

低氧诱导因子-1与缺血性心肌损伤保护的研究进展

丁然然^{1,2#} 哈艳平^{1,2#} 王振良^{1,2} 雷洪^{1,2} 申志华³ 郭峻莉^{4*} 揭伟^{1,2*}

(¹广东医学院病理学系, 湛江 524023; ²广东医学院附属医院病理诊断与研究中心, 湛江 524001;

³广东医学院病理生理教研室, 湛江 524023; ⁴海南医学院心血管研究所, 海口 570102)

摘要 低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是一个关键和特异的核转录因子, 也是联系低氧、缺血损伤等病理现象的纽带。HIF-1通过作用于低氧反应元件在转录水平调控一系列低氧反应基因表达以介导细胞对低氧的应答, 在缺血缺氧性疾病中发挥着重要的生物学功能。缺血性心肌病是临床上常见的致死性疾病, HIF-1与缺血性心肌病的病理生理关系密切, 在受损心肌的保护反应中发挥重要作用。该文就HIF-1功能调节、在缺血性心肌损伤中的表达调控及参与心肌保护机制的研究进展作一综述, 并展望了基于HIF-1靶点进行缺血性心肌病防治的临床意义。

关键词 低氧诱导因子-1; 缺血性心肌病; 心肌保护

Advances in HIF-1 and Cardioprotection of Ischemic Myocardial Injury

Ding Ranran^{1,2#}, Ha Yanping^{1,2#}, Wang Zhenliang^{1,2}, Lei Hong^{1,2}, Shen Zhihua³, Guo Junli^{4*}, Jie Wei^{1,2*}

(¹Department of Pathology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; ²Pathological Diagnosis and Research Centre, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China; ³Department of Pathophysiology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; ⁴Cardiovascular Institute, Hainan Medical College, Haikou 570102, China)

Abstract Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a critical and specific nuclear transcriptional factor, which associates with the pathological phenomena of hypoxia and ischemic injury. HIF-1 plays an important biological role in hypoxic-ischemic diseases through transcription of a series of hypoxia response genes archived with hypoxia response element. Ischemic heart disease is a common clinical fatal etiology, and HIF-1 is tightly associated with the pathophysiology of ischemic heart disease, which plays an important role in protecting the injured myocardium. In this paper, the functional mediation, the regulation of HIF-1 expression in ischemic myocardial injury and the progress in myocardial protection mechanisms are reviewed. Besides, we also prospect the significance of clinical effects of prevention targeted at HIF-1 on ischemic heart disease.

Keywords hypoxia-inducible factor-1; ischemic heart disease; cardioprotection

低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是1992年首次由Semenza等^[1]在人肝癌Hep3B细胞核提取物中发现的能特异结合于促红细胞生

成素基因低氧反应元件(hypoxia response element, HRE)上的一种转录因子, 在缺氧条件下广泛存在于人类和哺乳动物的细胞内, 是由低氧敏感的 α 亚基

收稿日期: 2015-04-16 接受日期: 2015-07-29

国家自然科学基金(批准号: 81000073、81160020、81170121、81460042)、广东省教育厅科技创新项目(批准号: 2013KJJCX0088)和广东医学院优硕博基金(批准号YS2014013、YS2015004、YS2015005)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0898-66893322, E-mail: guojl79@163.com; Tel: 0759-2388584, E-mail: wei.jie@gdmc.edu.cn

Received: April 16, 2015 Accepted: July 29, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81000073, 81160020, 81170121, 81460042), the Science and Technology Innovation Project of Department of Education of Guangdong Province (Grant No.2013KJJCX0088) and the Excellent Graduate Student Training Program of Guangdong Medical University (Grant No.YS2014013, YS2015004, YS2015005)

#These authors contributed equally to this work

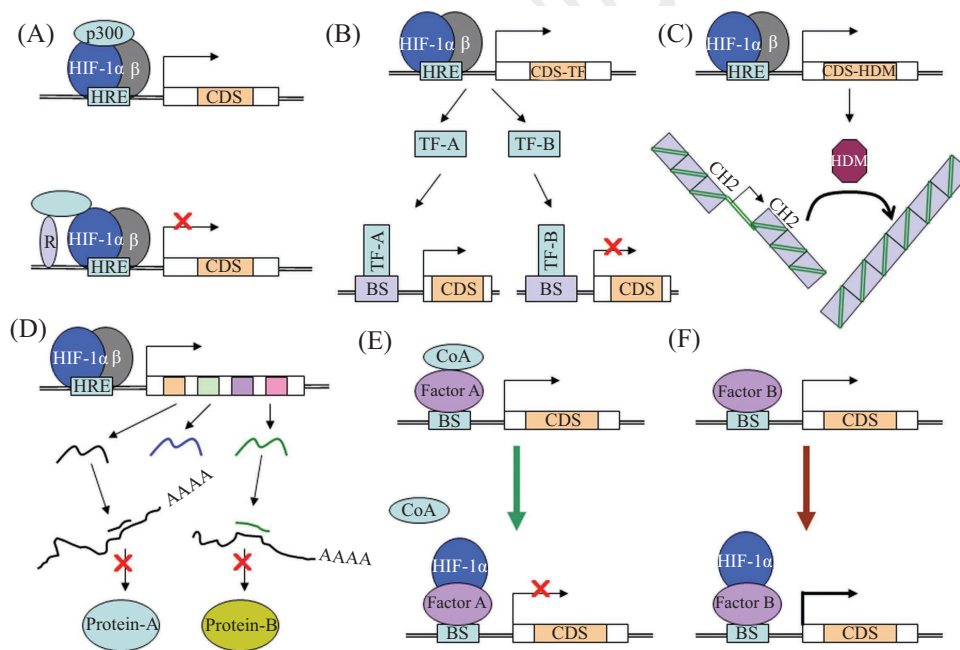
*Corresponding authors. Tel: +86-898-66893322, E-mail: guojl79@163.com; Tel: +86-759-2388584, E-mail: wei.jie@gdmc.edu.cn

网络出版时间: 2015-10-21 14:57:46

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151021.1457.006.html>

(120 kDa)和组成性表达的 β 亚基(91~94 kDa)构成的异二聚体。 β 亚基又称芳香烃受体核转运蛋白(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT),主要在细胞核内稳定表达,不受氧浓度的调节,而 α 亚基主要在细胞质中表达,随氧浓度的变化来调节HIF-1的活性,因此,HIF- α 是作为活性亚基和功能亚基通过转录调控一系列低氧反应基因的表达来介导细胞对低氧的应答^[2]。哺乳动物含有三种HIF- α 亚基:HIF-1 α 、HIF-2 α 和HIF-3 α 。HIF-1 α 和HIF-2 α 的结构相似且两者的生物学功能已被广泛报道,而HIF-3 α 存在多种剪接体,并且可以抑制HIF-1 α 和HIF-2 α 的活性^[3]。目前,已知HIF-1调节200多种下游靶基因的转录表达,并且与其他的信号通路形成复杂的网络调控系统,成为联系低氧、缺血以及炎症损伤等病理现象的纽带。

