缺氧诱导因子在新生儿坏死性小肠结肠炎中的 作用机制研究

张云飞 张霄 郭春宝*

(重庆医科大学附属儿童医院肝胆外科/国家儿童健康与疾病临床医学研究中心/儿童发育疾病研究教育部 重点实验室/儿科学重庆市重点实验室,重庆 400014)

摘要 该文探讨了缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)在新生儿坏死性小肠结肠炎(neonatal necrotizing enterocolitis, NEC)中的作用机制。收集8例NEC患儿小肠组织作为疾病组和6例胃肠道畸形患儿小肠组织作为对照组。将40只7日龄的C57BL/6新生鼠(WT)分为NEC组(WT/NEC, n=20)和对照组(WT/DF, n=20), 40只7日龄C57BL/6背景的谷氧还原蛋白1(glutaredoxin1, Grx1)基因敲除鼠(Grx1^{-/-})分为NEC组(Grx1^{-/-}/NEC, n=20)和对照组(Grx1^{-/-}/DF, n=20)。Western blot 检测人和小鼠肠组织HIF-1 α 、小鼠肠组织血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA); qRT-PCR检测小鼠肠道血管内皮生长因子VEGFA mRNA,免疫荧光染色检测人和小鼠肠组织HIF-1 α 。结果显示,NEC患儿小肠组织中HIF-1 α 表达量较WT/DF显著降低(P<0.05); WT/NEC 小鼠小肠组织HIF-1 α 和VEGFA蛋白表达量较WT/DF显著降低(P<0.05); WT/NEC组小肠组织中 VEGFA表达量较WT/DF组显著降低(P<0.05), $Grx1^{-/-}$ /NEC组VEGFA表达量较WT/NEC组显著升高 (P<0.05); HIF-1 α 主要表达于小肠上皮细胞,NEC患儿肠组织和NEC小鼠肠组织中HIF-1 α 免疫荧光 染色强度均较各自对照组显著降低, 而Grx1基因敲除显著提高了NEC小鼠肠组织HIF-1 α 免疫荧光 染色强度。该研究结果表明,HIF-1 α 在NEC患儿和NEC小鼠中有重要作用,其机制可能与肠道微血 管的发育相关。

关键词 坏死性小肠结肠炎;缺氧诱导因子;血管内皮生长因子;谷氧还原蛋白1

Mechanism Investigation of Hypoxia-Inducible Factor in Neonatal Necrotizing Enterocolitis

ZHANG Yunfei, ZHANG Xiao, GUO Chunbao*

(Department of Hepatobiliary Surgery Children's Hospital of Chongqing Medical University/National Clinical Research Center for Child Health and Disorders/Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders/ Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China)

Abstract This study was to investigate the role of HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α) in NEC (neonatal necrotizing enterocolitis) and its possible mechanism. The small intestine tissues of eight children with NEC were collected as the disease group and six children with gastrointestinal abnormalities as the control group. Forty 7-day-

收稿日期: 2020-12-25 接受日期: 2021-02-22

国家自然科学基金(批准号: 30973440、30770950)、国家自然科学基金重点项目(批准号: 30330590)和重庆市自然科学基金重点项目(批准号: CSTC、2008BA0021、cstc2012jjA0155)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 13032386618, E-mail: guochunbao@foxmail.com

Received: December 25, 2020 Accepted: February 22, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30973440, 30770950), Key Project of the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30330590), and Key Project of the Chongqing Natural Science Foundation (Grant No.CSTC, 2008BA0021, cstc2012jjA0155)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-13032386618, E-mail: guochunbao@foxmail.com

