

肾阳虚大鼠肾组织中 microRNA 差异性表达与信号通路分析

宣玲¹, 包玉婷¹, 周小杰¹, 姬丽婷¹, 杨元宵², 李昌煜^{1*}

(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053;

2. 杭州医学院基础医学与法医学院, 杭州 310013)

[摘要] 目的: 采用基因芯片检测腺嘌呤造模诱导肾阳虚证大鼠肾组织中显著差异表达的小分子核糖核酸(miRNA), 并用生物信息学方法分析其意义。方法: 模型组大鼠灌胃 150 mg·kg⁻¹腺嘌呤诱导肾阳虚肾损伤模型, 正常组灌服等量生理盐水。麻醉处死后取部分肾组织病理切片做苏木素-伊红(HE)染色并检测血液中血尿素氮(BUN), 血肌酐(SCr)的含量, 尿液中 24 h 尿蛋白(24U-TP)含量; trizol 法提取肾脏组织中 RNA, RNA 经检测质量合格后用于后续芯片分析。μParaflo® 微流体芯片分析肾组织中差异表达的 miRNA; 通过实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)进一步验证芯片结果; 利用生物信息学网站分析差异表达 miRNA 的靶基因及其功能。结果: 基因芯片结果显示造模后共有 50 个 miRNA 差异表达, 与正常组比较, 模型组只有 9 个 miRNA 在肾组织中高表达且具有显著性差异, 其中, 与正常组比较, 模型组中 rno-miR-21-5p, rno-let-7i-5p, rno-miR-146b-5p 和 rno-miR-15b-5p 表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); rno-miR-6215, rno-miR-192-5p, rno-miR-378b, rno-miR-378a-3p 和 rno-miR-194-5p 表达明显降低($P < 0.05$)。经 PCR 验证表明, 与正常组比较, rno-miR-21-5p, rno-miR-146b-5p 表达显著上升($P < 0.01$); rno-miR-192-5p, rno-miR-378b, rno-miR-378a-3p, rno-miR-194-5p 表达显著下降($P < 0.01$)。其中, miR-192, miR-21, miR-378 与上皮细胞-间充质转化/间充质-上皮细胞转化(EMT/MET)平衡相关, miR-192 和 miR-378 可作为抗纤维化因子保护肾脏, 而 miR-21 可作为促纤维化因子诱导肾脏损伤。miR-194 可通过靶向调控脑 Ras 同源蛋白(Rheb)拮抗缺氧再灌注诱导的人肾近端肾小管上皮细胞 HK-2 损伤。这些差异 miRNA 的靶基因主要富集在 Wnt 和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路上。这两条信号通路与 EMT/MET 平衡密切相关。结论: 通过基因芯片表达谱, 发现 4 个参与肾间质纤维化(RIF)作用调节和 2 个未知功能 miRNA 表达。为进一步深入分析肾阳虚的调控网络提供了一个新的线索。

[关键词] 肾阳虚; 肾间质纤维; 上皮细胞-间充质转化(EMT); microRNA; 生物信息

[中图分类号] R2-0; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)17-0057-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191837

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190605.1804.001.html>

[网络出版时间] 2019-06-06 15:02

Differential Expression and Signal Transduction Analysis of MicroRNA Related to Kidney Yang Deficiency in Kidney Tissues of Rats

XUAN Ling¹, BAO Yu-ting¹, ZHOU Xiao-jie¹, JI Li-ting¹, YANG Yuan-xiao², LI Chang-yu^{1*}

(1. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. School of Basic Medical Sciences & Forensic Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310013, China)

[Abstract] **Objective:** Microarray chip was used to detect the differentially expressed microRNA (miRNA) in kidney tissues of rats with kidney-Yang deficiency induced by adenine, and its significance was analyzed by bioinformatics method. **Method:** Rats with kidney-Yang deficiency were induced by intragastric administration of 150 mg·kg⁻¹ adenine in model group, while rats in normal group were given the same amount of

[收稿日期] 20190103(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673839, 81373507); 浙江省中医药科技计划项目(2019ZQ014); 大学生创新创业孵化项目(2018R410051)

