

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.16.001
文章编号: 1005-8982(2020)16-0001-06

基础研究·论著

MicroRNA-381 靶向调控 KLF-4 抗肾纤维化的机制研究

王立成, 李现铎, 陈冬冬, 唐冠宝, 门同义

(山东大学附属千佛山医院 泌尿外二科, 山东 济南 250014)

摘要: 目的 探究 MicroRNA-381 (miR-381) 通过靶向调控 KLF-4 抑制肾纤维化病理进程的作用机制。**方法** 选取 2014 年 2 月—2017 年 12 月山东大学附属千佛山医院收治的 106 例肾纤维化患者; 另取同期该院健康体检者 100 例作为对照组。采用 microRNA (miRNA) 靶基因数据库筛选出 miR-381 潜在靶基因 *KLF-4* 并使用荧光素酶进行验证; 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测肾纤维化患者血清 miR-381。将 NRK49F 细胞分为 miR-381 组、NC 组、Ang II 组及空白组。使用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 miR-381 组、NC 组中 *KLF-4* 表达变化; 使用 qRT-PCR 检测 miR-381 组和 NC 组中多种肾纤维化因子 mRNA 表达变化。检测 Ang II 组和空白组细胞中 miR-381 表达变化, miR-381 组、NC 组及 Ang II 组细胞中 α -SMA 表达变化。将小鼠随机分为单侧输尿管梗阻 (UUO) 组、UUO+miR-381 组及假手术组, 检测 UUO 组和假手术组小鼠肾脏组织 miR-381 表达变化, 并使用 Masson 染色观察 miR-381 对肾纤维化的作用。**结果** qRT-PCR 结果显示, 肾纤维化患者血清 miR-381 相对表达量低于对照组 ($P < 0.05$)。相比 NC 组, miR-381 组肾纤维化因子 α -SMA、CTGF、COL1A1 及 COL3A1 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$); Ang II 刺激 NRK49F 细胞后, 相比空白组 miR-381 相对表达量降低, 而 Ang II 组 α -SMA 相对表达量升高, 过表达 miR-381 后 α -SMA 相对表达量降低 ($P < 0.05$)。*KLF-4* 是 miR-381 靶基因, miR-381 可以负调控 *KLF-4* mRNA 和蛋白的表达 ($P < 0.05$)。UUO 组小鼠肾脏组织中 miR-381 相对表达量低于假手术组, 相比 UUO 组, UUO+miR-381 组肾纤维化区域减小, 细胞外基质沉积变少, COL1A1 和 COL3A1 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$)。**结论** miR-381 通过抑制 *KLF-4* 抗肾纤维化的发展进程, 可能成为肾纤维化诊断及治疗的新靶点。

关键词: 肾病; 纤维化; microRNA; 诊断; 治疗

中图分类号: R586.9

文献标识码: A

MiR-381 regulates the development of renal fibrosis via KLF-4

Li-cheng Wang, Xian-duo Li, Dong-dong Chen, Guan-bao Tang, Tong-yi Men

(Department of Urology, Shandong Provincial Qianfoshan Affiliated Hospital to Shandong University, Jinan, Shandong 250014, China)

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of miR-381 on the pathological process of renal fibrosis by targeting KLF-4. **Methods** The potential target gene KLF-4 of miR-381 was screened out from the microRNA target gene database and verified with luciferase. The expression level of miR-381 in serum of patients with renal fibrosis and healthy controls was respectively detected by qRT-PCR. NRK49F cells were divided into miR-381 transfection group, NC group, Ang II group and blank control group. The expression of KLF-4 in miR-381 transfection group and NC group was determined by qRT-PCR and Western blotting, and qRT-PCR was used to explore the mRNA expression of multiple renal fibrogenic factors in miR-381 transfection group and NC group. Ang II was then used to stimulate the cells in the first three groups, and the expression changes of miR-381 in the Ang II group and the

