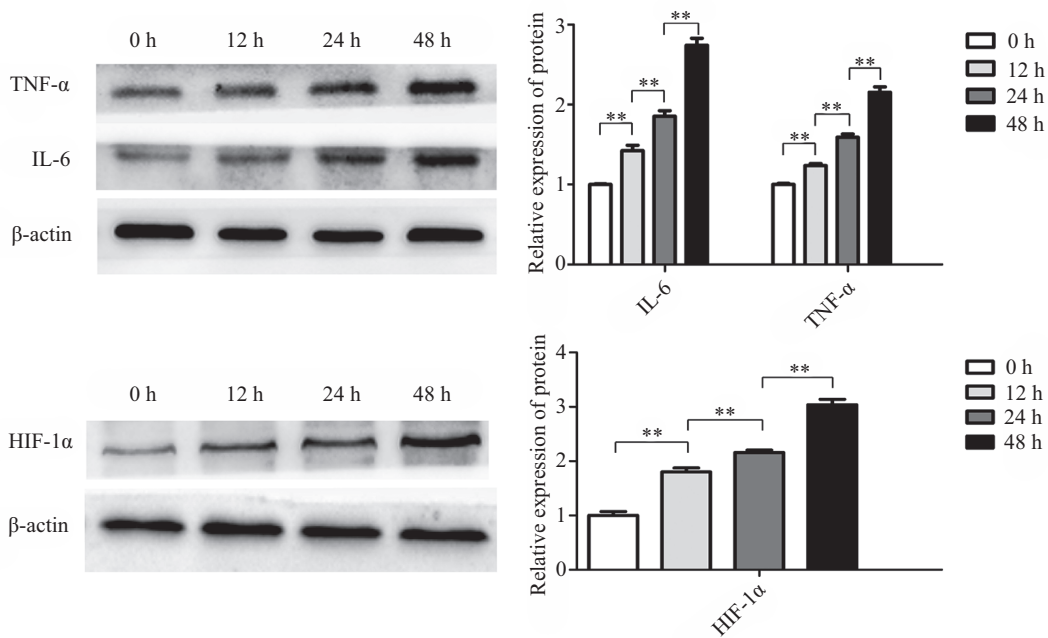
培养人真皮微血管内皮细胞,分为0 h组、12 h组、24 h组和48 h组,待细胞进入生长对数期时,分别置于三气培养箱中培养0、12、24、48 h(5% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、90% N<sub>2</sub>)。提取各组总蛋白及RNA,进行Western blot及RT-PCR检测。随着缺氧时间增加,HIF-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 蛋白质水平不断增加,缺氧48 h时,HIF-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 的蛋白质水平达到最高,各组间相比,均具有显著差异( $P<0.01$ ),具有时间依赖性(图1)。同时,随着缺氧时间增加,HIF-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 的mRNA水平不断增加,缺氧48 h时,HIF-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 的mRNA水平达到最高,各组间相比,均具有显著差异( $P<0.01$ ),具有时间依赖性(图2)。

### 2.2 不同氧浓度对HIF-1 $\alpha$ 及IL-6、TNF- $\alpha$ 基因表达的影响

培养人真皮微血管内皮细胞,分为常氧组、5% O<sub>2</sub>组和1% O<sub>2</sub>组,待细胞进入生长对数期时,置于三气培养箱中培养24 h。提取各组总蛋白及RNA,进行Western blot及RT-PCR检测。随着氧浓度的下降,HIF-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 的蛋白质水平不断增加,当氧浓度下降到1%时,HIF-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 蛋白质水平达到最高,各组间相比均具有显著差异( $P<0.01$ ),具有氧浓度递减依赖性(图3)。同时,随着氧浓度的下降,HIF-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 的mRNA水平不断增加,当氧浓度下降到1%时,HIF-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 的mRNA水平达到最高,各组间相比均具有显著差异( $P<0.01$ ),具有氧浓度递减依赖性(图4)。

