

本文引用: 张海英, 王 晖, 潘佳俊, 高海波, 赵欣然, 刘春燕, 唐 群. 六味地黄汤通过 miR-210/HIF-1 α 信号通路对 CoCl₂ 诱导的 HK-2 细胞上皮间质转化的影响和机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(4): 619-626.

六味地黄汤通过 miR-210/HIF-1 α 信号通路对 CoCl₂ 诱导的 HK-2 细胞上皮间质转化的影响和机制研究

张海英, 王 晖, 潘佳俊, 高海波, 赵欣然, 刘春燕*, 唐 群*
湖南中医药大学医学院, 湖南 长沙 410208

〔摘要〕 目的 观察六味地黄汤(Liuwei Dihuang Decoction, LWDHD)调控 miR-210/HIF-1 α 信号通路对 CoCl₂ 诱导的 HK-2 细胞上皮间质转化(epithelial mesenchymal transdifferentiation, EMT)的作用和机制。方法 体外培养 HK-2 细胞,分对照组(N组)、模型组(M组)、LWDHD 血清组(LW组)、空白血清+miR-210 过表达组(LV-miR-210组)、空白血清+miR-210 沉默组(LV-anti-miR-210组)、空白血清+miR-210 阴性对照组(LV-miR-210 NC组)、LWDHD 血清+miR-210 过表达组(LW+LV-miR-210组)、LWDHD 血清+miR-210 沉默组(LW+LV-anti-miR-210组)、LWDHD 血清+miR-210 阴性对照组(LW+LV-miR-210 NC组),除 N 组外,其他各组加入 CoCl₂ 处理。CCK-8 法检测不同浓度 LWDHD、CoCl₂ 在 24 h 后对 HK-2 细胞活性的影响并选择最佳干预浓度。细胞免疫荧光和 Western blot 法检测各组 HK-2 细胞中缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)、 β -连环蛋白(β -catenin)、波形蛋白(Vimentin)、上皮钙黏素(E-cadherin)蛋白表达情况;qPCR 法检测 miR-210、HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin mRNA 表达情况。通过慢病毒感染 HK-2 细胞,实现 miR-210 的过表达和抑制,并加入 CoCl₂,观察 miR-210、HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 蛋白和 mRNA 表达以及 LWDHD 的干预作用。结果 CCK-8 结果显示,LWDHD、CoCl₂ 最佳干预浓度分别为 10%、200 μ mol/L。与 N 组相比,M 组细胞形态由铺路石样向长梭形改变,HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 蛋白和 mRNA 表达升高($P<0.05$, $P<0.01$),miR-210 mRNA 表达升高($P<0.01$),E-cadherin 蛋白表达降低($P<0.01$);与 M 组相比,LW 组 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 蛋白和 mRNA 表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),miR-210 mRNA 表达降低($P<0.05$),E-cadherin 蛋白表达升高($P<0.01$)。与 LV-miR-210 NC 组相比,LV-anti-miR-210 组 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 蛋白和 mRNA 表达降低($P<0.05$, $P<0.01$);与 LV-miR-210 NC 组相比,LV-miR-210 组 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 蛋白和 mRNA 表达升高($P<0.05$, $P<0.01$)。在慢病毒转染各组的基础上,加入 LWDHD 处理后,LWDHD 可降低各组 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 蛋白和 mRNA 表达($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 LWDHD 抗纤维化作用机制与其下调 miR-210/HIF-1 α 信号通路,抑制肾小管 EMT 有关。

〔关键词〕 肾纤维化;六味地黄汤;上皮间质转化;miR-210;缺氧诱导因子 1 α ;HK-2 细胞

〔中图分类号〕R259 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.04.007

Effects and mechanism of Liuwei Dihuang Decoction on CoCl₂-induced epithelial-mesenchymal transition of HK-2 cells through the miR-210/HIF-1 α signaling pathway

ZHANG Haiying, WANG Hui, PAN Jiajun, GAO Haibo, ZHAO Xinran, LIU Chunyan*, TANG Qun*
Medical College, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

〔Abstract〕 Objective To observe the effects and mechanism of Liuwei Dihuang Decoction (LWDHD) regulating epithelial mesenchymal transition (EMT) of HK-2 cells induced by CoCl₂ through miR-210/HIF-1 α signaling pathway. **Methods** HK-2 cells were cultured in vitro and divided into normal group (N group), model group (M group), LWDHD medicated serum group (LW group),

〔收稿日期〕2022-09-02

〔基金项目〕湖南省自然科学基金项目(2021JJ30506);湖南省教育厅项目(21A0242,20C1398);长沙市自然科学基金项目(kq2014089);湖南中医药大学研究生科研创新项目(2021CX32)。