收稿日期: 2020-02-18

[通信作者] 门同义, E-mail: mentongyish3316@sina.com; Tel: 17865125711

blank control group were detected, and we also investigated the alteration of α -SMA expression in the miR-381 transfection group, NC group and Ang II group after the stimulation of Ang II. Mice were randomly divided into UUO + miR-381 group, UUO group and sham group. The expression of miR-381 in the renal tissues of the UUO group and sham group was detected and the effects of miR-381 on renal fibrosis were observed morphologically by Masson staining. **Results** The results of qRT-PCR showed that the expression level of miR-381 in the serum of patients with renal fibrosis was lower than that in the healthy control group ($P < 0.05$). Compared with the NC group, mRNA expressions of renal fibrogenic factors α -SMA, CTGF, COL1A1 and COL3A1 in the miR-381 transfection group were reduced to different degrees ($P < 0.05$). After the stimulation of Ang II on NRK49F cells, the expression of miR-381 was significantly lower than that of the blank control group, while the expression level of α -SMA increased in the Ang II group but decreased after overexpression of miR-381 ($P < 0.05$). KLF-4 was the target gene of miR-381, and miR-381 could negatively regulate the expression of KLF-4 mRNA and protein ($P < 0.05$). The renal expression level of miR-381 in UUO group was lower than that in the sham group. Compared with the UUO group, the renal fibrosis area and extracellular matrix deposition in the UUO + miR-381 group were declined, and the expression levels of COL1A1 and COL3A1 mRNA were decreased. **Conclusions** MiR-381 may be a new target for the diagnosis and treatment of renal fibrosis by inhibiting the development of renal fibrosis via KLF-4.

Keywords: renal fibrosis; miR-381; KLF4; UUO

肾间质纤维化是各种慢性肾脏疾病终末期的共同病变过程。因肾小管上皮-间质细胞转化, 正常的肾脏结构被细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 替代。KLF-4 抑制多种细胞上皮-间质细胞转化, 调控肾纤维化发展进程^[1-5]。研究发现, MicroRNA (miRNA) 是纤维化发生、发展过程中细胞生物学功能的主要调控者^[6-8]。本研究旨在分析 miR-381 与 KLF-4 在肾纤维化发展进程中的调控关系, 为诊断及治疗肾纤维化提供新的研究方向。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2014 年 2 月—2017 年 12 月山东大学附属千佛山医院收治的 106 例肾纤维化患者。其中, 男性 59 例, 女性 47 例; 平均年龄 (53.42 ± 12.15) 岁。所有患者无泌尿系感染、糖尿病及恶性肿瘤。收集同期本院健康体检者 100 例作为对照组。其中, 男性 50 例, 女性 50 例; 平均年龄 (52.35 ± 10.33) 岁。

1.2 外周血采集

采用美国 BD 公司一次性血清分离胶管, 所有纳入患者及健康体检者于清晨空腹状况下抽取外周静脉血约 3 ml, 静置。待血清析出后, 使用台式离心机以 1 500 r/min 离心 10 min, 取上层血清, 冻存至 -80°C 冰箱待检测。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应

采用美国 Invitrogen 公司 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 将提取到的总 RNA 按照逆转录试剂盒说明书

进行 RNA 逆转录, 合成 cDNA。应用美国 ABI 公司 StepOne Plus 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 仪, 严格按照日本 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq PCR 反应试剂盒的操作说明书进行 PCR 反应。

1.4 细胞培养和转染

NRK49F 细胞购自中国科学院上海细胞库, 在 10% 磷酸盐缓冲液 (PBS) 的 DMEM-LG 培养基中, 37°C 、95% 空气、5% 二氧化碳的细胞恒温培养箱中孵育培养。当细胞生长至覆盖率达 85% 时, 进行细胞传代。传代过程中, 弃去原 DMEM-LG 培养基, 无菌 PBS 洗 3 次, 再用 0.25% 胰酶消化 1 min。在倒置显微镜下观察细胞消化过程, 待细胞变圆、边缘变亮后, 加入含 10% PBS 的 DMEM 培养基终止消化并将细胞按照 1 : 3 的比例进行传代。将细胞分为 miR-381 组、NC 组、Ang II 组、空白组。miR-381 组按照说明书将 miR-381 mimics 转染进 NRK49F 细胞; NC 组按照说明书将 negative control miRNA mimics 转染进 NRK49F 细胞; Ang II 组将 Ang II 作用于 NRK49F 细胞; 空白组未做任何处理。

1.5 荧光素酶报告分析

构建 KLF-4 野生型 3' -UTR 荧光素酶报告基因质粒 pMIR-WT, 并以 pMIR-WT 质粒为模板, 利用 PCR 搭桥法构建其潜在结合位点突变型报告基因质粒 pMIR-MUT。用 pMIR-WT 或 pMIR-MUT 分别转染 miR-381 组和 NC 组 NRK49F 细胞。在细胞培养箱中培养 36 h 后, 用 Passive lysis buffer 裂解细胞后分析双荧光素酶活性。

