

miR-451 通过 Akt 负向调控糖尿病肾病患者组织上皮间质转分化

郭红宝, 刘友霞, 贾俊亚, 闫铁昆*

(天津医科大学总医院 肾脏内科, 天津 300052)

摘要:目的 研究微小 RNA-451(miR-451)对糖尿病肾病组织上皮间质转分化(EMT)的影响。方法 取健康人肾脏组织和糖尿病患者肾脏组织,RT-qPCR 检测肾组织 mi-451、Akt 和 EMT 相关基因(E-钙黏素、波形蛋白和 α -平滑肌肌动蛋白)的表达;Western blot 和免疫组织化学染色(IHC)检测 Akt 和 EMT 相关蛋白的表达。结果 糖尿病肾病肾脏组织中 miR-451 和 E-钙黏素 mRNA 表达量显著低于正常肾组织($P<0.05$);Akt、vimentin 和 α -SMA mRNA 表达量显著增多($P<0.05$);Akt、vimentin 和 α -SMA 蛋白表达量显著增高($P<0.05$);E-钙黏素蛋白表达量显著降低($P<0.05$)。结论 糖尿病肾病时 miR-451 很可能通过 Akt 负向影响肾脏上皮间质转分化。

关键词: 糖尿病肾病;微小 RNA-451;上皮间质转分化

中图分类号:R34 文献标志码:A

miR-451 negatively regulates EMT of the diabetic nephropathy by Akt

GUO Hong-bao, LIU You-xia, JIA Jun-ya, YAN Tie-kun*

(Department of Nephrology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China)

Abstract: Objective To study microRNA-451 (miR-451)'s influence on diabetic nephropathy epithelial mesenchymal transdifferentiation (EMT). **Methods** Taking human healthy kidney tissues and diabetic nephropathy kidney tissues, real-time PCR was used to detect the expression of miR-451, Akt and EMT related genes (E-cadherin, vimentin and alpha smooth muscle actin) in different groups; Western blot and immuno-histochemical staining (IHC) were used to detect the expression of Akt and EMT related proteins in different groups. **Results** The expressions of miR-451 and E-cadherin mRNA significantly reduced in diabetic nephropathy kidney tissues as compared with healthy kidney tissues, and the expressions of Akt, vimentin and alpha-SMA mRNA significantly increased. The expressions of Akt, vimentin and alpha-SMA protein significantly increased, and the expression of E-cadherin protein decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusions** The miR-451 is likely to negatively influence diabetic nephropathy epithelial mesenchymal trans differentiation by Akt.

Key words: diabetic nephropathy; miR-451; epithelial-mesenchymal transformation

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类长约 22 个核苷酸的非编码单链小分子 RNA, 其在胚胎发育、组织分化、细胞增殖、侵袭和凋亡等多种过程中

发挥重要作用, 并参与了糖尿病肾病的关键基因的表达^[1]。糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病常见的且严重的微血管并发症之一, 是慢性

收稿日期: 2019-03-08 修回日期: 2019-12-06

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (8160030684)

* 通信作者 (corresponding author): 703571348@qq.com

肾功能衰竭的主要病因,最终导致肾小球硬化和间质纤维化^[2]。高血糖是糖尿病肾病最主要致病因素之一,诱导肾小管上皮间质转化(epithelial mesenchymal transformation, EMT)加速肾脏纤维化是 DN 发病的潜在机制之一。笔者前期研究表明 miR-451 对糖尿病肾病早期具有预防和保护作用, Akt 是 miR-451 的作用靶点^[3],其基因在肿瘤中通过各种信号通路促进上皮间质转化,加速恶性肿瘤侵袭和迁移;而糖尿病肾病中曲格列酮通过 PI3K/Akt 信号通路失活葡萄糖转运蛋白,延缓肾小管上皮间质转化的发生^[4]。有效延缓或阻断肾小球硬化和间质纤维化的进程是防治 DN 的关键。本文研究 miR-451 对糖尿病患者肾脏组织 EMT 的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

