



doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2014.04.007
http://www.lcbl.net/articles/516

· 论 著 ·

新生儿缺氧缺血性脑病患儿血液中血管内皮生长因子和 miR-125b 表达水平及相关性研究

黄群, 谭丹凤, 马敏, 黄广文, 龙小兰, 吴虹

(湖南省妇幼保健院儿童保健科, 长沙 410008)

[摘要] 目的: 探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和miR-125b在新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)患儿和正常新生儿血液中表达水平及相关性。方法: 收集20例正常新生儿和20例HIE患儿血液标本, 分离血浆和外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 利用real-time PCR检测PBMC中miR-125b表达, ELISA方法检测血浆中VEGF含量。结果: 与正常对照组相比, HIE患儿PBMC中miR-125b表达显著降低($P=0.00002$), 而血浆中VEGF水平显著升高($P=6.26\times 10^{-8}$); 同时在正常组中, miR-125b表达与VEGF水平无相关性($r=0.016$, $P=0.946$, $n=20$), 但在HIE组($r=-0.505$, $P=0.023$, $n=20$)二者却呈显著负相关。结论: 新生儿脑缺血缺氧时可能通过降低miR-125b表达从而升高VEGF表达。

[关键词] 新生儿缺氧缺血性脑病; 微小RNA; 血管内皮生长因子

Relationship between vascular endothelial growth factor and miR-125b in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy

HUANG Qun, TAN Danfeng, MA Min, HUANG Guangwen, LONG Xiaolan, WU Hong

(Department of Child Care, Maternal and Child Health Hospital of Hunan Province, Changsha 410008, China)

Abstract **Objective:** To explore the expression and correlation between vascular endothelial growth factor (VEGF) and miR-125b in healthy and hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) neonatus. **Methods:** A total of 20 controls and 20 HIE samples were recruited in this study, plasma and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) were prepared for detecting the miR-125b expression and VEGF concentration using real-time PCR and ELISA kit, respectively. **Result:** Compared with controls, miR-125b expression in PBMC was significantly decreased ($P=0.00002$) but VEGF concentration in plasma was increased in HIE group ($P=6.26\times 10^{-8}$). Meanwhile, there was no significant correlation between miR-125b expression and VEGF level in controls ($r=0.016$, $P=0.946$,

$n=20$). However, significant correlation was observed in HIE group ($r=-0.505$, $P=0.023$, $n=20$). **Conclusion:** The VEGF level was increased possibly due to the down-regulation of miR-125b in HIE neonatus.

Key words hypoxic-ischemic encephalopathy; microRNA; vascular endothelial growth factor

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是指继发于围产期缺氧和窒息的缺氧缺血性脑损伤,临床上主要表现为肌张力和原始反射异常、意识水平改变和经常性抽搐等^[1]。HIE仍然是新生儿死亡的常见病因,并且很容易发展成严重的神经系统疾病如癫痫、智力迟钝和大脑性麻痹等^[2]。大量的研究已鉴定出众多与HIE发生发展相关的分子标志物,包括S100钙结合蛋白B(S100 calcium-binding protein B, S100B)、神经原特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、白介素6(interleukin-6, IL-6)、血清脑型肌酸磷酸激酶(serum creatinine phosphokinase BB, CPK-BB)、胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、人磷酸化神经丝H(pNF-H)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF或VEGFA)等^[3-4],其中VEGF被认为是最强的促血管生成因子,它不仅促进毛细血管增生,而且还能促进毛细血管成熟、抑制其凋亡。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长约20 nt左右的内源性非编码小RNA,以碱基互补配对方式在翻译水平上对靶基因进行调控。研究表明,miR-125b是一种与血管生成相关的miRNA,生物信息学分析发现VEGF 3'非编码区(untranslated region, UTR)存在miR-125b的结合位点,它通过抑制VEGF的表达,从而抑制胆管上皮细胞的增殖^[5]。目前研究已发现VEGF与HIE相关,但是关于miRNA与HIE相关研究稀少,因此本研究旨在探讨miR-125b和VEGF在HIE患儿中表达水平变化及其相关性,为阐明HIE的发病机制和寻找新的防治方法提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 样本收集

本研究所需新生儿血液标本均来自湖南省妇幼保健院2013年1月至2013年12月新生儿病房和产房的足月新生儿,并且本研究已通过本院伦理委员会批准,HIE诊断标准参考2004年长沙制定的新生儿缺氧缺血性脑病诊断标准^[6]。将新生儿分成两组,第一组为正常对照组20例[胎龄(39.70±1.03)周,体质量(3.30±0.31) kg,男、女各10例],