〔第一作者〕张海英,女,硕士研究生,研究方向:肾纤维化病理机制及防治。

〔通信作者〕* 刘春燕,女,博士,副教授,E-mail:liuchunyan0221@126.com;唐 群,男,博士,教授,硕士研究生导师,E-mail:tangqun460@126.com。

blank serum+over-expressed miR-210 group (LV-miR-210 group), blank serum+silent miR-210 group (LV-anti-miR-210 group), blank serum+miR-210 negative group (LV-miR-210 NC group), LWDHD medicated serum+over-expressed miR-210 group (LW+LV-miR-210 group), LWDHD medicated serum+silent miR-210 group (LW+LV-anti-miR-210 group) and LWDHD medicated serum+miR-210 negative group (LW+LV-miR-210 NC group). Except for N group, the other groups were treated with CoCl_2 . CCK-8 was used to detect the effect of different concentrations of LWDHD and CoCl_2 on the activity of HK-2 cells after 24 hours, and the best intervention concentration was selected. Cell immunofluorescence and Western blot were used to determine hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1), β -catenin, Vimentin, and E-cadherin protein expression levels. miR-210, HIF-1 α , β -catenin and Vimentin mRNA expression levels were measured by qPCR. By lentivirus transfection of HK-2 cells, miR-210 was overexpressed and inhibited. Then CoCl_2 was added to the medium. The miR-210, HIF-1 α , β -catenin, Vimentin protein and mRNA expression of the regulation effect of LWDHD were observed. **Results** The CCK-8 showed that the optimal intervention concentrations of LWDHD and CoCl_2 were 10% and 200 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Compared with N group, the morphology of cells in group M changed from the shape of paving stone to the shape of long spindle. HIF-1 α , β -catenin, Vimentin protein and mRNA expression increased ($P<0.05$, $P<0.01$) while miR-210 mRNA expression increased ($P<0.01$) and E-cadherin protein expression decreased ($P<0.01$). Compared with M group, LW group can significantly reduce the expression of HIF-1 α , β -catenin, Vimentin protein and mRNA ($P<0.05$, $P<0.01$), down-regulate the expression of miR-210 mRNA ($P<0.05$) and up-regulate the expression of E-cadherin protein ($P<0.01$). Compared with the LV-miR-210 NC group, LV-anti-miR-210 group showed lower HIF-1 α , β -catenin, Vimentin protein and mRNA ($P<0.05$, $P<0.01$), and LV-miR-210 group showed higher HIF-1 α , β -catenin, Vimentin protein and mRNA ($P<0.05$, $P<0.01$). After LWDHD administration to each group of lentivirus transfection, HIF-1 α , β -catenin, Vimentin protein and mRNA expression decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** The anti-fibrosis mechanism of LWDHD is related to its down-regulation of miR-210/HIF-1 α signaling pathway, which is related to the inhibition of renal tubular EMT.

[**Keywords**] renal fibrosis; Liuwei Dihuang Decoction; epithelial-mesenchymal transition; miR-210; hypoxia inducible factor-1 α ; HK-2 cells; HK-2 cells

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)是世界范围内的公共卫生问题^[1]。CKD 的主要病理特征是肾纤维化(renal fibrosis, RF)。肾小管上皮间质转化(epithelial mesenchymal transdifferentiation, EMT)是 RF 的重要机制之一。由于治疗方法有限,CKD 患者的长期生存率和生活质量都很低。因此,如何有效预防 EMT 是肾脏疾病研究领域的焦点之一^[2]。CKD 早期普遍存在低氧,慢性低氧是导致 RF 的关键因素^[3]。目前研究已证实,低氧通过表达低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor, HIF-1 α)信号途径引起 RF,参与 EMT 过程^[4]。微小 RNA(micro RNA, miRNA)是一种功能性非编码 RNA,长度约 22 个核苷酸。低氧可诱导大量 miRNA 表达的变化,其中 miR-210 与 HIF-1 α 的关系最为密切^[5]。HIF-1 α 的累积促进 miR-210 表达的增加,而 miR-210 反过来可以通过抑制 HIF-1 α 的降解来增强其分子的稳定性^[6]。miR-210 可以参与体内各种生理和病理过程,例如细胞增殖^[7]、炎症损伤^[8]、EMT^[9]等。已经证实,miR-210 广泛存在于各种恶性肿瘤如乳腺癌、肝癌等,并参与 EMT 发生发展,导致恶性肿瘤细胞侵袭和转移^[10]。miR-210/HIF-1 α 通路促进 EMT 的发生可能是 RF

的重要发病机制。六味地黄汤(Liuwei Dihuang Decoction, LWDHD)是临床治疗 CKD 的有效方剂,但其有效机制尚未完全阐明^[11]。现代药理学研究发现,该方具有抗氧化、抗缺氧、抗纤维化的药理作用^[12]。本研究以 CoCl_2 诱导的 HK-2 细胞为研究对象,探讨 LWDHD 通过 miR-210/HIF-1 α 信号通路调控 EMT 的作用机制,以期为临床防治 CKD 提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞

雄性 SD 大鼠 34 只,体质量(200 \pm 20) g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号:SYXK(湘)2019-0009,所有动物饲养在湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心。HK-2(人肾皮质近曲肾小管上皮细胞)细胞株(批号:CL-0109,武汉普诺赛生命科技有限公司)。本研究由湖南中医药大学实验动物伦理委员会审查通过,审查批号:LLBH-202105100002。