miR-451、U6 小 RNA、Akt、E-钙黏素、vimentin、 α -SMA 和 GAPDH 引物及定量 PCR 标准化试剂盒(上海吉玛制药技术有限公司);反转录试剂盒(Promega 公司);转染试剂(Roche 公司);Trizol 试剂(Invitrogn 公司);兔抗 Akt、vimentin、 α -SMA 和 E-钙黏素一抗(Santa Cruz 公司);鼠抗 GAPDH 一抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗鼠二抗、苏木精、伊红、一抗稀释液、生物素标记的组化二抗、辣根酶标记的卵白素三抗、DAB 显色试剂盒和中性树胶等试剂(北京中杉金桥生物技术有限公司);PVDF 膜(Amersham Life Sciences 公司);ECL 检测试剂盒(Pierce 公司);其余为国产分析纯试剂。

1.2 分组及组织来源

分为正常肾脏组织组(normal kidney tissue, NKT)和糖尿病肾病组织组。选取 IV 期,即临床糖尿病肾病期(diabetic nephrotic kidney tissue, DNKT)。两组肾脏组织均来源于外伤后泌尿外科术后破碎组织,并经天津医科大学总医院肾科病理实验室诊断。此研究经天津医科大学总医院伦理委员会批准(伦理字 201110 号),患者签署知情同意书。

1.3 方法

1.3.1 实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 检测

miR-451、Akt 和 EMT 相关基因的表达:提取各组组织的总 RNA,并反转录成 cDNA,分别用 miR-451 (5'-GCGGCGCAAAGAATTCTCCT-3', 5'-GGAACGC TTCACGAATTTG-3')、U6 (5'-ATTGGAACGATACA GAGAAGATT-3', 5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3')、Akt (5' -AGGACTGTAGGAGTGGACGATGGTGG-3', 5'-GCAGCGGATGATGAAGGTGTTGG-3')、E-cadherin (5'-TTTTTCATCTTCTCCTTCTCCTTCC-3', 5' -AGACT TTCAAACAGACAGCACCA-3')、vimentin (5'-TTGTC ACCCACTCTTCATTCATT-3', 5'-ATCAGTTCAGTTA GCCTGTTTCAG-3')、 α -SMA (5'-GTGTCAGCGTCCCT TGATTCCTC-3', 5'-GATGGGTCCATTTCAGTTGGTT GT-3') 和 GAPDH (5'-TGTGGGCATCAATGGATTT GG-3', 5'-ACACCATGTATTCCGGGTCAAT-3') 引物于荧光定量 PCR 仪进行 RT-qPCR 扩增,以 U6 和 GAPDH 为内参。扩增体系 20 μ L:2 \times 定量 PCR 缓冲液 10 μ L,引物体系 (5 μ mol/L) 0.8 μ L, ddH₂O 5 μ L, cDNA 4 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min(循环数 1);95 $^{\circ}$ C 12 s, 62 $^{\circ}$ C 60 s(循环数 40);62 $^{\circ}$ C ~ 95 $^{\circ}$ C, 以 0.2 $^{\circ}$ C/2 s 温度上升(循环数 1)。RT-qPCR 结果的判定: Δ Ct = Ct 目的基因 - Ct 内参, $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct 糖尿病组 - Δ Ct 正常组,转染组相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$,对照组相对表达量 = 1。

1.3.2 Western blot 和免疫组化检测 Akt 和 EMT 相关蛋白的表达:提取各组组织总蛋白,等量上样 SDS-PAGE 凝胶电泳,冰浴下 80 V 转膜 90 min。37 $^{\circ}$ C 温箱封闭 60 min,兔抗 Akt、E-钙黏素、vimentin 和鼠抗 α -SMA、GAPDH (1 : 500) 一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,室温复温 60 min,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和山羊抗鼠二抗 (1 : 2 000) 室温孵育 60 min,凝胶成像分析仪曝光。免疫组化:石蜡切片 70 $^{\circ}$ C 干烤过夜,顺序放入二甲苯 I、II 各 15 min,无水乙醇 I 和 II、95%乙醇、80%乙醇及蒸馏水各 15 min,脱蜡至水;0.01 mol/L 柠檬酸抗原修复缓冲液 (pH 6.0) 500 mL 预加热至 92 $^{\circ}$ C,放入切片,维持温度 92 $^{\circ}$ C ~ 98 $^{\circ}$ C,抗原修复 20 min,自然冷却至室温,ABC 法免疫组化染色^[3]。

