

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.17.008

miRNA-9-5p 与 NF- κ B 信号通路在 2 型糖尿病肾病发病中的作用机制*陈洁¹ 罗敏虹^{2Δ} 陈兴强¹ 张萌¹ 符薇薇¹

(1 海南省三亚市人民医院肾内科 海南 三亚 572000; 2 中山大学附属第八医院肾内科 广东 深圳 518000)

摘要 目的:探讨 miRNA-9-5p 与 NF- κ B 信号通路在 2 型糖尿病肾病发病中的作用机制。方法:将 80 只 db/db 小鼠随机分为糖尿病肾病组、糖尿病肾病+罗格列酮组、糖尿病肾病+miRNA-9-5p 组、糖尿病肾病+阴性对照组,每组 20 只,分别给予生理盐水、噻唑烷二酮类抗糖尿病药马来酸罗格列酮、miRNA-9-5p、miRNA-9-5p 阴性对照核酸,10 μ g/d 腹腔注射。另将 20 只健康 db/m 小鼠作为对照组。观察各组空腹血糖(FBG)、餐后血糖(PBG)、肾脏指数、24h 尿量、肾脏组织变化,检测血清 NF- κ B 信号通路关键因子单核细胞趋化因子蛋白-1(MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6),及肾脏组织 NF- κ B mRNA、NF- κ B p65 蛋白水平。结果:糖尿病肾病组 FBG、PBG、24 h 尿量均高于对照组,肾脏指数低于对照组($P<0.05$)。糖尿病肾病+罗格列酮组和糖尿病肾病+miRNA-9-5p 组小鼠 FBG、PBG、24 h 尿量低于糖尿病肾病组,肾脏指数高于糖尿病肾病组($P<0.05$)。糖尿病肾病组小鼠血清 MCP-1、TNF- α 、IL-6 水平,肾脏组织 NF- κ B mRNA、NF- κ B p65 蛋白水平均高于对照组($P<0.05$)。糖尿病肾病+罗格列酮组和糖尿病肾病+miRNA-9-5p 组血清 MCP-1、TNF- α 、IL-6 水平,肾脏组织 NF- κ B mRNA、NF- κ B p65 蛋白水平低于糖尿病肾病组($P<0.05$)。结论:NF- κ B 在糖尿病肾病发病中起到重要作用,miRNA-9-5p 可以阻断 NF- κ B 信号通路,下调 MCP-1、TNF- α 、IL-6 的表达,抑制糖尿病肾病的发生和发展。

关键词:糖尿病肾病;核转录因子- κ B;miRNA-9-5p;细胞因子

中图分类号:R-33;R587.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)17-3239-05

The Role of microRNA9-5p and NF-kappa B Signaling Pathway in the Pathogenesis of Type 2 Diabetic Nephropathy*

CHEN Jie¹, LUO Min-hong^{2Δ}, CHEN Xing-qiang¹, ZHANG Meng¹, FU Wei-wei¹

(1 Department of Nephrology, Sanya People's Hospital of Hainan Province, Sanya, Hainan, 572000, China;

2.Department of Nephrology, Eighth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen, Guangdong, 518000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of miRNA-9-5p and NF- κ B signaling pathway in the pathogenesis of type 2 diabetic nephropathy. **Methods:** 80 cases of db/db mice were randomly divided into diabetic nephropathy group, diabetic nephropathy+rosiglitazone group, diabetic nephropathy+miRNA-9-5p group, diabetic nephropathy+negative control group, 20 cases in each group, which were respectively given physiological saline, thiazolidinediones two antidiabetic drugs rosiglitazone maleate, miRNA-9-5p, miRNA-9-5p negative control nucleic acid with 10 μ g/d intraperitoneal injection. Selected another 20 cases of healthy db/m mice as the control group. Fasting blood glucose (FBG), postprandial blood glucose (PBG), renal index, 24 h urine volume and renal tissue changes were observed in each group, and detected levels of serum NF- κ B signaling pathway critical factor monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and expression of NF- κ B mRNA, NF- κ B p65 in renal tissue. **Results:** FBG, PBG, 24h urine volume of diabetic nephropathy group were higher than that of control group, renal index was lower than that of control group ($P<0.05$). FBG, PBG, 24h urine volume of diabetic nephropathy+rosiglitazone group, diabetic nephropathy+ miRNA-9-5p group were lower than that of diabetic nephropathy group, renal index was higher than that of diabetic nephropathy group ($P<0.05$). The levels of serum MCP-1, TNF- α , IL-6 and expression of NF- κ B mRNA, NF- κ B p65 in renal tissue in the diabetic nephropathy were higher than control group ($P<0.05$). The levels of serum MCP-1, TNF- α , IL-6 and expression of NF- κ B mRNA, NF- κ B p65 in renal tissue of the diabetic nephropathy+rosiglitazone group, the diabetic nephropathy+miRNA-9-5p group were lower than that of in the diabetic nephropathy group ($P<0.05$). **Conclusion:** NF- κ B plays an important role in the pathogenesis of diabetic nephropathy, miRNA-9-5p can block the signal pathway of NF- κ B, down regulate the expression of MCP-1, TNF- α , IL-6, inhibit the occurrence and development of diabetic nephropathy.