### 2.3 沉默HIF-1 $\alpha$ 对细胞迁移性的影响

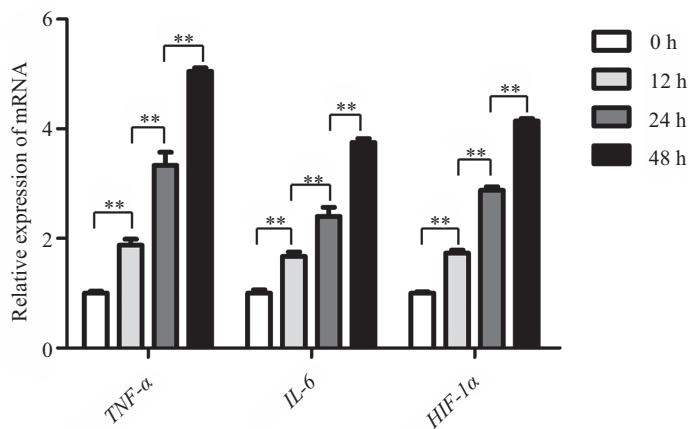
计数人真皮微血管内皮细胞迁移数目可以发



\*\*P<0.01.

图1 不同缺氧时间下HIF-1α及TNF-α、IL-6的蛋白质水平

Fig.1 The protein levels of HIF-1α, TNF-α and IL-6 in different hypoxia time



\*\*P<0.01.

图2 不同缺氧时间下HIF-1α、TNF-α、IL-6 mRNA的表达情况

Fig.2 The mRNA expressions of HIF-1α, TNF-α and IL-6 in different hypoxia time

现, 对照组(88.33±3.51)和空载组(86.67±2.56)细胞迁移数无明显差异(P=0.67), 而沉默组(62.33±4.51)细胞迁移数较对照组及空载组明显减少, 差异具有显著性(P<0.01, 图5)。

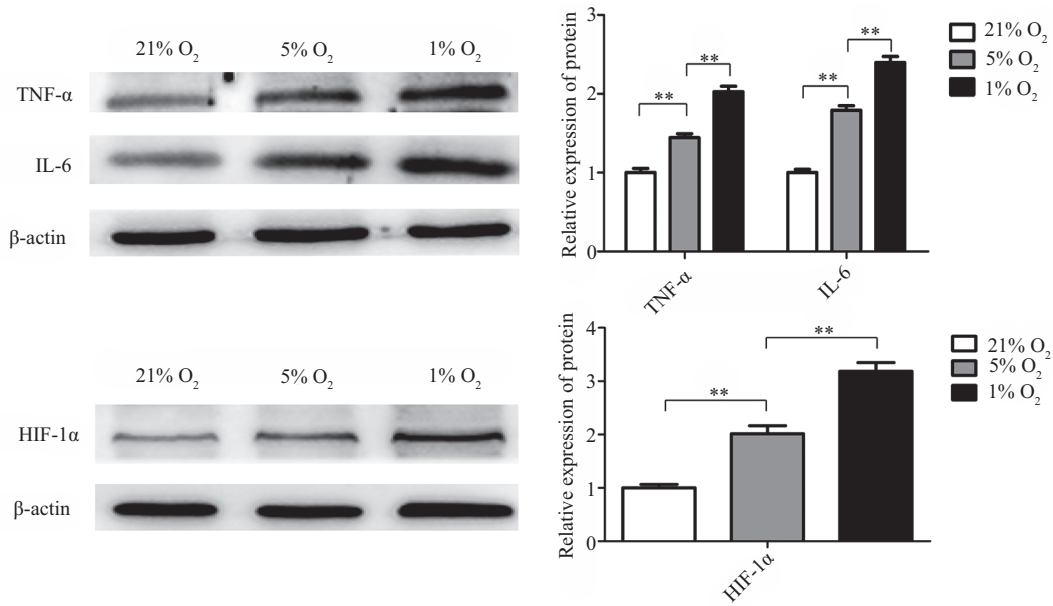
#### 2.4 沉默HIF-1α对细胞凋亡的影响

将人真皮微血管内皮细胞进行空载病毒及HIF-1α-siRNA腺病毒感染后, 置于三气培养箱低氧培养24 h, 并将未感染病毒的人真皮微血管内皮细胞置于三气培养箱低氧培养24 h作为阴性对照组, 用流式细胞术检测细胞凋亡结果。对照组(0.23±0.01)与

