

毛海霞, 康婷, 吴蔚桦, 等. 腺嘌呤诱导慢性肾病大鼠模型中 HIF-1 α 、RhoA、SOX9 的表达及意义 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 70–77, 135.

Mao HX, Kang T, Wu WH, et al. Expression and significance of HIF-1 α , RhoA and SOX9 in rats with adenine-induced chronic kidney disease [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 70–77, 135.

doi: 10. 3969/j.issn.1671–7856. 2022. 03. 010

腺嘌呤诱导慢性肾病大鼠模型中 HIF-1 α 、RhoA、SOX9 的表达及意义

毛海霞^{1,2}, 康婷^{1,2}, 吴蔚桦^{1,2}, 朱婷婷^{1,2}, 张丽玲^{1,2}, 欧三桃^{1,2*}

(1. 西南医科大学附属医院肾病内科, 四川 泸州 646000;
2. 四川省肾脏疾病临床医学研究中心, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 观察腺嘌呤诱导大鼠慢性肾病模型中 HIF-1 α 、RhoA 和 SOX9 的表达及其与肾间质纤维化的关系。**方法** 将 20 只大鼠随机分为对照组 (Con 组) 和模型组 (腺嘌呤诱导的 CKD 大鼠模型)。分别于第 3、6 周处死大鼠。观察肾形态改变; 分别检测大鼠肾功及 24 h 尿蛋白水平; HE 染色观察肾病理变化; 天狼星红染色观察肾小管间质纤维情况; 免疫组化染色观察肾组织中 HIF-1 α 、RhoA、SOX9、Col-I 和 α -SMA 蛋白的表达; RT-PCR 检测大鼠肾 HIF-1 α 、RhoA 和 SOX9 和 Col-I、 α -SMA mRNA 水平, 分析 HIF-1 α 、RhoA 和 SOX9 表达程度与肾小管间质纤维化的相关性; ELISA 检测两组大鼠血清 SOX9 水平。**结果** 与 Con 组相比, CKD 组大鼠 24 h 尿蛋白和血清 BUN、Scr 均明显增加 ($P < 0.05$); CKD 组 HE 染色和天狼星红染色见明显肾小管扩张及间质纤维化, 且随时间进展加重; 免疫组化及 RT-PCR 均提示 CKD 组 HIF-1 α 、RhoA、SOX9 蛋白及 mRNA 表达均增加; CKD 组大鼠血清中 SOX9 水平较对照组升高, 且随造模时间延长增加。相关性分析提示 HIF-1 α 、RhoA、SOX9 mRNA 表达与 Col-I 和 α -SMA 相关, 且 HIF-1 α 、RhoA、SOX9 三者也存在正相关关系。**结论** 在腺嘌呤诱导的 CKD 大鼠模型中, 存在 HIF-1 α 、RhoA、SOX9 的高表达, 且可能与肾间质纤维化进程密切相关; 血清 SOX9 的水平有望成为早期诊断 CKD 的分子标记物。

【关键词】 慢性肾病; HIF-1 α ; RhoA; SOX9

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671–7856 (2022) 03–0070–08

Expression and significance of HIF-1 α , RhoA and SOX9 in rats with adenine-induced chronic kidney disease

MAO Haixia^{1,2}, KANG Ting^{1,2}, WU Weihua^{1,2}, ZHU Tingting^{1,2}, ZHANG Liling^{1,2}, OU Santao^{1,2*}

(1. Department of Nephrology, Affiliated hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.
2. Sichuan Clinical Research Center for Nephropathy, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective To observe expression of HIF-1 α , RhoA and SOX9 proteins in kidneys and to determine their relationship with tubulointerstitial fibrosis in rats with adenine-induced chronic kidney disease. **Methods** Twenty rats were randomly divided into a control (Con) group and model group (adenine-induced CKD rat model). The rats were sacrificed after 3 and 6 weeks. Morphological changes of the kidney were observed and the renal functions and 24 h urinary protein were assessed. Renal pathological changes were observed by HE staining and interstitial fibers of renal tubules were

[作者简介] 毛海霞 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 慢性肾病与血管钙化。E-mail: 1245622086@qq.com

[通信作者] 欧三桃 (1976—), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 慢性肾病与血管钙化。E-mail: ousantao@163.com

observed by Sirius red staining. Immunohistochemical staining was used to observe expression of HIF-1 α , RhoA, SOX9, Col-I and α -SMA proteins in renal tissue. HIF-1 α , RhoA, SOX9, Col-I and α -SMA mRNA levels in the kidney were measured by RT-PCR and the relationship between the expression levels of HIF-1 α , RhoA and SOX9, and renal tubular interstitial fibrosis was analyzed. The expression level of SOX9 in serum of the two groups was measured by an ELISA.

Results Compared with the Con group, 24 h urinary protein, serum BUN and Scr in the CKD group were increased significantly ($P<0.05$). In the CKD group, HE staining and Sirius red staining showed obvious renal tubule dilatation, interstitial fibrosis and aggravation over time. Immunohistochemistry and RT-PCR showed that the expression of HIF-1 α , RhoA and SOX9 was increased in the CKD group and the serum level of SOX9 in the CKD group was higher than that in the control group, which was increased over time. Correlation analysis showed that the mRNA expression of HIF-1 α , RhoA and SOX9 was correlated with Col-I and α -SMA, and there was a positive correlation among HIF-1 α , RhoA and SOX9.

Conclusions HIF-1 α , RhoA and SOX9 are highly expressed in the adenine-induced CKD rat model, which may be closely related to the progression of renal interstitial fibrosis. Moreover, the serum level of SOX9 is expected to be a molecular marker for early diagnosis of CKD.