进入二十世纪以来,心血管疾病逐渐成为影响人类生命质量的全球性公共卫生问题。世界卫生组织2012年公布全球因心血管疾病死亡人数预计为1 740万,其中,由于缺血性心脏病而死亡的人数为740万^[4]。中国每年约有350万人死于心血管疾病^[5]。关于HIF-1与缺血性心脏病关系的研究已有较多的文献进行了总结^[6-9]。相关报道主要集中于HIF-1表达、调节以及HIF-1参与缺血性心脏病保护机制的初步认识。本文在前期报道共识的基础上,对近年来有关HIF-1活性调节以及HIF-1参与缺血性心脏病保护的新机制,特别是HIF-1介导缺血性心脏病的组织供血、能量代谢、内源性干细胞激活、miRNA表征、炎症及氧化应激反应调节的有关进展进行了总结,并展望了基于HIF-1为靶点在缺血性心脏病防治中的临床应用价值。深入探讨缺血性心肌损伤这种

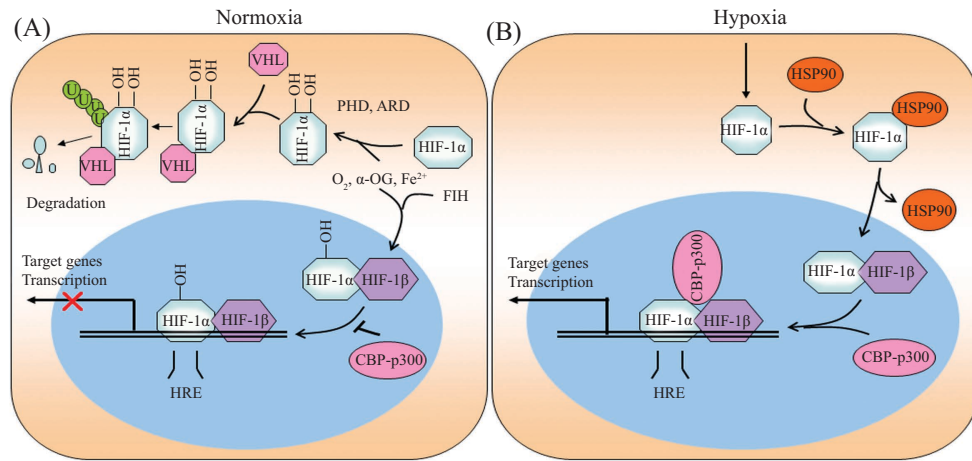


A: HIF-1与靶基因HRE结合,募集共刺激分子(CoA)或共抑制分子(CoR)而活化或抑制基因表达。B: HIF-1与靶基因HRE结合后调控某些转录因子(TF)的表达而调节其下游基因的表达。C: HIF-1调控组蛋白去甲基酶(HDM)表达而改变染色质的结构来实现对基因表达的调节。D: HIF-1调控miRNA的表达实现对特定靶基因表达的调控。E: HIF-1与某些因子(如SP1)结合后去除了与该因子预先结合的CoA进而抑制该因子的活性。F: HIF-1与某些因子(如N1-ICD)结合后增加了该转录因子的活性而调节基因的表达。HRE: 低氧反应元件; CDS: 蛋白质编码域; BS: 结合位点; TF: 转录因子; HDM: 组蛋白去甲基酶; CoA: 共刺激分子; CoR: 共抑制分子。

A: HIF-1 binds directly to target genes at HRE and recruits coactivator (CoA) and co-repressor (CoR) proteins thereafter to increase or repress gene transcription. B: HIF-1 binds with HRE and transactivates genes that encode transcription factor (TF), which either activates (TF-A) or represses (TF-B) the expression of secondary target genes. C: HIF-1 activates histone demethylase (HDM) expression and changes the structure of chromatin to achieve the regulation of gene expression. D: HIF-1 activates transcription of genes encoding miRNAs that bind to mRNAs and either block their translation or induce their degradation. E: HIF-1 binds to the factor such as SP1 and functions as a CoR. F: HIF-1 binds to factor such as N1-ICD and functions as a CoA. HRE: hypoxia response element; CDS: coding DNA sequence; BS: binding site; TF: transcriptional factor; HDM: histone demethylase; CoA: co-activator; CoR: co-repressor.

图1 HIF-1调控靶基因表达的机制(根据参考文献[10]修改)

Fig.1 Mechanisms of HIF-1-mediated expression of target genes (modified from reference [10])



A: 常氧环境下以PHD的羟化途径介导HIF-1的泛素化降解, 以FIH-1的羟化途径介导HIF-1的转录活性抑制。B: 低氧环境下胞质内HIF-1 α 转移到核内与HIF-1 β 结合成异二聚体, 募集共刺激因子CBP/P300并反式作用于HRE, 诱导靶基因的表达。PHD: 脯氨酸羟化酶; FIH-1: HIF-1抑制因子; HRE: 低氧反应原件; α -OG: α 酮戊二酸; VHL: von Hippel-Lindau蛋白; HSP90: 热休克蛋白90; CBP/P300: 一种共刺激因子。

A: under normoxic condition, hydroxylation of PHD leads to degradation of HIF-1 α subunit via ubiquitin-proteasome system (UPS), while hydroxylation of FIH-1 results in inhibiting HIF-1 α transcriptional activity. B: under hypoxic condition, cytosol HIF-1 α translocates into the nucleus and further heterodimerize with HIF-1 β , thereafter recruiting the coactivator factor CBP/P300 and transacting on the HRE, inducing expression of the target genes. PHD: prolyl hydroxylase; FIH-1: factor inhibiting HIF-1; HRE: hypoxia response element; α -OG: α -ketoglutarate; VHL: von Hippel-Lindau protein; HSP90: heart shock protein 90; CBP/P300: a kind of coactivator.

图2 HIF-1的活性调节

Fig.2 The regulation of HIF-1 activity

病理条件下, HIF-1表达水平的变化及其所发挥的功能和作用机制, 将为其应用于临床治疗提供有力的理论依据。

1 HIF-1的功能调节

HIF-1通过不同的机制实现对下游靶基因表达的调节(图1), 同时其本身的活性在常氧和低氧状态下调节机制亦不同。HIF-1活化的调节是一个多步骤的过程, 调控其在体内的活性和表达主要在蛋白质水平而非mRNA水平。HIF-1 α 蛋白存在于胞质中, 常氧下极易降解, 而在低氧的细胞中其表达水平升高且伴有活性的提升(图2)。Jiang等^[11]证实, 氧浓度下降时HIF-1 α 的水平以指数方式增长, 半数最大量发生在氧浓度为1.5%~2.0%, 最大量则发生在氧浓度低于0.5%。HIF-1 α 的稳定性受脯氨酸羟化酶(prolyl hydroxylases, PHD)、VHL(product of von hippel-lindau gene)、ARD-1(arrest-defective-1)、NO(nitric oxide)等的调节, 而其活性受FIH-1(factor inhibiting HIF-1)、p300/CBP(一种共刺激分子)、CITED2(Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2)、MAPK(mitogen-activated protein kinase)、

SUMO(small ubiquitin related modifier)、IL-1 β (interleukin-1 β)、TNF(tumor necrosis factor)、NO、CO、CoCl₂、脱铁敏等调控。

常氧下HIF-1 α 通过泛素-蛋白酶体途径降解。PHD是HIF-1 α 氧依赖调节的关键酶, 目前已知的有三种类型: PHD-1、PHD-2和PHD-3。这三种PHD亚基都在心脏组织中表达, 含量最多的亚基则是PHD-2和PHD-3, 在心肌缺血或者梗死时常伴有PHD-2和PHD-3 mRNA水平的增加。在常氧下起关键作用的是PHD-2。有关PHD/HIF-1轴在心肌缺血保护中的作用参见文献[12]。PHD对HIF-1 α 的羟化作用是一个氧依赖的酶促反应, 在O₂、Fe²⁺、 α -酮戊二酸的参与下它可以羟化修饰ODDD区(oxygen dependent degradation domain)第402和564脯氨酸残基, 使得VHL(von Hippel-Lindau)蛋白能特异作用于HIF-1 α 的ODDD区。VHL有两个亚区, α 亚区在CCT-1(cytosolic chaperonin containing TCP-1)促进下与Elongin B/C、Cullin 2及RBX1在细胞内有机结合成复合体, 该复合体在空间结构上与酵母菌复合体SCF(Skp1/Cdc53/Fbox)相似, 而后者是泛素蛋白酶体的成分之一, 介导靶蛋白的降解。 β 亚区与ODDD结合, 并激活E3泛素连接酶, 使HIF-1 α 亚基泛素化而形

