

· 论著 ·

miR-17 对高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤作用的机制研究

黄红梅¹ 杨茂君¹ 羊暑艳¹ 汤筱池¹ 徐勇²

¹成都市双流区第一人民医院内分泌科 610200; ²西南医科大学附属医院内分泌科, 泸州 646099

通信作者:徐勇, Email: zzh1911@sina.com

【摘要】 目的 探索 miR-17 在糖尿病肾病体外细胞模型中的调节作用机制。**方法** 选取人肾小管上皮细胞(HK-2 细胞)作为模型细胞,构建高糖诱导的糖尿病肾脏体外细胞损伤模型。将细胞分为空白组(正常培养基)、葡萄糖组(高糖诱导),在高糖诱导模型组的基础上又分为miR-17 inhibitor 组和 NC inhibitor 组。实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)检测空白组和高糖模型组miR-17 及核转录因子(Nrf-2)表达情况。再通过细胞活力检测试剂盒(CCK8)检测各组细胞增殖差异,以及流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。WB 检测Nrf-2/血红素氧化酶-1(HO-1)信号通路相关蛋白表达,双荧光素酶报告基因检测法检测miR-17对Nrf-2的靶向关系。**结果** miR-17 inhibitor能够显著促进高糖诱导的HK-2细胞增殖,且明显抑制高糖诱导的HK-2细胞的凋亡,同时miR-17能够抑制 Nrf-2/HO-1 信号通路,并且双荧光素酶报告基因结果显示miR-17具有靶向抑制Nrf-2的作用。**结论** MiR-17 能够靶向 Nrf-2 对高糖诱导的 HK-2 细胞氧化应激损伤具有一定的修复能力。

【关键词】 糖尿病肾病;miR-17;靶向关系;核转录因子

基金项目:四川省科学技术厅(2019YFS0537)

DOI:10.3760/cma.j.cn121383-20200918-09037

Effect of miR-17 on hyperglycemic-induced renal tubular epithelial cell injury Huang Hongmei¹, Yang Maojun¹, Yang Shuyan¹, Tang Xiaochi¹, Xu Yong². ¹Department of Endocrinology, Chengdu Shuangliu District First People's Hospital, Chengdu 610200, China; ²Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646099, China
Corresponding author: Xu Yong, Email: zzh1911@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the regulatory mechanism of miR-17 in the diabetic nephropathy by in vitro model. **Methods** HK-2 cells were damaged by high glucose to set the model of DN in vitro. Cells were divided into blank group (normal medium), glucose group (high sugar induction), miR-17 inhibitor group and NC inhibitor group. The expression of miR-17 and Nrf-2 in the blank group and the high-glucose model group were detected by Real-time PCR. The difference of cell proliferation and apoptosis in each group were detected by CCK8 and flow cytometry. Western blot was used to detect the protein expression related to Nrf-2/HO-1 signaling pathway, and Luciferase reporter assay was used to detect the effect of miR-17 on Nrf-2. **Results** miR-17 inhibitor promoted the proliferation of HK-2 cells and significantly inhibited the apoptosis of HK-2 cells (renal tubular epithelial cells) which induced by high glucose. Meanwhile, miR-17 inhibited the signaling pathway of Nrf-2/HO-1, and the Luciferase reporter results showed that miR-17 had the effect of targeted inhibition of Nrf-2. **Conclusion** miR-17 can target Nrf-2 and repair the oxidative stress injury of HK-2 cells induced by high glucose.

