

论著·实验研究

microRNA-145 对 TGF- β 1 诱导的人肾小管上皮细胞上皮间充质转化的影响

刘华¹ 何小解² 李国君¹ 丁庆雄¹ 梁晚霞¹ 樊娟¹

(1. 深圳市南山区妇幼保健院儿科, 广东 深圳 518052;
2. 中南大学湘雅二医院儿童医学中心, 湖南 长沙 410011)

[摘要] **目的** 研究 microRNA-145 (miR-145) 对转化生长因子 (TGF)- β 1 诱导人肾小管上皮细胞 (HK-2) 上皮间充质转化 (EMT) 的影响。**方法** 人工合成 miR-145 基因序列, 构建真核重组质粒 pCMV-miR-145。以未处理 HK-2 细胞为对照组; 以 TGF- β 1 处理 HK-2 细胞为 TGF- β 1 组; 以 pCMV-myc 空白质粒转染后经 TGF- β 1 处理 HK-2 细胞为 TGF- β 1 空白质粒组; 以 pCMV-miR-145 质粒转染后经 TGF- β 1 处理 HK-2 细胞为 TGF- β 1+miR-145 组。采用实时荧光定量 PCR 检测 miR-145 表达。采用 Western blot 检测 TGF- β /Smad 信号传导蛋白 TGF- β 1、Smad3、Smad2/3、p-Smad2/3, 以及 EMT 生物标记物蛋白 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、纤维连接蛋白 (FN) 和 I 型胶原蛋白 (Col I) 的表达水平。采用 ELISA 法检测培养细胞上清液中 FN 和 Col I 的含量。**结果** miR-145 表达质粒构建成功, 重组质粒有效转染 TGF- β 1 诱导 HK-2 细胞。与对照组比较, TGF- β 1+miR-145 组细胞中 miR-145 表达上调 ($P<0.01$); 与对照组和 TGF- β 1+miR-145 组比较, TGF- β 1 组和 TGF- β 1 空白质粒组细胞中 miR-145 表达均下降 ($P<0.01$)。与 TGF- β 1 组和 TGF- β 1 空白质粒组比较, TGF- β 1+miR-145 组细胞内 TGF- β 1、Smad3、Smad2/3 和 p-Smad2/3 蛋白表达量减少 ($P<0.05$); α -SMA、FN、Col I 蛋白表达亦明显减少 ($P<0.05$); TGF- β 1+miR-145 组培养液上清中 FN、Col I 含量减少 ($P<0.05$)。**结论** miR-145 参与 TGF- β 1 处理 HK-2 细胞 EMT 的调控。miR-145 可能通过抑制 TGF- β 依赖的 Smad 信号通路活性, 从而抑制肾小管 EMT。
[中国当代儿科杂志, 2017, 19 (6): 712-718]

[关键词] microRNA-145; TGF- β /Smad 信号通路; 上皮间充质转化; 人肾小管上皮细胞

Effects of microRNA-145 on epithelial-mesenchymal transition of TGF- β 1-induced human renal proximal tubular epithelial cells

LIU Hua, HE Xiao-Jie, LI Guo-Jun, DING Qing-Xiong, LIANG Wan-Xia, FAN Juan. Department of Pediatrics, Nanshan Maternity and Child Health Care Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518052, China (He X-J, Email: hexj7150@163.com)

Abstract: Objective To investigate the effects of microRNA-145 (miR-145) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of TGF- β 1-induced human renal proximal tubular epithelial (HK-2) cells. **Methods** The gene sequence of miR-145 was synthesized and cloned into pCMV-myc to construct recombinant plasmid pCMV-miR-145. HK-2 cells were divided into four groups: control (untreated), TGF- β 1 (treated with TGF- β 1), blank+TGF- β 1 (treated with TGF- β 1 after HK-2 cells transfected with blank plasmid) and miR-145+TGF- β 1 (treated with TGF- β 1 after HK-2 cells transfected with pCMV-miR-145 recombinant plasmid). Expression of miR-145 was detected by real-time PCR (RT-PCR). TGF- β 1, Smad3, Smad2/3, p-Smad2/3, α -SMA, FN and type I collagen (Col I) protein levels were detected by Western blot. Concentrations of fibronectin (FN) and Col I in cell culture supernatants were measured using ELISA. **Results** pCMV-miR-145 recombinant plasmid was successfully transfected into HK-2 cells. Compared with the control group, the miR-145+TGF- β 1 group showed a significant up-regulation in the expression level of miR-145 ($P<0.01$). However, the TGF- β 1 and blank+TGF- β 1 groups showed a significant down-regulation in the expression level of miR-145 compared with that in the control and miR-145+TGF- β 1 groups ($P<0.01$). Compared with the TGF- β 1 and blank+TGF- β 1 groups,

