

MicroRNA 及其靶基因在糖尿病肾病小鼠肾脏的表达

杨雪唯, 梁小弟, 努尔斯曼古丽·奥斯曼, 陆剑飞, 关亚群, 焦谊

新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011

摘要 验证与糖尿病肾病小鼠肾脏相关的 microRNAs 的表达并运用实时荧光定量 PCR 分析靶基因与糖尿病肾病的关系。以 db/db 小鼠为模型组 (DN 组), db/m 小鼠为正常组 (NC 组), 定期测量小鼠的体重、血糖、甘油三酯、总胆固醇及 24 h 尿蛋白排泄率。留取 DN 小鼠与 NC 小鼠肾脏组织, 检测肾脏组织形态学染色及实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)。qRT-PCR 验证差异表达的 microRNAs 及其靶基因的 mRNA 表达水平。血糖、24 h 尿蛋白排泄率结果表明糖尿病肾病动物模型构建成功。与 NC 小鼠相比, DN 小鼠肾脏 miR-196a、miR-21、miR-200b 表达明显升高, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。miR-196a、miR-200b、miR-21 的表达水平与血糖、甘油三酯、总胆固醇、24 h 尿蛋白排泄率存在正相关关系 ($P < 0.05$)。利用 miRNAs 数据库预测 miR-196a 的靶基因有 ANX1、HOXB7、PTEN、FOXO1、HOXB8、HOXA5 等。与 NC 组比较, DN 组 ANX1、FOXO1 的 mRNA 表达水平降低, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时 ANX1、FOXO1 与 24 h 尿蛋白排泄率存在正相关 ($P < 0.05$)。MiR-196a 可能通过调节 ANX1、FOXO1 的表达水平来参与糖尿病肾病的发生发展。

关键词 糖尿病肾病; microRNA; 实时荧光定量 PCR; 靶基因

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一种以高血糖为特征的慢性代谢性疾病。糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病患者常见的微血管并发症之一, 也是引起终末期肾脏功能衰竭 (end-stage renal disease, ESRD) 的重要诱因^[1-3]。DN 的发病与遗传、代谢、肾脏血流动力学、高血压及细胞因子等作用因素相关^[4], 但具体机制尚不完全清楚。microRNA (miRNA) 是人们近年发现的一种小于 24 个核苷酸的单链、非编码、内源性 RNA 分子, 可在转录后水平通过与靶基因 mRNA 的 3' 非编码区互补配对从而调节基因的表达。研究发现 miRNA 在细胞生长、增殖、分化及凋亡中发挥重要的作用^[5-7]。研究表明, miRNA 不仅与 DM 发生相关^[8], 在 DN 的发病机制中也扮演极为重要的角色^[9-10]。多种 miRNA 在 DN 患者血清及肾脏组织中特异性表达, 其异常表达与炎症反应^[11]、糖脂代谢异常^[12]密切相关, 参与了 DN 的病理生理机制。因此随着研究的不断深入, 某种 miRNA 将可能成为早期 DN 诊断的标志物。db/db 小鼠是目前研究较成熟的 II 型糖尿病动物模型, 主要表现为肾小球系膜细胞增生、基质增多、基底膜增厚、肾间质纤维化及蛋白尿等^[13]。本研究以 db/db 小鼠 (模型

组, DN 组) 与 db/m 小鼠 (正常组, NC 组) 为实验对象, 运用实时荧光定量 PCR 验证差异表达的 miRNA, 并预测其下游靶基因, 探索其与 DN 可能存在的调控关系, 为了解 DN 的发病机制提供新思路。

1 材料

1.1 实验动物

选取遗传背景为 C57BL/KsJ 的 SPF 清洁级 db/db 小鼠 10 只, 4 周龄 (雄性), 体重为 (20.20±1.45)g; 同窝出生的 db/m 小鼠 10 只, 4 周龄 (雄性), 体重为 (14.9±0.72)g, 购自南京大学模式动物研究所。小鼠于新疆医科大学动物实验中心喂养, 每笼 1 只, 小鼠随意进食、饮水, 每天替换垫料使垫料保持洁净干燥, 正常喂养一周以适应新环境。温度为 18~25℃, 相对湿度为 60%~80%, 昼夜交替照明各 12 h, 本动物实验已通过新疆医科大学第一附属医院伦理委员会批准。

