

基于 miRNA 测序技术探讨黄芪-丹参药对干预自发性高血压大鼠肾损害的机制研究

刘 瑶¹, 李 伟^{2*}

1. 山东中医药大学中医学院, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学附属医院 肾内科, 山东 济南 250014

摘要: 目的 基于微小 RNA (microRNA, miRNA) 高通量测序技术, 探讨黄芪-丹参药对通过调控 miRNA 改善高血压肾损害的作用机制。方法 以 9 只 WKY 大鼠作为对照组, 将自发性高血压大鼠随机分为模型组和黄芪-丹参药对 (3.4 g/kg) 组, 每组 9 只; 黄芪-丹参药对组给予黄芪-丹参药对进行干预, 观察各组大鼠血压及肾组织病理变化, 并对各组大鼠肾组织进行 miRNA 测序。结果 经黄芪-丹参药对干预 4 周后, 与模型组比较, 大鼠血压显著降低 ($P < 0.01$), 大鼠肾小球分叶不明显, 系膜区增生减轻。与对照组相比, 模型组共筛选出 115 个差异表达 miRNA, 其中 68 个差异表达 miRNA 上调、47 个差异表达 miRNA 下调; 与模型组相比, 黄芪-丹参药对组筛选得到 91 个差异表达 miRNA, 其中 67 个差异表达 miRNA 上调、24 个差异表达 miRNA 下调。差异表达 miRNA 的 qRT-PCR 验证结果显示, 各组大鼠肾组织 miRNA-142-5p、miRNA-3585-5p、miRNA-219a-5p、miRNA-122-5p 和 miRNA-125b-1-3p 表达与 miRNA 测序结果趋势一致。差异表达 miRNA 的靶基因预测及功能富集结果显示, 基因本体 (gene ontology, GO) 功能主要富集于阴离子跨膜转运、突触前、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性等方面; 京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路主要富集于哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、自噬、单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 信号通路等途径。结论 miR-219a-5p、miR-3585-5p 和 miR-142-5p 可能是黄芪-丹参药对延缓高血压肾损害进程的直接靶点。

关键词: 黄芪-丹参药对; 高血压肾损害; miRNA 测序; 自发性高血压大鼠; 生物信息学分析

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)18-5599-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.014

Mechanism of *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herbal pair on renal damage of spontaneously hypertensive rats based on miRNA sequencing technology

LIU Yao¹, LI Wei²

1. College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Department of Nephropathy, Affiliated Hospital of Shandong University of Chinese Medicine, Jinan 250014, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Huangqi (*Astragali Radix*) and Danshen (*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*) herbal pair on renal damage of spontaneously hypertensive rats by regulating miRNA based on miRNA high-throughput sequencing. **Methods** Nine WKY rats were used as control group, spontaneously hypertensive rats were randomly divided into *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herbal pair (3.4 g/kg) group and model group, with nine mice in each group. *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herbal pair were given to intervene, blood pressure was measured and pathological changes of renal tissue were observed. miRNA sequencing experiments were performed to determine the differential expression profiles of miRNAs. **Results** After 4 weeks of intervention with *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herbal pair, compared with model group, blood pressure of rats was significantly reduced ($P < 0.01$), glomerular lobules of rats were not obvious, and mesangial hyperplasia was reduced. Compared with control group, 115 differentially expressed miRNAs

收稿日期: 2021-01-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81673812)

作者简介: 刘 瑶 (1988—), 女, 讲师, 在站博士后, 研究方向为中西医结合治疗肾系疾病的研究。Tel: 15689415998 E-mail: 1194674664@qq.com

*通信作者: 李 伟, 女, 博士, 主任医师, 博士生导师。Tel: (0531)68616038 E-mail: lweidw@163.com

in model group were screened, of which 68 differentially expressed miRNAs were up-regulated and 47 differentially expressed miRNAs were down-regulated; Compared with model group, 91 differentially expressed miRNAs in *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herbal pair group were screened, of which 67 differentially expressed miRNAs were up-regulated and 24 differentially expressed miRNAs were down-regulated. The results of qRT-PCR verification of differentially expressed miRNAs showed that expressions of *miRNA-142-5p*, *miRNA-3585-5p*, *miRNA-219a-5p*, *miRNA-122-5p* and *miRNA-125b-1-3p* were consistent with the trend of miRNA sequencing results. The target gene prediction and function enrichment results of differentially expressed miRNAs showed that the function of gene ontology (GO) was mainly enriched in anion transmembrane transport, presynaptic, protein serine/threonine kinase activity, etc., Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway was mainly enriched in mammalian target of rapamycin (mTOR), mitogen-activated protein kinase (MAPK), autophagy, adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway and other pathways. **Conclusion** *miR-219a-5p*, *miR-3585-5p* and *miR-142-5p* may be the direct targets of *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herbal pair to delay the progression of renal damage in hypertension.

Key words: *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herbal pair; hypertensive renal damage; miRNA sequencing; spontaneously hypertensive rats; bioinformatics analysis

高血压和肾脏病密切相关, 互为病因和加重因素^[1]。长期持续的原发性高血压, 可引发肾小动脉肌内膜肥厚、管腔狭窄、细小动脉玻璃样变, 继发肾实质缺血性损害, 进一步加剧血压升高, 二者形成恶性循环。高血压肾损害是终末期肾脏病 (end stage renal disease, ESRD) 的独立危险因素和主要病因。因此, 探讨高血压肾损害的新型防治策略, 有助于降低 ESRD 及其并发症的发生率。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类进化上非常保守、长度介于 21~25 个核苷酸的内源性非编码小分子 RNA, 通过其种子序列 (5'端的 2~8 位核苷酸序列) 与靶 mRNA 3'非翻译端互补靶序列匹配, 介导 mRNA 的降解或抑制蛋白质的翻译, 进而调节相应基因表达。研究发现, miRNA 不仅可以影响多种细胞活性和细胞增殖、凋亡、分化、迁移和死亡等生物学过程, 从而在高血压发生发展中发挥重要作用^[2-3], 也可作为糖尿病肾病、免疫性肾脏疾病、肾细胞癌等多种肾脏疾病的潜在治疗靶点^[4-6]。