[第一作者] 宣玲, 在读硕士, 从事中药药理及新药开发研究, E-mail: 15375682006@163.com

[通信作者] * 李昌煜, 硕士, 教授, 从事中药药理及新药开发研究, E-mail: lcyzcmu@sina.com

saline. Kidney tissues were taken for hematoxylin-eosin (HE) staining pathological sections after anesthesia and blood urea nitrogen (BUN), creatinine (SCr) in blood and 24-hour urinary protein (24U-TP) in urine were measured. μ Paraflo[®] microfluidic chip technology was used to investigate differential expression miRNA in kidney tissues, and microarray results were verified by Real-time PCR. Bioinformatics database was used to analyze the target genes and functions of differential expression miRNAs. **Result:** Gene chip results showed that there were 50 differentially expressed microRNAs after modeling. Compared with control group, only 9 miRNAs were highly expressed in kidney tissues with significant difference were detected in model group. Compared with the normal group, the expression of rno-miR-21-5p, rno-let-7i-5p, rno-miR-146b-5p and rno-miR-15b-5p in model group increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the expression of rno-miR-6215, rno-miR-192-5p, rno-miR-378b, rno-miR-378a-3p and rno-miR-194-5p decreased significantly ($P < 0.05$). Verification by Real-time PCR showed that, compared with the normal group, the expression of rno-miR-21-5p and rno-miR-146b-5p increased significantly ($P < 0.01$), while the expression of rno-miR-192-5p, rno-miR-378b, rno-miR-378a-3p and rno-miR-194-5p decreased significantly ($P < 0.01$). In which, miR-192, miR-21 and miR-378 are associated with epithelial-mesenchymal transition/mesenchymal-epithelial transition (EMT/MET) balance. miR-192 and miR-378 can be used as anti-fibrosis factors to protect the kidney, while miR-21 can be used as fibrosis factors to induce kidney injury. miR-194 can antagonize the damage of human proximal renal tubular epithelial cells (HK-2) induced by hypoxia-reperfusion by targeting brain Ras homologous protein (Rheb). Target genes of differentially expressed miRNAs were predominantly involved in Wnt and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. **Conclusion:** This experiment found 4 miRNAs involved in the regulation of renal interstitial fibrosis (RIF) and 2miRNAs with unknown functions, which provided a new clue for further analysis of the regulatory network of kidney-yang deficiency.

[**Key words**] kidney Yang deficiency; renal interstitial fibrosis; epithelial to mesenchymal (EMT); microRNA; biological information

肾阳虚为体内肾阳不足,温煦、推动、兴奋功能减退,阳不制阴产生一系列虚寒症状的病理状态。临床上慢性肾脏病患者(CKD)常见肾阳虚证候,肾间质纤维化(RIF)是慢性肾脏病发展为终末期肾衰的关键环节,病理改变以炎性细胞浸润、细胞外基质积聚和成纤维细胞增生为主^[1-5]。RIF属中医“癥积”范畴,多见于“癃闭”“水肿”“关格”“虚劳”等疾病。“肾阳亏虚,阴寒停积”是肾络癥积的中医病机,采取有效的治疗策略延缓 RIF 的进展成为治疗 CKD 的重点^[6-7]。课题组前期研究发现,清洁级雄性 SD 大鼠经腺嘌呤造模后,可通过损伤肾脏诱导肾功能衰竭,进而出现一系列阳虚症状,通过检测相关指标判断为理想的肾阳虚肾损伤动物模型^[8]。且腺嘌呤诱导的肾阳虚证大鼠存在明显的 EMT/MET 失衡^[9],该平衡与 RIF 关系密切。小分子核糖核酸(miRNA, miR)是一类长度为 18~25 个核糖核苷酸的单链小分子 RNA,通过与目的基因 3'非翻译区(3-UTR)结合并负调控靶基因发挥作用^[10-11]。大量研究表明 miRNA 与 RIF 进程密切相关,在其发生发展中起着至关重要的作用,可作为潜在的治疗靶

标及诊断和预后的生物标志物发挥作用^[12-14]。本实验通过基因芯片筛选肾脏组织中与肾阳虚证发生或发展潜在相关的差异性 miRNA,利用生物信息学网站分析差异表达 miRNA 的靶基因及功能。为更好的研究肾损伤所致肾阳虚病理进程提供新的思路和方法。

1 材料

1.1 动物 12 只 SPF 级健康雄性 SD 大鼠,购自上海西普尔必凯实验动物有限公司。合格证号 SCXK(沪)2013-0016。动物由浙江中医药大学动物实验中心代为饲养,使用许可证号 SYXK(浙)2013-0184。饲养条件:温度(22±1)℃,湿度 50%~60%,12 h 光照,通风频率 15~20 次/h,标准饲料喂养,饮水自由。伦理审查决议编号 ZSLL-2017-054。