成HIF-1 α 泛素多聚体,最终被蛋白酶体(26S)降解。低氧状态下,PHD的活性被抑制,阻止了ODDD区域的脯氨酸羟化,HIF-1 α 不与pVHL结合,而是与热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)结合,从而阻断了HIF-1 α 的泛素-蛋白酶体降解途径。随后HIF-1 α 转入胞核与HIF- β 组成二聚体,并结合到低氧反应基因的启动子序列,促进下游靶基因的表达。而在细胞核中,HIF-1的转录活性则受羟化酶及HIF-1的抑制因子FIH-1调控^[13]。此外,Co²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺及铁离子螯合剂都可阻断HIF-1 α 的羟化,使得其在胞质内稳定表达。

低氧状态下,HIF-1 α 进入细胞核并且募集共刺激因子p300/CBP,反式作用于HRE,诱发细胞的低氧反应。目前,已知的天冬氨酰羟化酶是Mahon等^[13]在2001年发现的FIH-1,它能特异结合于HIF-1 α 抑制性结构域。常氧下,FIH-1羟化HIF-1 α 的C-端反式激活域(C-terminal transactivation domain, C-TAD)亚基第803位天冬氨酰残基,阻断了C-TAD与转录辅因子的反应,HIF-1 α 进入细胞核就不能募集p300,进而抑制HIF-1 α 的转录活性。FIH-1使常氧下未经泛素-蛋白酶体途径降解的HIF-1 α 蛋白灭活,起二级负向调控作用。与PHD类似,FIH-1活性作用的发挥依赖于环境中的O₂、Fe²⁺、 α -酮戊二酸。因此,在低氧或有铁离子螯合剂存在时,FIH-1的活性受抑制而HIF-1 α 转录增加。此外,FIH-1还可以通过与pVHL和组蛋白脱乙酰基酶的反应间接抑制C-TAD的转录激活功能。

HIF-1还可通过非氧依赖的方式来调节其活性,如常氧下的细胞因子、生长因子、环境刺激因素以及其他的信号分子等。其中,部分还可通过激活PI3K/Akt信号转导通路和MEK/MAPK信号转导通路来诱导HIF-1 α 的反式激活及合成。

总之,低氧和常氧条件下HIF-1的功能调节机制显著不同,其活性受多因素的影响。靶向干预PHD和FIH-1基因或采用化学抑制剂是HIF-1活性研究的重要手段。

2 HIF-1的信号通路及分子调节

HIF-1自身活性调节主要通过两条信号途径:PI3K/Akt信号通路和MEK/MAPK信号通路。前者主要介导调控HIF-1 α 蛋白质水平和稳定性,后者则介导HIF-1 α 反式激活功能调控。这两条通路既分别

独立又协调地调控HIF-1 α 的转录活性。此外,Notch信号及miRNA分子等也参与HIF-1稳定性或活性的调节。就目前所知,对HIF-1表达和活性的调节主要由以上几种信号转导途径来实现,但各种途径在调节中又不完全相同。另外,SIRT3和PKM2作为新的HIF-1活性调控分子,有关其作用机制参见文献^[14]。

2.1 PI3K/Akt信号通路

PI3K/Akt信号通路主要调节非低氧依赖性HIF-1 α 的表达,这在肿瘤组织的HIF-1 α 表达中得到证实。在心肌组织或细胞中,机械性压力刺激^[15]、迷走神经兴奋^[16]亦可通过PI3K/Akt信号通路来调节HIF-1 α 表达。亦有报道显示,在肺动脉平滑肌细胞中低氧刺激同样可以活化PI3K/Akt信号而调节HIF-1 α 基因表达^[17]。

2.2 MEK/MAPK信号通路

磷酸化调节对HIF-1活性具有重要作用。体外实验已发现,可通过ERK与p38MAPK信号转导途径调节HIF-1的活性,另外,p42/44和p38激酶在提高HIF-1 α 转录活性的情况下而不影响HIF-1 α 蛋白质的稳定性^[18]。Minet等^[19]发现,HIF-1 α /HIF-2 α 在低氧状态下的调控作用需要细胞MAPK p42/44或PI3K的存在,磷酸化不但不会对HIF-1 α 的稳定性和DNA的连接产生影响,还可以提高HIF-1 α 的转录活性。在CCL39细胞中,参与ERK/MAPK信号转导途径的一种蛋白激酶的过表达可导致p42/p44的磷酸化而引起HIF-1 α 的磷酸化,它的激活能增加HIF-1依赖性报告基因的表达,但未增加HIF-1 α 蛋白的含量,提示该效应是由于HIF-1 α 转录激活域的转录活性增强引起的。因此,ERK/MAPK信号转导途径是激活HIF-1 α 转录活性所必需的。

2.3 Notch信号通路

Notch信号通路与HIF-1的相互调节同样复杂,并且存在多个层次。首先,低氧通过上调Notch配体DLL1和DLL4基因转录,以增强Notch信号。我们最近的结果也显示,在心肌细胞中,低氧刺激可以通过ERK、JNK信号上调Notch配体Jagged1表达(待发表资料)。其次,HIF-1 α 与Notch胞内结构域(Notch-ICD)之间可以发生直接相互作用。HIF-1 α 被募集到Notch-ICD的转录复合物上,结合Notch相应的启动子来激活Notch靶基因。HIF-1 α 和Notch-ICD的相互作用可能是低氧稳定Notch-ICD的基础。再次,FIH-1不仅使HIF-1 α 羟化也使Notch-ICD羟化。相

比于HIF-1 α , FIH-1更容易与Notch-ICD结合, 因此, 影响了FIH-1介导的HIF-1 α 转录活性的抑制。相反, Notch信号亦可调控HIF-1活性。Sahlgren等^[20]的研究显示, Notch信号可以增强HIF-1 α 活性而在肿瘤细胞上皮间质转化过程中发挥作用。Gao等^[21]进一步研究发现, 低氧一方面促进Notch信号的活化, 另一方面应用*Notch-1* siRNA和Notch信号抑制剂抑制了低氧诱导的血管生成/内皮细胞侵袭和迁移及MMP-2、MMP-9的活性, 证实了Notch信号与HIF-1 α 信号存在相互调节的效应。

2.4 miRNA

MicroRNA(miRNA)为一类长度约20 bp的非编码RNA, 在基因表达调控中具有重要作用。通过与靶mRNA 3' UTR结合, miRNA实现对目的基因表达的调控。越来越多的参与HIF-1 α 的表达和稳定性调控的miRNA被鉴定, 如miRNA-199^[22]、miRNA-206^[23]、miRNA-20b^[24]、miRNA-21^[25]、miRNA-210^[26]、miRNA-138^[27]、miRNA-107^[28]、miRNA-135b^[29]、miRNA-17^[30]及miRNA-183^[31]等。这些miRNA大多数抑制HIF-1 α 的表达, 少数可以稳定HIF-1 α 活性。此外, 有报道显示, miRNA-31通过抑制HIF-1 α 抑制剂FIH来间接激活HIF-1 α ^[32]。