1.2 试剂与仪器

实验试剂包括, 甘油三酯 (TG) 测定试剂盒; 总胆固醇 (TC) 测定试剂盒 (北京中生北控生物科技股份有限公司); 24 h 尿

收稿日期: 2016-09-09; 修回日期: 2017-01-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81460162); 高等学校科研计划项目 (XJEDU20141021)

作者简介: 杨雪唯, 硕士研究生, 研究方向为 microRNA 与糖尿病肾病, 电子信箱: 568910956@qq.com; 焦谊 (通信作者), 副教授, 研究方向为代谢性疾病分子机制, 电子信箱: jymiranda@163.com

引用格式: 杨雪唯, 梁小弟, 努尔斯曼古丽·奥斯曼, 等. MicroRNA 及其靶基因在糖尿病肾病小鼠肾脏的表达[J]. 科技导报, 2017, 35(4): 84-89; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.04.015

蛋白测定试剂盒(北京诚林生物科技有限公司);一步法 RT-PCR 试剂盒(凯杰生物工程有限公司);miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒(上海生工生物有限公司);Throme Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(中国赛默飞世尔科技);SYBR[®] Select Master Mix 试剂盒(ABI公司,美国)。实验仪器包括伯乐全波长酶标仪(BIO-RAD公司);实时荧光定量 PCR 热循环仪(ABI公司,美国)等。

2 实验方法

2.1 模型建立与分组

选出的各 10 只 db/db 小鼠与 db/m 小鼠,每周测量体重,双周采集尾尖静脉血,离心取上清用于测量小鼠血糖、甘油三酯、总胆固醇水平,使用代谢笼收集尿液,测定 24 h 的尿蛋白排泄率。当 db/db 小鼠的血糖、24 h 尿蛋白排泄率与 db/m 小鼠比较差异有统计学意义时($P < 0.05$),表明糖尿病肾病动物模型构建成功^[4]。

2.2 标本处理

当 DN 模型构建成功后,于第 20 周将小鼠用水合氯醛麻醉,使用毛细玻璃管在眼眶后静脉丛取血收集至离心管,4℃,3000 r/min 离心 10 min 后取上清。将小鼠解剖,快速剥离双侧肾脏,弃去脂肪,一侧肾脏收集在冻存管中于液氮中冻存,另一侧肾脏置 10% 甲醛溶液中固定。

2.3 血清指标与 24 小时尿蛋白白检测

使用葡萄糖氧化酶法测定血糖含量,根据 TG、TC 试剂盒说明书测定血清中甘油三酯、总胆固醇含量。收集小鼠 24 h 尿液,根据 24 h 尿蛋白测定试剂盒说明书用酶联免疫法测定 24 h 尿蛋白排泄率。

2.4 DN 小鼠肾脏病理学变化

将保存在甲醛溶液中的肾脏组织进行脱水、石蜡包埋,切片厚 3~4 μm,用苏木精-伊红染色(HE)、过碘酸-雪夫染色(PAS)、马森三氏染色(Masson)等方法进行染色处理。在光镜下观察肾小球及肾小管病变情况,主要包括系膜细胞增生、基底膜增厚、肾小管空泡形成、肾间质纤维化、糖原沉积、胶原蛋白沉积等特征性病理变化。

2.5 miRNA 提取与 qRT-PCR 筛选差异表达的 miRNA

称取液氮中保存的小鼠肾脏组织 50 mg,按柱式 miRNA 抽提试剂盒说明书提取组织总 RNA,用微量核酸蛋白分析仪测定 RNA 浓度及纯度,按照逆转录试剂盒操作步骤将 RNA 逆转录成 cDNA,体系包括:5×hispec buffer 4 μL,10×nucleics mix 2 μL,RT-mix 2 μL,RNase-free water 10 μL,总 RNA 2 μL。反应条件:37℃ 60min,95℃ 5min。用 qRT-PCR 检测差异表达的 miRNAs,体系包括:RNase-free H₂O 3 μL,2×qPCR mix 10 μL,Universal primer 2 μL,特异引物 2 μL,Rox(L)1 μL,cDNA 1 μL。反应条件:95℃ 30 s(1个循环),95℃ 5 s,60℃ 30 s(40个循环)。qRT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 miRNA 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primer of miRNA quantitative real-time PCR

miRNA	miRNA 引物序列(5'→3')
miR-196a-5p	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG
miR-187-3p	UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG
miR-709	GGAGGCAGAGGCAGGAGGA
miR-451a	AAACCGUUACCAUUCAGAGUU
miR-98-5p	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU
miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA
miR-21a-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA

注:F为上游引物,R为下游引物。

2.6 miRNA 靶基因预测

根据 miRNAs 数据库:miRBase (<http://www.Mirbase.org>)、TargetScan (<http://targetscan.org>)、PicTar (<http://www.pictar.org>) 预测 miRNA 的靶基因,选取上述 3 个数据库中预测结果的交集作为 miRNA 的靶基因。

2.7 qRT-PCR 检测靶基因的 mRNA 表达水平

按照经典 Trizol 法^[5]提取肾脏组织中总 RNA,用微量核酸蛋白分析仪测定 RNA 浓度及纯度,根据 Throme Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行逆转录。参照 Genbank 的 mRNA 序列,靶基因引物由 Primer 3.0 软件设计,由生工生物有限公司合成(表 2)。根据 SYBR Green 染料法测定靶基因的 mRNA 表达水平,反应条件为:预变性 50℃ 2 min,变性 95℃ 10 min,95℃ 15 s,退火 60℃ 1 min,延伸 95℃ 15 s,实验结果由 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。

表 2 小鼠靶基因引物序列

Table 2 Target gene primer sequences of mice

基因名称	引物序列(5'→3')
<i>β-actin-F</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA
<i>β-actin-R</i>	GGGGTGTGAAGTCTCAAA
<i>ANX1-F</i>	GCCCCTACCCITCTCAAT
<i>ANX1-R</i>	CCAAAACAACCTCCTCCAG
<i>HOXB7-F</i>	GATCTACCCCTGGATGCGAA
<i>HOXB7-R</i>	ATCTGTCTTTCGGTGAGGCA
<i>PTEN-F</i>	GAAAGGGACGGACTGGTGTA
<i>PTEN-R</i>	TACATAGCGCTCTGACTGG
<i>HOXA5-F</i>	CATCTGAGCGGCCAAAGTAC
<i>HOXA5-R</i>	ACGAGAACAGGGCTCTTCA
<i>FOXO1-F</i>	CATTGCGGAAAGAGAGAGCC
<i>FOXO1-R</i>	AGGGGTTGCTGCTGAAATTG
<i>HOXB8-F</i>	GATCGGGGTCTCTAATGGA
<i>HOXB8-R</i>	TCGAAGAAGGGATGCCAGTT

2.8 统计学分析

使用 SPSS 17.0 数据分析软件进行数据统计,所有计量资

料均采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)的形式表示,两组间数据比较采用独立样本t检验分析。 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠各项生化指标

与db/m组小鼠比较,db/db组小鼠的体重在第4周、第8周、第12周、第16周、第20周升高明显,且差异有统计学意义

($P < 0.01$)。与db/m组小鼠比较,db/db组小鼠的血糖、甘油三酯、总胆固醇水平在第4周、第8周、第12周、第16周、第20周持续升高,且差异有统计学意义($P < 0.01$)。与db/m组小鼠比较,db/db组小鼠的24 h尿蛋白排泄率在第12周、16周、20周时升高,且差异有统计学意义($P < 0.01$),根据两组小鼠血糖、24 h尿蛋白排泄率情况分析,说明糖尿病肾病的动物模型构建成功(表3)。

表3 两组小鼠的一般情况与生化指标($\bar{x}\pm s$)

Table 3 General conditions and biochemical indexes of two groups of mice($\bar{x}\pm s$)

实验阶段	体重/g		血糖/(mmol·L ⁻¹)		甘油三酯/(mmol·L ⁻¹)		总胆固醇/(mmol·L ⁻¹)		尿蛋白/(μg/24 h)	
	NC	DN	NC	DN	NC	DN	NC	DN	NC	DN
第4周	14.77±1.03	23.56±1.44**	2.95±1.53	4.34±0.82**	0.45±0.13	1.89±0.30**	1.08±0.20	1.89±0.30**	0.16±0.05	0.18±0.05
第8周	16.02±0.82	27.29±2.75**	3.15±0.92	5.92±1.78**	0.20±0.05	0.38±0.11**	0.69±0.19	1.30±0.29**	0.83±0.3	1.06±0.91
第12周	18.66±1.06	31.02±4.27**	3.43±0.71	8.19±2.63**	0.29±0.06	0.55±0.15**	0.82±0.17	1.69±0.35**	1.24±0.29	3.5±0.45**
第16周	21.05±1.00	38.26±6.53**	3.54±0.53	8.94±3.04**	0.40±0.09	0.85±0.43*	0.88±0.18	1.97±0.11**	1.17±0.2	3.56±0.79**
第20周	22.49±1.27	42.57±6.55**	3.59±0.63	10.43±4.24**	0.41±0.10	0.87±0.04**	0.91±0.18	2.00±0.11**	1.2±0.27	4.54±1.01**