第二组为HIE组20例[胎龄(39.65±0.99)周,体质量(3.21±0.31) kg,男、女各10例]。所有新生儿均无宫内感染及先天遗传性疾病,无先天性畸形。正常组患儿均无宫内发育迟缓、窒息及缺氧表现,母孕期健康及分娩过程中无异常,并严格排除神经系统疾病和糖尿病等。两组在胎龄和体重方面均无显著差异。对入选的新生儿在出生后24 h时抽取股静脉血3 mL于EDTA抗凝管中,4 ℃,3 000 r/min离心10 min,取500 μL血浆用于VEGF测定,剩余的血液混匀后立即用于外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的提取。

1.2 方法

1.2.1 PBMC和RNA提取

利用淋巴细胞分离液(GE Healthcare,美国),采用梯度密度离心法分离PBMC,最后得到的PBMC溶于500 μL Trizol(TaKaRa,中国大连)中用于RNA的提取,提取方法参照Trizol试剂说明书。总RNA溶于20 μL用0.1%二乙基焦碳酸酯(Diethylprocarbonate, DEPC)处理的灭菌水中,4 ℃溶过夜后测定浓度,并电泳检测RNA完整性。

1.2.2 VEGF测定

血浆中VEGF的测定采用ELISA试剂盒(武汉华美生物工程有限公司),操作步骤参考说明书。每个样品均设置3个复孔,最后记录450 nm的光密度(Optical density, OD)值,用于绘制标准曲线和计算待测样品浓度。

1.2.3 Real-time PCR

PBMC中miR-125b的表达采用Real-time PCR方法测定。每个待测样取500 ng总RNA,利用逆转录试剂盒(TaKaRa,中国大连)合成互补DNA(cDNA),稀释4倍后取2 μL作为real-time PCR的模板。利用ABI 7500 real-time PCR仪检测PBMC中miR-125b表达,反应体系和程序设置均参考real-time试剂盒(TaKaRa,中国大连)说明书。内参基因U6和目的基因miR-125b的逆转录引物和real-time引物均直接购自广州市锐博生物科技有限公司。Real-time PCR结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。

1.3 统计学处理

所有的数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 统计分析采用SPSS13.0软件包。两组数据间的比较采用非参数检验, miR-125b与VEGF之间的相关性采用Pearson相关分析, $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 PBMC 中 miR-125b 的表达水平

为了比较正常组和HIE组新生儿PBMC中miR-125b的表达水平, 我们利用real-time PCR检测了两组样本PBMC中miR-125b的表达水平。结果如图1所示, HIE患儿PBMC中miR-125b的表达显著低于正常新生儿($P=0.00002$)。

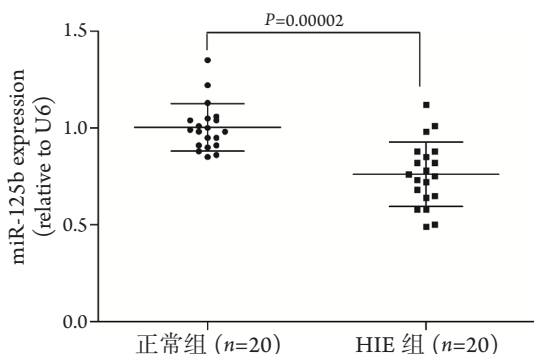


图1 正常组和HIE组新生儿PBMC中miR-125b的表达水平
Figure 1 The miR-125b expression of PBMC in healthy and HIE newborns

2.2 血浆中 VEGF 的含量

我们利用ELISA方法测定了两组新生儿血浆中VEGF含量。结果显示, HIE组血浆中VEGF含量 $[(170.25\pm 24.24) \text{ pg/mL}, n=20]$ 显著高于正常组血浆中VEGF含量 $[(107.75 \pm 11.80) \text{ pg/mL}, n=20]$ ($P=6.26\times 10^{-8}$, 图2)。

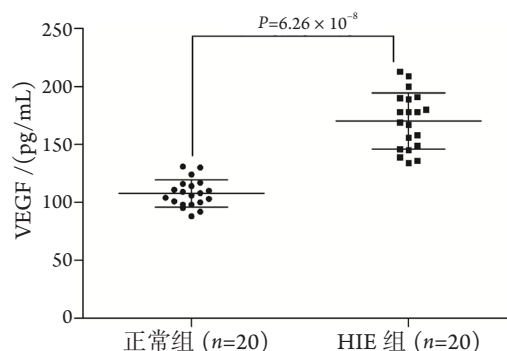


图2 正常组和HIE组血浆中VEGF的含量
Figure 2 Plasma VEGF concentration in healthy and HIE newborns