3 心肌缺血与HIF-1的表达和活化

3.1 缺血性心肌损伤中HIF-1的表达和活化

心肌缺血性损伤是临床上造成心力衰竭的重要原因之一。造成心肌缺氧的原因主要是氧供减少(冠状动脉血流减少)和心肌需氧量的增加(负荷增加)。冠状动脉粥样硬化造成血管狭窄, 下游血管床灌注减少, 是导致心肌缺血缺氧性损伤最主要的原因。缺血时心肌受到的环境应激不仅有缺氧, 还有缺血后再灌注产生的大量细胞毒性活性氧自由基ROS(reactive oxygen species), 进一步导致心肌细胞严重受损甚至产生心力衰竭。HIF-1是应对氧张力变化适应性反应的一个重要而特异的调控分子, 对氧张力的变化具有高度敏感性。

早在1999年, Nguyen和Claycomb^[33]就观察了HIF-1 α 在心肌细胞中的作用, 他们证实, 低氧(1% O₂)刺激心肌细胞4 h可以诱导HIF-1 α mRNA和蛋白质的显著表达。随后, Jung等^[34]证实, 长期低氧刺激乳SD大鼠的心脏和心肌细胞可以上调HIF-1 α mRNA水平。同期, Lee等^[35]应用急性低氧刺激冠脉

搭桥术(coronary artery bypass grafting, CABG)病人的心脏活检组织, 观察到了HIF-1 α mRNA水平的增加, 首次证实了与人相关的HIF-1 α 信号通路的存在。Kim等^[15]在2002年报道, 成年鼠心肌梗死后12 h再永久性地闭塞冠状动脉左前降支, 其梗死区和非梗死区都有HIF-1 α mRNA水平的增加, 且机械牵张能维持HIF-1 α 的稳定。上述发现为进一步阐明HIF-1 α 在心肌缺血性损伤中的作用奠定了基础。HIF-1在急性冠状动脉阻塞后明显提高^[36]。Shyu等^[37]研究发现, 永久性地闭塞冠状动脉左前降支后, 在梗死区注射VEGF及HIF-1 α 的DNA质粒使其过表达, 能够限制梗死灶的扩大, 增加毛细血管的密度, 增加血流量, 因而从功能上明确提出HIF-1 α 在心肌保护中发挥重要作用。

3.2 缺血后处理中HIF-1对心肌的保护作用

缺血后处理(ischemic postconditioning, IPO)是一种新的针对缺血再灌注损伤的治疗方法, 指在心肌缺血后全面恢复再灌注前进行短暂的多次预灌停灌处理, 通过启动内源性保护机制, 最大限度地减轻心肌再灌注损伤。IPO能有效地缩小梗死灶, 抑制心肌细胞凋亡。2014年, Li等^[38]用二甲基烯丙基氧甘氨酸(dimethyloxyallyl glycine, DMOG)证实IPO是通过稳定HIF-1 α 蛋白来介导其心肌保护作用的。HIF-1 α 蛋白质水平和梗死灶间的线性关系说明其保护作用的发挥是通过上调HIF-1 α 的表达来实现的^[38-39]。也有研究发现, IPO的心肌保护作用是通过刺激内源性腺苷受体、激活生存激酶、抑制线粒体通透性转运孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)的开放、活化下游靶基因[如NOS(nitric oxide synthase)]及某些信号的转导(如NF- κ B)来实现的, 但是这种调节机制的主要作用因素和始动因素还不清楚。

3.3 缺血预处理中HIF-1对心肌的保护作用

缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)又称预适应, 指预先反复短暂多次缺血(再灌注)可以提高心肌对随后持续缺血的耐受性。经皮冠状动脉腔内血管成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)中反复球囊血管扩张术可以诱发人心肌组织中IPC。IPC对心肌缺血的保护效应体现在其能缩小梗死面积、显著减轻缺血再灌注后心律失常的发生和改善心功能等方面。IPC保护心功能是通过HIF-1 α 活化IL-10基因的转录完成的^[40]。HIF-

1 α 缺陷的小鼠完全失去IPC的心肌保护效应^[41]。

4 HIF-1在心肌损伤保护作用中的机制

在缺血性疾病中促进HIF-1的活化具有重要的保护意义。HIF-1表达上调能增强心肌细胞对急性缺血性损伤的耐受,而这种作用的发挥有赖于HIF-1下游靶基因如*EPO*(erythropoietin)、*HO-1*(heme oxygenase-1)、脂联素(adiponectin)、*iNOS*(inducible nitric oxide synthase)、*VEGF*(vascular endothelial growth factor)、*IL-8*(interleukin-8)、*IL-10*(interleukin-10)、*SCF*(stem cell factor)等的协同作用,并通过多种生物学机制实现对心肌的保护。

4.1 增加组织供血

血管生成对心肌梗死灶的保护具有重要意义。*VEGF*在血管生成中具有举足轻重的作用。在血管发生阶段,*VEGF*的表达增强具有增加血管通透性的作用;上调*VEGF*可诱导内皮细胞的增殖和迁移,同时在血管生成素-2(angiotensin-2)的参与下,促进血管芽的形成;而在angiotensin-1和整合素(integrin)的参与下,则促进单个血管芽形成血管腔,并与周围的血管吻合。通过HIF-1 α 使得*VEGF*的表达增加能够诱导血管新生,进而增加血流量和氧供,减少器官梗死时机体的不良反应。有人观察到,*HIF-1 α* 转基因小鼠上皮组织中,通过HIF-1 α 调控使得有关基因协同作用,毛细血管密度增加了66%,总*VEGF*及各*VEGF*单体分别增加了16倍和6~9倍,且这种新生的血管更符合生理特点,避免了由*VEGF*单独调控所造成的淤血、水肿和渗漏现象^[42]。此外,HIF-1 α 在常氧条件下能快速降解,这将降低*VEGF*持续高表达所诱发的血管瘤的风险^[43]。动物实验证实,间断低氧处理大鼠能显著改善心肌梗死后的心功能,低氧7 d时心肌组织HIF-1 α 和*VEGF*表达处于峰值水平^[44]。

*EPO*为HIF-1 α 的一个经典的靶基因。除了具有刺激红细胞生成的作用外,*EPO*还与血管生成有关。在动物实验中发现,小鼠心肌IPC后能有效缩小缺血所导致的梗死灶,并伴有血浆中*EPO*的增多^[45]。这种增加是应对缺血缺氧性刺激的一种保护性反应。进一步研究证实,给予*EPO*能促进MI后局部心肌组织的微血管密度,增加梗死灶周围*VEGF*、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, *FGF*)和基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, *SDF-1*)等

因子的表达^[46-48]。

*NO*是具有扩血管作用的生物活性物质。血管内皮细胞产生的*NO*,通过细胞膜迅速传递至血管平滑肌细胞,使平滑肌松弛,动脉血管扩张,从而调节血压和血流分布。此外,*NO*还具有调节血管内皮生长、触发血管活性物质释放、促进血管生长与再生的作用。*NO*主要由*iNOS*诱导产生。*Jung*等^[34]发现,在心肌细胞慢性缺氧的条件下其*iNOS* mRNA的表达明显增加;而当编码HIF-1 α 的基因突变或者缺失,*iNOS* mRNA的表达被抑制,从而明确了低氧条件下存在HIF-1 α /*iNOS*信号。早期的研究显示,给予*iNOS*抑制剂后扩大了缺血再灌注所致的心肌梗死灶面积^[49],应用*iNOS*缺失的小鼠也得到了同样的结果^[50]。对过表达HIF-1 α 转基因鼠进行急性的心肌缺血再灌注处理,4周后与对照组相比,转基因鼠梗死灶的面积明显缩小,并伴心功能的明显改善,这些效应均与*iNOS*的表达增加密切相关^[36]。