空载组(0.24±0.01)相比, 凋亡率无明显差异(P=0.58), 不具有统计学意义。与对照组及空载组相比, 沉默组(0.32±0.01)凋亡率明显上升, 具有显著差异性(P<0.01, 图6)。

#### 2.5 沉默HIF-1α对细胞周期的影响

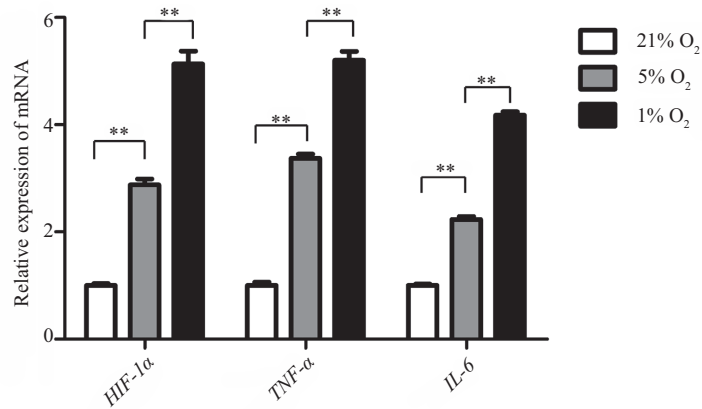
将人真皮微血管内皮细胞进行空载病毒及HIF-1α-siRNA腺病毒感染后, 置于三气培养箱低氧培养24 h, 并将未感染病毒的人真皮微血管内皮细胞置于三气培养箱低氧培养24 h作为对照组, 用流式细胞术检测细胞周期结果。对照组与空载组相比, S期



\*\* $P < 0.01$ .

图3 不同氧浓度下HIF-1 $\alpha$ 及TNF- $\alpha$ 、IL-6的蛋白质水平

Fig.3 The protein levels of HIF-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 at different oxygen concentrations



\*\* $P < 0.01$ .

图4 不同氧浓度下HIF-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA的表达情况

Fig.4 The mRNA expressions of HIF-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 at different oxygen concentrations

( $P=0.11$ )、G<sub>2</sub>期( $P=0.50$ )均无明显差异,不具有统计学意义。沉默组与对照组及空载组相比,S期明显减少,G<sub>2</sub>期明显增多,具有统计学意义( $P < 0.01$ )。此结果说明,沉默组细胞周期明显受到阻滞(图7)。

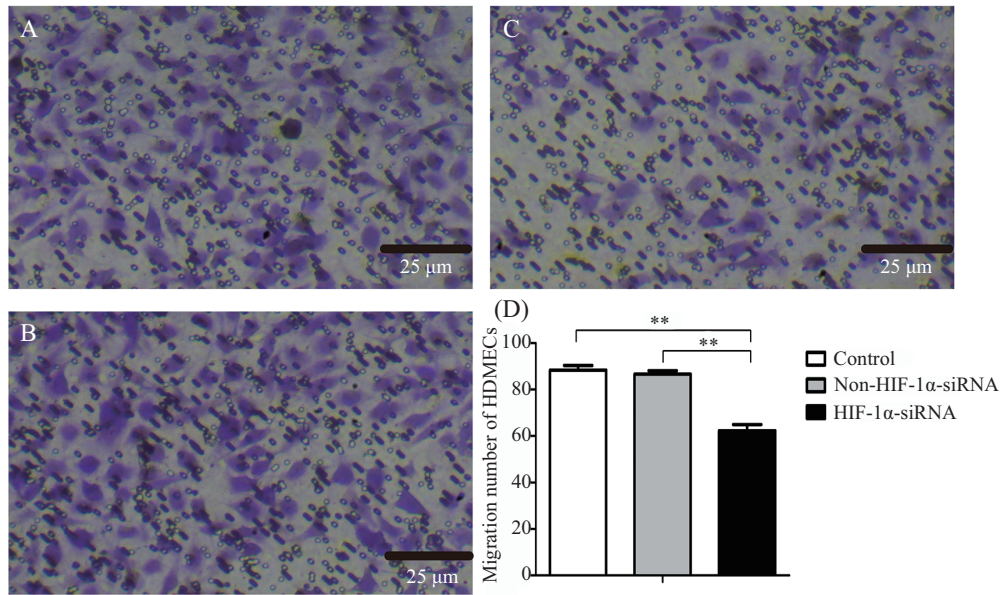
## 2.6 沉默HIF-1 $\alpha$ 与TNF- $\alpha$ 、IL-6蛋白质水平的相关性

