

内 分 泌

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002807

miR-132-5p 靶向 S100A9 介导高糖诱导的
肾小球系膜细胞凋亡及炎症反应

孙 枫, 王 颖

(扬州大学附属医院内分泌科, 扬州 225000)

【摘要】目的:探讨微小 RNA-132-5p(miRNA-132-5p, miR-132-5p)靶向 S100 钙结合蛋白 A9(S100 calcium binding protein A9, S100A9)对高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡及炎症反应的影响。**方法:**人肾小球系膜细胞用 DMEM 正常糖培养基培养作为对照组,用 DMEM 高糖培养基培养作为高糖组;miR-NC、miR-132-5p、anti-miR-NC、anti-miR-132-5p 转染至正常培养的肾小球系膜细胞中,记为 miR-NC 组、miR-132-5p 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-132-5p 组;将 miR-NC、miR-132-5p、si-NC、si-S100A9 转染至肾小球系膜细胞中再用高糖培养基培养,记为高糖+miR-NC 组、高糖+miR-132-5p 组、高糖+si-NC 组、高糖+si-S100A9 组;将 miR-132-5p 分别与 pcDNA、pcDNA-S100A9 转染至肾小球系膜细胞中再用高糖培养基培养,记为高糖+miR-132-5p+pcDNA 组、高糖+miR-132-5p+pcDNA-S100A9 组。实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测 miR-132-5p 和 S100A9 mRNA 表达水平;Western blot 检测 S100A9、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X, Bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)表达;双荧光素酶报告实验验证 miR-132-5p 和 S100A9 的靶向关系;流式细胞术检测细胞凋亡;酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素(interleukin, IL)-8、IL-6 水平。**结果:**高糖诱导的肾小球系膜细胞中 miR-132-5p 表达水平降低, S100A9 表达水平升高($P<0.05$)。miR-132-5p 靶向调控 S100A9, 过表达 miR-132-5p 或抑制 S100A9 表达, 高糖诱导的肾小球系膜细胞中细胞凋亡率降低, Bax 表达水平降低, Bcl-2 表达水平升高, TNF- α 、IL-8、IL-6 水平降低($P<0.05$)。S100A9 过表达逆转 miR-132-5p 过表达对高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡和炎症反应的抑制作用。**结论:**过表达 miR-132-5p 通过靶向下调 S100A9 抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡和炎症反应。

【关键词】miR-132-5p; S100A9; 高糖; 肾小球系膜细胞; 凋亡; 炎症反应

【中图分类号】R587.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2020-04-01

miR-132-5p mediates apoptosis and inflammatory of high glucose-induced
mesangial cells by targeting S100A9

Sun Feng, Wang Ying

(Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Yangzhou University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of microRNA-132-5p (miR-132-5p) targeting S100 calcium-binding protein A9 (S100A9) on the apoptosis and inflammatory of mesangial cells induced by high glucose. **Methods:** Human mesangial cells were cultured in DMEM normal glucose medium as control group, and cultured in DMEM high glucose medium as high glucose group. miR-NC, miR-132-5p, anti-miR-NC, anti-miR-132-5p were transfected into normal cultured mesangial cells and recorded as miR-NC group, miR-132-5p group, anti-miR-NC group, anti-miR-132-5p group; miR-NC, miR-132-5p, si-NC, si-S100A9 were transfected into mesangial cells and cultured in a high glucose medium, and recorded as high glucose+miR-NC group, high glucose+miR-132-5p group, high glucose+si-NC group, high glucose+si-S100A9 group; miR-132-5p was transfected with pcDNA and pcDNA-S100A9 into mesangial cells and cultured with high glucose medium, and recorded as high glucose+miR-132-5p pcDNA group, high glucose+miR-132-5p+pcDNA-S100A9 group. Real-time quantitative PCR(RT-qPCR) was used to detect miR-132-5p and S100A9 mRNA expressions. Western blot was used to detect S100A9, Bcl-2 associated X protein (Bax), and B cells lymphoma/leukemia-2 protein(Bcl-2) expression; dual luciferase assay was used to verify the targeting relationship between miR-132-5p and S100A9; flow