4.2 调节炎症反应

心肌梗死后梗死灶会出现炎症反应。浸润的炎性细胞在局部损伤心肌组织中具有双重作用:早期适量的炎细胞具有一定心肌保护作用,而慢性聚集增多的炎细胞则加重心肌损伤。激活HIF-1可以减轻与炎症有关的趋化因子和黏附分子的表达,进而减少缺血后心脏炎症细胞的浸润和缩小梗死面积。*Albrecht*等^[51]报道,人远端肢体缺血预处理(remote ischemic preconditioning, *RIPC*)在增加右心房组织HIF-1 α 表达的同时,早期还能增加右心房组织过氧化物酶(myeloperoxidase, *MPO*)和IL-1 β 水平,同时循环系统中相关炎症因子如TNF- α 、IL-1 β 和IL-8水平均较正常人群对照组和未实施*RIPC*组有增加,作者认为这些因子具有一定的心肌保护作用。在众多炎症因子中,IL-8与心肌梗死关系密切,IL-8血清水平的增高已成为心肌缺血早期复发、心肌梗死及*PTCA*突发性死亡的预测指标之一。*Ockaili*等^[52]证实了用*PHD*抑制剂*DMOG*预处理兔子心脏,显示心脏的梗死区缩小、血清中IL-8水平下降及心肌内炎性细胞浸润减少,表明稳定HIF-1 α 后可以调节梗死激发的炎症反应。*Albrecht*等^[51]和*Ockaili*等^[52]的报道存在不一致之处,即稳定HIF-1 α 后炎症因子IL-8表达水平变化趋势存在差异,这可能与样本取材的时间节点不同有关。进一步的研究也提出,左心室组织在慢性持续性缺氧和慢性间断性缺氧刺激中炎

性反应存在差异^[53]。

脂联素是一种由脂肪组织和心肌细胞分泌的脂肪细胞因子, 具有重要的心肌保护作用。Natarajan等^[54]发现, 在用*PHD-2* siRNA稳定小鼠体内的HIF-1 α 时, 心脏和微血管内皮细胞内的脂联素mRNA的表达增加, 提示HIF-1 α 能调节脂联素的表达。研究发现, 缺乏脂联素的小鼠相比野生型小鼠而言其对心肌缺血缺氧更敏感, 而将外源性的脂联素灌注到野生型的小鼠体内能有效的限制梗死灶的扩大^[55]。脂联素的心肌损伤保护作用可能与脂联素通过降低多种黏附分子(VCAM-1、ICAM-1、选择素-E)^[56]和抑制TNF的生成与释放而调节炎症反应有关。

4.3 调节氧化应激

ROS在心脏IPC中具有重要的作用。关于ROS在心肌损伤方面的作用存在两种截然不同的理论。早期的一项报道显示, 在无缺血状态下给予外源性的ROS能够模拟IPC所产生的心肌保护作用^[57], 提示ROS在IPC所产生的心肌保护中发挥重要作用。线粒体ROS能够活化预先存在的蛋白激酶如PKC、ERK1/2及p38MAPK, 这些蛋白激酶在缺血预处理中发挥着重要的调节作用。Cai等^[41]发现, HIF-1 α 和线粒体ROS信号的心肌保护作用在缺血预适应的急性期就已经表现出来, 且这种保护作用能持续2~3 h。他们还证实, 当HIF-1 α 缺失时心脏中与缺血预处理信号密切相关的线粒体ROS的产生、PTEN的氧化及Akt的磷酸化都不同程度的被抑制。另一种理论是ROS会加重心肌损伤, 其机制可能与心肌缺血缺氧性损伤所产生的ROS开放的mPTP(一种决定细胞凋亡的关键因素)有关^[58]。通过稳定化HIF-1 α 使得新陈代谢由氧化磷酸化转变为无氧糖酵解有望减少在缺血-缺氧过程中线粒体ROS的产生, 进而降低心肌再灌注时mPTP开放的易感性^[59]。关于HIF-1 α 是ROS产生的上游信号还是下游信号尚存在争议^[60]。很可能ROS产生的量(少量或超量)及时间点(早期或晚期)对受损心肌所起的作用不同。

*HO-1*是HIF-1的靶基因, 也是一种具有抗氧化和抗炎反应作用的酶, 它能催化亚铁血红素氧化为胆绿素、一氧化碳和二价铁。与过表达*HO-1*小鼠相比, *HO-1*基因缺失的小鼠急性缺血再灌注处理后其心肌梗死灶更大, 提示*HO-1*具有心肌保护的效应^[61]。Jancso等^[62]进一步发现, 在用腺苷、肾上腺素及阿片类药物预处理乳SD大鼠的心肌细胞时表现出心肌

保护作用且心肌中*HO-1*的表达增加, 而这种作用可被*HO-1*特异性siRNA所阻遏。

4.4 活化内源性干细胞

低氧预处理、过表达HIF、药物抑制PHD和基因敲除PHD和FIH等均能有效活化干细胞中HIF-1信号。Ling等^[63]报道, 在糖尿病患者中由于HIF-1信号受损将导致内皮祖细胞动员迟滞和减少, 这可能是糖尿病合并急性心肌梗死患者心功能不佳的原因之一。相反, 经过低氧预处理/培养^[64]或过表达HIF-1的干细胞^[65]则有效参与了受损心肌组织的修复。活化HIF-1信号能提高缺血区心脏干细胞的存活并减少其凋亡^[66], 提高干细胞动员^[67]等来参与心肌保护。成年个体心脏干细胞较幼年个体心脏干细胞活性差, 其根本原因在于成年个体中心脏组织获得更多水平的氧供, 因此, 低氧是维持心脏干细胞活性的关键因素。

4.5 改善心肌细胞代谢

稳定化的HIF-1 α 使得细胞改变代谢方式从氧化磷酸化转变为无氧糖酵解, 以更好地适应低氧环境。在低氧环境下, 维持ATP的产量需要上调多种HIF-1 α 的靶基因, 例如葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter 1, GLUT1)和GLUT4(增加细胞的糖摄取)、糖酵解酶(如磷酸果糖激酶1和分解葡萄糖的醛缩酶)、乳酸脱氢酶A(促进丙酮酸转化为乳酸)、丙酮酸脱氢酶激酶(从线粒体氧化磷酸化中转移出丙酮酸)和线粒体蛋白酶[LON(lon protease homolog, mitochondrial), 能够在复合物IV中调节COX4-1(cytochrome c oxidase subunit 4-1)转变为COX4-2(cytochrome c oxidase subunit 4-2)亚基, 促进ETC(electron transport chain)组分的效能, 从而限制ROS的生成及增强线粒体自噬, 活化BNIP3(BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3)]^[68]。为了控制低氧环境下由糖酵解所产生的乳酸盐, HIF-1 α 上调了细胞膜表面能将乳酸盐转运出细胞的单羧基运输蛋白4^[69]而增加Na⁺和H⁺的交换^[70]。

