

新肾病 1 号方调控 miR-199b-5p 抑制肾小管上皮间充质转化改善肾纤维化的作用研究

曾聪聪¹, 俞文秀², 王成功², 姜程曦³, 程锦国^{1*}

1. 温州医科大学附属第一医院 中医科, 浙江 温州 325000

2. 温州医科大学, 浙江 温州 325000

3. 温州医科大学药学院, 浙江 温州 325000

摘要: 目的 研究 miR-199b-5p 在新肾病 1 号方抗肾纤维化中的作用。方法 36 只大鼠随机分为假手术组、模型组及新肾病 1 号方低、中、高剂量 (9.69、19.38、38.76 g/kg) 组和氯沙坦 (50 mg/kg) 组, 每组 6 只。除假手术组外, 其余各组采用左侧单侧输尿管梗阻方法建立大鼠肾纤维化模型, 给予药物干预 14 d 后, 检测各组大鼠肾功能; 苏木素-伊红 (HE) 和 Masson 染色观察肾脏组织病理变化; 对假手术组、模型组和新肾病 1 号方高剂量组大鼠肾脏组织进行 miRNA 测序, 筛选差异表达 miRNAs, qRT-PCR 验证, 并进行靶基因的基因本体 (gene ontology, GO) 功能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, 生物信息学分析 miRNAs 与上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)、肾纤维化的关联性。免疫荧光法和 Western blotting 检测肾组织 EMT 相关蛋白表达情况。结果 与模型组比较, 新肾病 1 号方组大鼠血清肌酐 (serum creatinine, SCr) 和血清尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肾组织病理变化有所改善。miRNA 测序分析发现, miR-199b-5p 在模型组表达上调, 而在新肾病 1 号方高剂量组表达下调, qRT-PCR 验证了其 mRNA 相对表达量与测序结果基本一致; miR-199b-5p 的靶基因中与 EMT、肾纤维化相关功能的 90 个。与模型组比较, 新肾病 1 号方组肾组织中 EMT 相关蛋白 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 和波形蛋白 (Vimentin) 表达下调 ($P < 0.05$ 、 0.001), E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 和紧密连接蛋白-1 (Zonula occludens-1, ZO-1) 表达上调 ($P < 0.05$)。结论 新肾病 1 号方可能通过下调 miR-199b-5p 表达, 抑制 EMT, 从而发挥抗肾纤维化的作用。

关键词: 新肾病 1 号方; 上皮间充质转化; 肾纤维化; RNA 测序; miR-199b-5p; 柴胡皂苷; 黄芪甲苷; 盐酸小檗碱

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)05-1600-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.05.018

Improved-Nephropathy Formula 1 inhibits epithelial mesenchymal transformation of renal tubular and improves renal fibrosis by regulating miR-199b-5p

ZENG Congcong¹, YU Wenxiu², WANG Chenggong², JIANG Chengxi³, CHENG Jinguo¹

1. Department of Traditional Chinese Medicine, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

2. Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

3. School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

Abstract: Objective To investigate the role of miR-199b-5p in the treatment of anti-renal fibrosis of Improved-Nephropathy Formula 1 (新肾病 1 号方, N1F). **Methods** A total of 36 rats were randomly divided into sham group, model group, N1F low-, medium- and high-dose (9.69, 19.38, 38.76 g/kg) groups and losartan (50 mg/kg) group, with six rats in each group. Except the sham group, renal fibrosis model was established by left unilateral ureteral obstruction method in the other groups. After 14 d of drug intervention, renal

收稿日期: 2023-11-02

基金项目: 浙江省科学技术厅研发攻关计划立项项目 (2022C03160); 全国名老中医药专家学术传承工作室项目 (国中医药办人教函 [2021]270 号)

作者简介: 曾聪聪 (1990—), 博士研究生, 研究方向为中药治疗肾脏病。E-mail: zengcongcong1990@126.com

*通信作者: 程锦国, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合治疗肾病研究。E-mail: wsjcg@126.com

function was detected in each group of rats. The pathological changes of renal tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. Renal tissues of rats in sham group, model group and N1F high-dose group were sequenced by miRNA, screened for differentially expressed miRNAs and verified by qRT-PCR, gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of target genes were performed. The correlation between miRNAs and epithelial-mesenchymal transition (EMT) and renal fibrosis was analyzed by bioinformatics. The expressions of EMT-related proteins in renal tissue were detected by immunofluorescence and Western blotting. **Results** Compared with model group, serum creatinine (SCr) and blood urea nitrogen (BUN) levels were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), the pathological changes of renal tissue were improved in N1F groups. miRNA sequencing analysis showed that the expression of miR-199b-5p was up-regulated in model group, but down-regulated in N1F high-dose group. qRT-PCR verified that the relative mRNA expression level was basically consistent with the sequencing results. A total of 90 target genes in miR-199b-5p were related to EMT and renal fibrosis. Compared with model group, the expressions of EMT-related proteins α -smooth muscle actin (α -SMA) and Vimentin in renal tissue were down-regulated ($P < 0.05, 0.001$), but the expressions of E-cadherin and Zonula occludens-1 (ZO-1) were up-regulated in N1F groups ($P < 0.05$). **Conclusion** N1F may inhibit EMT by down-regulating the expression of miR-199b-5p, and play an anti-renal fibrosis role.