1.6 Western blotting

弃去培养皿中 DMEM 细胞培养液, 以预冷的无菌 PBS 清洗细胞 3 次, 弃去 PBS, 向培养皿中加入蛋白裂解液 200 μ l, 充分震荡, 用细胞刮收集细胞至 1.5 ml EP 管中, 4 $^{\circ}$ C、15 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为细胞全蛋白。通过聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 按说明书进行 Western blotting 检测。

1.7 复制单侧输尿管梗阻小鼠模型

24 只 BACB/c 小鼠, 雌雄不限, 鼠龄 6 ~ 8 周, 体重 18 ~ 20 g, 由山东大学附属千佛山医院动物实验中心提供, 动物许可证号: SYXK(鲁)20180009。将 24 只小鼠随机分为假手术组、单侧输尿管梗阻(UUO)组及 UUO+miR-381 组, 每组 8 只。小鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(0.004 ml/g)麻醉约 2 min 后, 取仰卧位固定。术前消毒, 于无菌条件下, 取腹部正中白线为手术切口。UUO 组和 UUO+miR-381 组寻找左侧输尿管并钝性分离输尿管至肾门, 于小鼠肾脏下极和肾门处分别用丝线结扎左侧输尿管, 并于两结扎处之间剪断输尿管。右侧输尿管不予任何处理, 缝合腹膜, 消毒, 缝合腹直肌和皮肤, 再次消毒。假手术组小鼠除不结扎输尿管外, 其余操作与上述相同。UUO+miR-381 组尾静脉注射 40 mg/kg miR-381 mimics 1 次/3 d, 假手术组和 UUO 组尾静脉注射等量生理盐水。

1.8 Masson 染色

切取小鼠肾脏标本并用固定液固定, 浸蜡包埋, 固定于切片机上切成 3 ~ 5 μ m 薄片, 按照说明书分别采用苏木精-伊红染色和 Masson 染色对 3 组小鼠肾脏纤维化进行分析。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 比较用独立样本 t 检验或单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-381 在肾纤维化患者及小鼠 UUO 模型体内的表达

qRT-PCR 结果表明, miR-381 在肾纤维化患者、对照组血清中的相对表达量分别为(0.324 \pm 0.047)和(1.000 \pm 0.122), 经 t 检验, 差异有统计学意义

($t = 53.035$, $P = 0.000$), 肾纤维化患者低于对照组。UUO 组、假手术组小鼠肾脏组织中 miR-381 相对表达量分别为(0.417 \pm 0.062)和(1.000 \pm 0.208), 经 t 检验, 差异有统计学意义($t = 12.030$, $P = 0.000$), UUO 组低于假手术组。

2.2 Ang II 抑制 NRK49F 细胞中 miR-381 的表达

Ang II 组和空白组 miR-381 相对表达量分别为(0.324 \pm 0.047)和(1.000 \pm 0.122), 经 t 检验, 差异有统计学意义($t = 53.035$, $P = 0.000$), 经 Ang II 刺激后 miR-381 在 NRK49F 细胞的相对表达量低于空白组。

2.3 miR-381 抑制 α -SMA 的表达

miR-381 组、Ang II 组、空白组 α -SMA 相对表达量为(0.762 \pm 0.089)、(1.127 \pm 0.154)、(0.519 \pm 0.073), 经方差分析, 差异有统计学意义($F = 7.321$, $P = 0.023$), Ang II 组高于 miR-381 组和空白组($t = 3.554$ 和 6.179, $P = 0.024$ 和 0.004)。

2.4 KLF-4 是 miR-381 的靶基因

通过 miRNA 靶基因数据库 Targetscan 进行筛选预测, 确定 miR-381 的潜在靶基因为 KLF-4 (见图 1)。双荧光素酶检测结果显示, miRNA-381 组与 NC 组 pMIR-WT 荧光活性分别为(0.437 \pm 0.043)和(1.000 \pm 0.126), 经 t 检验, 差异有统计学意义($t = 7.324$, $P = 0.002$), miRNA-381 组低于 NC 组; miRNA-381 组与 NC 组 pMIR-MUT 荧光活性分别为(0.951 \pm 0.012)和(1.121 \pm 0.164), 差异无统计学意义($t = 1.791$, $P = 0.148$)。miR-381 可结合 KLF-4 的 3'-UTR 并抑制 KLF-4 的表达。

