

维生素 C 调控肉鸡缺氧肺动脉血管平滑肌细胞缺氧诱导因子-1 α mRNA 转录的分子机制

曹 林, 曾秋凤*, 张克英, 丁雪梅, 白世平, 罗玉衡, 王建萍, 玄 玥, 宿卓薇

(四川农业大学动物营养研究所, 教育部动物抗病营养重点实验室, 雅安 625014)

摘 要: 作者旨在通过脯氨酸羟化酶抑制剂(DMOG)和过氧化氢(H₂O₂)刺激肉鸡缺氧肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)探讨维生素 C(VC)对其氧化还原状态与缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)及其受体 2(VEGFR2/Flk-1)mRNA 转录调控的分子机制。在前期 PASMCs 培养和缺氧模型的基础上设计 3 个小试验, VC 和 H₂O₂、VC 和 DMOG、VC 和 H₂O₂+DMOG, 每个试验 5 个处理, 每个处理 6 个重复。结果表明: 与常氧和缺氧空白组相比, 试验 1, VC 显著增加 SOD/MDA 的比值($P<0.05$), 显著下调 HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 mRNA 的转录水平($P<0.05$), H₂O₂ 显著上调缺氧肉鸡 PASMCs HIF-1 α mRNA 转录($P<0.05$); 试验 2, DMOG 显著上调 SOD/MDA 的比值($P<0.05$), 显著下调 HIF-1 α 和 VEGFR2 mRNA 转录($P<0.05$), 但显著上调 VEGF mRNA 的转录($P<0.05$), VC+DMOG 显著上调 HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 mRNA 转录($P<0.05$); 试验 3, VC+H₂O₂+DMOG 三者同时添加极显著增加 HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 mRNA 转录($P<0.01$)。以上结果提示, VC 能提升细胞外基质的抗氧化水平, 其对缺氧基因表达的调控与细胞内脯氨酸羟化酶活性和氧化还原状态相关。

关键词: 肉鸡肺动脉平滑肌细胞; 缺氧; HIF-1 α ; 维生素 C; H₂O₂; DMOG

中图分类号: S852.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)05-1033-08

Molecular Mechanism of Vitamin C on Hypoxia Inducible Factor-1 α mRNA Transcription of Broiler Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells under Hypoxia Condition

CAO Lin, ZENG Qiu-feng*, ZHANG Ke-ying, DING Xue-mei, BAI Shi-ping,

LUO Yu-heng, WANG Jian-ping, XUAN Yue, SU Zhuo-wei

(Key Laboratory of Animal Nutrition for Disease Resistance in the Ministry of Education, Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the molecular mechanism of Vitamin C (VC) on redox state and the mRNA transcription of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), Vascular endothelial growth factor (VEGF) and Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2/Flk-1) in broiler PASMCs under hypoxia condition through dimethylxalylglycine (DMOG) and H₂O₂. This study executed on the basis of the culture of PASMCs and hypoxia model, included 3 experiments, VC and H₂O₂, VC and DMOG, VC and H₂O₂+DMOG, including 5 treatments with six replicates of each experiment. Compared with control group under normoxic and hypoxic, Exp. 1 showed that VC significantly increased SOD to MDA ratio ($P<0.05$), and down-regulated the mRNA transcription of HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 ($P<0.05$); Exp. 2 showed that DMOG significantly increased SOD to MDA ratio ($P<0.05$), and down-regulated the mRNA transcription of HIF-1 α and VEGFR2 ($P<0.05$) respectively, but significantly up-regulated the mRNA tran-

收稿日期: 2015-10-10

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31101733); 四川农业大学 211 双支计划

作者简介: 曹 林(1990-), 男, 四川绵阳人, 硕士生, 主要从事家禽营养与饲料研究, E-mail: 1315522048@qq.com

* 通信作者: 曾秋凤, 研究员, 博士, 主要从事家禽营养与饲料研究, E-mail: zqf@sicau.edu.cn

scription of *VEGF* ($P < 0.05$), VC + DMOG significantly up-regulated the mRNA transcription of *HIF-1 α /VEGF/VEGFR2* ($P < 0.05$); Exp. 3 showed that VC + H₂O₂ + DMOG markedly up-regulated the mRNA transcription of *HIF-1 α /VEGF/VEGFR2* ($P < 0.01$). These results suggested that VC could increase cellular antioxidative ability, and regulate the relative expression of hypoxia genes based on the activity of proline hydroxylase and the redox state of broiler PSMCs.

