

HIF-VEGF-Notch 信号通路相关因子在类马蹄内翻足胎鼠的孕鼠胎盘中的表达变化

韩国栋, 杨 涛, 郑朋飞, 江 波, 楼 跃

(南京医科大学附属南京儿童医院骨科, 江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:探讨全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)诱导的类马蹄内翻足胎鼠的孕鼠胎盘中 HIF-VEGF-Notch 信号通路相关因子的表达变化。方法:20 只 SD 孕鼠随机分为 ATRA 诱导组(A 组)和对照组(B 组),每组 10 只。孕 20 d,经剖宫产取出新鲜胎盘组织,采用 RT-PCR 法检测缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth, VEGF)、Notch1 mRNA 的变化,采用 Western blot 方法检测 HIF-1、VEGF、Notch1 蛋白的表达变化。结果:与 B 组相比,A 组 VEGF 的 mRNA 和蛋白表达水平降低,而 HIF-1 和 Notch1 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高。结论:HIF-VEGF-Notch 信号通路相关因子的改变可能与马蹄内翻足的发生有相关性。

[关键词] HIF-VEGF-Notch 信号通路;类马蹄内翻足;胎盘

[中图分类号] Q344.13

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2016)08-964-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20160814

先天性马蹄内翻足(congenital clubfoot, CCF)是一种严重危害儿童身心健康的常见先天性畸形,全球每年约有 15 万新生婴儿患病,给社会和家庭带来沉重负担^[1]。多年来全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)诱导的类马蹄内翻足胎鼠模型一直被用于研究先天性马蹄内翻足的发病机制。有学者在研究中发现,ATRA 诱导的类马蹄内翻足胎鼠胎盘组织出现细胞异常凋亡,以合体滋养细胞为主,表现为细胞核固缩,核内染色质聚集于核膜或凝集成致密块状。同时,胎盘重量明显减轻,胎盘血管数目减少,血管壁增粗增厚,部分血管闭塞,毛细血管袢数目及长度增加,无效腔增多,影响了胎盘的血液供应^[2-3]。但在其发病机制的研究中,胎盘血管因素尚无相关报道。已知 HIF-VEGF-Notch 信号通路促进血管内皮细胞的增殖、迁移、动静脉分化等,对血管生成的调控发挥了重要作用^[4]。本研究拟通过检测 HIF-VEGF-Notch 信号通路相关因子在类马蹄内翻足胎鼠的孕鼠胎盘中的表达变化,探讨其与先天性马蹄内翻足可能的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

动物 Sprague-Dawley(SD)大鼠(南京医科大学动物试验中心),体重 240~260 g,按雌雄 1:1 夜晚合笼,于次日晨经托盘法查找阴栓,发现阴栓定为孕 0 d,后

分笼饲养,并记录妊娠天数。共获妊娠鼠 20 只,孕 10 d 随机分为实验组(A 组)和对照组(B 组),每组 10 只。实验过程动物的处置参照 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准。

ATRA(Sigma 公司,美国),TRIzol(Invitrogen 公司,美国),SYBR Green 荧光定量 PCR Mix(Roche 公司,美国),操作步骤均按试剂盒说明书要求进行。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立及分组

将孕 SD 大鼠随机分为 2 组,每组 10 只,于孕 10 d 给予以下处理。实验组(A 组):灌胃针注入溶于 2 mL 矿物油的 ATRA(剂量为 120 mg/kg)1 次^[5],给予普通水和饲料喂养;对照组(B 组):灌胃针注入同等剂量的矿物油 1 次,同样予普通水和饲料喂养。孕鼠均于孕 20 d 经剖宫产取新鲜胎盘组织。

1.2.2 RT-PCR 检测相关基因的表达量

按照 TRIzol 试剂盒的说明提取总 RNA,用紫外分光光度仪测定 RNA 的纯度和浓度。参照 NCBI GenBank 数据库设计缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth, VEGF)和 Notch1 的引物序列,由上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。参照试剂盒说明进行 RT-PCR 反应,通过 SDS2.3 软件记录循环阈值(Ct 值),根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因的相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
HIF-1	上游: TGAACATCAAGTCAGCAACG
	下游: CACAAATCAGCACCAAGCAC
VEGF	上游: GAAGCTCATCTCTCCTATGTGCTGGC
	下游: CCTGGTGGACATCTCCAGGAGTACC
Notch1	上游: GACCGTGTGGCTTCCTTCTA
	下游: GTTGGTGTCCAGTTGGAG
GAPDH	上游: GGGGCTCTCTGCTCCTCCCTG
	下游: AGGCGTCCGATACGGCCAAA

