

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.15.003

MiR-21 靶向调控 Mfn2 对缺血再灌注损伤肾小管上皮 NRK-52E 细胞自噬及凋亡的影响 *

王 顺 黄 萱 穆尼热·阿不力孜 韩媛媛 温金凤 李素华[△]

(新疆医科大学第一附属医院肾病中心 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要 目的:探讨 miR-21 对缺血再灌注损伤肾小管上皮细胞自噬及凋亡的影响及其与线粒体融合素 2(mitochondria fusion protein mitofusin2, Mfn2)的靶向关系。**方法:**将大鼠近端肾小管上皮细胞株 NRK-52E 细胞按处理方式不同分组:I/R+control mimics 组(转染 control mimics 后缺氧 3 h/复氧 3 h),I/R+miR-21mimics 组(转染 miR-21mimics 后缺氧 3 h/复氧 3 h),I/R 组(缺氧 3 h/复氧 3 h)及对照组(正常培养)。选取 30 只 Sprague-Dawley(SD)大鼠,随机分为假手术组、缺血再灌注模型组(I/R 组)。取大鼠肾组织进行 HE 染色,自动生化分析仪检测大鼠血清尿素氮(BUN)、肌酐(Cr),四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测细胞增殖能力,TUNEL 法检测细胞凋亡,实时荧光定量 PCR 检测细胞自噬和凋亡相关基因 LC3-II、LC3-I、Beclin1、Bcl-2、Bax 及 Mfn2 mRNA 表达,Western blot 法检测细胞自噬和凋亡相关蛋白的表达,荧光素酶实验验证 miR-21 与 Mfn2 的靶向关系。**结果:**Sham 组大鼠血清 BUN、Cr 水平,大鼠肾组织细胞凋亡率高于 I/R 组($P<0.05$)。I/R 组大鼠肾组织肾小管结构紊乱,大量炎症细胞浸润。Sham 组大鼠肾组织 miR-21 水平高于 I/R 组($P<0.05$)。48 和 72 h 时,I/R+miR-21 mimics 组细胞活力明显低于 I/R+control mimics 组,I/R 组及对照组($P<0.05$),I/R 组细胞活力低于对照组($P<0.05$)。I/R+miR-21mimics 组凋亡率显著高于 I/R+control mimics 组,I/R 组及对照组($P<0.05$),I/R 组凋亡率显著高于对照组($P<0.05$)。与对照组比较,I/R 组细胞 Beclin1、LC3-II/LC3-I、Bax 蛋白及基因 mRNA 表达量升高,Bcl-2 蛋白及基因 mRNA 表达量降低($P<0.05$);与 I/R 组比较,I/R+miR-21mimics 组细胞 Beclin1、LC3-II/LC3-I、Bax 蛋白及基因 mRNA 表达量升高,Bcl-2 蛋白及基因 mRNA 表达量降低($P<0.05$)。miR-21 与 Mfn2 具有靶向关系。**结论:**miR-21 可靶向 Mfn2 促进肾缺血再灌注损伤引起的凋亡及自噬。

关键词: MiR-21; Mfn2; 肾缺血再灌注损伤; 凋亡; 自噬

中图分类号: R-33; R692 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2021)15-2812-07

Effects of miR-21 Targeting Mfn2 on Autophagy and Apoptosis of Renal Tubular Epithelial NRK-52E Cells after Ischemia-reperfusion Injury*

WANG Shun, HUANG Xuan, MUNIRE·A-bu-li-zi, HAN Yuan-yuan, WEN Jin-feng, LI Su-hua[△]

(Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830054, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of miR-21 on autophagy and apoptosis of renal tubular epithelial cells after ischemia-reperfusion injury and its targeting relationship with mitochondrial fusion protein 2 (Mfn2). **Methods:** NRK-52E cells were divided into three groups: I/R + control mimics group (hypoxia 3 h / reoxygenation 3 h after transfection of control mimics), I/R + miR-21 mimics group (hypoxia 3 h / reoxygenation 3 h after transfection of miR-21 mimics), I/R group (hypoxia 3 h / reoxygenation 3 h) and control group (normal culture). Thirty Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into sham operation group and I/R group. Renal tissue was stained with HE. Serum urea nitrogen (BUN) and creatinine (CR) were detected by automatic biochemical analyzer. Cell proliferation was detected by MTT assay. Apoptosis was detected by TUNEL assay. Autophagy and apoptosis related genes LC3-II, LC3-I, Beclin1, Bcl-2, Bax and Mfn2 mRNA expression were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. Western blot was used to detect the autophagy and apoptosis related proteins. The targeting relationship between miR-21 and Mfn2 was verified by luciferase assay. **Results:** The levels of serum BUN, Cr and the apoptosis rate of renal cells in Sham group were higher than those in I/R group ($P<0.05$). In I/R group, the structure of renal tubules was disordered and a large number of inflammatory cells infiltrated. The level of miR-21 in Sham group was higher than that in I/R group ($P<0.05$). At 48 and 72 h, the cell viability of I/R + miR-21 mimics group was significantly lower than that of I/R + control mimics group, I/R group and control group ($P<0.05$), and the cell viability of I/R group was lower than that of control group ($P<0.05$). The apoptosis rate of I/R + miR-21 mimics group was significantly higher than that of I/R + control mimics group, I/R group and control group ($P<0.05$), and the apoptosis rate of I/R group was significantly higher than that of control group

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81960132)

作者简介: 王顺(1977 年-),女,博士,副主任医师,主要研究方向:急性肾损伤、慢性肾脏病管理、血液净化,
电话: 0991-4363894, E-mail: Wangshun128@126.com

[△] 通讯作者: 李素华,女,博士,主任医师,主要研究方向:急性肾损伤、肾小球疾病诊治、慢性肾脏病管理, E-mail: lisuhuanh@sina.com

(收稿日期: 2021-01-30 接受日期: 2021-02-27)

($P<0.05$). Compared with the control group, the expressions of Beclin1, LC3- II / LC3- I , Bax protein and gene mRNA were increased and the expressions of Bcl-2 protein and gene mRNA were decreased in I/R group ($P<0.05$). Compared with I/R group, the expressions of Beclin1, LC3- II / LC3- I , Bax protein and gene mRNA were increased and the expressions of Bcl-2 protein and gene mRNA were decreased in I/R + miR-21mimics group ($P<0.05$). MiR-21 has a targeted relationship with Mfn2. **Conclusion:** miR-21 can target Mfn2 and promote apoptosis and autophagy induced by renal ischemia-reperfusion injury.