1.2 主要试剂与仪器

CoCl_2 (批号:C118624,上海阿拉丁生化科技股

份有限公司);LV-hsa-miR-210 慢病毒、LV-hsa-miR-210-inhibition 慢病毒、阴性对照病毒CON137、嘌呤霉素(批号分别为:13462E6、13462E4、1343EAA、134635C,上海吉凯基因科技有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(批号:E-BC-K318,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);HIF-1 α 抗体、 β -联蛋白(β -catenin)抗体、波形蛋白(Vimentin)抗体、上皮钙黏素(E-cadherin)抗体、GAPDH 抗体(批号分别为:10002313、00069064、00103236、20000258、B2202101,武汉三鹰生物技术有限公司);PAGE 蛋白预制胶(批号:J67319002S,南京艾思易生物科技有限公司);总 RNA 快速抽提试剂盒(货号:Cat#220011,上海飞捷生物技术有限公司);miRNA 逆转录试剂盒、SYBR 扩增试剂盒(批号分别为:05231416、05227808,苏州近岸蛋白质科技股份有限公司)。miR-210 正向引物(货号:Cat#HmiRQP0317,广州复能基因有限公司)。

酶标仪(型号:Spark 20M,瑞士 Tecan 公司);化学发光成像分析仪(型号:721BR17573,美国 Bio-Rad 公司);正置荧光显微镜(型号:Axioscope,德国 Carl-Zeiss 公司);实时荧光定量 RCR 仪(型号:LightCycler 96,瑞士 Roche 公司)。

1.3 药物与含药血清制备

中药 LWDHD 配方:熟地黄、山药、山茱萸、泽泻、茯苓、牡丹皮(批号分别为:2012213、TH21092703、SX20180904、SX21093006、CK21092703、CK21100804)按照 8:4:4:3:3:3 比例配制,所有药材均购自湖南中医药大学第一附属医院。按照随机数字表将 34 只雄性 SD 大鼠分为 2 组:空白对照组、LWDHD 组,各 17 只。根据前期实验,LWDHD 组以每日 33.75 g/kg 六味地黄煎液灌胃(相当于 70 kg 成人剂量的 5 倍)^[3],空白对照组以每日 10 mL/kg 蒸馏水灌胃。适应性饲养 5 d,灌胃 7 d 后,收集血清,血清分装储存于-80 °C 冰箱内备用。

1.4 细胞分组

HK-2 细胞系,分为对照组(N 组)、模型组(M 组)、LWDHD 血清组(LW 组)、空白血清+miR-210 过表达组(LV-miR-210 组)、空白血清+miR-210 沉默组(LV-anti-miR-210 组)、空白血清+miR-210 阴性对照组(LV-miR-210 NC 组)、LWDHD 血清+miR-

210 过表达组(LW+LV-miR-210 组)、LWDHD 血清+miR-210 沉默组(LW+LV-anti-miR-210 组)、LWDHD 血清+miR-210 阴性对照组(LW+LV-miR-210 NC 组)。除 N 组外,其他组加入 CoCl₂ 模拟肾内缺氧环境,同时加入空白或含药血清,培养 24 h 后收集细胞。

1.5 细胞转染

接种体积:用完全培养基(10% FBS DMEM)制备密度 5×10^4 个/mL 细胞悬液,接种 5 mL 至 25 cm² 培养瓶中,37 °C 培养 16~24 h,至细胞汇合度为 20%~30%。感染体积:用完全培养基 5 mL,按说明书加入相应病毒量。病毒体积=(感染复数 \times 细胞数目)/病毒滴度,感染复数=10。37 °C 培养 12~16 h,更换为完全培养基,继续培养;中途可对细胞换液,保持细胞活性;感染后约 72 h,观察感染效率;将细胞继续培养于含有 1 μ g/mL 嘌呤霉素的培养基中进行稳定株筛选。

1.6 CCK-8 法筛选最佳血清及 CoCl₂ 干预浓度

细胞悬液密度 5×10^4 个/mL、100 μ L/孔接种在 96 孔板中,37 °C 培养 24 h;吸弃培养基,每孔分别加入 100 μ L 含有 0、2.5%、5%、10%、20% 浓度药物血清的培养基或 0、100、200、300、400、800 μ mol/L CoCl₂,干预 24 h 后取出 96 孔板;去旧培养液,加入 CCK-8 工作液,37 °C 继续孵育 2 h;450 nm 处测量光密度值,通过细胞存活率选择最佳的血清浓度和缺氧时间。

1.7 Western blot 法检测各组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin、E-cadherin 的蛋白水平

给药 24 h 后,收集蛋白,测定蛋白浓度;用 PAGE 预制胶分离并转移蛋白到 PVDF 膜;3%~5% 牛奶封闭 2 h;一抗 4 °C 孵育过夜[HIF-1 α (1:8000)、 β -catenin (1:5000)、Vimentin (1:5000)、E-cadherin (1:10000)、GAPDH(1:15000)];次日,TBST 洗膜 3 次,10 min/次,二抗(1:15000)孵育 2 h;ECL 检测蛋白条带;Image J 软件分析。

1.8 qPCR 法检测各组 HK-2 细胞中 miR-210、HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin mRNA 表达

给药 24 h 后,用总 RNA 快速抽提试剂盒提取总 RNA。根据试剂盒进行 RNA 逆转录和扩增。miR-210 正向引物购自广州复能基因有限公司,反向引

表 1 qPCR 目的基因引物序列

基因	正向引物	反向引物	长度/bp
HIF-1 α	GGAAACTTCTGGATGCTGGTG	TTCCTCGGCTAGTTAGGGTAC	330
β -catenin	GAAAGCAAGCTCATCATTC	GACAGCACCTTCAGCACTCT	116
Vimentin	GACGCCATCAACACCGAGTT	CTTTGTCGTTGTTAGCTGGT	160
β -actin	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	120
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTGCGT	94

