文章编号:1000-5404(2010)13-1383-04

论著

早期糖尿病肾病相关微小 RNA 在小鼠肾脏的表达变化

张 政[1,2],罗勇军[3],彭惠民[4],何晓燕[1] (400016 重庆,重庆医科大学:细胞生物学及遗传学教研室[1],分子医学与肿瘤研究中心[2],实验教学中心[4];400038 重庆,第三军医大学高原军事医学系病理生理学教研室[3])

[摘要] **目的** 建立 db/db 小鼠早期糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)微小 RNA(microRNA,miRNA)的差异表达谱。**方法** 采用 12 只 9 周龄高血糖且 24 h 尿白蛋白显著增高的 db/db 小鼠作为早期糖尿病肾病组,12 只 9 周龄 db/m 小鼠作为正常对照组,用于 miRNA 芯片和实时荧光定量 RT-PCR 检测。Trizol 法抽提肾脏总 RNA,YM-100 微离心滤器富集小 RNA,芯片技术检测 DN 组和对照组 miRNAs 的差异表达谱。应用实时荧光定量 RT-PCR 验证部分差异 miRNAs,运用生物信息学技术预测部分相关 miRNAs 的靶基因。**结果** 芯片结果显示,66 个 miRNA 在 DN 组和对照组存在差异表达($P<0.01$),其中 35 个 miRNAs 在 DN 组呈高表达,31 个 miRNAs 在 DN 组呈低表达,差异倍数从 1.08 ~ 10.20。实时荧光定量 RT-PCR 进一步验证部分 miRNA 的表达,结果显示 3 个 miRNAs 在 DN 组表达上调,分别为:miR-196a、miR-98 和 miR-29c;4 个表达在 DN 组下调,分别为 miR-21、miR-451、miR-709 和 miR-187,差异显著($P<0.01$)。**结论** 部分 miRNAs 在 DN 和正常对照肾脏组织中存在差异表达,可能参与了 DN 发生的分子机制。

[关键词] 糖尿病肾病;microRNA;microRNA 芯片;差异表达

[中图法分类号] R394.2 **[文献标志码]** A

Expression of early diabetic nephropathy-related microRNA in kidneys of diabetic mice

Zhang Zheng[1,2], Luo Yongjun[3], Peng Huimin[4], He Xiaoyan[1] ([1]Department of Cell Biology and Genetics, College of Basic Medical Sciences, [2]Center of Molecular Medicine and Cancer Research, [4]Experimental Teaching Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Department of Pathophysiology and High Altitude Physiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To establish the differential expression profile of early diabetic nephropathy (DN)-related microRNA (miRNA) in kidneys of db/db mice. **Methods** Twelve 9-week-old male db/db mice with hyperglycemia and significantly elevated urinary albumin excretion were used as an early DN group, and another twelve 9-week-old male db/m mice were used as a control group. Total mRNA was extracted from kidney tissues of mice and miRNA was concentrated with the YM-100 micro-centrifugation filter. Differential expression profile of miRNA in DN and control groups was detected by miRNA assay and RT-PCR, respectively. Target gene of related miRNA was detected with bioinformatics technology. **Results** miRNA assay showed that 66 miRNAs were differentially expressed in DN and control groups ($P<0.01$). Of the 66 miRNAs, 35 and 31 were highly and lowly expressed, respectively, in DN group, with a difference of 1.08 to 10.20 folds. RT-PCR showed that the expression of 3 miRNAs was up-regulated (miR-196a, miR-98 and miR-29c) and the expression of 4 miRNAs was down-regulated (miR-21, miR-451, miR-709 and miR-187) in DN group($P<0.01$). **Conclusion** Some miRNAs are differentially expressed in the kidney tissues of DN and normal mice, suggesting that miRNAs may be involved in the molecular mechanism of DN.

[Key words] diabetic nephropathy;microRNA;microRNA microarray;differential expression

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30800534) and the Key Program of Chongqing Medical University(XBZD201001),Corresponding authors:Peng Huimin,Tel:86-23-68485806;E-mail:penghuimin6@sohu.com

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(30800534);重庆医科大学重点科研课题(XBZD201001)

[通信作者] 彭惠民,电话:(023)68485806,E-mail:penghuimin6@sohu.com

糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)是糖尿病并发症中最为严重的并发症之一,它已成为导致终末期肾衰竭的重要原因,也是导致糖尿病患者死亡的主要原