作者介绍: 孙 枫, Email: yzsf18@hotmail.com,

研究方向: 糖尿病肾病诊治。

通信作者: 王 颖, Email: 091007@yzu.edu.cn。

项目基金: 江苏省第五期“333 工程”培养资金资助项目(编号: Z2017018)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210513.1632.020.html>
(2021-05-14)

cytometry was used to detect apoptosis; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detected the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-8 and IL-6. **Results:** The expression of miR-132-5p in mesangial cells induced by high glucose was decreased, and the expression of S100A9 was increased ($P<0.05$). miR-132-5p targeted S100A9, overexpressed miR-132-5p or inhibited S100A9 expression. Apoptosis was

reduced in high glucose-induced mesangial cells, Bax expression was reduced, Bcl-2 expression was increased, and TNF- α , IL-8, IL-6 levels were decreased ($P < 0.05$). S100A9 overexpression reversed the inhibitory effect of miR-132-5p overexpression on apoptosis and inflammatory of mesangial cells induced by high glucose. **Conclusion:** Overexpression of miR-132-5p can inhibit apoptosis and inflammatory of high glucose-induced mesangial cells by down-regulating S100A9.

[Key words] miR-132-5p; S100 calcium binding protein A9; high glucose; mesangial cell; apoptosis; inflammatory

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病严重的并发症之一,也是导致糖尿病患者死亡的常见原因。肾小球系膜细胞异常增殖及胞外基质的大量合成是 DN 早期病理特征,且 DN 与炎症反应密切相关^[1-2]。研究肾小球系膜细胞的功能对 DN 发病机制及临床诊疗具有重要意义。研究发现,糖尿病状态下 S100 钙结合蛋白 A9(S100 calcium binding protein A9, S100A9)表达上调,与糖尿病肾脏损伤有重要相关性^[3]。S100A9 介导细胞内的炎症信号传导途径,在炎症中发挥重要调节作用^[4]。糖尿病大鼠牙周组织中 S100A9 表达上调, S100A9 可能介导 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路活化导致大鼠牙周组织结构病变^[5]。研究表明,miRNA 参与调节机体多种生理与病理过程,对机体免疫反应及疾病的发生发展起重要调控作用,也与 DN 的发生发展相关^[6]。本实验通过 TargetScan 在线软件预测 S100A9 可能的靶标 miRNA,结果显示 S100A9 与 miR-132-5p 存在结合位点。有研究报道 miR-132-5p 在急性心肌梗死患者中低表达^[7]。miR-132 通过胆碱能抗炎途径抑制脂多糖诱导的肺泡巨噬细胞发炎^[8]。miR-132 通过靶向 E2F 转录因子 5(E2F transcription factor 5, E2F5)抑制高葡萄糖诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移^[9]。然而 miR-132-5p 对高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡及炎症反应的影响及其机制尚未可知。本试验旨在研究 miR-132-5p 是否通过调控 S100A9 影响高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡及炎症反应。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

人肾小球系膜细胞株(HMCL)购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC);胎牛血清、DMEM 正常糖培养基(葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L)及 DMEM 高糖培养基(葡萄糖浓度为 30.0 mmol/L)购自美国 Hyclone 公司;实时荧光定量试剂盒购自北京智杰方远科技有限公司;Lipofectamine™ 2000 转染试剂购自上海伯易生物科技有限公司;蛋白提取试剂盒、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒、膜联蛋白 V-异硫

氰酸荧光素(annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC)和碘化丙锭(propidium iodide, PI)试剂盒购自北京索莱宝公司;酶联免疫吸附试剂盒(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)购自上海继锦化学科技有限公司。

1.2 细胞培养与分组

人肾小球系膜细胞用 DMEM 正常糖培养基培养作为对照组,用 DMEM 高糖培养基培养作为高糖组;miR-NC、miR-132-5p、anti-miR-NC、anti-miR-132-5p 转染至正常培养的肾小球系膜细胞中,记为 miR-NC 组、miR-132-5p 组、anti-miR-NC 组、anti-miR-132-5p 组;将 miR-NC、miR-132-5p、si-NC、si-S100A9 转染至肾小球系膜细胞中再用高糖培养基培养,记为高糖+miR-NC 组、高糖+miR-132-5p 组、高糖+si-NC 组、高糖+si-S100A9 组;将 miR-132-5p 分别与 pcDNA、pcDNA-S100A9 转染至肾小球系膜细胞中再用高糖培养基培养,记为高糖+miR-132-5p+pcDNA 组、高糖+miR-132-5p+pcDNA-S100A9 组。

1.3 实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测 miR-132-5p 和 S100A9 mRNA 表达水平