[收稿日期] 2017-01-25; **[接受日期]** 2017-04-20

[作者简介] 刘华, 男, 博士, 主治医师。

[通信作者] 何小解, 男, 副教授。

the miR-145+TGF- β 1 group showed significantly reduced levels of the signal proteins TGF- β 1, Smad3, Smad2/3 and p-Smad2/3 ($P<0.05$), as well as significantly reduced levels of the biomarkers α -SMA, FN and Col I ($P<0.05$). Meanwhile, concentrations of FN and Col I in cell culture supernatants also decreased ($P<0.05$). **Conclusions** miR-145 modulates the EMT of HK-2 cells treated with TGF- β 1, possibly by inhibition of the activation of TGF- β -dependent Smad signaling pathway. [Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(6): 712-718]

Key words: microRNA-145; TGF- β /Smad signaling pathway; Epithelial-mesenchymal transition; Human proximal tubular epithelial cell

肾脏纤维化以成纤维细胞及基质蛋白积聚并伴随肾单位功能丧失为特征,是进展性肾脏疾病的主要病理过程^[1]。转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β /Smad 信号通路及肾小管上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在肾脏纤维化中起关键作用^[2-4]。研究发现, microRNAs(miRNAs)可通过调控 TGF- β /Smad 信号通路促进或抑制肾小管 EMT,并最终影响肾脏纤维化进程^[5-7]。

miR-145 作为 miRNAs 家族成员之一,目前研究多集中于肿瘤及心血管领域^[8-10]。新近, Yang 等^[11]发现 miR-145 通过调节 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达,对肺纤维化的发生起重要作用。Megiorni 等^[12]显示 miR-145 作为关键调控因子之一,下调 Smad3 mRNA 表达,减少囊性纤维化发病。然而,miR-145 是否可参与肾脏纤维化调控且作用机制如何,尚无文献报道。本研究以 TGF- β 1 诱导的体外肾小管间质纤维化模型为研究对象,通过 pCMV-miR-145 表达质粒转染人肾小管上皮细胞(HK-2),初步探讨 miR-145 对 HK-2 细胞 EMT 的可能作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HK-2 细胞购于美国模式菌种收集中心。真核细胞表达载体 pCMV-myc、感受态细胞 *E.coli* DH5 α 、限制性核酸内切酶 EcoRI、Kpn I 和 T4 DNA 连接酶(长沙艾佳生物技术有限公司),PCR 引物、质粒抽提试剂盒(上海生工生物工程有限公司),脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司),胎牛血清、DMEM/F12(美国 Gibco 公司),miRNA 实时定量聚合酶链反应(PCR)试剂盒、Matrigel 胶、Transwell 小室(加拿大 Fermentas 公司),TGF- β 1(美国 Pepro Tech 公司),Smad3、Smad2/3 和 p-Smad2/3(美

国 Gene Tex 公司), α -SMA(美国 Abcam 公司),纤维连接蛋白(fibronectin, FN)和 I 型胶原蛋白(type I collagen, Col I)(美国 Santa Cruz 公司),辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠二抗(北京中衫金桥生物技术有限公司), β -actin(北京康为世纪生物技术有限公司),FN 和 Col I ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 miR-145 前体序列的扩增

根据 miRBase(www.mirbase.org)查询获得 hsa-miR-145 前体序列(M10000461),再通过 UCSC 基因组浏览器进行 BLAST 对比获取其基因组序列。Primer I: 5'-CGGAATTCGGCTGGATGC-AGAAGAGAAC-3', Primer II: 5'-GCGGTACCGCC-TTCTTCTTGAACCTCA-3'。Primer I 中加入 EcoRI 酶切位点,Primer II 中加入 Kpn I 酶切位点。PCR 反应条件:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,63℃退火 30 s,72℃延伸 50 s,30 个循环;72℃延伸 5 min。