Key words: broiler pulmonary artery smooth muscle cells; hypoxia; hypoxia inducible factor-1 α ; vitamin C; H₂O₂; DMOG

肉鸡腹水综合征 (ascites syndrome, AS) 又称肉鸡肺动脉高压综合征 (pulmonary hypertension syndrome, PHS), 是快大型肉鸡三大主要营养代谢性疾病之一。缺氧会引起肉鸡肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary arterial smooth muscle cells, PSMCs) 异常增生, 导致肉鸡肺动脉血管重构、肺动脉压升高、右心室肥大、自由基损伤等病理变化^[1], 引发肉鸡 AS。众多研究证实, 缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 alpha, HIF-1 α) 基因表达与肉鸡 AS 的发生发展密切相关^[2-3]。

HIF-1 α 的表达与活性受细胞内氧化还原状态和脯氨酸羟化酶活性的影响^[4]。常氧条件下, H₂O₂ 可通过失活脯氨酸羟化酶来稳定 HIF-1 α 蛋白活性^[5]。在人前列腺癌细胞中胰岛素通过诱导 H₂O₂ 的产生上调 HIF-1 α 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达^[6]。在血管内皮细胞线粒体 SOD 也可调节 HIF-1 α 的活性^[7]。脯氨酸羟化酶是 HIF-1 α 蛋白通过泛素化途径降解的关键酶。DMOG (dimethylloxalylglycine), 一种脯氨酸羟化酶的抑制剂, 可上调 HIF-1 α 蛋白的表达^[8]。维生素 C (VC) 作为一种强抗氧化剂和脯氨酸羟化酶的辅助因子, 对人或鼠类肿瘤细胞 HIF-1 α 基因表达及其蛋白活性有着较强的调控作用。本实验室前期试验也表明, 适宜浓度的 VC (500 或 1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 能有效下调缺氧肉鸡 PSMCs 中 HIF-1 α 及其下游靶基因 VEGF 及血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2/Flk-1) mRNA 的转录^[9]。

本试验旨在进一步研究 VC、DMOG 和 H₂O₂ 对缺氧肉鸡 PSMCs 氧化水平和缺氧基因 *HIF-1 α /VEGF/VEGFR2* mRNA 转录的影响, 揭示 VC 降低 *HIF-1 α /VEGF/VEGFR2* 基因转录的分子机制, 为 VC 在肉鸡健康养殖中的合理应用提供科学

依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试验仪器与试剂 仪器: 生物安全柜 (Thermo1300Series)、倒置显微镜 (Nikon TS100)、二氧化碳培养箱 (Thermo3111)、照相系统 (Nikon DS-Ri1)、多功能酶标仪 (SpectraMax M2)、ABI 7900 型荧光定量 PCR 仪。试剂: DMEM-F12 培养基 (HyClone)、南美洲胎牛血清 (Sigma)、胰蛋白酶 (HyClone)、青链霉素 (HyClone)、D-hanks 液 (武汉博士德)、CoCl₂ · 6H₂O (Sigma)。

1.1.2 肉鸡肺动脉平滑肌细胞培养及缺氧模型的建立 30 只 21 日龄健康 AA 肉公鸡, 在实验室前期研究基础上培养肉鸡 PSMCs, 且 CoCl₂ 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理 48 h 时 PSMCs 细胞增殖明显, 缺氧基因 *HIF-1 α /VEGF/VEGFR2* 的相对转录量较空白组也显著升高。故以 CoCl₂ 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 h 为条件建立细胞缺氧模型。

1.2 试验设计

本试验包括 3 个小试验。处理时间均为 48 h。

试验 1 VC 和 H₂O₂ 对肉鸡缺氧 PSMCs 氧化还原状态及缺氧基因转录的影响。采用 2 × 2 + 1 因子设计。缺氧条件下, 2 个 VC 添加水平 (0 和 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 2 个 H₂O₂ 添加水平 (0 或 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[10] 和常氧空白对照处理, 共 5 个处理, 每个处理 6 个重复。

试验 2 VC 和 DMOG 对肉鸡缺氧 PSMCs 氧化还原状态及缺氧基因转录的影响。采用 2 × 2 + 1 因子设计。缺氧条件下, 2 个 VC 添加水平 (0 和 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 2 个 DMOG 添加水平 (0 或 1 mmol · L⁻¹)^[5] 和常氧空白对照处理, 共 5 个处理, 每个处理 6 个重复。

试验 3 VC/H₂O₂/DMOG 对肉鸡缺氧

PASMCs 氧化还原状态及缺氧基因转录的影响。采用 $2 \times 2 + 1$ 因子设计。缺氧条件下, 2 个 VC 添加水平(0 和 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 2 个 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{DMOG}$ 添加水平(0 或 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{DMOG}$)和常氧空白对照处理, 共 5 个处理, 每个处理 6 个重复。

1.3 样品收集与检测

1.3.1 样品收集 按照 Trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA, -80°C 保存, 用于缺氧基因相对转录量检测。收集细胞培养液和细胞裂解液, 分别测定 VC、SOD 和丙二醛(MDA)的含量。

1.3.2 细胞培养液与裂解液氧化和抗氧化指标的检测 细胞培养液与裂解液中 VC、SOD 和 MDA

的检测按照试剂盒说明书进行。抗坏血酸(VC)试剂盒(南京建成, 货号: A009 50T/48 样)、SOD 试剂盒(南京建成, 货号: A001-1 羟胺法)、MDA 试剂盒(南京建成, 货号: A003-1 TBA 法)。