各组细胞培养 48 h 后提取总 RNA,反转录成 cDNA,按照荧光定量试剂盒进行 PCR,miR-132-5p 和 S100A9 分别以 U6 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参,miR-132-5p 上游引物序列:5'-ACCGTGGCTTTTCGATTGTTACT-3',下游引物序列:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';U6 上游引物序列:5'-CG-CTTCGGCAGCACATATACTA-3',下游引物序列:5'-CGCTT-CACGAATTTGCGTGTCA-3';S100A9 上游引物序列:5'-AC-CCAGACACCCTGAACC-3',下游引物序列:5'-AGCATGAT-GAACTCTCGA-3';GAPDH 上游引物序列:5'-CTGGGAC-GACATGGAGAAAA-3',下游引物序列:5'-AAGGAAGGCT-GGAAGAGTGAC-3';每个样品设 3 个重复,循环条件为 95℃ 5 min, 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环;60℃ 延长 5 min。相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.4 Western blot 检测 S100A9、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X, Bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)表达

各组细胞培养 48 h 后提取总蛋白,BCA 对蛋白进行定量。将蛋白样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至聚偏二氟乙烯膜上,用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗(1:1 000),4℃ 孵育过夜,加入二抗(1:2 000)室温孵育 90 min,用电化学发光(electro chemi luminescence, ECL)液显影,用 ChemiDoc XRS+系统成像,用 Quantity One 软件测定各组蛋白条带的灰度值,蛋白相对表达水平=目的条带灰度值/甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)条带灰度值。每个蛋白样品设 3 个重复。

1.5 双荧光素酶报告实验验证 miR-132-5p 和 S100A9 的靶向关系

用 PCR 扩增包含 miR-132-5p 结合位点的 S100A9 序列片段,并构建至荧光素酶表达载体中,获得 S100A9 野生型载体(WT-S100A9),将 S100A9 中序列 GCCACGG 突变为 AUG-CAUC,获得 S100A9 突变型载体(MUT-S100A9),将 WT-S100A9、MUT-S100A9 分别与 miR-NC、miR-132-5p 用 Lipofectamine 2000 脂质体共转染至肾小球系膜细胞中,转染 48 h 后,根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明检测荧光素酶活性。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞培养 48 h 后用预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution,PBS)漂洗,再结合缓冲液混匀后加入 10 μ L Annexin V-FITC,再加入 5 μ L PI,混匀后避光孵育 10 min。用流式细胞仪检测细胞凋亡率。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.7 ELISA 检测肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素(interleukin,IL)-8、IL-6 水平

各组细胞培养 48 h 后取上清,具体按照试剂盒操作进行检测。

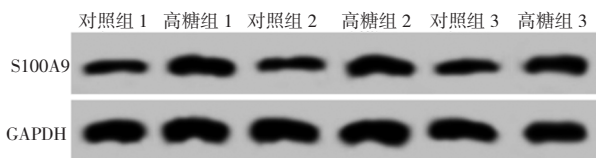
1.8 统计学处理

实验数据用 SPSS 20.0 软件分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。2 组比较行 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-132-5p 和 S100A9 在高糖诱导的肾小球系膜细胞中的表达

与对照组比较,高糖组肾小球系膜细胞中 miR-132-5p 表达水平降低(0.48 ± 0.05 vs. 1.01 ± 0.09 , $t=15.443$, $P=0.000$), S100A9 mRNA 表达水平(2.95 ± 0.28 vs. 1.00 ± 0.08 , $t=20.089$, $P=0.000$)和蛋白表达水平升高(0.85 ± 0.08 vs. 0.42 ± 0.04 , $t=14.423$, $P=0.000$)(图 1,表 1)。



注:对照组 1、2、3 代表对照组的 3 个重复;高糖组 1、2、3 代表高糖组的 3 个重复

图 1 S100A9 蛋白的表达

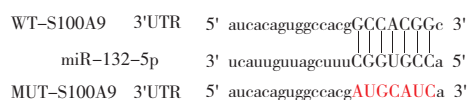
表 1 miR-132-5p 和 S100A9 在高糖诱导的肾小球系膜细胞中的表达($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	miR-132-5p	S100A9 mRNA	S100A9 蛋白
对照组	1.01 ± 0.09	1.00 ± 0.08	0.42 ± 0.04
高糖组	0.48 ± 0.05^a	2.95 ± 0.28^a	0.85 ± 0.08^a
t 值	15.443	20.089	14.423
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与对照组比较, $P<0.05$