Key words: Diabetic nephropathy; NF- κ B; miRNA-9-5p; Cell factor

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R587.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)17-3229-05

* 基金项目:海南省普通医学科研资助项目(14A210072)

作者简介:陈洁(1984-),男,本科,主治医师,研究方向:肾脏疾病,E-mail: 13198909666@139.com

Δ 通讯作者:罗敏虹(1981-),女,硕士,副主任医师,研究方向:肾脏疾病,E-mail: luo198111@126.com

(收稿日期:2019-03-15 接受日期:2019-04-10)

前言

糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)是2型糖尿病最主要的慢性微血管并发症,也是糖尿病患者致残和致死的重要原因之一^[1,2]。由于DN发展具有隐蔽性、持续性和不可逆性,因此早期发现、早期诊断和早期治疗对于DN的防治具有重要的意义^[3,4]。但目前关于DN的发病机制仍未完全明确,给DN的防治带来了很大困难。microRNAs是一类由20~22个碱基组成的小分子非编码RNA^[5,6]。核转录因子- κ B(NF- κ B)是p50和RelA两个亚基组成的二聚体,由其构成的信号系统在细胞应激反应、细胞因子应答和自由基损伤中起到重要作用^[7,8]。目前已有研究发现NF- κ B信号系统在DN发病中起到重要作用,但对其调控机制仍未完全明确^[9,10]。microRNAs可以通过调控其相应的靶mRNA翻译过程起到调控基因表达的作用^[11,12]。其中miRNA-9-5p是microRNAs家族的重要成员。本研究应用生物信息学方法发现miRNA-9-5p可能是NF- κ B的调控microRNA,并分析miRNA-9-5p与NF- κ B信号通路在2型糖尿病肾病中的作用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物

4周龄健康雄性db/m小鼠20只作为对照组,体重15~20g,平均(17.62 $\pm$ 1.85)g,购自海南省实验动物中心,动物合格证号0152802。另选择同周龄糖尿病肾病db/db小鼠80只,体重15~20g,平均(18.21 $\pm$ 1.63)g,购自海南省实验动物中心,动物合格证号0152563,研究经医院伦理委员会同意和批准。

1.2 试剂

实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,DNA Marker和Trizol购自武汉博士德生物工程有限公司。RNA抽提试剂盒miRNeasy Mini购自美国Life Technologies公司,miRNA-9-5p以及miRNA-9-5p阴性对照核酸购自山西森弗生物技术有限公司,TaqMan MicroRNA反转录试剂盒、基因表达预混液购自德国Qiagen公司,NF- κ B多克隆抗体、单核细胞趋化因子蛋白-1(MCP-1)多克隆抗体、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)多克隆抗体、白细胞介素-6(IL-6)多克隆抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司,醋酸纤维膜购自美国Amersham公司。马来酸罗格列酮购自葛兰素史克(天津)有限公司,规格:8mg/片,批号:20140432。

1.3 复制模型、分组及给药

db/m小鼠20只作为对照组,给予普通饮食,db/db小鼠80只随机分为4组,每组20只,给予高脂高热量饲养4周(饲料为基础鼠饲料52%,蔗糖10%,猪油24%,酪蛋白12%,复合多维0.1%,盐0.2%,矿物质0.4%,磷酸氢钙2%)。①糖尿病肾病组:喂养过程中给予生理盐水10 μ g/d腹腔注射,2次/d,于早晚小鼠进食后30min注射;②糖尿病肾病+罗格列酮组:喂养过程中给予马来酸罗格列酮10 μ g/d腹腔注射,2次/d,于早晚小鼠进食后30min注射;③糖尿病肾病+miRNA-9-5p组:喂养过程中给予miRNA-9-5p10 μ g/d腹腔注射,2次/d,于早晚小鼠进食后30min注射;④糖尿病肾病+阴性对照组:喂养过程

中给予miRNA-9-5p阴性对照核酸10 μ g/d腹腔注射,2次/d,于早晚小鼠进食后30min注射。喂养过程均在无特定病原体(SPF)级动物实验室中进行,室内通风良好,室温控制在18~20 $^{\circ}$ C,相对湿度55%,12h交替照明,小鼠自由饮水,进食,于小鼠处死前1天收集记录小鼠24h尿量。

1.4 观测指标

1.4.1 生物信息学软件对microRNA的预测 应用生物信息学在线预测软件miRanda(网址: <http://www.mirbase.org/>)和targetscan(网址: <http://www.targetscan.org/>),找到NF- κ B的基因序列和种子序列,运用预测软件进行分析,miRNA-9-5p可能是NF- κ B的调控microRNA。