1.3 miR-145 真核表达载体的构建

miR-145 基因扩增产物经琼脂糖电泳回收,T 载体连接测序证实无突变后,双酶切克隆入真核表达载体 pCMV-myc 中,转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆,送至上海生工生物工程有限公司进行测序鉴定。经酶切测序证实后将所得正确重组质粒命名为 pCMV-miR-145,Tip500 质粒抽提试剂盒抽提质粒保存。

1.4 细胞培养、转染及分组

含 10% 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素和 100 IU/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养液在 37℃、5%CO₂ 环境中培养 HK-2 细胞。用胰蛋白酶消化后接种于 6 孔培养板,待细胞融合至 80% 时,换成无血清培养基培养,同步化 24 h 后分别加入 5 μ g/L TGF- β 1 培养 24 h。另外,采用 Lipofectamine 2000 脂质载体转染 HK-2 细胞 24 h,具体操作按试剂盒说明书进行,再给予 5 μ g/L TGF- β 1 孵育 24 h。实验分组分为两部分:(1)将 HK-2

细胞分为对照组（未经任何处理）、空白质粒组（以 pCMV-myc 空白质粒转染 HK-2 细胞）、miR-145 组（以 pCMV-miR-145 质粒转染 HK-2 细胞）。（2）将 HK-2 细胞分为对照组（未经任何处理）、TGF- β 1 组（以 5 μ g/L TGF- β 1 处理 HK-2 细胞 24 h）、TGF- β 1 空白质粒组（以 pCMV-myc 空白质粒转染 HK-2 细胞后再经 5 μ g/L TGF- β 1 处理 24 h）；TGF- β 1+miR-145 组（以 pCMV-miR-145 质粒转染 HK-2 细胞后再经 5 μ g/L TGF- β 1 处理 24 h）。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测 miR-145 的表达

按 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA，琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性，RNA 吸光度 A260/A280 为 1.9~2.1 时方可用于检测。miR-145 的 cDNA 合成采用特异性颈环引物，逆转录相关操作按试剂盒说明书进行。实时荧光定量 PCR 严格按照试剂盒操作说明进行。PCR 反应条件：95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min；95 $^{\circ}$ C 变性 15 s，60 $^{\circ}$ C 退火和延伸 60 s，共 40 个循环。采用 U6 做参考基因，计算相对表达量。miR-145 相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算^[13]， $\Delta\Delta CT = (\text{实验组目的基因 Ct 值} - \text{实验组内参基因 Ct 值}) - (\text{对照组目的基因 Ct 值} - \text{对照组内参基因 Ct 值})$ ，每组平行设 6 个样本，实验独立重复 3 次。

1.6 Western blot 印迹分析

收集细胞加裂解液 30 min 后离心，取 5~10 μ L 上清 BCA 法测定蛋白浓度。每上样孔加 30 μ g 总蛋白，采用 10%SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭后分别加入抗人 TGF- β 1（1:400）、Smad3（1:500）、

Smad2/3（1:500）、p-Smad2/3（1:500）、 α -SMA（1:2000）、FN（1:1000）、Col I（1:2000）及 β -actin（1:1000）一抗，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，次日 PBST 洗膜，加 1:10000 辣根过氧化物酶标记的二抗（1:3000）室温孵育 1 h。加 ECL 液在柯达 4000MM 化学发光成像仪曝光显像，采用 Labwork 4.0 图像分析软件行半定量分析。每组平行设 6 个样本，实验独立重复 3 次。

1.7 ELISA 检测

按 FN 和 Col I 免疫试剂盒说明书分别检测细胞上清液中总 FN 及 Col I 含量。每组平行设 6 个复孔，实验独立重复 3 次。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 Bonferroni 法， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同分组细胞形态特点

光镜（nikon eclipse E400，日本）下显示，对照组细胞间连接紧密，呈鹅卵石样生长。TGF- β 1 组中细胞间隙明显增加，部分细胞与周围细胞脱离，形态由鹅卵石形转变为梭形。TGF- β 1+miR-145 组细胞大部分恢复为鹅卵石样，但仍有少部分为梭形，细胞脱离黏附的现象也有所减少。见图 1。

