

## 基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000238

## miR-451 调控早期糖尿病肾病小鼠肾小球肥大的机制

彭 睿<sup>1</sup>, 周 吉<sup>2</sup>, 李天驹<sup>3</sup>, 孙 艳<sup>2</sup>, 尹 频<sup>2</sup>, 彭惠民<sup>4</sup>, 张 政<sup>2</sup>

(1. 重庆医科大学基础医学院生物信息学教研室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学基础医学院细胞生物学及遗传学教研室, 重庆 400016;

3. 重庆医科大学第一附属医院感染科, 重庆 400016; 4. 重庆医科大学实验教学中心, 重庆 400331)

**【摘要】目的:**观察 miR-451 对早期糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)db/db 小鼠肾脏形态学影响,探讨 miR-451 在 DN 发病机制中的作用。**方法:**采用 24 只 7 周龄雄性 db/db 小鼠和 8 只正常对照 db/m 小鼠依次分为未处理组、空质粒组、miR-451 组及对照组。腹腔注射法进行质粒注射处理 2 周后,光镜下观察肾小球形态学变化,实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测肾脏组织 miR-451 的表达水平,Western blot 和激光共聚焦检测肾脏组织中 miR-451 的靶基因酪氨酸-3 单氧化酶/色氨酸单氧化酶活化蛋白(tyrosine3-monooxy-genase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, Ywhaz)及其相关的丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径中 p38 丝裂原激活的蛋白激酶(p38MAPK)及其上游激酶 MKK3(MAPK kinase 3)的表达水平。**结果:**7 周龄 db/db 小鼠未处理组相比对照组出现高血糖且尿蛋白排泄率(urinary albumin excretion rate, UAE)增加,提示进入早期 DN 阶段,给予 30 mg/(kg·d)质粒注射实验 2 周。光镜观察和肾小球直径测量发现,miR-451 处理组肾小球形态减小( $P=0.000$ )。Real-time PCR 检测显示 miR-451 组小鼠肾脏组织中 miR-451 的表达水平增高 1.79 倍( $P=0.002$ ),Western blot 和激光共聚焦结果显示,miR-451 组较未处理组和空质粒组肾脏组织 Ywhaz 的表达受到下调,同时 p38MAPK 及上游激酶 MKK3 蛋白表达水平减少( $P$ 均 $=0.000$ )。**结论:**miR-451 可能通过直接靶向 Ywhaz 基因,调控 MAPK 途径中关键蛋白 p38MAPK、MKK3 的表达,从而抑制肾小球肥大,在 DN 发病机制中可能起着重要的作用。

**【关键词】**糖尿病肾病;微小 RNA;酪氨酸-3 单氧化酶/色氨酸单氧化酶活化蛋白;p38 丝裂原激活的蛋白激酶

**【中图分类号】**R394.2;R394.3;Q78

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2013-10-30

## Involvement of miR-451 in the regulation of glomerular hypertrophy in db/db mouse with diabetic nephropathy at early stage

Peng Rui<sup>1</sup>, Zhou Ji<sup>2</sup>, Li Tianju<sup>3</sup>, Sun Yan<sup>2</sup>, Yin Pin<sup>2</sup>, Peng Huimin<sup>4</sup>, Zhang Zheng<sup>2</sup>

(1. Teaching and Research Section of Bioinformatics, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University;

2. Teaching and Research Section of Cell Biology and Genetics, College of Basic Medicine, Chongqing Medical

University; 3. Department of Infectious Disease, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

4. Center of Experiment Teaching, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To observe the effect of miR-451 on glomerular morphological changes in diabetic nephropathy (DN) of type 2 diabetic db/db mice and to explore the role of miR-451 in pathogenesis of early DN. **Methods:** Thirty-two 7-week-old db/db and normal db/m male mice were divided into miR-451 group, empty plasmid group, untreated group and normal control group. After intraperitoneal injection of plasmid for two weeks, the glomerular morphological changes were observed under the light microscope. Also, the expression of miR-451 was tested by real-time PCR and the tyrosine3-monooxy-genase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein (Ywhaz), p38MAPK and MAPK kinase 3 (MKK3) protein levels were examined by Western blot and immunofluorescence.