山东中医药大学附属医院李伟教授结合自身多年临床经验, 主张气虚血瘀贯穿高血压肾损害始终, 临床采用补气活血法治疗, 可减少患者尿微量白蛋白的排泄, 保护肾功能。黄芪-丹参作为补气活血的典型代表药对, 在调控血压、舒张血管、抗凝、抗氧化、调节炎症反应等方面具有多重功效^[7]。本课题组前期研究表明, 黄芪-丹参药对能够降低自发性高血压大鼠的血压及双肾血流阻力指数 (resistance index, RI), 提高肾组织一氧化氮 (nitric oxide, NO) 水平及一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase,

NOS) 活性, 延缓高血压肾损害的发展进程^[8-9]。本研究旨在通过 miRNA 测序技术, 从转录组学角度探索黄芪-丹参药对在自发性高血压大鼠肾组织中的直接作用靶点, 探讨其改善高血压肾损害的作用机制, 为中药防治高血压肾损害提供依据。

1 材料

1.1 动物

24 周龄 SPF 级雄性自发性高血压大鼠 18 只, 同周龄 WKY 大鼠 9 只, 体质量 280~300 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (京) 2016-0006。动物于温度 22~24 °C、湿度 50%~70% 条件下适应性饲养 1 周, 自由进食饮水。动物实验经山东中医药大学伦理委员会批准 (批准号 SDUTCM20210305023)。

1.2 药品与试剂

2 g 黄芪中药配方颗粒 (批号 18013991) 相当于饮片 5 g, 1 g 丹参中药配方颗粒 (批号 18005862) 相当于饮片 10 g, 均由山东中医药大学附属医院提供; QIAseq miRNA Library Kit、miRNeasy Mini Kit 购自德国 Qiagen 公司; MiPure Cell/Tissue miRNA Kit (批号 7E242G8) 购自南京诺维赞生物科技股份有限公司; Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (批号 638313)、TB Green™ Ex Taq™ II Kit (批号 RR820A) 购自 Takara 生物技术有限公司。

1.3 仪器

MRBP-RMC 大鼠多通道无创血压测量系统 (美国 IITC 公司); Eclipse E100 正置光学显微镜 (日本 Nikon 公司); Qubit® 3.0 Fluorometer (美国 Life Technologies 公司); Nanodrop One 分光光度计 (美

国 Thermo Fisher Scientific 公司); Agilent 2100 生物分析仪(美国 Agilent 公司); Hiseq Xten 测序仪(美国 Illumina 公司); Light Cycler480 II qRT-PCR 仪(德国 Roche 公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药

取 WKY 大鼠 9 只作为对照组, 将自发性高血压大鼠随机分为模型组和黄芪-丹参药对 (3.4 g/kg) 组, 每组 9 只。根据本课题组前期研究^[10], 黄芪、丹参饮片用量分别为 5.09、2.55 g/kg, 分别将黄芪、丹参配方颗粒用量定为 2.036、0.255 g/kg, 药物以 0.9% 氯化钠溶液溶解。各给药组 ig 药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液, 1 次/d, 连续 4 周。

2.2 黄芪-丹参药对对自发性高血压大鼠血压的影响

每周采用无创尾动脉加压法测量血压, 记录每只大鼠清醒状态下尾动脉的收缩压与舒张压, 连续测量 3 次。

2.3 黄芪-丹参药对对自发性高血压大鼠肾组织病理变化的影响

给药结束后, 大鼠 ip 3% 戊巴比妥钠 (80 mg/kg) 过量麻醉处死, 取肾组织, 于中性多聚甲醛中固定 48 h, 切片 (厚 4 μ m) 后石蜡包埋, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 以中性树胶封片, 于显微镜下观察并拍照。

2.4 各组大鼠肾组织差异表达 miRNA 分析

2.4.1 肾组织 RNA 的抽提与纯化 随机选取各组大鼠各 3 只, 按照试剂盒说明书提取肾组织 RNA, 用生物分析仪进行质量检测, 采用 Qubit® 3.0 Fluorometer 和 Nanodrop One 分光光度计进行定量分析。

2.4.2 文库构建与高通量测序 使用 QIAseq miRNA Library Kit 构建双端测序文库。纯化产物合成 cDNA 文库, 继而进行定量检测, 以确认插入片段的大小。通过 cBot 生成簇, 将文库稀释至 10 pmol/L, 在 Illumina Hiseq Xten 测序平台上测序。

2.4.3 基因表达的数据分析 将每个具有 miRNA 序列的样品读长与已有 miRNA 数据库和新 miRNA 的预测结果进行比较, 计算 miRNA 表达水平, 并通过 CPM 筛选 miRNA。使用 DESeq 软件分析样品 miRNA 表达并筛选出 $P < 0.05$ 、倍数变化 (fold change, FC) > 1.5 或 < 0.67 的差异表达 miRNA。

2.5 qRT-PCR 验证差异表达 miRNA

选择 5 个差异表达 miRNA (miRNA-142-5p、miRNA-3585-5p、miRNA-219a-5p、miRNA-122-5p、miRNA-125b-1-3p) 进行 qRT-PCR 验证。使用 MiPure Cell/Tissue miRNA Kit 提取各组大鼠肾组织 miRNA, 用 Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit 逆转录纯化的 miRNA, 合成 cDNA。根据 TB Green™ Ex Taq™ II Kit 试剂盒说明书进行 qRT-PCR 分析。以 U6 为内参, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

miRNAs	引物 (5'-3')
miRNA-142-5p	GCCCTAGAAAGCACTACTAAA
miRNA-3585-5p	TCACAAGCAGGTGTCTTTCAT
miRNA-219a-5p	GCCAAGTCCAAACGCAATTCT
miRNA-122-5p	TGGAGTGTGAAATGGTGTGTTG
miRNA-125b-1-3p	TTACGGGTTAGGCTCTTGGGA
U6	GGAACGATACAGAGAAGATTAGC