1.3.3 RT-PCR 检测 利用 SYBR Premix Ex TaqTMII 试剂盒和 ABI Prism7900 sequence detection system 进行 RT-PCR 检测。反应采用 $10 \mu\text{L}$ 体系, 冰上操作, 反应体系包括: $5 \mu\text{L}$ SYBR Premix Ex TaqTMII, $0.4 \mu\text{L}$ Forward Primer, $0.4 \mu\text{L}$ Reverse Primer, $0.2 \mu\text{L}$ ROX Reference, $3 \mu\text{L}$ dH_2O 和 $1 \mu\text{L}$ cDNA。反应条件: 95°C 预变性 30 s, 40 个循环(95°C 5 s, 60°C 34 s), 熔解曲线检测(95°C 15 s, 60°C 60 s, 95°C 15 s)。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 The sequence of primers

基因 Gene	基因序列号 GenBank No.	引物 Primer	序列 Sequence	产物长度/bp Fragment	退火温度/ $^\circ\text{C}$ Tm
β actin	NM_205518.1	Forward	5'-GAAGAGCTATGAACTCCCTGATGG-3'	60	60
		Reverse	5'-CCACAGGACTCCATACCCAAGA-3'		
HIF-1 α	NM_204297.1	Forward	5'-AACTCCTGGGTCGTTCAATCTATG-3'	117	61.5
		Reverse	5'-GCATTCTGTATTGTCCCGTAGTCA-3'		
VEGF	NM_001110355.1	Forward	5'-GATGAGATGTGCGGGTTGCT-3'	132	61
		Reverse	5'-ATGTGCGCTATGTGCTGACTCT-3'		
VEGFR2	NM_001004368.1	Forward	5'-CCTGGGGAATTTACTGCAAGC-3'	125	60
		Reverse	5'-GGAAGCAGGTGAAGTTGGGAG-3'		

1.4 统计分析

缺氧基因的相对转录量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[11] 计算: $\Delta Ct(\text{目的基因}) = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{内参基因})$; $\Delta\Delta Ct = Ct(\text{试验组}) - Ct(\text{对照组})$ 。目的基因的相对转录量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。用 SAS(9.0) 进行单因素方差分析, 差异显著时用 Duncan 法进行多重比较。以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。用 GraphPad Prism 5 作图, 但试验 3 缺氧基因的相对转录量经对数转换后再用 GraphPad Prism 5 作图。

2 结果

2.1 VC 和 H_2O_2 对肉鸡缺氧 PASMCs 氧化还原状态及缺氧基因转录的影响

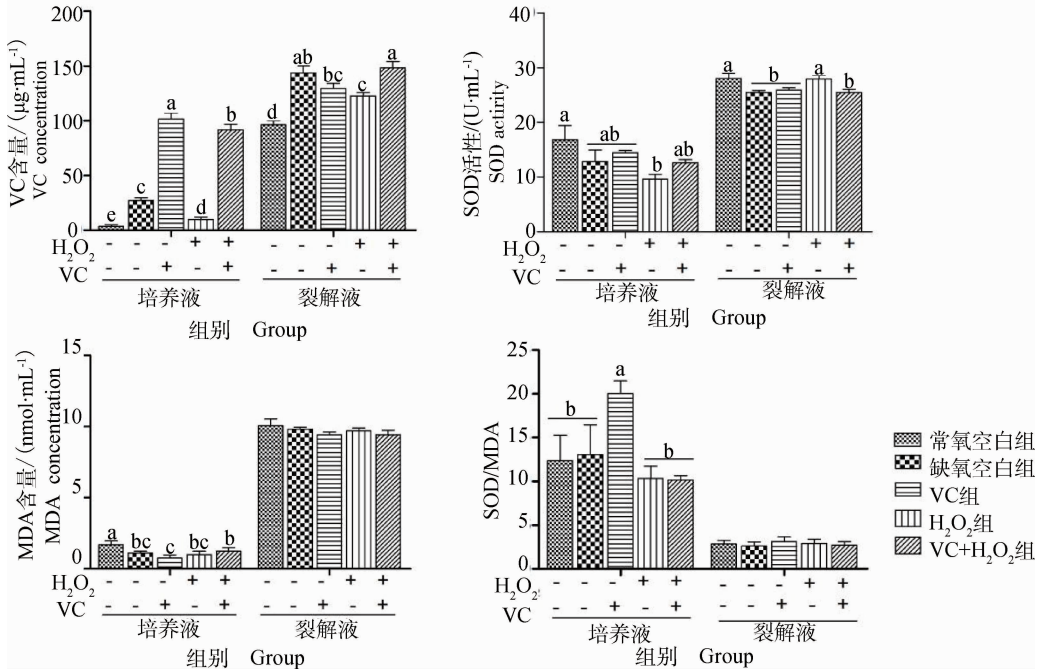
2.1.1 VC 和 H_2O_2 对肉鸡缺氧 PASMCs 氧化还原状态的影响 从图 1 可看出, 肉鸡 PASMCs 培养液和裂解液中 VC 含量常氧空白组最低, 且与缺氧空白组相比差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。缺氧