1.2 药品和试剂 腺嘌呤(上海伯奥生物科技有限公司,批号 131203);大鼠尿蛋白(UP)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海联迈生物工程有限公司,货号 LM-13349-ES);trizol 试剂(美国 Thermo 公司,批号 15596026);无核酸酶水(美国 Ambion 公司,批号 1706010);miRNA 实时荧光定量 PCR

(Real-time PCR) 试剂盒 (Takara 公司, 货号 RR820A, 638315); 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 1120)。

1.3 仪器 AL104 型 FA/JA 电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); 5430R 小型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); CFX96 型 Real-time PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); NanoDrop 2000 型分光光度计 (美国 Thermo 公司); DMI3000B 型荧光倒置显微镜 (德国莱卡公司); μ Paraflo[®] 微流体芯片 (杭州联川生物有限公司); GenePix4000B 型激光扫描仪 (美国 Molecular Device 公司); Agilent 2100 生物分析仪 (美国 Agilent 公司); 7020 型全自动生化仪 (日本日立株式会社)。

2 方法

2.1 腺嘌呤悬浊液制备 取状腺嘌呤粉末 15 g, 置于烧杯中, 加入蒸馏水, 搅拌, 溶解, 再加蒸馏水至 1 000 mL, 制备 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腺嘌呤悬浊液。4 °C 冰箱保存, 备用。

2.2 大鼠肾虚模型制备 12 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组和模型组, 依据课题组前期实验结果^[15], 模型组以 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的灌胃量, 连续灌胃给予 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腺嘌呤悬浊液 35 d, 每天 1 次; 正常组灌服等量生理盐水。中医证型诊断标准参考文献^[16]拟定。其规定通过观察动物的外观表现, 如出现体质量减轻, 竖毛拱背, 精神萎靡, 畏寒尿多等阳虚症状, 来判断肾虚动物模型与肾虚证的符合程度, 从而确定模型是否成功。

2.3 肾脏脏器指数计算 末次给药 1 h 后麻醉处死动物, 取肾脏, 称其湿重, 计算脏器指数 (脏器指数 = 脏器湿重/体质量)。

2.4 全自动生化仪检测生化指标 末次给药次日, 麻醉处死动物, 心脏取血, $3 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4 °C 离心 10 min 离心备用; 全自动生化仪检测 BUN, SCr 的含量。

2.5 ELISA 检测 24U-TP 含量 收集 24 h 尿液。 $3 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清, 于 -80 °C 保存, 备用。按照 ELISA 试剂盒说明书检测 24U-TP 含量。

2.6 HE 染色观察肾脏病理变化 取每组 3 只大鼠, 麻醉处死取肾组织, 用 10% 甲醇固定, 石蜡包埋后, 切取厚度约为 3 ~ 5 μm 的切片, 进行 HE 染色。荧光倒置显微镜 200 倍观察 HE 染色结果。

2.7 基因芯片检测 miRNA 表达谱变化 trizol 法提取肾脏组织中 RNA, 提取的 RNA 经 NanoDrop

2000 分光光度计和 Agilent Bioanalyzer 2100 质检合格后可进行后续的芯片实验。 μ Paraflo[®] 微流体芯片技术检测差异表达的 miRNA, 利用激光扫描仪采集杂交图像并使用 Array-Pro 图像分析软件将芯片杂交图像提取为数字信号, 原始数据进行背景值减除, 数据归一化后, 采用表达差异倍数 (fold change, fc) 以及 *t* 检验统计学方法对差异基因进行筛选。 $P < 0.05$ 为标准, 挑选出显著差异的 miRNA。

2.8 Real-time PCR 验证 miRNA 表达趋势 严格按照 takara miRNA 定量试剂盒操作, 上游引物序列见表 1, 下引物为试剂盒中通用引物。反转录反应条件为 37 °C 1 h, 85 °C 5 s。扩增反应条件为预变性 95 °C 30 s。PCR 反应 95 °C 5 s; 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。溶解曲线从 65 °C 开始升温, 每隔 0.5 °C 读数 1 次, 每次 5 s, 直到 95 °C。U6 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行基因表达相对定量分析。

2.9 生物信息网站预测 miRNA 靶基因 TargetScan Human 7.2 (http://www.targetscan.org/vert_72/) 和 microRNA.org (<http://www.mirbase.org/index.shtml>) 网站预测差异表达 miRNA 的靶基因, 两个数据库的靶基因取交集进行后续分析。对于预测得到的靶基因, 同时进行基因本体 (GO) 的功能富集分析及京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 的通路富集分析。

