于秀石,朱佳,魏丽丽,等. IGF-1上调 miR-155 表达对新生大鼠缺氧性肺动脉高压肺组织损伤的影响及其作用机制 [J]. 中国 比较医学杂志, 2019, 29(12): 31-38.

Yu XS, Zhu J, Wei LL, et al. Effect of IGF-1 upregulation of mi-155 expression on pulmonary tissue injury in neonatal rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(12): 31-38. doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 12.005

# IGF-1 上调 miR-155 表达对新生大鼠缺氧性肺动脉高压 肺组织损伤的影响及其作用机制

于秀石1,朱 佳2,魏丽丽1,马克涛1,司军强1,张忠双1,3\*,田俊杰1,罗 淑1,鲁广森1

(1.石河子大学医学院,新疆石河子 832000; 2.新疆维吾尔自治区人民医院,乌鲁木齐 830000;

3.石河子大学新疆地方与民族高发病教育部重点实验室,新疆石河子 832000)

【摘要】 目的 研究胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)上调 miR-155 表达在新生大鼠 缺氧性肺动脉高压(hypoxia-induced pulmonary hypertension, HPH)中的影响及机制。方法 建立新生大鼠 HPH 模 型,将 30 只新生 Wistar 大鼠依照随机数字表法分为模型组和尼莫地平给药组,健康新生大鼠作为空白对照组,10 只/组。所有组别大鼠于缺氧第2、4、8和12天分别取其新生大鼠,测定平均肺动脉压(mean pulmonary arterial pressure, mPAP),采用 ELISA 法检测血清缺氧诱导因子 1α (hypoxia-inducible factor 1α, HIF-1α)和内皮素-1 (endothelin-1, ET-1), 取缺氧第12天肺部组织, 检测各组大鼠肺组织中 miR-155、HIF-1α和 ET-1 表达的变化, 对照 组同法操作。结果 模型组大鼠反应迟钝,虚弱,体毛暗淡,蜷缩少动,精神萎靡,食量减少和体重下降等,空白对 照组大鼠反应敏捷,体毛光泽,饮食和体重正常,给药组大鼠的反应、体毛、饮食和体重介于空白对照组和模型组。 与空白对照组比,模型组大鼠缺氧2、4、8和12d的mPAP、HIF-1α和ET-1显著增高(P<0.05),与模型组比,给药 组大鼠缺氧 2、4、8 和 12 d 的 mPAP、HIF-1α 和 ET-1 显著降低(P<0.05)。空白对照组肺组织结构清晰可见,间质 无渗出,肺泡壁完整,模型组肺微血管扩张充血,双肺体积增大,明显肺水肿,可见浸润的炎症细胞,偶然形成透明 膜,大小各异的肺泡,肺泡间隔明显增厚,给药组大鼠其肺组织肺泡腔渗出、出血,毛细血管扩张开并充血,较模型 组炎症细胞浸润明显减轻。与空白对照组比,模型组大鼠缺氧 12 d 肺组织的 HIF-1α 和 ET-1 蛋白表达均显著增高 (P<0.05),miR-155表达显著降低(P<0.05),与模型组比,给药组大鼠缺氧 12 d 肺组织的 HIF-1α 和 ET-1 蛋白表 达均显著降低(P<0.05), miR-155 表达显著增高(P<0.05)。miR-155 的靶基因与 HIF-1α 的 5' UTR 配对互补, miR-155 可能通过靶向结合 HIF-1α 3' UTR 调控 miR-155 在肺组织中的表达。结论 新生大鼠 HPH 的发病过程 中低氧作为诱导 HIF-1α及 ET-1 的表达增强因素,减弱 miR-155 对 IGF-1R 的抑制作用,引发 HPH 肺组织损伤。 IGF-1 可通过上调 miR-155 表达,降低 IGF-1R 的细胞增殖作用并促进细胞凋亡,对肺组织损伤起保护作用。

【关键词】 肺动脉高压;大鼠;缺氧诱导因子 1α;内皮素-1;胰岛素样生长因子 1;miR-155

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2019) 12-0031-08

## Effect of IGF-1 upregulation of mi-155 expression on pulmonary tissue injury in neonatal rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension

YU Xiushi<sup>1</sup>, ZHU Jia<sup>2</sup>, WEI Lili<sup>1</sup>, MA Ketao<sup>1</sup>, SI Junqiang<sup>1</sup>, ZHANG Zhongshuang<sup>1,3\*</sup>, TIAN Junjie<sup>1</sup>, LUO Shu<sup>1</sup>, LU Guangsen<sup>1</sup>

(1. Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832000, China. 2. People's Hospital of Xinjiang Uygur

Autonomous Region, Urumqi 830000. 3. Key Laboratory for Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases of