2.5 miR-381 负向调控 KLF-4 mRNA 和蛋白的表达

qRT-PCR 结果显示, miR-381 组、NC 组 KLF-4 mRNA 相对表达量分别为(0.335 \pm 0.029)和(1.000 \pm 0.174), 经 t 检验, 差异有统计学意义($t = 6.530$, $P = 0.003$), miR-381 组低于 NC 组。

Western blotting 检测结果显示, miR-381 组、NC 组 KLF-4 蛋白相对表达量分别为(0.166 \pm 0.074)和(0.385 \pm 0.049), 经 t 检验, 差异有统计学意义($t = 4.274$, $P = 0.013$), miR-381 组低于 NC 组(见图 2)。miR-381 能靶向调控 KLF-4, 且抑制 KLF-4 mRNA 和蛋白的表达。

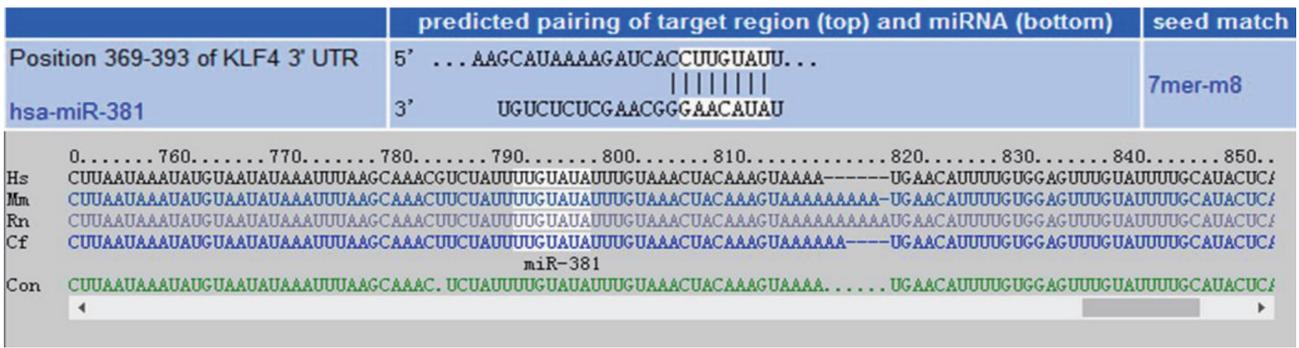


图 1 miR-381 与靶基因 *KLF-4* 的序列关系

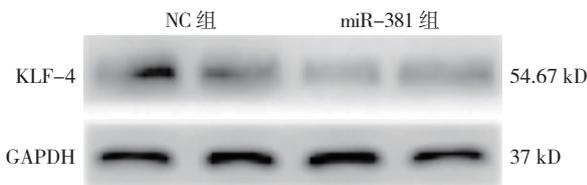


图 2 两组 *KLF-4* 蛋白的表达

2.6 miR-381 抑制肾纤维化因子 mRNA 的表达

NC 组与 miR-381 组肾纤维化因子 α -SMA、CTGF、COL1A1 及 COL3A1 mRNA 相对表达量比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-381 组均低于 NC 组。miR-381 能干扰 TGF- β 信号通路, 从而抑制肾纤维化的发展进程。见表 1。

表 1 两组肾纤维化因子 mRNA 的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	α -SMA mRNA	CTGF mRNA	COL1A1 mRNA	COL3A1 mRNA
NC 组	1.000 \pm 0.162	1.000 \pm 0.117	1.000 \pm 0.134	1.000 \pm 0.091
miR-381 组	0.614 \pm 0.076	0.403 \pm 0.054	0.482 \pm 0.082	0.267 \pm 0.045
<i>t</i> 值	3.736	8.025	5.711	12.506
<i>P</i> 值	0.020	0.001	0.005	0.000

2.7 miR-381 抑制 UUO 小鼠肾纤维化发展进程

Masson 染色发现, 相比 UUO 组, UUO+miR-381 组小鼠肾纤维化区域减小, ECM 沉积变少 (见图 3)。各组 COL1A1 和 COL3A1 mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, UUO+miR-381 组低于 UUO 组 ($t = 5.340$ 和 5.992 , $P = 0.006$ 和 0.004)。miR-381 抑制 UUO 小鼠的肾纤维化发展进程。见表 2。