URL: http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5501

old C57BL/6 newborn mice were divided into the NEC group (WT/NEC, n=20) and control group (WT/DF, n=20); Forty 7-day-old Grx1 (glutaredoxin1) knockout (Grx1--) mice on C57BL/6 background were divided into the NEC group ($Grx1^{-/-}$ /NEC, n=20) and control group ($Grx1^{-/-}$ /DF, n=20). Western blot was used to detect HIF-1 α in human and mouse intestinal tissues. It also detected VEGFA (vascular endothelial growth factor A) in mouse intestinal tissues. Mouse intestinal VEGFA mRNA was detected by qRT-PCR. Immunofluorescence staining was used to detect HIF-1 α in intestinal tissue of children and newborn mice. The expression of HIF-1 α in the small intestine of NEC children was significantly lower than that in the control group (P < 0.05). The expression levels of HIF-1a and VEGFA in the small intestine of WT/NEC mice were significantly lower than those in the WT/DF group (P < 0.05). The mRNA expression of VEGFA in WT/NEC mice intestine tissue was significantly lower than that in the WT/DF group (P < 0.05), and the expression of VEGFA in the Grx1⁻ ^{/-}/NEC group was significantly higher than that in WT/NEC group (P < 0.05). HIF-1 α was mainly expressed in small intestinal epithelial cells. The immunofluorescence intensity of HIF-1a staining in small intestinal tissues of NEC children and NEC mice was significantly lower than that in the control group, respectively. While Grx1 ablation significantly increased the intensity of HIF-1a immunofluorescence staining in NEC mouse intestine tissue. The results show that HIF-1 α plays an important role in NEC children and NEC mice, and its mechanism may be related to the development of intestinal microvascular.

Keywords neonatal necrotizing enterocolitis; hypoxia inducible factor; vascular endothelial growth factor; glutaredoxin1

新生儿坏死性小肠结肠炎(neonatal necrotizing enterocolitis, NEC)是最常见和最具破坏性的早产儿胃 肠道疾病^[1]。NEC主要影响早产儿,体重不足1 500 g 的早产儿中,其NEC发生率约为7%^[2]。在过去的几 十年里,随着医学技术的发展,NEC的总体发病率并 没有降低,而且死亡率仍然很高(10%~30%),该疾病 一直是新生儿医学领域的研究重点和热点。其发 病机制有小肠功能不成熟、缺氧、肠道免疫屏障受 损、人工喂养和肠道内的非正常菌群定植等[4]。多 种危险因素可以促进NEC的发生,包括先天性心脏 病^[5]、红细胞悬液输入和贫血^[6]、产妇子痫前期胎 盘供血不足和产时窒息^[7]、肠道微循环的改变^[8]。 这些发病机制和危险因素都和缺血缺氧相关。小肠 的血流量变化快,容易导致缺血缺氧,因此被认为是 NEC病理过程的关键起始因素,引起了肠道中一系 列的炎症反应¹⁹。缺氧会触发组织适应缺氧环境的 机制,引起各种细胞、系统、代谢反应,并且激活缺 氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α, HIF-1α)。 HIF-1α是一种调节缺氧诱导基因表达所必需的转录 因子^[10],可通过调节血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达来调控血管生 成,从而刺激内皮细胞增殖,促进内皮细胞和血管平 滑肌细胞的迁移,抑制细胞凋亡[11-12]。VEGF家族有

多种亚型,包括VEGF-A、-B、-C、-D、-E),VEGF-A被认为是最重要的血管生成因子。我们在预实验中发现,NEC患儿小肠组织中,HIF-1α表达量降低,肠道的微血管数量减少。因此,我们推测HIF-1α的表达降低在NEC的发生中起重要作用,通过下调VEGFA 影响小肠的微血管生成,从而促进NEC的发生。本研究首先收集NEC患儿小肠组织,检测HIF-1α的表达量,随后建立NEC小鼠模型,并且在此模型中引入 *Grx1*⁺⁻小鼠^[13],检测小肠组织的HIF-1α表达变化和 VEGFA表达量变化,探讨HIF-1α在NEC中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

试剂包括: Similac配方奶(Abbott Laboratories, 美国); 犬代乳奶粉(Pet-Ag, 美国); SDS-PAGE电泳 凝胶配制试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公 司); 高效RIPA组织裂解液(北京索莱宝科技有限公 司); 5×蛋白上样缓冲液、快速封闭液(上海碧云天 生物科技有限公司); HIF-1α Rabbit pAb(成都正能 生物技术有限责任公司); β-actin抗体(武汉三鹰生 物技术有限公司); 山羊抗兔IgG(成都正能生物技术 有限责任公司); 0.45 μm PVDF膜(Millipore, 德国); Trizol(Invitrogen, 英国); Evo M-MLV反转录试剂预 混液(11711)(湖南艾科瑞生物工程有限公司); SYBR[®] Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒II(11702)(湖南 艾科瑞生物工程有限公司)。