Ministry of Education, Shihezi University, Shihezi 832000)

[作者简介]于秀石(1983—),女,硕士,讲师,主要研究方向:心血管疾病发病机制的基础研究。E-mail:54242014@ qq.com

<sup>[</sup>基金项目]国家自然科学基金(81660271);石河子大学国际科技合作推进计划项目(GJHZ201603)。

<sup>[</sup>通信作者]张忠双(1980—),男,硕士,副教授。E-mail:zhangzhongshuang@shzu.edu.cn

[ Abstract ] **Objective** To study the effect and mechanism of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) up regulating miR-155 expression in hypoxic pulmonary hypertension (HPH) of neonatal rats. Methods The HPH model of newborn rats was established. Thirty newborn Wistar rats were divided into model group and nimodipine administration group according to the random number table. Healthy newborn rats were used as the blank control group, 10 rats per group. The mean pulmonary arterial pressure (mPAP) was measured on the 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> days of hypoxia in all groups of rats. The serum levels of hypoxia-inducible factor  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) and endothelin-1 (ET-1) were measured by ELISA. The lung tissues at the  $12^{th}$  day of hypoxia were taken and the expression levels of miR-155, HIF-1 $\alpha$  and ET-1 were measured. The control group was operated in the same way. Results In the model group, the rats were moving slowly, weak, dim, curled up, depressed, with reduced food intake and weight loss. In the blank control group, the rats were moving quickly, glossy, with normal diet intake and body weight. In the administration group, the rats' response, body hair, diet intake and weight were between the blank control and model groups. Compared with the control group, the mPAP, HIF-1 $\alpha$  and ET-1 of the model group were significantly higher at the  $2^{nd}$ ,  $4^{th}$ ,  $8^{th}$  and  $12^{th}$  days of hypoxia (P < 0.05), and the mPAP, HIF-1 $\alpha$ and ET-1 of the model group were significantly lower at the  $2^{nd}$ ,  $4^{th}$ ,  $8^{th}$  and  $12^{th}$  days of hypoxia (P < 0.05). In the control group, the lung tissue structure was clear, with intact alveolar wall and no interstitial exudation. In the model group, the pulmonary microvasculature was dilated and congested, the volume of both lungs was increased, with obvious pulmonary edema and inflammatory cell infiltration, and the presence of alveoli of different sizes, and the alveolar septa were obviously thickened. In the administration group, the alveoli were exuded and bleeding, and the capillaries were dilated and congested. Compared with the model group, inflammatory cell infiltration was significantly reduced. Compared with the blank control group, the expression of HIF-1 $\alpha$  and ET-1 in the lung tissue of the model group increased significantly (P < 0.05), and the expression of miR-155 decreased significantly (P < 0.05). Compared with the model group, the expression of HIF-1 $\alpha$  and ET-1 in the lung tissue of the drug group decreased significantly (P < 0.05), and the expression of miR-155 increased significantly (P < 0.05). The target gene of miR-155 and 5' UTR of HIF-1 $\alpha$  were complementary, and miR-155 might regulate the expression of miR-155 in lung tissue by targeting and binding HIF-1 $\alpha$  3' UTR. Conclusions Hypoxia may be an enhancing factor in inducing the expression of HIF-1 $\alpha$  and ET-1, reducing the inhibitory effect of miR-155 on IGF-1R, and causing HPH pulmonary tissue injury. IGF-1 may exert a protective effect on the lung tissue by upregulating the expression of miR-155, reducing the proliferation of IGF-1R cells and promoting apoptosis.

[Keywords] hypoxia-induced pulmonary hypertension; rats; hypoxia-inducible factor 1α; endothelin-1; insulinlike growth factor 1; miR-155

新生儿缺氧性肺动脉高压(hypoxia-induced pulmonary hypertension, HPH)是常见的威胁新生儿 生命的急危重症,疾病早期表现为肺血管痉挛,若 及时发现并进行治疗则可抑制血管痉挛,否则疾病 发展到晚期则表现为肺血管重塑,发生不可逆的组 织变化,此时期救治困难、死亡率高[1-2]。目前其发 病机制尚不清楚,已知血管舒缩因子的平衡失调在 发病过程中起了重要作用<sup>[34]</sup>。在 HPH 的发病机 制研究发现缺氧诱导因子 1α (hypoxia-inducible factor 1α, HIF-1α)和内皮素-1(endothelin-1, ET-1) 的上游调节因子,参与 HPH 的发生与发展<sup>[5]</sup>。 miR-155 属于小分子 RNA,能通过与靶基因 3'或 5' 非编码区(untranslated region, UTR)的结合,调控靶 基因的表达,参与机体的各种生物调控过程,如 miR-155 在抑郁症患者的血浆中的表达与多种炎症 因子相关。胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor1, IGF-1)能有效促进外周神经再生,具有非选择性神经营养作用,已有动物实验研究发现新生大 鼠缺氧缺血性脑损伤后脑室内给予 IGF-1,明显减 轻脑损伤区的神经元缺失<sup>[6]</sup>。在研究对 HPH 的机 制时,IGF-1上调 miR-155 表达的作用非常重要,但 miR-155 在肺损伤中的作用鲜有报道<sup>[7]</sup>;且国内尚 无新生儿 HPH 发生与 IGF-1 相关的研究。故而本 研究通过建立 HPH 新生大鼠模型,以尼莫地平为工 具药,探索在 HPH 发病过程中,IGF-1 的作用机制, HIF-1α 和 ET-1 的生理功能,现将结果报道如下。