条件下, H_2O_2 组培养液中 VC 含量显著降低 ($P < 0.05$), 裂解液中 VC 含量与缺氧空白组和 VC + H_2O_2 组相比也显著降低 ($P < 0.05$); VC 组培养液中 VC 含量显著高于其他处理组 ($P < 0.05$); VC + H_2O_2 组培养液中 VC 浓度显著低于 VC 组 ($P < 0.05$), 但显著高于其他处理组 ($P < 0.05$), 裂解液中 VC 含量与缺氧空白组相比有升高趋势, 但显著高于其他处理组 ($P < 0.05$)。

肉鸡 PASMCs 培养液和裂解液中 SOD 活性常氧空白组最高, 且培养液中 SOD 活性与 H_2O_2 组相比差异显著 ($P < 0.05$), 裂解液中 SOD 活性显著高于除 H_2O_2 组外的缺氧组 ($P < 0.05$)。缺氧条件下, H_2O_2 组培养液中 SOD 活性与其他缺氧组相比仅有降低趋势, 但裂解液中 SOD 活性上升, 显著高于其他缺氧组 ($P < 0.05$); VC 组和 VC + H_2O_2 组裂解液中 SOD 活性显著低于常氧组和 H_2O_2 组 ($P < 0.05$)。

肉鸡 PASCs 培养液中 MDA 含量常氧空白组显著高于缺氧条件下的各处理 ($P < 0.05$); 缺氧条件下, VC + H₂O₂ 组 MDA 含量显著高于 VC 组

($P < 0.05$), 其他缺氧组间差异不显著。此外, 肉鸡 PASCs 培养液中 VC 组 SOD/MDA 的比值显著高于其他试验组 ($P < 0.05$)。



a~e 表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同
a-e indicates significant different ($P < 0.05$). The same as below

图 1 VC 和 H₂O₂ 对肉鸡缺氧 PASCs 培养液和裂解液氧化还原状态的影响

Fig. 1 Effects of VC and H₂O₂ on the redox state of culture medium and lysis solution of broiler PASCs under hypoxia condition

2.1.2 VC 和 H₂O₂ 对肉鸡缺氧 PASCs 缺氧基因转录的影响 从图 2 可看出, 肉鸡 PASCs 缺氧基因 HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 mRNA 的相对转录量在常氧空白组显著低于缺氧试验组 ($P < 0.05$)。缺氧条件下, HIF-1 α 和 VEGF mRNA 的相对转录量呈现出一致的变化趋势; H₂O₂ 组缺氧基因的相对转录量最大, 显著高于其他处理组 ($P < 0.05$); VEGFR2 mRNA 的相对转录量在缺氧空白组最大, 显著高于 VC 组和 H₂O₂ + VC 组 ($P < 0.05$)。

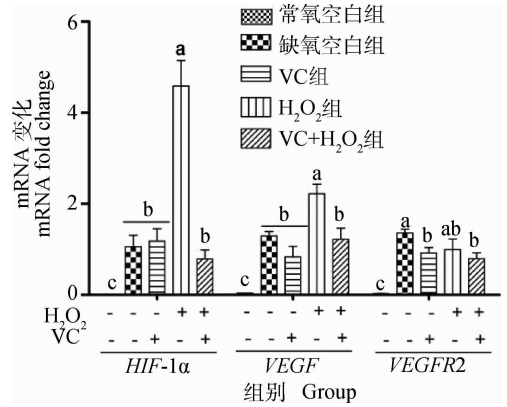


图 2 VC 和 H₂O₂ 对肉鸡缺氧 PASCs 缺氧基因 mRNA 转录的影响

Fig. 2 Effects of VC and H₂O₂ on the mRNA expression of hypoxia genes of broiler PASCs under hypoxia condition

2.2 VC 和 DMOG 对肉鸡缺氧 PASCs 氧化还原状态及缺氧基因转录的影响

2.2.1 VC 和 DMOG 对肉鸡缺氧 PASCs 氧化还原状态的影响 从图 3 可看出, 肉鸡 PASCs 培养液和裂解液中 VC 含量常氧空白组最低, 且与缺氧组相比达到显著水平 ($P < 0.05$)。缺氧条件下, 培养液中 VC 含量, DMOG 组显著低于其他试验组 ($P < 0.05$), VC 组显著高于其他处理组 ($P < 0.05$), VC + H₂O₂ 组显著高于缺氧空白组 ($P < 0.05$)。

肉鸡 PASCs 培养液和裂解液中 SOD 活性常氧空白组最高, 其培养液中 SOD 活性与 DMOG 组相比达到显著水平 ($P < 0.05$), 其裂解液中 SOD 活性与缺氧试验组相比均达到显著水平 ($P < 0.05$)。