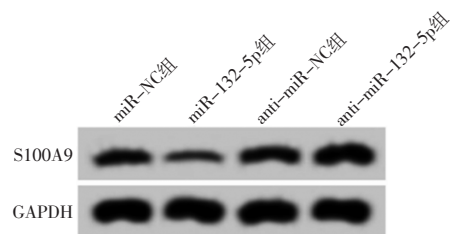
2.2 miR-132-5p 靶向调控 S100A9 的表达

TargetScan 预测显示 miR-132-5p 与 S100A9 存在结合位点(图 2)。荧光素酶报告实验显示,与 miR-NC 组相比,miR-132-5p 组中转染 WT-S100A9 载体的细胞荧光素酶活性明显降低(0.49 ± 0.05 vs. 1.02 ± 0.08 , $t=16.854$, $P=0.000$);而转染 MUT-S100A9 载体的细胞荧光素酶活性无统计学差异(1.04 ± 0.07 vs. 0.99 ± 0.09 , $t=1.316$, $P=0.207$)(表 2)。miR-132-5p 组 S100A9 表达水平低于 miR-NC 组(0.20 ± 0.02 vs. 0.41 ± 0.04),anti-miR-132-5p 组 S100A9 表达水平高于 anti-miR-NC 组(0.83 ± 0.08 vs. 0.40 ± 0.04)($F=252.720$, $P=0.000$)(表 3)。



注:红色标注的 AUGCAUC 是 S100A9 中序列 GCCACGG 突变而来

A. S100A9 的 3'UTR 中含有与 miR-132-5p 互补的核苷酸序列



B. S100A9 蛋白表达

图 2 miR-132-5p 靶向调控 S100A9 表达

表 2 双荧光素酶报告实验($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	WT-S100A9	MUT-S100A9
miR-NC组	1.02 ± 0.08	0.99 ± 0.09
miR-132-5p组	0.49 ± 0.05^a	1.04 ± 0.07
t 值	16.854	1.316
P 值	0.000	0.207

注:a,与 miR-NC 组比较, $P<0.05$

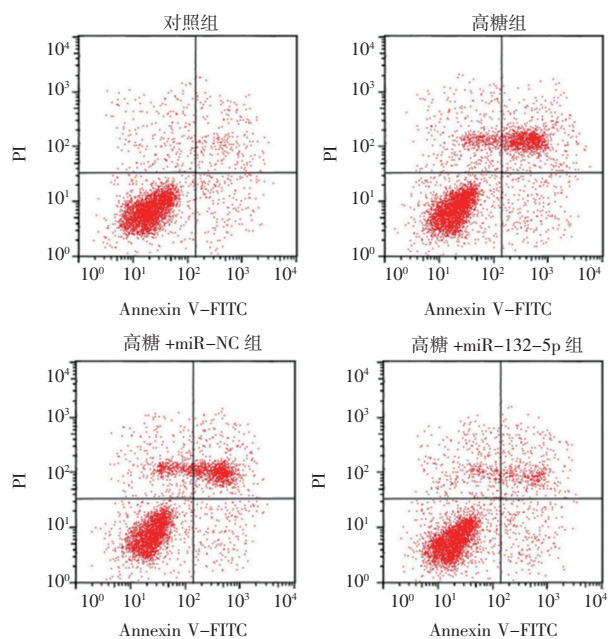
表 3 miR-132-5p 调控 S100A9 蛋白的表达($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	S100A9蛋白
miR-NC组	0.41 ± 0.04
miR-132-5p组	0.20 ± 0.02^a
anti-miR-NC组	0.40 ± 0.04
anti-miR-132-5p组	0.83 ± 0.08^b
F 值	252.720
P 值	0.000

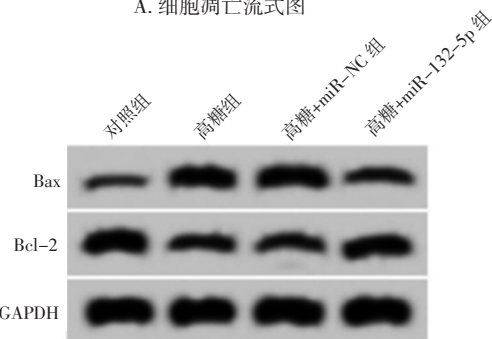
注:a,与 miR-NC 组比较, $P<0.05$;b,与 anti-miR-NC 组比较, $P<0.05$

2.3 miR-132-5p 过表达对高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡的影响

与对照组比较,高糖组肾小球系膜细胞中 miR-132-5p 表达水平降低,细胞凋亡率升高,Bax 表达水平升高,Bcl-2 表达水平降低($P<0.05$);与高糖+miR-NC 组比较,高糖+miR-132-5p 组 miR-132-5p 表达水平升高,细胞凋亡率降低,Bax 表达水平降低,Bcl-2 表达水平升高($P<0.05$)(图 3,表 4)。