【**Keywords**】 chronic kidney disease; HIF-1 α ; RhoA; SOX9

慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)是一种以肾功能丢失逐渐加重为特征的进展性疾病^[1],已成为全球的重大公共健康问题,是导致世界人口死亡的主要疾病^[2]。CKD 发病机制复杂多样,其中肾小管间质纤维化(tubulointerstitial fibrosis, TIF)是其最常见的病理特征和 CKD 进展的共同途径^[3]。影响肾间质纤维化的因素众多,涉及多种信号因子和信号通路调控系统。上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)可通过改变分泌的细胞外基质促进 TIF 的发展,其中,缺氧参与并促进了该过程的发生、发展^[4-5]。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)作为缺氧敏感的关键转录因子,被证实与肾纤维化有关^[6-7]。近年来, RhoA/ROCK 信号通路被证实在促进肾纤维化方面起到积极作用^[8],而 SOX9 作为下游因子发挥作用, HIF-1 α 同时也是 RhoA 转录的重要调节因子^[9]。缺氧可通过 HIF-1 α 激活 RhoA/ROCK 信号通路来诱导细胞骨架损伤和重塑, KEGG 信号通路显示 SOX9 参与 HIF-1 α 信号通路^[10],但 HIF-1 α 是否可通过 RhoA、SOX9 发挥促进肾间质纤维化的作用,目前尚无相关报道。因此,本研究主要观察 HIF-1 α 、RhoA 和 SOX9 在腺嘌呤诱发大鼠 CKD 模型中的表达以及与 CKD 肾间质纤维化的关系,以进一步探讨 CKD 肾间质纤维化的发病机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 5~6 周龄雄性 SD 大鼠 20 只,体重 180~240 g,购自西南医科大学实验动物中心[SCXK(川)2018-0017]。饲养于西南医科大学动物研究

中心[SYXK(川)2018-0065]。该实验经西南医科大学实验动物伦理委员会审批(IACUC-SWMU20210350),并遵循实验动物的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

腺嘌呤(V900471-100G, Sigma 公司,美国); HIF-1 α 抗体、SOX9 抗体(ab8366, ab185230, Abcam,英国); RhoA 抗体(10749-1-AP, 武汉三鹰公司); Col-I 抗体(BS1530, bioworld 公司,美国); α -SMA 抗体(19245S, CST 公司,美国); SABC 试剂盒(bioworld 公司,美国); RNA 提取试剂盒、RNA 逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(R701、R323-01、Q711-02/03, 南京维诺赞公司); HIF-1 α 、RhoA、SOX9、Col-I、 α -SMA 和 GAPDH 上下游引物(上海生工生物工程有限公司); SOX9 ELISA 试剂盒(30899, 泉州睿信生物科技有限公司)。全自动生化分析仪(西门子,德国);光学显微镜(Nikon 公司,日本);RNA 逆转录仪(Eppendorf 公司,德国);RT-PCR 仪(Eppendorf 公司,德国);自动酶标仪(BioTek 公司,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及造模

将 20 只大鼠随机分为对照组($n=10$)和 CKD 组($n=10$)。所有大鼠自由进食普通饲料、饮水,昼夜节律光照,室温喂养,适应性喂养 1 周后,开始实验。CKD 组给予 250 mg/(kg·d)的 2.5%腺嘌呤混悬液每天灌胃,1~3 周每天灌胃 1 次,4~6 周每天减半灌胃 1 次;对照组给予等量生理盐水灌胃。

1.3.2 留取血、尿、肾组织标本

造模后第 3、6 周时,分别处死两组大鼠各 5 只;处死前 24 h 将大鼠置于清洁的代谢笼中,收集 24 h

尿液测定 24 h 尿蛋白,行 10%戊巴比妥麻醉后经腹主动脉采血,离心后取血清分装并保存于-80℃冰箱待用,部分血清用于行肾功能检测,部分用于 ELISA 检测;处死后取右肾称重及行剖面观察,左肾部分肾组织于 10%中性福尔马林中浸泡固定,制作石蜡切片(4 μm),用作形态学观察,部分肾组织冻存于-80℃冰箱中备用。

1.3.3 肾组织形态学观察

HE 染色:取大鼠肾组织石蜡切片,二甲苯脱蜡至水后行苏木素液、伊红复染,透明,中性树胶封片。于光镜下观察肾组织病理改变。

天狼星红染色:切片脱蜡至水,苏木素液染 3~5 min,水洗后天狼星红染液染 15~30 min,无水乙醇直接分色与脱水,二甲苯透明,风干后中性树胶封片,镜检。

1.3.4 免疫组化染色检测肾组织中 HIF-1α、RhoA、SOX9、Col-I 和 α-SMA 蛋白的表达

肾组织切片 60℃脱蜡水化,热抗原修复,免疫组化笔画圈围住组织,灭活内源酶活性,封闭非特性位点,依次添加一抗、二抗、ABC 复合物、DAB 显色液,苏木素复染,脱水晾干后中性树胶封片,显微镜下观察。

1.3.5 RT-PCR 检测大鼠肾 HIF-1α、RhoA 和 SOX9 和 Col-I、α-SMA mRNA

取冻存肾组织,按说明书提取总 RNA,再将 RNA 逆转录为 cDNA。设计 HIF-1α、RhoA、SOX9、Col-I 和 α-SMA 引物序列,见表 1 参照试剂盒行体外 PCR 扩增,记录 PCR 反应的循环阈值(CT 值),以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示目的基因的相对表达量。