将人真皮微血管内皮细胞进行空载病毒及HIF-1 $\alpha$ -siRNA腺病毒感染后,置于三气培养箱低氧培养48 h,同时,将未感染病毒的人真皮微血管内皮细胞置于三气培养箱低氧培养48 h作为对照组。提取各组细胞的总蛋白,以 $\beta$ -actin为内参,Western blot检测

各组细胞中HIF-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6的蛋白质水平情况,用凝胶图像分析以分析电泳结果。对照组和空载组HIF-1 $\alpha$ ( $P=0.86$ )、TNF- $\alpha$ ( $P=0.73$ )、IL-6( $P=0.54$ )蛋白质水平均无明显差异。沉默HIF-1 $\alpha$ 后,HIF-1 $\alpha$ 蛋白质水平明显降低( $P < 0.01$ ),同时,TNF- $\alpha$ 、IL-6的蛋白质水平也明显降低,具有显著差异性( $P < 0.01$ ),说明HIF-1 $\alpha$ 与TNF- $\alpha$ 和IL-6成正相关(图8)。

## 2.7 沉默HIF-1 $\alpha$ 与TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA水平的相关性

将人真皮微血管内皮细胞进行空载病毒及HIF-1 $\alpha$ -siRNA腺病毒感染后,置于三气培养箱低氧培养

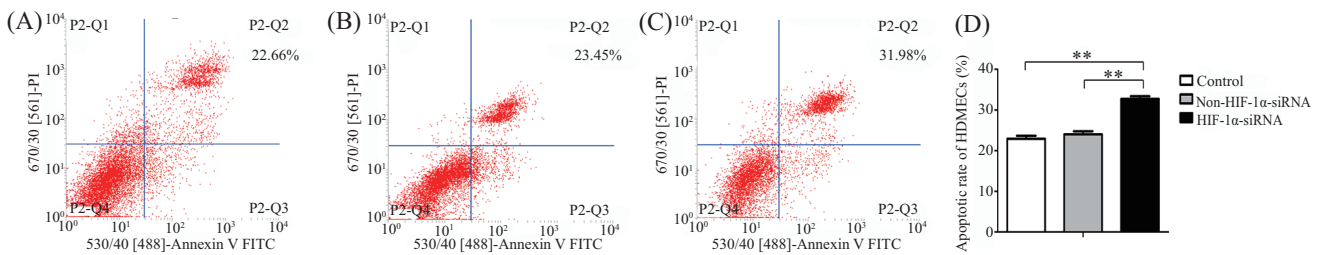


A: 对照组; B: 空载组; C: 沉默组; D: Transwell细胞迁移实验结果统计分析图, \*\* $P < 0.01$ 。

A: control group; B: non-HIF-1 $\alpha$ -siRNA group; C: HIF-1 $\alpha$ -siRNA group; D: the statistical analysis of the results of Transwell migration chart, \*\* $P < 0.01$ .