1.4.2 血清学指标检测 采用最后喂食时小鼠不禁食状态下测定的随机血糖作为餐后血糖(PBG)。末次给药后禁食12h,所有动物称空腹体重,处死小鼠后经腹主动脉取血后,3500r/min离心10min,分离血清,应用贝克曼库尔特AU5800全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特有限公司生产)测定小鼠空腹血糖(FBG)。应用酶联免疫吸附法测定各组小鼠血清MCP-1、TNF- α 和IL-6水平,以上操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.4.3 肾脏组织学观察 处死小鼠后迅速取小鼠双侧肾脏,称重,计算肾脏指数=肾重量(g)/小鼠重量(g)。肾脏去除包膜,应用生理盐水冲洗,并用滤纸拭干,置入4%甲醛溶液中固定,石蜡包埋,制成连续切片,HE染色,应用日本Olympus生物显微镜观察肾脏组织学形态。

1.4.4 肾脏组织NF- κ B mRNA检测 应用FQ-PCR检测肾脏NF- κ B mRNA表达水平。取小鼠肾脏组织约100mg,加入Trizol 1mL 5 $^{\circ}$ C低温下研磨,应用miRNeasyMini试剂提取肾脏总RNA,再根据TaqMan MicroRNA反转录试剂盒使用说明书进行反转录,反应体系:NF- κ B正向引物为5'-GGGACTAT-GACTTCAATGGG-3',反向引物为5'-CAGGC-TAGGGTCAGGGTAT-3', β -actin正、反向引物各0.5 μ L,NF- κ B正、反向引物各1 μ L,TaqPCR Master Mix 12.5 μ L,去离子水8.5 μ L。扩增产物为300bp,反应条件为94 $^{\circ}$ C 30s、56 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 1min共30循环,72 $^{\circ}$ C 7min 1循环。应用 β -actin作为内参,1.5%琼脂糖凝胶电泳,应用凝胶分析系统分析实验结果,测定目的基因以及内参分光光度值,统计NF- κ B mRNA相对表达量。

1.4.5 肾脏组织NF- κ B蛋白检测 应用Western blot检测肾脏NF- κ B p65蛋白水平。取小鼠肾脏组织约100mg,置于冰上用含0.1%蛋白酶抑制剂的生理盐水冲洗,加入含蛋白酶抑制剂的裂解溶液后在冰上超声匀浆,4 $^{\circ}$ C下离心30min,提取上清液用于检测蛋白浓度,取蛋白30mg煮沸5min,SDS-PAGE电泳,并转至NC膜上,应用5%脱脂奶粉PBST溶液封闭过夜,次日洗膜后加入兔抗鼠NF- κ B p65(1:100)及 β -actin,洗膜后加入生物素二抗标记杂交,37 $^{\circ}$ C下反应1h,洗膜后在暗室下加入发光剂,X射线胶皮曝光,显影、定影。应用杂交信号在图像分析系统中检测各组NF- κ B p65相对表达量。

1.5 统计学方法

数据处理采用SPSS17.0统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用方差分析,两两比较用SNK-q检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血糖、肾脏指数和尿量比较

各组间 FBG、PBG、肾脏指数、24 h 尿量比较差异有统计学意义(均 $P < 0.05$), 糖尿病肾病组小鼠 FBG、PBG、24 h 尿量均

高于对照组, 肾脏指数低于对照组($P < 0.05$)。糖尿病肾病 + 罗格列酮组、糖尿病肾病 + miRNA-9-5p 组小鼠 FBG、PBG、24 h 尿量低于糖尿病肾病组, 肾脏指数高于糖尿病肾病组($P < 0.05$)。糖尿病肾病 + 阴性对照组小鼠 FBG、PBG、24 h 尿量、肾脏指数与糖尿病肾病组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠血糖、肾脏指数和尿量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of blood sugar, kidney index and urine volume of mice in each group($\bar{x} \pm s$)

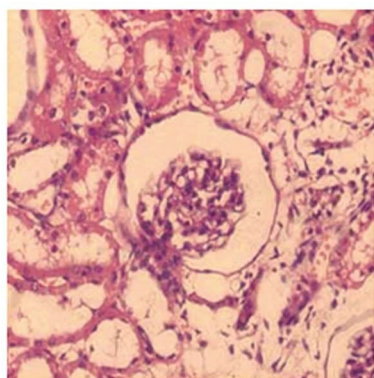
Groups	n	FBG/(mmol/L)	PBG/(mmol/L)	Kidney index	24 h urine volume/[ml/(g·100)]
Control group	20	5.53± 0.48	7.02± 0.83	7.12± 0.47	4.78± 0.95
Diabetic nephropathy group	20	14.86± 2.53 ^a	16.97± 3.37 ^a	4.34± 0.63 ^a	9.15± 2.12 ^a
Diabetic nephropathy+rosiglitazone group	20	8.78± 0.73 ^{ab}	9.83± 2.97 ^{ab}	5.23± 0.6 ^{ab}	5.43± 0.98 ^{ab}
Diabetic nephropathy+miRNA-9-5p group	20	11.23± 2.25 ^{ab}	12.45± 2.74 ^{ab}	5.27± 0.74 ^{ab}	5.67± 1.76 ^{ab}
Diabetic nephropathy+negative control group	20	14.78± 2.46	16.88± 3.45	4.38± 0.73	9.17± 2.32
F value	-	88.313	46.735	58.242	30.752
P value	-	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Comparison with control group, ^a $P < 0.05$; Comparison with diabetic nephropathy group, ^b $P < 0.05$.