Key words: miR-21; Mfn2; Renal ischemia-reperfusion injury; Apoptosis; Autophagy

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R692 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)15-2812-05

前言

缺血再灌注后肾脏可功能障碍,甚至肾衰竭。肾小管上皮细胞损伤程度与缺血再灌注损伤的严重程度密切相关,抑制肾小管上皮细胞凋亡对于减轻缺血再灌注损伤至关重要^[1]。近年来发现多种 miRNAs 参与了缺血再灌注损伤过程^[2-4]。miR-21 是研究较多的一种 miRNAs, Jia 等研究发现^[5], 缺氧 / 复氧 (I/R) 处理抑制了骨髓源性树突状细胞 (BMDC) miR-21 的表达, 下调 miR-21 可诱导 BMDC 产生炎症细胞因子。另外研究发现^[6], 红景天通过上调 miR-21 抑制氧化应激和炎症反应保护缺氧 / 复氧诱导的心肌细胞。然而 miR-21 调控肾缺血再灌注损伤的机制尚不清楚。线粒体融合素 2 (mitochondria fusion protein mitofusin2, Mfn2) 不但与线粒体融合密切相关, 而且通过多种信号通路促进细胞的凋亡。周杰等研究发现^[7], Mfn2 通过 Ras-PI3K-Akt 信号途径抑制缺血再灌注诱导的乳鼠心肌细胞凋亡。但有关 Mfn2 与缺血再灌注损伤诱导的肾细胞凋亡是否有关所知甚少。本研究探讨了 miR-21 对 I/R 肾损伤的影响及其与 Mfn2 的关系, 希望为缺血再灌注肾损伤的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 30 只健康成年清洁级 SD 大鼠, 雌雄不限, 体质量 220~270 g, 所有大鼠在动物房进行适应性饲养 1 周, 保持环境清洁, 温度、湿度相对稳定, 正常饲养。大鼠由江苏省农业科学院实验动物中心生产, 许可证号: SCXK(苏)2012-0005, 使用许可证号 SYXK(苏)2014-0030。动物处理及实验过程得到海南医学院动物关怀及使用委员会的许可 (IACUC0023)。实验研究过程中严格遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂、细胞株及仪器

大鼠近端肾小管上皮细胞株 NRK-52E 细胞 (上海生命科学研究所)。DMEM 培养基 (Sigma 公司, 美国); 胎牛血清、双抗、胰蛋白酶 (Biosciences, 美国); Control miR-21, miR-21 mimic、MUT-Mfn2 和 WT-Mfn2 (上海生工生物有限公司); 兔抗鼠微管相关蛋白 1 轻链 3-II (microtubule-associated protein 1 light chain3, LC3-II)、LC3-I、Beclin1、B 细胞淋巴瘤 / 白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、线粒体融合素 2 (Mfn2)、 β -actin 多克隆一抗、羊抗鼠单克隆二抗 (Sigma 公司, 美国); Trizol 试剂 (江苏碧云天科技有限公司); LC3-II、LC3-I、Beclin1、Bcl-2、Bax 及 DADPH 引物序列 (上海生工有限公司); MTT 检测试剂盒、RNA 提取试剂盒、PCR

试剂盒 (武汉博士德生物公司); 血清尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr) 检测试剂盒 (江苏碧云天科技有限公司); TUNEL 原位凋亡细胞检测试剂盒、DAPI 染色试剂盒 (BioVision 公司, 美国); 酶标仪、倒置荧光显微镜 (上海仪电分析仪器有限公司); ABI 7900PCR 扩增仪 (上海仪电分析仪器有限公司); Trans Blot 转膜仪、化学发光成像仪 (上海仪电分析仪器有限公司); 凝胶成像系统 (UVP bioimaging systems, 美国)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及构建缺氧 / 复氧 (I/R) 细胞模型 用含 10% FBS 和青、链霉素各 100U/L 的 RPMI1640 培养基培养 NRK-52E, 无血清 RPMI1640 培养基培养 NRK-52E, 常规培养于 37℃、5% CO₂ 培养箱。待细胞铺满培养瓶后, 用 0.25% 胰酶消化, 制备单细胞悬液, 继续培养, 定期更换培养基、传代。取对数生长的细胞, 制备 2×10^5 单细胞悬液, 接种于 6 孔板中, 用无血清培养基培养, 细胞培养箱 (5% CO₂, 1% O₂, 94% N₂) 中培养 3 h, 换成含有血清的培养基, 37℃、5% CO₂ 培养 3 h 复氧。

1.3.2 细胞转染及分组 在细胞缺氧处理前 12 h, 使用 Lipofectamine 2000 试剂对细胞进行转染, 细胞分为 4 组: I/R+control mimics 组 (I/R 细胞转染 miR-NC), I/R+miR-21mimics 组 (I/R 细胞转染 miR-21 mimics), I/R 组 (I/R 细胞未转染) 及对照组 (细胞未进行转染、I/R 处理, 只加入等量的生理盐水)。各组细胞继续培养 24 h, 用于后续实验。