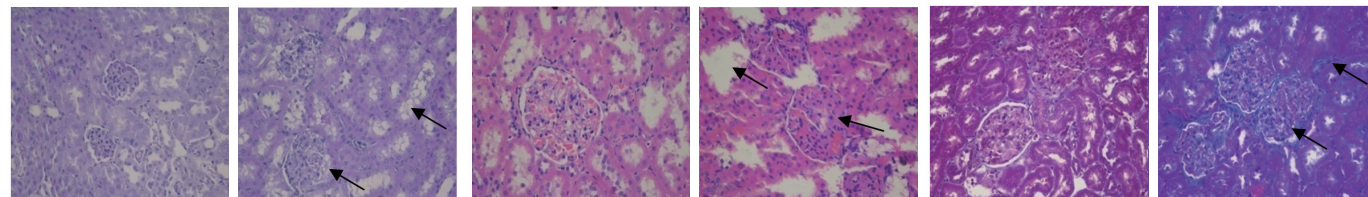
注:与db/m比较,**为 $P < 0.01$ 。

3.2 DN小鼠肾脏病理学变化

本研究通过HE、PAS、Masson染色观察DN小鼠的肾脏病理学改变。由HE染色结果可知, DN小鼠部分肾小球出现系膜增宽、基底膜增厚、肾小管出现空泡样改变, NC小鼠肾小球及肾小管未见明显异常。PAS染色结果显示, DN小鼠部分肾小球系膜内, 紫红色糖原沉积物明显, 肾小管一定程度扩

张, NC小鼠肾小球及肾小管未见明显异常变化, 未见明显紫红色糖原沉积。

Masson染色结果可见, DN组小鼠可见肾小球基底膜一定程度增厚, 蓝紫色胶原纤维染色明显, 出现一定程度扩张及空泡样改变; 肾间质胶原纤维沉积明显, NC小鼠肾小球、肾小管、肾间质胶原纤维染色正常(图1)。



(a) NC小鼠HE染色 (b) DN小鼠HE染色 (c) NC小鼠PAS染色 (d) DN小鼠PAS染色 (e) NC小鼠Masson染色 (f) DN小鼠Masson染色

图1 DN小鼠与NC小鼠肾脏组织形态学染色(400×)

Fig. 1 Renal tissue morphology in DN group and NC group(400×)

3.3 实时荧光定量PCR结果

与NC组小鼠相比, DN组小鼠肾脏中miR-196a、miR-21、miR-200b的表达水平升高明显, 且差异有统计学意义($P < 0.05$), miR-187、miR-709、miR-451、miR-98、miR-29c的表达水平差异没有统计学意义($P > 0.05$), 结果见表4。

3.4 相关性分析

由相关性分析可知, miR-196a的表达水平与血糖、甘油三酯、总胆固醇、24 h尿蛋白排泄率显著正相关(相关系数分别为 $r=0.651$ 、 $r=0.807$ 、 $r=0.419$ 和 $r=0.682$, 所有 $P < 0.05$)。miR-200b的表达水平与血糖、甘油三酯、总胆固醇、24h尿蛋白排泄率显著正相关(相关系数分别为 $r=0.579$ 、 $r=0.61$ 、 $r=$

表4 两组小鼠差异表达的miRNA($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Differential expression of miRNA in two groups of mice($\bar{x}\pm s$)

miRNA	NC组	DN组
miR-196a	1.32±0.33	2.53±0.66**
miR-187	1.37±0.50	1.17±0.34
miR-709	1.56±0.96	1.28±0.89
miR-451	1.34±0.53	1.07±0.27
miR-98	1.21±0.45	1.17±0.32
miR-29c	1.60±0.69	1.96±1.02
miR-200b	1.12±0.38	1.88±0.81*
miR-21	1.42±0.53	2.12±0.74*