1.4 统计学分析

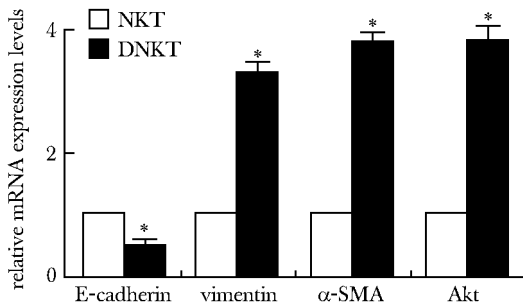
所有数据处理均采用 SPSS16.0 统计软件分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,两组比较采用

LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 miR-451 和 EMT mRNA 的表达

糖尿病组 miR-451 mRNA 的表达量为正常组的 30.33%, 显著降低 ($P < 0.05$); E-钙黏素 mRNA 的表达量 (0.48 ± 0.88) 也明显降低 ($P < 0.05$); Akt、vimentin 和 α -SMA mRNA 的表达量明显升高 ($P < 0.05$), 分别为 (3.80 ± 0.15), (3.82 ± 0.23), (3.30 ± 0.15) (图 1)。



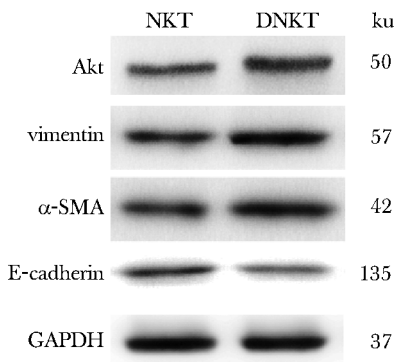
* $P < 0.05$ compared with NKT group

图 1 Akt 和 EMT 相关 mRNA 的表达量

Fig 1 Akt and EMT related mRNA expression level ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.2 糖尿病组 EMT 相关蛋白的表达

与正常组相比,糖尿病组 E-钙黏素蛋白表达量 (0.37 ± 0.03) 显著降低 ($P < 0.05$); Akt、vimentin 和 α -SMA 蛋白表达量明显增高 ($P < 0.05$), 分别为 (0.61 ± 0.04), (0.66 ± 0.03), (0.69 ± 0.05) (图 2)。



* $P < 0.05$ compared with NKT group

图 2 Akt 和 EMT 相关蛋白的表达水平

Fig 2 Akt and EMT related protein expression level ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.3 EMT 相关蛋白阳性评分

与正常组相比,糖尿病组 E-钙黏素蛋白阳性评分 (18.67 ± 1.76) 显著降低 ($P < 0.05$); vimentin、 α -SMA 蛋白阳性评分明显增高 ($P < 0.05$), 分别为 (52.33 ± 2.33), (48.67 ± 2.33) (图 3)。