腺苷是一种遍布人体细胞的内源性核苷, 可直接进入心肌经磷酸化生成腺苷酸, 参与心肌能量代谢, 同时还参与扩张冠脉血管、增加血流量。HIF-1不仅能直接调节心肌组织中腺苷的代谢^[71], 还调控CD73及腺苷A2B受体的活化。Eckle等^[72]针对HIF-1 α 的稳定化与腺苷信号通路在IPC急性期的相互作用作了研究, 发现IPC能够增加成年鼠心肌细胞外腺苷的含量, 且这种效应与HIF-1 α 依赖的CD73和A2B

受体的上调有关。IPC对于CD73和A2B受体的效应可通过应用DMOG或PHD-2 siRNA使得HIF-1 α 稳定化来模拟。相反, 缺失CD73的小鼠在给予PHD的抑制剂DMOG后, 心肌细胞的腺苷含量并不升高, 且梗死灶也不能有效地缩小。

4.6 调节miRNA表征

IPC及IPO均可诱导保护性miRNA(如miRNA-139-5p、miRNA-125b*、miRNA let-7b和miRNA-487b)来实现对损伤心肌的保护^[73]。Chen等^[74]证实, 血管内皮细胞中存在低氧反应性miRNA, 其他细胞模型中亦证实存在HIF-1直接调控的miRNA^[75-77]。因此, 心肌缺血性损伤可通过HIF-1调控miRNA的表达变化来实现心肌保护。

5 HIF-1持续活化对心肌保护的不利影响

尽管稳定HIF-1在心肌损伤保护中具有重要的作用, 但HIF-1过度活化所带来的不利影响也逐渐受到研究人员的重视。2008年, Lei等^[78]的一项研究显示, 通过基因敲除*VHL*后HIF-1 α 得以稳定的小鼠发生严重的心力衰竭和心脏横纹肌肉瘤。同样, 条件性PHD2失活的小鼠可发展为扩张性心肌病, 同时, 伴随红细胞生成增加和静脉淤血, 因此, HIF-1 α 的持续稳定和活化很可能是发展为扩张性心肌病的病因^[79]。2010年, Bekerejian等^[80]的研究进一步提示, 心肌细胞特异性过表达HIF-1 α 后可诱导心肌病, 而这种表型可通过失活HIF-1 α 而得以逆转。相似的结果在2010年Moslehi等^[81]和2012年Holscher等^[82]的研究中重现。这些报道中均采用基因调控手段使得心肌细胞中HIF-1 α 得以长期持续稳定和活化。因此, 长期持续活化HIF-1 α 与短期活化HIF-1 α 对心肌所起的作用可能不同。

6 问题与展望

HIF-1作为一种氧敏感的核转录因子, 在哺乳动物的生长发育、生理和病理低氧应答反应中起着举足轻重的作用。其自身活性的调控在很大程度上决定了细胞对于氧分压变化的敏感性和应答反应。当前, 心血管疾病已经逐渐成为影响人类身体健康的首要因素, 而缺血性心肌病是血管疾病的常见类型, 临床危害严重。靶向干预HIF-1在急性缺血性心肌病的保护的临床转化医学中正逐渐得到重视。IPC、RIPC、IPO的技术已经走入临床。近年来有研究报道,

异氟烷对于缺血再灌注损伤的心肌也有保护作用, 这种保护作用的发挥涉及HIF-1。基于HIF-1这一涉及缺血性心脏病病理生理反应的重要因子进行深入基础研究及靶向干预, 具有重要的理论意义和一定的临床转化价值。今后拟深化如下几个方面的研究。

精确认识HIF-1表达调控的时空特点及信号关联。目前, 对于HIF-1结构、表达及活性调节的基础研究取得很大的进展。对HIF-1与众多信号通路及某些关键因子的相互作用的进一步认识有望提出靶向干预HIF-1的新思路。在细胞和动物研究水平上, 采用基因调控技术精确研究HIF-1的功能日趋成熟。CRISPR/Cas9基因编辑系统是当前极具应用前景的基因操作技术^[83]。因此, 基于CRISPR/Cas9基因编辑系统可以实现对心肌细胞中HIF-1表达的时间和空间特性的研究, 从而为阐明HIF-1在缺血性心脏病中的生理和病理作用及相关机制提供新的策略。

建立心肌缺血损伤中HIF-1活化或抑制干预的节点判断标准。鉴于持续慢性活化HIF-1对心脏本身具有一些不利影响, 今后临床针对缺血性心脏病患者的治疗应以早期活化HIF-1、晚期抑制HIF-1为原则, 但相关时间节点和活化阈值的判断尚无标准。因此, 推进相关动物实验将有助于为这一问题的解决提供新的参考。

开展晚期心衰患者HIF-1表达特征的流行病学研究及抑制干预的临床研究。晚期心衰患者心脏组织中HIF-1呈高度活化状态, 这种过度活化伴随一系列的形态学变化。因此, 对晚期心衰患者抑制HIF-1也许是个辅助的治疗手段。鉴于此, 大力开展有效的HIF-1小分子化学抑制剂的研究显得意义重大。当前已有包括YC-1^[84]、Topotecan^[85]、Echinomycin^[86]在内的抑制剂的成功研制, 但相关体内应用尚缺乏足够的依据。miRNA对HIF-1表达和活性具有重要调控作用, 针对HIF-1靶向特异性miRNA的应用是另一个抑制HIF-1的可行性策略。总之, 在进一步明确晚期心衰患者心肌组织中HIF-1表达的流行病学特征的基础上, 采用合适的方法对符合标准的晚期心衰患者开展临床实验显得很有必要。

深化HIF-1介导干细胞移植治疗缺血性心脏病研究。当前, 干细胞移植研究成为缺血性心脏病辅助治疗的新方法。HIF-1与干细胞增殖、分化、迁移及存活等生物学特性的关系已有报道, 但相关体外生物学机制及体内生物学效应有待进一步阐明。

鉴于HIF-1对干细胞生物学功能具有举足轻重的作用, 采用最新的基因编辑手段对干细胞中HIF-1进行时空表达的调控是可行的。有关HIF-1介导干细胞存活、增殖、迁移、分化等相关基础研究将为推进干细胞移植治疗缺血性心脏病奠定更坚实的基础。

总之, 本文总结了HIF-1表达和功能调节机制, 阐述了缺血性心肌病中HIF-1表达和活性调控的特点, 特别是对HIF-1参与缺血性心肌损伤保护的机制进行了总结。尽管如此, 对于HIF-1的认识和研究还远远不够。因此, 阐明HIF-1活性的调控机制及信号转导通路不仅为缺血缺氧性疾病的药理学研究提供靶点, 也对其临床治疗颇有意义。

参考文献 (References)