**Results:** Elevation of urinary albumin excretion rate (UAE) was shown in the untreated group of 7-week-old db/db mice, suggesting

作者介绍: 彭 睿, Email: larodarchillwind@aliyun.com,

研究方向: microRNA 调控糖尿病肾病的分子机制研究。

通信作者: 张 政, Email: zhangzheng92@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: NSFC.81270912);

重庆市科委自然科学基金面上资助项目(编号: cstc2013jcy-

ja10044); 重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:

KJ110304)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000238.html>

that the 7-week-old db/db mice had the features similar to the diabetic nephropathy at early stage. Then plasmid injection experiment was executed on mice for two weeks. Real-time RT-PCR results showed that miR-451 was 1.79 folds high in miR-451 group than in empty plasmid group ( $P=0.002$ ). Also, glomeruli acreage was smaller in miR-451-treated group than in the empty plasmid and untreated groups ( $P=0.000$ ). Moreover, Western blot and immunofluorescence results demonstrated that

Ywhaz, p38MAPK and MKK3 proteins were reduced in miR-451 group ( $P=0.000$ ). **Conclusion:** miR-451 can repress glomerular hypertrophy by targeting Ywhaz gene and affecting MAPK signal pathway. Therefore, miR-451 might play an important role in the pathogenesis of DN.

【Key words】diabetic nephropathy; microRNA; tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein; p38 mitogen-activated protein kinase

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病常见慢性微血管并发症之一,在过去的 10 年时间里 DN 的发生率已上升了近两倍,约占终末肾衰竭的 50%<sup>[1]</sup>,严重影响糖尿病患者健康。近几年研究提出在其发病机制中存在一些后生的影响,如微小 RNA(microRNAs, miRNAs)。miRNAs 是一类内源性的具有调控功能的非编码单链 RNA,通过碱基互补配对的方式识别靶 mRNA,并根据互补程度的不同指导沉默复合体降解靶 mRNA 或者阻遏靶 mRNA 的翻译。最近的研究表明 miRNA 的异常表达及活动与许多疾病的发生发展相关,在 DN 中也起着重要的作用<sup>[2]</sup>。有报道 miR-377 的过度表达可以增加纤连蛋白和血管内皮因子的产生,影响肾小球形态学的变化<sup>[3]</sup>;miR-192 是慢性 DN 中显著下调的 miRNA,通过抑制 E 盒结合锌指蛋白 1/2(zinc finger E-box binding homobox proteins 1 and 2, Zeb1/2) 的表达,促进型胶原表达增加,造成基质胶原堆积,最终导致 DN 的发生<sup>[4]</sup>;miR-29 在转化生长因子  $\beta$  的抑制作用下,促进胶原蛋白的表达,造成肾小球细胞肥大和肾纤维化<sup>[5]</sup>;miR-200 促进转化生长因子  $\beta$  表达增加,造成肾小管上皮间质转化和纤维化,导致 DN 的发生<sup>[6]</sup>;本课题前期也报道了一些 miRNAs 与 DN 相关<sup>[7-8]</sup>。提示 miRNA 与 DN 密切相关。

本研究以前期 microRNA 芯片、real-time PCR 技术筛选 DN 相关 miRNAs-miR-451,以双荧光素酶报告系统验证的色氨酸单氧化酶活化蛋白(tryptophan 5-monooxygenase activation protein, Ywhaz)为其靶基因为基础,通过注射质粒于早期糖尿病 DN 模型 db/db 小鼠观察 miR-451 对肾脏形态学变化,检测 Ywhaz 蛋白及其相关的丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)途径中关键蛋白 p38MAPK、MKK3 表达的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物及分组

4 周龄的雄性 2 型糖尿病模型 db/db 小鼠 24 只及同龄

正常对照 db/m 小鼠 8 只,均购于中国科学院上海实验动物中心。本实验室在空质粒 pGenesil-1(武汉晶赛生物工程公司)基础上已成功构建重组 pGenesil-miR-451 质粒。动物均饲养于层流柜中,所有食物及器具消毒后使用,严格无菌操作。小鼠自由饮水、摄食,每天更换垫料,保持垫料干燥。待小鼠适应新环境后每 2 周检测其体质量、血糖、24 h 尿蛋白排泄量,直到 db/db 小鼠出现蛋白尿高于 db/m 小鼠,即进入早期 DN(7 周龄)。随后,将实验动物分为 4 组,每组各 8 只:对照组(正常未处理的 db/m 小鼠)、未处理组(未处理 db/db 小鼠)、空质粒组(注射空质粒 pGenesil-1 的 db/db 小鼠)、miR-451 组(注射重组 pGenesil-miR-451 质粒的 db/db 小鼠)。每天给 miR-451 组和空质粒组 db/db 小鼠腹腔分别注射 30 mg/(kg·d)量的 pGenesil-miR-451 和 pGenesil-1 空质粒,持续 2 周。2 周后,处死小鼠,检测相关指标。所有动物实验遵循重庆医科大学伦理委员会规定进行。