2.6 差异表达 miRNA 靶基因的预测、差异表达 miRNA 与靶基因网络的构建

利用 miRanda 算法从 miRNA-mRNA 序列匹配情况及能量稳定性方面综合预测差异表达 miRNA 靶基因。运用 Cytoscape 软件构建差异表达 miRNA 与相应靶基因的网络图。

2.7 统计分析

采用 SPSS 17.0 软件分析数据, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组用独立样本的 t 检验比较。

3 结果

3.1 黄芪-丹参药对对自发性高血压大鼠血压的影响

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠收缩压和舒张压显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 给药后第 2 周, 黄芪-丹参药对组大鼠收缩压显著降低 ($P < 0.05$), 给药后第 3、4 周, 收缩压和舒张压均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.2 黄芪-丹参药对对自发性高血压大鼠肾组织病理变化的影响

如图 1 所示, 对照组可见肾小球体积正常, 系膜区未见明显增生, 系膜基质正常, 未见肾小球硬化, 肾小管上皮细胞形态正常; 模型组可见肾小球体积轻度增大, 分叶明显, 系膜区增生, 系膜基质增多, 伴明显的中性粒细胞及其他炎性细胞浸润, 轻度肾小管萎缩; 黄芪-丹参药对组可见肾小球体积轻度增大, 分叶不明显, 系膜区轻度增生, 伴轻度中性粒细胞和其他炎性细胞浸润。

表 2 黄芪-丹参药对对自发性高血压大鼠血压的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)Table 2 Effect of *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herbal pair on blood pressure of spontaneously hypertensive rats ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	血压类型	血压/mm Hg				
			给药前	给药后第 1 周	给药后第 2 周	给药后第 3 周	给药后第 4 周
对照	—	收缩压	132.89±11.42	132.17±10.76	131.25±10.12	130.69±9.96	129.45±8.76
		舒张压	109.41±10.17	106.78±11.32	104.65±9.93	102.89±9.57	100.18±10.08
模型	—	收缩压	198.76±5.72 ^{##}	196.89±5.98 ^{##}	194.37±4.97 ^{##}	192.63±4.68 ^{##}	191.75±5.05 ^{##}
		舒张压	171.38±6.64 ^{##}	169.12±5.43 ^{##}	166.54±6.12 ^{##}	164.19±5.36 ^{##}	163.07±4.91 ^{##}
药对	3.4	收缩压	199.24±4.46	190.63±3.98	183.92±4.09 ^{*△}	179.12±4.14 ^{**△△}	173.42±4.96 ^{**△△}
		舒张压	170.57±5.48	165.88±7.12	161.77±6.34	158.48±5.96 ^{*△}	150.17±6.99 ^{**△△}

与同组给药前比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与对照组同时间比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组同时间比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ (1 mm Hg=133 Pa)

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs same group before administration; ^{##} $P < 0.01$ vs control group at the same time; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group at the same time (1 mm Hg = 133 Pa)

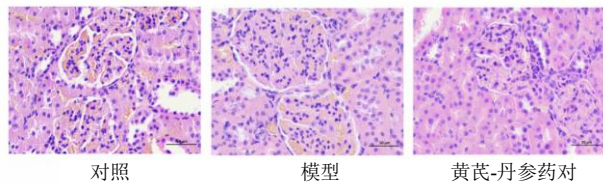


图 1 黄芪-丹参药对对自发性高血压大鼠肾组织病理变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effect of *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herbal pair on kidney pathological changes of spontaneously hypertensive rats (HE, ×100)

3.3 各组大鼠肾组织差异表达 miRNA 分析

如图 2、3 所示, 与对照组比较, 模型组筛选得到 115 个差异表达 miRNA, 其中 68 个 miRNA 上调、47 个 miRNA 下调, 最具显著性差异的 miRNA 为 *miR-219a-2-3p*; 与模型组比较, 黄芪-丹参药对组筛选得到 91 个差异表达 miRNA, 其中 67 个 miRNA 上调、24 个 miRNA 下调, 最具显著性差异的 miRNA 为 *miR-874-5p*。

如表 3 所示, *miR-219a-5p*、*miR-3585-5p*、*miR-142-5p* 在模型组表达上调, 而在黄芪-丹参药对组表达下调, 推测这 3 个基因的表达可能与黄芪-丹参药对的调控作用相关, 因此将其作为后续研究的筛选靶点。

3.4 差异表达 miRNA 的 qRT-PCR 验证

如图 4 所示, 各组大鼠肾组织 *miRNA-142-5p*、*miRNA-3585-5p*、*miRNA-219a-5p*、*miRNA-122-5p* 和 *miRNA-125b-1-3p* mRNA 相对表达量与 miRNA 测序结果趋势一致, 提示 miRNA 测序结果真实可靠, 可用于进一步的深层次数据分析。

3.5 差异表达 miRNA 的功能分析

miRNA 不编码蛋白质, 但可通过调控 mRNA

发挥作用, 因此, 本研究通过对 miRNA 靶基因的预测, 使用基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析分别对靶基因进行富集, 以探讨 miRNA 在细胞内的潜在调控作用。GO 功能分析包括细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 和生物过程 (biological process, BP) 3 个部分^[11]。