【Keywords】 Diabetic nephropathy; miR-17; Targeted relationship; Nrf-2

Fund program: Department of Science and Technology of Sichuan Province (2019YFS0537)

DOI:10.3760/cma.j.cn121383-20200918-09037

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 通常是由代谢紊乱造成的全身性疾病,是终末期肾脏疾病的主要原因,具有高死亡率、严重危害人类的生命健康,影响生活质量^[1]的特点。DN 作为糖尿病的常见并发症,目前仍不能得到有效治疗,因此,迫切需要开发更有效的药物来预防或减慢其发展。微小 RNA (miRNA) 是一类短的非编码 RNA,可通过靶向基因的 3'UTR 调节基因表达,已有研究报道 miRNA 参与了 DN 的发展^[2-4]。miR-17 家族由人类染色体 13、X 和 7 上的 14 个成熟 miRNAs 组成^[5],miR-17 已被报道在 DN 中表达上调^[6],但其作用机制尚不明确。前期调研并通过 Targetscan 发现编码蛋白核转录因子 (Nrf-2) 的 *NFE2L2* 基因是 miR-17 的潜在靶基因。Nrf-2 是一种具有调节细胞氧化应激的转录因子,能够保持细胞氧化应激稳态,维持超氧化物歧化酶 (SOD) 在机体内的活性,清除机体氧自由基。抑制丙二醛的产生,从而抑制丙二醛与蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合^[7]。Nrf-2 蛋白已被证明能通过 Nrf-2/血红素氧化酶-1 (HO-1) 通路参与氧化应激保护 DN 导致的肾脏损伤^[8-10]。笔者推测 DN 中升高的 miR-17 抑制了 Nrf-2 的表达,加剧了氧化应激反应,促进了 DN 的病理进程。本研究采取体外高糖刺激人肾小管上皮细胞 (HK-2 细胞) 损伤建立体外肾损伤模型^[11],转染 miR-17 inhibitor,在细胞水平检测 HK-2 细胞凋亡、增殖情况,以及丙二醛、SOD 的水平。探讨 Nrf-2/HO-1 信号通路参与 HK-2 细胞氧化应激的机制,确定 miR-17 对氧化应激的调节关系。高糖诱导的 HK-2 细胞是高度模拟 DN 的体外模型,研究 miR-17 在 HK-2 细胞的分子机制,为 miRNA 治疗 DN 提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 试剂 AnnexinV/PI 细胞双染凋亡检测试剂盒购买于上海复申生物科技有限公司;谷氨酰胺、胎牛血清、DMEM 培养基购自以色列 Biological Industries 公司;细胞活力检测试剂盒 (CCK8) 购买于碧云天生物技术公司;三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 购自上海生工生物工程股份有限公司;抗体 Nrf-2、HO-1 均购自上海生工 Bbilibili;转染试剂 Lipo2000 (美国 invitrogen 生命技公司,美国);丙二醛、SOD 检测试剂盒购买于南京建成生物工程研究所有限公司;Promega Dual-Luciferase system 检测试剂盒购买于美国 Promega 公司;D 葡萄糖购买于 Sigma 公司产品;miR-17 inhibitor、NC inhibitor 购买于中国锐博生物。

仪器设备:垂直电泳带转印系统 (伯乐,美国);

Tanon 5200 型化学发光成像仪 (天能,中国);二氧化碳细胞培养箱 (赛默飞世尔,美国);三目倒置显微镜 (徕卡,德国);-80 °C 超低温冰箱 (赛默飞世尔,美国);Eppendorf 型移液器、Eppendorf 5424R 型离心机 (艾本德,德国);IMARK 型多功能酶标仪 (伯乐,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与处理 人 HK-2 细胞购自中国科学院上海细胞库。细胞 37 °C 复苏后使用含有 10% 的胎牛血清 DMEM (4.5 g/L Glucose) 完全培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养,每隔 2 d 进行一次传代。将 10 μl DMEM 与目的质粒以及内参质粒充分混匀后室温放置 (溶液 A),之后将 10 μl DMEM 与 0.3 μl 的转染试剂充分混匀 (溶液 B),室温放置 5 min。将溶液 A 与溶液 B 充分混匀,室温放置 20 min。转染前为细胞更换新鲜培养基,之后将转染混合物加入混匀。37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养。