注:*为 $P < 0.05$, **为 $P < 0.01$ 。

0.602 和 $r=0.584$, 所有 $P < 0.05$)。miR-21 的表达水平与血糖、甘油三酯、总胆固醇、24 h 尿蛋白排泄率显著正相关(相关

表 5 miRNA 表达水平与小鼠生化指标相关性分析
Table 5 Correlation analysis between miRNA expression and biochemical indexes in mice

miRNA	相关性	生化指标			
		血糖	甘油三酯	总胆固醇	24 h 尿蛋白排泄率
miR-196a	r 值	0.651	0.807	0.419	0.682
	P 值	0.001	0.001	0.021	0.001
miR-200b	r 值	0.579	0.61	0.602	0.584
	P 值	0.001	0.007	0.008	0.011
miR-21	r 值	0.518	0.591	0.583	0.586
	P 值	0.048	0.01	0.011	0.011

注: r 表示相关系数; $P < 0.05$ 表示两组数据正相关。

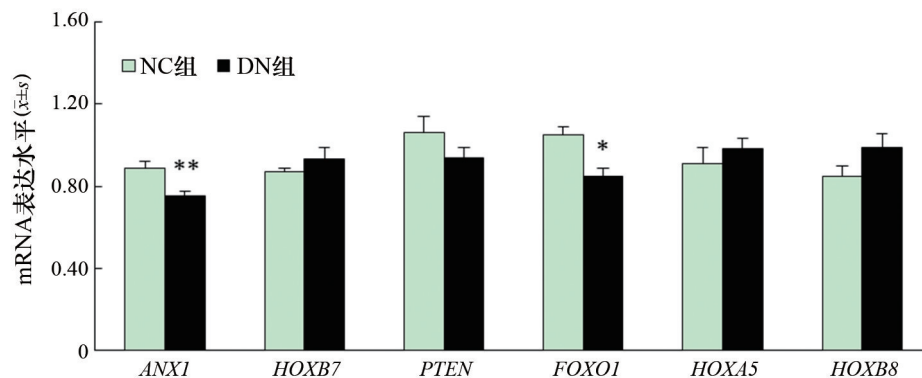
系数分别为 $r=0.518$ 、 $r=0.591$ 、 $r=0.583$ 和 $r=0.586$, 所有 $P < 0.05$)。

3.5 miR-196a 靶基因预测结果

选择差异最显著的 miR-196a 作为本次研究对象并预测其下游靶基因,通过 miRNAs 数据库 miRbase、TargetScan 和 PicTar 预测可能与糖尿病肾病相关的靶基因。包括: *ANXI* (膜联蛋白 A1)、*HOXB7* (同源基因 B7)、*PTEN* (磷酸酶及张力蛋白同源基因)、*FOXO1* (叉头转录因子 O 亚族 1)、*HOXA5* (同源基因 A5)、*HOXB8* (同源基因 B8)。

3.6 miR-196a 靶基因的 mRNA 表达水平

实时荧光定量 PCR 结果显示,与 NC 组相比, *ANXI*、*FOXO1* 在 DN 小鼠肾脏中表达下调,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。但 *HOXB7*、*PTEN*、*HOXA5*、*HOXB8* 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2)。



注:与 NC 组相比,*为 $P < 0.05$,**为 $P < 0.01$

图 2 miR-196a 靶基因的 mRNA 表达水平

Fig. 2 mRNA expression level of miR-196a target gene

3.7 相关性分析

由相关性分析得出,24 h 尿蛋白排泄率与 *ANXI* ($r=-0.898$, $P=0.001$)、*FOXO1* ($r=-0.839$, $P=0.001$) 的表达存在显著负相关(表 6)。

表 6 靶基因与 24h 尿蛋白排泄率相关性分析
Table 6 Correlation analysis between target gene and 24h urinary protein excretion rate

生化指标	相关性	靶基因	
		<i>ANXI</i>	<i>FOXO1</i>
24 h 尿蛋白排泄率	r 值	-0.898	-0.839
	P 值	0.001	0.001

4 讨论与结论

糖尿病肾病(DN)是一种以肾小球系膜细胞异常增殖、基底膜增厚及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积为特征的代谢性疾病,最终发生肾小球硬化,导致肾脏功能

