DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.002

高糖诱导腹膜间皮细胞发生上皮间质转化中 microRNA 的异常变化

郝 静 包瑾芳 刘 军 袁伟杰 于 青△

(上海交通大学医学院附属第一人民医院肾内科 上海 200080)

摘要 目的:定腹膜间皮细胞在高糖引起上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程中 microRNA 的表达差异。**方法:**常规培养 PMC 细胞，利用高糖培养液刺激诱导腹膜间皮细胞发生 EMT，倒置显微镜观察各组细胞形态学变化，实时定量 PCR 检测 EMT 标志基因变化,以此确定高糖诱导 EMT 的发生。利用特异茎环结构的引物合成 microRNA 的 cDNA,实时定量 PCR 检测重要 microRNA 的表达变化。**结果:**高糖培养液培养腹膜间皮细胞 48hr 后,细胞形态呈梭形改变,同时 EMT 标记基因 E-cadherin 表达明显减低(P<0.01),Vimentin 表达显著升高(P<0.01),说明高糖诱导腹膜间皮细胞发生了 EMT。利用 microRNA 特异的茎环结构引物,实时定量 PCR 检测结果发现高糖刺激后 miR-193a 的表达明显上调(P<0.01);miR-15a 和 let-7e 的表达明显降低(P<0.01);miR-16 和 miR-21 的表达无明显变化(P>0.05),同时检测发现高糖刺激后 miR-193a 的表达水平随刺激时间表达升高。**结论:**异常变化的 microRNA 可能对高糖诱导的腹膜间皮细胞 EMT 具有重要调控作用。

关键词:miR-193a; 上皮间质转化; 腹膜纤维化; 异常表达

中图分类号:R459.5,R692.5,R572.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)04-608-03

The Abnormal Expression Level of MicroRNA in Rpithelial-Mesenchymal Transition of Eritoneal Mesothelial Cells Induced by High Glucose

HAO Jing, BAO Jin-fang, LIU Jun, YUAN Wei-jie, YU Qing△

(Department of Nephrology, Shanghai First People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To determine the expression level of microRNA in the process of epithelial-mesenchymal transition (EMT) of peritoneal mesothelial cells induced by high glucose. **Methods:** The peritoneal mesothelial cells were cultured routinely by M199 medium with 10% fetal bovine serum, and the EMT was induced by D-glucose stimulation. The occurrence of EMT was determined by the change of cell morphology and EMT marker genes expression levels. Cell morphology change was observed by inverted microscope, and expression levels of EMT marker genes were determined by real-time PCR. The expression levels of microRNA were detected by real-time PCR with microRNA-specific stem-loop structure primer. **Result:** The peritoneal mesothelial cells were changed to fusiform cell morphology following high-glucose medium stimulated 48 hr, and the EMT marker genes were changed significantly, such as the decreased of E-cadherin and increased of Vimentin (P<0.01 respectively). These result proved the EMT had been induced by high-glucose. Applied real-time PCR with microRNA -specific stem-loop structure primer, miR-193a was detected increased notably (P<0.01), and miR-15a and let-7e was increased (P<0.01), while miR-16 and miR-21 had no significant change (P>0.05). Importantly the iincrease of miR-193a was positive correlation with stimulus duration. **Conclusion:** It is indicated that the abnormal expression of MicroRNA in rpithelial-Mesenchymal could influence the transition of eritoneal mesothelial cells which was induced by high glucose

Key words: MicroRNA; Epithelial-mesenchymal transition; Peritoneal fibrosis; Abnormal expression

Chinese Library Classification(CLC): R459.5, R692.5, R572.2 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)04-608-03

