

# 糖尿病肾病患者血清 miR-192 的表达及其对转化生长因子 $\beta$ 信号通路的影响

李洁 周平 胡秀梅 彭佑铭

**【摘要】** 目的 检测糖尿病肾病(DN)患者血清中 microRNA(miR)-192 的表达,并探讨其在 DN 的作用机制。方法 应用实时荧光定量 PCR 检测肾活检确诊的 DN 组、糖尿病无肾损害组和健康人群血清中 miR-192 的表达,以 U6 小 RNA 为内参,计算其相对表达量。同时检测肾组织 miR-210 表达。探讨 miR-192 作为 DN 特异性血清学指标的可能性。用生物信息分析方法分析可受 miR-192 调节的靶基因,并在体外过表达或下调 miR-192 表达以进一步研究。用不同浓度转化生长因子  $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)刺激肾小球系膜细胞,检测细胞和培养上清中 miR-192 含量。结果 DN 患者血清 miR-192 表达量显著低于健康对照( $0.41 \pm 0.09$  比  $1.00 \pm 0.00$ ,  $P < 0.01$ )。各组间 miR-210 表达差异无统计学意义。TGF- $\beta$  信号通路下游基因抗锌指 E 盒结合蛋白 1(ZEB-1)、胰岛素样生长因子 1(IGF-1)和 I 型胶原(Col I)可被 miR-192 调节。不同浓度 TGF- $\beta$ 1 刺激均导致系膜细胞及培养上清 miR-192 含量显著下降。结论 血清中 miR-192 可能通过调节 TGF- $\beta$  通路参与 DN 的发病。miR-192 具有的特异性可能会成为 DN 潜在的诊断标志物。

**【关键词】** 糖尿病肾病; 微 RNA; 转化生长因子  $\beta$ ; miR-192

**Expression of serum microRNA-192 in the diabetic nephropathy patients and its impact on TGF- $\beta$  signaling pathway** LI Jie, ZHOU Ping, HU Xiu-mei, PENG You-ming. Department of Nephrology, the First Hospital of Zhuzhou City, Hunan Zhuzhou 412000, China

Corresponding author: PENG You-ming, Department of Nephrology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China, Email: pengym5577@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To detect the expression of serum microRNA (miR)-192 in diabetic nephropathy (DN) patients and investigate its effects on DN. **Methods** The serum levels of miR-192 and miR-210 in DN patients, diabetic patients without renal injury and healthy people were detected by real-time quantitative PCR. Down-stream target genes were predicted using TargetScan software and further confirmed by gain of function and loss of function studies *in vitro*. Mesangial cells were treated with different concentrations of TGF- $\beta$ 1, then miR-192 expressions of cells and supernatant were examined as well. **Results** Serum miR-192 level significantly decreased in DN patients compared with healthy people ( $0.41 \pm 0.09$  vs  $1.00 \pm 0.00$ ,  $P < 0.01$ ) and diabetic patients without renal injury, while the serum miR-210 levels were not significantly different among three groups. Bioinformatics analysis results showed that some target genes were involved in TGF- $\beta$  signal pathway. ZBP1, IGF-1 and type I collagen (Col I) were chosen and confirmed by Western blotting, which were regulated by miR-192. TGF- $\beta$ 1 decreased the expression of miR-192 in both cells and cell culture supernatants. **Conclusion** Serum miR-192 may promote the progress of DN by regulating TGF- $\beta$ 1 signaling pathway and may be used as a potential biomarker in the diagnosis of DN depending on its certain specificity.