当 db/db 小鼠随机血糖  $\geq 11.1$  mmol/L(世界卫生组织, 1999),24 h 尿蛋白与 db/m 正常小鼠无明显差异时,视为 2 型糖尿病阶段;继续喂养,当持续高血糖并检测到 24 h 蛋白尿明显高于 db/m 小鼠时,视为 2 型 DN 阶段<sup>[9]</sup>。

### 1.2 生化指标检测

每 2 周检测小鼠体质量、血、尿标本,饲养的小鼠隔夜不进食,清晨断尾取全血,用小鼠代谢笼收集 24 h 尿液,血糖和 24 h 蛋白尿均通过自动生化仪检测(Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan)。

### 1.3 Real-time PCR 检测 miR-451 的表达

采用 Trizol 法提取小鼠肾脏组织总 RNA。采用 TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription kit 进行逆转录反应。逆转录反应总体系 15  $\mu$ l,其中 100 mmol/L dNTPs 0.15  $\mu$ l, Multi-Scribe<sup>™</sup> 逆转录酶(50 U/ $\mu$ l)1  $\mu$ l, 10 $\times$  逆转录缓冲液 1.5  $\mu$ l, RNA 酶抑制剂(20 U/ $\mu$ l)0.19  $\mu$ l, 无酶水 4.16  $\mu$ l, RNA(2 ng)5  $\mu$ l, RT 引物 3  $\mu$ l。逆转录反应条件:16  $^{\circ}$ C 30 min; 42  $^{\circ}$ C 30 min; 85  $^{\circ}$ C 5 min; 4  $^{\circ}$ C 放置。应用 TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assays real-time PCR 试剂盒,以小鼠 snoRNA202 作为内标, miRbase 登录号: AF357327, 序列: GCTGTACTGACTTGATGAAAGTAC-TTTTGAACCCTTTCCATCTGATG。引物均由 Applied Biosystems 公司合成,反应参照试剂盒说明书进行。mmu-miR-451(miRbase 登录号: MIMAT0001632), 序列: AAACCGUUAAC-AUUACUGAGUU。PCR 反应体系为 10  $\mu$ l,其中 TaqMan 2 $\times$  Universal PCR Master Mix(含引物)5  $\mu$ l, 20 $\times$  TaqMan MicroRNA Assay Mix 0.5  $\mu$ l, 无酶水 3.8  $\mu$ l, RT 反应液 0.7  $\mu$ l。反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 2 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。每个检验指标做 3 个复孔。用 2 <sup>$-\Delta\Delta C_t$</sup>  法( $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t, \text{miR-451 组}} - \Delta C_{t, \text{空质粒组}}$ )相对定量 miR-451 的表达水平<sup>[10]</sup>。

#### 1.4 肾组织形态学观察

组织从活体取材后切成约 1 mm<sup>3</sup> 大小的组织块,经固定、脱水、浸透包埋,制成石蜡切片,进行 HE 染色后,光镜下观察小球形态学变化。取甲醛固定的肾脏组织切片,显微测量尺检测肾小球直径,在 3 个不同的视野中(每 100 个肾小球为 1 组)取其平均值。

#### 1.5 激光共聚焦检测

取小鼠肾脏组织 4%多聚甲醛固定 4 h,用恒冷箱切片机切成 14 μm 的切片,贴于明胶玻片。室温干燥 30 min 后,放入 -20 ℃ 保存。切片用含有 5% BSA,5% 正常山羊血清及 1% Triton X-100 的 0.01 mol/L PBS 封闭 2 h。分别将兔多克隆抗体 Ywhza(1:400)或鼠单克隆抗体 p-p38 MAPK(1:100)和兔多克隆抗体 p-MKK3 混合后抗体终浓度各为 1:100。加入一抗后室温过夜,用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。将 FITC 标记抗鼠 IgG 第二抗体(1:400)和 TRITC 标记抗兔 IgG 第二抗体(1:600)混合,加入二抗后室温孵育 2 h。0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,5%甘油封片,激光共聚焦扫描显微镜观察结果。

#### 1.6 Western blot 检测

RIPA 组织裂解液提取小鼠肾脏组织总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,15%SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗(兔多克隆抗体 Ywhza(sc-1019)(1:1 000),鼠单克隆抗体 p-p38 MAPK(sc-7973)(1:500),兔多克隆抗体 p-MKK3(sc-293107)(1:500)及内参鼠单克隆抗体 β-actin(1:2 000)孵育 4 ℃ 过夜,二抗(羊抗兔 IgG/HRP(1:500)(北京中杉金桥)和羊抗小鼠 IgG/HRP(1:500)(北京中杉金桥)常温孵育 1 h,ECL 化学发光试剂显色。结果图像输入计算机,利用北航 CM-2000B 型生物医学图像分析系统检测条带的积分灰度值。用 β-actin 为内参照进行校正,各条带的光密度值与 β-actin 蛋白条带的光密度值之比进行半定量分析。

#### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 进行统计分析,计量资料均采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,4 组间比较用单因素方差分析,两独立样本均数比较采用 *t* 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

#### 2.1 小鼠一般情况

进入实验的 4 周龄 db/db 小鼠已出现高血糖,而相比于

db/m 小鼠,其尿蛋白排泄率(urinary albumin excretion rate, UAE)开始变化。此阶段的 db/db 小鼠的病理特征与糖尿病相同,故认为可代表 2 型糖尿病阶段;未处理的 db/db 小鼠在 7 周龄时,相比于正常组小鼠,其 UAE 增加,认为可代表 DN 早期阶段<sup>[9]</sup>。

以 30 mg/(kg·d)的注射量给 7 周龄 db/db 小鼠质粒处理 2 周后,在 3 组 db/db 小鼠在体质量、随机血糖、UAE 无明显变化(表 1)。提示 db/db 小鼠体内 miR-451 的过表达对体质量、血糖、UAE 的影响不大。

#### 2.2 Real-time PCR 检测 miR-451 的表达水平

在注射 miR-451 和空质粒的小鼠肾脏组织中,进行 Real-time PCR 检测,miR-451 标准化 Ct 值  $22.50 \pm 0.67$ ,空质粒组标准化 Ct 值为  $21.71 \pm 0.51$ ,miR-451 组较空质粒组 miR-451 表达增高( $t=4.656, P=0.002$ )。2 组平均  $\Delta\Delta Ct$  为  $0.84 \pm 0.14$ ,如图 1 所示,miR-451 组较空质粒组 miR-451 表达增高 1.79 倍。结果表明,通过腹腔注射方法可以使 db/db 小鼠肾组织中高表达 miR-451。

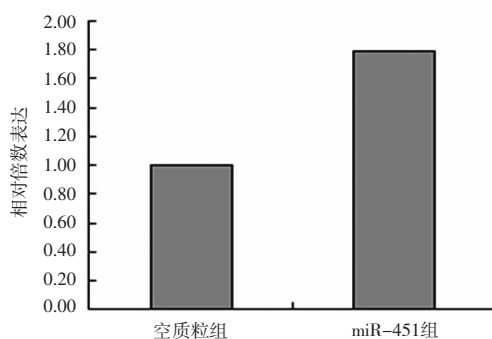


图 1 Real-time PCR 检测 miR-451 表达水平

Fig.1 Real-time PCR results of miR-451 expression

#### 2.3 miR-451 对肾小球形态学的影响

光镜下观察及通过对肾小球直径测量实验发现,空质粒组、未处理组的肾小球大于正常对照 db/m 小鼠[(49.88 ± 3.02)、(52.41 ± 2.79) vs. (38.22 ± 2.96) μm]( $F=669.868, P=0.000$ ),提示在 DN 早期 db/db 小鼠肾小球增大是早期肾脏形态学发生改变的特征之一。而 miR-451 处理组肾小球[(41.45 ± 2.79) μm]较空质粒组和未处理组均减小( $F=399.828, P=0.000$ ),表明高表达 miR-451 对肾小球肥大具有抑制作用。

表 1 小鼠体质量、血糖及 24 h 尿蛋白排泄量检测

Tab.1 Detection of body weight, blood glucose and 24 h UAE of mice

| 组别         | 体质量 (g)                 |                         | 血糖 (mmol/l)             |                         | UAE (μg/24 h)            |                          |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|            | 注射前 (7 周龄)              | 注射后 (9 周龄)              | 注射前 (7 周龄)              | 注射后 (9 周龄)              | 注射前 (7 周龄)               | 注射后 (9 周龄)               |
| 对照组        | 15.2 ± 1.9              | 18.5 ± 1.6              | 8.4 ± 1.1               | 9.6 ± 0.8               | 11.3 ± 1.4               | 12.1 ± 2.0               |
| 未处理组       | 31.5 ± 4.6 <sup>a</sup> | 39.8 ± 5.4 <sup>a</sup> | 18.3 ± 2.1 <sup>a</sup> | 27.4 ± 3.3 <sup>a</sup> | 70.9 ± 8.4 <sup>a</sup>  | 93.3 ± 11.5 <sup>a</sup> |
| 空质粒组       | 30.2 ± 4.3 <sup>a</sup> | 33.6 ± 5.8 <sup>a</sup> | 19.8 ± 1.5 <sup>a</sup> | 26.9 ± 2.8 <sup>a</sup> | 79.4 ± 9.2 <sup>a</sup>  | 89.2 ± 12.7 <sup>a</sup> |
| miR-451 组  | 26.4 ± 5.7 <sup>a</sup> | 37.0 ± 4.1 <sup>a</sup> | 21.1 ± 1.7 <sup>a</sup> | 28.3 ± 2.5 <sup>a</sup> | 77.6 ± 10.3 <sup>a</sup> | 82.5 ± 10.4 <sup>a</sup> |
| <i>F</i> 值 | 22.920                  | 28.959                  | 100.871                 | 98.799                  | 128.416                  | 115.247                  |
| <i>P</i> 值 | 0.000                   | 0.000                   | 0.000                   | 0.000                   | 0.000                    | 0.000                    |