随着腹膜透析技术的不断改进,在一些长期透析患者中已观察到进行性腹膜纤维化、膜的高渗透性以及超滤衰竭[1,2],目前机制尚未完全明确,但可能与腹膜长期暴露于高糖、高渗、酸性腹透液、葡萄糖降解产物以及糖化终末产物等相关[3,4]。上皮细胞间充质转化 (Epithelial-Mesenchymal Transition,EMT)是指具有极性的上皮细胞转换成具有活动能力、能够在细胞基质间自由移动的间充质细胞过程。EMT 能促进组织修复,同时也与慢性炎症、癌症转移、发展,器官纤维化等多种病理状态中密切相关[5,6]。腹膜间皮细胞 EMT 被认为是腹膜纤维化的起始和可逆的关键环节[1]。

microRNA 是一类在进化上高度保守的单链非编码小 RNA,长 18-25 个核苷酸,主要通过碱基互补配对原则结合于靶基因的 3' 非翻译区从而抑制靶基因的表达[7,8]。目前,大量的 microRNA 在植物,线虫,果蝇以及哺乳动物组织和细胞中被克隆或通过生物信息学手段预测出来[9]。据推测,每个 microRNA 都可以调控上百个基因的表达,人类基因组上约有三分之一的

作者简介:郝静(1977-),女,主治医师,在读硕士研究生,研究方向:慢性肾病的临床与基础研究,E-mail: wei_rain9@sina.com

△通讯作者:于青, E-mail: yuqingsl@yahoo.com.cn

(收稿日期:2013-06-13 接受日期:2013-07-10)

基因都受到 microRNA 的调控。microRNA 的功能研究发现，它们参与了包括细胞增殖，分化，凋亡，癌症发生等的各种生理病理过程。本研究将通过高糖诱导腹膜间皮细胞产生 EMT，并利用实时定量 PCR 对肾脏重要的几个 microRNA 进行表达变化的分析。

1 材料与方法

1.1 材料

人腹膜间皮细胞为本科室冻存细胞株。

1.2 主要试剂及仪器

TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司，逆转录酶及 SYBR Green 实时定量 PCR 试剂盒购自 TAKARA 公司。定量 PCR 仪及分光光度计购自 Qiagen 公司。

1.3 高糖诱导腹膜间皮细胞 EMT

常规培养腹膜间皮细胞，待细胞生长至 80 %融合时进行消化，显微镜计数后用 M199 培养液调解细胞浓度，接种于 12 孔培养板 (5×10^5/ 孔)，37℃ 和 5%CO_2 的培养箱内培养 24 hr 后，进行高糖(含 50 mmol/L 葡萄糖的 M199 培养液)诱导不同时间，以含 5.6 mmol/L 葡萄糖的 M199 培养液作为对照[10]。

1.4 总 RNA 提取

采用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA，采用分光光度计确定 RNA 的浓度和纯度。

1.5 引物合成

利用基因数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)查询目的基因的 mRNA 序列，通过软件 primer 3(http://frodo.wi.mit.edu/)，根据所需设置相关引物参数，设计用于 real-time PCR 所需的引物序列；利用 microRNA 的茎环结构特征，设计 microRNA 的逆转录引物和 PCR 引物，由上海英潍捷基公司协助合成。

1.6 实时定量 PCR

运用 one-step SYBR® Green RT PCR 试剂盒在实时定量 PCR 仪上分别检测目的基因和 microRNA 的表达，反应条件为 95 ℃，5 sec，60 ℃，30 sec，共 40 个循环。

1.7 统计学分析

所有实验重复 3 次，数据以均值± 标准差表示，利用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。两组数据之间比较采用 Student's t-test，两组以上数据采用 one-way ANOVA 检验；P<0.05 认为具有统计学差异。

2 结果

2.1 高糖诱导腹膜间皮细胞 EMT

腹膜间皮细胞在含高糖的培养液中培养 48 hr 后，显微镜观察发现对照组细胞贴壁生长，排列紧密，呈椭圆形；高糖刺激后 PMC 细胞变大变长，呈梭型改变，并且排列紊乱。Real-time PCR 反应扩增曲线结果(图 1)显示，与对照组相比，高糖刺激 48 hr 后，E-cadherin 的表达明显降低，是对照组的(35.6± 5.674) % (P<0.01)；Vimentin 的表达明显升高，是对照组的 2.45± 0.245 倍(P<0.01)，提示高糖刺激诱导 PMC 细胞发生 EMT 的基因学改变。

