

不同浓度甘氨酸铁对猪肾细胞铁调基因表达的调节作用

李美荃¹, 车丽涛², 佟荟全¹, 王 静¹, 姚丽媛¹, 郭荣富^{2*}

(1. 昆明学院农学与生命科学学院, 昆明 650214; 2. 云南农业大学动物科学技术学院/云南省动物营养与饲料重点实验室, 昆明 650201)

摘要:铁是新生动物重要的必需微量元素之一。铁营养对母猪胎儿生长发育和新生仔猪铁代谢具有重要生物学意义。本试验建立猪肾细胞缺铁模型补加甘氨酸铁, 通过荧光定量PCR检测促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO), 低氧诱导因子-1(Hypoxia-inducible factor, HIF-1)和血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)的基因表达情况, 研究甘氨酸铁对猪肾细胞铁代谢基因表达的影响。结果表明, 适宜浓度的去铁胺(Deferoxamine, DFO)可有效降低猪肾细胞内铁含量, 成功构建猪肾细胞缺铁模型。缺铁细胞添加甘氨酸铁可有效增加细胞内铁含量。添加甘氨酸铁可调控铁代谢基因EPO、HIF-1和VEGF的表达, 其信号传导通路需进一步研究。

关键词:甘氨酸铁; 去铁胺; 缺铁; 低氧诱导因子; 促红细胞生成素

中图分类号: S828; Q78

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)04-0088-04

Effects of Different Concentrations of Glycine Iron on the Expression of Iron-Regulated Gene in Pig Kidney Cells

LI Meiquan¹, CHE Litao², TONG Huiquan¹, WANG Jing¹, YAO Liyuan¹, GUO Rongfu^{2*}

(1. College of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming 650214; 2. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University/Yunnan Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed, Kunming 650201, China)

Abstract: Iron is one of the essential trace elements in newborn animals. Iron nutrition has important biological significance for the growth and development of sow fetus and the metabolism of newborn pig iron. In this study, Glycine Iron was added to the iron deficiency model of pig kidney cells, and the expression of EPO, HIF-1 and VEGF was detected by fluorescence quantitative PCR to study the effect of Glycine Iron on iron metabolism gene expression in pig kidney cells. The results showed that DFO with appropriate concentration can effectively reduce the content of iron in pig kidney cells, and the model of iron deficiency in pig kidney cells was successfully constructed. Glycine Iron was added to iron deficient cells to effectively increase the iron content in cells. Glycine Iron was added to regulate the expression of iron metabolism genes EPO, HIF-1 and VEGF. Its signal transduction pathways need further study.

Key words: Glycine Iron; DFO; Iron-deficiency; HIF; EPO

低氧和铁调节多种代谢进程^[1-2]。研究表明, 低氧对体外细胞低氧相关基因表达有重要影响^[3]。且铁缺乏可以进一步增强其与缺氧的相关性^[4-5]。缺铁有潜在的损害脯氨酸羟化酶(proline

hydroxylase, PHD)活性的效果, 加重低氧反应的作用。铁螯合剂去铁胺(Deferoxamine, DFO)可增强HIF基因中 α 亚基活性, 可能通过抑制PHD活性, 促进铁蛋白反应, 降低HIF-2 α 翻译^[6]。HIF可调节机体的缺氧反应, 例如, 通过诱导促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)和血管生长内皮因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)的基因表达, 以促进组织的氧气更大利用^[7-8]。相关报道也证实EPO在胎儿时期由肝脏分泌, 成体主要由肾脏分泌, EPO是调节红细胞生成的多肽类激素,

收稿日期: 2019-11-07

基金项目: 云南省科技计划项目(2018FH001-042); 云南省教育厅科学研究基金项目(2018JS390)

作者简介: 李美荃(1986-), 女, 讲师, 博士, 从事动物营养与饲料科学研究。

通讯作者: 郭荣富, 男, 博士, 教授, E-mail: rongfug@163.com

在氧气稀薄的高原,EPO可以通过促进红细胞生成,缓解因吸入空气氧浓度低而导致的慢性缺氧损伤^[9-10]。DFO在临床上作为铁的第一螯合剂^[11]。DFO分子量大,不容易穿透细胞^[12]。本试验以猪肾细胞为模型,研究缺铁情况下,甘氨酸铁及水平对猪肾细胞低氧适应及铁代谢基因的调节作用。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养