注:a,与对照组相比  $P<0.01$

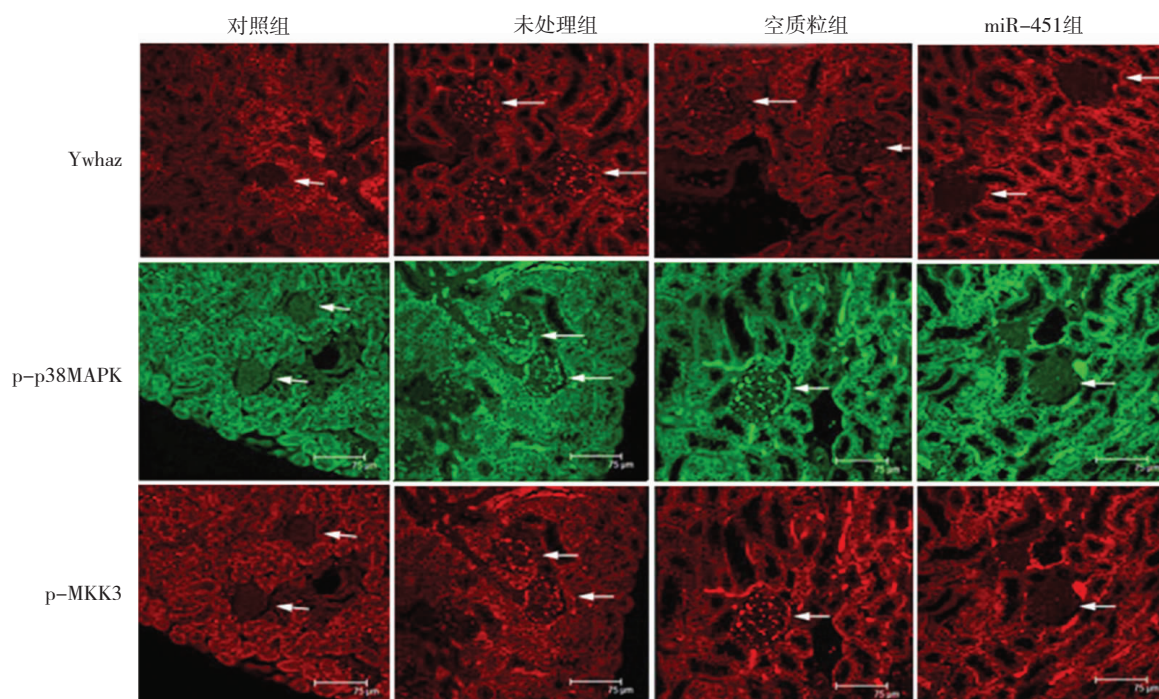


图2 激光共聚焦检测各组肾脏 Ywhaz、p-pMAPK、p-MKK3 蛋白的表达 (IF, 400 ×)

Fig.2 Immunofluorescence staining of the expression of Ywhaz, p-p38 MAPK and p-MKK3 in kidneys in various groups (IF, 400 ×)

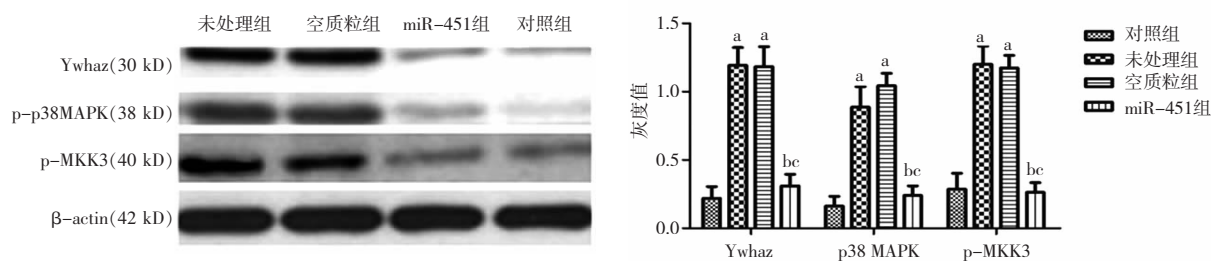
a, 与对照组相比  $P < 0.01$ ; b, 与未处理组相比  $P < 0.01$ ; c, 与空质粒组相比  $P < 0.01$ 