**【Key words】** Diabetic nephropathy; MicroRNAs; Transforming growth factor- $\beta$ ; miR-192

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2012.05.008

作者单位: 412000 湖南省株洲市第一医院肾病内科(李洁、胡秀梅、周平); 中南大学湘雅二医院肾病内科(彭佑铭)

通信作者: 彭佑铭, Email: pengym5577@yahoo.com.cn

糖尿病肾病(DN)是糖尿病重要的微血管并发症,病理表现为细胞外基质(ECM)在肾小球系膜及基底膜内过度积聚,导致肾小球纤维化。microRNA(miR)为19~25核苷酸的单链RNA,通过与mRNA 3'UTR局部互补进行碱基配对,从而对基因表达发挥负性调控作用。miR在细胞增殖、凋亡及应激反应起重要作用,其功能的增强或减弱都将影响疾病的进程<sup>[1-2]</sup>。miR-192在肾脏组织高表达,富集于肾皮质。DN纤维化肾小球中的miR-192表达水平显著低于无纤维化组织,miR-192表达下降与肾小管间质纤维化相关<sup>[3]</sup>。同时,miR-192与Ago2(argonaute2)结合,在血清、血浆中稳定存在<sup>[4]</sup>。本研究通过检测DN患者血清中miR-192的表达,探讨其作为预测DN病情的标志物的可能性,并分析其在DN中的可能作用机制。

### 对象与方法

1. 对象与标本采集: DN组为2008年至2010年在本院肾内科住院,临床诊断为DN并通过肾活检病理检查确诊的患者20例,男13例,女7例,年龄(45.2±4.7)岁,病程>7年,eGFR(70.2±10.7) ml/min,24 h尿蛋白量(5.3±3.1) g;病理均显示典型的K-W硬化性结节病灶,免疫荧光检测为免疫复合物阴性;排除并发原发性或其他继发性肾小球、肾小管病变。糖尿病无肾损害(DM)组30例,男15例,女15例,年龄(50.5±3.7)岁,确诊糖尿病≤1年,eGFR(87.9±5.6) ml/min,尿蛋白阴性。2组均为2型糖尿病患者,并接受降糖药物治疗,血糖控制满意。健康对照组30例,男16例,女14例,年龄(42.4±2.3)岁,为本院体检中心年龄大于40岁的健康人群。受试者抽取10 ml全血,1200×g离心分离血清,保存于-80℃冰箱待测。本研究经本院伦理委员会批准,且所有受试者均签署知情同意书。

2. 主要试剂: 人肾系膜细胞系(HMC,本实验室保存),胎牛血清(杭州四季青),高糖DMEM培养基、F12培养基(美国Gibco),抗锌指E盒结合蛋白1(zinc finger E-box-binding protein 1,ZEB1)单克隆抗体(美国CST),抗I型胶原(Col I)多克隆抗体、抗胰岛素样生长因子1(IGF-1)多克隆抗体(英国Abcam),miR-192 mimics(miR-192模拟核酸)、抗miR-192及Scr(Scrmble,与人基因组非

同源序列)对照合成(上海吉玛),重组人转化生长因子(TGF)β1(美国R&D),Lipofectamine 2000(美国Invitrogen),辣根过氧化物酶(HRP)耦联的山羊抗鼠IgG(韩国KPL),TRI Reagent® BD(美国Invitrogen),氯仿、异丙醇、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司),Nuclease-Free水(美国Promega),TaqMan® MicroRNA反转录试剂盒、miR-192、miR-210和U6 TaqMan检测试剂盒、TaqMan 2×Universal PCR Master Mix II(无UNG)(美国Applied Biosystems)。

3. 常规实验室检查: 采集晨尿行尿常规检查。晨空腹采集血液样本,全自动生化分析仪检测肾功能、血脂、血糖等生化指标。用简化MDRD公式计算肾小球滤过率eGFR [ $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(1.73\text{ m}^2)^{-1}$ ]= $186\times\text{Scr}(\text{mg}/\text{dl})^{-1.154}\times\text{年龄}(\text{岁})^{-0.203}\times 0.742(\text{女})$ 。