如图 5 所示, 与对照组相比, 模型组 GO 功能富集程度最高的分别为阴离子跨膜转运、突触前、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性。与模型组相比, 黄芪-丹参药对组 GO 功能富集程度最高的分别为 Ras 蛋白信号转导、囊泡膜、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性。

KEGG 分析结果如图 6 所示, 与对照组相比, 模型组差异表达 miRNA 靶基因主要富集在哺乳动物雷帕霉素靶点 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、自噬、腺苷酸激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 信号通路、FoxO 信号通路、转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β) 信号通路等途径。与模型组相比, 黄芪-丹参药对组差异表达 miRNA 靶基因主要富集在 MAPK 信号通路、mTOR 信号通路、自噬、AMPK 信号通路、TGF-β 信号通路、Ras 信号通路等途径。

3.6 差异表达 miRNA 与靶基因网络的构建

构建各组间差异表达 miRNA 和其靶基因的局部网络图见图 7, 以确定 2 种类型基因间的功能性相互作用, 为进一步阐明黄芪-丹参药对改善高血压

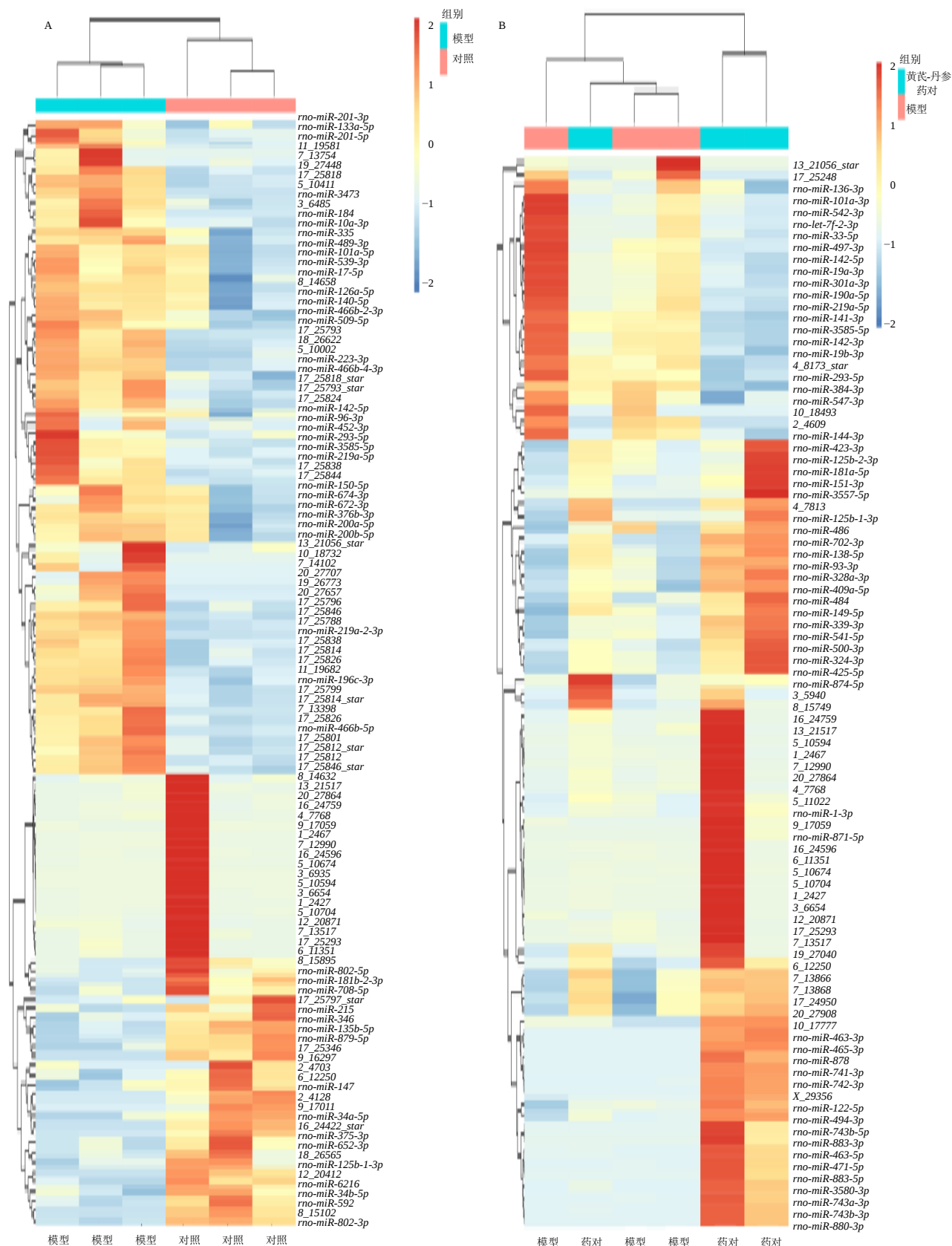


图 2 模型组与对照组比较 (A)、黄芪-丹参药对组与模型组比较 (B) 肾组织差异表达 miRNA 的热图

Fig. 2 Heat map of differential expression miRNA of kidney tissue in comparison between model group and control group (A), comparison between Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma herbal pair group and model group (B)