图3 Western blot 检测肾脏 Ywhaz、p-p38 MAPK 及 p-MKK3 蛋白的表达

Fig.3 Effect of miR-451 on Ywhaz, p-p38 MAPK and p-MKK3 protein expression in kidney detected by Western blot

#### 2.4 激光共聚焦检测结果

激光共聚焦结果显示, 未处理组和空质粒组肾脏组织 Ywhaz、p-p38MAPK、p-MKK3 蛋白均较对照组增高, 但 miR-451 组 Ywhaz、p-p38MAPK、p-MKK3 蛋白表达较空质粒组和未处理组减少(图 2), 提示高表达 miR-451 可抑制 DN 小鼠肾脏 Ywhaz 表达, 进而降低相关 MAPK 信号途径关键蛋白 p38 MAPK 和 MKK3 的表达, 可能是其延缓肾小球肥大的重要机制。

#### 2.5 Western blot 检测 Ywhaz、p-p38MAPK、p-MKK3 蛋白的表达

Western blot 结果显示 Ywhaz 在空质粒组和未处理组肾脏组织较对照组表达增高, 而在 miR-451 组较空质粒组和未处理组降低。同时, p-p38MAPK 在空质粒组和未处理组较对照组表达增高, 而在 miR-451 组 p-p38MAPK 蛋白表达较空质粒组和未处理组减少。此外, p-MKK3 在空质粒组和未

处理组较对照组表达增加, 而在 miR-451 组较空质粒组和未处理组减少。由此提示 miR-451 高表达后可抑制 DN 小鼠肾脏 MAPK 信号途径关键蛋白 Ywhaz、p38 MAPK 和 MKK3 的表达(见表 2, 图 3A、3B)。

表 2 Ywhaz、p-p38MAPK、p-MKK3 蛋白在各组间表达情况

Tab.2 Ywhaz, p-p38MAPK, p-MKK3 protein expression in each group

| 组别        | Ywhaz                     | p-p38MAPK                 | MKK3                      |
|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 对照组       | 0.22 ± 0.09               | 0.16 ± 0.07               | 0.29 ± 0.12               |
| 未处理组      | 1.19 ± 0.13 <sup>a</sup>  | 0.89 ± 0.15 <sup>a</sup>  | 1.20 ± 0.13 <sup>a</sup>  |
| 空质粒组      | 1.18 ± 0.15 <sup>a</sup>  | 0.84 ± 0.09 <sup>a</sup>  | 1.17 ± 0.11 <sup>a</sup>  |
| miR-451 组 | 0.31 ± 0.12 <sup>bc</sup> | 0.24 ± 0.10 <sup>bc</sup> | 0.26 ± 0.13 <sup>bc</sup> |
| F 值       | 57.715                    | 39.301                    | 55.639                    |
| P 值       | 0.000                     | 0.000                     | 0.000                     |

注: a, 与对照组相比  $P < 0.01$ ; b, 与未处理组相比  $P < 0.01$ ; c, 与空质粒组相比  $P < 0.01$

### 3 讨论

持续的蛋白尿(>300 mg/d 或>200  $\mu$ g/min)、持续高血糖、肾小球过滤率下降是 DN 的重要标志。DN 病变组织在显微镜下观察一般伴有小管间质纤维化、肾小球基底膜增厚、足状突细胞融合、系膜细胞肿胀、细胞外基质堆积等特征<sup>[11]</sup>。近年来已有报道,调控基因 miRNA 的异常活动可能导致 DN 疾病的发生发展,在动物模型中抑制一些在 DN 中上调的 miRNAs,也可以减轻蛋白尿及系膜基质堆积。提示对 miRNA 的调控可能对预防和减缓 DN 病程发展有帮助。

近年 miR-451 在多种癌症、心脏、血液病中均有报道<sup>[12-15]</sup>。前期工作芯片筛查中发现 miR-451 在 DN 小鼠肾脏组织中下调,这与 Bimpaki 等<sup>[16]</sup>在人大结节性肾上腺皮质病变组织中检测的 miR-451 下调结果一致。提示在 DN 中 miR-451 很可能是重要的调控分子。