1.3.3 MTT 法检测细胞增殖能力 分别消化、收集各组细胞, 调整浓度为 5×10^4 L 的单细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 每组设置 5 个复孔, 置于培养箱中 0, 24, 48, 72 及 96 h, 终止前每孔加入 20 mL MTT, 继续培养 4 h, 上机前吸弃培养液, 每孔加入 150 mL DMSO, 水平摇床摇动 30 min, 在酶标仪 (450 nm 波长) 上测量吸光度 OD 值, 并绘制细胞活力曲线。

1.3.4 荧光素酶实验验证 miR-21 与 CD44 的靶向关系 参照脂质体转染说明书将 CD44 野生型或突变型的荧光素酶报告基因质粒载体与 miR-NC、miR-21-mimic 一起转入细胞, 培养 48 h, 参照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书进行检测。

1.3.5 I/R 大鼠造模及分组 I/R 模型: 采用微型动脉夹夹闭双侧肾蒂法制备构建大鼠。常规戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 耳缘静脉麻醉, 消毒、铺巾。行气管插管, 连接麻醉机, 以混有 30 % 氧气的空气混合气体作为载体气体, 通气流速 (mL/min) = $0.65 \times$ 体重 (g), 仰卧固定, 开腹。用微型动脉夹夹闭双侧肾蒂 30 min, 观察肾脏颜色由鲜红色变为紫色, 打开微型动脉夹, 肾脏颜色由紫黑色变为鲜红提示 I/R 模型构建成功, 缝合伤口。术后放置于 37℃ 苏醒, 正常饲养 24 h 后处死, 收集血清或肾组织用于后续试验, -80℃ 保存。假手术组 (Sham 组): 麻醉成功后, 开腹, 分

离双侧肾蒂双侧肾蒂 30 min 不夹闭双侧肾蒂,30 min 后关腹,余处理同 I/R 组。每组 15 只。注射过程参照 Gusella GL 等^[9]的文献进行。

1.3.6 HE 染色 留取肾脏组织制备石蜡切片(4 μm),二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,切片经蒸馏水洗,放入苏木精溶液染色数分钟,经酸水及氨水分色,伊红染色,梯度酒精脱水,二甲苯透明后用树胶封片,显微镜下观察。

1.3.7 凋亡实验 取各组细胞,去除培养液,PBS 冲洗,3%多聚甲醛孵育 10 min,PBS 洗涤,加入适量凋亡检测液,37℃孵育 60 min,PBS 洗涤,加入 Hoechst 染色液室温避光孵育 8 min,PBS 冲洗,加抗淬灭剂,激光共聚焦显微镜下观察,计算凋亡率。细胞核呈蓝色。取各组肾组织,石蜡包埋,制备 4 μm 厚切片,脱蜡以及梯度乙醇脱水,蛋白酶 K 渗透组织 15 min。将上述处理后的细胞或组织加入末端脱氧核糖酐转移酶(TDT)反应缓冲液 10 min,37℃加入 TDT 反应混合物 60 min,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)反应显色,苏木精复染。凋亡细胞呈棕褐色,

计算凋亡率,凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数×100%。

1.3.8 肾功能指标 取出外周血,分离血清,2500 r/min 离心 10 min,生化分析仪检测血清肌酐和尿素氮。

1.3.9 实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR)检测细胞 LC3-II、LC3-I、Beclin1、Bcl-2、Bax 及 Mfn2 mRNA 表达 对数生长期的细胞,胰酶消化,离心 加入等体积 TRIzol 试剂,根据试剂盒说明书提取总 RNA,溶于 20 μL DEPC 水,取 1 μL 加入 79 μL DEPC 水检测纯度。根据反转录试剂盒合成 cDNA,样品总 RNA 1 μg,随机引物或 oligo-dT(18-20) 100 pmol,脱氧核糖三磷酸(每种 dNTP 各 10 mmol/L) 1 μL,反转录缓冲液(5×) 4 μL,RNase 抑制剂 (20-40 U/μL) 1 μL,M-MLV 反转录酶 20U,DEPC 处理水补至 20 μL,目标引物序列见表 1。根据试剂盒说明书进行 PCR 扩增:cDNA 2 μL、上下引物各 3 μL、Taq 聚合酶 0.5 μL,总体积共 25 μL,反应参数设置为 92℃ 20 s、96℃ 2 s、85℃ 20 s、80℃ 6 s,共 40 个循环。构建溶解曲线。2^{-ΔΔCt}法计算目标引物 mRNA 的相对表达量。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

Gengs		Sequences
LC3-II	Forward	5'-AAGCAACTCTGGATGGGATT-3'
	Reverse	5'-GCAGCCACAGGACGA AAC-3'
LC3-I	Forward	5'-GGAAGAGCACCGUGAUCAdTdT-3'
	Reverse	5'-AACACGCCCCGUGCCCAUGAACdTdT-3'
Beclin 1	Forward	5'-AGCATTCCGTCTGACCATCA-3'
	Reverse	5'-ACTCAGACCCTGAGGCTCAAAG-3'
Bcl-2	Forward	5'-GATACGAAGGGAGGGTGTACCA-3'
	Reverse	5'-CTCGGCCAGGGTGTGAA-3'
Bax	Forward	5'-CTGAAATTTATTGACAAACAGC-3'
	Reverse	5'-GCATCGAGAGAAGAGCAGGGACAT-3'
Mfn2	Forward	5'-CCTGGTCCCACAGATACCAC-3'
	Reverse	5'-CTCAGACCTGGGAAATGGAC-3'
GAPDH	Forward	5'-GCAAATTCATGGCACCCT-3'
	Reverse	5'-TCGCCCCACTTGATTTTGG-3'