衰竭。因此,抑制系膜细胞增殖及 ECM 堆积在 DN 发生发展中起着非常重要的作用。Choudhur 等^[16]的研究结果表明, DN 约占新诊断终末期肾功能衰竭的 40%,伴有终末期肾脏疾病的糖尿病患者 5 年生存率仅仅只有 20%,因此,探索 DN 的发生原因已成为全球关注的热点。

db/db 小鼠是目前研究较为深入的 II 型糖尿病动物模型,因此,采用 db/db 小鼠作为本课题糖尿病肾病的造模对象,结果显示,db/db 小鼠的体重、血糖、甘油三酯、总胆固醇水平与 db/m 小鼠相比明显升高。微量蛋白尿是 DN 的早期病理特征,db/db 小鼠从第 12 周出现多饮、多尿症状,结果显示 db/db 小鼠的 24 h 尿蛋白排泄率与 db/m 小鼠比较升高明显,且差异有统计学意义。由小鼠血糖、24 h 尿蛋白排泄率结果说明,本次课题 DN 动物模型构建成功。为了观察 db/db 小鼠的肾脏病变情况,进行了肾脏组织 HE、PAS 及 Masson 染色,发现与 db/m 小鼠比较,db/db 小鼠肾脏系膜细胞增生、基底膜增厚及细胞外基质沉积明显,此结果进一步表明 DN 模型成立,但出现的这些肾脏病理变化是由哪些作用因素导致的目前尚不完全清楚。

研究发现,miRNAs 在不同组织的表达有所不同,其表达变化参与人类多种疾病的发生发展,如肿瘤、心血管疾病、糖尿病及其并发症如糖尿病肾病等。Dey 等^[17]研究发现,在糖尿病小鼠与肾间质纤维化大鼠模型中 miR-21 表达升高明显,同时其靶基因 *PTEN* 表达下调,引起系膜细胞肥大、纤连蛋白(FN)表达增加、ECM 沉积的现象。miR-21 促进肾脏纤维化的原因也与 TGF- β /Smad 信号转导通路存在密切联系^[18-19]。近年来,关于 miRNA 与糖尿病肾病发生发展的相关研究备受瞩目。

本研究利用检索 DN 相关文献报道的小鼠肾脏组织差异表达 miRNAs 的芯片结果^[20-21],选择部分差异显著的 miRNAs 在本课题构建的 DN 动物模型中进行验证。在成功构建 DN 动物模型后,使用 qRT-PCR 验证差异表达的 miRNAs,相关性分析发现 miR-196a、miR-200b、miR-21 与血糖、甘油三酯、总胆固醇及 24 h 尿蛋白排泄率显著正相关,查阅相关文献发现 miR-196a 与糖尿病肾病的调控关系尚未见报道,因此选择 miR-196a 作为本课题研究对象。利用 miRNAs 数据库 miR-base、TargetScan 和 PicTar 预测其下游靶基因,发现 miR-196a 调节的靶基因范围非常广泛,涉及细胞增殖、分化、凋亡、血管形成、信号转导等多个方面,筛选出 *ANX1*、*HOXB7*、*PTEN*、*FOXO1*、*HOXA5* 及 *HOXB8* 作为 miR-196a 的靶基因。与 NC 小鼠相比,*ANX1*、*FOXO1* 在 DN 小鼠肾脏中表达显著下调,且差异有统计学意义。

研究报道指出,膜联蛋白(*ANX1*)是一种多功能磷脂酶 A2(PLA2)抑制蛋白,包括参与炎症、信号传递及细胞分化等^[22-24]。Luthra 等^[25]研究发现,*ANX1* 的表达受细胞内小分子、非编码 RNA(miRNA)调控,在食管癌组织中,*ANX1* 与 miR-196a 的表达水平成负相关。Niinuma 等^[26]发现 miR-196a 通过下调 *ANX1* 的表达促进肿瘤细胞增殖。本研究结果显示在 DN 小鼠肾脏组织中 miR-196a 表达上调,且与 *ANX1* 的表达呈负相关,这提示 miR-196a 可能通过下调 *ANX1* 的表达在 DN 的发生发展中发挥重要作用。叉头状转录因子 O1(Forkhead transcription factor O1,*FOXO1*)是 FOX 蛋白家族中的重要一员,国内外研究表明,作为胰岛素与生长因子信号通路中的重要因子,*FOXO1* 通过调节靶基因的表达在调节糖脂代谢、细胞增殖、凋亡与氧化应激等方面发挥重要作用^[27-29]。研究发现,*FOXO1* 在早期糖尿病肾病大鼠的肾皮质与高糖培养的大鼠系膜细胞中均呈低表达状态^[30-31]。本研究结果显示,*FOXO1* 与 miR-196a 在 DN 肾脏中存在负向调控关系,提示,miR-196 可能通过调节 *FOXO1* 的表达在 DN 的发生发展中发挥重要作用。