本课题组前期采用生物信息学方法预测找到了 miR-451 的 5 个潜在靶基因,其中 Ywhaz 基因其 3'UTR 序列与成熟 miR-451 的种子区域(第 2~8 个核苷酸序列)功能序列相结合,引起特别注意。而后进一步通过实验研究验证了 miR-451 直接靶向 Ywhaz 基因<sup>[17]</sup>。Ywhaz(又称 14-3-3 $\zeta$  蛋白)属于 14-3-3 蛋白家族成员,具有高度保守性,广泛存在于真核生物体内,可在神经组织、心、肝、肾、小肠等多个组织中表达。已有报道,在多种细胞中 miR-451 可负向调控 Ywhaz 蛋白的表达<sup>[18-19]</sup>。同时,Ywhaz 与糖尿病关系密切,Ywhaz 能通过 SH2 功能域与胰岛素受体底物 1 相互作用,阻断胰岛素受体信号途径并影响胰岛素敏感性<sup>[20]</sup>。此外,Ywhaz 在一定病理条件下与细胞增殖密切相关<sup>[21-22]</sup>。有研究发现,在 1 型糖尿病病模型鼠 NOD 小鼠中 Ywhaz 表达下降,提示糖尿病时 Ywhaz 的表达即有改变<sup>[23]</sup>。结合本实验结果糖尿病肾病时 Ywhaz 蛋白水平升高,提示 Ywhaz 蛋白水平升高可能是糖尿病肾病所致。进一步研究发现,过表达 miR-451 后,肾小球直径减小,Ywhaz 蛋白表达下降,表明 miR-451 可减缓肾小球肥大的出现,其机制可能与负性调控 Ywhaz 有关。

p38MAPK 蛋白最初被认为是在缺氧、高渗、紫外线、氧化自由基等应激因素下会被激活<sup>[24]</sup>,后来被

证实了在一些激素或生长因子的作用下也会被激活<sup>[25-26]</sup>。Furtado 等<sup>[27]</sup>报道了胰岛素能够增强 p38MAPK 的磷酸化,体内注射胰岛素的治疗,肾脏中 p38MAPK 的活性会增加 2.4 倍,p38MAPK 参与了对葡萄糖转运蛋白 4 的调控。

Ywhaz 能在 raf-MAPK 途径发挥重要作用,能够刺激苏氨酸/丝氨酸激酶 raf1 的活化,使 MAPKK 磷酸化,导致 MAPK 受刺激,从而引起细胞生长、分化、癌变<sup>[28]</sup>。也有研究发现,树突状细胞中 miR-22 靶向的 Ywhaz 能干扰 MAPK 途径<sup>[29]</sup>。此外,本实验中发现 miR-451 的过表达会引起 p38MAPK 及上游激酶 MKK3 蛋白的表达同时降低。本结果与 Xing 等的相关研究结果一致,他们发现 14-3-3 家族的过表达将增加 p38MAPK 的活性,14-3-3 通过调节激活 p38MAPK 的能力促进凋亡<sup>[30]</sup>,以上均提示 miR-451 可能靶向抑制 Ywhaz,继而下调 MAPK 信号关键蛋白 p38MAPK 和 MKK3 的表达,从而在 DN 中减缓系膜增生,抑制肾小球的肥大。

因此, DN 中 miR-451 通过对 Ywhaz 蛋白负向调控,从而调节 MAPK 途径,抑制肾小球的表型转化,对 DN 起着保护性作用。可见,若针对 miR-451 特异性分子进行靶药物治疗,可以抑制 MAPK 信号通路的激活,有可能是 DN 防治的新策略。但 miRNA 对疾病相关基因的调控是复杂的,一个 miRNA 可能调控多个靶基因及多个 miRNA 调控一个靶基因的协调效应的网络调控机制还需要进一步研究。

### 参考文献

- [1] Kanwar YS, Sun L, Xie P, et al. A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy[J]. *Annu Rev Pathol*, 2011(6):395-423.
- [2] Alvarez ML, DiStefano JK. The role of non-coding RNAs in diabetic nephropathy: potential applications as biomarkers for disease development and progression[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2012, 99(1):1-11.
- [3] Wang Q, Wang Y, Minto AW, et al. MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy[J]. *FASEB J*, 2008, 22(12):4126-4135.
- [4] Kato M, Zhang J, Wang M, et al. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF- $\beta$ -induced collagen expression via inhibition of E-box repressors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9):3432-3437.
- [5] Wang B, Komers R, Carew R, et al. Suppression of microRNA-29 expression by TGF- $\beta$ 1 promotes collagen expression and renal fibrosis