Key words: Improved-Nephropathy Formula 1; epithelial mesenchymal transformation; renal fibrosis; RNA sequencing; miR-199b-5p; saikosaponin; astragaloside A; berberine hydrochloride

慢性肾脏疾病 (chronic renal disease, CKD) 作为全球健康面临的一大难题,其发病率呈上升趋势,已成为常见的死亡原因^[1]。肾纤维化作为一种慢性病理过程,是 CKD 进展的主要病理特征。在 CKD 的早期阶段,肾纤维化主要表现为肾小球硬化和肾小管间质纤维化,随着病情的进展,肾纤维化程度逐渐加重,最终导致肾功能衰竭^[2]。因此,肾纤维化在 CKD 的进展中起着关键作用,为疾病的预后和诊断提供了重要指标。然而肾纤维化进展的机制尚未完全阐明,临床治疗肾纤维化仍缺乏有效的方法。

越来越多的证据表明,肾小管上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肾间质纤维化的关键事件,其特征是成纤维细胞增殖和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 产生与降解之间的不平衡。在 CKD 的发展过程中,肾小管细胞通过 EMT 途径转化为间充质细胞,这一过程伴随着纤维化的发生。EMT 不仅参与了肾纤维化的形成,还通过旁分泌机制进一步加剧了纤维化的进程^[3-4]。因此,抑制肾小管细胞的 EMT 可能是一种潜在的治疗策略,有助于延缓或逆转肾纤维化,从而改善 CKD 的预后。

MicroRNAs (miRNAs) 是一类非编码 RNA,它们在多种生物进程的转录后水平调节中发挥作用^[5]。近年来,miRNAs 在肾小管 EMT 中的作用也逐渐被重视。如 miR-21、miR-29、miR-30 等可以通过调节与 EMT 相关的基因 (如 Snail、Slug、Twist 等) 的表达水平,影响肾小管上皮细胞的形态、结构和功能^[6-8]。miRNA 除可以正向或负向影响肾小

管上皮间质转化,还可通过直接结合到靶基因的 3'-UTR 区,抑制或促进靶基因的表达^[9]。此外,miRNA 还可以通过影响信号转导通路的活性^[10],影响 EMT 的进展。

研究发现,糖尿病肾病患者血清 miR-199b-5p 水平升高,提示其参与了肾脏疾病的发生发展^[11];雷伟等^[12]发现 miR-199b-5p 在脂多糖诱导的大鼠肾小管上皮细胞损伤中表达升高;miR-199b-5p 还通过激活周期蛋白依赖性激酶 9 (cyclin-dependent kinases 9, CDK9) /Smad3 轴促进心肌纤维化^[13];此外,miR-199b-5p 在多种肿瘤 EMT 进程中表达下调^[14-15]。但关于 miR-199b-5p 在肾小管 EMT 及肾纤维化进程中的研究甚少,因此,进一步探究 miR-199b-5p 在肾脏纤维化中的作用和调控机制,将为开发新的治疗方法提供更多思路。

新肾病 1 号方 (Improved-Nephropathy Formula 1, N1F) 是第六批全国老中医药专家学术经验继承工作项目指导老师程锦国治疗慢性肾纤维化的经验方,临床疗效良好,前期实验研究了其抗肾纤维化的作用^[16-17],但能否通过影响 miRNAs 表达发挥对肾纤维化的治疗作用尚未见报道。故本项目以中医临床疗效确实的中药复方 N1F 为研究对象,旨在观察 N1F 调控 miR-199b-5p、抑制肾小管 EMT、发挥抗肾纤维化的作用,探讨治疗肾纤维化的新靶点。

1 材料

1.1 动物

36 只 SPF 级雄性大鼠,体质量 (200±20) g,购自浙江维通利华实验动物有限公司,许可证号

SYXK (浙) 2021-0020。所有大鼠均安置在 SPF 环境中, 温度 20~25 °C, 相对湿度 40%~70%, 12 h 光照和黑暗循环, 适应性喂养 1 周。动物实验经温州医科大学动物实验伦理委员会批准 (批准号 wydw2022-0633)。

1.2 药材

N1F 由温州医科大学附属第一医院中药房提供, 由黄芪 30 g、鳖甲 12 g、猫人参 30 g、三七 12 g、附子 6 g、土鳖虫 15 g、党参 30 g、柴胡 12 g、桂枝 12 g、制大黄 6 g、黄柏 10 g、片姜黄 12 g、铁树叶 30 g 组成, 经温州医科大学附属第一医院中药房陈晓城副主任分别鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根、鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 的背甲、猕猴桃科猕猴桃属植物对萼猕猴桃 *Actinidia valvata* Dunn 的根、五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎、毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx 的子根的加工品、鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker、桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 的干燥根、伞形科植物柴胡的干燥根 *Bupleurum chinense* DC.、樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝、蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根和根茎、芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮、姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的干燥根茎和苏铁科植物苏铁 *Cycas revolute* Thunb. 的干燥叶。课题组采用 UPLC-Q-TOF-MS 对 N1F 水煎剂的成分进行了分析, 鉴定出其水提取物含有 97 种化学成分。N1F 中以柴胡皂苷、黄芪甲苷和盐酸小檗碱, 质量浓度分别为 0.024、0.117、0.032 mg/mL。

1.3 药品与试剂

氯沙坦钾片 (国药准字 J20180006, 批号 0037482) 由浙江华海药业股份有限公司生产, 购自温州医科大学附属第一医院; 逆转录试剂盒 (批号 RR036A)、TB Green Premix EX Taq™ II 试剂盒 (批号 RR820A) 购自日本 Takara 公司; 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (批号 G1340)、Masson 染色试剂盒 (批号 G1120) 购自北京索莱宝科技有限公司; 大鼠血清肌酐 (serum creatinine, SCr) 测定试剂盒 (批号 C011-2-1)、大鼠血清尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 测定试剂盒 (批号 C013-2-1) 购自

南京建成生物工程研究所; PVDF 膜 (批号 IPVH00010、ISEQ00010) 购自美国 Millipore 公司; 兔抗波形蛋白 (Vimentin) 抗体 (批号 5741)、兔抗 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (批号 19245) 购自美国 CST 公司; 兔抗 GAPDH 抗体 (批号 ab128915)、兔抗 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 抗体 (批号 ab231303)、兔抗紧密连接蛋白 (Zonula occludens-1, ZO-1) 抗体 (批号 ab96587)、HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 ab205718)、Alexa Fluor® 488 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 150077)、DAPI (批号 ab104139) 购自英国 Abcam 公司。