物来自试剂盒,引物序列均未知。其余引物均购自擎科生物有限公司,序列详见表 1。相对定量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法,U6 或 β -actin 作为内参。

1.9 免疫荧光法检测各组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin、E-cadherin 蛋白水平

将细胞以 5×10^4 个/mL、1 mL/孔密度接种于 24 孔板爬片中;培养 24 h,待细胞生长至 80%后进行分组造模;每孔加适量 4% 多聚甲醛进行细胞固定 15 min;0.1% 曲拉通通透 10 min;5% BSA 封闭 30 min;一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜[HIF-1 α (1:500)、 β -catenin (1:500)、Vimentin (1:400)、E-cadherin (1:200)];次日,室温静置 30 min;荧光二抗 (1:200) 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h;DAPI 染核 2 min,以上每个步骤间使用 TBST 清洗 3 次,5 min/次;抗荧光淬灭剂封片;正置荧光显微镜下观察、拍照。

1.10 统计方法

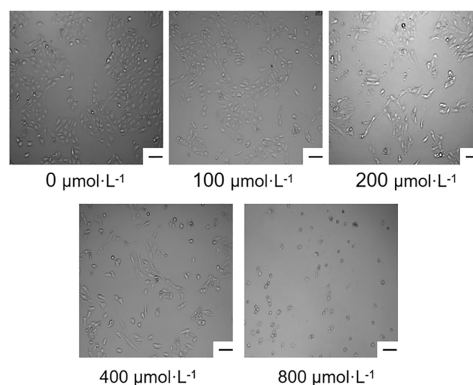
运用 SPSS 25.0 软件进行数据分析。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,先进行正态性和方差齐性检验,满足正态性时,采用单因素方差分析,组间比较若方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐时用 Kruskal-Wallis 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

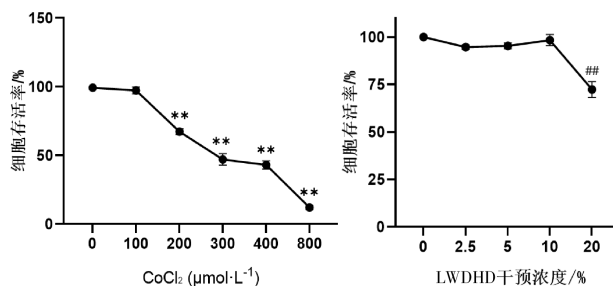
2.1 LWDHD 可减弱 CoCl₂ 对 HK-2 细胞的影响

培养 24 h 后,随着 CoCl₂ 刺激剂量增加后,细胞从铺路石到长梭形的形态学变化明显,甚至大量死亡。详见图 1。与 0 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ 组比较,200、300、400、800 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ 组显著降低了细胞活力 ($P < 0.01$),而 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ 组无明显变化 ($P > 0.05$)。因此,在随后实验中,CoCl₂ 的剂量为 200 $\mu\text{mol/L}$ 。增加 LWDHD 剂量作用于 HK-2 细胞后,与 0 LWDHD 组相比,20% LWDHD 组细胞活力明显降低 ($P < 0.01$),

2.5%、5%、10% LWDHD 组无明显变化 ($P > 0.05$)。因此,后续实验 LWDHD 浓度选用 10%。详见图 2。与 N 组比较,M 组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 蛋白和 mRNA 表达增加 ($P < 0.01$),E-cadherin 蛋白表达降低 ($P < 0.01$),CoCl₂ 成功诱导 HK-2 细胞 EMT;与 M 组比较,LW 组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 蛋白和 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),E-cadherin 蛋白表达增加 ($P < 0.01$)。详见图 3、表 2—3。免疫荧光结果证实 CoCl₂ 诱导缺氧 24 h 后 HK-2 细胞 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 高表达,阳性信号分别定位于细胞核、细胞膜、细胞膜;E-cadherin 低表达,阳性信号定位于细胞质。详见图 4。

图 1 不同 CoCl₂ 浓度下 HK-2 细胞形态变化 ($\times 100$)

注:比例尺 100 μm 。

图 2 不同 CoCl₂、LWDHD 浓度对 HK-2 细胞存活率的影响

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ 组比较, $**P < 0.01$;与 0 LWDHD 组比较, $\#P < 0.01$ 。

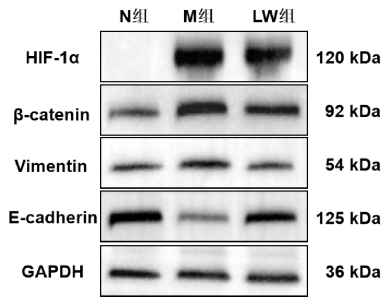


图3 各组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、EMT 相关蛋白表达水平

表2 各组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin、E-cadherin 蛋白水平($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	HIF-1 α	β -catenin	Vimentin	E-cadherin
N 组	0.07 \pm 0.01	1.03 \pm 0.11	0.53 \pm 0.15	1.40 \pm 0.14
M 组	1.25 \pm 0.10**	1.73 \pm 0.30**	1.17 \pm 0.06**	0.61 \pm 0.20**
LW 组	1.00 \pm 0.05 [#]	1.30 \pm 0.20 [#]	0.76 \pm 0.20 [#]	1.11 \pm 0.09 ^{##}