2.10 统计学方法 采用 GraphPad Prism 5.0 软件和 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较采用 *t* 检验, 多个组间比较采用 One-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学差异。

3 结果

3.1 腺嘌呤造模后对大鼠一般症状体征的影响 与正常组比较, 腺嘌呤造模组大鼠体质量显著减轻 ($P < 0.01$), 并出现情绪萎靡, 竖毛拱背, 毛发无光, 畏寒多尿等肾虚症状; 肾脏质量及肾脏指数均有显著增加 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.2 腺嘌呤造模后对大鼠相关生化指标的影响 采用全自动生化仪检测大鼠肾功能损伤情况, 与正常组比较, 腺嘌呤组大鼠血清的 BUN, SCr 以及 24U-TP 含量显著升高 ($P < 0.01$)。见表 3。

3.3 腺嘌呤造模后对大鼠肾脏病理形态学的影响 正常组大鼠肾组织结构清晰, 肾小球、肾小管基本结构和形态均未见异常; 腺嘌呤模型组大鼠肾小球内部结构坍塌, 肾小管扩张, 管腔可见沉积物, 肾小

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
rno-miR-21-5p-F	上游 CCGCGTAGCTTATCAGACTGATGTTGA	27
	下游 GCAGGGTCCGAGGTATTC	18
rno-let-7i-5p-F	上游 CGCTGAGGTAGTAGTTTGCTGCTT	25
	下游 GCAGGGTCCGAGGTATTC	18
rno-miR-6215-F	上游 CCTTTAGGGTTGCAGAGCCAGG	22
	下游 GCAGGGTCCGAGGTATTC	18
rno-miR-146b-5p-F	上游 ACGTGAGAACTGAATTCATAGGCTGT	27
	下游 GCAGGGTCCGAGGTATTC	18
rno-miR-192-5p-F	上游 GCGCTGACCTATGAAATTGACAGCC	24
	下游 GCAGGGTCCGAGGTATTC	18
rno-miR-378b-F	上游 CGAGTGGACTTGGAGTCAGAAGG	24
	下游 GCAGGGTCCGAGGTATTC	18
rno-miR-378a-3p-F	上游 GCACTGGACTTGGAGTCAGAAGG	24
	下游 GCAGGGTCCGAGGTATTC	18
rno-miR-15b-5p-F	上游 GCGTAGCAGCACATCATGGTTTACA	25
	下游 GCAGGGTCCGAGGTATTC	18
rno-miR-194-5p-F	上游 CGTGTAAACAGCAACTCCATGTGGA	24
	下游 GCAGGGTCCGAGGTATTC	18
U6	上游 CTCGCTTCGGCAGCAC	17
	下游 AACGCTTCACGAATTTGCCGT	20

表 2 腺嘌呤造模后对大鼠一般症状体征的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of adenine on renal index in rats after modeling

($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	体质量/g	肾/g	肾脏指数
正常	-	372.10 ± 23.22	2.83 ± 0.18	7.61 ± 0.29
腺嘌呤	150	263.65 ± 35.75 ¹⁾	24.26 ± 1.98 ¹⁾	24.26 ± 1.99 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾P < 0.01(表 3,5 同)。

表 3 腺嘌呤造模后对大鼠相关生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

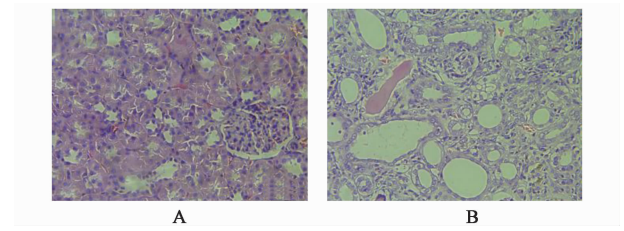
Table 3 Effect of adenine on biochemical indicators in rats after modeling

($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	BUN /mmol·L ⁻¹	Ser /μmol·L ⁻¹	24U-TP /mg·D ⁻¹
正常	-	5.99 ± 0.57	55.94 ± 2.82	22.92 ± 4.74
腺嘌呤	150	64.43 ± 7.32 ¹⁾	341.81 ± 37.28 ¹⁾	45.02 ± 10.15 ¹⁾