图5 缺氧条件下对照组、空载组及沉默组HDMECs迁移情况

Fig.5 The migration of HDMECs in control group, non-HIF-1 $\alpha$ -siRNA group and HIF-1 $\alpha$ -siRNA group under hypoxia condition

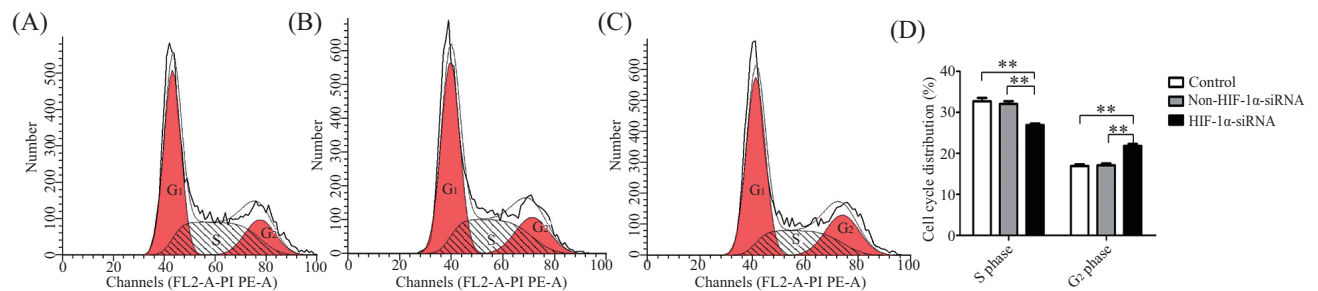


A: 对照组; B: 空载组; C: 沉默组; D: 流式细胞凋亡结果统计分析图, \*\* $P < 0.01$ 。

A: control group; B: non-HIF-1 $\alpha$ -siRNA group; C: HIF-1 $\alpha$ -siRNA group; D: the statistical analysis of the results of apoptosis chart, \*\* $P < 0.01$ .

图6 缺氧条件下对照组、空载组及沉默组HDMECs凋亡情况

Fig.6 The apoptosis of HDMECs in control group, non-HIF-1 $\alpha$ -siRNA group and HIF-1 $\alpha$ -siRNA group under hypoxia condition

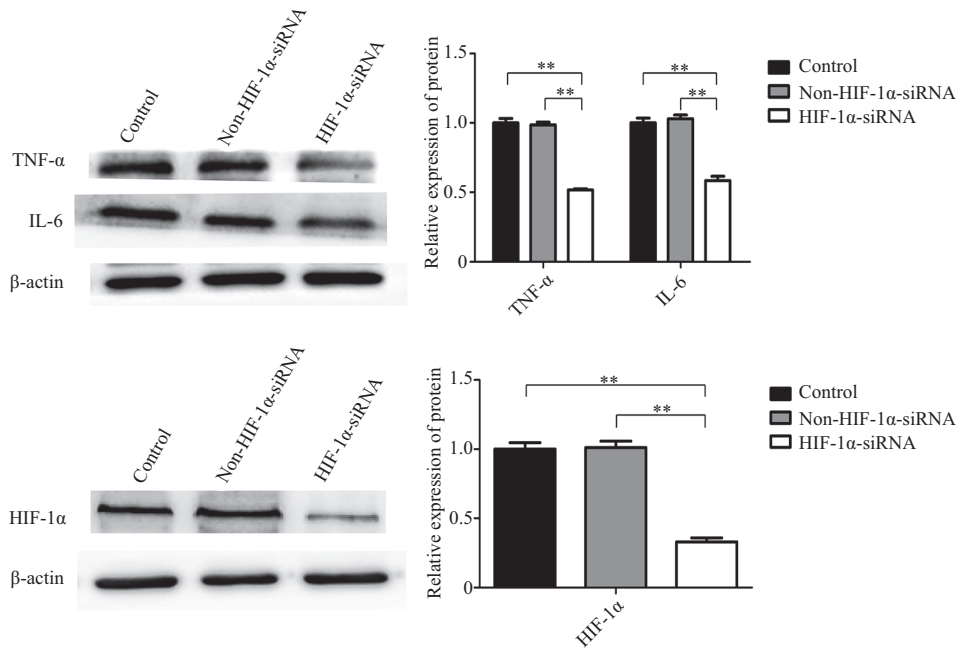


A: 对照组; B: 空载组; C: 沉默组; D: 流式细胞周期结果统计分析图, \*\* $P < 0.01$ 。

A: control group; B: non-HIF-1 $\alpha$ -siRNA group; C: HIF-1 $\alpha$ -siRNA group; D: the statistical analysis of the results of cell cycle chart, \*\* $P < 0.01$ .