1.3.10 Western blot 法检测 LC3-II、LC3-I、Beclin1、Bcl-2、Bax 及 Mfn2 蛋白的表达 细胞经胰酶消化,40℃1500 r/min,离心 5 min,去上清,超声波破核,离心,取上清液。配胶,上样,电泳,转膜,切膜,封闭液封闭 1 h,逐次 LC3-II (1:1000)、LC3-I (1:1000)、Beclin1 (1:1000)、Bcl-2 (1:1000)、Bax (1:1000)、Mfn2 (1:1000)、辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1000)。Bio-Rad 成像仪曝光成像,Image Lab Software 测定光密度,以目标蛋白与 β-actin 条带光密度比值表示相对表达量。

1.3.11 荧光素酶实验验证 miR-21 与 Mfn2 的靶向关系 首先将 Mfn2 野生型或突变型的荧光素酶报告基因质粒载体分别转染 I/R+control mimics 组,I/R+miR-21mimics 组细胞,培养 48 h 后去除培养液。PBS 清洗,加入细胞裂解液。4℃放置 10

min,40℃1000r/min 离心 3 min,取上清测定荧光素活性。

1.4 统计学分析

以 SPSS20.0 统计软件(SPSS Inc,Chicago,IL,USA)对各组间计量资料以均数±标准差表示,比较采用 ANOVA 检验,两两比较采用 LSD-t 法,计数资料以例数/百分比(n/%)表示,组间比较作 χ² 检验;P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MiR-21 在 I/R 大鼠肾组织的表达

Sham 组大鼠血清 BUN、Cr 水平,大鼠肾组织细胞凋亡率高于 I/R 组(P<0.05)。I/R 组大鼠肾组织肾小管结构紊乱,大量炎症细胞浸润,提示 I/R 模型大鼠成功。Sham 组大鼠肾组织 miR-21 水平高于 I/R 组(P<0.05)(见图 1)。

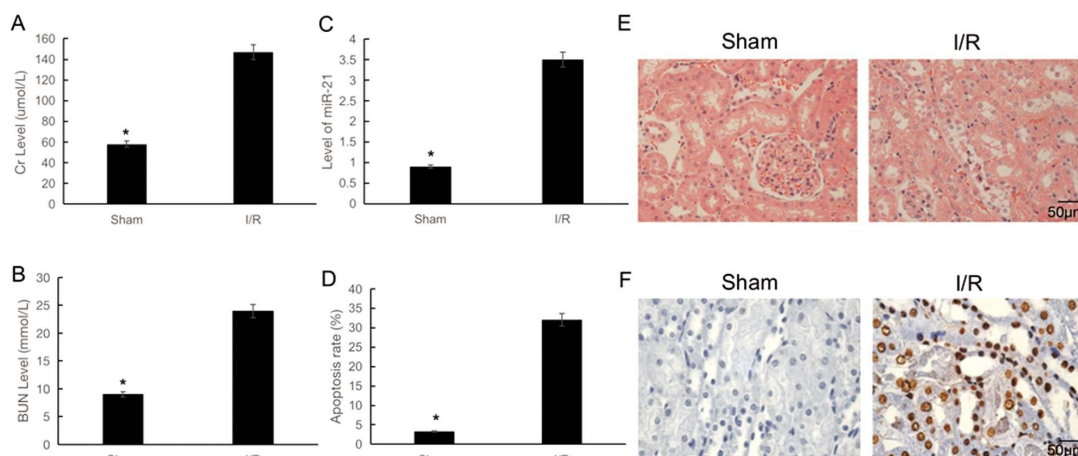


图1 I/R大鼠组织miR-21的表达

Fig.1 Expression of miR-21 in I/R rats

注:A血清Cr水平;B血清BUN水平;C miR-21表达水平;D凋亡率;E肾组织HE染色;F凋亡实验。*与I/R组比较, $P<0.05$ 。Note: A: Serum CR level; B: Serum BUN level; C: MiR-21 expression level; D: Apoptosis rate; E: Renal tissue HE staining; F: Apoptosis test. *Compared with I/R group, $P<0.05$.

2.2 过表达miR-21对NRK-52E细胞增殖的影响

I/R+miR-21 mimics组细胞miR-21水平显著高于I/R+control mimics组, I/R组及对照组 ($P<0.05$), I/R+control mimics组, I/R组细胞miR-21水平显著高于对照组 ($P<0.05$)。48和

72 h时, I/R+miR-21 mimics组细胞活力明显低于I/R+control mimics组, I/R组及对照组 ($P<0.05$), I/R+control mimics组, I/R组细胞活力低于对照组 ($P<0.05$) (见图2)。

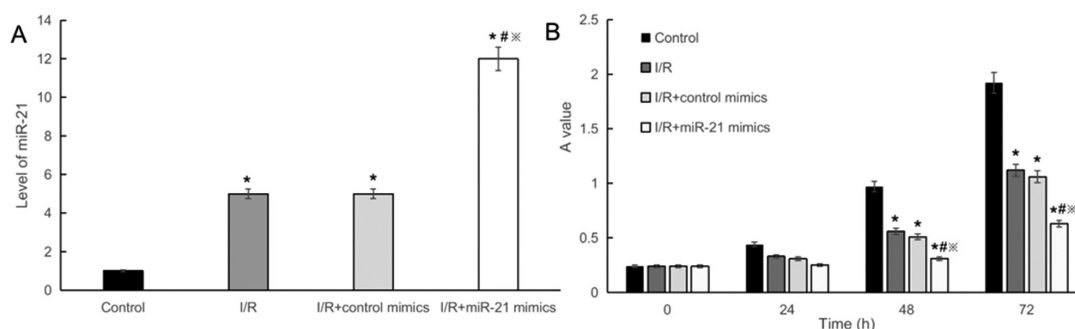


图2 MiR-21对NRK-52E细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of miR-21 on proliferation of NRK-52E cells

注:A: miR-21表达水平; B: MTT结果。*与对照组比较, $P<0.05$; #与I/R组比较, $P<0.05$; *与I/R+control mimics组比较, $P<0.05$ 。Note: A: miR-21 expression level; B: MTT results. *Compared with control group, $P<0.05$; # compared with I/R group, $P<0.05$; * compared with I/R + control mimics group, $P<0.05$.