#### 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物

清洁级 Wistar 大鼠 180 只, 雌雄不限, 日龄 3~
5 d (大鼠新生儿期), 体质量(20 ± 5) g, 购自海军
军医大学动物中心, 实验动物生产许可证号[SCXK

(沪)2019-0009]。依据应用实验动物的 3R 原则给 予适当关照。饲养及无菌手术在复旦大学医学院 实验动物科学部屏障动物实验设施进行[SYXK (沪)2019-0026],置于全自动调节低压舱,饲养条 件:室温 21℃~25℃,相对湿度 50%~65%,光暗循 环 12 h/12 h,自由饮水摄食。实验动物福利伦理审 查号:2019012304。

#### 1.2 主要试剂与仪器

尼莫地平(国药准字 H43020645,规格:每片 30 mg,湖南百草制药有限公司);鼠源性单克隆抗体 (Anti-β-actin)(美国 Amgen 公司);ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(BCA protein assay kit)(美国 BioVision 公司);TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription kit 试剂盒(美国 ABI 公司);Gel-Doc 凝胶成像分析系统(美国 UVP 公司);Leica Qwin 图像分析系统(德国 Leica 公 司);NanoDrop 2000 蛋白/核酸分析仪(美国 ThermoFisher 公司);高速离心机(美国 Beckman 公 司);LightCycler480 高通量实时荧光定量 PCR 仪 (美国罗氏公司);TRIzol 裂解液(美国 Invitrogen 公 司)和 RNase-free 水(美国 ThermoFisher 公司)。

#### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实验分组

新生大鼠均适应性饲养1周,随机分成3组:模 型组、给药组及空白对照组。将模型组和给药组新 生大鼠置于自制全自动调节常压低氧舱内(大气压 约50 kPa,氧浓度10%),制造间断性低氧环境,以 1.5 L/min 的速度输入含 10% 的氮氧混合气, 予以 氧浓度仪监测,维持氧浓度在 9.5%~10.5% 范围 内,控制二氧化碳浓度小于 0.5%。通过放置小风 扇维持低氧舱仓内气体均匀,通过减压阀和电磁阀 调节舱内压力,予以无水氯化钙、钠石灰吸收箱内 的水蒸气与二氧化碳。昼/夜为12/12,每天缺氧 8h,连续2周。分别于缺氧2、4、8、12d检测肺动脉 平均压(mean pulmonary arterial pressure, mPAP), mPAP≥6.5 pg/mL,且具有较强时间依赖性,则证 明成功建立 HPH 大鼠模型<sup>[8]</sup>。缺氧同时给药,其 中给药组每天灌胃给予3 mg/kg 尼莫地平。空白对 照组除不低氧,即大气压约 50 kPa,氧浓度 10%,其 余条件相同,两组大鼠放于同一房间以相同饮食饲 养,模型组及空白对照组每天灌胃给予生理盐水。 分别于缺氧2、4、8、12 d 依照随机数字表法抽取模 型组、给药组及空白对照组大鼠各 10 只进行相关检 测指标的监测。

#### 1.3.2 mPAP 检测

各组大鼠在被观测时间点经氯胺酮腹腔内注 射麻醉后,固定实验大鼠,消毒颈、胸部皮肤,行气 管插管,给予机械通气,潮气量:2~3 mL/min,监测 新生大鼠尾部血氧饱和度(pulse oxygen saturation, SpO<sub>b</sub>),使其维持在(90 ± 5)%。开胸,朝着血流的 反方向将弯形头皮针一端缓慢扎进肺动脉根部,头 皮针另一端通过压力传感器连接生理通道记录仪。 对肺动脉压力曲线进行记录。

#### 1.3.3 肺损伤组织病理形态学观察

于缺氧 12 d 给药后 2 h,处死大鼠,取肺部组 织,4%甲醛固定,脱水进行石蜡包埋,4 μm 进行组 织切片,二甲苯脱腊,苏木精染,伊红乙醇染色,二 甲苯处理,中性树脂进行封胶固定,烘箱过夜处理, 光镜下观察肺组织切片病理学变化。