1.2 临床样本收集

收集2020年1月至2020年12月重庆医科大学附 属儿童医院肝胆外科急诊手术NEC患儿(8例)切除的 小肠组织作为NEC组,肠道畸形患儿(6例,包括十二 指肠闭锁、回肠闭锁、肠吻合)手术切除的小肠组织 作为非NEC对照组。本研究经过所有患儿监护人的 知情同意,并经重庆医科大学医学伦理委员会批准。

1.3 动物分组及处理

7日龄背景为C57BL/6的新生小鼠(重庆医科 大学实验动物中心, SPF级) 40只, 雌雄不限, 体重 2.5 g~4.5 g, 由随机数软件产生随机数的方法将新 生小鼠分为对照组(WT/DF)和NEC组(WT/NEC),每 组20只;7日龄背景为C57BL/6的Grx1--新生小鼠 (四川大学实验动物中心, SPF级) 40只, 用以上同 样的方法分为对照组(Grx1--/DF)和NEC组(Grx1--/ NEC)。对照组小鼠由母鼠喂养,不做任何处理; NEC组小鼠置于恒温孵育箱中, 配制代乳品^[11], 灌胃 喂养,每次(0.03~0.04) mL/g, 1次/4 h。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) 5 mg/kg灌胃, 每日1次。给予缺 氧刺激60 s(置于100%氮气环境), 冷刺激10 min(置 于4 ℃环境)^[4]。建模3日过程中,每日给予2次缺氧 和冷刺激。本研究经重庆医科大学医学伦理委员会 批准,实验过程符合国家和单位有关实验动物的管 理和使用规定。

1.4 方法

1.4.1 记录新生小鼠的精神状态、活动、腹胀、腹泻、 便血等情况,两组小鼠在建模过程中的体重变化。

1.4.2 组织取材保存和形态学检测 建模结束,小 鼠采用断头法处死,取近回盲部小肠约3 cm,免疫荧 光染色观察,剩余小肠组织超低温冻存备用。取末 端小肠组织,通用型组织固定液固定,包埋、切片、 HE染色、拍照分析。肠组织病理学评分方法采用 Natalie^[14]所使用的双盲法,由病理学专家对肠组织 进行病理学评分,分值≥2分认为是成功的NEC模型, 每张切片随机在100倍镜下拍摄3张照片,3张照片评 分的平均值作为该样本的分值。

1.4.3 收集的外科手术标本,取1 cm进行石蜡包埋, 免疫荧光染色观察,其余-80 °C冻存备用。

1.4.4 Western blot 冻存备用的肠组织样本, 按照

每20 mg组织加入200 μL高效RIPA组织裂解液,组织 匀浆器匀浆2 min,4 ℃离心5 min(14 000 r/min),取1 μL 上清检测蛋白浓度(BCA法),其余上清加入5×蛋白 上样缓冲液煮沸5 min,冻存备用。取40 μg备用样品 进行SDS-PAGE凝胶电泳,转膜(200 V,100 min),室 温封闭10 min,按抗体说明书将一抗稀释(稀释比例 1:1 000),4 ℃环境下,膜于抗体中孵育10 h;随后加 入二抗(稀释比例1:500)室温孵育1 h, ECL显影。分 析软件采用ImageJ,目的蛋白相对表达量以目的蛋 白与内参蛋白条带灰度值比值表示。

1.4.5 免疫荧光染色 备好的石蜡切片进行脱蜡 至水;随后切片置于柠檬酸(pH6.0)抗原修复液中修 复抗原;切片用组化笔画圈,浸泡于3%双氧水溶液 中避光孵育25 min,中性PBS洗涤3次,每次5 min;滴 加BSA孵育30 min;滴加一抗,4°C孵育10 h;中性 PBS洗涤3次,每次5 min。滴加荧光二抗,避光孵育 1 h;滴加DAPI染液,避光孵育10 min;中性PBS洗涤 3次,每次5 min。滴加自发荧光淬灭剂孵育5 min,流 水冲洗10 min;滴加抗荧光淬灭剂封片;每张切片用 荧光显微镜随机采集3个200倍视野图像,用ImageJ 软件测量每个图像平均荧光强度,取平均值作为该 样本的荧光强度,进行统计分析。