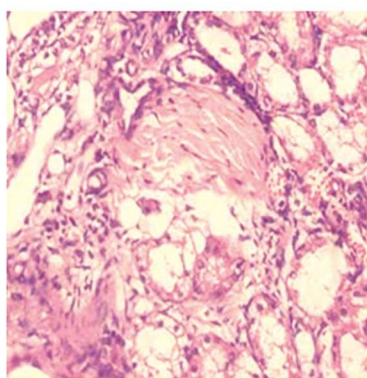
2.2 各组小鼠肾脏组织学变化

光镜下可见对照组肾小球肾小管形态正常; 与对照组相比, 糖尿病肾病组、糖尿病肾病 + 阴性对照组肾小球萎缩、硬化、坏死, 毛细血管塌陷; 糖尿病肾病 + 罗格列酮组较糖尿病肾

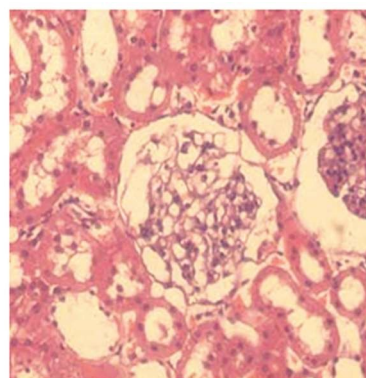
病组病变减轻, 仍可见肾小球萎缩、硬化、坏死; 糖尿病肾病 + miRNA-9-5p 组, 较糖尿病肾病组病变减轻, 与糖尿病肾病 + 罗格列酮组表现相似。见图 1。



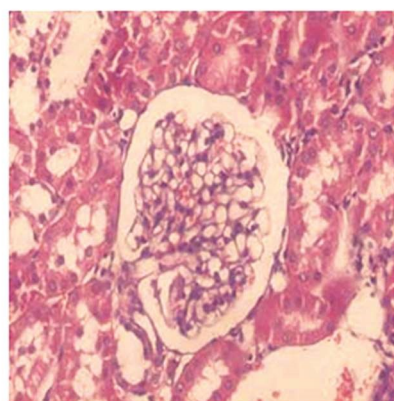
A: Control group



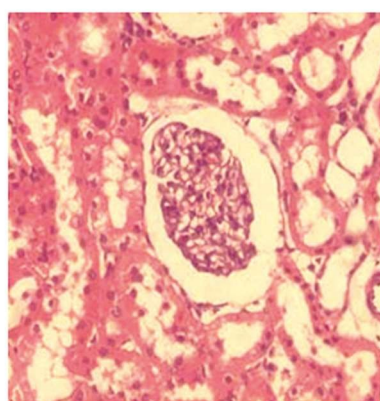
B: Diabetic nephropathy group



C: Diabetic nephropathy+rosiglitazone group



D: Diabetic nephropathy+miRNA-9-5p group



E: Diabetic nephropathy+negative control group

图 1 小鼠肾脏组织染色图片(HE× 300)

Fig.1 Images of kidney tissue staining in mice(HE× 300)

2.3 各组小鼠血清 MCP-1、TNF- α 、IL-6 水平比较

各组间小鼠血清 MCP-1、TNF- α 、IL-6 水平比较差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)，糖尿病肾病组小鼠血清 MCP-1、TNF- α 、IL-6 水平均高于对照组($P < 0.05$)。糖尿病肾病 + 罗格列酮组、

糖尿病肾病 + miRNA-9-5p 组血清 MCP-1、TNF- α 、IL-6 水平低于糖尿病肾病组($P < 0.05$)。糖尿病肾病 + 阴性对照组小鼠血清 MCP-1、TNF- α 、IL-6 水平与糖尿病肾病组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠血清 MCP-1、TNF- α 、IL-6 水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of serum levels of MCP-1, TNF- α and IL-6 in mice of each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	MCP-1($\mu\text{g/L}$)	TNF- α ($\mu\text{g/L}$)	IL-6($\mu\text{g/L}$)
Control group	20	3.48 $\pm$ 0.28	5.89 $\pm$ 0.24	0.81 $\pm$ 0.08
Diabetic nephropathy group	20	15.02 $\pm$ 1.23 ^a	14.21 $\pm$ 1.23 ^a	3.28 $\pm$ 0.21 ^a
Diabetic nephropathy+rosiglitazone group	20	7.32 $\pm$ 0.87 ^{ab}	7.87 $\pm$ 0.93 ^{ab}	1.53 $\pm$ 0.13 ^{ab}
Diabetic nephropathy+miRNA-9-5p group	20	8.93 $\pm$ 1.32 ^{ab}	8.51 $\pm$ 1.22 ^{ab}	1.62 $\pm$ 0.18 ^{ab}
Diabetic nephropathy+negative control group	20	14.98 $\pm$ 1.32	14.21 $\pm$ 1.23	3.31 $\pm$ 0.22
F value	-	430.530	271.107	863.859
P value	-	0.000	0.000	0.000

Note: Comparison with control group, ^a $P < 0.05$; Comparison with diabetic nephropathy group, ^b $P < 0.05$.