1.2.2 CCK8 细胞增殖实验 选择处于对数生长期的 HK-2 细胞,细胞用移液枪吹打均匀,罗氏计数法,将细胞接种于 96 孔板中,每孔 3×10^4 个细胞。高糖 (30 mmol/L) 孵育 48 h 诱导细胞损伤。将细胞分为空白对照组、葡萄糖诱导模型组,在模型组基础上又分为 miR-17 inhibitor 组、NC inhibitor 组,培养 48 h 后向各孔加入 CCK8 液 10 μl,37 °C 孵育 30 min,在多功能酶标仪 450 nm 波长下测量各孔吸光度值,并进行细胞活力计算。

1.2.3 细胞凋亡检测 取对数生长期细胞接种于 12 孔板中,每孔 10×10^4 个细胞,待细胞完全贴壁后,分为空白对照组、葡萄糖诱导模型组、miR-17 inhibitor 组、NC inhibitor 组,收集 6 孔板里的全部细胞,1 000 r/min 离心,丢掉上清液,磷酸缓冲盐清洗去除背景,固定液固定染色,室温避光孵育 15 min,立刻上机检测,使用流式异硫氰酸荧光素/碘化吡啶 (FITC/PI) 通道进行检测凋亡细胞所占比例。

1.2.4 蛋白免疫印迹法 (Western-blot) 实验 Nrf-2/HO-1 蛋白表达水平检测,取对数期细胞接种于 6 孔板中,分为空白对照组、葡萄糖诱导模型组、miR-17 inhibitor 组、NC inhibitor 组,将孔板中的细胞收集离心,磷酸缓冲盐清洗两遍,洗涤后按照 300 μl 每孔加入 RIPA 细胞裂解液 (含 1% 巯基乙醇),冰浴裂解 5 min,再细胞超声仪处理 10 min。最后将全部样品 100 °C 金属浴加热 10 min。将样品按照 7 μl 的量加载到十二烷基磺酸钠垂直胶进行电泳分离,完成分离的蛋白转印聚偏二氟乙烯膜上。奶粉封闭、分别

加入一抗(1:1 000)孵育,4℃摇床过夜。洗膜后,加入二抗稀释液(1:5 000),室温孵育 1 h,洗膜后在化学发光仪上显影,对目的蛋白进行采图,并分析各组条带蛋白灰度值。

1.2.5 荧光素酶基因测定 分别将 NC mimics + h-NFE2L2-3' UTR-wt 和 hmu-miR-17 + h-NFE2L2-3' UTR-wt 质粒转入 293T 细胞,选择海肾荧光素酶质粒(Renilla)作为内参质粒,收集细胞裂解,Promega Dual-Luciferase system 试剂盒进行检测。Hsa-miR-17-5P 的成熟序列为:caagugcuuacagucagguag。质粒构建及转染 miR-17 mimic 质粒由上海吉玛公司提供。

1.2.6 实时荧光定量聚合酶链反应 RNA 提取液(Trizol)总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,用反转录试剂盒进行反转录成互补 DNA(cDNA),SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒检测 miR-17、Nrf-2 表达情况,每个样本反应设 3 个重复。miRNA 采用两步加 A 法反转录,获得用于实时荧光定量的产物。根据相对定量(ddCT)法对结果进行相对定量分析,计算各样本的平均循环数(cycle threshold, CT)值,以 2^{-ddCT} 表示 mRNA 相对表达水平,所有反应均在实时荧光定量聚合酶链反应仪完成。文中涉及的引物序列分别为, U6 Forward Primer 5'-TCCGATCGTGAAGCGTTC-3', U6 Reverse Primer 5'-GTG-CAGGGTCCG AGGT-3'; actin Forward Primer 5'-CTG-GTGCTGTCTGCGCTG-3', actin Reverse Primer 5'-CT-

GGGTTTCGTC TTTCTGG-3'; Nrf-2 Forward Primer 5'-CCATTTACGGAGACCCAC-3', Nrf-2 Reverse Primer 5'-TGGGCAACTTTATTTC-3'; miR-17 Forward Primer 5'-ATCGCGTGCTTACAGTGC-3', miR-17 Reverse Primer 5'-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3'。