表 2 3 组小鼠 COL1A1 和 COL3A1 mRNA 相对表达量比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	COL1A1 mRNA	COL3A1 mRNA
假手术组	1.117 \pm 0.025	1.565 \pm 0.038
UUO 组	4.165 \pm 0.791	4.854 \pm 0.657
UUO+miR-381 组	1.649 \pm 0.201	2.411 \pm 0.259
<i>F</i> 值	10.023	9.327
<i>P</i> 值	0.004	0.005

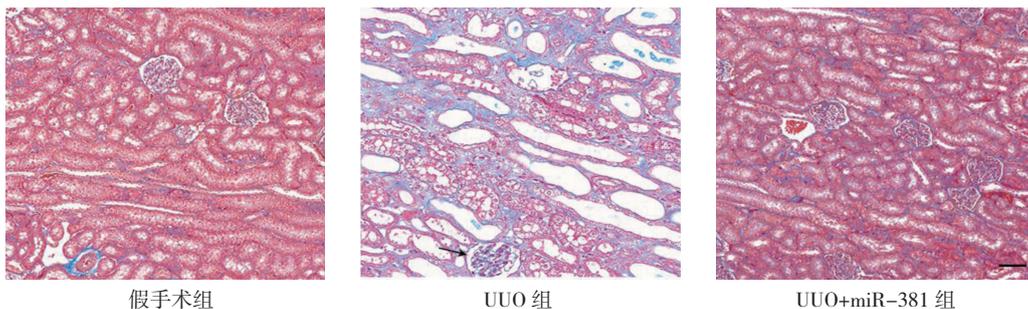


图 3 miR-381 对肾纤维化的调控 (Masson 染色 $\times 100$)

3 讨论

肾间质纤维化是肾脏病变的病理基础和最终途径, 其在多因素作用下, 引起炎症浸润、成纤维细胞增生及 ECM 在肾间质沉积^[9], 是肾衰竭特征之一。miRNA 是一类非编码单链小分子 RNA, 可调控人体 30% 编码蛋白基因的表达。左琪等^[10]发现, 相对于无肾间质纤维化患者, 肾间质纤维化患者尿中 miR-21 升高, 干预治疗后 miR-21 下降, 纤维化程度减轻。刘亚楠等^[11]在 UUO 大鼠模型中发现 miR-192 在纤维化中起促进作用。miRNA 靶点治疗可以抑制或阻断纤维化, 避免肾脏替代治疗。已有报道证实, miRNA 与肾间质纤维化密切相关, 但 miR-381 在肾间质纤维化中的作用鲜有报道。本研究发现, 肾间质纤维化患者血清 miR-381 低于对照组, 且在 UUO 组小鼠肾组织中 miR-381 低于假手术组。由此推断, miR-381 可能参与肾间质纤维化发展进程。

肾损伤时, Ang II 及其受体在成纤维细胞、系膜细胞中表达上调, 刺激成纤维细胞增殖, 促使 ECM 生成及生长因子分泌, 发挥促纤维化作用。 α -SMA 表达升高标志上皮细胞向肌成纤维细胞转化, 使肾间质中肌成纤维细胞聚集, 导致 ECM 合成和分泌增多, 促进纤维化形成。本研究通过 Ang II 刺激 NRK49F 细胞, 发现 Ang II 组 miR-381 低于空白组, 且 α -SMA 高于空白组, 但 miR-381 组 α -SMA 低于 Ang II 组, 表明 Ang II 促进 NRK49F 细胞中 α -SMA 的表达, 该作用可被 miR-381 抑制。由结果得知 miR-381 可抑制 α -SMA 表达及 Ang II 诱导的肾间质纤维化。

KLF 家族主要在胃肠道和其他上皮组织终末期细胞中高表达, 参与调节正常细胞分化增殖。KLFs 可作为转录激活子, 或转录抑制子, 有些 KLF 因子兼有两种功能。研究发现, KLF-4 是调节上皮细胞-间质细胞转化的关键负性调控蛋白^[12]。本研究通过 miRNA 靶基因数据库预测 KLF-4 是 miR-381 潜在靶基因, 采用双荧光素酶检测发现 miR-381 可抑制 KLF-4 的表达, 并通过实验验证 miR-381 可抑制 KLF-4 mRNA 和蛋白的表达。

CTGF 与肾脏、肺和肝脏等组织器官纤维化进程有关, 其在肾脏含量最高。CTGF 是 TGF- β 促纤维化信号通路下游因子, 刺激细胞增殖及 ECM 形成, 促进