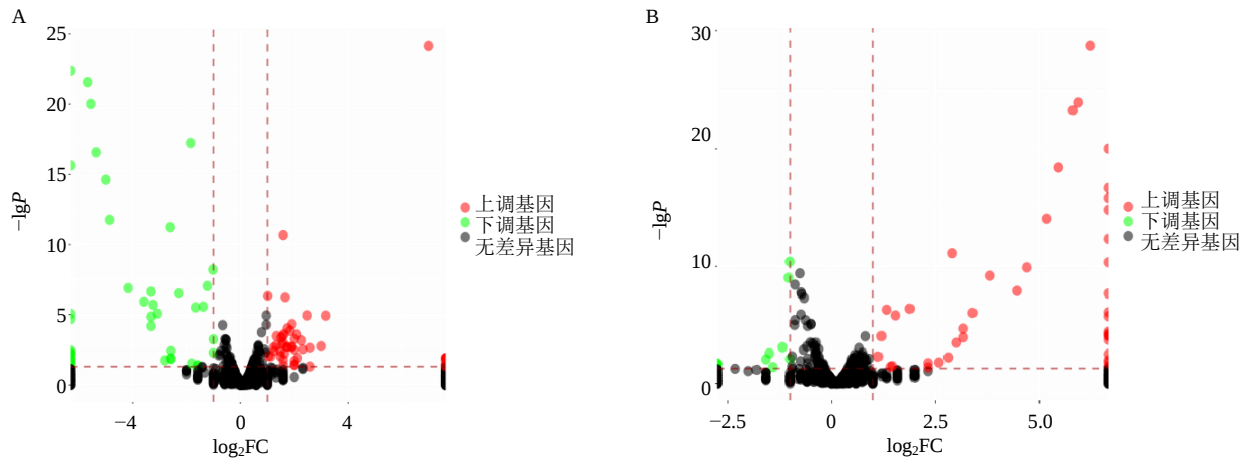


图 3 模型组与对照组比较 (A)、黄芪-丹参药对组与模型组比较 (B) 肾组织差异表达 miRNA 的火山图

Fig. 3 Volcano map of differential expression miRNA of kidney tissue in comparison between model group and control group (A), comparison between *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herbal pair group and model group (B)

表 3 各组大鼠肾组织差异表达 miRNA

Table 3 Analysis of differentially expressed miRNA in kidney of rats in each group

模型组 vs 对照组			黄芪-丹参药对组 vs 模型组		
差异 miRNA	P 值	FC	差异 miRNA	P 值	FC
miR-219a-2-3p	7.14×10^{-25}	127	miR-874-5p	0.031 304 297	2.75
miR-466b-2-3p	0.012 522 193	4.333 333 333	miR-702-3p	0.035 273 306	2.666 666 667
miR-219a-5p	0.017 459 335	3	miR-122-5p	4.99×10^{-7}	2.496 183 206
miR-3585-5p	0.002 117 97	2.333 333 333	miR-1-3p	8.99×10^{-5}	2.301 587 302
miR-142-5p	0.003 815 719	1.531 687 452	miR-484	0.004 801 115	2.172 413 793
miR-135b-5p	5.80×10^{-12}	0.163 934 426	miR-219a-5p	0.008 236 482	0.333 333 333
miR-879-5p	0.014 483 243	0.166 666 667	miR-497-3p	0.002 565 926	0.352 941 176
miR-181b-2-3p	0.003 674 443	0.166 666 667	miR-3585-5p	0.000 780 65	0.440 476 19
miR-802-3p	5.87×10^{-18}	0.278 276 481	miR-19a-3p	9.56×10^{-10}	0.487 243 831
miR-346	0.030 379 039	0.285 714 286	miR-142-5p	4.00×10^{-11}	0.498 504 487

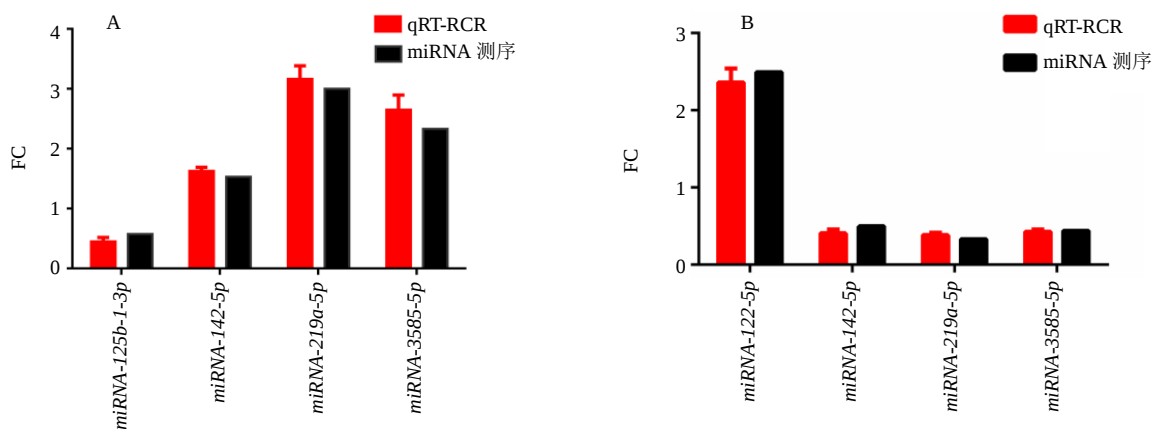


图 4 模型组与对照组比较 (A)、黄芪-丹参药对组与模型组比较 (B) 差异表达 miRNA 的 qRT-PCR 验证

Fig. 4 qRT-PCR verification of differentially expressed miRNA in comparison between model group and control group (A), comparison between *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herbal pair group and model group (B)