1.3.6 ELISA 检测血清 SOX9 水平

取大鼠血清,按照 ELISA 试剂盒操作步骤,并用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),通过标准曲线计算样品中 SOX9 含量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计量资料采用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两变量间的相关性分析用 *Pearson* 检验,以 $P<0.05$ 为有差异,具有统计学意义。

2 结果

2.1 肾整体和切面大体病理改变及肾重、肾重/体重比较

对照组大鼠肾大小形态正常,呈暗红色,触之有弹性,切面皮髓质界限分明;CKD 组大鼠肾呈“大白肾”,体积变大,色灰白,质韧,触之有颗粒感,且切面皮髓质稍模糊。CKD 组肾重、肾重/体重均比对照组增加,且差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 2、图 1。

2.2 两组大鼠肾功能及 24 h 尿蛋白定量比较

CKD 组大鼠肾功能指标(BUN、Scr)和 24 h 尿蛋白定量在 3、6 周较对照组均明显升高,且差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列表
Table 1 Sequence table of primers for RT-PCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
HIF-1α	Forward, 5'-CTCCCTTTTTCAGCAGCAG-3'
	Reverse, 5'-GCTCCATTCATCCTGTTC-3'
RhoA	Forward, 5'-GCTTGTTGTAAGACATGCTTGCTC-3'
	Reverse, 5'-GGCCTCAGACGGTCATAATCTTCC-3'
SOX9	Forward, 5'-CTCCTACTACAGCCACGCAG-3'
	Reverse, 5'-AGCTGTGTGTAGACGGGTTC-3'
Col-I	Forward, 5'-GGATCGACCCTAACCAAGCC-3'
	Reverse, 5'-GATCGGAACCTTCGCTTGCA-3'
α-SMA	Forward, 5'-GCGTGGCTATTCTTCGTGACTAC-3'
	Reverse, 5'-CCATCAGGCAGTTCGTAGCTCTTC-3'
GAPDH	Forward, 5'-CCCCAATGTATCCGTTGTG-3'
	Reverse, 5'-TAGCCCAGGATGCCCTTAGT-3'

表 2 两组大鼠肾重、肾重/体重比较($n=5$)

Table 2 Comparison of kidney weight and kidney weight/body weight between two groups of rats

组别 Groups	3 周 3 weeks		6 周 6 weeks	
	对照组 Con group	模型组 CKD group	对照组 Con group	模型组 CKD group
肾重 Weight of kidney	1.316±0.112	4.482±1.293 **	1.404±0.111	4.092±0.455 **
肾重/体重 Kidney weight/body weight	0.004±0.001	0.018±0.004 **	0.003±0.000	0.016±0.002 **

注:与同期对照组相比, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the Con group, ** $P<0.01$.

2.3 肾组织病理改变

HE 染色可见对照组第 3、6 周大鼠肾组织结构清晰,无明显异常。CKD 组大鼠肾组织随时间进展结构变得紊乱,肾小球数量逐渐减少,囊腔扩张明显,肾小管扩张伴棕黄色颗粒沉积。天狼星红染色见对照组大鼠肾间质无明显胶原沉积,而 CKD 组大鼠肾间质明显红染,胶原纤维较为丰富,且随时间进展其程度加重。见图 2。

2.4 肾组织 HIF-1α、RhoA、SOX9、Col-I 和 α-SMA 免疫组化

免疫组化结合 Image Pro Plus 分析结果显示,对照组大鼠可见肾小管 HIF-1α、RhoA、SOX9 表达较少,且主要集中在靠近肾小球的周围。CKD 组大鼠肾小管及间质可见较多棕黄色颗粒沉积,提示 HIF-1α、RhoA、SOX9 的表达较多,且随时间进展其表达逐渐增强,肾小球上也有不均匀表达。Col-I 和

α-SMA 蛋白在对照组肾间质表达较少,而在 CKD 组肾间质显著表达,且随时间进展其表达程度加重。见图 3。

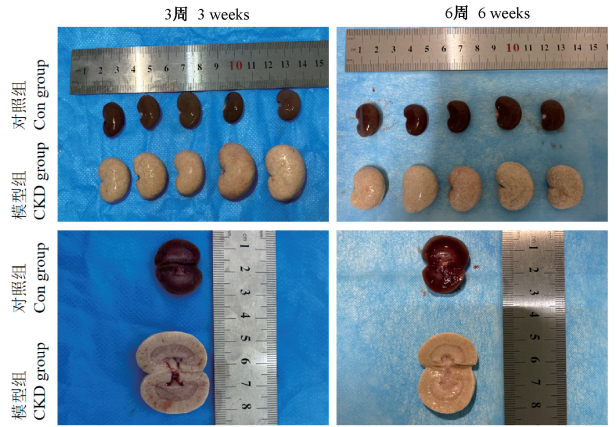
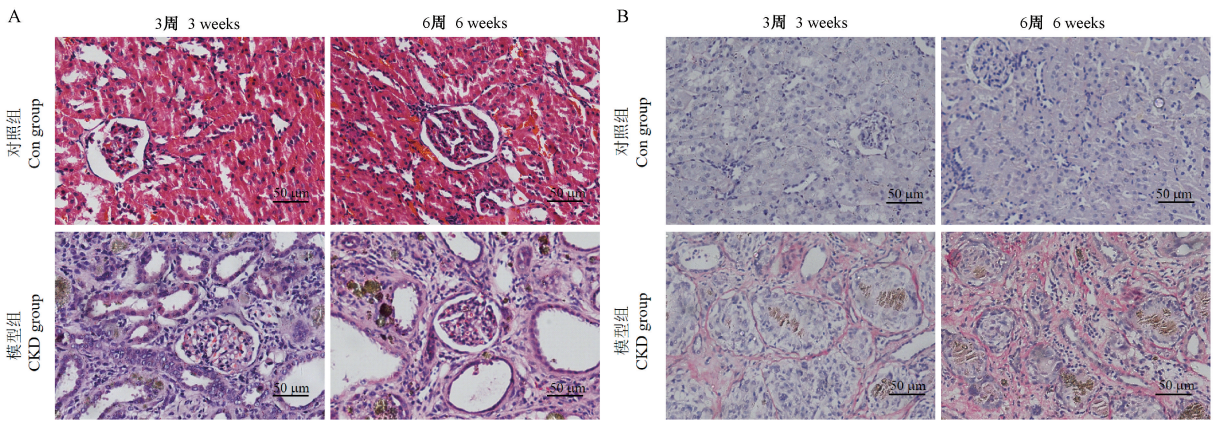