2.3 过表达miR-21对NRK-52E细胞凋亡的影响

I/R+miR-21 mimics组凋亡率显著高于I/R+control mimics组, I/R组及对照组 ($P<0.05$), I/R+control mimics组, I/R组凋亡率显著高于对照组 ($P<0.05$) (见图3)。

2.4 过表达miR-21对NRK-52E细胞LC3-II、LC3-I、Beclin1、Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

I/R诱导的NRK-52E细胞Beclin1、LC3-II/LC3-I、Bax表达升高, Bcl-2蛋白表达量降低, 过表达miR-21增加了细胞Beclin1、LC3-II/LC3-I、Bax表达, 抑制了Bcl-2蛋白表达 ($P<0.05$) (见图4)。

2.5 过表达miR-21对NRK-52E细胞LC3-II、LC3-I、Beclin1、Bcl-2、Bax基因mRNA表达的影响

I/R诱导的NRK-52E细胞Beclin1、LC3-II/LC3-I、Bax表达升高, Bcl-2基因mRNA表达量降低, 过表达miR-21增加了细胞Beclin1、LC3-II/LC3-I、Bax表达, 抑制了Bcl-2基因

mRNA表达 ($P<0.05$) (见图5)。

2.6 miR-21与Mfn2的靶向关系

通过生物学信息软件分析发现, miR-21与WT-3'UTR-Mfn2在99-106位置处存在一定数量的互补碱基对。I/R诱导的NRK-52E细胞Mfn2蛋白及基因mRNA表达升高, 过表达miR-21增加了细胞Mfn2蛋白及基因mRNA表达 ($P<0.05$)。荧光素酶实验表明, 转染miR-21 mimic+WT-Mfn2的细胞荧光素酶活性低于转染control mimics+WT-Mfn2组 ($P<0.05$) (见图6)。

3 讨论

缺血再灌注损伤(I/R)是导致肾损伤的主要病因, 严重时可导致肾衰竭, 甚至死亡。病理基础为急性肾小管坏死, 而肾小管上皮细胞作为缺血再灌注损伤中主要受损细胞, 在肾缺血再灌注损伤发生发展中发挥重要的作用。MicroRNAs是近年来研

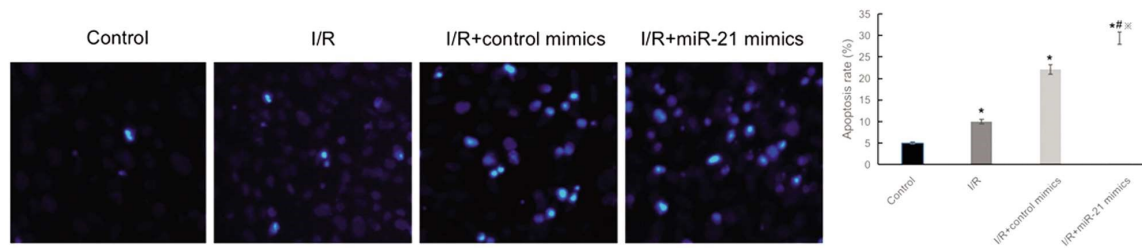


图3 MiR-21 对凋亡的影响

Fig. 3 Effect of miR-21 on apoptosis

注: * 与对照组比较, $P < 0.05$; # 与 I/R 组比较, $P < 0.05$; * 与 I/R+control inhibitor (mimics) 组比较, $P < 0.05$ 。

Note: * compared with control group, $P < 0.05$; # compared with I / R group, $P < 0.05$; * compared with I / R + control inhibitor (mimics) group, $P < 0.05$.

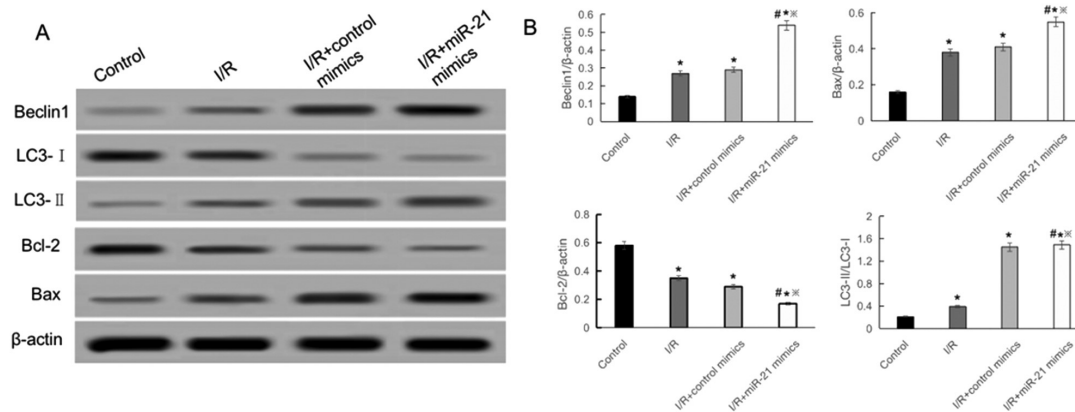


图4 各组细胞 LC3-II、LC3-I、Beclin1、Bcl-2、Bax 蛋白的表达

Fig.4 Expression of LC3 - II, LC3 - I, Beclin1, Bcl-2 and Bax protein in each group

注: A: Western blot 结果; B: 统计学结果。* 与对照组比较, $P < 0.05$; # 与 I/R 组比较, $P < 0.05$; * 与 I/R+control mimics 组比较, $P < 0.05$ 。

Note: A: Western blot results; B: Statistical results. * Compared with control group, $P < 0.05$; # compared with I / R group, $P < 0.05$;

* compared with I / R + control mimics group, $P < 0.05$.