1.4.6 实时荧光定量PCR检测VEGFA的mRNA表达 水平 取备用组织,采用Trizol法提取组织RNA,分 光光度计检测RNA浓度,调整RNA浓度至400 ng/μL, 将RNA逆转录为cDNA。以cDNA为模板,分别对目 的基因和内参基因进行扩增(Bio-Rad CFX90 Realtime PCR仪)。反应条件为:95°C 30 s;95°C 5 s,60°C 30 s,共39个循环。以β-actin为内参,用2^{-dACi}法分析 VEGFA的mRNA表达水平。引物序列如表1所示。

1.5 统计学处理

分析和作图软件采用GraphPad Prism 8.0。采 用正态性分布检验分类定量资料,用(*x*±s)表示正态 分布且方差齐的定量资料,独立样本t检验比较两 组间差异;多组间比较采用单因素方差分析。用中 位数M(Q)表示不符合正态性分布或方差不齐的定 量资料,用Wilcoxon Mann-Whitney检验进行组间比 较。P<0.05表示有统计学差异。

2 结果

2.1 NEC患儿肠组织HIF-1α蛋白表达

Western blot检测结果显示, NEC患儿小肠组

织HIF-1α表达较对照组显著降低,差异有统计学意 义(P<0.01,图1A)。免疫荧光染色检测显示,HIF-1α主要表达于患儿小肠上皮细胞,NEC患儿小肠组 织的HIF-1α平均荧光强度较对照组患儿显著降低 (图1B)。

2.2 动物一般情况和病理学改变

由母鼠喂养的WT/DF和Grx1^{-/-}/DF小鼠精神 状态良好,活动较多,皮下脂肪丰富,无腹胀、腹 泻、便血等症状。采用配方乳喂养的WT/NEC小 鼠第2日开始出现腹胀、腹泻、便血,活动减少,皮 下脂肪减少, Grx1^{-/-}/NEC小鼠仅出现轻度腹胀和腹 泻, 无便血和消瘦等症状; 小鼠建模前后体重变化 (图2D)。肉眼观察小鼠组织, WT/DF和Grx1^{-/-}/DF 小鼠肠组织较细, 呈淡黄色, 无积气、水肿、出血 改变; WT/NEC小鼠肠积气显著, 质脆, 部分回肠末 端有出血、坏死等改变; Grx1^{-/-}/NEC小鼠小肠轻 度积气, 部分轻度水肿, 无出血、坏死等改变。100 倍镜下观察WT/DF和Grx1^{-/-}/DF小鼠肠组织, 层次 结构清晰, 基底膜连续, 腺体整齐, 绒毛完整, 黏膜 层、黏膜下层和固有层结构连接紧密; NEC组小鼠 肠组织结构破坏, 肠绒毛数量减少、排列紊乱、水 肿, 部分坏死脱落, 基底层变薄, 部分断裂; Grx1^{-/-}/ NEC小鼠绒毛轻度水肿, 少量脱落, 无坏死, 基底层 连续(图2B)。病理学评分统计显示, WT/NEC组小 鼠肠组织评分值(3.17±0.44)较WT/DF组(0.17±0.25) 显著升高(P<0.000 1, 图2C), Grx1^{-/-}/NEC组病理评 分值(1.29±0.38)较WT/NEC组(3.17±0.44)显著降低 (P<0.000 1)。建模结束后, WT/NEC组小鼠体重较

Table 1 Primer sequences used in Real-time PCR 引物 序列 Primer Sequence VEGFA Forward: 5'-GCA GCG ACA AGG CAG ACT AT-3' Reverse: 5'-AGA ACC AAC CTC CTC AAA CCG-3' Forward: 5'-CAT CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C-3' β-actin Reverse: 5'-ATG GAG CCA CCG ATC CAC A-3' 0.8 HIF-1 α relative to β -actin .5'0 α - β -actin (A) NEC Control HIF-1α β-actin Control NEC (B) DAPI HIF-1α Merge Average intensity of HIF-1α 11 11 11 Control 200 µm 200 µm 200 µm NEC Control NEC