A. 细胞凋亡流式图



B. 凋亡相关蛋白表达

图3 miR-132-5p 过表达对高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡的影响

表4 miR-132-5p 过表达对高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	miR-132-5p	凋亡率/%	Bax	Bcl-2
对照组	1.00 ± 0.09	7.65 ± 0.74	0.22 ± 0.03	0.74 ± 0.07
高糖组	0.46 ± 0.04 ^a	25.14 ± 2.36 ^a	0.68 ± 0.06 ^a	0.30 ± 0.03 ^a
高糖+miR-NC组	0.44 ± 0.05	27.11 ± 2.61	0.69 ± 0.07	0.28 ± 0.03
高糖+miR-132-5p组	0.86 ± 0.07 ^b	12.58 ± 1.26 ^b	0.31 ± 0.03 ^b	0.62 ± 0.06 ^b
<i>F</i> 值	168.702	223.530	210.291	185.825
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b:与高糖+miR-NC组比较, $P<0.05$

2.4 miR-132-5p 过表达对高糖诱导的肾小球系膜细胞炎症反应的影响

与对照组比较,高糖组肾小球系膜细胞中 TNF- α 、IL-8、IL-6 水平升高($P<0.05$);与高糖+miR-NC 组比较,高糖+miR-132-5p 组 TNF- α 、IL-8、IL-6 水平降低($P<0.05$)(表 5)。

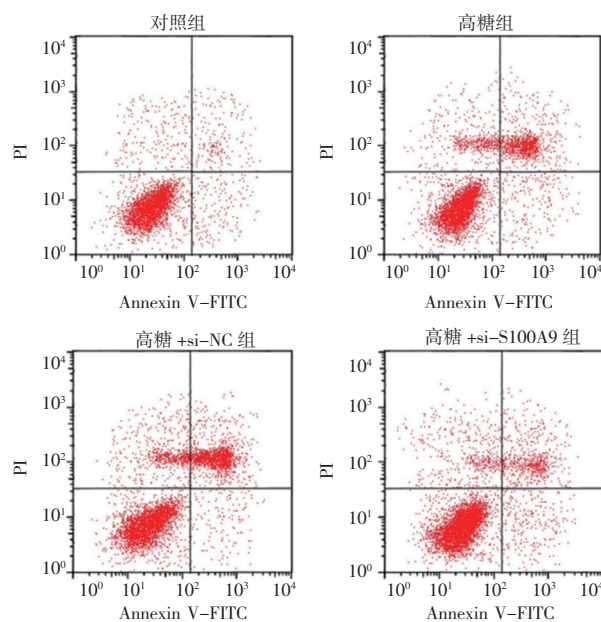
表5 miR-132-5p 过表达对高糖诱导的肾小球系膜细胞炎症反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	TNF- α /(ng·L ⁻¹)	IL-8/(μ g·L ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)
对照组	36.58 ± 3.25	0.36 ± 0.03	18.42 ± 1.83
高糖组	115.24 ± 10.58 ^a	8.12 ± 0.81 ^a	53.65 ± 5.22 ^a
高糖+miR-NC 组	119.32 ± 9.24	8.36 ± 0.84	56.87 ± 5.61
高糖+miR-132-5p 组	52.69 ± 5.43 ^b	1.52 ± 0.15 ^b	29.36 ± 2.54 ^b
<i>F</i> 值	273.779	467.763	183.728
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

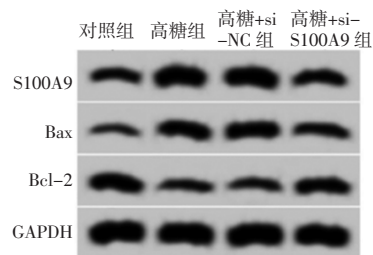
注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b:与高糖+miR-NC 组比较, $P<0.05$

2.5 抑制 S100A9 表达对高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡和炎症反应的影响

与高糖+si-NC 组比较,高糖+si-S100A9 组 S100A9 表达水平降低,细胞凋亡率降低,Bax 表达水平降低,Bcl-2 表达水平升高,TNF- α 、IL-8、IL-6 水平降低($P<0.05$)(图 4,表 6)。