综上所述,miR-196a 可能通过下调 *ANX1*、*FOXO1* 的表达,在 DN 的发生发展中发挥重要作用,但具体调控机制还有待进一步研究。

参考文献(References)

[1] Mehdi U F, Adams-Huet B, Raskin P, et al. Addition of angiotensin re-

ceptor blockade or mineralocorticoid antagonism to maximal angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic nephropathy[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2009, 20(12): 2641-2650.

- [2] Chow F Y, Nikolic-Paterson D J, Ozols E, et al. Intercellular adhesion molecule-1 deficiency is protective against nephropathy in type 2 diabetic db/db mice[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2005, 16(6): 1711-1722.
- [3] Dronavalli S, Duka I, Bakris G L. The pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 2008, 4(8): 444-452.
- [4] Mora C, Navarro J F. Inflammation and pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Metabolism*, 2004, 53(2): 265-266.
- [5] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [6] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-355.
- [7] Farh K K, Grimson A, Jan C, et al. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution[J]. *Science*, 2005, 310(5755): 1817-1821.
- [8] Dehwah M A, Xu A, Huang Q. MicroRNAs and type 2 diabetes/obesity [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2012, 39(1): 11-18.
- [9] Deshpande S D, Putta S, Wang M, et al. Transforming growth factor- β -induced cross talk between p53 and a microRNA in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2013, 62(9): 3151-3162.
- [10] Alvarez M L, Distefano J K. The role of non-coding RNAs in diabetic nephropathy: Potential applications as biomarkers for disease development and progression[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2013, 99(1): 1-11.
- [11] Ordas A, Kanwal Z, Lindenberg V, et al. MicroRNA-146 function in the innate immune transcriptome response of zebrafish embryos to *Salmonella typhimurium* infection[J]. *BMC genomics*, 2013, 14(1): 696.
- [12] Bhatt K, Kato M, Natarajan R. Mini-review: Emerging roles of microRNAs in the pathophysiology of renal diseases[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2016, 310(2): F109-F118.
- [13] Sharma K, McCue P, Dunn S R. Diabetic kidney disease in the db/db mouse[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2003, 284(6): F1138-F1144.
- [14] 姜华生, 刘建社, 朱忠华, 等. 坎地沙坦对糖尿病肾病小鼠血清和皮质激素诱导的蛋白激酶 1 表达的影响及意义[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(5): 547-550.
- Jiang Huasheng, Liu Jianshe, Zhu Zhonghua, et al. The significance of candesartan on diabetic nephropathy mice induced by serum and glucocorticoid protein kinase 1 expression[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2006, 22(5): 547-550.
- [15] 戴先成, 柴智锋, 徐永城, 等. Trizol 法大鼠心肌总 RNA 提取方法探讨[J]. *刑事技术*, 2014, 39(3): 15-16.
- Dai Xiancheng, Chai Zhifeng, Xu Yongcheng, et al. Study on extraction method of total RNA from rat heart by Trizol[J]. *Forensic Science and Technology*, 2014(3): 15-16.
- [16] Choudhury D, Tuncel M, Levi M. Diabetic nephropathy—A multifaceted target of new therapies[J]. *Discovery Medicine*, 2010, 10(54): 406-415.
- [17] Dey N, Das F, Mariappan M M, et al. MicroRNA-21 orchestrates high glucose-induced signals to TOR complex 1, resulting in renal cell pathology in diabetes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(29): 25586-25603.

