

肾积水后缺氧诱导因子-1、血管内皮生长因子、 微小 RNA-210 的动态表达*

刘亚明, 邓 君, 匡仁锐, 崔苏萍[△]

(南昌大学第一附属医院泌尿外科 330006)

[摘要] **目的** 观察小鼠肾积水后缺氧诱导因子-1(HIF-1)、血管内皮生长因子(VEGF)、微小 RNA(miRNA)-210 在不同时间点的表达变化并探讨其调控机制。**方法** 采用丝线结扎单侧输尿管的方法制备急性完全性单侧肾积水模型(UUO模型),分为假手术对照组和单侧肾积水组,于单侧肾积水后 2、5、9、14 d 分别颈椎脱臼处死。采用实时荧光定量 PCR 检测肾积水后患肾各时间点 HIF-1 mRNA、VEGF mRNA 及 miRNA-210 的表达变化,采用 Western blot 方法检测肾积水后各时间点 HIF-1 蛋白的表达变化。**结果** HIF-1 mRNA 表达水平在肾积水后表达量逐渐上调($P < 0.05$)。VEGF mRNA 及 miRNA-210 表达水平在肾积水后 2 d 升高并达到高峰,于 UUO 后 5、9、14 d 表达量逐渐下调($P < 0.05$)。HIF-1 蛋白表达量逐渐上调。**结论** 肾积水后 HIF-1 mRNA 及蛋白表达逐步上调,VEGF mRNA 及 miRNA-210 表达一过性上调,可能与肾积水后肾皮质被压迫机体对缺氧、缺血产生适应性反应有关。

[关键词] 缺氧诱导因子-1;血管内皮生长因子;微小 RNA-210;单侧肾积水

[中图分类号] R692.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)30-4196-03

Dynamic changes of the expression of HIF-1, VEGF and miRNA-210 in the kidney after unilateral ureteral occlusion*

Liu Yaming, Deng Jun, Kuang Renrui, Cui Suping[△]

(Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression of inducible factor 1(HIF-1), vascular endothelial growth factor(VEGF) and miRNA-210 and explore the regulatory mechanism after unilateral ureteral occlusion (UUO). **Methods** UUO models are made by ligation unilateral ureteral with silk, and they were divided into sham group and UUO group. All the mice were sacrificed by cervical dislocation after 2, 5, 9 and 14 d of UUO. The kidney samples were examined for HIF-1 mRNA, VEGF mRNA and miRNA-210 by quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and HIF-1 protein by Western blot. **Results** The expression level of HIF-1 mRNA was gradually raised after UUO ($P < 0.05$), and compared with the sham group, the expression level of VEGF mRNA and miRNA-210 were up regulated after 2 d of UUO and down regulated after 5, 9 and 14 d of UUO compared with the sham group ($P < 0.05$); the expression level of HIF-1 protein increased after UUO compared to the sham group. **Conclusion** The results of the level of HIF-1 protein increased and VEGF mRNA and miRNA-210 were up regulated, which might be related to the adaptive response of kidney hypoxia and ischemia after UUO.

[Key words] hypoxia inducible factor 1; vascular endothelial growth factor; micro RNA 210; unilateral ureteral occlusion

微小 RNA(miRNA)是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA,其能抑制或降低靶基因 mRNA 的翻译或使其表达量下调^[1]。miRNA-210 是一种具有缺氧诱导活性的 miRNA,在缺氧条件下表达可上调^[2]。缺氧诱导因子-1(HIF-1)是一随着细胞内氧浓度的变化而调节靶基因表达的转录激活因子^[3]。血管内皮生长因子(VEGF)具有强烈的促进血管内皮细胞分裂、增殖以及诱导血管新生的作用。其是内皮细胞增生、存活因子,它通过内皮细胞的特殊受体促进血管新生,并在此过程中扮演着重要角色,是当前认为最为重要的促血管生成因子^[4]。本研究旨在观察小鼠肾积水后 miRNA-210 及其下游基因 HIF-1、VEGF 的表达变化,探讨其在肾积水后血管新生中的调控作用,现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 健康 BALB/C 系雄性小鼠 25 只,体质量(23±2)g,由南昌大学医学院动物科学部提供。在动物实验室按同一