A. 细胞凋亡流式图



B. 凋亡相关蛋白表达

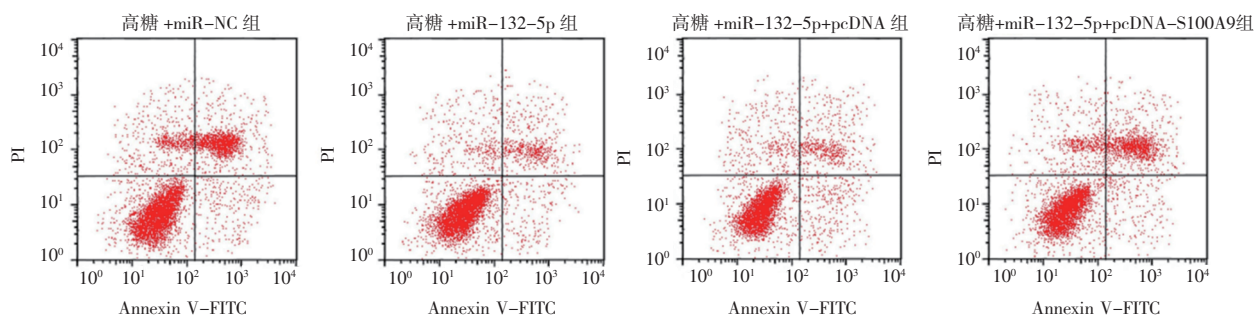
图4 抑制 S100A9 表达对高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡的影响

2.6 S100A9 过表达逆转 miR-132-5p 过表达对高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡和炎症反应

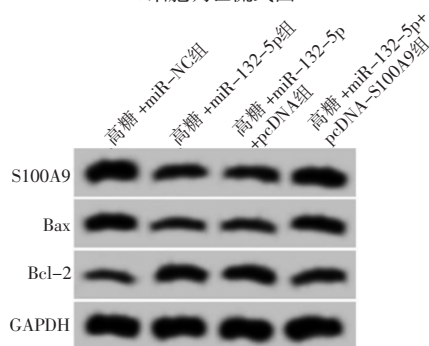
与高糖+miR-132-5p+pcDNA 组比较,高糖+miR-132-5p+pcDNA-S100A9 组 S100A9 表达水平升高,细胞凋亡率升高,Bax 表达水平升高,Bcl-2 表达水平降低,TNF- α 、IL-8、IL-6 水平升高($P<0.05$)(图 5,表 7)。

表 6 抑制 S100A9 表达对高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡和炎症反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	S100A9	凋亡率/%	Bax	Bcl-2	TNF- α /(ng·L ⁻¹)	IL-8/(μ g·L ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)
对照组	0.43 $\pm$ 0.04	6.32 $\pm$ 0.63	0.23 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.07	31.26 $\pm$ 3.13	0.42 $\pm$ 0.04	15.69 $\pm$ 1.57
高糖组	0.84 $\pm$ 0.08 ^a	24.15 $\pm$ 2.45 ^a	0.66 $\pm$ 0.06 ^a	0.31 $\pm$ 0.03 ^a	118.26 $\pm$ 9.36 ^a	8.23 $\pm$ 0.82 ^a	54.63 $\pm$ 5.44 ^a
高糖 +si-NC 组	0.86 $\pm$ 0.07	26.58 $\pm$ 2.55	0.67 $\pm$ 0.07	0.29 $\pm$ 0.03	123.65 $\pm$ 10.31	8.29 $\pm$ 0.78	57.21 $\pm$ 5.78
高糖 +si-S100A9 组	0.51 $\pm$ 0.05 ^b	14.21 $\pm$ 1.43 ^b	0.36 $\pm$ 0.03 ^b	0.60 $\pm$ 0.06 ^b	63.48 $\pm$ 6.39 ^b	1.93 $\pm$ 0.19 ^b	38.32 $\pm$ 3.74 ^b
F 值	115.169	210.417	169.398	177.175	291.902	467.250	165.448
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b:与高糖 +si-NC 组比较, $P<0.05$ 

A. 细胞凋亡流式图



B. 凋亡相关蛋白表达

图 5 S100A9 过表达逆转 miR-132-5p 过表达对高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡和炎症反应