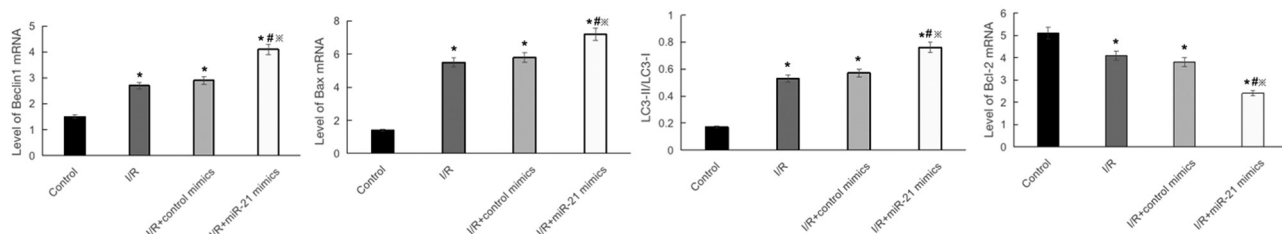


图5 各组细胞 LC3-II、LC3-I、Beclin1、Bcl-2、Bax 基因 mRNA 的表达

Fig. 5 mRNA expression of LC3 - II, LC3 - I, Beclin1, Bcl-2 and Bax genes in each group

注: * 与对照组比较, $P < 0.05$; # 与 I/R 组比较, $P < 0.05$; * 与 I/R+control inhibitor 组比较, $P < 0.05$ 。

Note: * compared with control group, $P < 0.05$; # compared with I / R group, $P < 0.05$; * compared with I / R + control inhibitor group, $P < 0.05$.

研究的热点,参与多种细胞生理病理活动,国内外研究表明 miRNAs 在急性肾损伤中发挥了重要作用,如 Xu 等研究发现^[9], miR-10a 过表达可通过抑制 PIK3CA 表达促进肾缺血再灌注损伤。在细胞及动物水平的研究中,Zhao 研究发现^[10], miR-27a-3p 通过介导氧化应激促进肾缺血再灌注损伤。miR-21 作为研究较多的一种 miRNAs,研究发现^[11],维生素 D3 和促红细胞生成素通过促进热休克蛋白 70 和 miR-21 表达保护肾缺血再灌注损伤。本研究通过构建 I/R 肾小管上皮细胞及大鼠肾缺血再灌注损伤模型,观察 miR-21 对肾缺血再灌注的影响,结果显示,缺血再灌注损伤细胞及大鼠肾组织中高表达 miR-21,过表达 miR-21 可加速肾小管上皮细胞的损伤,下调 miR-21 可改善缺

血再灌注对肾组织的损伤。提示 miR-21 参与了肾缺血再灌注损伤的发生,沉默 miR-21 可改善缺血再灌注损伤。

miRNA 参与调控各种生物过程包括自噬、增殖和凋亡。凋亡和自噬虽是细胞死亡的两种途径,但两者密不可分、相互作用,在肾缺血再灌注发生发展中起到关键作用^[12]。因此,探索这部分内容对于肾缺血再灌注损伤的防治具有重要的意义。细胞凋亡是细胞在一系列基因激活下进行的一种死亡过程,通过这种过程人体可消除无功能或异常细胞。缺血再灌注的细胞受到炎症因子刺激后会诱发细胞启动凋亡过程以清除坏死的细胞。Bcl-2 家族是调控细胞凋亡的关键蛋白,主要包括两个成员:抗凋亡蛋白(Bcl-2)和促凋亡蛋白(Bax)。Bcl-2 通过结合 Bax 蛋

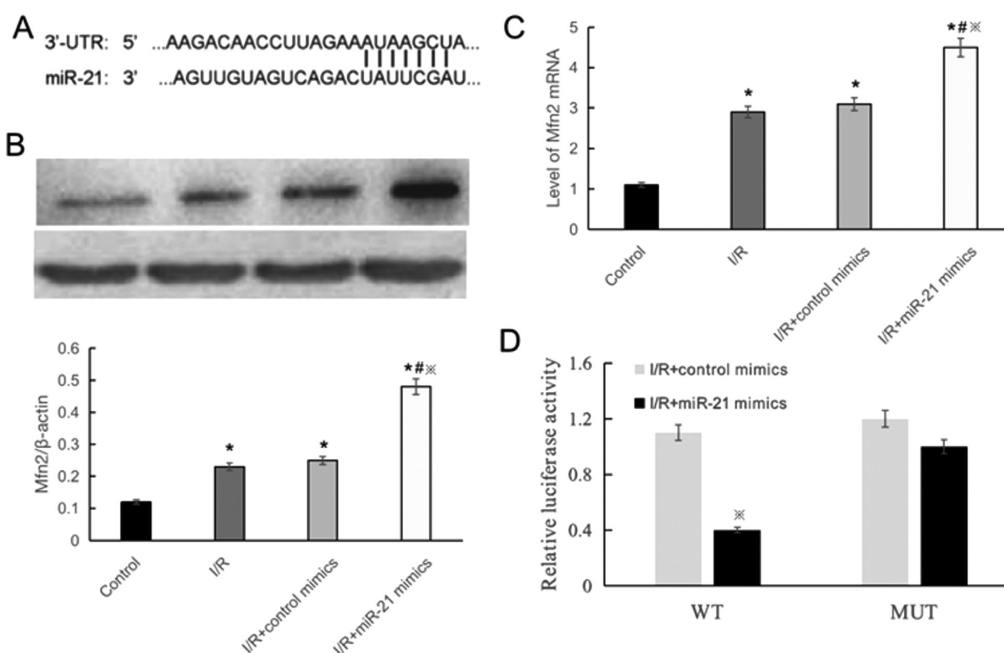


图6 miR-21 与 Mfn2 的靶向关系

Fig.6 The targeting relationship between miR-21 and Mfn2

注:A:互补碱基对;B:Mfn2 蛋白表达;C:Mfn2 基因 mRNA 表达水平;D:荧光素酶实验。* 与对照组比较, $P<0.05$;# 与 I/R 组比较, $P<0.05$; * 与 I/R+control mimics 组比较, $P<0.05$ 。