1.4 仪器

CFX 荧光定量 PCR 仪、165-8001 型电泳仪、转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); TGL-16gR 型低温离心机 (上海安亭科学仪器厂); BSA224S 型电子分析天平 (赛多利斯公司); Spectra Max 190 型全波长酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); JS-M6P 型凝胶成像系统 (上海培清科技生物公司); Histo Core Arcadia 型石蜡包埋机、RM2235 型石蜡切片机 (德国 Leica 公司); TI-S 型倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 肾纤维化模型建立、分组和给药

36 只 SPF 级雄性大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为假手术组、模型组及 N1F 低、中、高剂量 (9.69、19.38、38.76 g/kg, 分别相当于临床剂量的 0.5、1、2 倍^[18]) 组和氯沙坦 (50 mg/kg) 组, 每组 6 只。除假手术组外, 其余 30 只大鼠均行单侧输尿管结扎术, 将动物固定在手术台上, 消毒后, 在腹部正中作 1 个小的切口, 分离出左侧输尿管并将其结扎, 从而造成梗阻。假手术组大鼠仅开腹游离左侧输尿管不结扎。术后第 1 天开始, 每日给药 1 次, 连续 14 d。各给药组每日早晨 ig 相应药物, 假手术组和模型组 ig 等体积蒸馏水。

2.2 生化指标检测

末次给药 2 h 后, 以 1% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) ip 大鼠。提前备好抗凝管, 大鼠麻醉后腹主动脉取血, 血液样本置于抗凝管中, 摇匀, 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, -80 °C 冰箱保存。按照试剂盒说明书检测 SCr 和 BUN 水平。

2.3 肾脏组织病理学变化

取出的肾组织经过固定、脱水、浸蜡、包埋等步骤后, 被切成薄片。然后行 HE 染色、Masson 染色, 于显微镜下观察肾组织的病理学改变。

2.4 大鼠肾组织差异表达 miRNA 的分析

2.4.1 肾组织 RNA 的提取、制备文库和测序 分别从假手术组、模型组和 N1F 高剂量组随机选取 3 只大鼠的肾脏组织,使用 TRIzol 法提取组织样本的总 RNA。实验流程按照 Illumina 公司提供的标准步骤执行,包括制备文库和测序实验。miRNA 测序文库制备采用 TruSeq Small RNA Sample Prep Kits 试剂盒^[9]。文库制备工作完成后,对构建好的文库使用 Illumina Hiseq2000/2500 进行测序,测序读长为单端 50 bp。

2.4.2 基因鉴定与表达分析 此部分实验委托联川生物公司完成。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,对各样本中 miRNA 进行表达量分析,并对表达量进行归一化,得到 norm 值。以差异倍数 (fold change, FC) >2 或 FC < 0.5 (即 |log₂FC| > 1)、P < 0.05 为阈值。使用 edgeR 软件进行差异表达分析,获得不同样本之间的差异表达 miRNA。

2.5 差异表达 miRNA 的 qRT-PCR 验证

选择 miR-199b-5p 这个差异表达 miRNA 进行 qRT-PCR 验证。取各组大鼠 miRNA,使用 TransScriptII All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One-Step gDNA Removal) 反转录试剂盒反转录成 cDNA。根据 TransStart Top Green qPCR SuperMix 试剂盒说明书进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 miRNA 引物序列

miRNA	序列 (5'-3')
<i>rno-miR-199b-5p</i>	F: CGCGCCCACTGTTTACTACT R: AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
<i>U6</i>	F: CTCGCTTCGGCAGCAC R: AACGCTTCACGAATTTGCGT

2.6 miR-199b-5p 靶基因的功能分析

通过 dbEMT、Genecard、String 等数据库对 miR-199b-5p 的靶基因进行富集,包括基因本体 (gene ontology, GO) 功能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。同时,初步筛选 miR-199b-5p 通过 EMT 影响肾纤维化的靶基因。

2.7 免疫荧光染色检测肾组织 α -SMA 及 ZO-1 表达情况

将肾组织样本石蜡包埋、切成薄片,脱蜡、水

化,柠檬酸缓冲液中加热,滴加 3%的 H₂O₂ 孵育 15 min,血清 37 °C 封闭 30 min,分别滴加 α -SMA (1 : 600) 及 ZO-1 (1 : 500) 抗体,4 °C 孵育过夜;滴加荧光二抗 (1 : 800),避光 37 °C 孵育 1 h,DAPI 复染 10 min 后,滴加防荧光淬灭剂封片,利用荧光显微镜进行拍照。

2.8 Western blotting 检测肾组织 α -SMA、Vimentin、E-cadherin 和 ZO-1 蛋白表达

肾组织加入 RIPA 蛋白裂解液和蛋白酶抑制剂,取上清提取总蛋白。使用 BCA 法测定蛋白含量,蛋白样品经 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,用 5%脱脂牛奶封闭 1.5 h,分别加入 α -SMA (1 : 1 000)、Vimentin (1 : 1 000)、E-cadherin (1 : 1 000)、ZO-1 (1 : 2 000) 及 GAPDH (1 : 20 000) 抗体,孵育后洗膜;加入二抗孵育、洗膜,滴加发光液,采用凝胶成像系统拍照,分析条带灰度。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行数据处理和统计学分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析 (One way ANOVA) 法进行多组间差异分析。

3 结果

3.1 N1F 对肾纤维化大鼠肾功能的影响

如表 2 所示,与假手术组比较,模型组大鼠 SCr、BUN 水平均明显升高 (P < 0.01); 与模型组比较,各给药组 SCr、BUN 水平均明显降低 (P < 0.05、0.01),且 N1F 高剂量组作用最佳。

表 2 N1F 对肾纤维化大鼠肾功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 2 Effect of N1F on renal function in rats with renal fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	SCr/(μ mol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)
假手术	—	40.23 ± 3.43	5.57 ± 0.46
模型	—	79.05 ± 3.89**	13.64 ± 2.13**
N1F	9.69	62.98 ± 4.92 [#]	9.32 ± 1.78 [#]
	19.38	63.25 ± 4.43 [#]	8.53 ± 1.28 ^{##}
	38.76	60.10 ± 3.67 ^{###}	7.83 ± 1.31 ^{###}
氯沙坦	0.05	64.10 ± 3.90 [#]	9.31 ± 1.13 [#]

与假手术组比较: **P < 0.01; 与模型组比较: [#]P < 0.05 ^{###}P < 0.01.