表 7 S100A9 过表达逆转 miR-132-5p 过表达对高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡和炎症反应 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	S100A9	凋亡率/%	Bax	Bcl-2	TNF- α /(ng·L ⁻¹)	IL-8/(μ g·L ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)
高糖 +miR-NC 组	0.86 $\pm$ 0.08	25.41 $\pm$ 2.54	0.68 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.03	117.26 $\pm$ 10.27	8.31 $\pm$ 0.83	55.21 $\pm$ 5.51
高糖 +miR-132-5p 组	0.38 $\pm$ 0.04 ^a	11.69 $\pm$ 1.17 ^a	0.32 $\pm$ 0.03 ^a	0.61 $\pm$ 0.06 ^a	56.32 $\pm$ 5.61 ^a	1.49 $\pm$ 0.15 ^a	28.36 $\pm$ 2.74 ^a
高糖 +miR-132-5p+pcDNA 组	0.36 $\pm$ 0.03	10.28 $\pm$ 1.03	0.30 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 0.05	53.14 $\pm$ 5.33	1.44 $\pm$ 0.14	26.58 $\pm$ 2.63
高糖 +miR-132-5p+pcDNA-S100A9 组	0.74 $\pm$ 0.07 ^b	19.65 $\pm$ 1.84 ^b	0.57 $\pm$ 0.05 ^b	0.35 $\pm$ 0.03 ^b	98.54 $\pm$ 9.87 ^b	7.93 $\pm$ 0.78 ^b	41.22 $\pm$ 4.32 ^b
F 值	167.217	147.586	160.215	157.177	137.336	397.454	100.203
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与高糖 +miR-NC 组比较, $P<0.05$;b:与高糖 +miR-132-5p+pcDNA 组比较, $P<0.05$

3 讨论

DN是糖尿病常见的微血管并发症。本研究通过高糖刺激肾小球系膜细胞研究 miR-132-5p 在 DN 中的作用。实验结果显示,高糖可诱导肾小球系膜细胞凋亡和炎症因子释放,且此过程中 miR-132-5p 低表达,表明 miR-132-5p 可能参与高糖条件下肾小球系膜细胞的凋亡和炎症反应过程。研究报道

miR-132 可以促进转化生长因子(transforming growth factor,TGF)- β 1 诱导的大鼠肾间质成纤维细胞 NRK-49F 分泌细胞外基质^[10]。miR-132 通过抑制沉默信息调节因子 2 同源物 1(silent information regulator 2 homolog 1,SIRT1)、固醇调节元件结合蛋白-1c(sterol regulatory element-binding protein 1c,SREBP-1c)促进脐静脉内皮细胞炎症反应血管内皮损伤^[11]。三七皂苷 R1 通过提高 miR-132 减轻脂多糖触发的 PC-12 炎症损伤^[12]。本试验结果显示,

过表达 miR-132-5p, 高糖诱导的肾小球系膜细胞中细胞凋亡率降低, Bax 表达水平降低, Bcl-2 表达水平升高, TNF- α 、IL-8、IL-6 水平降低。TNF- α 、IL-8、IL-6 均是促炎因子, 是 2 型 DN 病理生理过程中重要的炎症介质, 在 2 型 DN 发生发展过程中起重要作用^[13]。这说明过表达 miR-132-5p 可抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞中细胞凋亡和炎症反应。

肾小球肾炎是终末期肾脏疾病的常见原因, S100A8/A9 复合物是一种与炎症相关的生物标志物, 患有肾小球肾炎的小鼠血清 S100A8/A9 水平升高, 促进炎症因子分泌, 促进肾小球肾炎^[14]。S100A8/A9 的高水平与 2 型糖尿病中的急性冠状动脉综合征和动脉粥样硬化相关^[15]。抑制 S100A8/A9 可能阻止慢性肾脏病患者肾纤维化^[16]。S100A9 沉默可通过阻断急性胰腺炎小鼠的 IL-17 信号传导途径来抑制促炎性细胞因子的释放^[17]。本试验结果显示, 高糖诱导的肾小球系膜细胞中 S100A9 表达水平升高, 抑制 S100A9 表达, 高糖诱导的肾小球系膜细胞中细胞凋亡率降低, Bax 表达水平降低, Bcl-2 表达水平升高, TNF- α 、IL-8、IL-6 水平降低, 说明抑制 S100A9 表达可抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞中细胞凋亡和炎症反应。miR-132-5p 靶向调控 S100A9。S100A9 过表达逆转 miR-132-5p 过表达对高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡和炎症反应的抑制作用, 提示 miR-132-5p 可能通过调控 S100A9 的表达影响高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡和炎症反应。

综上所述, 过表达 miR-132-5p 通过靶向下调 S100A9 可抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡和炎症反应。本研究的重要性在于: 通过研究与糖尿病肾病相关的肾小球系膜细胞凋亡和炎症反应的可能分子机制, 为糖尿病肾病从分子水平防治提供一定的理论依据和可能的分子作用靶点。