Note: A: complementary base pairs; B: Mfn2 protein expression; C: Mfn2 mRNA expression; D: luciferase assay. *Compared with control group, $P<0.05$; # compared with I / R group, $P<0.05$; * compared with I / R + control mimics group, $P<0.05$.

白,形成二聚体,使 Bax 蛋白处于失活状态,导致细胞不能启动凋亡途径^[13]。当 Bcl-2 表达被抑制后,则与 Bax 分离,引起凋亡的发生。研究发现^[14],缺血再灌注肾动物肾小管上皮细胞高表达凋亡相关蛋白。李轩杰^[15]等研究羟考酮对大鼠肾缺血再灌注细胞凋亡的影响时发现,缺血再灌注肾组织 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 的表达上调,Bcl-2/Bax 比值降低。韩庆玲^[16]等研究结果显示,肾缺血再灌注损伤导致糖尿病小鼠肾组织 Bax、Caspase-3 蛋白表达增加,Bcl-2 蛋白表达下降。本研究结果显示,缺血再灌注损伤的肾小管上皮 NRK-52E 细胞及肾组织凋亡细胞明显增加,Bax 蛋白表达升高,Bcl-2 蛋白表达降低,提示缺血再灌注导致肾组织发生了凋亡,且过表达 miR-21 可加剧细胞的凋亡,下调 miR-21 则可以抑制减轻凋亡。

自噬是真核细胞维持细胞稳定,提供能量的过程,对缺血再灌注损伤细胞存活和细胞死亡起到至关重要的作用。自噬的激活可以保护缺血再灌注损伤的肾小管上皮细胞,如胡黄连苷 II 预处理可通过增强自噬反应减轻缺血再灌注肾损伤引起的炎症反应,改善肾功能,保护肾组织^[17],此外番茄红素可通过激活自噬改善肾缺血再灌注损伤^[18]。另一方面,自噬的过度激活可加重肾损伤,抑制过度自噬可改善缺血再灌注肾损伤,如二甲双胍可通过抑制自噬减轻缺血再灌注损伤导致的肾损伤^[19]。氯化锌可减轻内质网应激,抑制自噬反应,改善缺血再灌注肾损伤引起的炎症反应^[20]。Beclin1 蛋白是启动自噬的重要蛋白,与 PI3K 形成结合体,调控 Atg 蛋白的位置,进而加速自噬体的形成^[21]。微管相关蛋白 (microtubule-associated protein 1 light chain3, LC3)位于自噬泡膜,参与自噬体的合成,与自噬泡的数量呈正相关,LC3 主要包括了 I 型和 II 型,LC3- I 代表了自噬

前状态,发生自噬后,LC3 I 则与自噬泡膜的 PE 结合形成 LC3- II^[22]。LC3- II、LC3- I 及 Beclin1 是与自噬密切相关的蛋白,在自噬体形成中发挥至关重要的作用,可反映自噬活动,是研究自噬活动的特异性指标^[23]。本研究结果显示,缺血再灌注损伤的肾小管上皮 NRK-52E 细胞 Beclin1 蛋白水平、LC3- II /LC3- I 升高,提示 NRK-52E 细胞发生了自噬激活,过表达 miR-21 可加剧细胞的自噬,下调 miR-21 则可以抑制自噬。

细胞凋亡、自噬包含了线粒体途径和死亡受体介导途径。线粒体途径是最重要的细胞凋亡、自噬信号途径之一。研究发现,肝脏缺血再灌注后,线粒体自噬上调,导致肝细胞死亡减少^[24]。另外研究发现,心肌发生缺血再灌注时,激活了线粒体 c-Jun N- 末端激酶(JNK),进而加速细胞的自噬和凋亡,促进了缺血再灌注损伤^[25]。在此过程中线粒体膜的通透性发生改变,招募自噬小体与溶酶体,诱导线粒体自噬的发生。Mfn2 属于线粒体外膜蛋白,周炜等^[26]研究显示,血管平滑肌细胞 Mfn2 蛋白通过线粒体途径负调控 Ras 基因,抑制 Ras-PI3K/Akt 信号通路,抑制 Bcl-2 基因表达,促进 Bax 基因表达,提示 Mfn2 可通过 Ras-PI3K/Akt 通路促进细胞发生凋亡。张艳平研究发现^[27],低温可上调大脑皮质的 Mfn2 表达保护脑缺血再灌注损伤。但 Mfn2 在缺血再灌注损伤后肾组织凋亡、自噬中的调控作用文献报道较少,与 miR-21 的关系尚不清楚。研究显示^[28],miR-214 可靶向调控 Mfn2 促进缺血再灌注损伤肾小管细胞凋亡。本研究结果显示,缺血再灌注损伤的肾小管上皮细胞高表达 Mfn2,上调 miR-21 可促进 Mfn2 蛋白的表达,荧光素实验结果表明 miR-21 与 Mfn2 存在靶向关系。

综上所述,miR-21 参与了肾缺血再灌注损伤的发生,其通

过靶向 Mfn2 调控自噬、凋亡促进了缺血再灌注损伤, miR-21 有望成为肾缺血再灌注防治的靶点。

参考文献(References)