管阻塞,部分呈现蛋白管型。见图 1。

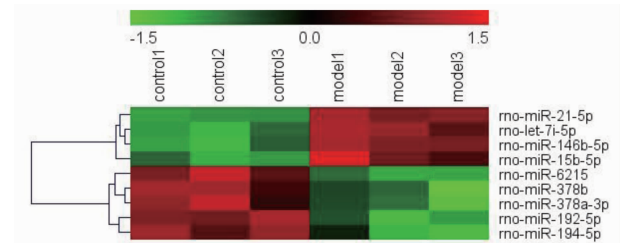
3.4 腺嘌呤造模后对大鼠肾脏组织中 miRNA 表达的影响 腺嘌呤造模诱导肾阳虚大鼠模型后,基因芯片结果显示有 9 个 miRNAs 差异表达显著。其中,与正常组比较,rno-miR-21-5p, rno-let-7i-5p, rno-miR-146b-5p 和 rno-miR-15b-5p 造模后表达明显升高(P < 0.05, P < 0.01); rno-miR-6215, rno-miR-192-5p, rno-miR-378b, rno-miR-378a-3p 和 rno-miR-194-5p 表达明显降低(P < 0.05)。见图 2,表 4。



A. 正常组; B. 腺嘌呤组

图 1 腺嘌呤造模后对大鼠肾脏病理的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of adenine on kidney pathology in rats after modeling (HE, ×200)



红色. miRNA 高表达; 绿色. mRNA 低表达

图 2 差异性 miRNAs 聚类分析

Fig. 2 Differential miRNAs cluster analysis

3.5 Real-time PCR 验证基因芯片结果 PCR 数据显示,比较于正常组,腺嘌呤诱导肾阳虚模型之后, rno-miR-21-5p, rno-miR-146b-5p 表达显著上升(P < 0.01); rno-miR-192-5p, rno-miR-378b, rno-miR-378a-

表 4 上、下调差异表达的 miRNA 在正常与模型肾脏组织中的表达差异

Table 4 Differential expression of up and down-regulated microRNAs in normal and model kidney tissues

miRNA	差异倍数	表达趋势
rno-miR-21-5p	3.09 ²⁾	up
rno-let-7i-5p	1.14 ²⁾	up
rno-miR-146b-5p	3.76 ¹⁾	up
rno-miR-15b-5p	1.47 ¹⁾	up
rno-miR-6215	-2.37 ²⁾	down
rno-miR-192-5p	-2.57 ¹⁾	down
rno-miR-378b	-1.61 ¹⁾	down
rno-miR-378a-3p	-1.68 ¹⁾	down
rno-miR-194-5p	-2.36 ¹⁾	down

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

表 5 差异表达 miRNA PCR 验证结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Real-time PCR result of miRNA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	miR-21-5p	let-7i-5p	miR-146b-5p	miR-15b-5p	miR-194-5p
正常	-	0.87 ± 0.18	1.33 ± 0.10	1.18 ± 0.20	0.85 ± 0.20	0.93 ± 0.30
腺嘌呤	150	2.71 ± 0.08 ¹⁾	1.50 ± 0.06	7.61 ± 0.06 ¹⁾	0.73 ± 0.03	0.05 ± 0.01 ¹⁾
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	miR-192-5p	miR-378b	miR-378a-3p	miR-6215	
正常	-	1.00 ± 0.17	0.90 ± 0.28	0.88 ± 0.25	0.85 ± 0.24	
腺嘌呤	150	0.03 ± 0.02 ¹⁾	0.18 ± 0.01 ¹⁾	0.16 ± 0.01 ¹⁾	0.04 ± 0.01 ¹⁾	

作用下可转变为极难溶解于水的 2,8-二羟基腺嘌呤,沉积于肾小管与肾间质部位,形成异物肉芽肿性炎性反应,堵塞肾小管腔并引起肾小管腔呈囊状扩张。随着病程的进展,肾单位大量丧失,导致肾功能衰竭^[17],进而出现一系列明显的阳虚表现。本实验中模型组大鼠均出现体质量减轻,竖毛拱背,精神萎靡,畏寒尿多等阳虚症状。HE 染色及生化指标显示腺嘌呤组大鼠肾脏损伤严重,综上,表明造模成功。基因芯片结合 PCR 验证结果显示,rno-miR-21-5p 和 rno-miR-146b-5p 造模后表达升高。rno-miR-6215, rno-miR-192-5p, rno-miR-378b, rno-miR-378a-3p 和 rno-miR-194-5p 表达降低,差异具有统计学意义,提示这些 miRNA 可能参与肾阳虚的发生发展并有可能成为其新的治疗标靶及生物标志物。