1.3.4 Western blot 法检测 HIF-1α 和 ET-1 在肺组 织的表达

取"1.3.2"项下大鼠肺部组织,提取总蛋白,蛋 白变性缓冲液变性,在硝酸纤维素膜上放置 12.5% SDS-PAGE 胶转膜后,3% BSA 4℃封闭过夜,PBS 缓 冲液洗涤硝酸纤维素膜,分别掺入 HIF-1α 和 ET-1 单克隆抗体(1:500),在室温下孵化 45 min,PBS 缓 冲液洗涤硝酸纤维素膜。二抗孵育,掺入 HRP 标记 的二抗(1:1000),室温孵化 30 min,PBS 缓冲液洗 涤硝酸纤维素膜,ECL 发光并成像,以 β-actin 作为 内参,检测 HIF-1α 各组的相对表达,检测肺部组织 中的 ET-1 蛋白的相对表达量。采用显微成像系统 进行拍照,并对图片使用 Image Pro Plus 6.0 进行处 理分析,将染色阳性颗粒的灰度单位转换为吸光单 位,并测量其密度(optical density, OD)值,以此作为 其阳性表达的半定量。

1.3.5 ELISA 法检测血清中 HIF-1α 与 ET-1 的 表达

各组大鼠于观察时间点采静脉血0.5~1.0 mL, 3000 r/min 离心 15 min,提取上清液,置离心管置 于-20℃冰箱备用。使用 ELISA 试剂盒,严格按照说 明书操作,计算血清 HIF-1α 与 ET-1 的含量。

1.3.6 定量 PCR 检测肺组织的 miR-155 mRNA 表达

取出大鼠肺部组织研磨,加入1 mL TRIzol 裂解 液,室温静置5 min,加入200 μL 氯仿混匀,室温放 置10 min。离心取上层,加入等体积异丙醇于 RNase-free 的 1.5 mL 离心管中,冰浴 30 min,在 4℃,12 000 r/min 离心 15 min,得到 RNA 沉淀,空气 干燥 RNA。加入 50 µL RNase-free 的水溶解 RNA; 利用 NanoDrop 测定总抽提 RNA,置于-20℃,备用。 根据 TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription kit 试剂盒操作说明书,cDNA 产物由抽提的 RNA 体外 反转录实验得到;在 16℃ 中孵化需要 30 min;在 42℃ 中孵化需要 30 min;85℃加热 5 min,4℃保存。 通过得到的 cDNA 进行 PCR 荧光定量检测,在 LightCycler480 仪器上操作,以 U6 为内参,miR-155 的相对表达用  $\Delta$ CT 来表示,95℃,预变性 10 min, 95℃ 15 s,60℃ 30 s,70℃ 30 s,共40 个扩增周期,  $\Delta$ CT = CT<sub>U6</sub>-CT<sub>miR-155</sub> 计算 miR-155 mRNA 的相对表 达,引物信息见表 1。

#### 1.4 统计学分析

本研究中数据使用 SPSS 22.0 进行分析,采用 单因素方差分析计量资料以平均数±标准差( x̄±s)表示,组间两两比较采用 SNK-q 检验,以 P< 0.05 认为差异有显著性。

#### 2 结果

#### 2.1 各组大鼠的一般状况比较

模型组大鼠反应迟钝,虚弱,体毛暗淡,蜷缩少动,精神萎靡,食量减少和体重下降等;空白对照组 大鼠反应敏捷,体毛光泽,饮食和体重正常;给药组 大鼠的反应、体毛、饮食和体重介于空白对照组和 模型组。

#### 2.2 各组大鼠不同时间段 mPAP 比较

与空白对照组比,模型组大鼠缺氧 2、4、8 和 12 d 的 mPAP 显著增高(P<0.05),与模型组比,给药 组大鼠缺氧 2、4、8 和 12 d 的 mPAP 显著降低(P<0.05),见表 2。

#### 2.3 各组大鼠肺组织 HE 染色

空白对照组肺组织结构清晰可见,间质无渗 出,无炎症细胞浸润,肺泡腔内未发生水肿液与出 血,肺泡壁完整;模型组肺微血管扩张充血,双肺体 积增大,明显肺水肿,大量红细胞与液体从肺泡腔 及肺泡隔内渗出,可见浸润的炎症细胞,偶然形成 透明膜,大小各异的肺泡,肺泡间隔明显增厚;给药 组大鼠其肺组织肺泡腔渗出、出血,毛细血管扩张 开并充血,较模型组炎症细胞浸润明显减轻,见 图 1。