选用原代的猪肾细胞,以DMEM含血清培养液(10%胎牛血清)为基础培养液,在37℃、5%CO₂培养箱内培养。

1.2 DFO诱导建立猪肾细胞缺铁模型和细胞活力测定

在基础培养液中分别加入0(对照)、20、40、60、80、100、120、140、160、180 μmol/L DFO(每个处理3个重复),诱导细胞24 h产生缺铁应激,观察细胞状态,采用MTS法,收集汇合的细胞,接种于96孔培养板,每孔100 μL培养基加20 μL Cell Titer 96 AQueous One Solution Reagent,在37℃、5%CO₂环境下孵育1~4 h,490 nm下读取吸光度值。采用Iron Assay Kit检测细胞内铁含量。

在缺铁细胞板中移去培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗1次,添加0(对照)、20、40、80、160 μmol/L浓度水平的甘氨酸铁(Sigam,美国),24 h后检测培养液中细胞的HIF-1、EPO、VEGF基因mRNA的表达情况。其中NC组为空白对照组,未添加DFO,未做缺铁处理;其他组均做缺铁处理,其中甘氨酸添加浓度为80 μmol/L。

1.3 基因表达

1.3.1 总RNA提取

各细胞总RNA提取按照RNA simple Total RNA Kit(Takara, Japan)试剂盒说明书进行,每孔细胞加1 mL裂解液RZ,加入氯仿萃取,最后得到的总RNA溶解于超纯水中,总RNA的纯度与浓度分别用分光光度计在260 nm与280 nm下检测,A₂₆₀/A₂₈₀在1.8~2.0之间方可采用。

1.3.2 反转录

采用相同浓度的总RNA样品按试剂盒(TaKaRa, Japan)说明书要求配制RT反应液,总体积10 μL。用于实时荧光定量的RT产物(cDNA)于-20℃保存^[11]。

1.3.3 常规PCR反应结果

以提取的RNA反转录产物作为模板进行常规PCR反应,用2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产

物,基因PCR扩增产物条带清晰,无杂带,说明引物可以特异性地扩增出目的产物。

1.3.4 实时荧光定量PCR

上述cDNA用于实时荧光定量PCR相关内参基因β-actin以及目的基因。各基因序列见表1。

表1 RT-PCR引物信息

基因	引物(5'-3')	产物长度(bp)
VEGF (G)	F-CGAAGGTCTGGACTGTGT	117
	R-CATTTGTTGCTGCTAGGAA	
HIF-1 (H)	F-AAACAGAGCAGGAAAAGGA	80
	R-TCAAAGCGACAGATAACACA	
EPO (I)	F-CATTTGCTGTTGATACTTTGTG	107
	R-TCACCTGTCCCTTCTCCT	
β-actin	F-TCTGGCACCACACCTTCT	114
	R-TGATCTGGGTCATCTTCTCAC	

1.4 数据分析

猪肾细胞抑制率、细胞铁含量、细胞应激参数数据采用Microsoft Excel 2007处理,采用SPSS 19.0软件进行统计处理,结果用“平均数±标准差”表示,各处理间采用Duncan's法进行多重比较。

采用Livak等设计的比较阈值法测定目的基因的相对表达量。所有不同处理细胞的铁调节基因表达量均是以β-actin为内参基因,目的基因的量=2^{-ΔΔCt},ΔΔCt=[(Ct目的基因-Ct管家基因)试验组]-[(Ct目的基因-Ct管家基因)对照组],所以,2^{-ΔΔCt}表示的是试验组目的基因的表达相对于对照组变化的倍数,使用这一方法可以直接得到目的基因相对于管家基因的定量^[13]。试验数据采用SPSS 19.0软件进行统计处理,各处理间采用LSD One-Way ANOVA进行标准单因素方差分析,采用Sigma Plot 11.0软件画柱形图。