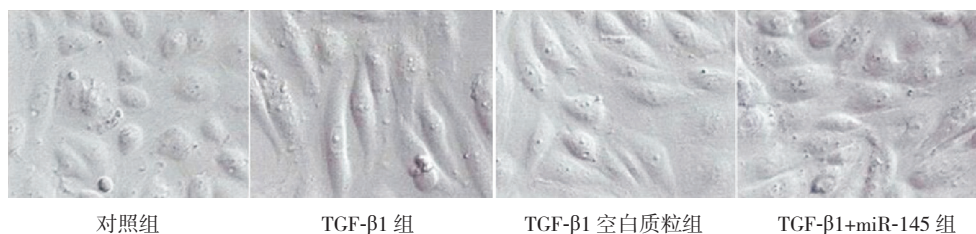


图1 各组细胞光镜下形态学改变（ $\times 200$ ） 对照组细胞连接紧密，呈鹅卵石样；TGF- β 1 组细胞间隙明显增加，部分细胞与周围细胞脱离，呈梭形；TGF- β 1 空白质粒组细胞呈梭型，间隙增加；TGF- β 1+miR-145 组细胞多数形态呈鹅卵石样，细胞脱离黏附较少。

2.2 miR-145 表达质粒的构建

miR-145 基因扩增片段凝胶电泳结果显示 1、2、4~10 号克隆在 250 bp 与 500 bp 之间有明亮特异的扩增条带(图 2)。接种 1 号阳性转化子,分装 200 μ L 送检测序。采用 DNASTar 的 MegAlign 软件对插入片段进行测序,结果证实插入片段与设计序列完全匹配。

2.3 荧光倒置显微镜检测质粒转染 HK-2 细胞状态

经质粒转染 24 h 后,在荧光倒置显微镜(奥林巴斯 IX81,日本)视野下可观察到空白质粒组

和 miR-145 组有大量细胞发出绿色荧光信号,转染率约 70% 以上,而对照组未见绿色荧光,见图 3。

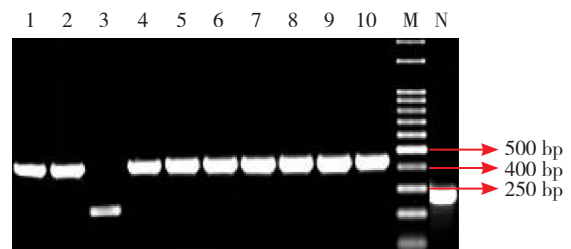


图 2 GR325 琼脂糖凝胶电泳图 M: Marker; N: 阴性对照; 1、2、4~10 为阳性转化子; 3 为阴性转化子。

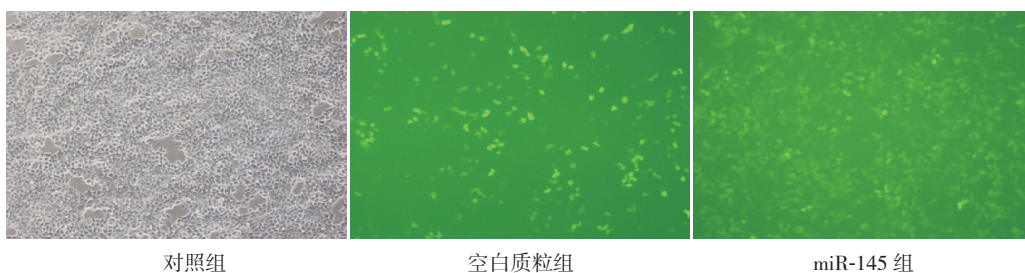


图 3 质粒转染 HK-2 细胞的检测(荧光倒置显微镜, $\times 80$) 对照组无 HK-2 细胞发出荧光信号;空白质粒组和 miR-145 组均可见大量 HK-2 细胞发出绿色荧光信号。

2.4 miR-145 表达检测

实时荧光定量 PCR 结果显示,各组细胞内 miR-145 表达比较差异有统计学意义($F=157.103$, $P<0.001$)。与对照组(0.526 ± 0.024)和空白质粒组(0.537 ± 0.016)比较,miR-145 组细胞内 miR-145 表达(0.836 ± 0.052)显著升高($P<0.01$);而对照组与空白质粒组比较,miR-145 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.5 TGF- β 1 刺激对 HK-2 细胞 miR-145 表达的影响