图7 缺氧条件下对照组、空载组及沉默组HDMECs周期情况

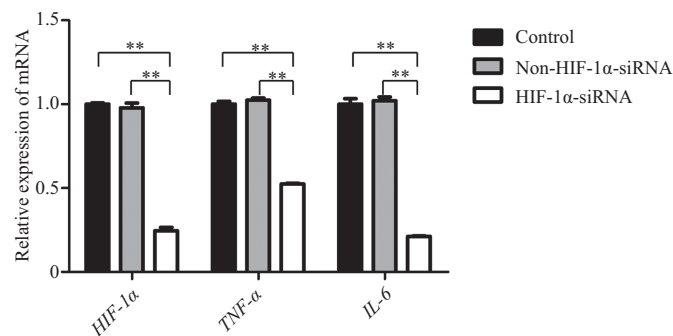
Fig.7 The cell cycle of HDMECs in control group, non-HIF-1 $\alpha$ -siRNA group and HIF-1 $\alpha$ -siRNA group under hypoxia condition



\*\* $P < 0.01$ .

图8 沉默HIF-1α后HIF-1α、TNF-α、IL-6蛋白的表达情况

Fig.8 The protein expressions of HIF-1α, TNF-α, IL-6 after silencing HIF-1α gene



\*\* $P < 0.01$ .

图9 沉默HIF-1α后HIF-1α、TNF-α、IL-6 mRNA的表达情况

Fig.9 The mRNA expressions of HIF-1α, TNF-α, IL-6 after silencing HIF-1α gene

48 h, 同时, 将未感染病毒的人真皮微血管内皮细胞置于三气培养箱低氧培养48 h作为对照组。提取各组细胞的RNA, 以GAPDH为内参, RT-PCR检测各组细胞中HIF-1α、TNF-α、IL-6 mRNA水平情况。低氧环境中, 对照组和空载组HIF-1α( $P=0.50$ )、TNF-α( $P=0.31$ )、IL-6( $P=0.62$ )mRNA水平均无明显差异。沉默HIF-1α后, HIF-1α的mRNA水平明显降低( $P < 0.01$ ), 同时, TNF-α、IL-6的mRNA水平也明显降低, 差异具有显著性( $P < 0.01$ )。因此, 在缺氧环境中, TNF-α、IL-6 mRNA水平与HIF-1α mRNA水平成正相关(图9)。

### 3 讨论

下肢静脉溃疡是一种常见的慢性下肢疾病。因

其发病率高、易复发的特征加重了医疗卫生支出的负担<sup>[14-15]</sup>。下肢静脉溃疡发病机制十分复杂, 目前尚未完全阐明。研究证实, 静脉高压导致的炎性改变参与到静脉溃疡的形成中<sup>[4]</sup>。同时临床研究发现, 皮肤组织缺氧也参与了静脉溃疡的发生发展过程<sup>[7]</sup>。

HIF-1α是HIF-1的一个重要亚基, 主要由氧浓度调节表达, 是维持细胞内和全身氧稳态的重要转录因子。低氧环境中, HIF-1α具有重要的调节功能, 参与细胞代谢、细胞凋亡及炎症反应。静脉溃疡中, 静脉瓣膜功能障碍及血液反流形成静脉高压, 导致静脉血流瘀滞, 形成缺氧微环境, 从而导致内皮细胞的损伤, 释放系列炎性细胞因子及趋化因子(如TNF-α和IL-6等), 形成炎性微环境。

TNF- $\alpha$ 和IL-6细胞因子处于炎症瀑布效应的中心位置,在炎性环境中,表达释放增加。TNF- $\alpha$ 作为诱导细胞反应中的最初因子,能在细胞核亚细胞水平上激发一系列级联反应或瀑布效应,诱导多种炎症因子、黏附因子、NO及氧自由基上调,从而损害组织<sup>[16]</sup>。此外,TNF- $\alpha$ 能作用于微血管内皮细胞增加毛细血管通透性并导致局部缺血和血栓形成<sup>[16-17]</sup>,从而加重组织的损害。IL-6作为前炎症反应因子,它不仅对血管内皮细胞及炎症细胞具有直接的激活和毒性作用,而且具有催化和放大炎症反应和毒性的作用,造成组织细胞损害<sup>[16]</sup>。