1.2.7 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测 细胞 SOD、丙二醛水平 ELISA 检测,将对数生长期细胞接种于细胞培养皿,按照空白组、葡萄糖组、miR-17 inhibitor、NC inhibitor 进行分组,收集细胞制成匀浆液, -20℃ 冰箱反复冻融 3 次,然后用显微镜观察细胞是否完全破碎,4 000 r/min,离心 15 min,上清液作 SOD、丙二醛测定。SOD、丙二醛按照 ELISA 操作说明进行处理。

2 统计学处理

使用 Prism 8 对实验数据进行统计学分析,每次实验的结果独立重复 3 次实验,实验数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。使用 Student's-t-test 计算各组间的统计差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 miR-17 在正常 HK-2 细胞和高糖诱导损伤细胞中的表达 使用实时荧光定量聚合酶链反应检测正常 HK-2 细胞(空白组)和高糖诱导损伤 HK-2 细胞(葡萄糖组)中 miR-17 和 Nrf-2 的表达水平,损伤细胞较正常细胞 miR-17 中表达水平显著升高,而损伤细胞较正常细胞 Nrf-2 表达水平显著降低,见图 1。



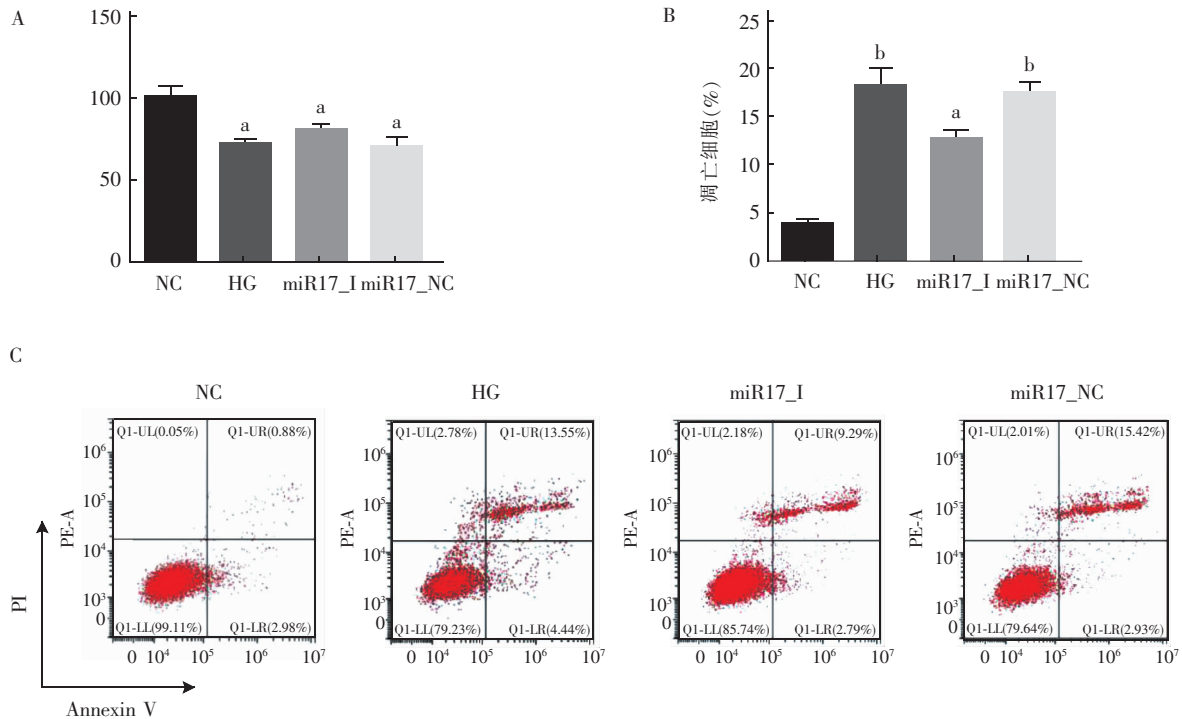
注:A:空白组与高糖诱导组 MiR-17 水平;B:空白组与高糖诱导组 Nrf-2 水平;Nrf-2:核转录因子;与对照组比较,葡萄糖诱导组 $^aP < 0.05$