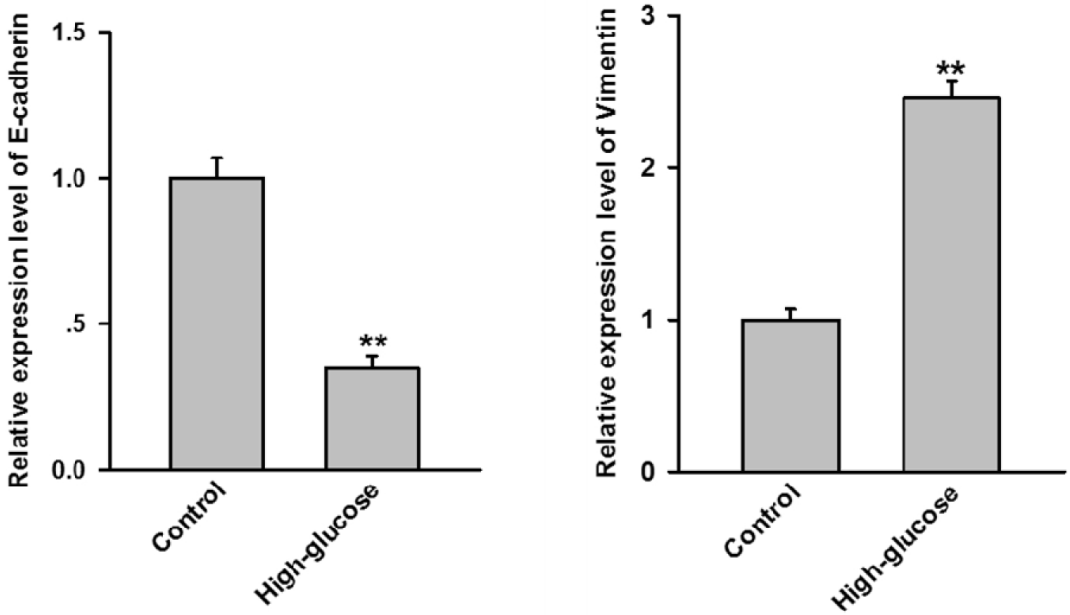

图 1 基因的相对表达变化

Fig.1 The relative expression level of genes

注：** P<0.01 vs 对照组。

Note:** P<0.01 vs control group.

2.2 microRNA 在 EMT 过程的表达差异

肾脏疾病发生发展的调控过程中均有 microRNA 的参与，根据肾脏组织 microRNA 的表达谱，对肾脏发育和疾病相关的某些 microRNA (miR-193a、miR-21、miR-15a、miR-16 和 let-7e) 进行 EMT 过程中表达谱的检测，用内参 U6 归一化，计算相对表达变化。结果(图 2)发现，与对照组相对，miR-193a 的表达明显上调，是对照组的 2.56± 0.32 倍(P<0.01)；miR-15a 和 let-7e 的表达明显降低，分别为对照组的 (67.3± 9.53)%和(66.5± 8.35) % (P<0.01)；miR-16 和 miR-21 的表达无明显变化(P>0.05)。

2.3 miR-193a 在高糖诱导的 EMT 过程中表达下调

利用 real-time PCR 对 miR-193a 随高糖刺激腹膜间皮细胞不同时间(12hr、24hr、36hr 和 48hr)的表达变化进行检测。结果发现,在高糖刺激腹膜间皮细胞 12hr 后,miR-193a 的表达出现明显升高,且与高糖的刺激时间成正相关(图 3),提示 miR-193a 在高糖诱导的 EMT 过程中可能具有重要作用。

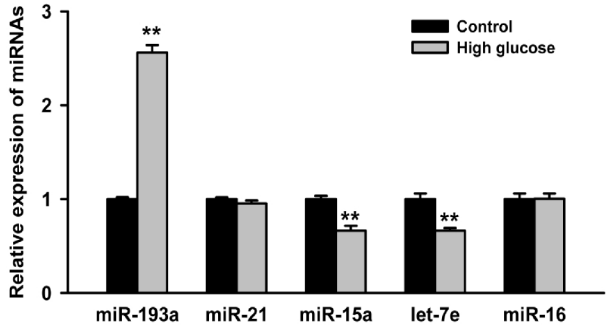

图 2 miRNAs 的相对表达变化

Fig.2 The relative expression level of miRNAs

注:** P<0.01 vs 对照组。

Note:** P<0.01 vs control group.