1.2.3 Western blot 检测 HIF-1、VEGF 和 Notch1 的蛋白含量

取新鲜的胎盘组织,重量约 50 mg,匀浆器在冰浴中将组织研磨成浆,EP 管内加入组织蛋白提取液,于冰上放置 10 min,将 EP 管离心 30 min (1 000 r/min,4℃),离心后取上清液,经 BCA 法蛋白定量。各组取等量蛋白约 50 μg,与 5×上样缓冲液(体积比为 1:4)混匀,煮沸,经过电泳、转膜、封膜、抗体孵育后于凝胶成像仪中显影成像。最后用 Image J 软件对图像进行分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,所有实验数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义,采用 GraphPad Prism5.0 软件绘图。

2 结果

2.1 一般情况

10 只 B 组 SD 孕鼠共获得胎鼠 122 只,未见畸形。10 只 A 组 SD 孕鼠中有 1 只在灌胃 2 d 后死亡。剩余 9 只孕鼠共获胎鼠 78 只,出现类马蹄内翻足畸形的有 42 只,类马蹄内翻足畸形出现的概率为 52.8%。

2.2 RT-PCR 检测 HIF-1、VEGF 和 Notch1 基因表达量

与 B 组相比,A 组 VEGF mRNA 表达减少,HIF-1 mRNA 表达增加($P < 0.05$),Notch1 mRNA 表达增加($P < 0.05$,图 1)。

2.3 Western blot 检测 VEGF、HIF-1 和 Notch1 的蛋白含量

与 B 组相比,A 组 VEGF 蛋白表达减少,HIF-1、Notch1 蛋白表达增加($P < 0.05$,图 2)。

3 讨论

先天性马蹄内翻足的病因至今仍未完全明确,

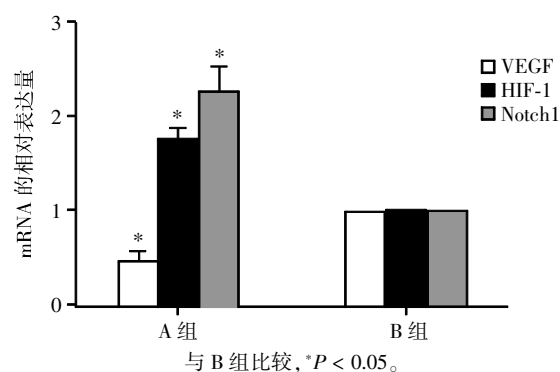


图 1 HIF-1、VEGF 和 Notch1 基因表达量

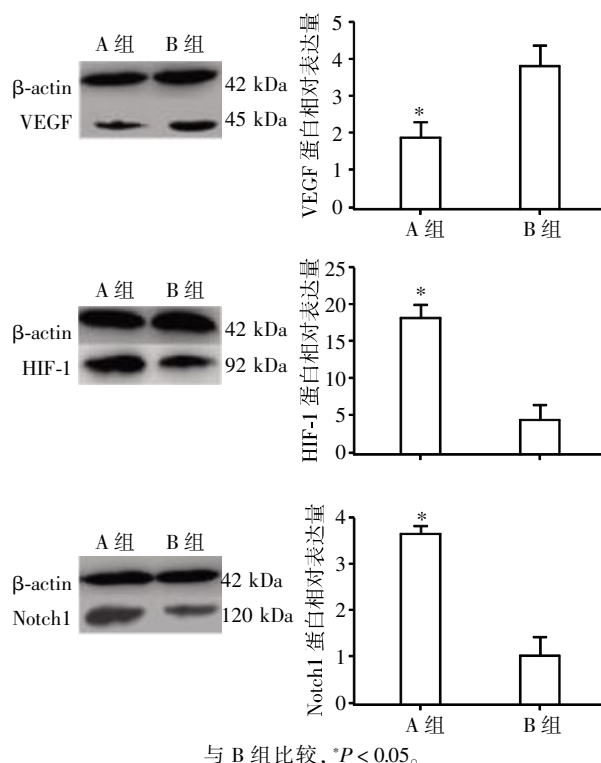


图 2 Western blot 检测 VEGF、HIF-1 和 Notch1 的蛋白表达量

其病因可能包括神经病变、肌肉异常、血管异常、遗传因素、宫内发育阻滞等多种因素。目前,研究较多的是神经肌肉因素,而胎盘血管因素鲜有报道。胎盘是维持胎儿宫内营养和生长发育的重要器官,在胚胎植入、妊娠成功及维持妊娠的过程中,胎盘的正常发育都发挥着至关重要的作用。胎盘功能障碍将导致胎儿生长受限、畸形的发生^[6]。胎盘血管作为胎盘和胎儿血液供应的通道,在胎盘发育过程中占据相当的地位。近年来,HIF-VEGF-Notch 通路作为介导血管生成的重要信号通路,在各医学领域成为研究的热点,但在胎盘血管方面报道较少。