图 1 两组大鼠肾大体病理改变
Figure 1 Pathologic change between two groups of rats

表 3 两组大鼠肾功及 24 h 尿蛋白定量比较(n=5)
Table 3 Comparison of renal function and 24 h urinary protein quantity between two groups of rats

组别 Groups	3 周 3 weeks		6 周 6 weeks	
	对照组 Con group	模型组 CKD group	对照组 Con group	模型组 CKD group
尿素氮 (mmol/L) BUN	6.26±0.65	54.44±19.70**	5.80±0.67	71.80±31.59**
肌酐 (μmol/L) Scr	29.36±7.34	215.10±55.82**	24.04±1.18	199.40±46.56**
24 h 尿蛋白定量 (g/24 h) 24 h urine protein	13.32±1.50	23.32±2.64**	10.45±10.45	28.75±5.52**

注:与同期对照组相比,**P<0.01。
Note. Compared with the Con group, **P<0.01.



注:A:HE 染色结果,B:天狼星红染色结果。
图 2 两组大鼠肾组织 HE 染色及天狼星红染色
Note. A, HE staining. B, Sirius red staining.

Figure 2 HE staining and Sirius red staining in the two groups of rats

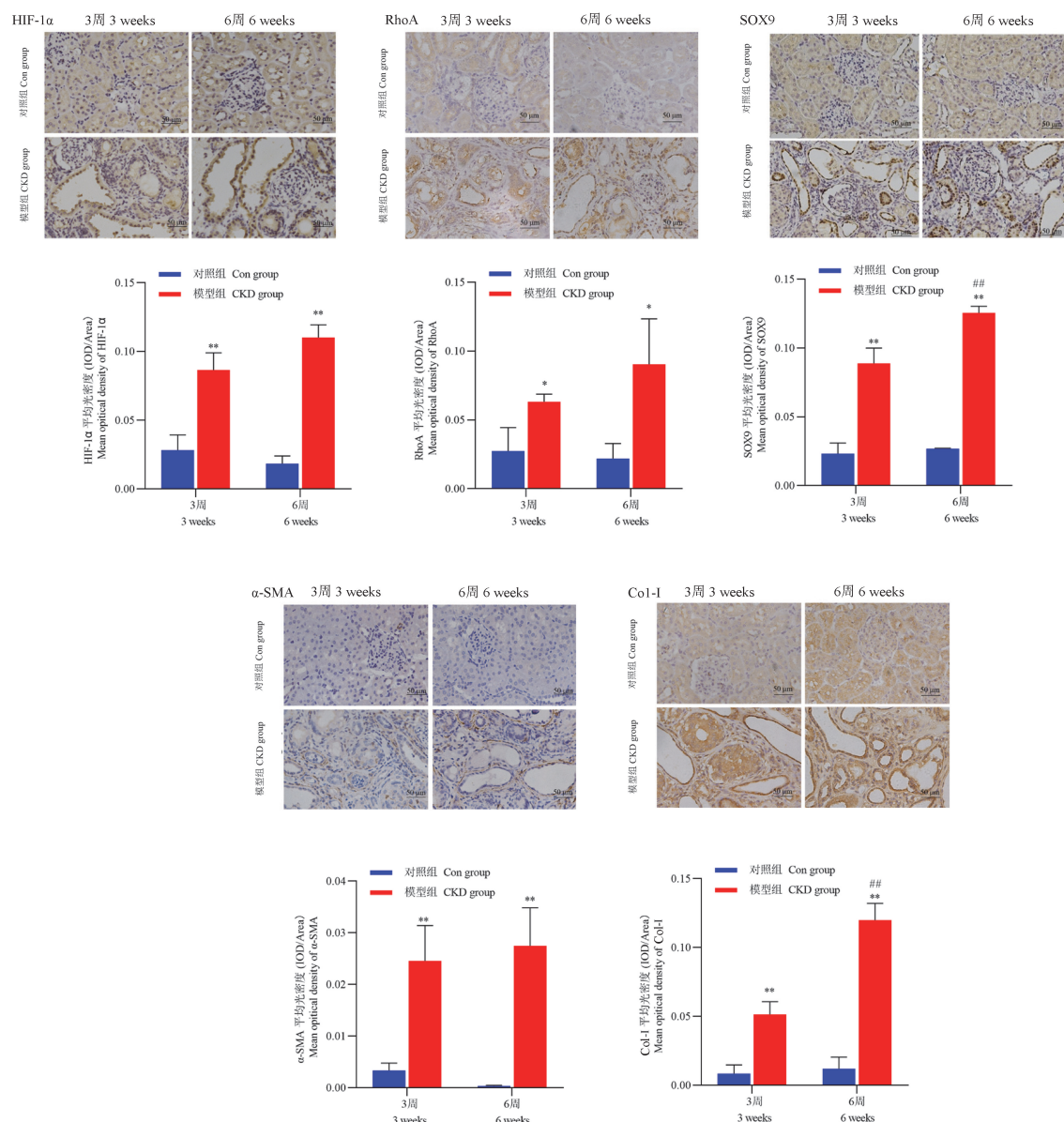
2.5 肾组织 HIF-1 α 、RhoA 和 SOX9 和 Col-I、 α -SMA mRNA 表达情况