2.5 各组小鼠肾脏组织 NF- κ B mRNA 表达情况比较

FQ-PCR 结果表明,对照组、糖尿病肾病组、糖尿病肾病 + 罗格列酮组、糖尿病肾病 + miRNA-9-5p 组、糖尿病肾病 + 阴性对照组小鼠肾脏组织 NF- κ B mRNA 表达水平分别为 (0.61 $\pm$ 0.08)、(0.88 $\pm$ 0.06)、(0.71 $\pm$ 0.07)、(0.78 $\pm$ 0.05)、(0.83 $\pm$ 0.06),五组小鼠肾脏组织 NF- κ B mRNA 表达水平的比较,差异有统计学意义($F = 405.128, P = 0.000$)。糖尿病肾病组、糖尿病肾病 + 罗格列酮组、糖尿病肾病 + miRNA-9-5p 组、糖尿病肾病 + 阴性对照组小鼠肾脏组织 NF- κ B mRNA 表达水平均高于对照组 ($P < 0.05$)；糖尿病肾病 + 罗格列酮组、糖尿病肾病 + miRNA-9-5p 组肾脏组织 NF- κ B mRNA 表达水平低于糖尿病肾病组($P < 0.05$)，见图 2。

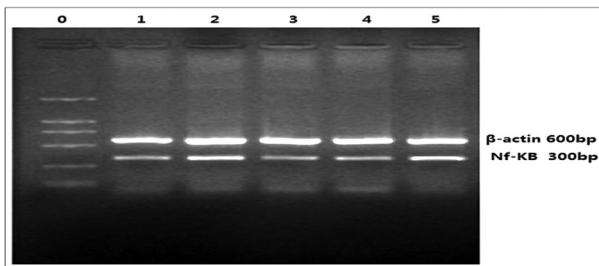


图 2 肾脏组织 NF- κ B 电泳图

Fig.2 Electrophoresis of NF-kappa B in Kidney Tissue

Note: 1.Control group; 2.Diabetic nephropathy group; 3.Diabetic nephropathy+rosiglitazone group; 4.Diabetic nephropathy+miRNA-9-5p group; 5.Diabetic nephropathy+negative control group.

2.6 各组小鼠肾脏组织 NF- κ B p65 表达情况比较

Western blot 结果表明,对照组、糖尿病肾病组、糖尿病肾病 + 罗格列酮组、糖尿病肾病 + miRNA-9-5p 组、糖尿病肾病 + 阴性对照组小鼠肾脏组织 NF- κ B p65 水平分别为 (0.143 $\pm$ 0.022)、(0.437 $\pm$ 0.028)、(0.221 $\pm$ 0.022)、(0.248 $\pm$ 0.020)、(0.431 $\pm$ 0.025),五组小鼠肾脏组织 NF- κ B p65 水平比较,差异有统计学意义($F = 275.635, P = 0.000$)。糖尿病肾病组、糖尿病肾病 + 罗格列酮组、糖尿病肾病 + miRNA-9-5p 组、糖尿病肾病 +

阴性对照组小鼠肾脏组织 NF- κ B p65 水平均高于对照组($P < 0.05$)。糖尿病肾病 + 罗格列酮组、糖尿病肾病 + miRNA-9-5p 组肾脏组织 NF- κ B p65 蛋白水平低于糖尿病肾病组($P < 0.05$)。见图 4。

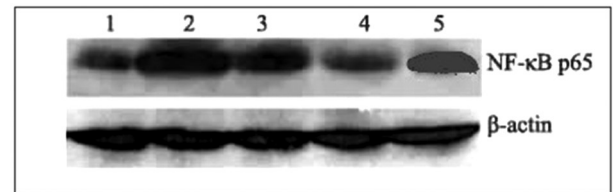


图 3 肾脏组织 Western blot 电泳图

Fig.3 Western blot electrophoresis of kidney tissue

Note: 1.Control group; 2.Diabetic nephropathy group; 3.Diabetic nephropathy+rosiglitazone group; 4.Diabetic nephropathy+miRNA-9-5p group; 5.Diabetic nephropathy+negative control group.