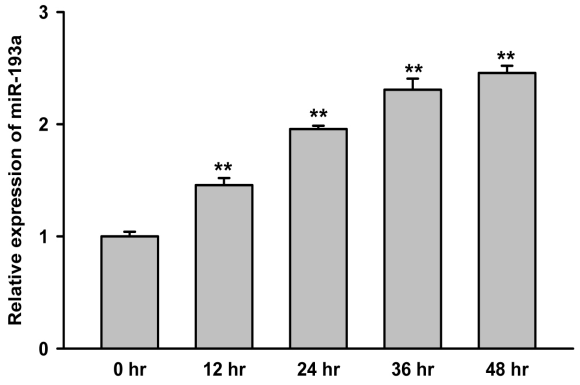

图 3 miR-193a 在高糖刺激后不同时间的表达变化

Fig.3 The expression of miR-193a in different times induced by high-glucose

注:** P<0.01 vs 0 hr 组。

Note:** P<0.01 vs 0 hr group.

3 讨论

本部分内容通过高糖诱导腹膜间皮细胞发生 EMT，通过细胞形态学变化以及 EMT 标记基因表达变化确认 EMT 发生，通过 real-time PCR 的方法对肾脏组织发育和疾病相关的多个 microRNA (miR-193a、miR-21、miR-15a、miR-16 和 let-7e) 进行高糖刺激后表达水平变化的检测，确认 miR-193a 的表达明显上调;miR-15a 和 let-7e 的表达明显降低;miR-16 和 miR-21 的表达无明显变化，同时检测发现高糖刺激后 miR-193a 的表达水平随刺激时间表达升高，提示其功能的重要性。

microRNA 是新近发现的一类细胞内源性非编码 RNA 小分子,由于其在细胞增殖、分化和凋亡、胚胎发育、形态建成以及疾病发生等一系列重要生命过程中表达出极其重要的调控作用,越来越受到重视[11,12]。最近的研究发现了一系列与 EMT 发生相关的 microRNA[13,14],提示 microRNA 在腹膜纤维化中可能具有重要调控作用。Gregory 等报道了 MDCK 细胞在 TGF-β 诱导的 EMT 改变时,miR-200 家族成员 (miR-200 a,miR-200 b,miR-200 c,miR-141 and miR-429) 以及 miR-205 是明显下调的[15]。Zavadil 等报道了人皮肤角化细胞在 TGF-β 诱导的 EMT 改变时 microRNA 表达谱，发现了 8 个可能相关 microRNA (miR-21,miR-32,miR-137,miR-346,miR-136,miR-192,miR-210 和 miR-211)[16]。这一系列研究发现提示在腹膜间皮细胞发生 EMT 时,microRNA 可能起着重要调节作用。

miR-193a 是人基因组 17 号染色体上基因间隔区内独立转录的一个 microRNA,以往研究证实 miR-193a 在肿瘤组织中表达异常,可能调控肿瘤的发生发展[17]。在急性骨髓性白血病中研究发现 miR-193a 通过抑制 c-kit 表达可发挥重要的肿瘤抑制子功能[17]。同时最新研究发现在局灶性节段性肾小球硬化症中 miR-193a 具有重要的调控作用[18]。目前 miR-193a 在腹膜纤维化过程中是否具有调节重要目前尚无报道。我们在高糖诱导腹膜间皮细胞 EMT 过程中,发现 miR-193a 的表达随高糖刺激明显升高,初步提示其可能参与腹膜间皮细胞的 EMT 过程,影响腹膜纤维化。

microRNA 对于细胞 EMT 的发生，腹膜纤维化等过程中表达水平的显著变化表明其在肾脏相关疾病中发挥着重要作用,可将 microRNA 作为肾脏疾病治疗的药物靶点来研发新的药物,为患者提供新的治疗方法。作为一个新兴研究领域,microRNA 在疾病发生发展中的调控作用越来越受到重视，深入研究 microRNA 在疾病发生发展中的作用机制对于进一步利用 microRNA 作为新的干预治疗的靶点具有重要意义。

参考文献(References)

[1] Lee HB, Ha H. Mechanisms of epithelial-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells during peritoneal dialysis[J]. J Korean Med Sci, 2007, 22(6): 943-945

[2] Yung S, Chan TM. Pathophysiology of the peritoneal membrane during peritoneal dialysis: the role of hyaluronan[J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011: 180594