表1 实时荧光定量PCR引物序列

A: Western blot检测发现患儿肠组织HIF-1α蛋白表达量; B: 荧光显微镜观察患儿小肠组织免疫荧光染色, HIF-1α主要表达于肠上皮细胞(绿色为HIF-1α, 蓝色为DAPI)。**P<0.01, ****P<0.000 1, 与对照组相比。

A: Western blot showed HIF-1 α expression in the intestinal tissues of children; B: immunofluorescence staining of children small intestine tissues was observed under fluorescence microscope. HIF-1 α is mainly expressed in intestinal epithelial cells (HIF-1 α : green; DAPI: blue). **P<0.01, ****P<0.000 1 *vs* control group.

图1 患儿HIF-1α检测 Fig.1 HIF-1α detection in children



A:小肠不同程度损伤典型实例(分别为O~IV级); B:新生小鼠肠组织用HE染色进行形态学分析:WT/NEC小鼠肠组织损伤严重,Grx1基因敲除减轻了NEC引起的肠道损伤; C:病理学评分:WT/NEC小鼠肠组织病理学评分较WT/DF显著升高,Grx1基因敲除降低了NEC小鼠肠组织病理学评分; D:从第9日之后,WT/NEC小鼠体重较WT/DF小鼠减轻,Grx1基因敲除减轻了体重变化。**P<0.01, ****P<0.000 1, 与WT/DF相比; **P<0.005, ****P<0.000 1, 与WT/NEC相比。

A: typical characteristics of gross morphology (Grade O-IV, respectively); B: stained with HE for morphometric analyse (Original magnification): the intestinal tissue of WT/NEC mice was seriously damaged, and *Grx1* ablation alleviated this damage; C: histopathological score: the intestinal histopathological score of WT/NEC mice was higher than WT/DF group. *Grx1* ablation decreased the intestinal histopathological score of NEC mice; D: after day 9, weight loss was observed in WT/NEC mice compared with WT/DF mice, ablation of *Grx1* ameliorated this trend. **P<0.01, ****P<0.000 1 *vs* WT/DF group; "P<0.05, "##P<0.001, "###P<0.000 1 *vs* WT/NEC group.

图2 病理学和体重变化 Fig.2 Pathology and body weight changes

WT/DF减轻, Grx1基因敲除减弱了NEC处理对小鼠体重增长的影响(P<0.001,图2D)。

2.3 小鼠肠组织HIF-1α蛋白表达

免疫荧光染色检测显示, HIF-1 α 同样主要表 达于小鼠小肠上皮细胞, WT/NEC小鼠小肠组织的 HIF-1 α 平均荧光强度较WT/DF小鼠降低(P<0.000 1, 图3A); *Grx1^{-/-}*/NEC小鼠HIF-1 α 平均荧光强度较WT/ NEC小鼠升高(P<0.001, 图3A)。Western blot检测结 果显示, WT/NEC组小鼠小肠组织HIF-1 α 蛋白表达 量较WT/DF显著降低(P<0.01, 图3B)。

2.4 小肠组织VEGF蛋白和VEGFA mRNA表达

Western blott检测结果显示,WT/NEC小鼠肠 组织VEGFA蛋白表达水平较WT/DF小鼠显著降低 (P<0.001,图4A)。RT-PCR结果显示,WT/NEC组小 鼠小肠组织中VEGFA的mRNA表达水平较WT/DF组 显著降低(P<0.05,图4B),Grx1^{-/-}/NEC小鼠VEGFA的 mRNA表达水平较WT/NEC组显著升高(P<0.01,图4B)。

3 讨论

HIF-1是由α和β亚基组成的异二聚体,调节缺 氧诱导基因表达所必需的转录因子,包括血管生成、 红细胞生成、细胞增殖、细胞凋亡、能量产生等多 种缺氧诱导基因,促进细胞适应低氧微环境^[15-16]。许 多研究报告指出,当细胞暴露于缺氧或经历应激时 HIF-1α对细胞是有益的^[17-18]。本研究发现,NEC患 儿小肠组织中HIF-1α显著减低,证明NEC的发生和 HIF-1α有密切联系。我们用免疫荧光染色定位HIF-1α,发现其主要表达于小肠上皮细胞,并且在免疫荧 光的半定量分析中,也同样取得了和Western blot一 致的结果,NEC患儿和NEC小鼠小肠组织HIF-1α染 色的平均荧光强度均较各自对照组显著降低。随后