因,严重威胁人们的健康[1]。微小RNA(microRNA,miRNA)是一类约21~23个核苷酸的非编码RNA分子,通过与靶基因mRNA的特定位点结合,抑制该蛋白的合成或诱导该mRNA的降解,从而参与基因的表达调控。目前已成为基因表达调控研究的热点领域,与肿瘤、内分泌疾病等多种疾病关系密切,且部分miRNA参与糖尿病及其并发症的发生、发展[2,3]。因此本研究拟探讨糖尿病肾病模型小鼠早期DN期miRNAs表达的变化,为进一步了解miRNA在糖尿病肾病中的调控机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/KSJ-db/db小鼠(中国科学院上海实验动物中心)8周龄,体质量35~37 kg,雄性,12只;C57BL/KSJ-db/m小鼠(中国科学院上海实验动物中心)8周龄,体质量18~20 kg,雄性,12只。适应性喂养1周后检测体质量、全血血糖和24 h尿白蛋白排泄量(24 h urine albumin excretion,UAE),证实发生早期DN后,宰杀小鼠,迅速剥离双侧肾脏,两组小鼠各取一半分别用于miRNA芯片及real-time RT-PCR检测。纳入标准为:早期DN组:随机血糖≥11.1 mmol/L(WHO,1999)及UAE显著高于对照组。糖尿病诊断标准参考《内科学》五年制教材第6版,早期DN标准参考文献[4]方法,即高血糖伴UAE显著高于对照组($P<0.01$)。

1.1.2 主要试剂 细胞总RNA提取试剂Trizol(Invitrogen公司),芯片(LC Science实验室),尿蛋白检测试剂盒(放免法)(南京建成生物有限公司),*Taq*Man® MicroRNA Assays(美国Applied Biosystems公司),血糖仪及血糖试纸(德国拜耳公司)。

1.2 方法

1.2.1 生化检测 称体质量,收集血、尿标本。血标本在早上采取,隔夜不禁食,经小鼠尾静脉获取后立即检测血糖。尿标本采用小鼠代谢笼收集,小鼠在代谢笼中自由饮食饮水,收集24 h尿量检测尿白蛋白。

1.2.2 总RNA提取 采用液氮研磨法将组织磨成粉末,加入Trizol混合,按试剂说明提取RNA。

1.2.3 芯片检测 YM-100微离心滤器将db/m对照小鼠组和db/db DN小鼠各6只肾脏组织总RNA样本进行大小分别,取2~5 μg小RNA(<300 nt)用poly A聚合酶扩展3′末端形成poly A尾。然后把一个寡核苷酸标记连接到ployA尾上用于荧光染色。通过微循环泵在Paraflomicrofludic芯片上进行杂交,过夜。在microfludic芯片上,每个检测探针由一个化学修饰核苷酸编码的片段互补地结合到靶miRNA或其它RNA,聚乙二醇的分隔片段促使编码片段从底物中分离出来。检测探针是原位PCR化学合成。杂交解链温度的平衡由探针的化学修饰调节完成。杂交反应在34 ℃下用100 L 6xSSPE buffer(包含25%甲醛胺)平衡。此后,用tag-specific Cy3和Cy5染料进行荧光标记,用激光扫描器收集杂交的图像。扣除背景,用LOWESS滤器规范信号后,据专业软件分析数据。对于2个颜色的实验值,按2组检测信号的比率及P值和t检验值计算。重复1次芯片实验。(此部分在美国休斯顿LC Science实验室完成)

1.2.4 Real-time RT-PCR 采用db/m对照小鼠组和db/db DN小鼠各6只,根据miRNA芯片分析结果,选择两组差异倍数≥1.55且表达量信号值在两组均大于1000的miRNAs进一步行定量RT-PCR验证。利用*Taq*Man® MicroRNA Assays定量RT-PCR试剂盒,采用Applied Biosystems公司已申请专利的商业化miRNAs特异性引物,以snoRNA202作为内参,对miRNAs进行检测。反应参照试剂盒说明书进行。逆转录反应:取总RNA 2 ng作为起始模板,反应体系为10 μl,每个检验指标做3个复孔。反应条件为:95 ℃ 2 min变性,40个循环95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s。最终数据用$2^{-\Delta\Delta Ct}$公式分析得到差异倍数[5]。

1.2.5 生物信息学分析 应用互联网miRNA靶基因预测软件Pictar(http://pictar.bio.nyu.edu/)、Targetscan(http://www.targetscan.org/)、MiRanda(http://www.microrna.org/)在线服务站点搜索差异表达miRNAs的预测靶基因,取至少2个软件预测到的基因作为靶基因。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.0统计软件进行t检验。采用Microsoft Excel作图。