2.3 miR-125b 和 VEGF 的相关性

通过生物信息学分析, 我们发现VEGF 3' UTR存在miR-125b的结合位点(图3A), 而且已有研究证明VEGF受miR-125b的调控^[5], 因此我们分析了PBMC中miR-125b表达水平与血浆中VEGF水平的相关性。结果表明, 在正常组中, miR-125b与VEGF无显著相关性($r=0.016$, $P=0.946$, $n=20$, 图3B), 而在HIE组二者却呈显著负相关($r=-0.505$, $P=0.023$, $n=20$, 图3C)。

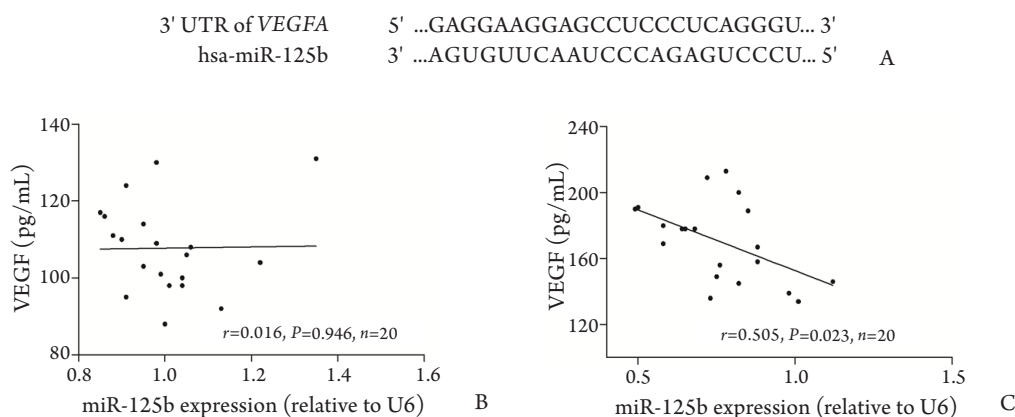


图3 miR-125b 和 VEGF 的相关性
Figure 3 The correlation of miR-125b and VEGF

A: Bioinformatics analysis of miR-125b and VEGF 3' UTR; B: The correlation of miR-125b and VEGF in controls; C: The correlation of miR-125b and VEGF in HIE group

3 讨论

HIE是一种在新生儿中发病率较高的疾病, 国外的发病率大概为1%~6%, 我国的发病率大概为3%~6%^[7]。近一半的HIE新生儿预后较差, 这往往可以导致新生儿死亡以及各种永久性神经系统疾病。目前关于HIE发病机制及相关的分子标志物研究较多, 但关于表观遗传学如miRNA与HIE的研究则很稀少。本研究首次探讨了与血管新生相关的miR-125b在HIE中的表达变化以及与VEGF之间的相关性, 发现miR-125b表达在HIE患儿中显著下降, 并且血浆中VEGF水平显著升高, 同时还发现在HIE患儿和总体中miR-125b表达与血浆中VEGF水平呈显著负相关。

VEGF(即VEGFA)是近年来确定的一种促进血管内皮细胞增殖和血管生成的细胞因子, 它通过与VEGF受体的结合从而诱导多种细胞反应, 包括促进细胞的迁移和有丝分裂、促进血管新生、促进细胞增殖同时抑制细胞凋亡等^[8]。研究表明, 缺氧可以诱导VEGF的表达^[9]。当胎盘组织发生缺氧时, VEGF通过抑制细胞凋亡来抵抗缺氧造成的脑组织损伤。因此, 在脑外伤、肿瘤生长和中风时VEGF的上调可能导致血管通透性和随后的脑水肿形成的增加^[10]。本研究中, 我们发现与正常对照组患儿相比, HIE患儿血浆中VEGF水平显著升高, 这进一步证实了缺氧可以诱导VEGF水平升高。缺氧条件下, VEGF水平升高有利于缓解缺氧对脑组织所造成的损伤, 但这种条件下VEGF水平的升高往往是一种应激或者代偿作用, 持续的时间均比较短, 一般缺氧缺血7天后VEGF的水平又会恢复至正常水平, 因此维持VEGF长时间的高水平有可能是对抗缺氧缺血造成脑组织损伤的一个策略。

miRNA是一类在翻译水平上调控基因表达的小分子非编码RNA, miRNA的表达往往具有组织和功能特异性。研究发现有一些miRNA受缺氧调节, 这类miRNA也被称为缺氧miRNA^[11-12]。缺氧条件下, Let-7和miR-103/107表达上调, 通过作用于真核翻译起始因子2C1 (Argonaute 1, AGO1)基因3' UTR促进血管新生, 同时AGO1表达受到抑制还可以促进VEGF表达上调导致肿瘤组织血管新生和肿瘤患者比较差的预后^[13]。本研究中, 我们发现与正常对照组相比, HIE组PBMC中miR-125b的表达显著降低。因此, 我们推测, miR-125b可能也是一种受缺氧诱导的miRNA, 并且缺氧可能