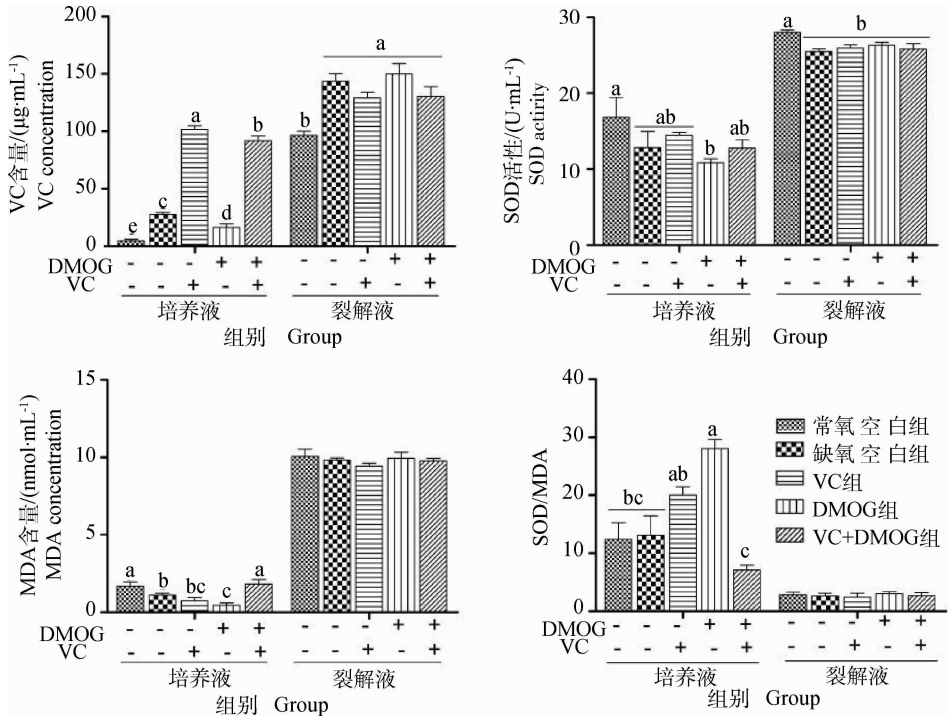


图 3 VC 和 DMOG 对肉鸡缺氧 PASCs 培养液和裂解液氧化还原状态的影响

Fig. 3 Effect s of VC and DMOG on the redox state of culture medium and lysis solution of broiler PASCs under hypoxia condition

肉鸡 PASCs 培养液中 MDA 含量常氧空白组和 VC+DMOG 组无差异,但显著高于其他试验组($P < 0.05$)。缺氧条件下,DMOG 组 MDA 含量最低,与缺氧空白组相比达到显著水平($P < 0.05$)。肉鸡 PASCs 培养液中 SOD/MDA 的比值 DMOG 组最大,显著高于除 VC 组外的所有试验组($P < 0.05$); VC 组 SOD/MDA 的比值与常氧空白组和缺氧空白组相比有升高趋势,与 DMOG+VC 组相比达到显著水平($P < 0.05$)。

2.2.2 VC 和 DMOG 对肉鸡缺氧 PASCs 基因转录的影响 从图 4 可看出,肉鸡 PASCs 缺氧基因 $HIF-1\alpha$ / $VEGF$ / $VEGFR2$ mRNA 在常氧条件下的相对转录量同试验 1 一致,显著低于缺氧试验组($P < 0.05$)。缺氧条件下,DMOG+VC 组缺氧基因的相对转录量都最大,显著高于其他试验组($P < 0.05$); DMOG 组 $HIF-1\alpha$ mRNA 的相对转录量显著低于其他缺氧组($P < 0.05$), $VEGF$ mRNA 的相对转录量显著高于除 DMOG+VC 组外的试验组($P < 0.05$), $VEGFR2$ mRNA 的相对转录量也达到最小值,显著低于除 VC 组外的缺氧组($P < 0.05$);VC 组与缺氧空白组相比, $VEGFR2$ mRNA 的相对转录量显著降低($P < 0.05$)。

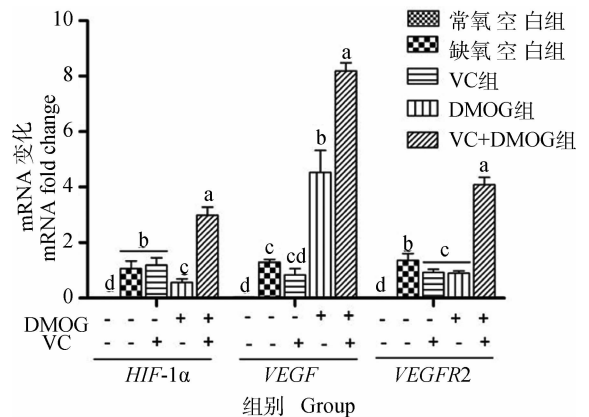


图 4 VC 和 DMOG 对肉鸡缺氧 PASCs 基因转录的影响
Fig. 4 Effect of VC and DMOG on the mRNA expression of hypoxia genes of broiler PASCs under hypoxia condition

2.3 VC/ H_2O_2 /DMOG 对肉鸡缺氧 PASCs 氧化还原状态及缺氧基因转录的影响

2.3.1 VC/ H_2O_2 /DMOG 对肉鸡缺氧 PASCs 氧化还原状态的影响 从图 5 可看出,肉鸡 PASCs 培养液和裂解液中 VC 含量常氧空白组最低,除 VC+ H_2O_2 +DMOG 组外,培养液中 VC 含量与缺氧组相比达到显著水平($P < 0.05$)。缺氧条件下, H_2O_2 +DMOG 组培养液中 VC 含量显著