2 结果与分析

2.1 不同浓度DFO对猪肾细胞抑制率的影响

由图1可知,DFO作用24 h时,猪肾脏随着DFO浓度增加,添加时间延长,肾脏细胞抑制率升高。

2.2 DFO作用对猪肾细胞铁含量的影响

由图2可知,DFO作用24 h,随着DFO浓度升高,猪肾细胞铁含量随之降低。

综合图1、图2结果,根据细胞的死亡率及细胞铁含量分析,最终选择100 μmol/L和作用24 h为试验DFO浓度和考察时间,细胞抑制率相对较低。

2.3 甘氨酸铁对猪肾缺铁细胞培养液应激参数的影响

由图3可知,随甘氨酸铁浓度增加,猪肾细胞

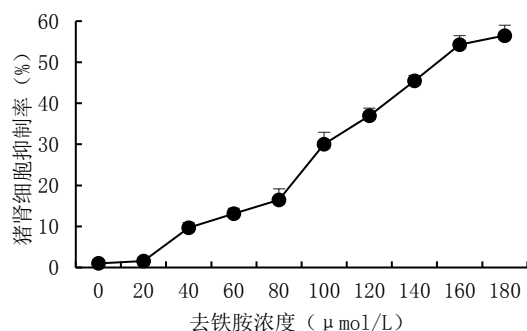


图1 不同浓度DFO对猪肾细胞抑制率的影响

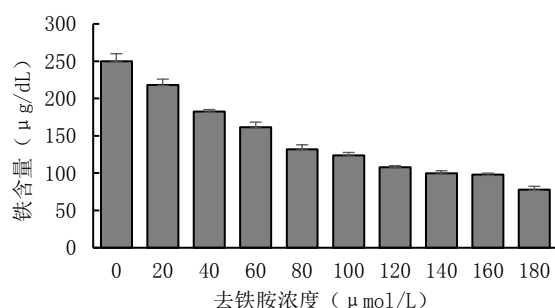
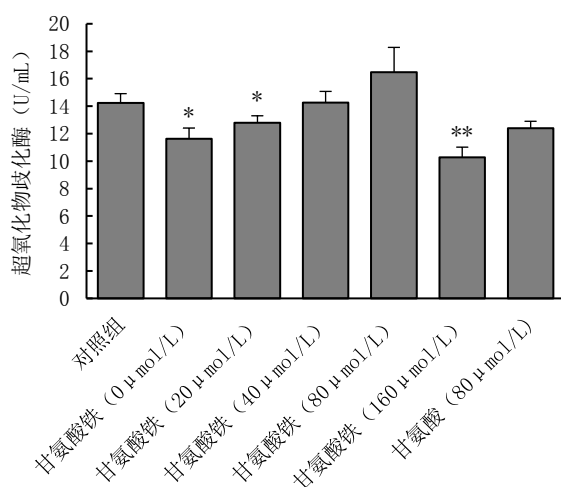


图2 不同浓度DFO对猪肾细胞铁含量的影响



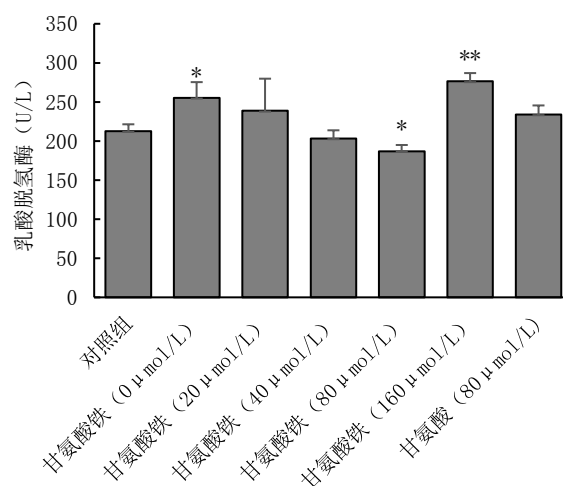
超氧化物歧化酶(SOD)含量先升高后降低,甘氨酸铁添加量为80 μmol/L, SOD含量最高。添加甘氨酸组与甘氨酸铁添加量为0时,无显著差异。随甘氨酸铁浓度增加,猪肾细胞乳酸脱氢酶(LDH)含量先降低后升高,甘氨酸铁添加量为80 μmol/L, LDH含量最低,甘氨酸铁添加量为160 μmol/L, LDH含量极显著高于对照组($P<0.01$)。