注:与 N 组比较,** $P<0.01$;与 M 组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

表3 各组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin mRNA 表达($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	HIF-1 α	β -catenin	Vimentin
N 组	0.41 \pm 0.14	0.22 \pm 0.07	0.58 \pm 0.06
M 组	1**	1**	1**
LW 组	0.57 \pm 0.13 [#]	0.63 \pm 0.07 ^{##}	0.66 \pm 0.05 ^{##}

注:与 N 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 M 组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

2.2 LWDHD 下调 CoCl₂ 处理的 HK-2 细胞中 miR-210 的表达

与 N 组比较,M 组 HK-2 细胞中 miRNA-210

表达水平增加($P<0.01$);与 M 组比较,LW 组 HK-2 细胞中 miR-210 表达水平降低($P<0.05$)。详见图 5。

2.3 LWDHD 通过下调 miR-210 减轻 HK-2 细胞 EMT

细胞转染后,LV-miR-210 组 HK-2 细胞中 miR-210 水平高于 LV-miR-210 NC 组($P<0.05$),而 LV-anti-miR-210 组 miR-210 水平显著低于 LV-miR-210 NC 组($P<0.01$),慢病毒转染成功。详见图 6。与 LV-miR-210 NC 组比较,LV-miR-210 组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 蛋白和 mRNA 表达增加($P<0.05, P<0.01$);与 LV-miR-210 NC 组比较,LV-miR-210 组 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 蛋白和 mRNA 表达升高($P<0.05, P<0.01$),抑制 miR-210 的表达可抑制 EMT。与上述 3 组比较,在此基础上加 LWDHD 的 3 组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 蛋白和 mRNA 表达水平降低($P<0.05, P<0.01$),LWDHD 可通过下调 miR-210/HIF-1 α 表达,抑制 EMT。免疫荧光结果显示:与 LV-miR-210 NC 组比较,LV-miR-210 组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 高表达,E-cadherin 低表达;反之,LV-anti-miR-210 组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 低表达,E-cadherin 高表达。与上述 3 组比较,在此基础上加 LWDHD 的 3 组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 低表达,E-cadherin 高表达。详见图 7—8,表 4—5。

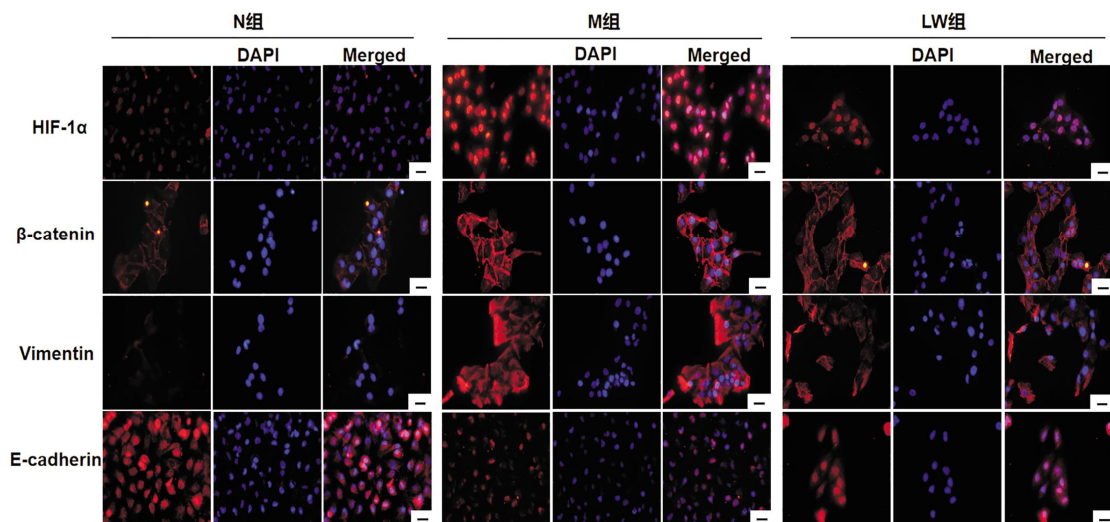


图4 免疫荧光法检测各组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin、E-cadherin 的蛋白水平($\times 400$)

注:红色代表蛋白表达,蓝色代表细胞核;比例尺 20 μm 。

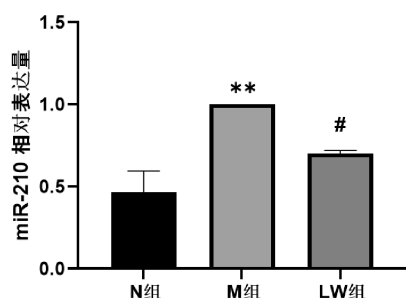


图5 各组 HK-2 细胞中 miR-210 相对表达量

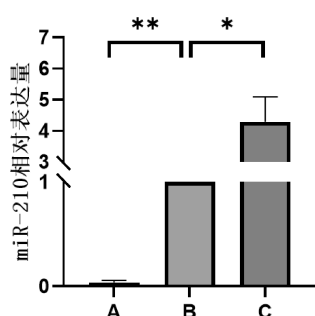
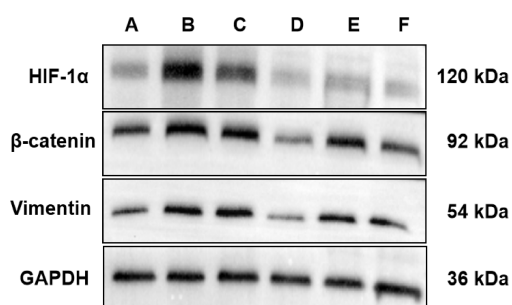
注:与 N 组比较, ** $P<0.01$;与 M 组比较, # $P<0.05$ 。