高于除 VC 组外的其他缺氧组 ($P < 0.05$), 裂解液中 VC 含量最高, 但仅与 VC 组相比达到显著水平 ($P < 0.05$); VC 组培养液中 VC 含量最高, 与其他缺氧组相比达到显著水平 ($P < 0.05$), 裂解液中 VC

含量最低但各处理组之间无显著差异 ($P < 0.05$); VC+H₂O₂+DMOG 组培养液中 VC 含量最低, 显著低于其他缺氧组 ($P < 0.05$)

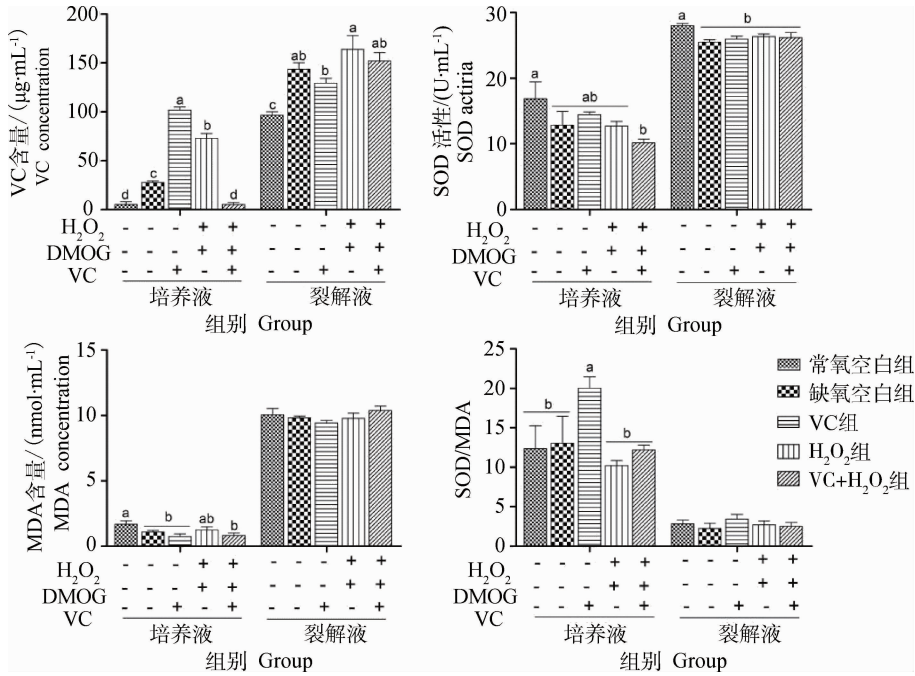


图 5 VC、H₂O₂ 和 DMOG 对肉鸡缺氧 PASCs 培养液和裂解液氧化还原状态的影响
Fig. 5 Effect of VC, H₂O₂ and DMOG on the redox state of culture medium and lysis solution of broiler PASCs under hypoxia condition

肉鸡 PASCs 培养液和裂解液中 SOD 活性常氧空白组都处于最高水平, 培养液中 SOD 活性与 VC+H₂O₂+DMOG 组相比达到显著水平 ($P < 0.05$), 裂解液中 SOD 活性与缺氧组相比均达到显著水平 ($P < 0.05$)。

肉鸡 PASCs 培养液中 MDA 含量常氧空白组最高, 显著高于除 H₂O₂+DMOG 组外的其他缺氧组 ($P < 0.05$), VC 组 SOD/MDA 的比值最大, 显著高于其他处理组 ($P < 0.05$)。

2.3.2 VC/H₂O₂/DMOG 对肉鸡缺氧 PASCs 缺氧基因转录的影响 从图 6 可看出, 肉鸡 PASCs 缺氧基因 HIF-1α/VEGF/VEGFR2 mRNA 的相对转录量于 VC+H₂O₂+DMOG 组最大, 极显著高于其他处理组 ($P < 0.01$); VEGFR2 mRNA 的相对转录量 H₂O₂+DMOG 组显著高于常氧空白组、缺氧空白组和 VC 组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

HIF-1α 是肉鸡 AS 发生的关键启动因子。研究证实, VC 是降解 HIF-1α 蛋白关键酶活性得以发

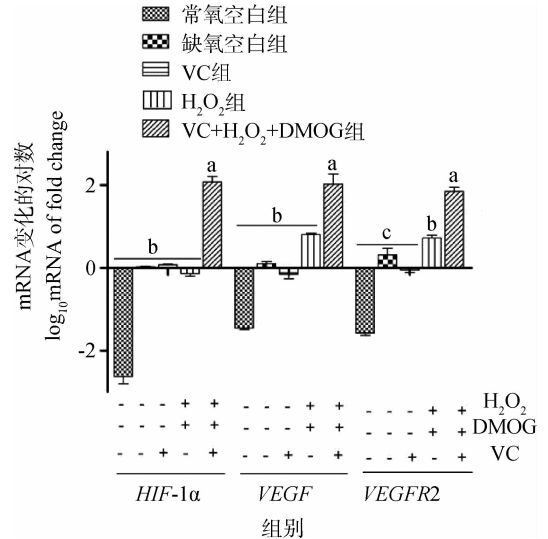


图 6 VC/H₂O₂/DMOG 对缺氧肉鸡 PASCs 基因转录的影响 (数据经过对数转换)
Fig. 6 Effect of VC/H₂O₂/DMOG on the mRNA expression of hypoxia genes of broiler PASCs under hypoxia condition (Data of figure 6 is logarithmic conversion)