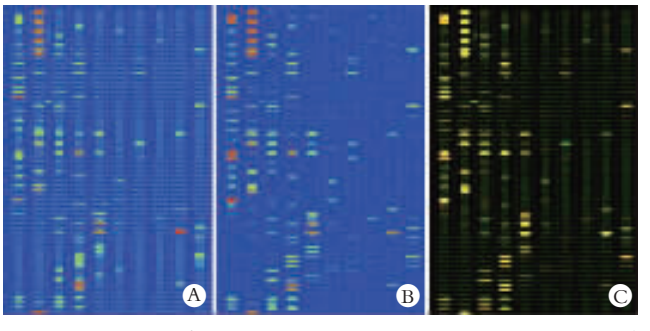
2 结果

2.1 小鼠一般情况

db/db小鼠体质量(38.2±1.9)g较db/m小鼠(18.7±1.5)g明显增高($P<0.01$),db/db小鼠血糖[(29.6±5.2)mmol/L]显著高于对照db/m小鼠[(8.2±0.9)mmol/L]($P<0.01$),db/db小鼠UAE[(107.0±29.8)μg/24 h]显著高于db/m小鼠[(14.2±3.1)μg/24 h]($P<0.01$)。

2.2 miRNA芯片检测结果

来自db/m对照小鼠和db/db DN小鼠肾脏组织总RNA经小RNA分离后,分别用Cy3和Cy5标记,然后同miRNA芯片杂交。每张芯片由多个重复区域组成。每个区域的miRNA探针序列信息来自于Sanger miRBase Release 10.0版本数据库(http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/)。使用Genepix 4000B对杂交后的芯片进行图像扫描,结果如图1所示。结果发现66个miRNAs在DN组表达异常,差异显著($P<0.01$),其中35个miRNAs在DN组呈高表达,31个miRNAs在DN组呈低表达,差异倍数1.08~10.20。其中7个miRNAs在两组差异倍数≥1.55信号值均大于1 000,结果如表1所示。差异倍数大提示与DN相关,信号值在两组均高,提示结果可靠性高。



A: Cy3标记的db/m对照组; B: Cy5标记的db/db DN组; C: Cy3/Cy5比值

图1 两组小鼠肾脏组织miRNA芯片检测结果

表 1 两组小鼠肾脏组织差异表达且信号值高的 miRNAs 芯片结果

名称	对照组信号值	DN 组信号值	lg2 (DN 组/ 对照组)	差异倍数 (DN 组/对照组)
mmu-miR-451	4 369.77	1 334.76[a]	-1.66	-3.16
mmu-miR-21	3 650.71	1 593.15[a]	-1.20	-2.30
mmu-miR-196a	3 043.24	6 795.79[a]	1.13	2.19
mmu-miR-709	44 780.94	24 649.30[a]	-0.88	-1.84
mmu-miR-98	11 553.28	19 373.26[a]	0.68	1.60
mmu-miR-29c	3 276.08	5 241.66[a]	0.64	1.56
mmu-miR-187	1 701.83	1 119.58[a]	-0.63	-1.55

a:$P<0.01$,与对照组信号值比较

2.3 Real-time RT-PCR 结果

Real-time RT-PCR 结果显示,7 个在芯片结果中差异倍数大且信号值高的 miRNAs 在 DN 组较对照组呈显著变化($P<0.01$)。这 7 个 miRNAs 分别为:miR-196a[(2.33 ±0.05)倍增高],miR-98[(1.79 ±0.06)倍增高]和 miR-29c[(1.66 ±0.04)倍增高]在 DN 组高表达,miR-451[(3.71 ±0.07)倍减少],miR-21[(2.65 ±0.05)倍减少],miR-187[(1.68 ±0.03)倍减少]和 miR-709[(1.42 ±0.06)倍减少]在 DN 组低表达。结合芯片结果,此 7 个 miRNAs 在 DN 中的表达在定量 PCR 结果和芯片结果是趋势一致,表明是可靠的。

选择早期 DN 表达上调倍数最大的的 miR-196a 和下调倍数最大的 miR-451 进行靶基因预测,通过靶点预测软件 Pictar、Targetscan 和 MiRanda 预测它们可能与 DN 相关的靶基因。为了减少假阳性,取至少 2 个软件预测到的基因作为靶基因,其中 miR-196a 共筛选出 144 个基因,其中包括胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor 2, IGF)、丝裂原蛋白激酶的激酶的激酶 1(MAP Kinase Kinase Kinase 1, Map3k1)、可溶性载质转运蛋白(solute carrier family, SLC)、生长抑制家族(inhibitor of growth family, ING)、上皮生长因子底物(epidermal growth factor receptor pathway substrate epidermal growth factor receptor pathway substrate, Eps)、溶胶原蛋白(procollagen, COL)、转移生长因子(transforming growth factor, TGF)、β-肾上腺素能受体(adrenergic receptor, Adrb3)、转录调控因子(transcriptional regulating factor, Trerf1)等 DN 相关基因;miR-451 共筛选出 5 个基因,其中包括钙离子结合蛋白(calcium binding protein 39, Cab39)、真核翻译延长因子(eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, Eef1a1)、F-box 蛋白家族(F-box protein 33, Fbxo33)等 DN 相关基因。