3 讨论

NF- κ B 是真核细胞中一种具有多向调节功能的转录因子,被认为是糖尿病微血管病发生和发展的中心调节因子^[13,14]。正常情况下,NF- κ B 以无活性的诱导形式存在于细胞浆中,当机体遇到应激、损伤和炎症等各种致病因子时,NF- κ B 被激活并转移到细胞核内,并与细胞黏附分子、细胞因子、急性时相蛋白等靶基因位点的增强子结合,起到调控作用^[15,16]。MCP-1、TNF- α 、IL-6 是 NF- κ B 的重要下游因子,这些因子在炎症反应、慢性血管疾病发病中起到重要作用。Ahmed S 等^[17]通过研究发现糖尿病肾病患者血清 NF- κ B 水平增高,并认为 NF- κ B 激活和肾小管内皮细胞炎症因子的生成是糖尿病肾病进展的重要标志。郭丽婷等^[18]通过对 33 例糖尿病患者外周血单核细胞研究发现患者单核细胞中 NF- κ B 活性升高,其活性程度与患者尿蛋白水平相关。

microRNAs 是近年来发现的一类内源性小分子非编码 RNA。它可以通过与 1 个或多个 mRNA 序列互补,调控其相应的靶 mRNA 翻译过程,起到调控基因表达的作用^[19,21]。其中

miRNA-9-5p 是 miRNA-9s 家族的重要成员。参照 miRanda 和 targetsan 数据库的查询分析,本研究找到 NF- κ B 的基因序列和种子序列,并运用预测软件进行分析,miRNA-9-5p 可能是 NF- κ B 的调控 microRNA。国外有研究发现 miRNA-9 具有调节细胞胰岛素分泌的能力^[22]。有学者通过对糖尿病肾病患者血清 microRNAs 表达谱分析发现,糖尿病肾病患者血清 miRNA-9-5p 水平升高,且与患者肾小球率过滤相关^[23]。但目前 miRNA-9-5p 通过什么机制来促进糖尿病肾病发生仍未有定论。本研究通过对 db/db 小鼠的研究发现,糖尿病肾病组小鼠 FBG、PBG、24 h 尿量均高于对照组,肾脏指数低于对照组。糖尿病肾病 + 罗格列酮组、糖尿病肾病 + miRNA-9-5p 组小鼠 FBG、PBG、24 h 尿量低于糖尿病肾病组,肾脏指数高于糖尿病肾病组。提示 miRNA-9-5p 可以有效的降低糖尿病肾病病变发生,而 miRNA-9-5p 可能通过调节机体炎症、免疫应答、肿瘤等诸多生理病理过程在糖尿病肾病发生中起到重要的作用^[24]。从各组肾脏组织学比较来看,糖尿病肾病 + miRNA-9-5p 组较糖尿病肾病组病变减轻,与糖尿病肾病 + 罗格列酮组相似。证实 miRNA-9-5p 可以降低糖尿病肾脏损害。

进一步研究发现,糖尿病肾病组小鼠血清 MCP-1、TNF- α 、IL-6 水平均高于对照组。糖尿病肾病 + 罗格列酮组、糖尿病肾病 + miRNA-9-5p 组血清 MCP-1、TNF- α 、IL-6 水平低于糖尿病肾病组。MCP-1、TNF- α 、IL-6 是 NF- κ B 的重要下游因子,也是 NF- κ B 信号通路的重要组成部分。NF- κ B 可以与转录因子 AP-1 协同作用,刺激单核细胞、巨噬细胞、成纤维细胞表达 MCP-1,从而趋化单核 / 巨噬细胞向肾脏聚集,促进糖尿病肾病的发生。TNF- α 和 IL-6 是机体中重要的炎症因子,正常情况下 TNF- α 主要有巨噬细胞产生,TNF- α 可以进一步通过自分泌作用于巨噬细胞,引起巨噬细胞活化并释放更多的炎症介质,导致疾病进展。而 IL-6 具有活化 T 细胞和成纤维细胞的作用,在肾脏纤维化的过程中起到重要作用。本研究结果提示 miRNA-9-5p 可能通过抑制 NF- κ B 信号通路,减轻下游细胞因子的生成,在糖尿病肾病的发生和发展中起到重要作用。

本研究还应用 FQ-PCR 和 Western blot 对不同组别小鼠肾脏组织 NF- κ B mRNA、NF- κ B p65 蛋白水平进行了检测,结果发现,糖尿病肾病组、糖尿病肾病 + 罗格列酮组、糖尿病肾病 + miRNA-9-5p 组、糖尿病肾病 + 阴性对照组小鼠肾脏组织 NF- κ B mRNA、NF- κ B p65 蛋白水平均高于对照组。糖尿病肾病 + 罗格列酮组、糖尿病肾病 + miRNA-9-5p 组血清 NF- κ B mRNA、NF- κ B p65 蛋白水平低于糖尿病肾病组。提示 miRNA-9-5p 可以通过抑制肾脏 NF- κ B 的生成,从而降低糖尿病肾病的发生。NF- κ B 可能是 miRNA-9-5p 的靶基因,而 miRNA-9-5p 可以通过调控 NF- κ B 信号通路,抑制 NF- κ B p65 蛋白的翻译,其具体机制有待于进一步研究证实。同时值得注意的是,本研究中 miRNA-9-5p 对 NF- κ B 的作用不如罗格列酮。但两者的作用机制不同,罗格列酮是治疗糖尿病的经典药物,其主要药理机制是通过激动过氧化物受体增殖激活受体 γ ,进而提高机体胰岛素的敏感性,对葡萄糖的生成、转运和利用起到调控作用。而本研究显示 miRNA-9-5p 主要通过 NF- κ B 信号通路对炎症反应、细胞增殖起到抑制作用。由于 miRNA-9-5p 调控具有广泛的微调作用,因此具有更广阔的应用前景。