参 考 文 献

- [1] 于小函, 邸 波. 肾小球系膜细胞与糖尿病肾病[J]. 医学研究杂志, 2015, 44(9): 7-9.
- [2] 王永胜, 杨丽霞, 程 涛, 等. 糖尿病肾病的炎症致病机制与中药防治[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 200-207.
- [3] 刘春红, 王 兵, 乔 羽, 等. 肾消康对糖尿病肾病大鼠肾组织基因 S100A9 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(10): 2518-2520.
- [4] 胡 筱. S100A8 和 S100A9 对自身免疫性疾病影响的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2015, 42(3): 257-260.
- [5] Hu X. S100A8 and S100A9 in autoimmune diseases[J]. Int J Pediatr, 2015, 42(3): 257-260.
- [6] 孙文华, 陈国庆, 田卫东. S100A9 在糖尿病大鼠牙周组织中的表达及其作用研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2016, 34(4): 419-424.
- [7] Sun WH, Chen GQ, Tian WD. Expression and effect of S100A9 in the periodontium of diabetic rats[J]. West China J Stomatol, 2016, 34(4): 419-424.
- [8] 敬剑英, 喻雪琴, 陈 芳, 等. microRNA 在糖尿病肾病发病机制中的研究进展[J]. 海南医学, 2019, 30(11): 1455-1458.
- [9] Jing JY, Yu XQ, Chen F, et al. Research progress of microRNA in pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Hainan Med J, 2019, 30(11): 1455-1458.
- [10] 朱敬伟, 戴国华, 姚 静, 等. 益气活血中药对急性心肌梗死病人血浆 miR-223-3p、miR-132-5p 表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(9): 939-943.
- [11] Zhu JW, Dai GH, Yao J, et al. Effect of Chinese herbs for invigorating qi on expression of plasma miR-223-3p and miR-132-5p in patients with acute myocardial infarction[J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis, 2016, 14(9): 939-943.
- [12] Liu F, Li Y, Jiang R, et al. miR-132 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in alveolar macrophages by the cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. Exp Lung Res, 2015, 41(5): 261-269.
- [13] Xu Q, Liang Y, Liu X, et al. miR-132 inhibits high glucose-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration by targeting E2F5[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(2): 2012-2020.
- [14] 朱慧萍, 苏 震, 周宏伟, 等. microRNA-132 对肾间质成纤维细胞分泌细胞外基质的调控作用[J]. 温州医科大学学报, 2013, 43(7): 421-425.
- [15] Zhu HP, Su Z, Zhou HW, et al. Effect of adjusting and controlling microRNA-132 on extracellular matrix of secretion cells in renal interstitial fibroblast[J]. J Wenzhou Med Coll, 2013, 43(7): 421-425.
- [16] 张丽伟. miR-132 抑制 SIRT1 调控 SREBP-1c 通路并诱导血管内皮细胞炎症反应的机制研究[D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2014.
- [17] Zhang LW. miR-132 inhibits expression of SIRT1 and induces vascular endothelial inflammation through regulation of the SREBP-1c metabolic pathway[D]. Beijing: Chinese PLA General Hospital & Medical School, 2014.
- [18] Sun Y, Liu B, Zheng X, et al. Notoginsenoside R1 alleviates lipopolysaccharide-triggered PC-12 inflammatory damage via elevating microRNA-132[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 1808-1814.
- [19] Pepper RJ, Wang HH, Rajakaruna GK, et al. S100A8/A9(calprotectin) is critical for development of glomerulonephritis and promotes inflammatory leukocyte-renal cell interactions[J]. Am J Pathol, 2015, 185(5): 1264-1274.
- [20] Hirata A, Kishida K, Nakatsuji H, et al. High serum S100A8/A9 levels and high cardiovascular complication rate in type 2 diabetics with ultrasonographic low carotid plaque density[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2012, 97(1): 82-90.
- [21] Tammara A, Florquin S, Brok M, et al. S100A8/A9 promotes parenchymal damage and renal fibrosis in obstructive nephropathy[J]. Clin Exp Immunol, 2018, 193(3): 361-375.
- [22] Wu DM, Wang S, Shen M, et al. S100A9 gene silencing inhibits the release of pro-inflammatory cytokines by blocking the IL-17 signalling pathway in mice with acute pancreatitis[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(4): 2378-2389.

(责任编辑: 唐秋姗)