3 讨论

db/db 小鼠是 Leptin 受体基因缺陷导致的先天肥胖性 2 型糖尿病小鼠,具有高血糖、高血脂、胰岛素抵抗等特性。其发病过程与人 2 型糖尿病肾病非常相似,出现肾脏、肾小球肥大,尤其是肾小球系膜间质扩张,它是研究最深入的 2 型糖尿病基因模型,肾功能、肾结构的研究都很深入,也用于干预实验,研究参与 DN 发生的重要通路,是国际上广为采用的研究 DN 的动物模型[4,6-8]。

miRNA 是一类非编码的小 RNA 分子,有 5′端磷酸基和 3′端羟基,定位于 RNA 前体的 3′端或 5′端。自第 1 个 miRNA(1in-4 和 let-7)分子在线虫中被发现以来[9],迄今为止已在包括人类、果蝇、植物等多种生物物种中鉴别出超过万种 miRNA 分子。目前越来越多的研究表明,miRNA 通过与靶基因的相互作用,调控着人类至少 1/3 基因的表达,在生理和病理过程中均具有重要作用[10]。

生物芯片(biochip)技术是 20 世纪 90 年代初发展起来的新技术,具有高通量、高集成、微型化、连续化和自动化的特点,此技术现今已经成熟运用到 mRNA 水平基因表达检测上,是检测细胞或组织 miRNA 表达谱的理想方法[11]。本研究通过采用 miRNA 芯片筛查早期 DN db/db 小鼠和正常对照 db/m 小鼠肾脏组织 miRNA 差异表达谱,Real-time RT-PCR 验证部分差异表达 miRNA,初步筛查出了一些 DN 相关的 miRNAs。

本实验通过 miRNA 芯片检测 DN 组和对照组 miRNA 差异表达谱,在含 568 个探针 miRNA 芯片检测中发现有 480 个 miRNAs 在 DN 组中表达,214 个 miRNAs 在对照组表达。DN 组和对照组肾脏组织表达的 miRNA 有 66 个 miRNAs 差异有显著性($P<0.01$),其中 35 个 miRNAs 在 DN 组呈高表达,31 个 miRNAs 在 DN 组呈低表达,差异倍数从 1.08 至 10.20。其中 miR-196a,miR-98 和 miR-29c 在 DN 组高表达,miR-21, miR-451,miR-709 和 miR-187 在 DN 组低表达。实时荧光定量 RT-PCR 验证了这 7 个 miRNAs 在 DN 组和对照组肾脏组织的表达。由此提示,部分 miRNAs 在 DN 和正常对照肾脏组织中存在差异表达,可能参与了 DN 发生的分子机制。在这 7 个 miRNAs 中,miR-29c 的发现与其他学者有一致性,He 等[12]报道包括 miR-29a,miR-29b 和 miR-29c 的 miR-29 家族在 2 型糖尿病中发挥一定的作用。miR-196a、miR-98、miR-21、miR-451、miR-709 和 miR-187 与 DN 的关系目前少见其他课题组的报道。本课题组同时发现 miR-21 对调控 DN 肾小球系膜增殖起着一定的保护性作用[13]。结合其他学者研究发现,miRNAs 确实参与了糖尿病及其并发症的发生、发展。有报道 hsa-miR-657 通过靶向人 IGF2R 基因对 2 型糖尿病的发展产生影响[14];过度表达 miR-375 可以抑制小鼠胰腺 β 细胞的胰岛素分泌,导致糖尿病的发生[2];miR-133 通过抑制 ERG 基因钾离子通道,促进糖尿病心脏病变的发生[3]。尤其在在 miRNAs 与 DN 关系的研究中,Kato