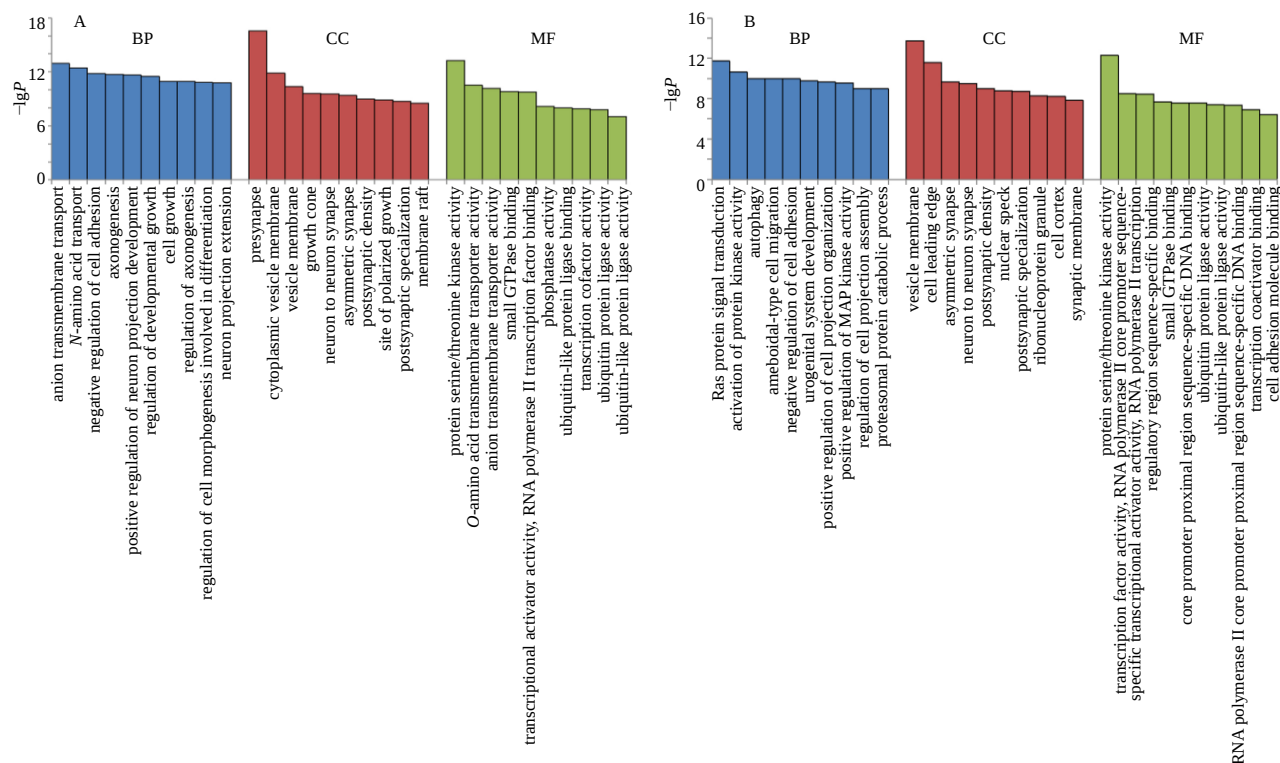


图 5 模型组与对照组比较 (A)、黄芪-丹参药对组与模型组比较 (B) 差异表达 miRNA 靶基因的 GO 功能富集分析 (前 10)
Fig. 5 GO function enrichment analysis of differentially expressed miRNA target genes in comparison between model group and control group (A), comparison between *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herbal pair group and model group (B) (top 10)

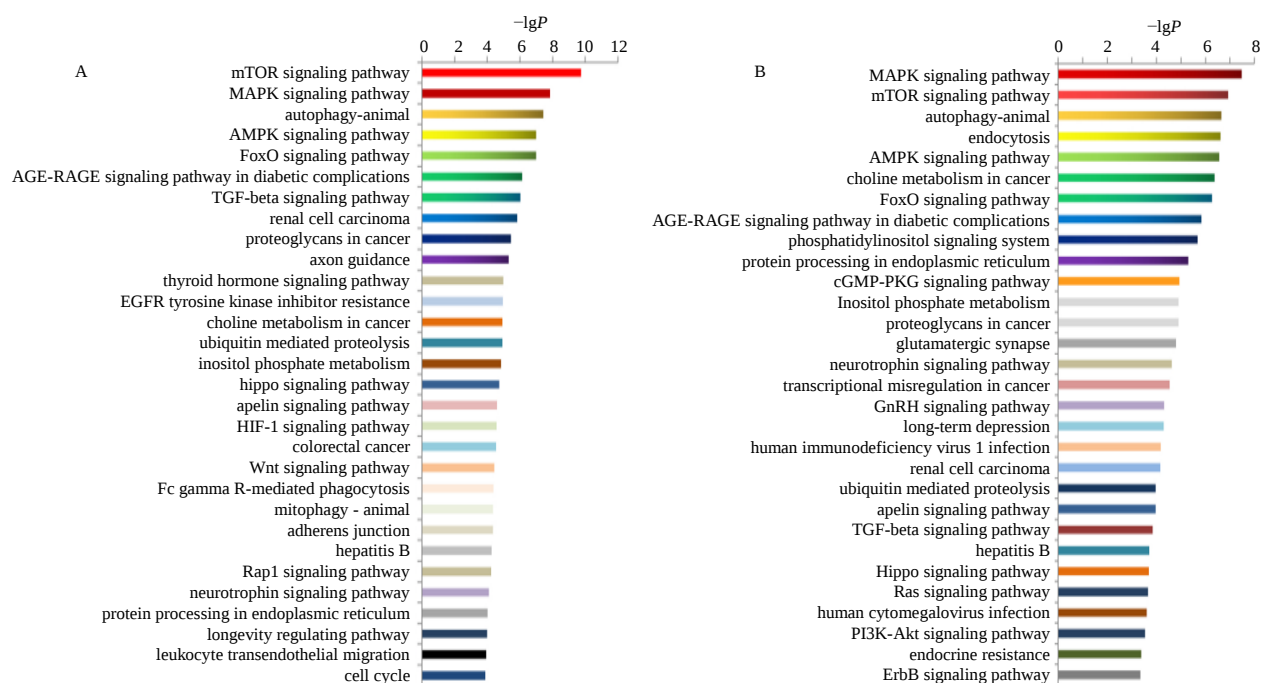
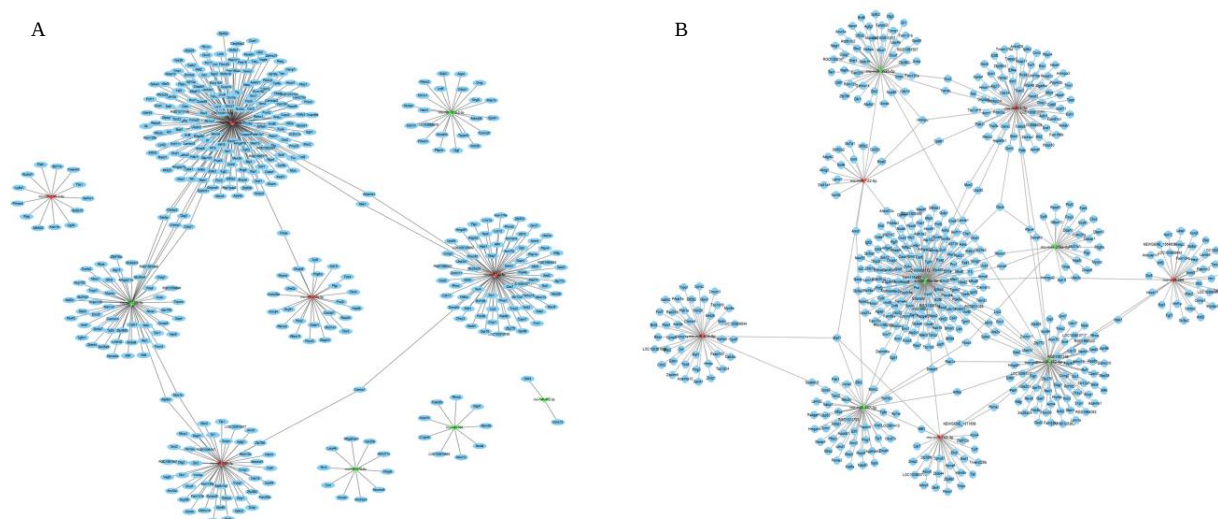