**P < 0.01 vs sham group; [#]P < 0.05 ^{###}P < 0.01 vs model group.

3.2 N1F 对肾纤维化大鼠肾脏病理变化的影响

如图 1 所示,假手术组大鼠肾脏结构正常,肾小球、肾小管及间质均无异常改变。与假手术组比较,模型组肾小管上皮细胞出现大量变性坏死,管腔扩张,间质增宽,大量炎性细胞浸润,肾小管萎

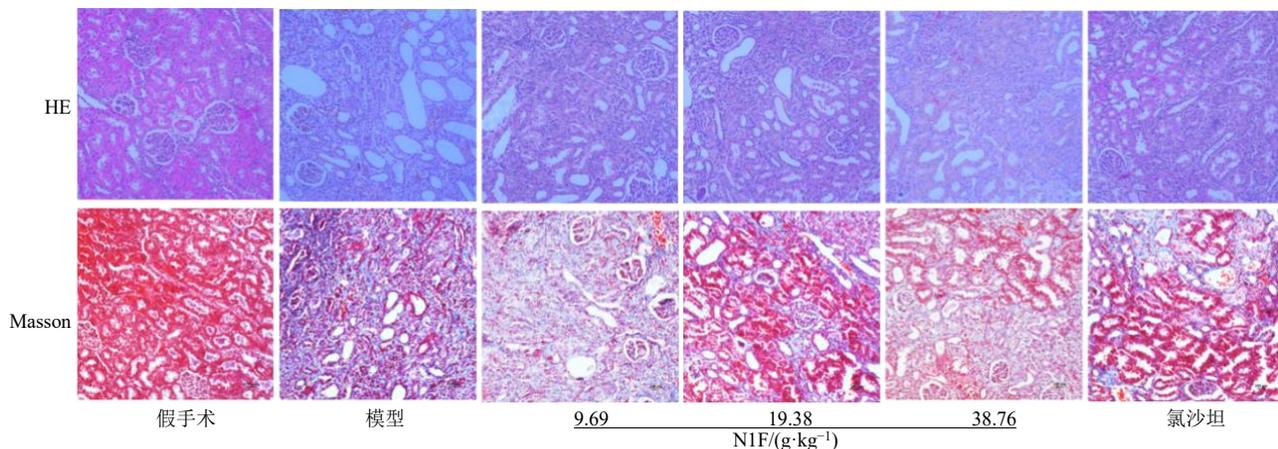


图1 N1F对肾纤维化大鼠肾脏病理变化的影响 (×200)

Fig. 1 Effect of N1F on pathological changes of renal tissue in rats with renal fibrosis (× 200)

缩,肾间质胶原纤维沉积明显增多;与模型组比较,各给药组大鼠肾脏组织的炎性细胞浸润有一定程度减轻,胶原纤维沉积减少,其中N1F高剂量组胶原纤维沉积明显减少。

3.3 基因表达谱变化

如图2和表3所示,与假手术组比较,模型组共筛

选出339个差异表达miRNA,其中218个miRNA下调、121个miRNA上调;与模型组比较,N1F高剂量组共筛选出41个差异表达miRNA,其中39个miRNA下调、2个miRNA上调。其中*rno-miR-199b-5p*、*rno-miR-127-5p*、*rno-miR-103-2-5p*和*rno-PC-3p-39464*在模型组表达上调,而在N1F高剂量组表达下调。

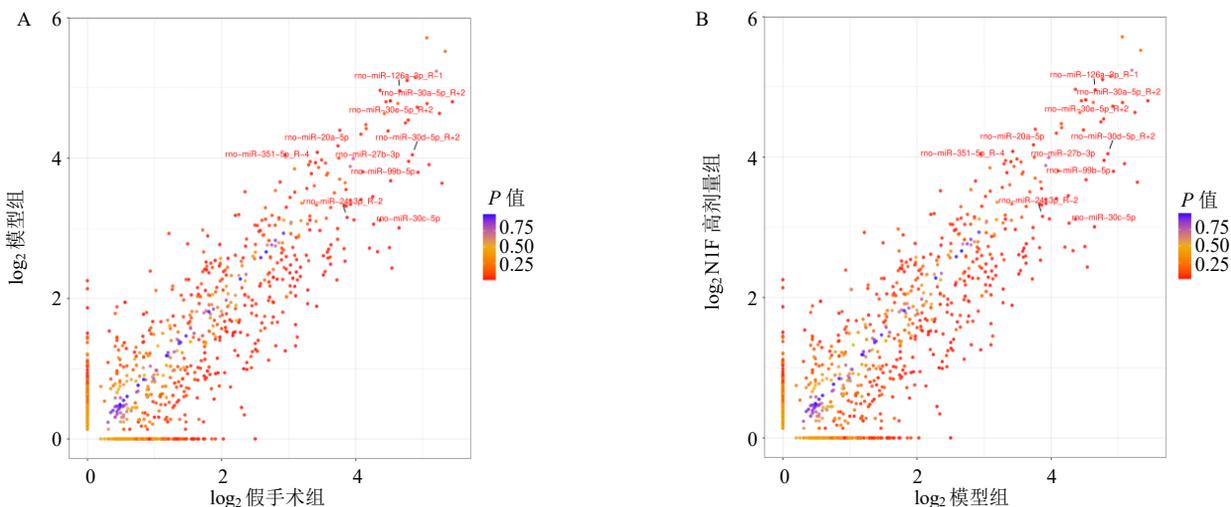


图2 模型组 vs 假手术组 (A)、N1F高剂量组 vs 模型组 (B) 肾脏组织差异表达miRNA的散点图

Fig. 2 Scatter plot of differentially expressed miRNA in renal tissue of model group vs sham group (A), N1F high-dose group vs model group (B)