- [18] Zhong X, Chung A C, Chen H Y, et al. Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis[J]. *Journal of the American Society Nephrology*, 2011, 22(9): 1668-1681.
- [19] Zarjou A, Yang S, Abraham E, et al. Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: Role of miR-21[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2011, 301(4): F793-F801.
- [20] Zhang Y, Xiao H Q, Wang Y, et al. Differential expression and therapeutic efficacy of microRNA-346 in diabetic nephropathy mice[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2015, 10(1): 106-112.
- [21] Facio FN Jr, Facio M F, Spessoto L F, et al. Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of annexin1 on erectile function after cavernous nerer injury in rats[J]. *Internatinal Journal of Impotence Research*, 2016, 28(6): 221-227.
- [22] Horlacher T, Noti C, de Paz JL, et al. Characterizatoin of annexin-A1 glycan binding reveals binding to highly sulfated glycans with preference for highly sulfated heparan sulfate and heparin[J]. *Biochemistry*, 2011, 50(13): 2650-2659.
- [23] Bizzarro V, Fontanella B, Franceschelli S, et al. Role of Annexin A1 in mouse myoblast cell differentiation[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2010, 224(3): 757-765.
- [24] DAcounto C W, Fontanella B, Rodriquez M, et al. Histone deacetylase inhibitor FR235222 sensitizes human prostate adenocarcinoma cells to apoptosis through up-regulation of Annexin A1[J]. *Cancer Letters*, 2010, 295(1): 85-91.
- [25] Luthra R, Singh RR, Luthra MG, et al. MicroRNA-196a targets annexin A1: A microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers[J]. *Oncogene*, 2008, 27(52): 6667-6678.
- [26] Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, et al. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors [J]. *Cancer Research*, 2012, 72(5): 1126-1136.
- [27] Arden K C. Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer[J]. *Experimental Gerontology*, 2006, 41(8): 709-717.
- [28] Wu Z, Sun H, Zeng W, et al. Upregulation of MircoRNA-370 induces proliferation in human prostate cancer cells by downregulating the transcription factor FOXO1[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45825.
- [29] Hannenhalli S, Kaestner K H. The evolution of *Fox* genes and their role in development and disease[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10 (4): 233- 240.
- [30] Wu L, Zhang Y, Qin G, et al. The effect of resveratrol on *FoxO1* expression in kidneys of diabetic nephropathy rats[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(9): 9085-9093.
- [31] 吉鸿飞, 秦贵军, 张伟伟, 等. 叉头状转录因子O1对高糖培养大鼠肾小球系膜细胞氧化应激的影响[J]. *中华糖尿病杂志*, 2012, 4(11): 681-685.
- Ji Hongfei, Qin Guijun, Zhang Weiwei, et al. Effects of Foxo1 on oxidative stress in rat glomerular mesangial cells cultured with high glucose[J]. *Chinese Journal of Diabetes Mellitus*, 2012, 4(11): 681-685.

Expression of microRNA and target gene in kidney of diabetic nephropathy mice

YANG Xuewei, LIANG Xiaodi, NUERSIMANGULI Aosiman, LU Jianfei, GUAN Yaqun, JIAO Yi

Preclinical Medicine College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract In this paper, the expression of microRNAs in diabetic nephropathy is verified and the relationship between the target genes and the diabetic nephropathy is analyzed by qRT-PCR. With db/db mice as the model group (DN group) and db/m mice as normal group (NC group), we measure the weight, the blood glucose, the triglyceride, the total cholesterol and the 24 h urinary albumin excretion rate in every mice. The renal tissue from the kidney of the DN and NC mice is taken for pathological examination and qRT-PCR. The difference of the expression levels of microRNAs is confirmed by qRT-PCR, and then the mRNA expression of the target genes is verified. The DN animal model is successfully constructed according to the blood glucose and the 24 h urinary albumin excretion rate results. The expression levels of miR-196a, miR-21 and miR-200b are significantly increased in the DN mice compared with the NC mice, and the difference is statistically significant ($P < 0.05$). The expression levels of miR-196a, miR-200b and miR-21 are positively correlated with the level of the blood glucose, the triglyceride, the total cholesterol and the 24h urinary protein excretion rate. The microRNAs database is used to predict the target genes of miR-196a, including *ANXI*, *HOXB7*, *PTEN*, *FOXO1*, *HOXB8* and *HOXA5*. The expression levels of the *ANXI* and the *FOXO1* are significantly lower in the DN mice compared with the NC group, and the difference is statistically significant ($P < 0.05$). There is a positive correlation between the *ANXI*, the *FOXO1* and the 24 h urinary protein excretion rate. It is concluded that miR-196a may be involved in the development of the diabetic nephropathy to regulate the expressions of the *ANXI* and the *FOXO1*.

Keywords diabetic nephropathy; microRNA; quantitative real-time PCR; target genes

(责任编辑 田恬)