2.4 甘氨酸铁对猪肾细胞铁调节基因表达的影响

由图4可知,缺铁组EPO的表达量显著高于对照组($P<0.05$)。随着甘氨酸铁浓度的增加,EPO基因的表达量随之降低,甘氨酸铁添加量160 μmol/L时,EPO表达量最低。添加甘氨酸组与甘氨酸铁添加量为0时,无显著差异。

缺铁组HIF-1的表达量极显著高于对照组($P<0.001$)。随着甘氨酸铁浓度的增加,HIF-1基因的表达量随之降低,甘氨酸铁添加量160 μmol/L时,与对照组相比差异不显著。

缺铁组VEGF的表达量极显著高于对照组($P<$



注:“*”表示差异显著($P<0.05$),“**”表示差异极显著($P<0.01$),“***”表示差异极显著($P<0.001$),“****”表示差异极显著($P<0.0001$),猪肾细胞缺铁模型的建立,使用DFO的浓度为100 μmol/L,下同

图3 甘氨酸铁对猪肾细胞培养液应激参数的影响

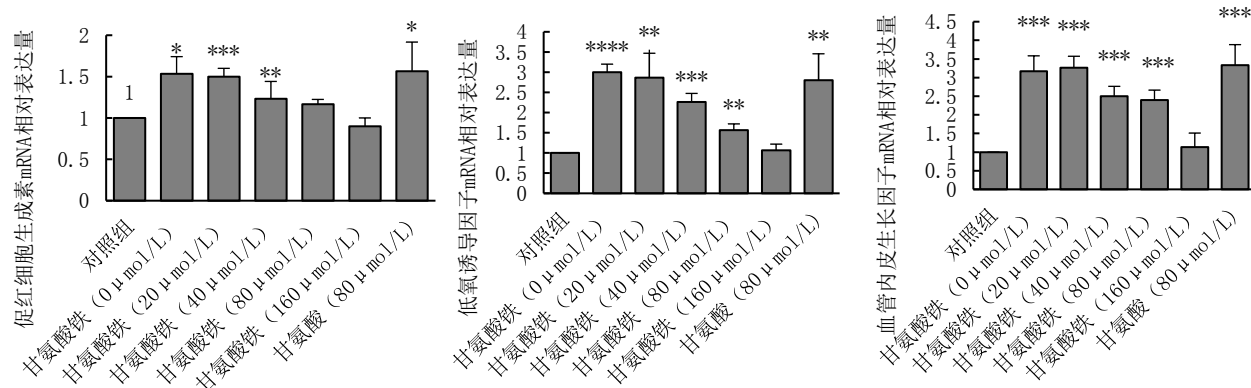


图4 添加甘氨酸铁对猪肾细胞铁代谢基因表达差异

0.0001)。随着甘氨酸铁浓度的增加, *VEGF* 基因的表达量随之降低, 甘氨酸铁添加量为 160 $\mu\text{mol/L}$ 时, *VEGF* 表达量最低, 与对照组相比无显著差异。

3 讨 论

3.1 不同浓度 DFO 对猪肾细胞抑制率及细胞铁含量的影响

DFO 添加浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, 作用时间为 24 h 时, 细胞抑制率相对较低。随着 DFO 浓度升高, 猪肾细胞铁含量降低。Paranee 等研究表明, DFO 作为铁螯合剂可减少大鼠肾脏铁的积累和降低氧化应激损伤^[14]。李红霞等使用 DFO 成功为人肝细胞建立缺铁模型, 可显著降低肝细胞内铁含量, 与本试验结果一致^[15]。