- [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(2): 252–265.
- [6] Wang B, Koh P, Winbanks C, et al. miR-200a Prevents renal fibrogenesis through repression of TGF- $\beta$ 2 expression[J]. *Diabetes*, 2011, 60(1): 280–287.
- [7] Zhang Z, Peng H, Chen J, et al. MicroRNA-21 protects from mesangial cell proliferation induced by diabetic nephropathy in db/db mice[J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(12): 2009–2014.
- [8] 张政, 罗勇军, 彭惠民, 等. 早期糖尿病肾病相关微小 RNA 在小鼠肾脏的表达变化[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(13): 1383–1386.
- [9] Makino H, Miyamoto Y, Sawai K, et al. Altered gene expression related to glomerulogenesis and podocyte structure in early diabetic nephropathy of db/db mice and its restoration by pioglitazone[J]. *Diabetes*, 2006, 55(10): 2747–2756.
- [10] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [11] Nishi S, Ueno M, Hisaki S, et al. Ultrastructural characteristics of diabetic nephropathy[J]. *Med Electron Microsc*, 2000, 33(2): 65–73.
- [12] Zhu H, Wu H, Liu X, et al. Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(5): 582–588.
- [13] Li X, Sanda T, Look AT, et al. Repression of tumor suppressor miR-451 is essential for NOTCH1-induced oncogenesis in T-ALL[J]. *J Expe Med*, 2011, 208(4): 663–675.
- [14] Zhang X, Wang X, Zhu H, et al. Synergistic effects of the GATA-4-mediated miR-144/451 cluster in protection against simulated ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte death[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 49(5): 841–850.
- [15] Rasmussen KD, Simmini S, Abreu-Goodger C, et al. The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(7): 1351–1358.
- [16] Bimpaki EI, Iliopoulos D, Moraitis A, et al. MicroRNA signature in massive macronodular adrenocortical disease and implications for adrenocortical tumorigenesis[J]. *Clinical Endocrinol (Oxf)*, 2010, 72(6): 744–751.
- [17] 查何, 彭惠民, 马晶, 等. miR-451 靶向调控肾小球系膜细胞 Ywhaz 基因的表达[J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(8): 1107–1112.
- [18] Patrick DM, Zhang CC, Tao Y, et al. Defective erythroid differentiation in miR-451 mutant mice mediated by 14-3-3 $\zeta$ [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(15): 1614–1619.
- [19] Bergamaschi A, Katzenellenbogen BS. Tamoxifen downregulation of miR-451 increases 14-3-3 $\zeta$  and promotes breast cancer cell survival and endocrine resistance[J]. *Oncogene*, 2012, 31(1): 39–47.
- [20] Oghara T, Isobe T, Ichimura T, et al. 14-3-3 protein binds to insulin receptor substrate-1, one of the binding sites of which is in the phosphotyrosine binding domain[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(40): 25267–25274.
- [21] Lin M, Morrison CD, Jones S, et al. Copy number gain and oncogenic activity of YWHAZ/14-3-3 $\zeta$  in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(3): 603–611.
- [22] Nishimura Y, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Overexpression of YWHAZ relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of gastric carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(6): 1324–1331.
- [23] Wu J, Kakoola DN, Lenchik NI, et al. Molecular phenotyping of immune cells from young NOD mice reveals abnormal metabolic pathways in the early induction phase of autoimmune diabetes[J]. *PloS one*, 2012, 7(10): e46941.
- [24] Rappsilber J, Siniosoglou S, Hurt E C, et al. A generic strategy to analyze the spatial organization of multi-protein complexes by cross-linking and mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2000, 72(2): 267–275.
- [25] Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation[J]. *Physiol Rev*, 2001, 81(2): 807–869.
- [26] Somwar R, Perreault M, Kapur S, et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase  $\alpha$  and  $\beta$  by insulin and contraction in rat skeletal muscle: potential role in the stimulation of glucose transport[J]. *Diabetes*, 2000, 49(11): 1794–1800.
- [27] Furtado LM, Somwar R, Sweeney G, et al. Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin[J]. *Biochem Cell Biology*, 2002, 80(5): 569–578.
- [28] Berg D, Holzmann C, Riess O. 14-3-3 proteins in the nervous system[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4(9): 752–762.
- [29] Min S, Liang X, Zhang M, et al. Multiple tumor-associated microRNAs modulate the survival and longevity of dendritic cells by targeting YWHAZ and Bcl2 signaling pathways[J]. *J Immunol*, 2013, 190(5): 2437–2446.
- [30] Xing H, Zhang S, Weinheimer C, et al. 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades[J]. *EMBO J*, 2000, 19(3): 349–358.

(责任编辑:冉明会)