图 1 miR-17 和 Nrf-2 的表达水平

3.2 miR-17 抑制 HK-2 细胞凋亡及促进增殖的能力 高糖诱导损伤 HK-2 细胞较正常细胞(空白组)中 miR-17 表达水平显著性增加,转染 48 h 后,应用 CCK8 法检测细胞增殖水平,发现 miR-17 inhibitor 转染组细胞增殖能力明显强于葡萄糖诱导模型组和 NC inhibitor 组。流式细胞仪对细胞凋亡检测,模型组、NC inhibitor 和 miR-17 inhibitor 组凋亡被显著抑制,分别为 $(18.23 \pm 1.23)\%$ 、 $(12.78 \pm 2.65)\%$ 和 $(17.57 \pm 2.55)\%$,见图 2。

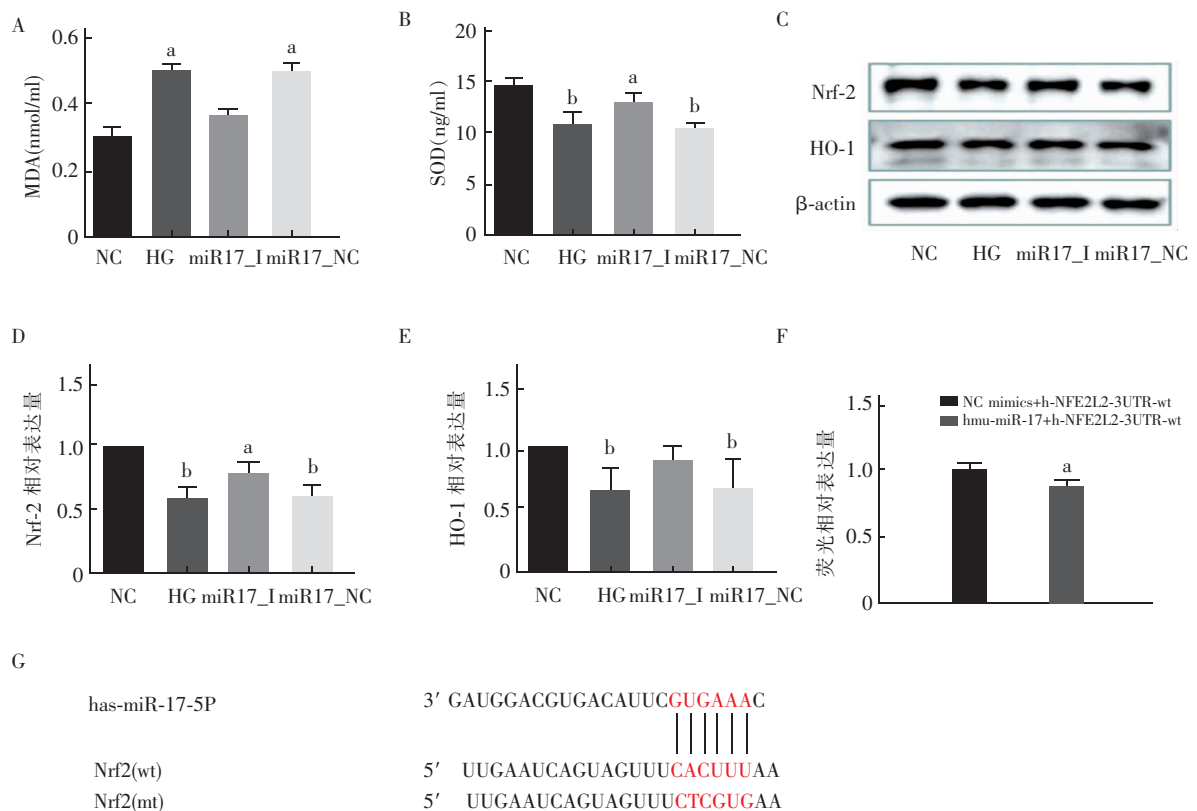
3.3 miR-17 能够靶向 Nrf-2 对高糖诱导的 HK-2 细

胞氧化应激损伤具有一定的改善 miR-17 inhibitor 组能够明显诱导损伤 HK-2 细胞 SOD 的表达,改善高糖诱导的丙二醛水平。丙二醛诱导下,HO-1 表达下降,Nrf-2 的表达水平显著下降,HO-1、Nrf-2 的表达水平与葡萄糖诱导模型组和 NC inhibitor 组比较也得到一定程度的回升。双荧光素酶报告基因法检测 miR-17 与 Nrf-2 的作用关系,与 NC mimics + h-NFE2L2-3' UTR-wt 组比较 hmu-miR-17 + h-NFE2L2-3' UTR-wt 荧光素酶活性显著降低,证明 miR-17 直接与 Nrf-2 mRNA 的 3'UTR 相互作用,见图 3。



注: A: CCK8 法细胞增殖实验结果; B-C: 细胞凋亡流式细胞术检测统计结果; HK-2: 人肾小管上皮细胞; NC: 对照组; HG: 葡萄糖诱导模型组; miR17_I: 葡萄糖+miR17 inhibitor 组; miR17_NC: 葡萄糖+NC inhibitor 组; 与空白组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$

图 2 miR-17 inhibitor 促进 HK-2 细胞增殖及抑制其凋亡