综上所述,NF- κ B 信号通路在糖尿病肾病发病中起到了重要的作用,miRNA-9-5p 可以阻断 NF- κ B 信号通路,下调 MCP-1、TNF- α 、IL-6 的表达,抑制糖尿病肾病的发生和发展。

参考文献(Reference)

- [1] 熊思,彭辉勇,柳迎昭. MicroRNAs 在糖尿病肾病中的研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(1): 60-66
- [2] Zhao T, Sun S, Zhang H, et al. Therapeutic Effects of Tangshen Formula on Diabetic Nephropathy in Rats [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0147693
- [3] Shang J, Wang S, Jiang Y, et al. Identification of key lncRNAs contributing to diabetic nephropathy by gene co-expression network analysis[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 3328
- [4] Derakhshanian H, Djazayeri A, Javanbakht MH, et al. The Effect of Vitamin D on Cellular Pathways of Diabetic Nephropathy [J]. Rep Biochem Mol Biol, 2019, 7(2): 217-222
- [5] 胡奕芳,郭佳. 微小 RNA 在糖尿病肾病发生发展中的作用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2018, 27(2): 168-173
- [6] 赵万霞,王何婷,任月秋,等. 糖尿病肾病早期标志物研究新进展[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2018, 38(3): 192-195
- [7] Deng X, Sun L, Lai X, et al. Tea Polypeptide Ameliorates Diabetic Nephropathy through RAGE and NF- κ B Signaling Pathway in Type 2 Diabetes Mice[J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(45): 11957-11967
- [8] 江思瑜,孙竟,李金航,等. 2 型糖尿病大鼠肾组织 NF- κ B 水平的变化[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(14): 3439-3441
- [9] Nassirpour R, Raj D, Townsend R, et al. MicroRNA biomarkers in clinical renal disease: from diabetic nephropathy renal transplantation and beyond[J]. Food Chem Toxicol, 2016, 98(Pt A): 73-88
- [10] 周霞霞,李龙,于燕妮,等. 糖原合酶激酶-3 β 抑制剂对糖尿病肾病大鼠 Wnt 和核因子- κ B 信号通路的影响 [J]. 中华病理学杂志, 2015, 44(11): 783-787
- [11] Zhang Y, Sun X, Icli B, et al. Emerging roles for microRNAs in diabetic microvascular disease: Novel targets for therapy[J]. Endocr Rev, 2017, 38(2): 145-168
- [12] 王勾琴,王俭勤,梁耀军,等. 微小 RNA 在糖尿病肾病患者血清中的表达及临床意义[J]. 中华肾脏病杂志, 2015, 31(7): 503-508
- [13] Hong J, Wang X, Zhang N, et al. D-ribose induces nephropathy through RAGE-dependent NF- κ B inflammation [J]. Arch Pharm Res, 2018, 41(8): 838-847
- [14] Shukla R, Banerjee S, Tripathi YB. Pueraria tuberosa extract inhibits iNOS and IL-6 through suppression of PKC- α and NF- κ B pathway in diabetes-induced nephropathy [J]. J Pharm Pharmacol, 2018, 70(8): 1102-1112
- [15] Oguiza A, Recio C, Lazaro I, et al. Peptide-based inhibition of I κ B kinase/nuclear factor- κ B pathway protects against diabetes-associated nephropathy and atherosclerosis in a mouse model of type 1 diabetes [J]. Diabetologia, 2015, 58(7): 1656-1667
- [16] Lazaro I, Oguiza A, Recio C, et al. Targeting HSP90 Ameliorates Nephropathy and Atherosclerosis Through Suppression of NF- κ B and STAT Signaling Pathways in Diabetic Mice [J]. Diabetes, 2015, 64(10): 3600-3613
- [17] Ahmed S, Mundhe N, Borgohain M, et al. Diosmin Modulates the NF- κ B Signal Transduction Pathways and Downregulation of Various Oxidative Stress Markers in Alloxan-Induced Diabetic Nephropathy [J]. Inflammation, 2016, 39(5): 1783-1797

(下转第 3212 页)