### 2.4 不同时间段各组大鼠血清中 HIF-1α 与 ET-1 水平比较

与空白对照组比,模型组大鼠缺氧2d、4d、8d和 12d的HIF-1α和ET-1均显著增高(P<0.05),与模型 组比,给药组大鼠缺氧2、4、8和12d的HIF-1α和ET-1 均显著降低(P<0.05),见表3和表4。

#### 2.5 各组大鼠肺组织 ET-1 蛋白表达检测

与空白对照组比,模型组大鼠缺氧 12 d 肺组织的 HIF-1α和 ET-1 蛋白表达均显著增高(*P*<0.05), 与模型组比,给药组大鼠缺氧 12 d 肺组织的 HIF-1α 和 ET-1 蛋白表达均显著降低(*P*<0.05),见图 2 和 表 5。

表 1 各引物序列信息 Table 1 Primer sequence information

基因 Gene	引物用	序列(5'-3') Primer sequences
m:D 155	上游引物 Upstream primers	TTACGATTAACACTATCC
miii (~155	下游引物 Downstream primers	CTAGGTGCGTTCAGTG
114	上游引物 Upstream primers	TAGGGTGCTCGCTTCGGC
	下游引物 Downstream primers	CTGGTGTCGTGGAGTCG

表 2	各组大鼠不同时间段 mPAP	比较(n=10	))
-----	----------------	---------	----

Table 2   Comparison	of mPAP in the rats of	of different groups a	t different time of treatm	nent $(n=10)$
组别		1	mPAP (pg/mL)	
Groups	2 d	4 d	8 d	12 d
模型组 Model group	7. $89 \pm 1.48^{a}$	9.96±1.52 <sup>a</sup>	11. 23±2. 17ª	14. 46±2. 21 <sup>a</sup>
给药组 Treatment group	$6.05 \pm 1.29^{b}$	8.56±1.39 <sup>b</sup>	9.47±1.47 <sup>b</sup>	11. 23±2. 03 <sup>b</sup>
空白对照组 Control group	5.12±1.23	8.33±1.34	8.56±1.17	9.78±1.26
F	11.107	3.867	6. 709	16. 112
Р	0.000	0.033	0.004	0.000

注:模型组与空白对照组比,\*P<0.05;给药组与模型组比,\*P<0.05。

Note. Comparison between the model and blank control groups, <sup>a</sup>P<0.05. Comparison between the administration and model groups, <sup>b</sup>P<0.05.



#### 图1 各组大鼠肺组织的病理学改变

Figure 1 Pathological changes in the lung tissues of rats in the three groups

表3 不同时间段各组大鼠血清中 HIF-1α 水平比较(n=10)

组别		1	HIF-1α (pg/mL)	
Groups	2 d	4 d	8 d	12 d
模型组 Model group	$0.79 \pm 0.08^{a}$	0. 94±0. 13 <sup>a</sup>	0. 95±0. 07 <sup>a</sup>	0. 94±0. 12 <sup>a</sup>
给药组 Treatment group	$0.61 \pm 0.07^{b}$	$0.73 \pm 0.10^{b}$	$0.68 \pm 0.06^{b}$	$0.79 \pm 0.09^{b}$
医白对照组 Control group	0.39±0.05	$0.41 \pm 0.07$	0.49±0.05	0.48±0.06
F	87.246	67.201	145.727	63.257
Р	0.000	0.000	0.000	0.000

注:模型组与空白对照组比,\*P<0.05;给药组与模型组比,\*P<0.05。

Note. Comparison between the model and blank control groups,  ${}^{a}P$ <0.05. Comparison between the administration and model groups,  ${}^{b}P$ <0.05.

<b>Table 4</b> Comparison of serum ET-1 levels at different times of rats in the three groups $(n=10)$					
组别			ET-1(pg/mL)		
Groups	2 d	4 d	8 d	12 d	
模型组 Model group	20. 21±6. 43ª	27. 13±6. 51 <sup>a</sup>	35. 74±8. 24ª	34. 73±8. 32ª	
给药组 Treatment group	15.64±1.23	21. 22±4. 35	26.70±5.25	26.75±5.38	
空白对照组 Control group	15. 17±2. 21 <sup>b</sup>	18. 22±2. 36 <sup>b</sup>	18.75 $\pm$ 2.47 <sup>b</sup>	19. 86±2. 65 <sup>b</sup>	
F	4.871	9.220	21.346	15. 794	
Р	0.016	0.001	0.000	0.000	

#### 表4 不同时间段各组大鼠血清中 ET-1 水平比较(n=10)

注:模型组与空白对照组比, \*P<0.05; 给药组与模型组比, \*P<0.05。

Note. Comparison between the model and blank control groups,  ${}^{a}P < 0.05$ . Comparison between the administration group and model groups,  ${}^{b}P < 0.05$ .