实时荧光定量 PCR 结果显示,予 5 μ g/L TGF- β 1 刺激 24 h 后,各组细胞内 miR-145 表达比较差异有统计学意义($F=180.225$, $P<0.001$)。与对照组(0.526 ± 0.024)和 TGF- β 1+miR-145 组(0.733 ± 0.064)比较,TGF- β 1 组(0.312 ± 0.014)和 TGF- β 1 空白质粒组(0.331 ± 0.018)miR-145 表达明显下降($P<0.01$)。与对照组比较,TGF- β 1+miR-145 组 miR-145 表达升高($P<0.01$)。

TGF- β 1 组和 TGF- β 1 空白质粒组比较,miR-145 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.6 miR-145 对 HK-2 细胞 TGF- β /Smad 信号蛋白的影响

Western blot 印迹结果显示,予 5 μ g/L TGF- β 1 刺激 24 h 可导致 HK-2 细胞 TGF- β 1 表达明显增多。表现为与对照组比较,TGF- β 1 组、TGF- β 1 空白质粒组、TGF- β 1+miR-145 组细胞中 TGF- β 1 蛋白表达量增加($P<0.05$)。而 miR-145 抑制 TGF- β 1 过表达,表现为 TGF- β 1+miR-145 组与 TGF- β 1 组和 TGF- β 1 空白质粒组比较,TGF- β 1 蛋白表达量减少($P<0.05$)。同样 miR-145 阻止 TGF- β 1 激活信号蛋白 Smad2/3。表现为与对照组比较,TGF- β 1 组、TGF- β 1 空白质粒组、TGF- β 1+miR-145 组细胞中 Smad3、Smad2/3 和 p-Smad2/3 蛋白表达量增加($P<0.05$)。而 TGF- β 1+miR-145 组与 TGF- β 1 组和 TGF- β 1 空白质粒组比较,Smad3、Smad2/3 和 p-Smad2/3 蛋白表达量减少($P<0.05$),见图 4,表 1。

2.7 miR-145 对 TGF-β1 诱导 HK-2 细胞 EMT 的影响

Western blot 印迹结果显示, 各组细胞内 α-SMA 表达比较差异有统计学意义 ($F=150.880$, $P<0.001$)。TGF-β1 刺激可使 HK-2 细胞 α-SMA 表达增多, 表现为与对照组 (0.35 ± 0.04) 比较, TGF-β1 组 (0.82 ± 0.05)、TGF-β1 空白质粒组 (0.83 ± 0.05)、TGF-β1+miR-145 组 (0.55 ± 0.04) 细胞中 α-SMA 蛋白表达量增加 ($P<0.01$)。而 miR-145 抑制 α-SMA 过表达, 表现为与 TGF-β1 组和 TGF-β1 空白质粒组比较, TGF-β1+miR-145 组 α-SMA 蛋白表达量明显减少 ($P<0.01$), 见图 5。

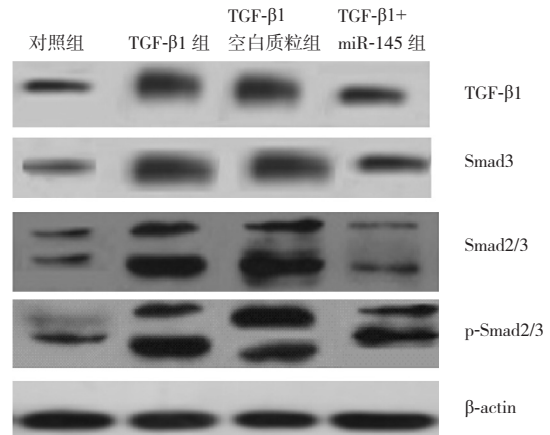


图 4 Western blot 检测 miR-145 表达质粒对 TGF-β1 诱导 HK-2 细胞 TGF-β/Smad 信号蛋白表达的影响

表 1 各组细胞相关信号蛋白的表达比较 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	TGF-β1	Smad3	Smad2/3	p-Smad2/3
对照组	0.192 ± 0.019	0.322 ± 0.023	0.165 ± 0.008	0.110 ± 0.017
TGF-β1 组	0.573 ± 0.021^a	0.788 ± 0.017^a	0.484 ± 0.019^a	0.359 ± 0.039^a
TGF-β1 空白质粒组	0.554 ± 0.025^a	0.787 ± 0.014^a	0.482 ± 0.018^a	0.359 ± 0.037^a
TGF-β1+miR-145 组	$0.328 \pm 0.018^{a,b,c}$	$0.542 \pm 0.023^{a,b,c}$	$0.298 \pm 0.014^{a,b,c}$	$0.232 \pm 0.025^{a,b,c}$
F 值	459.435	790.818	611.525	90.310
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: a 示与对照组比较, $P<0.05$; b 示与 TGF-β1 组比较, $P<0.05$; c 示与 TGF-β1 空白质粒组比较, $P<0.05$ 。