下调其表达, 从而影响其下游靶基因如VEGF的表达。同时通过生物信息学分析发现, VEGFA 3' UTR区存在miR-125b的结合位点, 而已有研究也表明VEGF是miR-125b的靶基因, miR-125b可以通过抑制VEGF的表达, 从而抑制胆管上皮细胞的增殖^[5]。因此, 我们同时分析了miR-125b表达水平与血浆中VEGF水平的相关性。我们发现, 在正常组中二者之间无相关性, 但是在HIE组中二者却呈显著负相关, 这也在一定程度上进一步表明VEGF表达受miR-125b的调控, 而且这种调控作用只在缺氧缺血条件下存在。

目前关于HIE的发病机制并不是十分清楚, 多数学说认为主要与二次损伤机制和细胞凋亡相关^[14]。因此, 继续深入探讨HIE的发病机制对于HIE的防治和相关的开发都具有重要的临床意义。本研究首次从表观遗传学角度出发, 发现miR-125b/VEGF通路与HIE的发病相关, 这可能为阐明HIE的发病机制提供了新的研究思路。当然, 本研究也存在一些不足之处, 如样本量偏小、缺少更深入的机制研究等。因此, 未来需要更多的研究来阐明miRNA及相关的信号通路在HIE发生发展过程中的作用和机制, 这可能会为HIE的防治提供新的实验依据。

参考文献

1. Ferriero DM. Neonatal brain injury[J]. N Engl J Med, 2004, 351(19): 1985-1995.
2. Yin XJ, Wei W, Han T, et al. Value of amplitude-integrated electroencephalograph in early diagnosis and prognosis prediction of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(4): 1099-1104.
3. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Biomarkers of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns[J]. Front Neurol, 2012, 3: 144.
4. Vasiljevic B, Maglajlic-Djukic S, Gojnic M, et al. New insights into the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. Pediatr Int, 2011, 53(4): 454-462.
5. Meng F, Onori P, Hargrove L, et al. Regulation of the histamine/VEGF axis by miR-125b during cholestatic liver injury in mice[J]. Am J Pathol, 2014, 184(3): 662-673.
6. 中华医学会儿科学分会新生儿学组. 新生儿缺氧缺血性脑病诊断标准[S]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(2): 97-98.
The Subspecialty Group of Neonatology, Pediatric Society, Chinese Medical Association. Diagnostic criteria for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[S]. Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(2): 97-98.

7. Gadzinowski J, Gulczyńska E, Michniewicz B, et al. The use of therapeutic whole body cooling in treating hypoxic-ischemic encephalopathy in the newborn—the first case in Poland[J]. *Ginekol Pol*, 2012, 83(8): 630-632.
8. Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, et al. Administration of r-VEGF-A prevents hepatic artery ligation-induced bile duct damage in bile duct ligated rats[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 291(2): G307-G317.
9. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia[J]. *J Appl Physiol*, 2000, 88(4): 1474-1480.
10. Aly H, Hassanein S, Nada A, et al. Vascular endothelial growth factor in neonates with perinatal asphyxia[J]. *Brain Dev*, 2009, 31(8): 600-604.
11. 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.
12. Ghosh G, Subramanian IV, Adhikari N, et al. Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF- α isoforms and promotes angiogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(11): 4141-4154.
13. Chen Z, Lai TC, Jan YH, et al. Hypoxia-responsive miRNAs target argonaute 1 to promote angiogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(3): 1057-1067.
14. 蔡清, 薛辛东, 富建华. 新生儿缺氧缺血性脑病研究现状及进展[J]. *中国实用儿科杂志*, 2009, 24(12): 968-971.
CAI qing, XUE Xindong, FU Jianhua. The current study and development of hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Chinese Journal of Practical Pediatrics* Dec, 2009, 24(12): 968-971.

本文引用: 黄群, 谭丹凤, 马敏, 黄广文, 龙小兰, 吴虹. 新生儿缺氧缺血性脑病患儿血液中血管内皮生长因子和 miR-125b 表达水平及相关性研究 [J]. *临床与病理杂志*, 2014, 34(4): 353-357. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2014.04.007

Cite this article as: HUANG Qun, TAN Danfeng, MA Min, HUANG Guangwen, LONG Xiaolan, WU Hong. Relationship between vascular endothelial growth factor and miR-125b in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2014, 34(4): 353-357. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2014.04.007