A: 荧光显微镜观察小鼠小肠组织HIF-1α免疫荧光染色。HIF-1α主要表达于肠上皮细胞, NEC小鼠肠组织HIF-1α平均荧光强度较对照组降低(绿色为HIF-1α, 蓝色为DAPI), Grx1基因敲除显著提高了NEC小鼠肠组织HIF-1α的荧光强度。B: Western blot检测发现NEC小鼠肠组织HIF-1α蛋白表达较对照组显著降低。**P<0.01, ****P<0.000 1,与WT/DF相比; ###P<0.001,与WT/NEC相比。

A: immunofluorescence staining of mice small intestine tissues was observed under fluorescence microscope (Original magnification). HIF-1 α is mainly expressed in intestinal epithelial cells. Compared with the WT/DF group, the mean fluorescence intensity of HIF-1 α in the intestinal tissues of WT/NEC mice was reduced (green: HIF-1 α ; blue: DAPI); in contrast, HIF-1 α expression was increased in the intestinal epithelial cells after *Grx1* ablation. B: Western blot showed that HIF-1 α protein expression in the intestinal tissues of WT/NEC mice was significantly lower than that in WT/NEC group. **P<0.01, ****P<0.000 1 *vs* WT/DF; ###P<0.001 *vs* WT/NEC group.

图3 小鼠肠组织HIF-1α检测 Fig.3 Detection of HIF-1α in intestinal tissue of mice

我们在NEC动物模型上进行了相同的研究, NEC小 鼠小肠组织中HIF-1α同样较对照组显著降低, 和临床 样本研究取得了一致的结果。有研究表明, 使用二 甲基氧基甘氨酸(dimethyloxalylglycine, DMOG, 抑制 HIF-1α的降解)能够减轻NEC小鼠的肠道损伤^[4]; 在 小鼠的肠炎模型中, 过表达HIF-1α可减轻肠道损伤, 这些结果都表明HIF-1α是有益的靶点^[19]。HIF-1α 的调节通过脯氨酸羟化结构域酶(prolyl hydroxylase domains, PHDs)和pVHL(von hippel lindau)对HIF-1α 进行蛋白酶体降解,从而调节HIF-1α丰度;而HIF-1α 则通过调节VEGFA的表达来介导血管生成^[20]和围 产期的氧稳态^[21-22]。在缺氧条件下,PHDs不被激活, HIF-1α稳定,并与HIF靶基因启动子中存在的HIF反 应元件结合,从而激活调节氧稳态基因的转录^[10],包 括VEGF^[16]。VEGF与血管内皮细胞受体结合调控血 管生成,引起内皮细胞出芽、迁移和增殖,并最终形 成新的血管分支^[23]。在生理状态下,肠道会经历显著 的血流波动,空腹状态下大约有全身血液总量的5%



A: Western blot检测结果表明WT/NEC小鼠肠组织VEGFA蛋白表达量较WT/DF小鼠显著降低。B: RT-PCR结果表明WT/NEC小鼠肠组织VEGFA mRNA表达量较WT/DF小鼠显著降低, *Grx1*基因敲除显著提高了NEC小鼠肠组织VEGFA mRNA表达量。*P<0.05, ***P<0.001, 与WT/DF相比; ##P<0.01, 与WT/NEC相比。

A: Western blot showed that the expression of VEGFA in intestinal tissue of WT/NEC mice was significantly lower than that in WT/DF group. B: the expression of *VEGFA* mRNA in the intestinal tissue of WT/NEC mice were significantly lower than that in WT/DF group, whereas the levels was increased by *Grx1* ablation. *P<0.05, ***P<0.001 vs WT/DF group; $^{\#\#}P<0.01$ vs WT/NEC group.