注: A: MDA 水平; B: SOD 水平; C-E: Nrf-2/HO-1 蛋白水平变化; F-G: miR-17 靶向抑制 Nrf-2 (position 186-192 of NFE2L2 3'UTR); MDA: 丙二醛; SOD: 超氧化物歧化酶; HO-1: 血红素氧化酶-1; Nrf-2: 核转录因子; β-actin: β-肌动蛋白; NC: 对照组; HG: 葡萄糖诱导模型组; miR17_I: 葡萄糖+miR17 inhibitor 组; miR17_NC: 葡萄糖+NC inhibitor 组; 与空白组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$

图 3 miR-17 能够靶向 Nrf-2 对 Nrf-2/HO-1 进行调控

4 讨论

目前 DN 的治疗方法仍是通过饮食干预,小分子药物治疗为主流,急需更加高效的治疗手段。miRNA 是人体内具有多种生物学功能的短链 RNA,在肿瘤的增殖、侵袭转移^[12],以及 DN 等多种疾病中发挥着关键调控作用,miRNA 主要通过结合靶基因的 3'非翻译区,调节基因转录后水平从而干预疾病的发生发展。DN 发病机制中氧化应激诱导的肾损伤占有重要地位^[13],同时 Nrf-2 在肾脏组织中高度表达,Nrf-2 是细胞氧化应激反应中的关键因子,近年来也被认为是清除活性氧族以抗氧化应激最敏感的信号,Nrf-2 下游的一系列抗氧化蛋白 HO-1、对机体的抗氧化损伤具有重要调控作用^[14]。找到靶向调节 Nrf-2 的 miRNA,能够为 DN 的治疗找到新的突破口。

本实验通过建立体外肾细胞损伤模型,发现高糖诱导下 miR-17 的表达水平明显增加,而 Nrf-2 的水平明显下降。转染 miR-17 inhibitor 能够促进 HK-2 细胞的增殖和抑制其凋亡,当 miR-17 被抑制伴随着 Nrf-2/HO-1 信号通路的激活,SOD 表达水平增加,改善脂质体的氧化水平,细胞丙二醛水平下降。同时通过荧光素酶报告基因验证了 miR-17 与 Nrf-2 的靶向关系。因此 miR-17 对高糖诱导的 HK-2 细胞损伤修复作用很可能由 miR-17 调节 Nrf-2 决定。综上所述,本实验研究结果表明,miR-17 能够靶向 Nrf-2,调节 Nrf-2/HO-1 信号通路,对高糖诱导的 HK-2 细胞损伤具有一定的保护作用。建立体外模型能够节约成本,缩短实验周期。但只从体外细胞实验水平进行初步机制研究,未进行动物在体实验进一步验证,miR-17 的这种保护作用是否在动物体内也能发挥功效有待考究。接下来将对 miR-17 进行体内实验研究,并对其具体作用机制深入探讨。