大量研究表明,肾阳虚证大鼠同时存在明显的肾间质纤维化形象,且温肾化气方剂可能通过延缓肾间质纤维化进程进而有效缓解肾阳虚症状^[18-20]。EMT 是肾间质纤维化的主要细胞学行为,在其发生发展中起着重要作用^[21-22]。本试验结果结合文献报道表明,上述部分 miRNA 可通过影响 EMT/MET

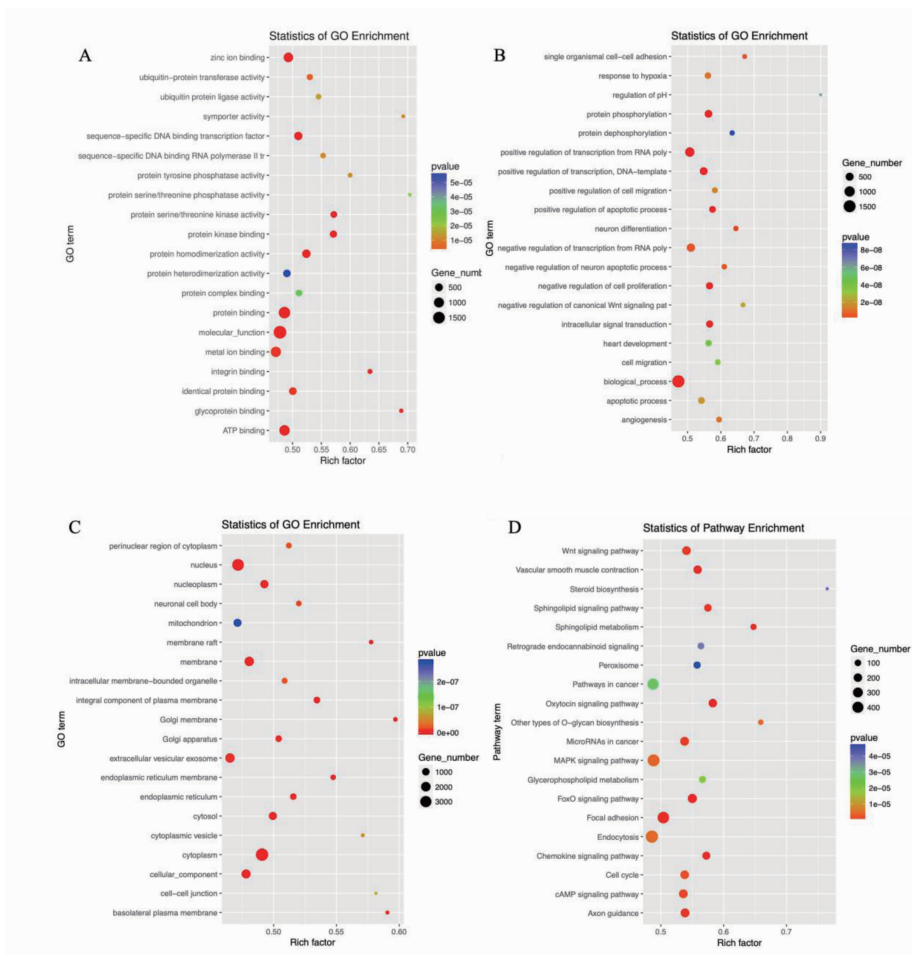
3p, rno-miR-194-5p 表达显著下降 ($P < 0.01$)。这与基因芯片结果基本一致,表明基因芯片结果可信。见表 5。

3.6 已验证差异 miRNA 靶基因预测及功能分析结果 利用 TargetScan 和 miRanda 在线预测网站取交集得出,这 7 个 miRNA 共有 3 716 个靶基因。GO, KEGG 富集分析结果见图 3。其中, P 值越小表明 GO 富集程度越高; RichFactor 表示位于该 KEGG 的差异基因数/位于该 KEGG 的总基因数, RichFactor 值越大, KEGG 富集程度越大。

4 讨论

《中药新药临床研究指导原则》中规定通过观察动物的外观表现来判断肾阳虚动物模型与肾阳虚证的符合程度,从而确定模型是否成功。当机体异常摄入大剂量高浓度腺嘌呤时,腺嘌呤在酶的