标准适应性饲养 1 周后,分为假手术(Sham)组、单侧肾积水(UUO)2、5、9、14 d 组,每组分别 5 只。

1.2 方 法

1.2.1 单侧肾积水模型制备 用 4% 水合氯醛以 1 mL/100 mg 腹腔注射麻醉后,行腹中线切口,找到左肾肾蒂,沿肾蒂向下移行找到左侧输尿管,在输尿管上 1/3 处两次结扎并剪断输尿管,以防逆行性感染,操作完毕后逐层缝合^[5]。分别饲养 2、5、9、14 d 后颈椎脱臼处死,取其左肾做进一步分析。所有个体按相同操作完成。(1)UUO 2、5、9、14 d 组行左侧输尿管结扎术后继续饲养 2、5、9、14 d;(2)Sham 组不结扎左侧输尿管,其余平行操作。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法检测 miRNA-210 的表达变化 采用 mirVana™ miRNA Isolation Kit 试剂盒提取实验组肾组织 miRNA,参照说明书将 miRNA-210 逆转录后行 RT-PCR[SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)]检测

miRNA-210 的表达变化。miRNA-210 逆转录所采用试剂盒为 PrimeScript™ RT reagent Kit, TaKaRa。检测系统为: StepOne™ Software v2.0, 内参为 U6。反应条件: 95 °C, 30 s; 95 °C, 5 s; 60 °C, 30 s; 40 个循环。Sham 组肾组织为对照, $\Delta\Delta CT = [Ct(\text{实验组}) - Ct(\text{实验组 U6})] - [Ct(\text{对照组}) - Ct(\text{对照组 U6})]$, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示基因的相对表达量。

1.2.3 RT-PCR 检测 HIF-1、VEGF mRNA 的表达变化 用 Trizol 法提取肾脏标本总 RNA。用紫外分光光度计检测 RNA 纯度, 取 OD_{260}/OD_{280} 为 1.8~2.0 的总 RNA 样本进行逆转录, 逆转录步骤按照试剂盒说明书操作, 所用试剂盒为: PrimeScript™ RT reagent Kit, TaKaRa。所得结果为 CDNA。参照说明书, 逆转录后行 RT-PCR [所用试剂为: SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)] 检测 HIF-1mRNA、VEGFmRNA 的表达变化。检测系统为: StepOne™ Software v2.0, 内参为 GAPDH。反应条件: 95 °C, 30 s; 95 °C, 5 s, 60 °C, 30 s; 40 个循环。假手术组肾组织为对照组, $\Delta\Delta CT = [Ct(\text{实验组}) - Ct(\text{实验组 GAPDH})] - [Ct(\text{对照组}) - Ct(\text{对照组 GAPDH})]$, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示基因的相对表达量。VEGF mRNA 上游引物: 5'-GAA GCT CAT CTC TCC TAT GTG CTG GC-3'; 下游引物: 5'- CCT GGT GGA CAT CTT CCA GGA GTA CC-3'; HIF-1 mRNA 上游引物: 5'- AGC CTG ATG CTC TCA CTC TGC -3'; 下游引物: 5'-TGT GTC ATC GCT GCC AAA A-3'; GAPDH mRNA 上游引物: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG -3'; 下游引物: 5'-TGC ACC ACC ACC TGC TTA GC-3'。以上引物均有广州锐博生物科技有限公司合成。

1.2.4 Western blot 检测 HIF-1 在蛋白水平上的表达变化 取出各组的肾组织, 质量约为 100 mg, 用组织电动匀浆器在冰浴中研磨成浆, 加入组织蛋白裂解液 1 mL, 组织蛋白酶抑制剂 1 μ L, 冰浴 20 min, 4 °C 下 12 000 \times g 离心 20 min, 用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测各组蛋白浓度并将各组蛋白浓度调节一致, 按照 1:5 的比例将蛋白样品与蛋白上样缓冲液混匀并于 100 °C 水浴煮沸 5 min。各样本均取 50 μ g 总蛋白经 10% 十二烷基-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭后, 用 HIF-1 特异性一抗 (1:300 稀释的小鼠抗小鼠 HIF-1 抗体) 孵育, 4 °C 过夜。二抗 (辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 1:5 000) 室温孵育 1 h 后加入 ECL 显色底物, 暗室曝光, 最后通过 QuantityOne 软件进行图像分析, 并按得出的数据进行统计学分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验。单因素方差 (one-way ANOVA) 分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测 HIF-1 mRNA、VEGF mRNA、miRNA-210 的表达变化 HIF-1 mRNA 在 UUO 2、5、9、14 d 组表达逐渐上调, 分别为 Sham 组的 (2.16 \pm 0.23)、(2.69 \pm 0.24)、(3.10 \pm 0.52)、(4.22 \pm 0.44) 倍, 与 Sham 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1; VEGF mRNA 在 UUO 后 2、5 d 组均表达上调, 分别约为 Sham 组的 (2.20 \pm 0.19)、(1.13 \pm 0.06) 倍, 在 UUO 9、14 d 组均表达下调, 分别为 Sham 组的 (0.35 \pm 0.05)、(0.17 \pm 0.02) 倍, 与 Sham 组, 差异均有统计学