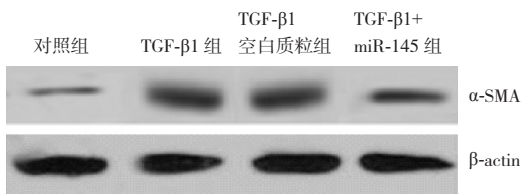


图 5 Western blot 检测 miR-145 表达质粒对 TGF-β1 诱导 HK-2 细胞 α-SMA 蛋白表达的影响

miR-145 减少 TGF-β1 诱导 HK-2 细胞及培养液上清中纤维化因子 FN、Col I 蛋白表达和含量: Western blot 印迹结果显示, TGF-β1 刺激可使 HK-2 细胞 FN、Col I 蛋白表达增多, 表现为与对照组比较, TGF-β1 组、TGF-β1 空白质粒组、TGF-β1+miR-145 组细胞中 FN 和 Col I 蛋白表达增加 ($P<0.05$)。而 miR-145 抑制 FN、Col I 蛋白过表达, 表现为 TGF-β1+miR-145 组与 TGF-β1 组和 TGF-β1 空白质粒组比较, FN 和 Col I 蛋白表达均减少

($P<0.05$)。同样, TGF-β1 刺激可使培养液上清中 FN、Col I 蛋白含量增多, 表现为与对照组比较, TGF-β 组、TGF-β1 空白质粒组、TGF-β1+miR-145 组培养液上清中 FN 和 Col I 浓度增加 ($P<0.05$)。而 miR-145 抑制上清液 FN、Col I 增加, 表现为 TGF-β1+miR-145 组与 TGF-β1 组和 TGF-β1 空白质粒组比较, FN 和 Col I 浓度明显减少 ($P<0.05$)。见图 6, 表 2。

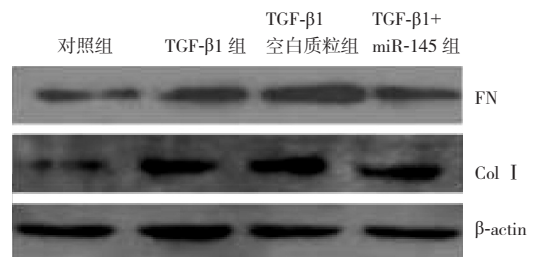


图 6 Western blot 检测 miR-145 表达质粒对 TGF-β1 诱导 HK-2 细胞 FN、Col I 蛋白表达的影响

表2 各组细胞及培养液上清 EMT 蛋白的表达和含量比较 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	FN	Col I	FN 浓度 (ng/mL)	Col I 浓度 (ng/mL)
对照组	0.106 ± 0.013	0.168 ± 0.019	19.0 ± 1.2	32.3 ± 2.5
TGF-β1 组	0.516 ± 0.029 ^a	0.568 ± 0.028 ^a	57.5 ± 4.0 ^a	89.1 ± 3.2 ^a
TGF-β1 空白质粒组	0.511 ± 0.017 ^a	0.545 ± 0.021 ^a	56.7 ± 3.3 ^a	86.2 ± 3.7 ^a
TGF-β1+miR-145 组	0.270 ± 0.031 ^{a,b,c}	0.296 ± 0.018 ^{a,b,c}	34.9 ± 2.1 ^{a,b,c}	49.7 ± 2.4 ^{a,b,c}
<i>F</i> 值	419.084	483.317	252.028	528.828
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: [FN] 纤维连接蛋白; [Col I] I 型胶原蛋白。a 示与对照组比较, $P<0.05$; b 示与 TGF-β1 组比较, $P<0.05$; c 示与 TGF-β1 空白质粒组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