平衡从而参与肾间质纤维化进程。研究发现在人肾脏近端小管细胞中,转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 可下调 miR-192 的表达且过表达 miR-192 可抑制 ZEB1/2 的表达从而逆转 TGF- β_1 介导的 E-cadherin 的下调^[23]。上述研究表明 miR-192 上调对肾脏具有一定的保护作用,这与本实验结果一致。miR-21 在肾纤维化动物模型及慢性肾脏疾病患者肾组织中均显著提高^[14,24],本实验中,腺嘌呤诱导肾阳虚证模型鼠肾组织中,miR-21 同样高表达。TGF- β_1 可通过 Smad3 诱导 miR-21 表达,其作为促纤维化因子可通过抑制 Smad7 表达从而激活 TGF- β 和 NF- κ B 信号通路。相对地,Smad7 过表达可抑制 Smad3 活性从而阻断 TGF- β 信号通路^[25]。除此以外,miR-21 还可通过抑制 PTEN 蛋白的表达,激活 PI3K/Akt 通路,促进肾小球系膜细胞肥大和纤维连接蛋白的表达^[26]。在人肾脏细胞中,TGF- β_1 可降低 miR-378 的表达,此外 miR-378 还可作为 TGF- β_1 的负调控因子抑制 Smad3 活性并可通过 MAPK 信号通路缓解肾小球系膜肥大和肾小管纤维化^[27]。miR-378a-3p 和 miR-378b 在模型组中均显著下调,与现有资料一



A. 分子功能; B. 生物学进程; C. 细胞组分; D. 靶基因 KEGG 通路分析结果

图 3 靶基因 GO 富集分析

Fig. 3 Analysis of GO enrichment

致,提示 miR-378 可作为抗纤维化因子保护肾脏。同时,根据靶基因预测结果可知,c-Jun 是 miR-378a-3p 的靶基因,c-Jun 与 c-Fos 结合形成激活蛋白 1 (AP-1) 早期反应转录因子。研究表明 AP-1 可通过调节下游基因 TGF- β_1 的应答,促进 I 型胶原 mRNA 的转录和分泌^[28],从而诱导纤维化。miR-378a-3p/c-Jun/AP-1/TGF- β 构成纤维化调控网络需要进一步分析、实验证明。miR-194 可通过靶向调控脑 Ras 同源蛋白 (Rheb) 拮抗缺氧再灌注诱导的 HK-2 损伤^[29]。但在现有资料中,未见 miR-146b-5p 及 miR-6215 在肾脏纤维化中的相关研究报道。

进一步通过 KEGG 通路分析发现,差异 miRNA 的靶基因多富集在 Wnt 信号通路和 MAPK 信号通路上。其中,Wnt 信号通路可通过抑制糖原合成酶激酶-3 β (GSK3 β) 介导的磷酸化和抑制细胞质中 β -连环素的降解来诱导 EMT^[30]。TGF- β 可通过 MAPK 信号通路(如 p38,Erk1/2)刺激细胞外基质

(ECM)的合成和积累从而诱导 EMT^[31]。进一步证实这些差异 miRNA 的靶基因可能通过影响 EMT/MET 平衡从而参与肾间质纤维化进程进而改善或加剧肾阳虚症状。本实验结合基因芯片,从基因水平和 miRNA 水平多维度确定了参与并调控肾阳虚的潜在原因,所预测的结果为肾阳虚的治疗和预测以及疾病发生发展的机制研究提供了理论依据。

[参考文献]

[1] Inoue T,Umezawa A,Takenaka T,et al. The contribution of epithelial mesenchymal transition to renal fibrosis differs among kidney disease models [J]. *Kidney Int*, 2015,87(1):223-228.

[2] ZHAO H, DONG Y, TIAN X, et al. Matrix metalloproteinases contribute to kidney fibrosis in chronic kidney diseases [J]. *World J Nephrol*, 2013, 2(3):84-89.

[3] Thiery J P, Acloque H,HUANG R Y,et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease

- [J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890.
- [4] 肖相如. 温阳法在慢性肾衰中的运用[J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(5): 86-87.
- [5] 刘莹露, 石格, 曹东维, 等. 肾脏周细胞-肌成纤维细胞转分化的病理机制及中药的干预作用[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(21): 4192-4197.
- [6] 陈朝青, 李彧, 李亚东. 肾脏纤维化的细胞学基础及中医药防治研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(3): 412-415.
- [7] ZHAO X, LUO G, FAN Y, et al. ILEI is an important intermediate participating in the formation of TGF- β_1 -induced renal tubular EMT [J]. *Cell Biochem Func*, 2018, 36(2): 46-55.
- [8] 童骏峰, 徐志伟, 杨元宵, 等. 腺嘌呤与氯化可的松所致大鼠肾阳虚证模型比较研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(11): 3901-3904.
- [9] Kalluri R, Weinberg R A. The basics of epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1420-1428.
- [10] Kim V N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(5): 376-385.
- [11] Jung H J, Suh Y. Circulating miRNAs in ageing and ageing-related diseases [J]. *J Genet Genomics*, 2014, 41(9): 465-472.
- [12] BAO H, HU S, ZHANG C, et al. Inhibition of miR-21 prevents fibrogenic activation in podocytes and tubular cells in IgA nephropathy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, (4): 455-460.
- [13] LUO L, LUO G, FANG Q, et al. Stable expression of hypoxia-inducible factor-1 α in human renal proximal tubular epithelial cells promotes epithelial to mesenchymal transition [J]. *Transplant Pro*, 2014, 46(1): 130-134.
- [14] François G, Grégoire S, Gnemmi V, et al. Increased circulating miR-A21 levels are associated with kidney fibrosis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e58014.
- [15] 陈红淑, 杨元宵, 戴世杰, 等. 肾气丸对肾阳虚证大鼠肾间质纤维化的作用研究 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 2017(6): 2700-2702.
- [16] 沈自尹, 王文健. 中医虚证辨证参考标准 [J]. 中西医结合杂志, 1986, 1986(10): 117.
- [17] Ali B H, Al-Salam S, Al Husseni I, et al. Effects of Gum Arabic in rats with adenine-induced chronic renal failure [J]. *Exp Biol Med (May-wood)*, 2010, 235(3): 373-382.
- [18] 孙伟, 尹雪皎, 涂玥, 等. 芪附汤调节 ERK1/2 信号通路改善 UUO 阳虚证模型肾间质纤维化的作用和机制 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4082-4089.
- [19] 张选明, 杨百京, 叶丹, 等. 补阳还五汤对肾间质纤维化大鼠 α -SMA 的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 7(23): 136-140.
- [20] 高艳霞, 蔡宏瑜, 万强, 等. 黄芪山甲方对 UUO 模型中肾间质纤维化 TGF- β_1 及的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(12): 1090-1091.
- [21] HUANG S, Susztak K. Epithelial plasticity versus EMT in kidney fibrosis [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(1): 4-6.
- [22] 尹雪皎, 孙伟, 万毅刚, 等. 肾小管上皮细胞间充质转分化的调控机制及中药的干预作用 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(5): 648-652.
- [23] WANG B, Herman-Edelstein M, Koh P, et al. E-cadherin expression is regulated by miR-192/215 by a mechanism that is independent of the profibrotic effects of transforming growth factor- β [J]. *Diabetes*, 2010, 59(7): 1794-1802.
- [24] Chau B N, XIN C, Hartner J, et al. MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways [J]. *Sci Transl Med*, 2012, doi: 10.1126/scitranslmed.3003205.
- [25] ZHONG X, Chung A C K, CHEN H Y, et al. miR-21 is a key therapeutic target for renal injury in a mouse model of type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2013, 56(3): 663-674.
- [26] Dey N, Das F, Mariappan M M, et al. MicroRNA-21 orchestrates high glucose-induced signals to TOR complex 1, resulting in renal cell pathology in diabetes [J]. *J Bio Chem*, 2011, 286(29): 25586-25603.
- [27] WANG B, YAO K, Wise A, et al. miR-378 reduces mesangial hypertrophy and kidney tubular fibrosis via MAPK signaling [J]. *Clin Sci*, 2017, 131(5): 411-423.
- [28] Chadjichristos C, Ghayor C, Herrouin J F, et al. Down-regulation of human type II collagen gene expression by transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in articular chondrocytes involves SP3/SP1 ratio [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(46): 43903-43917.
- [29] SHEN Y, ZHAI Y, WANG L, et al. MicroRNA-194 overexpression protects against hypoxia/reperfusion-induced HK-2 cell injury through direct targeting Rheb [J]. *J Cell Biochem*, 2018, doi: 10.1002/jcb.28114.
- [30] YANG S, LIU Y, LI M Y, et al. FDX3 promotes tumor growth and metastasis by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway and EMT in non-small cell lung cancer [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 124.
- [31] Wojciechowski M C, Mahmutovic L, SHU D Y, et al. ERK1/2 signaling is required for the initiation but not progression of TGF β -induced lens epithelial to mesenchymal transition (EMT) [J]. *Exp Eye Res*, 2017, 159: 98-113.

[责任编辑 孙丛丛]