与对照组相比,CKD 组大鼠肾 HIF-1 α 、和 SOX9 mRNA 水平随时间进展均明显增加,且 HIF-1 α 和 SOX9 mRNA 在各时间点的差异均具有统计学意义,RhoA 在第 6 周时差异具有统计学意义;CKD 组大鼠各时间点肾 Col-I、 α -SMA mRNA 均较对照组升高,且差异具有统计学意义。见图 4。

2.6 相关性分析

采用 Pearson 对各指标进行相关性分析,结果提

示 HIF-1 α 、RhoA 和 SOX9 mRNA 表达与 Col-I mRNA 表达呈显著正相关($r=0.993, P<0.000; r=0.864, P<0.000; r=0.957, P<0.000$); HIF-1 α 、RhoA 和 SOX9 mRNA 表达与 α -SMA mRNA 也呈明显正相关($r=0.820, P=0.001; r=0.758, P=0.004; r=0.779, P=0.003$)。随后,进一步分析 HIF-1 α 、RhoA 和 SOX9 之间的相关性,发现其两两间均存在显著正相关(HIF-1 α 与 RhoA mRNA $r=0.871, P<0.000$; HIF-1 α 与 SOX9 mRNA $r=0.944, P<0.000$; RhoA 和 SOX9 mRNA $r=0.715, P=0.009$)。见图 5。

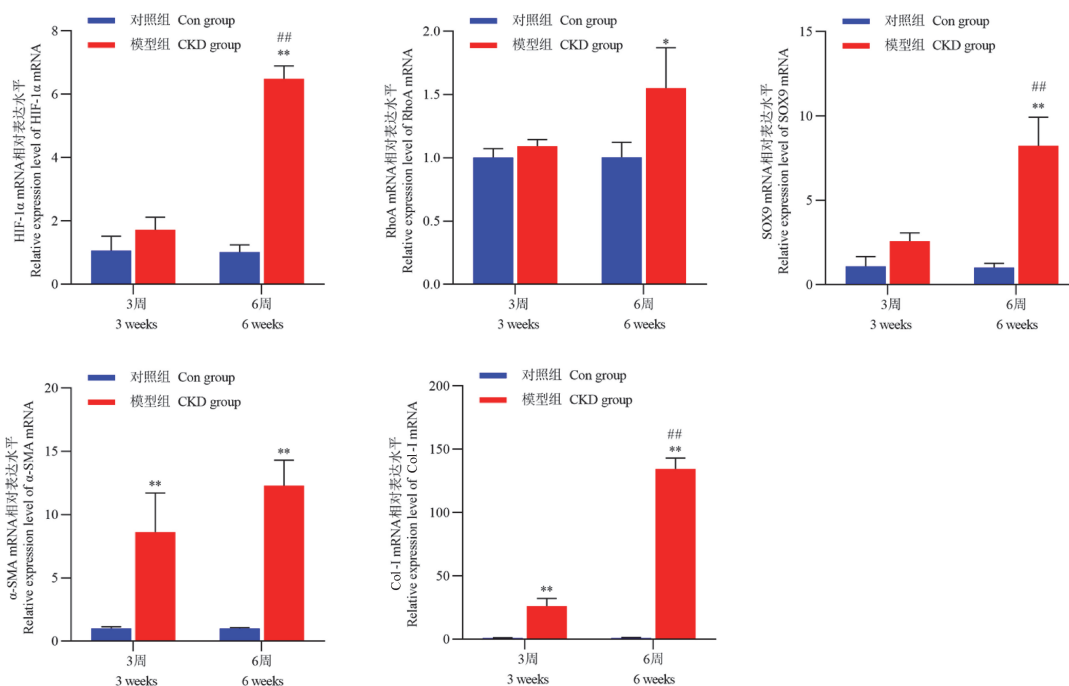


注:与同期对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与前一时间 CKD 组相比,## $P<0.01$ 。

图 3 免疫组化结果

Note. Compared with the Con group, * $P<0.01$, ** $P<0.01$. Compared with the previous time point of CKD group, ## $P<0.01$.

Figure 3 Immunohistochemical results of renal tissue



注:与同期对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与前一时间 CKD 组相比, ## $P < 0.01$ 。

图 4 两组大鼠肾 mRNA 相对表达量

Note. Compared with the Con group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the previous time point of CKD group, ## $P < 0.01$.