本研究发现,与对照组相比,ATRA 诱导的实验组胎盘的 VEGF 的表达降低,而 HIF-1 和 Notch1 的

表达升高。VEGF 在血管新生中的作用主要是 VEGF 的受体和配体结合后,促进血管内皮分裂、增殖、诱导新生血管的形成^[7]。VEGF 表达下调,影响了滋养细胞的分化和植入能力等,导致胎盘植入过浅,随着妊娠进展,胎盘灌注不足,胎盘缺血缺氧,进一步损伤血管内皮。这一过程抑制了胎盘血管的新生,造成胎盘组织缺血缺氧。而 HIF-1 在机体处于缺氧状态时具有特异敏感性,它是根据组织缺血、缺氧后细胞内氧浓度的变化而变化^[8]。当胎盘处于缺血缺氧状态时,HIF-1 α 与 β 形成稳定的二聚体,进一步介导对缺氧敏感的下游基因,这其中也包括 VEGF,使胎盘组织对缺氧产生耐受和适应。Notch 信号通路和 VEGF 信号通路,两者在调控血管新生的过程中存在着密切关系。VEGF 与其受体结合后,引起 Notch 信号通路配体 Dll4 的表达,Dll4 与 Notch1/4 相结合后激活 Notch 信号通路下游靶基因的转录,从而促进细胞增殖、分化、血管内皮细胞的迁移以及动静脉的分化^[9-10]。本研究发现,HIF-1、Notch1 表达升高,这与许多学者有关血管新生的研究结果一致。然而本研究观察到 HIF-1、Notch1 表达增高的同时,伴随着 VEGF 表达水平降低,这与胎盘缺血缺氧的学说相矛盾,因为 VEGF 是 HIF-1 的下游基因,HIF-1 的表达可以激活 VEGF 的转录^[11-12]。笔者分析这种表达负相关产生的原因可能有:①慢性缺氧状态下 HIF-1 持续高表达,而 ATRA 诱导的类马蹄内翻足胎鼠的 HIF-1 调节存在感知障碍,反而抑制了 VEGF 的分泌^[13];②HIF-1 存在多种下游基因,VEGF 的生成与其他因子相拮抗;③其他基因等综合因素对 VEGF 的影响,比如 Zhou^[14]的研究表明,HIF-1 α 的升高常伴 P53 基因表达上调,而 P53 基因可促使胎盘细胞凋亡,妨碍血管的修复,抑制 VEGF 的生成。血管新生是多因子、多通路共同参与的复杂生理过程,其间的相互作用与关系有待进一步研究。

综上所述,胎盘功能障碍将导致胎儿生长受限、畸形的发生已被许多学者证实^[6]。本研究通过检测 HIF-1、Notch1、VEGF 在 ATRA 诱导的类马蹄内翻足胎鼠胎盘和正常胎鼠胎盘中的不同表达,提示了其先天性马蹄内翻足的发病可能具有相关性。

[参考文献]

[1] Evans AM, Van Thanh D. A review of the Ponseti method

and development of an infant clubfoot program in Vietnam [J]. *J Am Podiatr Med Assoc*,2009,99 (4):306-316

- [2] 刘媛,高鹏,谢英博,等. 胎盘细胞凋亡与胎儿生长受限关系的研究[J]. *中华妇产科杂志*,2002,37(12):721-722
- [3] Jiang B, Zhang Z, Zheng P, et al. Apoptotic genes expression in placenta of clubfoot-like fetus pregnant rats [J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2014,7(2):677-684
- [4] Luttun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to treatment [J]. *Trends Cardiovasc Med*,2002,12(2):88-96
- [5] Delgado-Baeza E, Santos-Alvarez I, Martos-Rodríguez A. Retinoic acid-induced clubfoot-like deformity: pathoanatomy in rat fetuses [J]. *J Pediatr Orthop B*,1999,8(1):12-18
- [6] Park CB, Demayo FJ, Lydon JP, et al. NODAL in the uterus is necessary for proper placental development and maintenance of pregnancy [J]. *Biol Reprod*,2012,86(6):194
- [7] Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis [J]. *J Clin Oncol*,2005,23(5):1011-1027
- [8] Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*,1999,15:551-578
- [9] Hellström M, Phng LK, Hofmann JJ, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis [J]. *Nature*,2007,445(7129):776-780
- [10] Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, et al. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo [J]. *Nature*,2006,442(714):823-826
- [11] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system [J]. *Nat Med*,2003,9(6):677-684
- [12] Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Protein kinases and the hypoxia-inducible factor-1, two switches in angiogenesis [J]. *Curr Pharm Des*,2003,9(7):531-541
- [13] 钱小泉,宋艳萍,王丽琴,等. 血管内皮生长因子和缺氧诱导因子-1 α 在妊娠高血压综合征患者胎盘组织中的表达 [J]. *生殖与避孕*,2014,34(8):628-632
- [14] Zhou J. Tumor hypoxia and cancer progression [J]. *Cancer Lett*,2006,237(1):10-21

[收稿日期] 2015-12-13