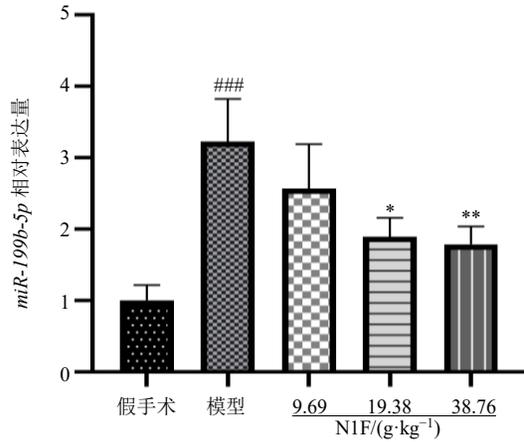
表3 各组大鼠肾组织差异表达的miRNA

Table 3 Differentially expressed miRNA in renal tissue of rats in each group

差异 miRNA	模型组 vs 假手术组		N1F高剂量组 vs 模型组	
	P值	FC	P值	FC
<i>rno-miR-199b-5p</i>	0.032	3.04	4.25	0.028
<i>rno-miR-127-5p</i>	0.046	3.02	0.08	0.041
<i>rno-miR-103-2-5p</i>	0.044	3.03	0.37	0.028
<i>rno-PC-3p-39464</i>	0.012	5.16	0.13	0.047

3.4 miR-199b-5p 差异表达的 qRT-PCR 验证

通过文献查阅^[11-15],miR-199b-5p可能与肾脏病及EMT进程相关,且RNA测序部分提示miR-199b-5p为差异表达miRNA。因此,以miR-199b-5p为研究对象,进行qRT-PCR验证,如图3所示,*miR-199b-5p* mRNA相对表达量的验证结果与测序结果趋势一致,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。



与假手术组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 图 6 同。

*** $P < 0.001$ vs sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below fig. 6.

图 3 miR-199b-5p 的 qRT-PCR 验证 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 qRT-PCR validation of miR-199b-5p ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

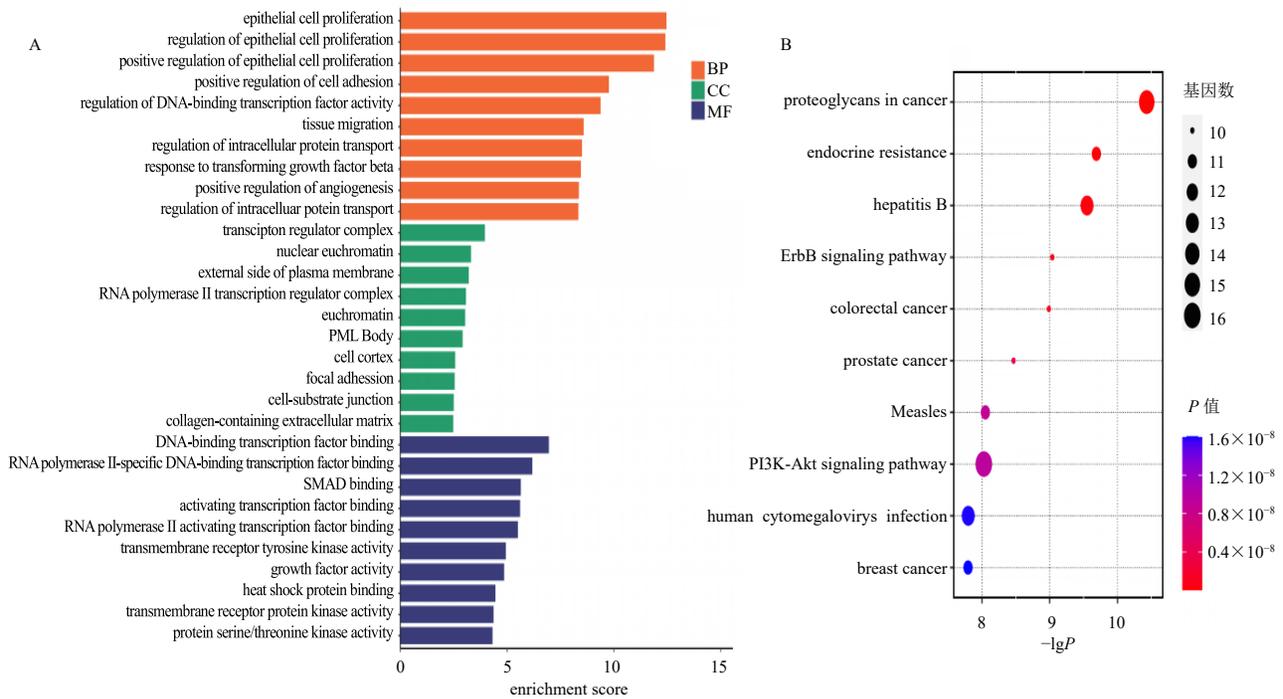


图 4 miR-199b-5p 靶基因的 GO 功能 (A) 和 KEGG 通路 (B) 富集分析

Fig. 4 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis of miR-199b-5p target genes