Figure 4 Relative mRNA expression of the kidneys in the two group of rats

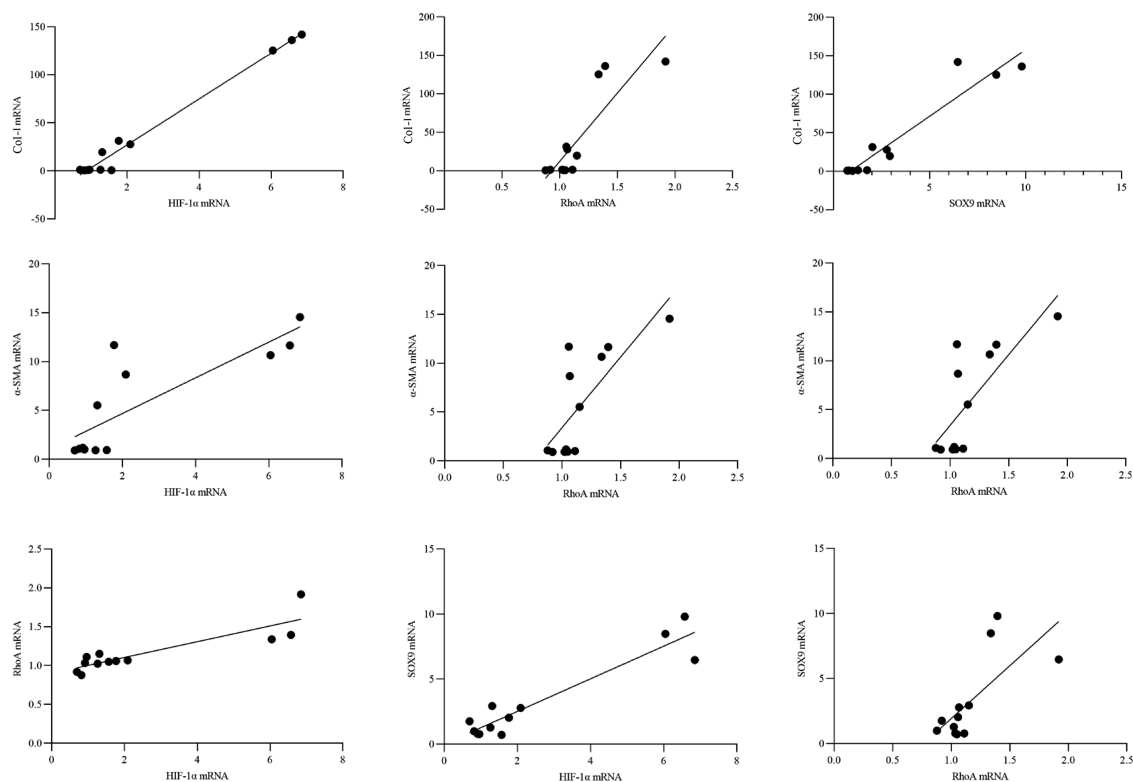


图 5 mRNA 相关性分析

Figure 5 Correlation analysis of the mRNA

2.7 大鼠血清 SOX9 的水平

3 周大鼠对照组血清中 SOX9 水平为 (13.63 ± 1.595) ng/mL, CKD 组为 (16.16 ± 1.390) ng/mL; 6 周大鼠对照组血清中 SOX9 水平为 (12.63 ± 1.540) ng/mL, CKD 组为 (18.27 ± 1.334) ng/mL。CKD 组大鼠血清中 SOX9 水平较同期对照组均升高, 且差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$); 血清 SOX9 水平随造模时间延长而增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.8 血清 SOX9 水平与肾功能、24 h 尿蛋白的相关性分析

用 Pearson 检验得出: 血清中 SOX9 水平与尿素氮、肌酐、24 h 尿蛋白定量均存在正相关关系 ($r_1 = 0.759, P = 0.000; r_2 = 0.757, P = 0.000; r_3 = 0.822, P = 0.000$)。见图 6。

3 讨论

CKD 最常见的病理表现是肾纤维化, 主要包括肾小球硬化、肾小管萎缩和肾间质纤维化。而肾间质纤维化作为发展为终末期肾病的主要病变之一, 涉及信号通路繁多, 目前研究较多的有 TGF- β /Smad3、JAK/STAT 和 PI-3K 通路等^[11], 但并不能完全解释其进展过程。近年来研究发现, 在慢性肾病组织中普遍存在缺氧状态, 而缺氧主要通过缺氧诱导因子 (HIF-1) 途径来促进肾间质纤维化从而参与慢性肾病的进展。既往研究表明 RhoA 和 SOX9 均与 HIF-1 相关, 且都不同程度参与肾间质纤维化过程, 因此本研究通过检测 HIF-1、RhoA 和 SOX9 表达及相关肾纤维化指标, 探讨 HIF-1、RhoA 和 SOX9 是否参与了 CKD 的肾间质纤维化过程。

腺嘌呤灌胃诱导 CKD 主要是通过促进肾小管间质纤维化、肾小管萎缩和晶体形成, 能较好的模拟人类的正常 CKD 的发展, 故成为广泛采用的诱导 CKD 的造模方式^[12-13]。本实验采用腺嘌呤灌胃, 可见模型组大鼠肾呈“大白肾”改变, 肾功能下降且 24

h 尿蛋白定量升高, 且 HE 染色发现肾结构紊乱伴肾小管明显扩张, 天狼星红染色发现 CKD 组胶原纤维沉积且其纤维化程度随时间进展加重, 证实腺嘌呤诱导 CKD 大鼠模型成功。

HIF-1 α 是缺氧诱导因子家族中的一员, 普遍存在于人和哺乳动物的细胞内, 可以激活下游 100 多种与缺氧相关的因子转录表达, 主要通过调控细胞增殖、自噬、炎症、氧化应激等介导细胞产生缺氧应答, 近年来发现其与慢性病的发生发展密切相关^[14]。CKD 时, HIF-1 α 可通过激活 NF- β 、EPO、GLUT-1、IGF-1 和 INOS 发生等促进肾间质成纤维细胞向肌成纤维细胞转化, 进而促进肾间质纤维化, 同时还可促进血管生成^[15]。本研究发现在腺嘌呤诱发的 CKD 大鼠肾小管上皮细胞核中存在 HIF-1 α 的高表达, 其 mRNA 水平同高表达, 且其表达与肾纤维化因子 Col-I、 α -SMA mRNA 呈显著正相关, 提示 HIF-1 α 可能参与并促进了 CKD 的肾间质纤维化过程, 与既往类似研究结果一致。其次, HIF-1 α 与 RhoA 和 SOX9 mRNA 的表达也高度相关, 且 RhoA 和 SOX9 在肾小管上皮细胞核中均明显高表达。既往研究发现在乳腺癌中 HIF-1 α 可激活 RhoA/RhoA 轴, 导致细胞和基质收缩^[16]。在肿瘤、肺动脉高压等多种疾病中都证实了 HIF-1 α /RhoA 轴的存在, 但与 CKD 的相关研究较少, 本研究发现在 CKD 间质纤维化中, HIF-1 α 与 RhoA 存在相关关系, 但还需进一步研究证实。