20405-20410

- [13] POWERS S K, WIGGS M P, DUARTE J A, et al. Mitochondrial signaling contributes to disuse muscle atrophy [J]. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 2012, 303(1): E31-E39
- [14] DEGENS H, GAYAN-RAMIREZ G, VAN HEES H W. Smoking-induced skeletal muscle dysfunction: from evidence to mechanisms[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 191(6): 620-625
- [15] POSSO S V, QUESNOT N, MORAES J A, et al. AT-RVD1 repairs mouse lung after cigarette smoke-induced emphysema via downregulation of oxidative stress by NRF2/KEAP1 pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 56: 330-338
- [16] NEDELJKOVIC I, CARNERO-MONTORO E, LAHOUSSE L, et al. Understanding the role of the chromosome 15q25.1 in COPD through epigenetics and transcriptomics [J]. Eur J Hum Genet, 2018, 26(5): 709-722
- [17] RAAG M, PARNA K. Cigarette smoking and smoking-attributable diseases among Estonian physicians: a cross-sectional study[J]. BMC Public Health, 2018, 18(1): 194
- [18] SATO K, SHIBATA Y, INOUE S, et al. Impact of cigarette smoking on decline in forced expiratory volume in 1s relative to severity of air-flow obstruction in a Japanese general population: The Yamagata-Takahata study[J]. Respir Investig, 2018, 56(2): 120-127
- [19] SAVRAN O, ULRIC C S. Early life insults as determinants of chronic obstructive pulmonary disease in adult life [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2018, 13: 683-693
- [20] SILVESTRI E, CIOFFI F, DE MATTEIS R, et al. 3,5-Diiodo-L-Thyronine Affects Structural and Metabolic Features of Skeletal Muscle Mitochondria in High-Fat-Diet Fed Rats Producing a Co-adaptation to the Glycolytic Fiber Phenotype [J]. Frontiers in physiology, 2018, 9: 194-194
- [21] L Z, Y Z, W W, et al. Skeletal Muscle-Specific Overexpression of PGC-1 α Induces Fiber-Type Conversion through Enhanced Mitochondrial Respiration and Fatty Acid Oxidation in Mice and Pigs[J]. International journal of biological sciences, 2017, 13(9): 1152-1162
- [22] J C, L B, M S, et al. The role of alterations in mitochondrial dynamics and PGC-1 α over-expression in fast muscle atrophy following hindlimb unloading [J]. The Journal of physiology, 2015, 593 (8): 1981-9195
- [23] CANNAVINO J, BROCCA L, SANDRI M, et al. PGC1-alpha over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded mice [J]. J Physiol, 2014, 592 (20): 4575-4589
- [24] ATTAIX D, PICHARD C, BARACOS V E. Muscle wasting: is mitochondrial dysfunction a key target? [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2015, 18(3): 213-214
- [25] M S, J L, C H, et al. PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(44): 16260-16265
- [26] ARGILES J M, LOPEZ-SORIANO F J, BUSQUETS S. Muscle wasting in cancer: the role of mitochondria[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2015, 18(3): 221-225
- [27] MITO T, ISHIZAKI H, SUZUKI M, et al. Transmitochondrial miceDelta and mtDNA mutator mice, but not aged mice, share the same spectrum of musculoskeletal disorders[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 456(4): 933-937
- [28] GASPARI M, LARSSON N G, GUSTAFSSON C M. The transcription machinery in mammalian mitochondria [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1659(2-3): 148-152
- [29] SU Z, KLEIN J D, DU J, et al. Chronic kidney disease induces autophagy leading to dysfunction of mitochondria in skeletal muscle[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2017, 312(6): F1128-f1140
- [30] ACEVEDO L M, RAYA A I, MARTINEZ-MORENO J M, et al. Mangiferin protects against adverse skeletal muscle changes and enhances muscle oxidative capacity in obese rats [J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173028

(上接第 3243 页)

- [18] 郭丽婷,高志红,葛焕琦. 2 型糖尿病患者外周血 microRNA-155、细胞核因子- κ B 和可溶性细胞间黏附分子-1 的表达及其与血管并发症的关系研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25(3): 213-217
- [19] Bijkerk R, Duijs JM, Khairoun M, et al. Circulating microRNAs associate with diabetic nephropathy and systemic microvascular damage and normalize after simultaneous pancreas-kidney transplantation [J]. Am J Transplant, 2015, 15(4): 1081-1090
- [20] 唐春银,李玲玉,武艳,等.microRNAs 在糖尿病肾病中的研究进展[J]. 牡丹江医学院学报, 2017, 38(5): 123-125
- [21] 廖华君,文小敏,许帅.microRNA-21 在糖尿病肾病发病机制中的研究进展[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(9): 1482-1485
- [22] Riancho J, Vázquez-Higuera JL, Pozueta A, et al. MicroRNA Profile in Patients with Alzheimer's Disease: Analysis of miR-9-5p and miR-598 in Raw and Exosome Enriched Cerebrospinal Fluid Samples [J]. J Alzheimers Dis, 2017, 57(2): 483-491
- [23] 杨雪唯,梁小弟,努尔斯曼古丽·奥斯曼,等. MicroRNA 及其靶基因在糖尿病肾病小鼠肾脏的表达[J]. 科技导报, 2017, 38(4): 84-89