挥的必需营养成分^[5], 可有效降低肉鸡肺、肝中 HIF-1α 的表达, 增强血清抗氧化水平, 显著降低肉

鸡 AS 的发病率。VC 是一种广谱抗氧化物,在细胞内外液中都有重要的抗氧化活性,能有效清除 O_2^- 、 H_2O_2 、 OH^- 、 LOO^- 等,减轻氧化剂对 RNA 转录、DNA、蛋白质或膜结构的损伤。但当有过渡金属(如铁和铜)存在时 VC 也可能起还原剂作用^[12]。SOD 是清除体内自由基的重要抗氧化酶,而 MDA 是脂质过氧化反应链式终止阶段产生的小分子产物,其含量可间接反映自由基的产生情况^[13]。SOD/MDA 比值能够反映自由基引起的脂质过氧化和清除速率,便于深入了解自由基的代谢情况。

本试验在 $CoCl_2$ 诱导肉鸡 PSMCs 建立细胞缺氧模型的基础上进行。结果发现,常氧条件下缺氧基因 *HIF-1 α /VEGF/VEGFR2* 的转录量都很低,而缺氧能显著上调其转录,这与 D. Shweiki 等的研究结果^[14]一致。缺氧会引起机体自由基代谢异常^[15], H_2O_2 的添加加剧细胞氧化与抗氧化失衡,加强氧化应激,上调 *HIF-1 α* 和 *VEGF* mRNA 的表达^[16-17]。有研究证实 H_2O_2 与 *HIF-1 α* 和 *VEGF* mRNA 的显著转录息息相关^[18]。饲料中添加 1 000 mg \cdot kg⁻¹ VC 能增强肉鸡血清抗氧化水平,显著下调 AS 肉鸡肺 *HIF-1 α /VEGF/VEGFR2* mRNA 的转录^[2-3]。本试验同样发现 VC 能显著提升培养液中 SOD/MDA 的比值,增强肉鸡 PSMCs 抗氧化能力,显著下调 *HIF-1 α /VEGF/VEGFR2* mRNA 的转录。

脯氨酸羟化酶是 *HIF-1 α* 通过泛素蛋白途径降解的限速酶^[19]。DMOG 通过抑制脯氨酸羟化酶活性来抑制 *HIF-1 α* 羟化,减少 *HIF-1 α* 蛋白降解,稳定 *HIF-1 α* 蛋白活性,上调 *HIF-1* 信号通路。试验发现 DMOG 的添加显著下调 *HIF-1 α* mRNA 的转录,原因在于 DMOG 阻断了 *HIF-1 α* 通过泛素化蛋白途径的降解,使其在细胞内大量积累^[5],反馈性地下调 *HIF-1 α* mRNA 的转录。脯氨酸羟化酶的抑制剂有两类:铁螯合剂,如去铁敏和环吡酮胺,或铁竞争剂,如二氯化钴($CoCl_2$);酮戊二酸类似物,如 DMOG^[20-21]和 FG-4487 等。本试验用于化学诱导缺氧的 $CoCl_2$ 已竞争性地抑制了脯氨酸羟化酶的活性,再加入 DMOG 进一步抑制脯氨酸羟化酶对 *HIF-1 α* 的羟化作用,使 *HIF-1 α* 蛋白保持稳定,并与 *HIF-1 β* 结合形成 *HIF-1*^[22]。DMOG 使 *HIF-1 α* 蛋白在细胞内的大量积累,显著提升其靶基因 *VEGF* mRNA 的相对转录量^[23],且 *VEGF* 和 *VEGFR2* 的表达受多种上游转录因子,如 *HIF-1 α* 、

癌基因 *Ras* 和细胞因子等的共同调控^[24]。在 $CoCl_2$ 诱导肉鸡 PSMCs 缺氧的基础上,VC+DMOG 以及 VC+ H_2O_2 +DMOG 作用时,VC 不仅没有下调缺氧基因的转录,反而促使其相对转录量显著升高,甚至是常氧组的上万倍。可能由于 VC 在不同生理状态下其作用效果存在差异。本试验条件下 VC 可能增加了肉鸡缺氧 PSMCs 对 DMOG 和 H_2O_2 +DMOG 的敏感性,这与马爱国等研究发现 0.5 mmol \cdot L⁻¹ VC 可能增加细胞 DNA 对 H_2O_2 及其他有害物质损害的敏感性的结果^[25]一致。

4 结 论

VC 可以有效地缓解肉鸡缺氧 PSMCs 因 H_2O_2 氧化刺激引起的缺氧基因的转录,但还能增强其对 DMOG 和 H_2O_2 +DMOG 的敏感性,上调缺氧基因的转录。

参考文献 (References):