图 6 模型组与对照组比较 (A)、黄芪-丹参药对组与模型组比较 (B) 差异表达 miRNA 靶基因的 KEGG 通路富集分析 (前 30)
Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed miRNA target genes in comparison between model group and control group (A), comparison between *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herbal pair group and model group (B) (top 30)



红色表示上调的 miRNA 基因, 绿色表示下调的 miRNA 基因, 蓝色表示被 miRNA 靶向调控的 mRNA

Red indicates up-regulated miRNA genes, green indicates down-regulated miRNA genes, blue indicates mRNA targeted and regulated by miRNA

图 7 模型组与对照组比较 (A)、黄芪-丹参药对组与模型组比较 (B) 差异表达 miRNA 与靶基因的网络图

Fig. 7 Network diagram of differentially expressed miRNA and target genes in comparison between model group and control group (A), comparison between *Astragali Radix* and *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* herbal pair group and model group (B)

肾损害的作用机制提供依据。

4 讨论

持续稳定的高血压可诱发肾脏血流动力学改变, 直接造成肾脏的组织病理变化, 使肾小动脉管壁增厚、管腔狭窄, 引发肾小球硬化、肾小管萎缩及肾间质纤维化, 进而影响肾功能, 因此, 血压控制的稳定在一定程度上影响患者进入 ESRD 的时间和速度, 早期发现并诊断对高血压肾损害患者的治疗和预后起至关重要的作用。肾活检虽是诊断疾病的金标准, 但不常作为观察高血压肾损害患者病情动态变化的直接方法, 寻找非创性生物标志物是高血压肾损害等肾脏疾病的研究目标。

miRNA 作为关键上游基因, 在促进或抑制高血压肾损害的发生发展中发挥重要作用。本研究 miRNA 高通量测序结果显示, 模型组与对照组的 miRNA 表达谱存在差异, 在筛选出的 115 个差异表达 miRNA 中, 68 个表达上调、47 个表达下调, 其中与对照组比较, 模型组 *miRNA-142-5p*、*miRNA-219a-5p*、*miRNA-3585-5p* 表达在 miRNA 测序和 qRT-PCR 验证中均上调。*miRNA-142-5p* 可通过靶向调控信号淋巴细胞活化分子相关蛋白 (SLAM-associated protein, SAP)、CD84 抑制 T 细胞过度活化, 间接影响 B 细胞的抗体生成, 其表达水平与狼疮性肾炎的活动性密切相关^[12]。在氧化低

密度脂蛋白的刺激下, 高表达的 *miRNA-142* 还可促进高脂血症及动脉粥样硬化的发展进程^[13]。*miRNA-219-5p* 被证实可以靶向结合 E-钙黏蛋白并下调其表达水平, 诱导上皮间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT), 进而影响器官纤维化的发生^[14]。目前尚缺乏关于 *miRNA-3585-5p* 的详尽报道。本研究发现, 经黄芪-丹参药对干预后, 模型组大鼠上述 3 个基因表达水平均显著下调, 提示 *miRNA-142-5p*、*miRNA-219a-5p*、*miRNA-3585-5p* 可能是黄芪-丹参药对延缓高血压肾损害进程的直接靶点。

利用 GO 的结构功能体系, 把参与同样功能或通路的基因进行分类, 对研究高血压肾损害的发生发展机制有重要意义。本研究 GO 功能富集分析发现, 与高血压肾损害相关的 GO 条目集中在阴离子跨膜转运、L-氨基酸转运、细胞生长、缺氧应答、囊泡膜、细胞质囊泡膜、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、L-氨基酸跨膜转运蛋白活性、小三磷酸鸟苷 (guanosine triphosphate, GTP) 酶结合等方面, 提示由于高血压引起机体内环境的紊乱, 使细胞质、囊泡膜等成分变化, 影响机体缺氧应答、离子转运、细胞内信号转导及电解质平衡, 致使机体能量代谢异常。KEGG 通路分析显示, 模型组差异表达 miRNA 的靶基因主要富集于 mTOR、MAPK、自噬、