4. RNA抽提及反转录: 用Trizol试剂抽提血清中总RNA。取500 μl血清中加入500 μl Trizol,震荡15 s充分混匀,室温放置5 min,加入250 μl氯仿,剧烈震荡15 s,室温静置5 min,15 000×g,4℃离心15 min。小心吸取上层水相转移至另一EP管中,加入等体积异丙醇,颠倒混匀沉淀RNA,12 000×g 4℃离心10 min,75%乙醇漂洗1次,干燥后溶解。采用TaqMan®反转录试剂盒中特异性的茎-环状引物,进行反转录。100 mmol dNTPs(含dTTP)0.15 μl,MultiScribe® Reverse Transcriptase 1.00 μl(50 U/μl),10×Reverse Transcription Buffer 1.50 μl,RNase抑制剂0.19 μl(20 U/μl),RT primer 3 μl,总RNA 100 ng,Nuclease-free水补至15 μl。反应条件:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min。

5. 实时荧光定量PCR检测: 按说明书操作。采用TaqMan方法进行miR-192、miR-210和U6的实时定量检测。TaqMan 2×Universal PCR Master Mix II(无UNG)10 μl,TaqMan MicroRNA Assays 1 μl,反转录产物4 μl,Nuclease-free水补至20 μl。反应条件:95℃ 10 min,95℃ 15 s及60℃ 1 min,后2步共50个循环。PCR反应在StepOne™荧光定量PCR仪进行。

6. 下游靶基因验证: HMC用10%胎牛血清(DMEM-F12培养液100 U/ml青霉素和100 U/ml链霉素)常规培养,miR-192 mimics寡核苷酸、miR-192反义核酸及对照转染采用脂质体。转染前1 d消化细胞接种于6 cm培养皿,48 h后吸

弃培养基,1×PBS 洗涤两次。加入 2×Loading buffer 120 μl,用细胞刮刮下细胞,冰上裂解,测量浓度后 100℃水浴变性 10 min。上样 30 μg,10%~15%SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,依次加一抗、二抗,ECL 显色试剂,X 线片曝光、显影。

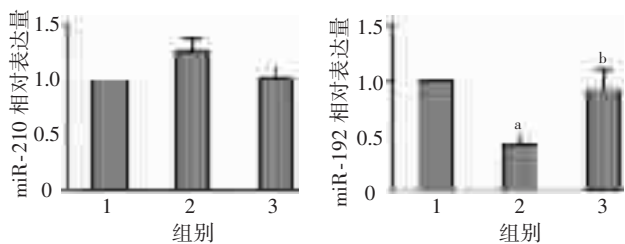
7. TGF-β1 对 HMC 的 miR-192 表达影响: HMC 常规培养,以 5×10<sup>5</sup>/ml 细胞悬液接种六孔板,24 h 更换无血清培养基分别加入 5 μg/L、10 μg/L TGF-β1 刺激,以 0.1%BSA 作对照。48 h 后,分别抽提细胞培养上清和细胞总 RNA,进行 miR-192 定量 PCR 检测。

8. 数据处理及统计学分析:首先计算 3 个平行反应的平均 CT 值。用比较 CT 值法。ΔCT 目的基因=每个标本的目的基因 CT 值-此标本的内参基因 U6 的 CT 值。ΔΔCT 目的基因=处理组 ΔCT 目的基因-对照组 ΔCT 目的基因。基因相对表达量采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 方法计算<sup>[5]</sup>。两个样本符合正态分布和方差齐,采用两个独立样本 t 检验,α=0.05 作为检验标准。应用 SPSS 17.0 软件进行统计。

### 结 果

1. 各组血清 miR-210、miR-192 表达量: 定量 PCR 检测结果显示, DN 组血清 miR-192 表达量(0.41±0.09)显著低于健康对照组(1.00±0.00)和 DM 组(0.91±0.19),而 DN 组血清 miR-210 表达量(1.25±0.12)与健康对照组(1.00±0.00)和 DM 组(1.02±0.10)差异无统计学意义,见图 1。