[3] Lai KN, Leung JC. Inflammation in peritoneal dialysis [J]. Nephron Clin Pract, 2010, 116(1): c11-18

[4] Mittelmaier S, Niwa T, Pischetsrieder M. Chemical and physiological relevance of glucose degradation products in peritoneal dialysis [J]. J Ren Nutr, 2012, 22(1): 181-185

[5] Flessner MF. The effect of fibrosis on peritoneal transport [J]. Contrib Nephrol, 2006, 150: 174-180

[6] Aroeira LS, Aguilera A, Sanchez-Tomero JA, et al. Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(7): 2004-2013

[7] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431 (7006): 350-355

[8] Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease[J]. Dev Cell, 2006, 11(4): 441-450

(下转第 620 页)

levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O_2 tension[J]. Am J Physiol, 1996, 271(41): 1172-1180

[8] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(12): 5510-5514

[9] Clifford DM, Fisher SA, Brunskill SJ, et al. Stem cell treatment for acute myocardial infarction [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2012, 2: 006536

[10] Wang H, Jin P, Sabatino M, et al. Comparison of endometrial regenerative cells and bone marrow stromal cells[J]. J Transl Med, 2012, 10 : 207

[11] Wang M, Crisostomo PR, Herring C, et al. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006, 291(4): 880-884

[12] Wang M, Tsai BM, Crisostomo PR, et al. Pretreatment with adult progenitor cells improves recovery and decreases native myocardial proinflammatory signaling after ischemia[J]. Shock, 2006, 25(5): 454 -459

[13] Wang Y, Haider HK, Ahmad N, et al. Combining pharmacological mobilization with intramyocardial delivery of bone marrow cells over-expressing VEGF is more effective for cardiac repair [J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 40(5): 736-745

[14] Thomas GV, Tran CH, Mellinghoff IK, et al. ypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer[J]. Nat Med, 2006, 12(1): 122-127

[15] Hirota K, GL Semenza. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2006, 59(1): 15-26

[16] Leung KW. Yung KK, Mak NK, et al. Angiomodulatory and neurological effects of ginsenosides[J]. Curr Med Chem, 2007, 14(12): 1371 -1380

[17] Chang YS, Seo EK, Gyllenhaal C, et al. Panax ginseng: a role in cancer therapy?[J]. Integr Cancer Ther, 2003, 2(1): 13-33

[18] Khan TA, FW Sellke, RJ Laham. Gene therapy progress and prospects: therapeutic angiogenesis for limb and myocardial ischemia [J]. Gene Ther, 2003, 10(4): 285-291

[19] Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics[J]. Cancer Res, 2000, 60(6): 1541-1545

[20] Howdieshell TR, Riegner C, Gupta V, et al. Normoxic wound fluid contains high levels of vascular endothelial growth factor [J]. Ann Surg, 1998, 228(5): 707-715

(上接第 610 页)

[9] Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development[J]. Science, 2003, 301(5631): 336-338

[10] Ha H, Yu MR, Lee HB. High glucose-induced PKC activation mediates TGF-beta 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells[J]. Kidney Int, 2001, 59(2): 463-470

[11] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans[J]. Cell, 1993, 75(5): 855-862

[12] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297

[13] Guttilla IK, Adams BD, White BA. ERalpha, microRNAs, and the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer[J]. Trends Endocrinol Metab, 2012, 2 3(2): 73-82

[14] Wendt MK, Tian M, Schiemann WP. Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF-beta-induced EMT during cancer progression[J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(1): 85-101

[15] 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

[16] Zavadil J, Narasimhan M, Blumenberg M, et al. Transforming growth factor-beta and microRNA: mRNA regulatory networks in epithelial plasticity[J]. Cells Tissues Organs, 2007, 185(1-3): 157-161

[17] Yang Y, Zhou L, Lu L, et al. A novel miR-193a-5p-YY1-APC regulatory axis in human endometrioid endometrial adenocarcinoma[J]. Oncogene, 2013, 32(29): 3432-3442

[18] Gebeshuber CA, Kornauth C, Dong L, et al. Focal segmental glomerulosclerosis is induced by microRNA-193a and its downregulation of WT1[J]. Nat Med, 2013, 19(4): 481-487