图4 小鼠肠组织VEGFA蛋白和VEGFA mRNA检测 Fig.4 Detection of VEGFA protein and VEGFA mRNA in intestinal tissue of mice

进入肠道,进食后大约会有全身总血液量的30%进入肠道^[24]。微血管减少导致肠灌注受损与NEC的发生密切相关^[25]。因此,我们检测了*VEGFA* mRNA在动物中的表达量,发现NEC小鼠小肠组织中*VEGFA* 的表达量较对照组显著降低,VEGFA蛋白表达水平同样降低,说明对VEGFA的调控是从基因层面进行的,而HIF-1α正好是作用于VEGFA的转录启动子^[4]。我们推测HIF-1α的表达降低,导致了*VEGFA*的转录下降,最终引起VEGFA的蛋白表达水平下降;稳定HIF-1α的表达,能够提高*VEGFA*的表达量,从而对NEC起保护作用。为了对此进行验证,我们引入了 *Grx1*⁺⁺鼠,对NEC模型中HIF-1α的表达进行干预。

谷氧还原蛋白1(glutaredoxin1, Grx1)在体内是 一种具有保守性和普遍表达的酶,它主要抑制蛋白 质S-谷胱甘肽化,调节蛋白质的氧化还原反应^[26]。 蛋白质半胱氨酸残基与谷胱甘肽(glutathione, GSH) 结合产生GSH加合物,这些加合物被Grx1特异性地 逆转。GSH加合物能稳定HIF-1α,抑制HIF-1α的降 解,从而提高HIF-1α的表达量^[13]。因此, Grx1⁻⁻鼠能 通过增加GSH加合物的产生提高HIF-1α表达量。实验结果发现, Grx1基因敲除显著改善了NEC病理过程导致的HIF-1α降低和VEGF4降低,并且减轻了NEC小鼠的肠道损伤,减轻了小鼠的疾病严重程度。因此,我们认为Grx1/HIF-1α/VEGFA信号轴在NEC的病理过程中起关键作用。

综上所述,我们推测在NEC的病理过程中,由 于HIF-1α表达量降低,引起VEGFA表达量下降,导 致了小肠组织的血管生成减少,小肠供血不足,引起 小肠组织缺血缺氧,促进了NEC的发生。目前,国内 外的研究大多只采用临床样本或动物模型,本研究 采用临床样本和动物实验结合的方法验证HIF-1α在 NEC中的机制,两种方法取得了一致的结果,并且引 入Grx1⁻⁻鼠,增加了推断的可靠性。我们研究的局 限性是临床样本数量较小,并且通过Grx1基因敲除 来干预HIF-1α的表达是间接的,Grx1是否通过其他 机制对NEC起保护作用,还需进一步的实验进行验 证。HIF-1α在NEC的病理过程中显著降低,但在临 床实践中能否通过提高HIF-1α的表达来改善NEC的

病理过程还有待于进一步的研究。

参考文献 (References)

- OU J, COURTNEY C M, STEINBERGER A E, et al. Nutrition in necrotizing enterocolitis and following intestinal resection [J]. Nutrients, 2020, 12(2): 520.
- [2] HACKAM D, CAPLAN M. Necrotizing enterocolitis: pathophysiology from a historical context [J]. Semin Pediatr Surg, 2018, 27(1): 11-8.
- [3] ALGANABI M, LEE C, BINDI E, et al. Recent advances in understanding necrotizing enterocolitis [J]. F1000Res, 2019, doi: 10.12688/f1000research.17228.1.
- [4] BOWKER R M, YAN X, MANAGLIA E, et al. Dimethyloxalylglycine preserves the intestinal microvasculature and protects against intestinal injury in a neonatal mouse NEC model: role of VEGF signaling [J]. Pediatr Res, 2017, 83(2): 545-53.
- [5] GIANNONE P J, LUCE W A, NANKERVIS C A, et al. Necrotizing enterocolitis in neonates with congenital heart disease [J]. Life Sci, 2008, 82(7/8): 341-7.
- [6] PATEL R M, KNEZEVIC A, SHENVI N, et al. Association of red blood cell transfusion, anemia, and necrotizing enterocolitis in very low-birth-weight infants [J]. Jama, 2016, 315(9): 889-97.
- PERGER L, MUKHOPADHYAY D, KOMIDAR L, et al. Maternal pre-eclampsia as a risk factor for necrotizing enterocolitis [J].
 J Matern Fetal Neonatal Med, 2016, 29(13): 2098-103.
- [8] DOWNARD C D, GRANT S N, MATHESON P J, et al. Altered intestinal microcirculation is the critical event in the development of necrotizing enterocolitis [J]. J Pediatr Surg, 2011, 46(6): 1023-8.
- [9] BAREGAMIAN N, RYCHAHOU P G, HAWKINS H K, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase pathway regulates hypoxia-inducible factor-1 to protect from intestinal injury during necrotizing enterocolitis [J]. Surgery, 2007, 142(2): 295-302.
- [10] MCGETTRICK A F, O'NEILL L A J. The role of HIF in immunity and inflammation [J]. Cell Metab, 2020, 32(4): 524-36.
- [11] AVRAHAM-DAVIDI I, YONA S, GRUNEWALD M, et al. Onsite education of VEGF-recruited monocytes improves their performance as angiogenic and arteriogenic accessory cells [J]. J Exp Med, 2013, 210(12): 2611-25.
- [12] IYER N V, KOTCH L E, AGANI F, et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha [J]. Genes Dev, 1998, 12(2): 149-62.
- [13] WATANABE Y, MURDOCH C E, SANO S, et al. Glutathione adducts induced by ischemia and deletion of glutaredoxin-1 stabilize HIF-1 α and improve limb revascularization [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(21): 6011-6.