(表 4)。

3.6 N1F 对肾纤维化大鼠肾组织 EMT 相关蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠肾组织中 ZO-1、E-cadherin 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$), α -SMA 和 Vimentin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组 α -SMA

3.5 miR-199b-5p 的靶基因的功能分析

miR-199b-5p 的 GO 功能富集分析 (图 4-A) 显示, 靶基因主要富集在蛋白连接、细胞迁移、对生长因子的反应、细胞对生长因子刺激的反应、染色质结合、DNA 转录因子结合细胞增殖、凋亡、自噬等条目。KEGG 通路富集分析 (图 4-B) 显示, 主要富集于表皮生长因子受体 2 (receptor tyrosine protein kinase erbB2, ErbB)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、病毒感染及肿瘤等。随后, 对 miR-199b-5p 影响肾纤维化的可能机制 EMT 进行筛选, 结合 TargetsCan 预测和韦恩分析, 鉴定了 miR-199b-5p 靶基因中与 EMT、肾纤维化相关功能的 90 个基因 (图 5); 根据蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 中度值提取排名前 20 名的核心靶点, 并分析其对应的可能作用机制

蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.001$), N1F 中、高剂量组和氯沙坦组 Vimentin 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), N1F 低、中剂量组和氯沙坦组 E-cadherin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。免疫荧光染色结果 (图 7) 与 Western blotting 结果一致, 与假手术组比较, 模型组大鼠肾组织 ZO-1 阳性表达减少, α -SMA 阳性表达增多; 与模型组比较,

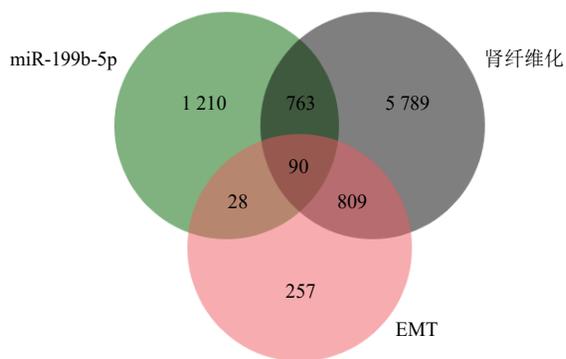


图 5 与 EMT、肾纤维化相关的功能基因筛选

Fig. 5 Screening of functional genes related to EMT and renal fibrosis

表 4 miR-199b-5p 靶基因中与 EMT、肾纤维化相关的功能基因

Table 4 Functional genes related to EMT and renal fibrosis in miR-199b-5p-target genes

靶基因	度值	靶基因	度值
JUN	38	CAV1	18
SIRT3	33	KDR	18
GSK3B	30	YWHAZ	17
SMAD2	25	LEP	17
PI3KCA	24	CXCL12	17
TLR4	23	MYD88	16
BRAF	21	CDKN1B	14
CREBBP	20	STAT5B	14
MAPK8	20	FGFR1	14
MAPK14	19	TSC2	13

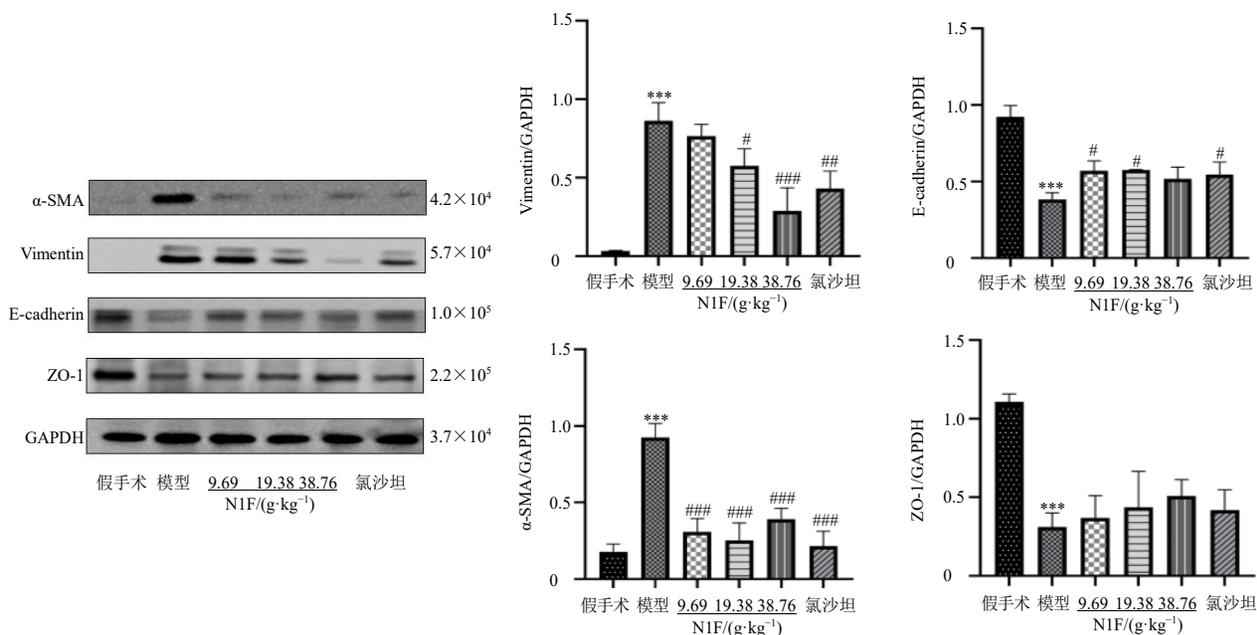


图 6 N1F 对肾纤维化大鼠 EMT 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of N1F on EMT related proteins expressions in rats with renal fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