意义 ($P < 0.05$), 见图 2; miRNA-210 在 UUO 2、5 d 组均表达上调, 分别为 Sham 组的 (4.81 \pm 0.55)、(1.81 \pm 0.10) 倍, 在 UUO 9、14 d 组均表达下调, 分别为 Sham 组的 (0.88 \pm 0.05)、(0.23 \pm 0.01) 倍, 与 Sham 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

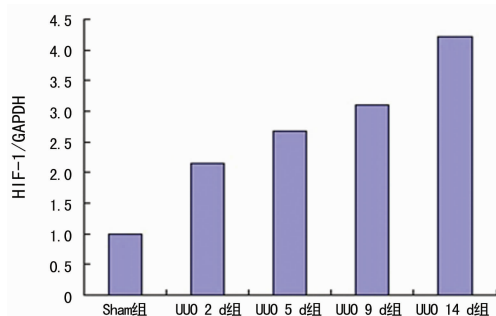


图 1 肾积水后 HIF-1 mRNA 在各时间段的表达变化

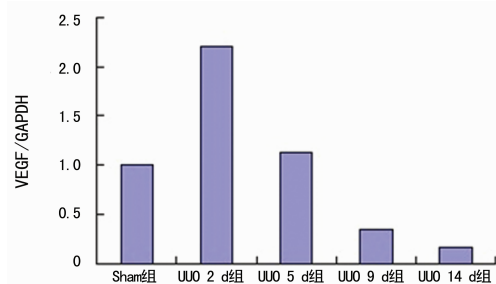


图 2 肾积水后 VEGF 在各时间段的表达变化

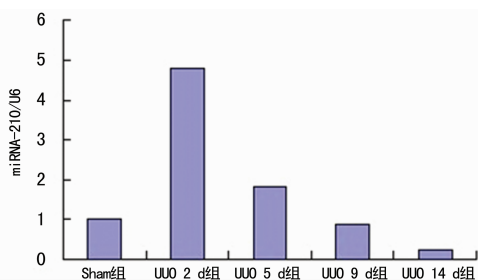


图 3 肾积水后 microRNA-210 在各时间段的表达变化

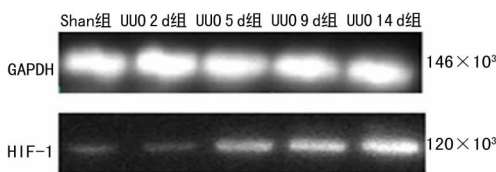


图 4 肾积水后 HIF-1 蛋白在各时间段的表达变化

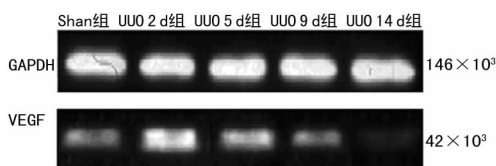


图 5 肾积水后 VEGF 蛋白在各时间段的表达变化

2.2 Western-blot 检测 HIF-1、VEGF 蛋白的表达变化 HIF-1 蛋白条带在 UUO 2、5、9、14 d 组较 Sham 组蛋白条带逐步加深; VEGF 蛋白条带在 UUO 2 d 组蛋白条带最深, 随着

UUO 时间的延长蛋白条带逐渐变浅,见图 4、5。

3 讨 论

肾积水是由于尿路梗阻而引起的肾盂肾盏扩张并伴有肾组织的萎缩,如果引起肾积水的因素不能得到解除,囤积在肾盂及肾盏内的尿液就会越来越多,并压迫肾脏髓质,引起髓质内血液循环压力增大使得肾内血流量速度减慢甚至停止,从而引起肾组织缺血缺氧^[6]。因此尽快解除引起肾积水的因素,对于肾功能的保护起着极为重要的作用。在肾脏积水后肾组织中 HIF-1 的表达会随着时间的延长而逐渐上调^[6],上述观点在肾缺血再灌注模型中同样得到证实^[7]。

miRNA-210 是一种具有缺氧诱导活性的 miRNA,通过下调靶基因 Ephrin-A3 的表达而影响下游基因发挥生物作用^[8]。在缺氧的情况下通过 Akt-p53 通路使 miRNA-210 表达上调^[9]。Kelly 等^[10]发现,在常氧条件下脯氨酸羟化酶在甘油-3 磷酸脱氢酶-1(GPD1L)作用下使 HIF-1 蛋白中的两个脯氨酸羟化,而引起 HIF-1 蛋白的降解,而 miRNA-210 可以抑制 GPD1L,使脯氨酸羟化酶不能发挥作用而引起 HIF-1 不被降解而上调。