同时,在炎性微环境中,当活化信号(如TNF- $\alpha$ 、氧化剂等)暴露时,将促使核转录因子-Kappa B(nuclear factor-Kappa B, NF- $\kappa$ B)活化进入核内,结合至基因启动子反应元件,激活炎症基因的转录,诱导细胞因子、黏附分子及血管活性调节因子上调,进一步使得下游细胞因子(如TNF- $\alpha$ 、IL-6等)表达增加。本研究通过腺病毒沉默HIF-1 $\alpha$ 研究在缺氧环境中TNF- $\alpha$ 、IL-6的表达变化,发现沉默组TNF- $\alpha$ 、IL-6的表达较对照组明显减弱,而空载组和对照组无明显差异,这提示,TNF- $\alpha$ 、IL-6与HIF-1 $\alpha$ 的表达成正相关的关系。其机制可能是,HIF-1 $\alpha$ 可以通过调节缺氧反应元件激活I $\kappa$ B激酶,从而使I $\kappa$ B蛋白质磷酸化释放NF- $\kappa$ B,使其转入细胞核并激活下游基因(如TNF- $\alpha$ 、IL-6等)的表达。因此,抑制HIF-1 $\alpha$ 的表达可能会通过抑制NF- $\kappa$ B途径从而减少TNF- $\alpha$ 、IL-6等的表达。我们将对此假设作进一步的研究。

现有研究证实,HIF-1 $\alpha$ 在轻中度缺氧时具有抗凋亡作用<sup>[18]</sup>。一方面可以通过HIF-1 $\alpha$ 激活其下游基因,增加血管生成、调节糖酵解等方式减少细胞凋亡;另一方面可以通过上调抗凋亡因子Bcl-2等因子的作用,抑制细胞的凋亡。本文通过腺病毒沉默HIF-1 $\alpha$ 观察在缺氧环境中细胞生物学行为的变化,发现沉默组较对照组细胞迁移性减弱、凋亡增加、周期阻滞,而空载组与对照组无明显差异。这说明,HIF-1 $\alpha$ 具有促进细胞增殖和抗凋亡的作用。这也与程艳香等<sup>[9]</sup>在低氧诱导因子1 $\alpha$ 对子宫颈癌细胞生物学行为的影响中的研究结果相一致。

综上所述,静脉溃疡的发病机制十分复杂,HIF-1 $\alpha$ 的调节及炎性因子的产生参与到了静脉溃疡的形成中。HIF-1 $\alpha$ 和炎性因子可能存在协同作用。抑制HIF-1 $\alpha$ 可对炎性反应起到一定程度的抑制作用,有利

于促进静脉溃疡愈合。但抑制HIF-1 $\alpha$ 的同时也会促进细胞凋亡、抑制新生血管的形成,又不利于静脉溃疡的愈合。因此,HIF-1 $\alpha$ 在静脉溃疡的发病机制还需进一步探讨,这将为静脉溃疡的治疗提供新依据。