图6 各组 HK-2 细胞中 miR-210 相对表达量

注:A. LV-anti-miR-210 组;B. LV-miR-210 NC 组;C. LV-miR-210 组。与 LV-miR-210 NC 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。图7 各组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 蛋白水平

注:A. LV-anti-miR-210 组;B. LV-miR-210 组;C. LV-miR-210 NC 组;D. LW+LV-anti-miR-210 组;E. LW+LV-miR-210 组;F. LW+LV-miR-210 NC 组。

表4 各组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 蛋白水平 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	HIF-1 α	β -catenin	Vimentin
LV-anti-miR-210 组	0.82 \pm 0.23*	0.94 \pm 0.13*	0.89 \pm 0.13*
LV-miR-210 组	1.47 \pm 0.16*	1.35 \pm 0.28*	1.88 \pm 0.28*
LV-miR-210 NC 组	0.93 \pm 0.20	1.19 \pm 0.22	1.58 \pm 0.34
LW+LV-anti-miR-210 组	0.36 \pm 0.16#	0.62 \pm 0.02#	0.45 \pm 0.07#
LW+LV-miR-210 组	0.53 \pm 0.16 $\&$	1.23 \pm 0.27 $\&$	1.14 \pm 0.28 $\&$
LW+LV-miR-210 NC 组	0.44 \pm 0.18*	0.70 \pm 0.04*	0.78 \pm 0.16*

注:与 LV-miR-210 NC 组比较, * $P<0.05$;与 LV-anti-miR-210 组比较, # $P<0.05$;与 LV-miR-210 组比较, $\&$ $P<0.05$ 。表5 各组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin mRNA 表达 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	HIF-1 α	β -catenin	Vimentin
LV-anti-miR-210 组	0.48 \pm 0.07*	0.53 \pm 0.13*	0.64 \pm 0.02**
LV-miR-210 组	1.46 \pm 0.02**	1.75 \pm 0.13**	1.70 \pm 0.12**
LV-miR-210 NC 组	1	1	1
LW+LV-anti-miR-210 组	0.25 \pm 0.04#	0.19 \pm 0.03#	0.22 \pm 0.02#
LW+LV-miR-210 组	0.83 \pm 0.02 $\&$	1.27 \pm 0.25 $\&$	1.05 \pm 0.11 $\&$
LW+LV-miR-210 NC 组	0.43 \pm 0.14*	0.69 \pm 0.10*	0.49 \pm 0.05*

注:与 LV-miR-210 NC 组, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 LV-anti-miR-210 组比较, # $P<0.05$;与 LV-miR-210 组比较, $\&$ $P<0.05$ 。

3 讨论

LWDHD 为北宋时期钱乙所创制,收录于《小儿药证直诀》,由熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓组成,具有三补三泻的特点。熟地黄滋阴补肾,山茱萸补养肝肾,山药补益脾阴,为“三补”;泽泻利湿泄肾浊,牡丹皮清泻虚热,茯苓淡渗脾湿,为“三泻”。中医学认为,气和血关系密切,气行则血行,气滞则血瘀,因此,肾气虚可导致血瘀,进而引致肾内缺氧。熟地黄、山茱萸、山药能调节免疫系统的功能,提高机体抗氧化能力,改善肾气虚,纠正肾内缺氧。泽泻、牡丹皮、茯苓具有活血散瘀、渗湿利水泻热功效。LWDHD 是目前临床治疗 CKD 的有效方剂^[4]。

近期研究证实,miR-210 是一种重要的低氧相关 miRNA,其茎-环结构位于染色体 11p15.5 上 AK123483 基因转录的内含子中,受缺氧诱导因子调节,后者参与 EMT 的调节,导致恶性肿瘤细胞的侵袭和转移^[15-16]。反过来,miR-210 表达增加也可以促进 HIF-1 α 表达。Vimentin 是肌成纤维细胞的标志性蛋白。E-cadherin 是上皮细胞的标志性蛋白,参与形成和维护细胞间的连接。HIF-1 α 的下游调控因子 β -catenin 在调节细胞增殖和分化中起重要作用。在正常情况下, β -catenin 参与 E-cadherin 与肌动蛋白的连接,促进诱导 EMT 的基因转录。HIF-1 α 对 EMT 的调节作用部分受 β -catenin 的调控^[17]。

EMT 引起肾间质纤维化,最终导致肾损伤。CoCl₂ 是一种常用的化学缺氧诱导剂,已广泛用作 EMT 和缺氧损伤诱导剂^[18-20]。本研究使用 CoCl₂ 在 HK-2 细胞中构建 EMT 模型,模拟 RF 的病理过程。结果显