N1F 各剂量组 ZO-1 阳性表达增多, α -SMA 阳性表达减少。

4 讨论

肾纤维化是一个发展过程, 是所有 CKD 病情进展的共同途径。目前, 对于肾纤维化机制及通路的探讨存在多样性, 随着对肾小管上皮细胞在 CKD 进程中作用的认识加深, 人们已经越来越注意到肾小管 EMT 是肾纤维化非常重要的一个核心。miRNAs 作为参与基因调节的重要分子, 已逐渐被证实在肾小管 EMT 中的作用, 但 miRNAs 数量众多, 筛选出合适的 miRNA, 对 EMT 进行有效调控, 仍需更多的研究工作。

左侧单侧输尿管梗阻法复制肾纤维化动物模型, 具有简单易行、结果可靠的优点, 是经典的制备肾纤维化模型的方法。本研究通过测序发现 miR-199b-5p 在 UUO 大鼠肾组织中显著增加, 并验证了肾纤维化模型中 miR-199b-5p 表达结果与测序一致, 证明 miR-199b-5p 参与了肾纤维化发生发展。本研究进一步发现 N1F 干预后, miR-199b-5p 在模型组大鼠肾组织中表达显著下调, 提示 miR-199b-5p 可能为 N1F 的作用靶点, 筛选到了新的 miRNA, 在一定程度上进一步完善和丰富了肾纤维化的发生机制。

本研究生物信息学预测发现 miR-199b-5p 可通

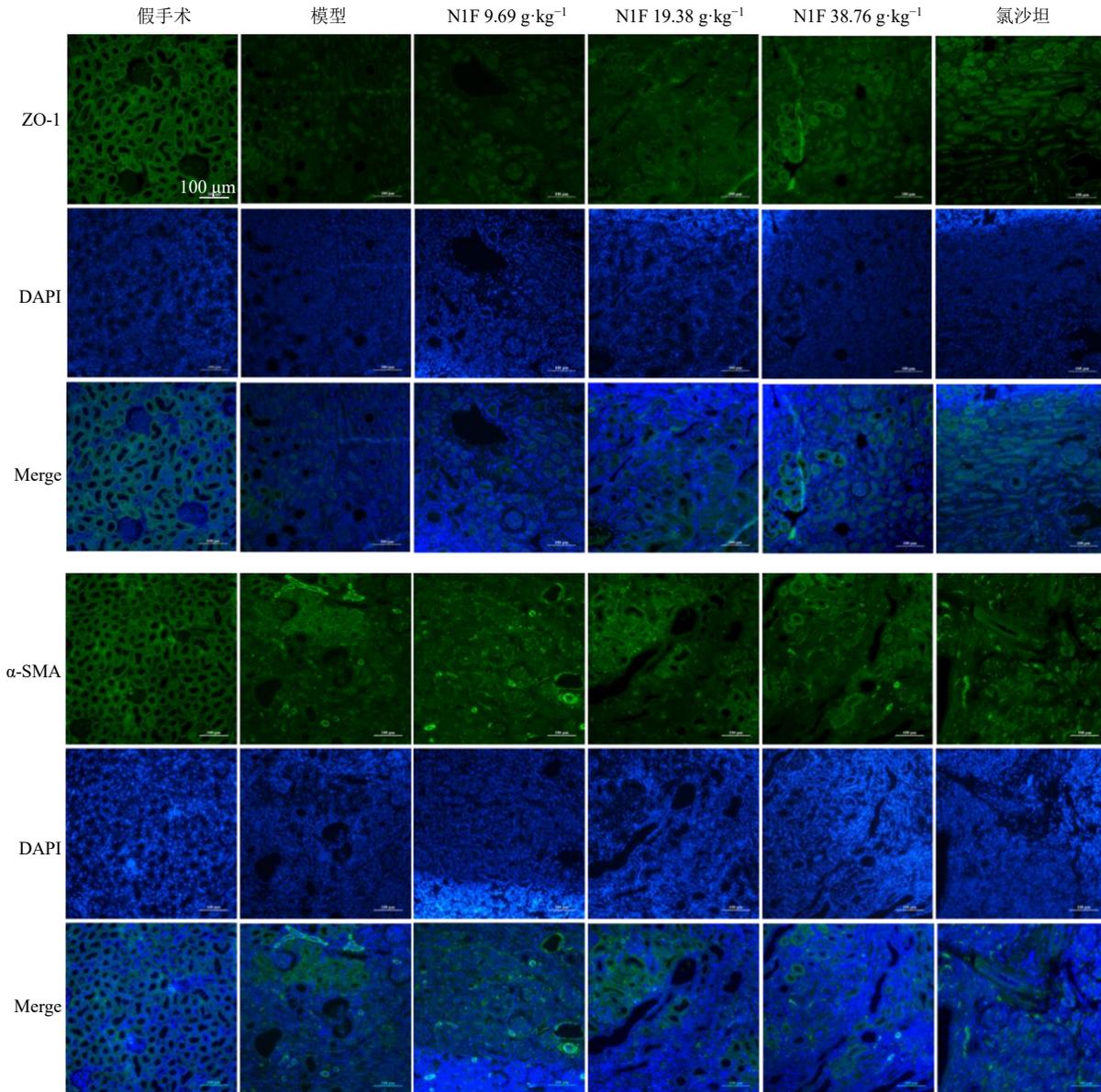


图 7 N1F 对肾纤维化大鼠 EMT 相关蛋白表达的影响 (免疫荧光, $\times 20$)

Fig. 7 Effect of N1F on EMT related proteins expressions in rats with renal fibrosis (immunofluorescence, $\times 20$)