肾间质纤维化^[13-14]。ECM 主要成分包括 I、III 型胶原, COL1A1 和 COL3A1 分别是 I、III 型胶原的组成部分^[15]。本研究发现, miR-381 组肾纤维化因子 mRNA 表达低于 NC 组, 说明 miR-381 抑制 KLF-4 表达, 并干扰 TGF- β 信号通路, 抑制肾间质纤维化发展进程。Masson 染色显示 UUO+miR-381 组小鼠肾间质纤维化区域小于 UUO 组, ECM 沉积变少, 纤维化进程受到抑制。UUO+miR-381 组小鼠 COL1A1 和 COL3A1 mRNA 低于 UUO 组, 表明 miR-381 可抑制 UUO 小鼠肾间质纤维化发展进程。

综上所述, miR-381 可抑制 Ang II 诱导的肾间质纤维化, 并下调肾纤维化基因表达。抑制 UUO 小鼠肾间质纤维化, 提示 miR-381 抑制 KLF-4 表达, 干扰 TGF- β 信号通路, 抑制肾间质纤维化发展进程。因此, miR-381 可能成为肾间质纤维化诊断及治疗的新靶点。

参 考 文 献:

- [1] KRIEGEL A J, LIU Y, COHEN B, et al. miR-382 targeting of kallikrein 5 contributes to renal inner medullary interstitial fibrosis[J]. *Physiol Genomics*, 2012, 44(4): 259-267.
- [2] LIU X J, HONG Q, WANG Z, et al. MicroRNA21 promotes interstitial fibrosis via targeting DDAH1: a potential role in renal fibrosis[J]. *Molecular Cellular Biochemistry*, 2016, 411(1/2): 181-189.
- [3] LV L L, CAO Y H, NI H F, et al. MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 305(8): 1220-1227.
- [4] YUNG S, CHAN T M. Molecular and immunological basis of tubulo-interstitial injury in lupus nephritis: a comprehensive review[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2016, 52(2): 1-15.
- [5] INOUE T, KUSANO T, TOMORI K, et al. Effects of cell-type-specific expression of a pan-caspase inhibitor on renal fibrogenesis[J]. *Clinical Experimental Nephrology*, 2014, 19(3): 350-358.
- [6] 汤涛涛, 吕林莉, 刘必成. microRNAs 与肾脏纤维化 [J]. *东南大学学报 (医学版)*, 2014, 33(6): 788-793.
- [7] 眭维国, 陈鹏, 戴勇. 小分子 RNA 与肾脏纤维化研究进展 [J]. *国际泌尿系统杂志*, 2014, 34(1): 134-138.
- [8] 尤小寒, 章慧娣, 苏震, 等. 与大鼠肾间质纤维化相关 microRNA 的初步研究 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2012, 28(10): 785-789.
- [9] 朱可可, 杨波. 肾间质纤维化发病机制研究进展 [J]. *广东医学*, 2015, 11(2): 324-326.

- [10] 左琪,包崑,林文秋,等.慢性肾脏病患者尿液 miR-21 表达及与间质纤维化相关性的研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(8): 700-703.
- [11] 刘亚楠,马宏,贾蓉,等. MicroRNA-192 在 UUO 幼年大鼠肾间质的表达及雷公藤多苷的干预研究 [J]. 中国药物与临床, 2014, 28(8): 1019-1021.
- [12] 魏莲子,方煜翔,高维强. 下调转录因子 KLF4 抑制前列腺癌细胞上皮-间质转化及细胞迁移和侵袭 [J]. 肿瘤, 2017, 37(5): 466-473.
- [13] 车丽双,黄荣桂. TGF- β 1 与 CTGF 在肾间质纤维化中的作用 [J]. 医学综述, 2013, 19(4): 624-626.
- [14] 张树华,孙冬梅,马琳,等. 糖尿病大鼠肾脏纤维化与 CTGF 表达的相关性 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2013, 5(2): 190-193.
- [15] 贺佩,胡君健,何永康,等. 四种单味中药及其复方对小鼠血吸虫病肝纤维化 I、III 型胶原及 TGF- β 1 表达的影响 [J]. 热带病与寄生虫学, 2016, 14(1): 25-28.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式:王立成,李现铎,陈冬冬,等. MicroRNA-381 靶向调控 KLF-4 抗肾纤维化的机制研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(16): 1-6.