2. miR-192 下游靶基因分析: TargetScan 是预测 miRNA 靶基因最常用和权威的在线软件,通过互补及结合序列保守性等原则进行数据库比对,对 miRNA 进行预测,其预测准确度高<sup>[6]</sup>。在对 miR-192 靶基因预测后,与肾脏纤维化和 DN 相关的 TGF-β 信号通路基因为其潜在靶基因。我们选择了 ZEB-1、IGF-1、Col I,用 Western 印迹进

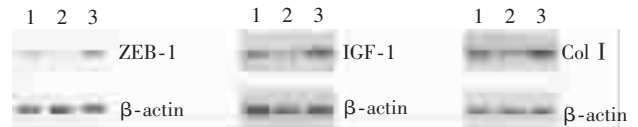


注:1:健康对照组;2:DN 组;3:DM 组;与健康对照组比较,<sup>a</sup>P < 0.01;与 DM 组比较,<sup>b</sup>P < 0.05

图 1 各组血清 miR-210 和 miR-192 表达量

行验证,结果表明这些因子可受 miR-192 的调节,见图 2。

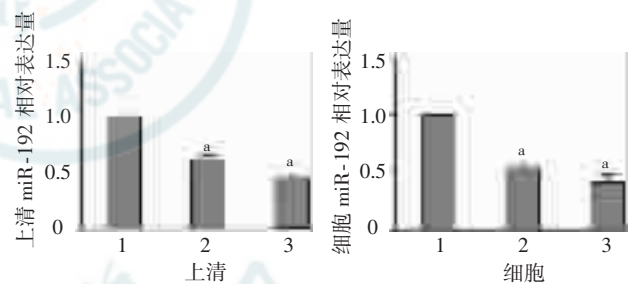
### 5. TGF-β 对 miR-192 表达的影响: 与 0.1%



注:1:Scr 对照;2:miR-192 过表达;3:抑制 miR-192;过表达 miR-192 可下调 ZEB-1、IGF-1 和 Col I 蛋白水平(miR-192 过表达组);采用反义链抑制肾系膜细胞内源性 miR-192 水平,可显著增加 ZEB-1、IGF-1 和 Col I 蛋白水平

图 2 可受 miR-192 调节的 TGF-β 下游基因表达 (Western 印迹)

BSA 对照组(1.00±0.00)比较,肾系膜细胞及培养上清中 miR-192 的含量都显著下降。5 μg/L TGF-β1 浓度组培养上清和系膜细胞 miR-192 表达量分别下降为 0.61±0.04 和 0.54±0.05(均 P < 0.01); 10 μg/L TGF-β1 浓度组培养上清和系膜细胞 miR-192 表达量分别下降为 0.45±0.05 和 0.42±0.06,(均 P < 0.01),见图 3。



注:1:BSA 对照组;2:5 μg/L TGF-β1 组;3:10 μg/L TGF-β1 组;与 BSA 对照组比较,<sup>a</sup>P < 0.01

图 3 TGF-β1 对 miR-192 表达的影响(qPCR)

### 讨 论

microRNA (miRNA) 是一种不编码蛋白质的(21~25)nt 大小的单链小分子 RNA。成熟 miRNA 发挥序列特异性转录后调控作用,与靶基因完全互补结合时,直接靶向切割 mRNA;当与靶基因不完全互补结合时,起调节基因表达的作用,阻遏基因的翻译。miRNA 参与生命过程中一系列的重要进程,包括发育、造血、器官形成、细胞凋亡、细胞增殖和肿瘤发生、发展<sup>[1]</sup>。miRNA 在血液中非常稳定,其血液测试值能较好地反映患者体内含