注:图 A 为空白对照组;图 B 为模型组;图 C 为给药组。

图 2 Western blot 检测大鼠肺部组织中 HIF-1α 与 ET-1 的表达

Note. A, Blank control group. B, Model group. C, Administration group.

Figure 2 Western blot detection of the ET-1 expression in the rat lung tissues

Table 5         Western blot detection of	E1-1 expression in lung tissues of r	ats in the three groups $(n=10)$
组别 Groups	HIF-1α	ET-1
模型组 Model group	1.5±0.4	1.2±0.5
给药组 Treatment group	3. 2±0. 7	5.3±0.9
空白对照组 Control group	2. 1±0. 5	2.5±0.6
F	24. 778	92. 746
Р	0.000	0. 000

Western blot 检测大鼠肺部组织中 HIF-1α 与 ET-1 的表达(n=10) 表 5

le 5	Western blot	detection of	ET-1	expression	in lung	tissues d	of rats	in the	three groups	()
10.5	western biot	uciccuon or .	LI-I	CADICSSION	III IUIIE	ussuus	or rais	in uic	unce groups	

#### 2.6 各组大鼠肺组织 miR-155 表达比较

与空白对照组比,模型组大鼠缺氧 12 d 肺组织 的 miR-155 表达显著降低(P<0.05), 与模型组比, 给药组大鼠缺氧 12 d 肺组织的 miR-155 表达显著 增高(P<0.05)。进一步从 TargetScan 网站对 miR-155 的靶基因进行预测发现,其与 HIF-1α 的 5' UTR 配对互补,说明 miR-155 可能是通过靶向结合 HIF-1α 3' UTR 调控其在肺组织中的表达水平。见 图3和表6。



注:模型组与空白对照组相比较,\*P<0.05;给药组与模型组相比 较,<sup>b</sup>P<0.05。

图 3 各组大鼠肺组织 miR-155 表达比较(n=10) Note. The model group compared with the control group,  ${}^{a}P < 0.05$ . The treatment group compared with the model group,  ${}^{b}P < 0.05$ .

Figure 3 Comparison of expression of microRNA-155 in lung tissue of rats in the three groups (n=10)

#### 3 讨论

#### 3.1 HPH 的发病机制及病理生理

HPH 的相关研究认为肺动脉高压的起始环节 为缺氧所致肺微小动脉内皮损伤,细胞因子与血管 活性物质产生及异常释放的原因为血管内皮受损 导致功能失调引起<sup>[9]</sup>。作用于血管平滑肌的血管 舒缩因子平衡失调,出现肺血管收缩为早期表现, 出现 HPH, 肺血管重建及肺血管壁病理改变为 HPH 后期表现<sup>[10]</sup>。其中越来越受到关注的为 HIF-1α 的 作用<sup>[11]</sup>.生理活性由 α 亚基的表达和活性决定的氧 依赖转录激活因子,是在缺氧条件下诱导产生的、 在体内许多细胞中广泛存在的。HIF-1α 是介导机 体对缺氧发生基因表达重新调整、肺血管收缩、肺 血管重塑形成的中心环节,在HPH的发生过程中起 着非常重要的作用<sup>[12]</sup>。有研究表明缺氧早期低氧 刺激肺组织产生大量 HIF-1α,由于缺氧耐受效应使 得肺组织 HIF-1α<sup>[13]</sup>表达随着缺氧时间延长不再明 显提高。本研究表明,在 HPH 大鼠模型中,早期缺 氧刺激能显著提高 HIF-1α 的表达, 而在缺氧后 8 d 和 12 d 虽然也有增加,但 HIF-1α 的表达相比于前 期无显著变化。

ET-1 是内源性血管收缩因子, 肺部是 ET-1 作 用和代谢的最重要脏器<sup>[14]</sup>。ET-1可能是促使肺血 管强烈收缩导致肺动脉高压发生过程中的一个重 要因素[15]。本次研究结果表明,在模型组新生大鼠

Table 6 Predictive results of target genes for microRNA-155

	靶区(顶部)和 miRNA(底部)的预测非层序配对 Predicted consequencetial pairing of target region(top)and miRNA(bottom)
Position 1036-1042 of Hif1a3' UTR	5' -GUGAGUAAUUUUAGAAGCAUUAU
Mmu-miR-155-5p	3'-UGGGGAUAGUGUUAAUCGUAAUU