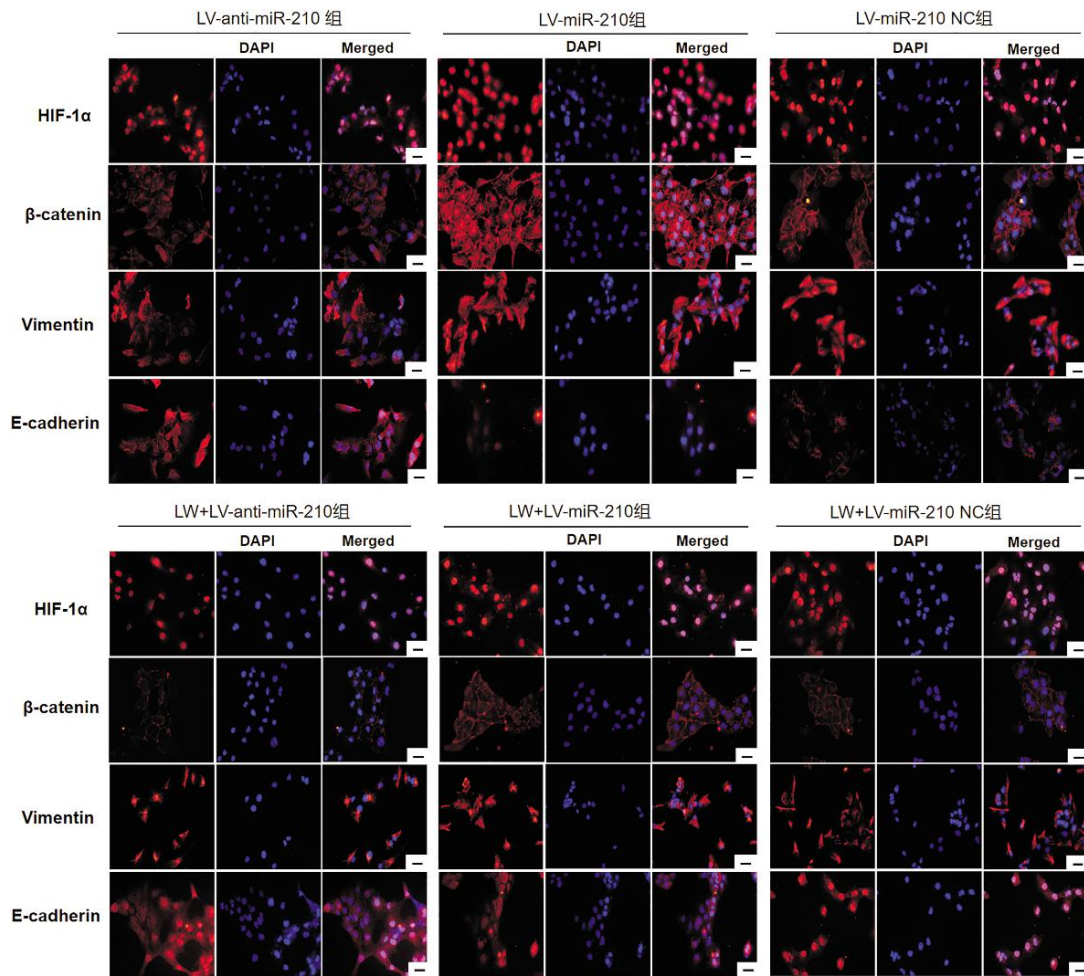


图8 免疫荧光法检测各组 HK-2 细胞中 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin、E-cadherin 的蛋白水平($\times 400$)

注:红色代表蛋白表达,蓝色代表细胞核;比例尺 20 μm 。

示, CoCl_2 降低了细胞活力, 诱导 EMT 间质标记物 Vimentin 表达升高 ($P < 0.01$), 上皮标志物 E-cadherin 表达降低 ($P < 0.01$), HIF-1 α 、 β -catenin 表达降低 ($P < 0.01$), 表明 EMT 模型构建成功。在此基础上, 进一步研究 LWDHD 对 CoCl_2 诱导的 HK-2 细胞 EMT 的影响。以往主要通过 TGF- β /Smad 途径研究 LWDHD 对 RF 的影响。例如, 有研究表明在糖尿病肾病大鼠中, 六味地黄丸通过抑制 TGF- β 诱导的 Smad2 磷酸化和 α -SMA 的表达来保护肾小球系膜细胞并预防 RF^[21]。本课题组前期研究已证实, LWDHD 可以上调 5/6 肾切除大鼠肾组织中 E-cadherin 的表达, 并下调 HIF-1 α 和 Twist 的表达, 从而延缓 RF^[22]。本研究结果显示: LWDHD 可减轻 CoCl_2 对 HK-2 细胞的影响, 表现为 EMT 间质标记物 Vimentin 表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 上皮标志物 E-cadherin 表达升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), HIF-1 α 、 β -catenin 表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。随后检测 miR-

210 在 HK-2 细胞中的表达水平, CoCl_2 诱导条件下 miR-210 表达水平升高 ($P < 0.01$), 经 LWDHD 处理后, miR-210 表达水平降低 ($P < 0.05$)。进一步通过转染 miR-210 抑制、过表达、空载体慢病毒, 实验结果表明, 抑制 miR-210 可降低 CoCl_2 诱导的 HK-2 细胞 EMT, 反之, 过表达 miR-210 则加重 EMT。在慢病毒转染各组的基础上, 加入 LWDHD 处理后, LWDHD 可降低各组 HIF-1 α 、 β -catenin、Vimentin 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。上述结果说明, miR-210/HIF-1 α 信号通路可促进 EMT 的发生发展, 而 LWDHD 可抑制 miR-210 的表达, 提示 LWDHD 可能通过调节 miR-210 调控 EMT。