等[15]发现 miR-192 在 DN 中显著增高；Wang 等[16]通过对高低糖培养的人肾小球系膜细胞进行芯片检测，发现高表达 miR-377 可引起糖尿病肾病纤维黏连蛋白的增加，从而对糖尿病肾病产生作用，提示 miRNAs 可能是参与调控 DN 的重要分子。本实验的研究结果进一步为 miRNAs 在早期 DN 发生中的分子机制提供了新的数据。但同样在 DN 中，我们发现的早期 DN 相关 miRNAs 却与其他学者在 DN 中的发现有差异，提示可能与 miRNAs 的种族特异性、组织特异性、发育阶段特异性有关，特别在疾病不同的发展阶段进行相关 miRNAs 研究十分必要。

miRNAs 通过对靶基因的表达调控而发挥作用，因此我们对在早期 DN 中显著上调的 miR-196a 和显著下调的 miR-451 进行靶点预测，以期进一步认识其与早期 DN 的关系。结果表明，miR-196a 有 144 个靶基因；miR-451 有 5 个靶基因，这些 miRNAs 作用靶点广泛，涉及细胞活化、分化、增殖、凋亡相关基因，信号转导基因、细胞周期调控相关基因等，而其中胰岛素样生长因子(IGF)、Map3k1、Sorcs1、可溶性载质转运蛋白(SLC)、生长抑制家族(ING)、上皮生长因子底物(Eps)、溶胶原蛋白(COL)、转移生长因子(TGF)、β-肾上腺素能受体(Adrb3)、转录调控因子(Trerf1)、钙离子结合蛋白(Cab39)、真核翻译延长因子(Eef1a1)、F-box 蛋白家族(Fbxo33)等均是与糖尿病及糖尿病肾病关系密切的分子。由此提示，miRNAs 靶基因预测为深入研究 miRNAs 在 DN 发生中的作用机制提供重要线索。

综上，本实验对早期 2 型糖尿病肾病小鼠相关 microRNA 初步筛查发现，在早期 DN 中 miR-196a，miR-98 和 miR-29c 表达上调；miR-21，miR-451，miR-709 和 miR-187 表达下调，提示这些 miRNAs 可能参与早期 2 型糖尿病肾病的发生。靶基因预测显示，miR-196a 和 miR-451 的靶点作用广泛，涉及细胞活化、分化、增值、凋亡，信号转导、细胞周期调控等，为进一步研究其在早期 DN 中的作用奠定了基础，但 miRNAs 在早期 2 型糖尿病肾病的具体分子机制还需要更多深入的研究。

参考文献：

[1] Collins A J, Foley R N, Herzog C, *et al*. United States Renal Data System 2008 Annual Data Report Abstract[J]. Am J Kidney Dis, 2009, 53(1 Suppl): Ⅵ-Ⅶ, S8 - S374.

[2] Poy M N, Eliasson L, Krutzfeldt J, *et al*. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion[J]. Nature, 2004, 432(7014): 226 - 230.

[3] Xiao J, Luo X, Lin H, *et al*. MicroRNA miR-133 represses HERG K^+ channel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts[J]. J Biol Chem, 2007, 282(17): 12363 - 12367.

[4] 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.

[5] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402 - 408.

[6] Lim A K, Ma F Y, Nikolic-Paterson D J, *et al*. Antibody blockade of c-fms suppresses the progression of inflammation and injury in early diabetic nephropathy in obese db/db mice[J]. Diabetologia, 2009, 52(8): 1669 - 1679.

[7] Sayyed S G, Hagele H, Kulkarni O P, *et al*. Podocytes produce homeostatic chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12, which contributes to glomerulosclerosis, podocyte loss and albuminuria in a mouse model of type 2 diabetes[J]. Diabetologia, 2009, 52(11): 2445 - 2454.

[8] Mima A, Arai H, Matsubara T, *et al*. Urinary Smad1 is a novel marker to predict later onset of mesangial matrix expansion in diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 2008, 57(6): 1712 - 1722.

[9] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843 - 854.

[10] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120(1): 15 - 20.

[11] Willenbrock H, Salomon J, Sokilde R, *et al*. Quantitative miRNA expression analysis: comparing microarrays with next-generation sequencing[J]. RNA, 2009, 15(11): 2028 - 2034.

[12] He A, Zhu L, Gupta N, *et al*. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes[J]. Mol Endocrinol, 2007, 21(11): 2785 - 2794.

[13] 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.

[14] Lv K, Guo Y, Zhang Y, *et al*. Allele-specific targeting of hsa-miR-657 to human IGF2R creates a potential mechanism underlying the association of ACAA -insertion/deletion polymorphism with type 2 diabetes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(1): 101 - 105.

[15] 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 U S A, 2007, 104(9): 3432 - 3437.

[16] Wang Q, Wang Y, Minto A W, *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.

（收稿：2009-11-20；修回：2010-01-05）

（编辑 栾 嘉）