3.2 甘氨酸铁对猪肾缺铁细胞培养液应激参数的影响

SOD 在保护细胞免受氧自由基的毒害中发挥重要作用。SOD 几乎存在于所有生物细胞中, 通过把 O_2^- 转化为 H_2O_2 , H_2O_2 再被过氧化氢酶和氧化物酶转化为无害的水 (H_2O), 从而达到清除细胞内氧自由基, 保护细胞的目的。本试验结果显示, 猪肾缺铁细胞添加 80 $\mu\text{mol/L}$ 甘氨酸铁, SOD 含量最高, 随剂量添加, SOD 显著下降。推测可能由于过量铁源对肾脏细胞可产生氧化应激。

LDH 存在于猪体内的各个器官中, 是国际上常用的评价细胞存活、生长状态和损伤常用的检测指标。用于检测细胞整体损伤, 损伤细胞由于胞溶作用而使 LDH 释放于细胞外。本试验结果显示, 甘氨酸铁添加浓度过大时, LDH 呈上升趋势。推测甘氨酸铁含量过高时, 可对细胞产生损伤。

3.3 甘氨酸铁对猪肾细胞铁调节基因表达的影响

随着甘氨酸铁浓度的增加, *EPO* 基因的表达量随之降低。*EPO* 是一个多功能组织保护性细胞因子, 具有抗炎, 抗细胞凋亡, 促血管生成和免疫调节作用^[16]。在缺血再灌注损伤时, 每日给予 *EPO* 治疗, 可保护肾脏。有研究报道, 肾脏是生成 *EPO* 的主要器官。本试验结果显示, 缺铁时为增加红细胞生成, *EPO* 表达量会上升。

缺铁组 *HIF-1* 的表达量极显著高于对照组。随着甘氨酸铁浓度的增加, *HIF-1* 基因的表达量随之降低。因铁与氧密切相关, *HIFs* 和铁调节蛋白 (IRP) 是调节细胞氧和铁稳态关键介质, 试验结果表明, *HIF-1* 随铁浓度增加, 呈下降趋势。

缺铁组 *VEGF* 的表达量极显著高于对照组。随着甘氨酸铁浓度的增加, *VEGF* 基因的表达量随

之降低。*VEGF* 是内皮细胞生长因子, 在微血管通透性和血管生长中发挥重要作用^[17]。*CRP* 能增加 *VEGF* 在牛主动脉内皮细胞、人冠状动脉内皮细胞和单核细胞的表达^[18]。肾脏感染会导致 *VEGF* 表达下调^[19]。本试验结果显示, 缺铁组 *VEGF* 的表达量极显著高于对照组, *VEGF* 作为 *HIF-1* 的下游因子与 *HIF-1* 表达一致。

综上, 高原低氧环境下, 红细胞生成与铁、氧气的运输密切相关。*EPO* 是促红细胞生成素, 对红细胞生成与合成血红蛋白 (HGB) 具有重要调节作用, 而肾脏是 *EPO* 合成的主要靶组织。结合前期研究高原低氧环境下仔猪补铁试验, 为提高仔猪血红蛋白 (HGB) 含量和低氧适应性, 本试验以猪肾细胞为模型, 探索缺铁情况下, 甘氨酸铁对猪肾细胞低氧适应及铁代谢基因的调节作用。明确环境因素对高原仔猪的影响, 为探索高原仔猪 hepcidin 和 *EPO* 铁代谢的调节作用提供科学依据。

4 小 结

(1) DFO 可有效降低猪肾细胞铁含量, 成功建立猪肾细胞缺铁模型; 缺铁细胞随铁含量增加, SOD 增加, 适宜剂量铁极显著降低培养液 LDH。

(2) 缺铁细胞 *EPO*、*HIF-1* 和 *VEGF* 的表达量极显著高于对照组。随着甘氨酸铁浓度的增加, *EPO* 基因的表达量随之降低。缺铁有潜在的损害脯氨酸羟化酶 (PHDs) 活性的效果, 加重低氧反应的作用。DFO 可增强 *HIF-1* 基因中 α 亚基活性。诱导 *EPO* 和 *VEGF* 的基因表达。

参考文献:

- [1] Semenza G L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia[J]. Journal of Applied Physiology, 2000, 88(4): 1474-1480.
- [2] Bothwell T, Charlton R W, Cook J D, et al. Iron Metabolism in Man[J]. Blackwell Scientific Publications, 1979, 37(5): 599-606.
- [3] Manalo D J, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1[J]. Blood, 2005, 105(2): 659-669.
- [4] Chan D A, Sutphin P D, Denko N C, et al. Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1 α [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277 (42): 40112-40117.
- [5] Park S S, Bae I, Lee Y J. Flavonoids-induced accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF) -1 α /2 α is mediated through chelation of iron[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2008, 103(6): 1989-1998.
- [6] Collins J F, Franck C A, Kowdley K V, et al. Identification of differentially expressed genes in response (下转第 135 页)

- [J]. 干旱区资源与环境, 2018, 32(2): 75-80.
- [26] 曾国揆, 胡 觉, 王秀菊, 等. 沼气技术的减排效果与 CDM 项目合格性探讨[J]. 能源工程, 2006(5): 36-38.
- [27] 魏成金, 刘 谨, 郭军洋, 等. 农村户用沼气清洁发展机制项目减排量估算[J]. 广东农业科学, 2013, 40(18): 231-233.
- [28] 曾 锦. 典型沼气发酵生态系统甲烷转换因子计算模型的建立与研究[D]. 昆明: 云南师范大学, 2020.
- [29] 王明星, 李 晶, 郑循华. 稻田甲烷排放及产生、转化、输送机理[J]. 大气科学, 1998, 22(4): 600-612.
- [30] 政府间气候变化专门委员会. 2006 年 IPCC 国家温室气体清单指南[M]. 日本: 日本全球环境战略研究所(IGES), 2006: 10.47.
- [31] 卢学强, 马建立, 邓小文, 等. 农村畜禽粪便 CDM 项目温室气体减排的核算方法学研究[M]. 石家庄: 河北人民出版社, 2009: 555-560.
- [32] 李玉娥, 董红敏, 万运帆, 等. 规模化养鸡场 CDM 项目减排及经济效益估算[J]. 农业工程学报, 2009, 25(1): 194-198.

(责任编辑: 刘洪霞)

- (上接第 91 页) to dietary iron deprivation in rat duodenum[J]. AJP Gastrointestinal & Liver Physiology, 2005, 288(5): 964-971.
- [7] 梁楚婷, 郭炜骅, 谭 理, 等. 低氧诱导因子-1: 细胞适应氧供应改变的关键蛋白[J]. 生物化学与生物物理进展, 2019, 46(11): 1041-1049.
- [8] 张鹏华, 陈兰英. 低氧诱导因子-1 的转录活性调控及其信号传导[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(6): 863-867.
- [9] 孙 云, 关广聚. 促红细胞生成素的研究新进展[J]. 国外医学(内科学分册), 2004, 31(9): 385-387.
- [10] 于秀燕, 马宝新, 李跃荣, 等. 促红细胞生成素对重要系统保护作用的研究进展[J]. 海南医学院学报, 2019, 25(19): 82-86.
- [11] Hershko C. Pathogenesis and management of iron toxicity in thalassemia[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010, 1202: 1-9.
- [12] Chevon M. A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals[J]. Free Radical Biology & Medicine, 1988, 5(1): 27-37.
- [13] Schmittgen T D, Livak J K. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [14] Paranee Y, Noppawan P M, Urai C, et al. Iron distribution and histopathological study of the effects of deferoxamine and deferiprone in the kidneys of iron overloaded β -thalassemic mice[J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2016, 68(8): 427-434.
- [15] 李红霞. HCP1 在肝细胞血红素转运中的作用及影响因素研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
- [16] Hardee M E, Arcasoy M O, Blackwell K L, et al. Erythropoietin biology in cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2006, 12(2): 332-339.
- [17] Ferrara N, Gerber H P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors[J]. Nature Medicine, 2003, 9(6): 669-676.
- [18] Turu M M, Slevin M, Matou S, et al. C-reactive protein exerts angiogenic effects on vascular endothelial cells and modulates associated signalling pathways and gene expression[J]. BMC Cell Biology, 2008, 9(1): 47.
- [19] Yano K, Liaw P C, Mullington J M, et al. Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality[J]. Journal of Experimental Medicine, 2006, 203(6): 1447-1458.

(责任编辑: 刘洪霞)