AMPK 及 TGF- β 信号通路等。mTOR 是一种进化上相对保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其信号通路的激活可调节肾脏细胞内的自噬水平、氧化应激及炎症反应,使肾脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)生成增加,促进肾脏纤维化^[15];此外, mTOR 通路还参与氨基酸、葡萄糖及脂质的代谢。MAPK 通路是真核细胞介导细胞外信号到细胞内反应的重要信号转导系统,在慢性肾衰竭模型大鼠中, MAPK 信号通路被激活, p38 MAPK、胞外信号调控激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase1/2 , ERK1/2)、c-Jun-N-末端激酶(c-Jun-N-terminal kinase, JNK) 蛋白的磷酸化水平升高, 促进肾小管上皮 EMT, 加重肾纤维化的程度^[16]。AMPK 通路是细胞内能量的开关, 高血压状态下局部肾组织的缺血缺氧可使 AMPK 通路激活, 进而调控细胞内的能量、糖、脂及蛋白质代谢; AMPK 通路可抑制 mTOR 通路, 增强细胞自噬, 参与高血压肾损害病理进程的调控^[10]。TGF- β 是公认的促肾纤维化细胞因子, 可直接增强肾小管上皮 EMT, 引起 ECM 异常堆积, 使肾小球基底膜增厚, 促进肾脏纤维化^[17-18]。综合黄芪-丹参药对组差异表达 miRNA 靶基因的 KEGG 通路富集分析结果, 推测黄芪-丹参药对可能通过调节筛选出的差异表达 miRNA, 调控相关信号通路, 从而发挥延缓高血压肾损害进程的作用。

近年来, 随着精准医疗和大数据时代的蓬勃发展以及基因芯片、高通量测序等生物技术的广泛应用, 与多种疾病发生、发展、诊治及预后相关的特定 miRNA 日益被发掘并予以鉴定, 从而为阐明疾病的作用机制和调控网络提供新思路。本研究通过分别对对照组、模型组及黄芪-丹参药对组大鼠肾组织进行 miRNA 测序, 构建各组间差异 miRNA 的表达谱, 并预测相应的靶基因; 应用生物信息学技术系统分析, 筛选与黄芪-丹参药对干预高血压肾损害密切相关的 miRNA 靶点及调控通路, 为高血压肾损害的机制研究和防治提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 《中国高血压防治指南》修订委员会. 中国高血压防治指南 (2018 年修订版) [J]. 心脑血管病防治, 2019, 19(1): 1-44.
- [2] Huo K G, Richer C, Berillo O, et al. miR-431-5p knockdown protects against angiotensin II-induced

hypertension and vascular injury [J]. *Hypertension*, 2019, 73(5): 1007-1017.

- [3] Huang Y Q, Tang S T, Huang C, et al. Circulating miRNA29 family expression levels in patients with essential hypertension as potential markers for left ventricular hypertrophy [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2017, 39(2): 119-125.
- [4] Conserva F, Barozzino M, Pesce F, et al. Urinary miRNA-27b-3p and miRNA-1228-3p correlate with the progression of kidney fibrosis in diabetic nephropathy [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 11357.
- [5] 王雁, 姜月华, 李伟. microRNA 在高血压肾损害中的研究进展 [J]. 中华高血压杂志, 2017, 25(2): 141-144.
- [6] Zhong B, Qin Z Q, Zhou H, et al. microRNA-505 negatively regulates HMGB1 to suppress cell proliferation in renal cell carcinoma [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9): 15025-15034.
- [7] 韩聪, 姜月华, 李伟. 黄芪-丹参药对改善高血压肾损害的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(12): 214-220.
- [8] 侯广建, 李伟, 赵蒙, 等. 黄芪-丹参药对通过改善肾脏血流对自发性高血压大鼠肾脏保护机制的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(3): 645-647.
- [9] 韩聪, 姜月华, 李伟, 等. 基于 16S rDNA 测序技术探索黄芪-丹参药对干预自发性高血压大鼠肠道菌群的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(5): 2233-2237.
- [10] 赵蒙. 黄芪-丹参药对改善自发性高血压大鼠肾脏损害的药效学观察及与 AMPK 通路相关性作用机制的研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [11] The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D330-D338.
- [12] Ding S, Liang Y S, Zhao M, et al. Decreased microRNA-142-3p/5p expression causes CD4⁺ T cell activation and B cell hyperstimulation in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(9): 2953-2963.
- [13] 张红娜. MiRNA142-3P 在内皮细胞氧化导致动脉粥样硬化过程中的表达 [D]. 大连: 大连医科大学, 2014.
- [14] 朱理辉, 罗勇, 廖文秋, 等. MicroRNA-219-5p 靶向 E-钙黏蛋白调控上皮间质转化抑制肝癌细胞侵袭转移 [J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(18): 22-29.
- [15] 黎池健, 黄玉香, 许伟成, 等. mTOR 信号通路在糖尿病肾病发病机制中作用的研究进展 [J]. 生命科学, 2019, 31(3): 284-288.
- [16] 汪卫红, 许烨, 李志明, 等. 黄芪水提物对慢性肾功能衰竭模型大鼠的改善作用及其对 MAPK 信号通路的影响 [J]. 中国药房, 2019, 30(10): 1386-1392.
- [17] 窦芳, 丁一, 姚敏娜, 等. 大黄素通过激活自噬对 TGF- β 1 诱导的 HK-2 细胞纤维化因子的影响 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(11): 1555-1559.
- [18] Song M K, Lee J H, Ryoo I G, et al. Bardoxolone ameliorates TGF- β 1-associated renal fibrosis through Nrf2/Smad7 elevation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 138: 33-42.

[责任编辑 李亚楠]