- [1] 朱子敬,陈星华,丁国华.肾小管上皮细胞能量代谢障碍在急性肾损伤中作用的研究进展[J].中华肾脏病杂志, 2020, 36(12): 965-969
- [2] Xing X, Guo S, Zhang G, et al. miR-26a-5p protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. Braz J Med Biol Res, 2020, 53(2): e9106
- [3] Liu W, Miao Y, Zhang L, et al. MiR-211 protects cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting cell apoptosis [J]. Bioengineered, 2020, 11(1): 189-200
- [4] Zhao J, Wang B. MiR-7-5p Enhances Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Degrading sirt1 mRNA [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2020, 76(2): 227-236
- [5] Jia P, Pan T, Xu S, et al. Depletion of miR-21 in dendritic cells aggravates renal ischemia-reperfusion injury [J]. FASEB J, 2020, 34(9): 11729-11740
- [6] Liu B, Wei H, Lan M, et al. MicroRNA-21 mediates the protective effects of salidroside against hypoxia/reoxygenation-induced myocardial oxidative stress and inflammatory response [J]. Exp Ther Med, 2020, 19(3): 1655-1664
- [7] 周杰,严凌,黄多新.线粒体融合素 2 通过 Ras-PI3K-Akt 信号途径抑制缺血再灌注诱导的乳鼠心肌细胞凋亡[J].中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(9): 973-979
- [8] Gusella GL, Fedorova E, Hanss B, et al. Lentiviral Gene Transduction of Kidney[J]. Human Gene Therapy, 2002, 13(3): 407-414
- [9] Xu D, Li W, Zhang T, et al. miR-10a overexpression aggravates renal ischemia-reperfusion injury associated with decreased PIK3CA expression[J]. BMC Nephrol, 2020, 21(1): 248
- [10] Zhao XR, Zhang Z, Gao M, et al. MicroRNA-27a-3p aggravates renal ischemia/reperfusion injury by promoting oxidative stress via targeting growth factor receptor-bound protein 2 [J]. Pharmacol Res, 2020, 155(4): 104718
- [11] Golmohammadi M G, Banaei S, Nejati K, et al. Vitamin D3 and erythropoietin protect against renal ischemia-reperfusion injury via heat shock protein 70 and microRNA-21 expression [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 20906
- [12] 彭显月,梁国标.自噬在肾缺血再灌注损伤中作用机制的研究进展[J].医学研究杂志, 2020, 49(7): 9-11+16
- [13] Freedman A, Jacobsen E. Follicular lymphoma: 2020 update on diagnosis and management[J]. Am J Hematol, 2020, 95(3): 316-327
- [14] 王莉芳,冯正平,李晓春,等.胃饥饿素对小鼠肾缺血再灌注损伤模型的保护作用[J].中国药业, 2020, 29(13): 21-24
- [15] 李轩杰,刘振臻,冷玉芳,等.羟考酮预先给药对大鼠肾缺血再灌注时细胞凋亡的影响[J].中华麻醉学杂志, 2017, 37(8): 943-946
- [16] 韩庆玲,郑德义,李伟人,等.肾缺血再灌注通过促凋亡途径加重糖尿病小鼠肾损伤[J].安徽医科大学学报, 2018, 53(12): 1834-1837
- [17] 刘浩,刘修恒,王磊,等.胡黄连苷 II 可通过增强自噬抑制炎症和氧化应激减轻大鼠肾缺血再灌注损伤 [J]. 武汉大学学报 (医学版), 2019, 40(2): 203-207
- [18] 曾敬,杨小利,刘渔凯,等.番茄红素防护肾脏缺血再灌注损伤及其对自噬机制的影响[J].中国药业, 2020, 29(1): 4-7
- [19] 金领微,潘敏,叶菡洋,等.二甲双胍通过调节氧化应激、内质网应激和自噬减轻大鼠肾缺血再灌注损伤的作用研究[J].医学研究杂志, 2020, 49(1): 111-117
- [20] Hadj Abdallah N, Baulies A, Bouhlel A, et al. Zinc mitigates renal ischemia-reperfusion injury in rats by modulating oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(11): 8677-8690
- [21] Lv Y, Fang L, Ding P, et al. PI3K/Akt-Beclin1 signaling pathway positively regulates phagocytosis and negatively mediates NF- κ B-dependent inflammation in Staphylococcus aureus-infected macrophages [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 510(2): 284-289
- [22] Runwal G, Stamatakou E, Siddiqi FH, et al. LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 10147
- [23] Li C, Chen Q, Tian Z, et al. Expression of MIF, Beclin1, and LC3 in human salivary gland adenoid cystic carcinoma and its prognostic value[J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(20): e15402
- [24] Ning XJ, Yan X, Wang YF, et al. Parkin deficiency elevates hepatic ischemia/reperfusion injury accompanying decreased mitochondrial autophagy, increased apoptosis, impaired DNA damage repair and altered cell cycle distribution [J]. Mol Med Rep, 2018, 18(6): 5663-5668
- [25] Xu J, Qin X, Cai X, et al. Mitochondrial JNK activation triggers autophagy and apoptosis and aggravates myocardial injury following ischemia/reperfusion [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(2): 262-270
- [26] 周炜,曹文静,陈莉莉,等.去除蛋白激酶 A 磷酸化位点的线粒体融合素 2 基因对血管平滑肌细胞凋亡的影响[J].中国动脉硬化杂志, 2012, 20(11): 968-971
- [27] 张艳平,张倩,阎玮,等.浅低温对大鼠脑缺血再灌注时皮质 Mfn2 表达的影响[J].中华麻醉学杂志, 2019, (11): 1383-1386
- [28] Yan Y, Ma Z, Zhu J, et al. miR-214 represses mitofusin-2 to promote renal tubular apoptosis in ischemic acute kidney injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2020, 318(4): F878-F887