缺氧2d起血清 ET-1 即明显增高,并持续至12d, 同时在模型组大鼠肺组织中 ET-1 蛋白也存在着显 著高表达。其原因可能为:在缺氧早期血管内皮细 胞在低氧刺激下产生大量 HIF-1α, HIF-1α 诱导下 游靶基因 ET-1 高表达。肺血管内皮细胞膜上 ET-B 受体与通过自分泌途径异常升高的 ET-1 相结合,生 成大量氧自由基,对肺动脉高压损伤程度加重与肺 血管内皮细胞本身的脂质造成过氧化损害<sup>[16]</sup>。

#### 3.2 IGF-1 上调 miR-155 表达对 HPH 的作用

IGF-1 作为体内重要的生长因子,对细胞的增 殖、分化、调亡及机体的生长发育起重要调节作 用<sup>[17-18]</sup>;已有相关研究报道称 IGF-1 可防治高氧肺 损伤<sup>[19-20]</sup>。在对 HPH 大鼠模型进行现非侵入性鼻 腔滴入 IGF-1 后发现,肺部组织损伤明显降低,说明 入 IGF-1 对大鼠低氧肺动脉高压肺组织损伤有保护 作用。通过检测给药组大鼠肺组织 HIF-1α 以及 ET-1 的表达发现,其在肺组织中的表达水平得到了 明显的抑制,表明 IGF-1 可能通过作用于 HIF-1α, 进而抑制 ET-1 的表达,发挥对肺组织的保护 作用<sup>[21]</sup>。

IGF-1R mRNA 可在大鼠肺小动脉壁上正常表 达。IGF-1 可特异结合细胞膜 ICG-1R,传导其刺激 增殖信号,引发细胞增殖、细胞分化等效应。ICG-1R 受激活后可影响大部分细胞的增殖和转化过程. 同时抑制细胞凋亡[22]。本次研究表明,模型组大鼠 缺氧2、4、8和12d的mPAP平均水平为均显著高 于空白对照组 mPAP 对应时间的平均水平,各时间 的差异均具有统计学意义,提示经低氧环境培养 后,大鼠可产生低氧性肺血管重建和缺氧性肺动脉 高压。Dogansen 等的研究<sup>[23]</sup>表明,肺动脉高压的大 鼠中,肺小动脉壁 miR-155 水平明显减少。分析原 因,在低氧性肺血管重建过程中, IGF-1R 不仅担任 受体角色,而且可引导肺血管平滑肌细胞从收缩表 型转化成合成表型,促进细胞增殖。而血管壁结构 构成与细胞增殖及凋亡相关。综上,IGF-1R 具有促 进细胞增殖及抑制细胞凋亡的作用,因此有利于血 管壁结构重建,而 miR-155 是 IGF-1R mRNA 中重要 的抑制因子[24]。因此,低氧条件时,肺小动脉壁 miR-155 水平的降低与低氧性肺血管重建具有重要 的关联,适当提升其水平有利于改善 HPH 病情<sup>[25]</sup>。

在分子水平上采用定量 PCR 检测肺组织中 miR-155 的表达发现,与空白对照组大鼠比,模型组

大鼠肺部组织中 miR-155 表达明显下降,差异具有显著性。与模型组大鼠比,IGF-1 给药后大鼠肺组织中 miR-155 表达的平均水平则明显升高,差异有统计学意义。对其靶基因进行预测分析发现,其可能通过靶向结合 HIF-1α 5' UTR,调控其在肺组织中的表达。

低氧作为始动因素通过诱导 HIF-1α 及其 ET-1 的表达,ICF-1R 具有促进细胞增殖及抑制细胞凋亡 的作用,miR-155 对 ICF-1R 的抑制作用减弱,导致 肺血管收缩与增生异常,进而导致 HPH 肺组织损 伤。ICF-1 可显著上调肺组织中 miR-155 的表达, 降低 ICF-1R 的细胞增殖作用并促进细胞凋亡,一定 程度上保护肺组织损伤的发生,对临床治疗缺氧性 肺动脉高压引发的肺损伤提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 桑葵,周英,李明霞.缺氧性肺动脉高压新生大鼠肺血管重 塑的研究 [J].中国当代儿科杂志,2012,14(3):210-214.
- Shi L, Kojonazarov B, Elgheznawy A, et al. MiR-223-IGF-IR signaling in hypoxia- and load-induced right ventricular failure: a novel therapeutic approach [J]. Cardiovasc Res, 2016, 111 (3): 184-193.
- [3] Li S, Geng J, Xu X, et al. MiR-130b-3p modulates epithelialmesenchymal crosstalk in lung fibrosis by targeting IGF-1 [J].
   Plos One, 2016, 11(3): e0150418.
- [4] 杜小群,李广洪,高润虹.预案管理在新生儿缺氧性肺动脉 高压患儿中的应用[J].临床护理杂志,2016,15(5):72 -75.
- [5] Han CF, Li ZY, Li TH. Roles of hypoxia-inducible factor-1α and its target genes in neonatal hypoxic pulmonary hypertension [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(18): 4167–4180.
- [6] El-Mazary AA, Nasif KA, Abdel-Hakeem GL, et al. Adiponectin, leptin and insulin levels at birth and in early postnatal life in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy [J]. J Diabetes Metab Disord, 2015, 14: 87–95.
- [7] Ho KH, Chen PH, Hsi E, et al. Identification of IGF-1enhanced cytokine expressions targeted by miR-181d in glioblastomas via an integrative miRNA/mRNA regulatory network analysis [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 732-744.
- [8] 李娟, 孙新, 毕辉, 等. 低压低氧性大鼠肺动脉高压模型的 建立 [J]. 临床心血管病杂志, 2008, 24(4): 297-301.
- [9] 杜延娜,富建华,薛辛东.低氧致肺动脉高压新生大鼠 TRIP6和 cyclinD1表达及其对肺血管重塑的影响 [J].中国 小儿急救医学,2016,23(11):774-779.
- [10] 马义丽, 王乐, 李明霞. 缺氧诱导因子 1α 及血管内皮生长因 子在新生大鼠缺氧性肺动脉高压发病机制中的作用 [J]. 中 华新生儿科杂志, 2017, 32(1): 64-68.