综上所述,miRNA 在生命科学领域具有举足轻重的地位,利用 miRNA 进行疾病治疗将为临床医疗提供新的方向,能够降低药物的研发成本,和研发时间,排除毒副作用对疗效的干扰,为患者减轻治疗成本。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 姚建,陈名道. 糖尿病肾病及其早期防治[J]. 中华内分泌代谢杂志,2002,18(4):330-331. DOI:10.3760/j.issn.1000-6699.2002.04.033.
- [2] 邵晓娜,耿嘉男,胡彦武,等. microRNA 与糖尿病肾病关系的探讨[J]. 中国实验诊断学,2015,(11):1974-1977. DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2016.20.001.
- [3] Krupa A, Jenkins R, Luo DD, et al. Loss of miRNA-192 Promotes Fibrogenesis in Diabetic Nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2010,21(3):438-447. DOI:10.1681/ASN.2009050530.
- [4] Zhang Z, Peng H, Chen J, et al. miRNA-21 protects from mesangial cell proliferation induced by diabetic nephropathy in db/db mice [J]. FEBS Lett, 2009, 583(12):2009-2014. DOI:10.1016/j.febslet.2009.05.021.
- [5] Foshay KM, Gallicano GI. miR-17 family miRNAs are expressed during early mammalian development and regulate stem cell differentiation [J]. Dev Biol, 2009, 326(2):431-443. DOI:10.1016/j.ydbio.2008.11.016.
- [6] 任玮,余宏川,王萍,等. miR-17-5p 诱导小鼠肾足细胞系凋亡 [J]. 基础医学与临床,2019,39(7):973-977. DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2019.07.009.
- [7] 李慧,杨林. Nrf2 抗氧化的分子调控机制 [J]. 生物信息学,2018,16(1):1-6. DOI:10.3969/j.issn.1672-5565.201708001.
- [8] 明建松,王晓雪,袁玉华. 丹酚酸 B 对糖尿病肾病模型大鼠肾组织中 Nrf-2 和 HO-1 的影响 [J]. 天津医药,2018,46(12):1286-1290. DOI:10.11958/20180963.
- [9] Thomas M. A preliminary evaluation of bardoxolone methyl for the treatment of diabetic nephropathy [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012, 8(8):1015-1022. DOI:10.1517/17425255.2012.697152.
- [10] 黄亚医,赵博,汪华新,等. 高糖对 HK-2 细胞缺氧复氧损伤的影响及 TLR7-MyD88-NF-κB 信号通路的作用 [J]. 现代医学,2018,46(1):11-14. DOI:10.3969/j.issn.1671-7562.2018.01.004.
- [11] 贾林,林智峰,马莉,等. P38MAPK 抑制剂 SB203580 对高糖诱导 HK-2 细胞转分化的影响 [J]. 天津医药,2016,44(4):426-429. DOI:10.11958/20150004.
- [12] 张亮. miRNA 在肿瘤诊断与生物治疗中的潜在应用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2006,13(3):159-161. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2006.03.001.
- [13] 刘志民,孙亮亮. 氧化应激在糖尿病发病机制中作用的认识 [J]. 内科理论与实践,2007,2(3):153-156. DOI:10.3969/j.issn.1673-6087.2007.03.006.
- [14] 缪莹,万沁. Nrf2/ARE 通路 with 糖尿病相关动脉粥样硬化 [J]. 国际内分泌代谢杂志,2017,37(3):203-206. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2017.03.016.

(收稿日期:2020-09-18)

[1] 姚建,陈名道. 糖尿病肾病及其早期防治[J]. 中华内分泌代谢