RhoA 作为研究最透彻的 RhoA-GTP 酶家族成员, 在调节细胞骨架蛋白、细胞形态和迁移、调控细胞增殖和转录等方面发挥了巨大的作用, 因此, 是目前研究的热点之一。晚近发现其转录主要受 c-Myc、HIF-1 α /2 α 、Stat 6 和 NF- κ B 等调控, 下游可激活 MAL、AP-1、NF- κ B、YAP/TAZ、 β -catenin 和 SOX9 等发挥生物活性作用^[9]。多项研究也表明, RhoA 通过不同通路参与并促进了肾间质纤维化的

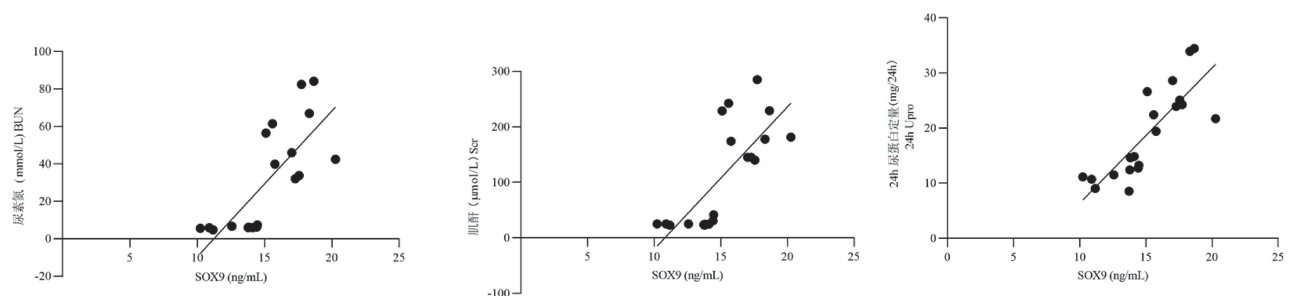


图 6 血清 SOX9 水平与肾功、24 h 尿蛋白定量的相关性分析

Figure 6 Correlation analysis of SOX9 with renal function and 24 h urinary protein quantity

进程^[8,17-18]。本研究也发现 RhoA 在 CKD 组大鼠肾小管上皮细胞核中高表达,且其 mRNA 水平与 Col-I 和 α -SMA mRNA 表达呈正相关,进一步证明了 RhoA 可能促进肾间质纤维化从而参与 CKD 的进展。RhoA 与 SOX9 mRNA 表达呈明显正相关关系,表明 RhoA 可能通过激活 SOX9 在肾间质纤维化的进程中发挥作用。

SOX9(sex-determining region Y box9)参与早期胚胎的多种器官的发育成熟,也与肿瘤的发生有关。近年来发现其可介导上皮细胞间质转分化和通过促进细胞外基质的产生参与器官纤维化。然而,SOX9 在肾间质纤维化中的研究相对较少,目前有研究表明 SOX9 可通过 PI3K-AKT 途径促进肾小管间质转分化和细胞外基质沉积^[19]。同时,大量研究表明在急性肾损伤后 SOX9 表达增强,可促进肾内源性的修复,从而延缓肾间质纤维化的发生^[20-21]。因此 SOX9 可能在早期肾损伤中起保护作用,在晚期肾损伤中起促进作用,但在肾间质纤维化中的具体作用还需要更深入的研究来证明。本研究发现随 CKD 进展,SOX9 在肾小管上皮细胞中高表达,在 6 周达高峰,且其 mRNA 水平与 Col-I、 α -SMA mRNA 呈显著正相关,表明在 CKD 模型中存在 SOX9 的表达增强,且其表达可能参与并促进了肾间质纤维化过程,进一步证实了关于 SOX9 在肾间质纤维化的作用^[22]。此外,本研究同时还发现血清 SOX9 水平在 CKD 大鼠中明显升高,与对照组相比差异具有统计学意义,且 CKD 组 6 周较 3 周表达进一步升高,表明其血清水平随 CKD 进展而上升。Nakagawa 等^[23]提出 SOX9 可作为提示肾小管损伤和间质纤维化的新型标志物,但目前尚无在血清学方面的报道,而本研究结果提示血清 SOX9 水平可能在一定程度上诊断 CKD 以及提示 CKD 病程的进展。

综上,本研究发现在腺嘌呤诱导的 CKD 大鼠模型中,存在 HIF-1 α 、RhoA 和 SOX9 的激活,且其表达增加可能与肾间质纤维化有关,今后还应进一步研究验证该通路并证明抑制其激活有助于抑制肾间质纤维化的发展,进而减缓 CKD 进程。此外血清 SOX9 水平有望成为早期诊断 CKD 以及提示其病情进展的新型标志物。

参考文献:

[1] Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives [J]. Lancet, 2013, 382

(9888): 260-272.