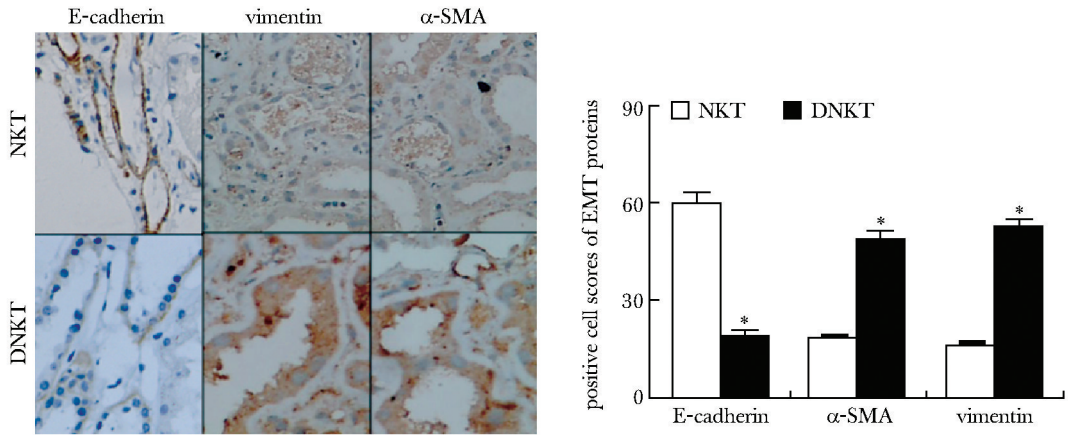
3 讨论

糖尿病肾病(DN)目前已成为终末期肾脏病的第 2 原因,仅次于各种肾小球肾炎^[5]。DN 临床分为 5 期,IV 期即临床(显性)DN 期,病情往往进行性发展,出现肾小管间质纤维化为主要特征的病理特点。

miRNAs 是一类长度为 19~25 个核苷酸序列的非编码 RNAs,参与了多种肾脏疾病,包括 DN、狼疮性肾炎、IgA 肾病、多囊肾及泌尿系肿瘤的发生发展过程^[6]。miR-451 对 DN 早期具有预防和保护作用,其作用机制尚不清楚。

EMT 作为 DN 最主要的病理变化,影响肾脏纤维化的进展。miRNAs 在 DN 发病机制中的作用远未阐明。miR-23b 靶向 HMGA2 下调 PI3K/Akt 信号通路活性抑制 DN EMT 的发生^[7]。14-3-3 ζ 蛋白能够磷酸化 Akt 的 Thr408 活化位点调控 Akt 活性,从而发挥其调控细胞增殖、迁移和代谢等功能^[8]。DN 是多因素综合作用的结果,因此,进一步研究抑制 TEMT 发生机制,对防治 DN 肾纤维化进展,保护肾功能具有重要意义。

本研究表明,与正常组相比,糖尿病组 miR-451



* $P < 0.05$ compared with NKT group

图3 EMT 相关蛋白阳性评分

Fig 3 EMT related protein positive score ($\times 100$)

mRNA 和 E-钙黏素 mRNA 的表达量明显降低, Akt、vimentin 和 α -SMA mRNA 的表达量明显升高; DNKT 组 E-钙黏素蛋白表达量显著降低, Akt、vimentin 和 α -SMA 蛋白表达量明显增高; DNKT 组

E-钙黏素蛋白表达量显著降低, vimentin、 α -SMA 蛋白表达量明显增高, 提示在 DN 中 miR-451 很可能通过靶向 Akt 负向调控 EMT 的进展。

参考文献:

- [1] Sun L, Sun J, Li X, *et al.* Understanding regulation of microRNAs on intestine regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* using high-throughput sequencing [J]. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 2017, 22: 1-9.
- [2] Zhang X, Lian X, Liang D, *et al.* Protective effect of Znt7 on high glucose-induced epithelial-to-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2018, 43: 500-512.
- [3] Guo H, Nan Y, Zhen Y, *et al.* miRNA-451 inhibits glioma cell proliferation and invasion by downregulating glucose transporter 1 [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37: 13751-13761.
- [4] Kuo CW, Chen HL, Tu MY, *et al.* Serum and urinary SOD3 in patients with type 2 diabetes: comparison with early chronic kidney disease patients and association with development of diabetic nephropathy [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 316: F32-F41.
- [5] 魏晓, 欧三桃. 综合防治, 延缓进展——2014 年版《中国糖尿病肾病防治专家共识》解读 [J]. *实用医学杂志*, 2016, 1: 1-3.
- [6] 李静, 梁田田, 王文健. 糖尿病肾病的早期诊断 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2017, 33: 470-475.
- [7] Xu J, Huang Z, Lin L, *et al.* miRNA-130b is required for the ERK/FOXO1 pathway activation-mediated protective effects of isosorbide dinitrate against mesenchymal stem cell senescence induced by high glucose [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35: 59-71.
- [8] 胡奕芳, 郭佳. 微小 RNA 在糖尿病肾病发生发展中的作用 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2018, 27: 168-173.