- [1] NAIN S, WOJNAROWICZ C, LAARVELD B, et al. Vascular remodeling and its role in the pathogenesis of ascites in fast growing commercial broilers[J]. *Res Vet Sci*, 2009, 86(3): 479-484.
- [2] YANG X, LUO Y H, ZENG Q F, et al. Effects of low ambient temperatures and dietary vitamin C supplement on growth performance, blood parameters, and antioxidant capacity of 21-day-old broilers[J]. *Poult Sci*, 2014, 93(4): 898-905.
- [3] 曾秋凤. 肉鸡腹水综合征的营养调控及其机理研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2006.
ZENG Q F. Study on the effect of nutrients on ascites incidence of broilers and the possible mechanism[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2006. (in Chinese)
- [4] SEMENZA G L. Regulation of mammalian O_2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15: 551-578.
- [5] PAN Y, MANSFIELD K D, BERTOZZI C C, et al. Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity *in vivo* and *in vitro* [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(3): 912-925.
- [6] ZHOU Q, LIU L Z, FU B, et al. Reactive oxygen species regulate insulin-induced VEGF and *HIF-1 α* expression through the activation of p70S6K1 in human prostate cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(1): 28-37.
- [7] DOSTANIC-LARSON I, MAVRAKIS L, XU W, et

- al. Mitochondrial superoxide dismutase enzyme (Mn-SOD) regulates hypoxia inducing factor-1 alpha (HIF-1 α) activity in human vascular endothelial cells [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181: A3936.
- [8] KNOWLES H J, RAVAL R R, HARRIS A L, et al. Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (8): 1764-1768.
- [9] 曹 林, 曾秋凤, 张克英, 等. 维生素 C 对肉鸡缺氧肺动脉平滑肌细胞缺氧诱导因子-1 α 转录水平的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(2): 388-396.
CAO L, ZENG Q F, ZHANG K Y, et al. Effects of vitamin c on the transcription of hypoxia inducible factor-1 α of broiler pulmonary artery smooth muscle cells under hypoxia [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(2): 388-396. (in Chinese)
- [10] BONELLO S, ZÄHRINGER C, BELAIBA R S, et al. Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site [J]. *Arterioscler Thrombo Vasc Biol*, 2007, 27(4): 755-761.
- [11] LIVAK K J, SCHMITTQEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402-408.
- [12] ZEMPLENI J, SUTTIE J W, GREGORY III J F, et al. Handbook of vitamins [M]. CRC Press, 2013.
- [13] 郭小权, 胡国良, 曹华斌, 等. 高能低蛋白日粮致脂肪肝出血综合征鸡抗氧化能力和肝损伤的研究 [J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(6): 829-832.
GUO X Q, HU G L, CAO H B, et al. Antioxidative functions and liver injury in laying hens with fatty liver hemorrhagic syndrome induced by high energy-low protein diet [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2010, 30(6): 829-832. (in Chinese)
- [14] SHWEIKI D, ITIN A, SOFFER D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis [J]. *Nature*, 1992, 359(6398): 843-845.
- [15] GUPTA V, LAHIRI S S, SULTANA S, et al. Antioxidative effect of *Rhodiola imbricata* root extract in rats during cold, hypoxia and restraint (C-H-R) exposure and post-stress recovery [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(4): 1019-1025.
- [16] GAO N, SHEN L, ZHANG Z, et al. Arsenite induces HIF-1 α and VEGF through PI3K, Akt and reactive oxygen species in DU145 human prostate carcinoma cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 255(1-2): 33-45.
- [17] GAO N, JIANG B H, LEONARD S S, et al. p38 Signaling-mediated hypoxia-inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor induction by Cr(VI) in DU145 human prostate carcinoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(47): 45041-45048.
- [18] LIU L, NING X, HAN S, et al. Hypoxia induced HIF-1 accumulation and VEGF expression in gastric epithelial mucosa cell; involvement of ERK1/2 and PI3K/Akt [J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2008, 42(3): 459-469.
- [19] DEMIDENKO Z N, BLAGOSKLONNY M V. The purpose of the HIF-1/PHD feedback loop; to limit mTOR-induced HIF-1 α [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(10): 1557-1562.
- [20] BERNHARDT W M, GOTTMANN U, DOYON F, et al. Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogenic kidney transplant model [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(50): 21276-21281.
- [21] LIU X B, WANG J A, OGLE M E, et al. Prolyl hydroxylase inhibitor dimethyloxalylglycine enhances mesenchymal stem cell survival [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106(5): 903-911.
- [22] KALLIO P J, WILSON W J, O'BRIEN S, et al. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1 α by the ubiquitin-proteasome pathway [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(10): 6519-6525.
- [23] LIU L X, LU H, LUO Y, et al. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(4): 908-914.
- [24] NEUFELD G, COHEN T, GENGRINOVITCH S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors [J]. *FASEB J*, 1999, 13(1): 9-22.
- [25] 马爱国, 刘四朝. 不同剂量维生素 C 对 DNA 氧化损伤影响的研究 [J]. *营养学报*, 2001, 23(1): 12-15.
MA A G, LIU S C. Effect of different levels of ascorbic acid on DNA damage [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2001, 23(1): 12-15. (in Chinese)