- [11] Jiang Y, Wang J, Tian H, et al. Increased SUMO-1 expression in response to hypoxia: Interaction with HIF-1α in hypoxic pulmonary hypertension [J]. Int J Mol Med, 2015, 36(1): 271 -281.
- [12] Li L, Kim IK, Chiasson V, et al. NF-кB mediated miR-130a modulation in lung microvascular cell remodeling: Implication in pulmonary hypertension [J]. Exp Cell Res, 2017, 359(1): 235 -242.
- [13] Sun M, Ramchandran R, Chen J, et al. Smooth muscle insulinlike growth factor-1 mediates hypoxia-induced pulmonary hypertension in neonatal mice [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2016, 55(6): 779-791.
- [14] Xu YP, He Q, Shen Z, et al. MiR-126a-5p is involved in the hypoxia-induced endothelial-to-mesenchymal transition of neonatal pulmonary hypertension [J]. Hypertens Res, 2017, 40 (6): 552-561.
- [15] 王乐,吴海燕,李明霞. 热休克蛋白 70 对新生大鼠缺氧性肺动脉高压的保护作用 [J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19 (1): 88-94.
- [16] Feng S, Chen S, Yu W, et al. H<sub>2</sub>S inhibits pulmonary arterial endothelial cell inflammation in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension [J]. Lab Invest, 2017, 97(3): 268 -278.
- [17] Iams WT, Lovly CM. Molecular pathways: clinical applications and future direction of insulin-like growth factor-1 receptor pathway blockade [J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(19): 4270 -4277.
- [18] 曹友红, 许春芳. 胰岛素样生长因子-1 受体在恶性肿瘤中的

研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(5): 706-709.

- [19] 刘峰,黄华萍,李羲,等.胰岛素样生长因子-1 在油酸致急 性肺损伤大鼠中的作用[J].中华肺部疾病杂志,2016,9
   (5):503-506.
- [20] 金贞爱,赵以坤,金正勇,等.胰岛素样生长因子-1对高氧 诱导的 A549 细胞凋亡的影响 [J].中国当代儿科杂志, 2013,15(6):490-493.
- [21] Gubrij IB, Pangle AK, Pang L, et al. Reversal of microRNA dysregulation in an animal model of pulmonary hypertension [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0147827.
- [22] Connolly M, Garfield BE, Crosby A, et al. MiR-322-5p targets IGF-1 and is suppressed in the heart of rats with pulmonary hypertension [J]. FEBS Open Biol., 2018, 8(3): 339-348.
- [23] Dogansen SC, Yalin GY, Tanrikulu S, et al. Impact of glucose metabolism disorders on IGF-1 levels in patients with acromegaly
   [J]. Horm Metab Res, 2018, 50(5): 408-413.
- [24] Qadir JA, Saleem MM, Umar A, et al. Clinical, haematological, and serum biochemical alterations due to spontaneously occurring pulmonary hypertension syndrome in broiler chicken reared under temperate climatic conditions of Northern Himalayas [J]. Comp Clin Pathol, 2018(2): 1–8.
- [25] Mondejar-Parreño G, Callejo M, Barreira B, et al. MiR-1 is increased in pulmonary hypertension and downregulates Kv1.5 channels in rat pulmonary arteries [J]. J Physiol, 2019, 597 (4): 1185-1197.

[收稿日期]2019-04-08