肾脏纤维化是大多数进展性慢性肾脏病不可避免的最终结局。在各种病理状态下, 肾小管上皮细胞可发生表型转化, 转变为产生细胞外基质的成纤维细胞或肌成纤维细胞, 这一病变过程被称为 EMT。目前认为, 肾小管 EMT 是导致肾脏纤维化的主要原因^[4]。研究显示 TGF-β 依赖的 Smad 信号通路作为 EMT 的关键促动因素, 在肾脏纤维化过程中起至关重要的调控作用^[14-15]。其具体机制如下。首先, TGF-β1 与其受体 II 绑定可以激活 I 型 TGF-β 受体激酶, 导致 Smad 通路受体 Smad2 与 Smad3 磷酸化。接着, 磷酸化 Smad2、Smad3 与 Smad4 绑定形成 Smad 复合体并进入细胞核。最后, 核内 Smad 复合体通过调控多种 EMT 靶基因转录产生肾脏纤维化效应^[16]。

miRNAs 是一类内源性、小分子、非编码 RNA, 通过与多种 mRNAs 相互作用以调控靶基因的表达, 并且诱导 mRNA 翻译抑制和降解^[17]。miRNAs 参与多种生理过程, 包括胚胎发生、器官发育、肿瘤形成及 EMT 启动等^[18-19]。新近研究发现, 在乳腺癌细胞中 miR-200 家族成员 miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141 和 miR-429 表达水平均显著下调, 增强其表达可有效阻止乳腺癌细胞 EMT 发生^[20]。同样, Chen 等^[21]研究显示, miR-328 可通过靶定 CD44 抑制肾小管细胞 EMT。这些结果暗示一些 miRNAs 可能在 EMT 形成及纤维化发生中发挥重要作用。

有鉴于此, 本研究以 TGF-β1 诱导的体外肾小管间质纤维化模型为研究对象, 将 pCMV-miR-145 转染至 TGF-β1 诱导的 HK-2 细胞, 通过检测信号蛋白及 EMT 生物标记物表达, 以期探讨 miR-145

对肾小管 EMT 的影响及可能作用机制。本研究将 pre-miR-145 序列克隆至真核表达载体 pCMV-myc 中, 经核酸测序结果证实插入片段与设计序列完全匹配, 提示 miR-145 真核表达载体 pCMV-miR-145 构建成功; 荧光显微镜观察到空白质粒组和 miR-145 组细胞中有大量荧光信号, 对照组未出现, 从而证明真核质粒稳定地转染到 HK-2 细胞。实时荧光定量 PCR 显示, 与对照组和空白质粒组比较, miR-145 组细胞内 miR-145 表达显著上调。同时, 通过预实验发现在 0、12、24 h 3 个不同时间点, 分别予 5 μg/L TGF-β1 刺激 HK-2 细胞, 观察到不同分组细胞 miR-145 和 TGF-β1 表达变化是保持一致的。即转染 miR-145 后, 在不同时间点均可抑制 TGF-β1 的过表达, 其中以 24 h 时最显著。根据 TGF-β 依赖 Smad 信号通路作用机制, 因此选择以 24 h 为时间切入点进行分析研究。本研究显示与对照组比较, TGF-β1 组中信号蛋白 TGF-β1、Smad3、Smad2/3 及 p-Smad2/3 表达均增加; 这暗示 TGF-β 依赖的 Smad 信号通路激活。而 TGF-β1+miR-145 组与 TGF-β1 组和 TGF-β1 空白质粒组比较, TGF-β1、Smad3、Smad2/3 及 p-Smad2/3 蛋白表达均减少。因此, 本研究结果表明体外 miR-145 抑制 TGF-β 依赖的 Smad 信号通路活性, 从而可能抑制肾小管 EMT。

EMT 从启动到完成的整个过程涉及多种分子生物学变化, 包括转录因子的激活、特异性细胞表面蛋白的表达、细胞骨架蛋白的重建与表达、细胞外基质成分的改变等。在许多情况下, 这些相关因子也成为 EMT 的生物标记物^[22]。EMT 生物标记物可分为获得标记物和丢失标记物两类, 获得标记物包括 α-SMA、FN 和 Col I 等; 丢失标记物包括 E-cadherin、扣带蛋白 (zonula occludens 1,

ZO-1)、细胞角蛋白(Cytokeratin)等^[23]。本研究表明,与对照组比较,TGF- β 1组细胞中获得标记物 α -SMA、FN和Col I蛋白表达增加;培养液上清中细胞外基质FN和Col I浓度增高。而TGF- β 1+miR-145组与TGF- β 1组和TGF- β 1空白质粒组比较,细胞中获得标记物 α -SMA、FN和Col I蛋白表达减少;培养液上清中细胞外基质FN和Col I浓度减少,这同样表明miR-145可能抑制肾小管EMT。