VEGF 是一种促内皮细胞生成血管因子,可由肾小球内皮细胞和肾小球脏层细胞生成,能促进内皮细胞迁移、增生、增强内皮细胞通透性及血管生成维持^[11]。研究表明,在缺氧情况下 miRNA-210 能促进内皮细胞的敏感性。并能促进体外培养的脐静脉内皮细胞的血管新生^[12-13]。

本研究结果显示,在小鼠 UUO 模型中,肾组织的 HIF-1 表达水平在 UUO 后表达量逐渐上调,VEGF 表达变化趋势与 miRNA-210 的变化趋势呈现一过性上调。那么为什么 HIF-1 α 与 miRNA-210、VEGF 的表达不一致,笔者推测可能产生 HIF-1 α 的细胞与产生 miRNA-210、VEGF 的细胞有区别,二者对缺氧耐受力不同,产生 HIF-1 α 的细胞可以很好地耐受缺氧,并能不断产生 HIF-1 α ,而产生 miRNA-210 和 VEGF 的细胞也具有缺氧耐受力,但仅在一定范围内随缺氧程度增加而产生增多,超过一定阈值会因为细胞或组织耐受力下降而产生下降,而出现一过性升高的情况。另外出现这种情况也有可能是因为 HIF-1 α 降解速度较慢,虽然随时间延长 HIF-1 α 累积量增多,但净产生量却随时间延长而减少,而 miRNA-210 和 VEGF 由于不稳定或衰减速率较快,产生降解速率减慢而表现出下调。

这与 Fasanaro 等^[13]及 Chang 等^[14]的报道相一致,进一步证实了 miRNA-210 调控 VEGF 并促进血管新生。本实验初步阐明了 UUO 后 miRNA-210、HIF-1、VEGF 的表达变化趋势,通过小鼠急性 UUO 模型观察三者的关系,不难看出具有缺氧诱导活性的 miRNA-210 在血管新生方面发挥着举足轻重的作用,其具体调控机制仍有待于进一步研究。

参考文献

[1] Zhang B, Stellwag EJ, Pan X. Large-scale genome analysis reveals unique features of microRNAs[J]. *Gene*, 2009, 443(1/2): 100-109.

[2] Zaccagnini G, Maimone B, Di Stefano V, et al. Hypoxia-induced miR-210 modulates tissue response to acute periph-

eral ischemia[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 21(8): 1177-1188.

- [3] Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia[J]. *Yale J Biol Med*, 2007, 80(2): 51-60.
- [4] Byungsoo K, Jun C. VEGF expression in hypoxia and hyperglycemia: reciprocal effect on branching angiogenesis in epithelial-endothelial co-cultures[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(8): 2027-2036.
- [5] Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage[J]. *Am J Kidney Dis*, 1992, 20(1): 1-17.
- [6] Stravodimos KG, Koritsiadis G, Lazaris AC, et al. Hydro-nephrosis promotes expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha[J]. *Urol Int*, 2009, 82(1): 38-42.
- [7] 李贺,汪洪,刘芬,等.肾缺血再灌注损伤后缺氧诱导因子-1 α 及其靶基因 miR-210、血管内皮生长因子的动态表达[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(12): 2074-2076.
- [8] 邓君,崔苏萍,阮琼芳,等.肾缺血再灌注损伤后 miR-210 及其靶基因的变化[J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26(11): 1512-1514.
- [9] Mutharasan RK, Nagpal V, Ichikawa Y, et al. microRNA-210 is upregulated in hypoxic cardiomyocytes through Akt- and p53-dependent pathways and exerts cytoprotective effects[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(4): H1519-1530.
- [10] Kelly TJ, Souza AL, Clish CB, et al. A hypoxia-induced positive feedback loop promotes hypoxia-inducible factor 1 α stability through miR-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(4): 2696-2706.
- [11] Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy[J]. *Cancer Lett*, 2008, 266(1): 37-52.
- [12] Lou Y, Gao F, Xie A, et al. MicroRNA-210 modified human umbilical vein endothelial cells induce capillary formation[J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2012, 26(5): 587-591.
- [13] Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand ephrin-A3 [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(23): 15878-15883.
- [14] Chang W, Lee CY, Park JH, et al. Survival of hypoxic human mesenchymal stem cells is enhanced by a positive feedback loop involving miR-210 and hypoxia-inducible factor 1[J]. *J Vet Sci*, 2013, 14(1): 69-76.