- 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. *Mol Cell Bio* 1992; 12(12): 5447-54.
- 2 Hochachka PW, Lutz PL. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp Biochem Phys B* 2001; 130(4): 435-59.
- 3 Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, *et al.* Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 2001; 414(6863): 550-4.
- 4 Organization WH. The top 10 causes of death. <http://whoint/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
- 5 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 朱曼璐, 王文, 王拥军, 等. 中国心血管病报告2013概要. 中国循环杂志(Chen Weiwei, Gao Runlin, Liu Lisheng, Zhu Manlu, Wang Wen, Wang Yongjun, *et al.* China cardiovascular summary reoport 2013. *Chinese Circ J* 2014; 29(7): 487-91.
- 6 Tekin D, Dursun AD, Xi L. Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection. *Acta Pharmacol Sin* 2010; 31(9): 1085-94.
- 7 Ong SG, Hausenloy DJ. Hypoxia-inducible factor as a therapeutic target for cardioprotection. *Pharmacol Therapeut* 2012; 136(1): 69-81.
- 8 Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol* 2014; 76: 39-56.
- 9 Hashmi S, Al-Salam S. Hypoxia-inducible factor-1 alpha in the heart: A double agent? *Cardiol Rev* 2012; 20(6): 268-73.
- 10 Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: Regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(7): 1263-8.
- 11 Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 1996; 271(4 Pt 1): C1172-80.
- 12 Martin-Puig S, Tello D, Aragonés J. Novel perspectives on the PHD-HIF oxygen sensing pathway in cardioprotection mediated by IPC and RIPC. *Front Physiol* 2015; 6: 137.
- 13 Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: A novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 2001; 15(20): 2675-86.
- 14 Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J* 2012; 31(11): 2448-60.
- 15 Kim CH, Cho YS, Chun YS, Park JW, Kim MS. Early expression of myocardial HIF-1alpha in response to mechanical stresses: Regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Circ Res* 2002; 90(2): E25-33.
- 16 Kakinuma Y, Ando M, Kuwabara M, Katare RG, Okudela K, Kobayashi M, *et al.* Acetylcholine from vagal stimulation protects cardiomyocytes against ischemia and hypoxia involving additive non-hypoxic induction of HIF-1alpha. *FEBS Lett* 2005; 579(10): 2111-8.
- 17 Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, *et al.* Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 2007; 18(12): 4691-7.
- 18 Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. The hypoxia-inducible factor and tumor progression along the angiogenic pathway. *Int Rev Cytol* 2005; 242: 157-213.
- 19 Minet E, Michel G, Mottet D, Raes M, Michiels C. Transduction pathways involved in hypoxia-inducible factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic Biol Med* 2001; 31(7): 847-55.
- 20 Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(17): 6392-7.
- 21 Gao W, Sweeney C, Connolly M, Kennedy A, Ng CT, McCormick J, *et al.* Notch-1 mediates hypoxia-induced angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64(7): 2104-13.
- 22 Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, *et al.* Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res* 2009; 104(7): 879-86.
- 23 Yue J, Guan J, Wang X, Zhang L, Yang Z, Ao Q, *et al.* MicroRNA-206 is involved in hypoxia-induced pulmonary hypertension through targeting of the HIF-1alpha/Fhl-1 pathway. *Lab Invest* 2013; 93(7): 748-59.
- 24 Cascio S, D'Andrea A, Ferla R, Surmacz E, Gulotta E, Amodeo V, *et al.* miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 alpha and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells. *J Cell Physiol* 2010; 224(1): 242-9.
- 25 Liu LZ, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, *et al.* MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1alpha expression. *PLoS One* 2011; 6(4): e19139.
- 26 Grosso S, Doyen J, Parks SK, Bertero T, Paye A, Cardinaud B, *et al.* MiR-210 promotes a hypoxic phenotype and increases radioresistance in human lung cancer cell lines. *Cell Death Dis* 2013; 4: e544.
- 27 Yeh YM, Chuang CM, Chao KC, Wang LH. MicroRNA-138 suppresses ovarian cancer cell invasion and metastasis by targeting SOX4 and HIF-1alpha. *Int J Cancer* 2013; 133(4): 867-78.
- 28 Yamakuchi M, Lotterman CD, Bao C, Hruban RH, Karim B, Mendell JT, *et al.* P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(14):

- 6334-9.
- 29 Umezumi T, Tadokoro H, Azuma K, Yoshizawa S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood* 2014; 124(25): 3748-57.
- 30 Poitz DM, Augstein A, Gradehand C, Ende G, Schmeisser A, Strasser RH. Regulation of the Hif-system by micro-RNA 17 and 20a-role during monocyte-to-macrophage differentiation. *Mol Immunol* 2013; 56(4): 442-51.
- 31 Tanaka H, Sasayama T, Tanaka K, Nakamizo S, Nishihara M, Mizukawa K, *et al*. MicroRNA-183 upregulates HIF-1alpha by targeting isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) in glioma cells. *J Neurooncol* 2013; 111(3): 273-83.
- 32 Chen T, Yao LQ, Shi Q, Ren Z, Ye LC, Xu JM, *et al*. MicroRNA-31 contributes to colorectal cancer development by targeting factor inhibiting HIF-1alpha (FIH-1). *Cancer Bio Ther* 2014; 15(5): 516-23.
- 33 Nguyen SV, Claycomb WC. Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265(2): 382-6.
- 34 Jung F, Palmer LA, Zhou N, Johns RA. Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circ Res* 2000; 86(3): 319-25.
- 35 Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 2000; 342(9): 626-33.
- 36 Kido M, Du L, Sullivan CC, Li X, Deutsch R, Jamieson SW, *et al*. Hypoxia-inducible factor 1-alpha reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(11): 2116-24.
- 37 Shyu KG, Wang MT, Wang BW, Chang CC, Leu JG, Kuan P, *et al*. Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1alpha/VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat. *Cardiovasc Res* 2002; 54(3): 576-83.
- 38 Li X, Zhao H, Wu Y, Zhang S, Zhao X, Zhang Y, *et al*. Up-regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha enhanced the cardioprotective effects of ischemic postconditioning in hyperlipidemic rats. *Acta Biochim Biophys Sin* 2014; 46(2): 112-8.
- 39 Zhao H, Wang Y, Wu Y, Li X, Yang G, Ma X, *et al*. Hyperlipidemia does not prevent the cardioprotection by postconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury and the involvement of hypoxia inducible factor-1alpha upregulation. *Acta Biochim Biophys Sin* 2009; 41(9): 745-53.
- 40 Cai Z, Luo W, Zhan H, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is required for remote ischemic preconditioning of the heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(43): 17462-7.
- 41 Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, Fox-Talbot K, Wang L, Wei C, *et al*. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha. *Cardiovasc Res* 2008; 77(3): 463-70.
- 42 Elson DA, Thurston G, Huang LE, Ginzinger DG, McDonald DM, Johnson RS, *et al*. Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Gene Dev* 2001; 15(19): 2520-32.
- 43 Dai Y, Xu M, Wang Y, Pasha Z, Li T, Ashraf M. HIF-1alpha induced-VEGF overexpression in bone marrow stem cells protects cardiomyocytes against ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42(6): 1036-44.
- 44 Wang Z, Si LY. Hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor in the cardioprotective effects of intermittent hypoxia in rats. *Ups J Med Sci* 2013; 118(2): 65-74.
- 45 Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, *et al*. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2003; 108(1): 79-85.
- 46 Xue J, Du G, Shi J, Li Y, Yasutake M, Liu L, *et al*. Combined treatment with erythropoietin and granulocyte colony-stimulating factor enhances neovascularization and improves cardiac function after myocardial infarction. *Chinese Med J* 2014; 127(9): 1677-83.
- 47 Lee Y, McGinn AN, Olsen CD, Nam K, Lee M, Shin SK, *et al*. Human erythropoietin gene delivery for cardiac remodeling of myocardial infarction in rats. *J Control Release* 2013; 171(1): 24-32.
- 48 Wang X, Chen Y, Kuang D, Zhang L, She T, Jie W, *et al*. The cardioprotective effects of erythropoietin in myocardial ischemic injury via upregulation of SDF-1 by JAK2/STAT3. *Int J Cardiol* 2012; 156(3): 320-2.
- 49 Takano H, Manchikalapudi S, Tang XL, Qiu Y, Rizvi A, Jadoon AK, *et al*. Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation* 1998; 98(5): 441-9.
- 50 Guo Y, Jones WK, Xuan YT, Tang XL, Bao W, Wu WJ, *et al*. The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(20): 11507-12.
- 51 Albrecht M, Zitta K, Bein B, Wennemuth G, Broch O, Renner J, *et al*. Remote ischemic preconditioning regulates HIF-1alpha levels, apoptosis and inflammation in heart tissue of cardiac surgical patients: A pilot experimental study. *Basic Res Cardiol* 2013; 108(1): 314.
- 52 Ockaili R, Natarajan R, Salloum F, Fisher BJ, Jones D, Fowler AA, 3rd, *et al*. HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: Role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(2): H542-8.
- 53 Ramirez TA, Jourdan-Le Saux C, Joy A, Zhang J, Dai Q, Mifflin S, *et al*. Chronic and intermittent hypoxia differentially regulate left ventricular inflammatory and extracellular matrix responses. *Hypertens Res* 2012; 35(8): 811-8.
- 54 Natarajan R, Salloum FN, Fisher BJ, Kukreja RC, Fowler AA, 3rd. Hypoxia inducible factor-1 upregulates adiponectin in diabetic mouse hearts and attenuates post-ischemic injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008; 51(2): 178-87.
- 55 Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, *et al*. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med* 2005; 11(10): 1096-103.
- 56 Cai J, Yi FF, Yang XC, Lin GS, Jiang H, Wang T, *et al*. Transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves cardiac function in infarcted rat hearts. *Cytotherapy* 2007; 9(3): 283-91.
- 57 Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, Scognamiglio A, De Simone C,