- [2] Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic kidney disease diagnosis and management: a review [J]. JAMA, 2019, 322 (13): 1294-1304.
- [3] Tan HL, Yap JQ, Qian Q. Acute kidney injury: tubular markers and risk for chronic kidney disease and end-stage kidney failure [Z]. Blood Purif, 2016, 41(1-3): 144-150.
- [4] Wei X, Zhu X, Jiang L, et al. Recent advances in understanding the role of hypoxia-inducible factor 1alpha in renal fibrosis [J]. Int Urol Nephrol, 2020, 52(7): 1287-1295.
- [5] Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, et al. Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia [J]. Kidney Int, 2004, 65(3): 871-880.
- [6] Hu J, Wang W, Zhang F, et al. Hypoxia inducible factor-1 α mediates the profibrotic effect of albumin in renal tubular cells [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15878.
- [7] Baumann B, Hayashida T, Liang X, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α promotes glomerulosclerosis and regulates COL1A2 expression through interactions with Smad3 [J]. Kidney Int, 2016, 90(4): 797-808.
- [8] 柳飞, 付平. RhoA/Rho 相关卷曲螺旋形成的蛋白激酶信号通路与慢性肾脏疾病 [J]. 华西医学, 2011, 26(5): 781-783.
- [9] Jae-Gyu K, Rokibul I, YC J, et al. Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 6381-6392.
- [10] Huang D, Cao L, Xiao L, et al. Hypoxia induces actin cytoskeleton remodeling by regulating the binding of CAPZA1 to F-actin via PIP2 to drive EMT in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Lett, 2019, 448: 117-127.
- [11] 姚兰. 肾纤维化相关信号通路研究进展 [J]. 国际泌尿系统杂志, 2015, 35(1): 147-150.
- [12] Diwan V, Brown L, Gobe GC. Adenine-induced chronic kidney disease in rats [J]. Nephrology (Carlton), 2018, 23(1): 5-11.
- [13] 马园园, 刘成海, 陶艳艳. 肾纤维化动物模型特点与研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 398-403.
- [14] 王慧星, 史可梅. 低氧诱导因子-1 α 在相关慢性疾病发病中作用的研究进展 [J]. 中国慢性病预防与控制, 2019, 27(9): 708-711.
- [15] Sulikowska B, Rutkowski B, Marszałek A, et al. The role of interstitial changes in the progression of chronic kidney disease [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2015, 69: 830-837.
- [16] Gilkes DM, Xiang L, Lee SJ, et al. Hypoxia-inducible factors mediate coordinated RhoA-ROCK1 expression and signaling in breast cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(3): E384-E393.
- [17] Babelova A, Jansen F, Sander K, et al. Activation of Rac-1 and RhoA contributes to podocyte injury in chronic kidney disease [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80328.

(下转第 135 页)

- 325; 108349.
- [49] Nagaraja TN, Keenan KA, Fenstermacher JD, et al. Acute leakage patterns of fluorescent plasma flow markers after transient focal cerebral ischemia suggest large openings in blood-brain barrier [J]. *Microcirculation*, 2008, 15(1): 1-14.
- [50] Krueger M, Bechmann I, Immig K, et al. Blood-brain barrier breakdown involves four distinct stages of vascular damage in various models of experimental focal cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35(2): 292-303.
- [51] Bankstahl M, Breuer H, Leiter I, et al. Blood-brain barrier leakage during early epileptogenesis is associated with rapid remodeling of the neurovascular unit [J]. *eNeuro*, 2018, 5(3): ENEURO.0123-18. 2018.
- [52] Chen B, Friedman B, Cheng Q, et al. Severe blood-brain barrier disruption and surrounding tissue injury [J]. *Stroke*, 2009, 40(12): e666-e674.
- [53] Jin X, Liu J, Yang Y, et al. Spatiotemporal evolution of blood brain barrier damage and tissue infarction within the first 3 h after ischemia onset [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 48(3): 309-316.
- [54] Santa-Maria AR, Heymans M, Walter FR, et al. Transport studies using blood-brain barrier in vitro models: a critical review and guidelines [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2020, 11: 1-18.
- [55] Sweeney MD, Montagne A, Sagare AP, et al. Vascular dysfunction-the disregarded partner of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2019, 15(1): 158-167.
- [56] Jacobsen MC, Cressman ENK, Tamm EP, et al. Dual-energy CT: lower limits of iodine detection and quantification [J]. *Radiology*, 2019, 292(2): 414-419.
- [57] De Prey J, Yu C, Echevarria FD, et al. Iodinated contrast extravasation on post-revascularization computed tomography mimics magnetic resonance hyperintense acute reperfusion marker: a case study [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2020, 29(12): 105294.
- [58] Kang J, Kwon H, Jung CK, et al. Usefulness of hyperintense acute reperfusion marker sign in patients with transient neurologic symptom [J]. *Medicine*, 2019, 98(19): e15494.

[收稿日期]2021-01-06

(上接第 77 页)

- [18] Gómez GI, Velarde V, Sáez JC. Role of a RhoA/ROCK-dependent pathway on renal connexin43 regulation in the angiotensin II-induced renal damage [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4408.
- [19] 张志强. SOX9 在肾小管上皮细胞纤维化中作用及机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [20] Zhu F, Chong Lee Shin O, Pei G, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells employed exosomes to attenuate AKI-CKD transition through tubular epithelial cell dependent Sox9 activation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41): 70707-70726.
- [21] Kumar S. Cellular and molecular pathways of renal repair after acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2018, 93(1): 27-40.
- [22] 陈健文, 黄梦杰, 陈香美. 转录因子 SOX9 在肾病中作用的研究进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2020, 41(6): 634-637.
- [23] Nakagawa S, Nishihara K, Miyata H, et al. Molecular markers of tubulointerstitial fibrosis and tubular cell damage in patients with chronic kidney disease [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e136994.

[收稿日期]2021-02-04