过调控 90 个靶基因介导肾小管 EMT 参与肾纤维化过程。根据实验结果结合进一步文献查阅发现, miR-199b-5p 调控的靶基因 JUN, 其蛋白在肾小球和肾小管处均见表达, 且主要在细胞核处高表达, 但发生肾损伤是时其表达量显著降低^[20], 可能与 JUN 参与细胞增殖、死亡、分化和炎症的调节相关; 去乙酰化酶 3 (sirtuins3, SIRT3) 作为线粒体蛋白乙酰化和代谢稳态的关键调节剂, 在肾纤维化的发生过程中, SIRT3 的去乙酰化修饰作用参与线粒体能量代谢调控, 从而起到抑制肾纤维化的作用^[21], 这表明 SIRT3 可能是肾纤维化过程中的一个重要靶基因。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated

protein kinase, MAPK) 家族 (包括 MAPK8、MAPK14 等) 在体内多种氧化应激和炎症反应过程中具有重要调控作用, 肾脏组织可以广泛表达 MAPK^[22], 从而加快肾纤维化进程; PI3K 信号通路是一个经典的抗凋亡、促存活的信号转导途径, 已被证实是糖尿病肾病发病过程中的一条重要信号通路, 与系膜基质增生、足细胞损伤等具有密切的联系, 加速肾纤维化的进程^[23]。当然还有更多的靶基因值得深入研究。本研究结果显示模型组大鼠肾脏组织 EMT 上皮表型相关蛋白 E-cadherin 和 ZO-1 表达下调, 间质表型相关蛋白 α -SMA 和 vimentin 表达上调; N1F 治疗后, EMT 上皮表型相关蛋白呈现上调, 间质表

型相关蛋白下调,肾纤维化减轻。因此,认为 miR-199b-5p 可能通过抑制 EMT,减轻肾纤维化,与生物信息学预测相符。

综上,N1F可减轻左侧单侧输尿管梗阻大鼠的肾脏纤维化,其作用机制可能与下调 miR-199b-5p、抑制 EMT 有关。本研究有助于阐明 miR-199b-5p 在肾纤维中的作用,并为开发针对肾纤维化的新治疗策略提供了方向。但本研究未能采用转染敲低质粒的方法下调 miR-199b-5p,尚需后续深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hoerger T J, Simpson S A, Yarnoff B O, et al. The future burden of CKD in the United States: A simulation model for the CDC CKD Initiative [J]. *Am J Kidney Dis*, 2015, 65(3): 403-411.
- [2] Djurdjaj S, Boor P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 65: 16-36.
- [3] Zeisberg M, Duffield J S. Resolved: EMT produces fibroblasts in the kidney [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(8): 1247-1253.
- [4] Liu Y H. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(2): 212-222.
- [5] Bartel D P. microRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [6] 王彦哲,王筱霞,汪年松. miR-30b/Snail 调控糖尿病肾病肾小管上皮细胞 EMT [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2017, 18(4): 288-291.
- [7] 王佳,林雪容,高恒波,等. miR-29a 靶向信号转导及转录激活因子 3 调控炎症反应在脂多糖诱导大鼠肾小管上皮细胞损伤中的保护作用 [J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(21): 2906-2910.
- [8] 蔡月琴,褚燕青,朱科燕,等. miR-21 对 TGF- β 1 诱导的肾小管上皮细胞间质转分化的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2017, 33(4): 346-350.
- [9] 熊莉丽,张宝,郭志云. microRNA 与转录因子调控网络综述 [J]. *重庆大学学报*, 2014, 37(6): 33-37.
- [10] 文枫,陈国纯,刘伏友. microRNA 调控慢性肾脏病小管间质纤维化研究进展 [J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2012, 1(1): 54-57.
- [11] 詹理睿. 基于 miR-199b-5p/Klotho/FGF23 通路探讨肾元颗粒对糖尿病肾病钙磷代谢的影响 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2018.
- [12] 雷伟,李爽,陈海涛,等. miR-199b-5p 靶向 Klotho 对脂多糖诱导的大鼠肾小管上皮细胞损伤的影响 [J]. *河北医药*, 2022, 44(21): 3210-3215.
- [13] 曾妮. 胞核内 miR-199b-5p 通过促进 CDK9 介导的 Smad3 激活促进心肌纤维化 [D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- [14] Zhao Z G, Zhao S K, Luo L M, et al. miR-199b-5p-DDR1-ERK signalling axis suppresses prostate cancer metastasis via inhibiting epithelial-mesenchymal transition [J]. *Br J Cancer*, 2021, 124(5): 982-994.
- [15] Zhou S J, Liu F Y, Zhang A H, et al. microRNA-199b-5p attenuates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(2): 233-244.
- [16] 木林洁,董飞侠,姜程曦,等. 肾病 I 号方醋酸乙酯提取物对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的影响 [J]. *中草药*, 2017, 48(7): 1380-1385.
- [17] Mu L J, Zhu L T, Feng Y, et al. Nephropathy 1st inhibits renal fibrosis by activating the PPAR γ signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 992421.
- [18] Richard H.Latt, 郑月华. 实验动物的药物剂量 [J]. *上海实验动物科学*, 1984, 4(3): 178-182.
- [19] Lopez J P, Diallo A, Cruceanu C, et al. Biomarker discovery: Quantification of microRNAs and other small non-coding RNAs using next generation sequencing [J]. *BMC Med Genomics*, 2015, 8: 35.
- [20] Zhang M, Li X M. Relationship of mitogen-activated protein kinases activation with transdifferentiation of renal tubular epithelial cells in patients with IgA nephropathy [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2004, 84(11): 898-903.
- [21] Zhang Y, Wen P, Luo J, et al. Sirtuin 3 regulates mitochondrial protein acetylation and metabolism in tubular epithelial cells during renal fibrosis [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(9): 847.
- [22] Omori S, Hida M, Ishikura K, et al. Expression of mitogen-activated protein kinase family in rat renal development [J]. *Kidney Int*, 2000, 58(1): 27-37.
- [23] 万金艳,龙宇,张羽璐,等. PI3K/Akt 信号通路在糖尿病肾病中的作用及中药干预的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(12): 3705-3716.

[责任编辑 李亚楠]