- Violante A, *et al.* Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1997; 80(5): 743-8.
- 58 Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: Its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35(4): 339-41.
- 59 Ong SG, Lee WH, Theodorou L, Kodo K, Lim SY, Shukla DH, *et al.* HIF-1 reduces ischaemia-reperfusion injury in the heart by targeting the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* 2014; 104(1): 24-36.
- 60 Heusch G. HIF-1 α and paradoxical phenomena in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2012; 96(2): 214-5; discussion 16-9.
- 61 Yet SF, Tian R, Layne MD, Wang ZY, Maemura K, Solovyeva M, *et al.* Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res* 2001; 89(2): 168-73.
- 62 Jancso G, Cserepes B, Gasz B, Benko L, Borsiczky B, Ferenc A, *et al.* Expression and protective role of heme oxygenase-1 in delayed myocardial preconditioning. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1095: 251-61.
- 63 Ling L, Shen Y, Wang K, Jiang C, Fang C, Ferro A, *et al.* Worse clinical outcomes in acute myocardial infarction patients with type 2 diabetes mellitus: Relevance to impaired endothelial progenitor cells mobilization. *PLoS One* 2012; 7(11): e50739.
- 64 Li TS, Cheng K, Malliaras K, Matsushita N, Sun B, Marban L, *et al.* Expansion of human cardiac stem cells in physiological oxygen improves cell production efficiency and potency for myocardial repair. *Cardiovasc Res* 2011; 89(1): 157-65.
- 65 Cerrada I, Ruiz-Sauri A, Carrero R, Trigueros C, Dorronsoro A, Sanchez-Puelles JM, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 α contributes to cardiac healing in mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. *Stem Cells Dev* 2013; 22(3): 501-11.
- 66 Yan F, Yao Y, Chen L, Li Y, Sheng Z, Ma G. Hypoxic preconditioning improves survival of cardiac progenitor cells: Role of stromal cell derived factor-1 α -CXCR4 axis. *PLoS One* 2012; 7(7): e37948.
- 67 Huang M, Nguyen P, Jia F, Hu S, Gong Y, de Almeida PE, *et al.* Double knockdown of prolyl hydroxylase and factor-inhibiting hypoxia-inducible factor with nonviral minicircle gene therapy enhances stem cell mobilization and angiogenesis after myocardial infarction. *Circulation* 2011; 124(11 Suppl): S46-54.
- 68 Cadenas S, Aragones J, Landazuri MO. Mitochondrial reprogramming through cardiac oxygen sensors in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 2010; 88(2): 219-28.
- 69 Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J Biol Chem* 2006; 281(14): 9030-7.
- 70 Shimoda LA, Fallon M, Pisarcik S, Wang J, Semenza GL. HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291(5): L941-9.
- 71 Wu J, Bond C, Chen P, Chen M, Li Y, Shohet RV, *et al.* HIF-1 α in the heart: Remodeling nucleotide metabolism. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 82: 194-200.
- 72 Eckle T, Kohler D, Lehmann R, El Kasmi K, Eltzschig HK. Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: A new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation* 2008; 118(2): 166-75.
- 73 Varga ZV, Zvara A, Farago N, Kocsis GF, Pipicz M, Gaspar R, *et al.* MicroRNAs associated with ischemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischemic pre- and postconditioning: ProtectomiRs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; 307(2): H216-27.
- 74 Chen Z, Lai TC, Jan YH, Lin FM, Wang WC, Xiao H, *et al.* Hypoxia-responsive miRNAs target argonaute 1 to promote angiogenesis. *J Clin Invest* 2013; 123(3): 1057-67.
- 75 Shan F, Li J, Huang QY. HIF-1 α -induced up-regulation of miR-9 contributes to phenotypic modulation in pulmonary artery smooth muscle cells during hypoxia. *J Cell Physiol* 2014; 229(10): 1511-20.
- 76 He M, Wang QY, Yin QQ, Tang J, Lu Y, Zhou CX, *et al.* HIF-1 α downregulates miR-17/20a directly targeting p21 and STAT3: A role in myeloid leukemic cell differentiation. *Cell Death Differ* 2013; 20(3): 408-18.
- 77 Chen Z, Li Y, Zhang H, Huang P, Luthra R. Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression. *Oncogene* 2010; 29(30): 4362-8.
- 78 Lei L, Mason S, Liu D, Huang Y, Marks C, Hickey R, *et al.* Hypoxia-inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell Bio* 2008; 28(11): 3790-803.
- 79 Minamishima YA, Moslehi J, Bardeesy N, Cullen D, Bronson RT, Kaelin WG Jr. Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure. *Blood* 2008; 111(6): 3236-44.
- 80 Bekerdejian R, Walton CB, MacCannell KA, Ecker J, Kruse F, Outten JT, *et al.* Conditional HIF-1 α expression produces a reversible cardiomyopathy. *PLoS One* 2010; 5(7): e11693.
- 81 Moslehi J, Minamishima YA, Shi J, Neuberger D, Charytan DM, Padera RF, *et al.* Loss of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in cardiomyocytes phenocopies ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2010; 122(10): 1004-16.
- 82 Holscher M, Schafer K, Krull S, Farhat K, Hesse A, Silter M, *et al.* Unfavourable consequences of chronic cardiac HIF-1 α stabilization. *Cardiovasc Res* 2012; 94(1): 77-86.
- 83 Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Human Mol Genet* 2014; 23(R1): R40-6.
- 84 Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, Kim J, Lee JC, Kim MS, *et al.* YC-1: A potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(7): 516-25.
- 85 Puppo M, Battaglia F, Ottaviano C, Delfino S, Ribatti D, Varesio L, *et al.* Topotecan inhibits vascular endothelial growth factor production and angiogenic activity induced by hypoxia in human neuroblastoma by targeting hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α . *Mol Cancer Ther* 2008; 7(7): 1974-84.
- 86 Cairns RA, Papandreou I, Sutphin PD, Denko NC. Metabolic targeting of hypoxia and HIF1 in solid tumors can enhance cytotoxic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(22): 9445-50.