综上所述,本研究表明在体外miR-145可参与肾小管EMT的调控。miR-145可能通过抑制TGF- β 依赖的Smad信号通路活性,从而抑制肾小管EMT。本研究为今后进一步行体内实验及肾脏纤维化的治疗提供了新的理论依据。然而,本研究存在一些局限性。例如,miR-145调控TGF- β /Smad信号通路的具体机制尚待阐述。miR-145是否直接作用于TGF- β /Smad信号通路的下游信号蛋白抑或作用于该信号通路的靶基因,从而发挥抑制纤维化效应,有待今后研究进一步证明。

[参 考 文 献]

- [1] Eddy AA, Neilson EG. Chronic kidney disease progression[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(11): 2964-2966.
- [2] Wang Y, Wang B, Du F, et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal interstitial fibrosis in mice[J]. J Histochem Cytochem, 2015, 63(4): 270-279.
- [3] Sugiyama F, Kobayashi N, Ishikawa M, et al. Renoprotective mechanisms of telmisartan on renal injury and inflammation in SHRSP.Z-Leprfa/IzmDmcr rats[J]. Clin Exp Nephrol, 2013, 17(4): 515-524.
- [4] Iwano M, Plieth D, Danoff TM, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis[J]. J Clin Invest, 2002, 110(3): 341-350.
- [5] Huang Y, Tong J, He F, et al. miR-141 regulates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through repression of HIPK2 expression in renal tubular epithelial cells[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(2): 311-318.
- [6] Tang O, Chen XM, Shen S, et al. MiRNA-200b represses transforming growth factor- β 1-induced EMT and fibronectin expression in kidney proximal tubular cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 304(10): F1266-F1273.
- [7] Wang JY, Gao YB, Zhang N, et al. miR-21 overexpression enhances TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition by target smad7 and aggravates renal damage in diabetic nephropathy[J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 392(1-2): 163-172.
- [8] Kojima S, Enokida H, Yoshino H, et al. The tumor-suppressive microRNA-143/145 cluster inhibits cell migration and invasion by targeting GOLM1 in prostate cancer[J]. J Hum Genet, 2014, 59(2): 78-87.
- [9] Rangrez AY, Massy ZA, Metzinger-Le Meuth V, et al. miR-143 and miR-145: molecular keys to switch the phenotype of vascular smooth muscle cells[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2011, 4(2): 197-205.
- [10] Zhang C. MicroRNA-145 in vascular smooth muscle cell biology: a new therapeutic target for vascular disease[J]. Cell Cycle, 2009, 8(21): 3469-3473.
- [11] Yang S, Cui H, Xie N, et al. miR-145 regulates myofibroblast differentiation and lung fibrosis[J]. FASEB J, 2013, 27(6): 2382-2391.
- [12] Megiorni F, Cialfi S, Cimino G, et al. Elevated levels of miR-145 correlate with SMAD3 down-regulation in cystic fibrosis patients[J]. J Cyst Fibros, 2013, 12(6): 797-802.
- [13] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [14] Lan HY. Diverse roles of TGF β /Smads in renal fibrosis and inflammation[J]. Int J Biol Sci, 2011, 7(7): 1056-1067.
- [15] Meng XM, Chung AC, Lan HY. Role of the TGF β /BMP 7/Smad pathways in renal diseases[J]. Clin Sci (Lond), 2013, 124(4): 243-254.
- [16] Nawshad A, Hay ED. TGF β 3 signaling activates transcription of the LEF1 gene to induce epithelial mesenchymal transformation during mouse palate development[J]. J Cell Biol, 2003, 163(6): 1291-1301.
- [17] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [18] Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, et al. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs[J]. Nat Genet, 2006, 38(3): 356-362.
- [19] Esquela Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4): 259-269.
- [20] Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1[J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(5): 593-601.
- [21] Chen CH, Cheng CY, Chen YC, et al. MicroRNA-328 inhibits renal tubular cell epithelial-to-mesenchymal transition by targeting the CD44 in pressure-induced renal fibrosis[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99802.
- [22] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1420-1428.
- [23] Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(2): 212-222.

(本文编辑: 万静)