- [14] DRUCKER N A, JENSEN A R, TE WINKEL J P, et al. Loss of endothelial nitric oxide synthase exacerbates intestinal and lung injury in experimental necrotizing enterocolitis [J]. J Pediatr Surg, 2018, 53(6): 1208-14.
- [15] BARTOSZEWSKI R, MOSZYŃSKA A, SEROCKI M, et al. Primary endothelial cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2 and their target gene expression profiles during hypoxia [J]. FASEB J, 2019, 33(7): 7929-41.
- [16] JIN M L, ZOU Z H, TAO T, et al. Effect of the recombinant adenovirus-mediated HIF-1 alpha on the expression of VEGF in the hypoxic brain microvascular endothelial cells of rats [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2020, 16: 397-406.
- [17] LANIGAN S, CORCORAN A E, WALL A, et al. Acute hypoxic exposure and prolyl-hydroxylase inhibition improves synaptic transmission recovery time from a subsequent hypoxic insult in rat hippocampus [J]. Brain Res, 2018, 1701: 212-8.
- [18] SINGH A, WILSON J W, SCHOFIELD C J, et al. Hypoxiainducible factor (HIF) prolyl hydroxylase inhibitors induce autophagy and have a protective effect in an *in-vitro* ischaemia model [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 1597.
- [19] SHAH Y M. The role of hypoxia in intestinal inflammation [J]. Mol Cell Pediatr, 2016, 3(1): 1.
- [20] PALAZON A, TYRAKIS P A, MACIAS D, et al. An HIF-1α/ VEGF-A axis in cytotoxic T cells regulates tumor progression [J]. Cancer Cell, 2017, 32(5): 669-83,e5.
- [21] PARK A M, SANDERS T A, MALTEPE E. Hypoxia-inducible factor (HIF) and HIF-stabilizing agents in neonatal care [J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2010, 15(4): 196-202.
- [22] 赵慧娟, 王文天, 王荣, 等. 低氧诱导因子调控造血的功能[J]. 中国细胞生物学学报(ZHAO H J, WANG W T, WANG R, et al. Roles of hypoxia inducible factors in hematopoietic regulation [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2020, 42(10): 1894-900.
- [23] OKABE K, FUKADA H, TAI-NAGARA I, et al. Neuron-derived VEGF contributes to cortical and hippocampal development independently of VEGFR1/2-mediated neurotrophism [J]. Dev Biol, 2020, 459(2): 65-71.
- [24] COLGAN S P, TAYLOR C T. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 7(5): 281-7.
- [25] KOIKE Y, LI B, GANJI N, et al. Remote ischemic conditioning counteracts the intestinal damage of necrotizing enterocolitis by improving intestinal microcirculation [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4950.
- [26] GORELENKOVA MILLER O, MIEYAL J J. Critical roles of glutaredoxin in brain cells-implications for parkinson's disease [J]. Antioxid Redox Signal, 2019, 30(10): 1352-68.