量。Chen 等<sup>[7]</sup>对肺癌、结肠癌和糖尿病患者的血清 miRNA 水平进行了分析, 确定这些疾病都有其特异性的血清 miRNA 表型, 可以作为诊断的血清标志物。

miR-192 在肾组织中高度富集, 其表达水平在 DN 患者肾活检标本中显著下降, 并通过调节 ZEB1 和 ZEB2 拮抗 TGF- $\beta$  信号通路发挥作用<sup>[3]</sup>。在 DN 小鼠模型中 miR-192 也能够影响 TGF- $\beta$  信号从而参与疾病进程<sup>[8]</sup>。Sun 等<sup>[9]</sup>报道低剂量紫杉醇通过调节 miR-192 基因启动子序列, 抑制 miR-192 介导的 TGF- $\beta$ -Smad 通路的激活, 从而抑制慢性肾脏病的肾脏纤维化。本研究中, 我们发现 DN 组 miR-192 表达水平显著低于健康对照和 DM 组, 但 3 组间 miR-210 表达量差异无统计学意义。生物信息分析法预测靶基因分析发现, TGF- $\beta$  信号通路多个因子(ZEB1、IGF1 和 Col I) 为其潜在调节靶基因, 并在体外实验证实。Zhang 等<sup>[10]</sup>报道, 在应激状态下 miRNA 可分泌至血液中, 通过血液到达效应细胞发挥作用。高糖刺激可以下调 miR-192 水平, 但不清楚是否与 TGF- $\beta$  通路有关。本研究中, 5  $\mu$ g/L 和 10  $\mu$ g/L 的 TGF- $\beta$  均可显著降低细胞内及培养上清的 miR-192 水平, 说明 miR-192 的表达和分泌受 TGF- $\beta$  调节, 此外, miR-192 在 IgA 肾病与健康人尿液中的含量没有明显变化<sup>[11]</sup>, 提示其具有潜在的 DN 血清标志物特异性。检测血液 DN 特异性 miRNA 并将其作为 DN 的生物学标志, 对于早期诊断和治疗 DN 可能有重要的意义。

## 参 考 文 献

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116: 281-297.
- [2] Saal S, Harvey SJ. MicroRNAs and the kidney: coming of age. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009, 18: 317-323.
- [3] Krupa A, Jenkins R, Luo DD, et al. Loss of MicroRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21: 438-447.
- [4] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 5003-5008.
- [5] Varkonyi-Gasic E, Hellens RP. Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. *Methods Mol Biol*, 2011, 744: 145-157.
- [6] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 2009, 19: 92-105.
- [7] Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 2008, 18: 997-1006.
- [8] 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 3432-3437.
- [9] Sun L, Zhang DS, Liu FY, et al. Low-dose paclitaxel ameliorates fibrosis in the remnant kidney model by down-regulating miR-192. *J Pathol*, 2011, 225: 364-377.
- [10] Zhang Y, Liu D, Chen X, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell*, 2010, 39: 133-144.
- [11] Wang G, Kwan BC, Lai FM, et al. Expression of microRNAs in the urinary sediment of patients with IgA nephropathy. *Dis Markers*, 2010, 28: 79-86.

(收稿日期: 2011-08-04)

(本文编辑: 李耀荣)

· 读者·作者·编者 ·

## 科技论文应注意使用法定计量单位

计量单位实行国务院 1984 年 2 月颁布的《中华人民共和国法定计量单位》, 并以单位符号表示, 具体使用参照中华医学会编辑出版部编辑的《法定计量单位在医学上的应用》一书。血压计量单位使用毫米汞柱(mm Hg), 但在文中首次使用时应注明 mm Hg 与 kPa 的换算系数(1 mm Hg= 0.133 kPa)。人体的血药浓度测定, 同人体其他检测值一样, 分母用 L, 不用 ml 或 dl。单位符号可以与非物理量的单位(如: 人、台、次等)的汉字构成组合形式的单位, 如: 次/min。单位符号中表示相除的斜线不能多于 1 条, 如 ng/kg/min, 应采用 ng·kg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> 的形式。参量及其公差均需附单位。当参量与其公差的单位相同时, 单位可以只写一次, 即加圆括号将数值组合, 置共同的单位符号于全部数值之后。例如: “75 ng/L $\pm$ 18 ng/L” 可以写作“(75 $\pm$ 18) ng/L”。正文中时间的表达, 凡前面带有具体数据者应采用 d、h、min、s, 而不用天、小时、分钟、秒。

本刊编辑部