综上所述, LWDHD 能显著提高 CoCl_2 处理的 HK-2 细胞的存活率, 并改善 EMT; 在 CoCl_2 诱导的 HK-2 细胞中, miR-210 高表达, LWDHD 可下调 miR-210/HIF-1 α 信号通路, 进而抑制肾小管 EMT, 从而延缓 RF。

参考文献

- [1] KIBRIA G M A, CRISPEN R. Prevalence and trends of chronic kidney disease and its risk factors among US adults: An analysis of NHANES 2003–18[J]. *Preventive Medicine Reports*, 2020, 20: 101193.
- [2] PANIZO S, MARTÍNEZ-ARIAS L, ALONSO-MONTES C, et al. Fibrosis in chronic kidney disease: Pathogenesis and consequences[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(1): 408.
- [3] LEE P, CHANDEL N S, SIMON M C. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020, 21(5): 268–283.
- [4] 李姗姗,孙倩,杨少宁,等.中医药基于 HIF-1 α 信号通路调节肾间质纤维化[J].*现代中西医结合杂志*,2022,31(10):1450–1454.
- [5] 王加豪.益气温阳活血法治疗特发性肺纤维化的临床效应及其调控 miR-210-3P 表达的实验研究[D].济南:山东中医药大学,2021.
- [6] 杜洁,陈艳梅,丁丽敏,等.血清 miR-210、HIF-1 α 水平变化与急性脑梗死患者神经功能缺损评分的相关性[J].*中国卫生工程学*, 2021,20(5):818–820.
- [7] WEI N, SONG H B. Circ-0002814 participates in proliferation and migration through miR-210 and FUS/VEGF pathway of preeclampsia[J]. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2022, 48(7): 1698–1709.
- [8] ZHANG J T, HE J G, LUO Y M, et al. MiR-210 regulates the inflammation of otitis media with effusion by inhibiting the expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 534: 401–407.
- [9] RONGLI, WANG. MicroRNA-210/Long non-coding RNA MEG3 axis inhibits trophoblast cell migration and invasion by suppressing EMT process[J]. *Placenta*, 2021, 109: 64–71.
- [10] BOUKROUT N, SOUIDI M, LAHDAOUI F, et al. Antagonistic roles of the tumor suppressor miR-210-3p and oncomiR MUC4 forming a negative feedback loop in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Cancers*, 2021, 13(24): 6197.
- [11] LIAO T T, ZHAO K N, HUANG Q, et al. A randomized controlled clinical trial study protocol of Liuwei Dihuang pills in the adjuvant treatment of diabetic kidney disease[J]. *Medicine*, 2020, 99(31): e21137.
- [12] SUN X Y, WU B, GENG L G, et al. Xiaokang Liuwei Dihuang Decoction ameliorates the immune infertility of male rats induced by lipopolysaccharide through regulating the levels of sex hormones, reactive oxygen species, pro-apoptotic and immune factors[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapie*, 2021, 139: 111514.
- [13] 王茜,成细华,刘春燕,等.六味地黄汤含药血清对 CoCl₂ 诱导 HK-2 细胞后 E-cadherin、 α -SMA 表达的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2022,42(4):557–563.
- [14] 詹苏欣.六味地黄汤联合参苓白术散治疗慢性肾衰竭的临床效果[J].*中外医学研究*,2022,20(10):9–12.
- [15] DONG B, LI S Y, ZHU S L, et al. MiRNA-mediated EMT and CSCs in cancer chemoresistance[J]. *Experimental Hematology & Oncology*, 2021, 10(1): 1–12.
- [16] RAHMATI M, FERNS G A, MOBARRA N. The lower expression of circulating miR-210 and elevated serum levels of HIF-1 α in ischemic stroke: Possible markers for diagnosis and disease prediction[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2021, 35(12): e24073.
- [17] 杜江.阿托伐他汀通过降低 HIF-1 α / β -catenin 表达抑制百草枯中毒致上皮-间质转化[D].南京:南京医科大学,2018.
- [18] KANG M K, KIM S I, OH S Y, et al. Tangeretin ameliorates glucose-induced podocyte injury through blocking epithelial to mesenchymal transition caused by oxidative stress and hypoxia[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(22): 8577.
- [19] GE H, LIU J, LIU F X, et al. Long non-coding RNA ROR mitigates cobalt chloride-induced hypoxia injury through regulation of miR-145[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2019, 47(1): 2221–2229.
- [20] MUÑOZ-SÁNCHEZ J, CHÁNEZ-CÁRDENAS M E. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2019, 39(4): 556–570.
- [21] XU Z J, SHU S, LI Z J, et al. Liuwei Dihuang pill treats diabetic nephropathy in rats by inhibiting of TGF- β /SMADS, MAPK, and NF- κ B and upregulating expression of cytoglobin in renal tissues[J]. *Medicine*, 2017, 96(3): e5879.
- [22] 董翔,胡爽,王茜,等.六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠肾脏缺氧诱导因子-1 α 及 Twist 和 E-cadherin 表达的影响[J].*北京中医药大学学报*,2020,43(11):927–934.

(本文编辑 黎志清)