## 参考文献 (References)

- 1 Alavi A, Sibbald RG, Phillips TJ, Miller OF, Margolis DJ, Marston W, *et al.* What's new: Management of venous leg ulcers: Approach to venous leg ulcers. *J Am Acad Dermatol* 2016; 74(4): 627-40.
- 2 高荐轶, 金 辉. 下肢静脉性溃疡诊治进展. 中国实用外科杂志 (Gao Jianyuan, Jin Hui. *Advances in diagnosis and treatment of venous ulcer of lower extremity.* *Chinese Journal of Practical Surgery*) 2015; 35(12): 1355-8.
- 3 Lal BK. Venous ulcers of the lower extremity: Definition, epidemiology, and economic and social burdens. *Semin Vasc Surg* 2015; 28(1): 3-5.
- 4 Chi YW, Raffetto JD. Venous leg ulceration pathophysiology and evidence based treatment. *Vasc Med* 2015; 20(2): 168-81.
- 5 White JV, Ryjewski C. Chronic venous insufficiency. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther* 2005; 17(4): 319-27.
- 6 Raffetto JD. Pathophysiology of wound healing and alterations in venous leg ulcers-review. *Phlebology* 2016; 31(1): 56-62.
- 7 马 龙, 万圣云. 静脉顺行造影、彩色多普勒超声及经皮氧分压对下肢静脉性溃疡静脉病变诊断价值的分析. 中国实用医药 (Ma Long, Wan shenyun. *Diagnostic value of intravenous contrast, color Doppler ultrasonography and percutaneous oxygen pressure in venous ulcers of lower extremities.* *China Practical Medicine*) 2016; 11(15): 9-10.
- 8 Yoshida T, Zhang H, Iwase T, Shen J, Semenza GL, Campochiaro PA, *et al.* Digoxin inhibits retinal ischemia-induced HIF-1 $\alpha$  expression and ocular neovascularization. *FASEB J* 2010; 24(6): 1759-67.
- 9 Kaelin WG Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O<sub>2</sub> sensing and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(11): 865-73.
- 10 Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(9): 609.
- 11 Castiglioni S, Cazzaniga A, Maier JA. Potential interplay between NF $\kappa$ B and PPAR $\gamma$  in human dermal microvascular endothelial cells cultured in low magnesium. *Magnesium Res* 2014; 27(2): 86-93.
- 12 Clark PR, Jensen TJ, Kluger MS, Morelock M, Hanidu A, Qi ZH, *et al.* MEK5 is activated by shear stress, activates ERK5 and induces KLF4 to modulate TNF responses in human dermal microvascular endothelial cells. *Microcirculation* 2011; 18(2): 102-17.
- 13 Stohl LL, Zang JB, Ding W, Manni M, Zhou XK, Granstein RD. Norepinephrine and adenosine-5'-triphosphate synergize in inducing IL-6 production by human dermal microvascular endothelial cells. *Cytokine* 2013; 64(2): 605-12.
- 14 Alavi A, Sibbald RG, Phillips TJ, Miller OF, Margolis DJ, Marston W, *et al.* What's new: Management of venous leg ulcers: Treating venous leg ulcers. *J Am Acad Dermatol* 2016; 74(4): 643-64.
- 15 van Gent WB, Catarinella FS, Lam YL, Nieman FH, Tooder IM, vander Ham AC, *et al.* Conservative versus surgical treatment of venous leg ulcers: 10-year follow up of a randomized, multicenter trial. *Phlebology* 2015; 30(1): 35-41.
- 16 乐海浪, 罗国强. 创伤后早期炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6的研

- 究进展. 现代诊断与治疗(Le Langqiang, Luo Guoqiang. Advances in the study of early inflammatory factors TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 after trauma. Modern Diagnosis & Treatment) 2014; 25(4): 763-5.
- 17 Marcosramiro B, García-weber D, Millán J. TNF-induced endothelial barrier disruption: beyond actin and Rho. Thromb Haemost 2014;112(6): 1088-92.
- 18 李咏梅. HIF-1 $\alpha$ 对低氧环境中脑胶质瘤细胞的作用及相关机制研究(博士论文). 昆明医科大学(Li Yongmei. The effect of HIF-1 $\alpha$  on the apoptosis and proliferation of brain glioma and related mechanism study. Kunming Medical University), 2015.
- 19 程艳香, 濮德敏, 刘 嵘, 李 天, 尹 伶, 马 丁. 低氧诱导因子1 $\alpha$ 对宫颈癌细胞生物学行为的影响. 中华妇产科杂志 (Cheng Yanxiang, Pu Deming, Liu Rong, Li Tian, Yin Ling, Martin. Effects of hypoxia inducible factor 1 alpha on biological behavior of cervical cancer cells. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology) 2007; 42(8): 551-4.