

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research微小 RNA - 142a - 3p 通过靶向下调 Atg161l
表达介导阿霉素肾病的研究Research of microRNA - 142a - 3p mediates adriamycin - induced nephropathy by
targeting down - regulation of Atg161l expression袁瑞阳, 丁海麦, 赵 星,
苏力德, 张学明(包头医学院 基础医学与法医学院, 内蒙古自治区
包头 014040)YUAN Rui - yang, DING Hai - mai,
ZHAO Xing, SU Li - de,
ZHANG Xue - ming(School of Basic Medicine and Forensic
Medicine, Baotou Medical College,
Baotou 014040, Inner Mongolia
Autonomous Region, China)

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金资助项目(2020MS08015、2020MS08007); 内蒙古自治区留学回区人员创新启动支持计划基金资助项目(2021); 内蒙古自治区科技创新引导奖励基金资助项目(Z19SQ2 - CZT01); 包头医学院花蕾计划基金资助项目(HLJH202315)

作者简介: 袁瑞阳(1998 -), 女, 硕士研究生, 主要从事慢性肾病的相关研究

通信作者: 张学明, 教授, 硕士生导师

MP: 13030486978

E - mail: byzhxm @ 126. com

摘要:目的 探究微小 RNA - 142a - 3p(miR - 142a - 3p)介导阿霉素肾病(AN)的作用机制。方法 将 BALB/c 小鼠随机分为正常组与模型组, 模型组通过尾静脉一次性注射 $10.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 阿霉素; 正常组使用相同方法注射等体积 0.9% NaCl。饲养 28 d 后取其两侧肾组织用于后续实验。用实时荧光定量聚合酶链反应(RT - qPCR)检测肾组织中 miR - 142a - 3p 表达情况; 用蛋白质印迹法检测肾组织中自噬相关蛋白 16 样蛋白 1(Atg161l)及炎症相关的 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)、白细胞介素 - 1β (IL - 1β)和白细胞介素 - 18(IL - 18)蛋白的相对表达水平。将人胚肾 HEK293T 细胞分为 Atg161l - WT + NC 转染组(转染 pmirGLO - Atg161l - WT 和 NC mimics)和 Atg161l - WT + miRNA - 142a - 3p 转染组(转染 pmirGLO - Atg161l - WT 和 miR - 142a - 3p mimics)。用双荧光素酶实验检测 miR - 142a - 3p 对 Atg161l 的靶向调控。**结果** 正常组与模型组肾组织中 miR - 142a - 3p 的相对表达水平分别为 1.20 ± 0.27 、 2.02 ± 0.14 ; Atg161l 蛋白的相对表达水平分别为 0.81 ± 0.13 、 0.57 ± 0.12 ; NLRP3 蛋白相对表达水平分别为 0.49 ± 0.11 、 0.82 ± 0.14 ; IL - 1β 蛋白相对表达水平分别为 0.55 ± 0.11 、 0.84 ± 0.08 ; IL - 18 蛋白相对表达水平分别为 0.41 ± 0.15 、 0.74 ± 0.09 , 模型组上述指标与正常组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。Atg161l - WT + NC 转染组和 Atg161l - WT + miRNA - 142a - 3p 转染组的相对荧光活性分别为 1.26 ± 0.07 和 0.92 ± 0.10 , 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 阿霉素肾病小鼠肾组织中 miR - 142a - 3p 下调靶蛋白 Atg161l 的表达, 激活炎症小体 NLRP3 通路, 促进阿霉素小鼠肾病的进行性发展。

关键词: 阿霉素肾病; 微小 RNA - 142a - 3p; 自噬相关蛋白 16 样蛋白 1; 炎症小体

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.03.015

中图分类号: R97 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)03-0372-04

Abstract: Objective To explore effect and mechanism of microRNA 142a - 3p (miR - 142a - 3p) on adriamycin - induced nephropathy (AN). **Methods** BALB/c mice were randomly divided into normal group and model group. The model group was injected with $10.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ doxorubicin at a time through the tail vein, and the normal group was injected with equal volume 0.9% NaCl by the same method. After 28 days of feeding, both sides of the kidney tissues were taken for experiment. Real - time quantitative polymerase chain reaction (RT - qPCR) was used to detect the expression of miR - 142a - 3p in the renal tissues. The expression levels of autophagy related protein 16 - like

protein 1 (Atg16l1) and inflammatory NOD-like receptor heat protein domain associated protein 3 (NLRP3), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-18 (IL-18) in the renal tissues were detected by Western blotting. Human embryonic kidney 293T cells were divided into Atg16l1-WT + NC transfection group (transfected pmirGLO-Atg16l1-WT and NC mimics) and Atg16l1-WT + miRNA-142a-3p group (transfected pmirGLO-Atg16l1-WT and miR-142a-3p mimics). Dual luciferase assay was used to detect the targeted regulation of miR-142a-3p on Atg16l1. **Results** The expression levels of miR-142a-3p in kidney tissues of normal group and model group were 1.20 ± 0.27 and 2.02 ± 0.14 ; the expression levels of Atg16l1 were 0.81 ± 0.13 and 0.57 ± 0.12 , NLRP3 were 0.49 ± 0.11 and 0.82 ± 0.14 ; IL-1 β were 0.55 ± 0.11 and 0.84 ± 0.08 ; IL-18 levels were 0.41 ± 0.15 and 0.74 ± 0.09 , respectively, and the above indexes in the model group were significantly different from those in the normal group (all $P < 0.05$). The relative luciferase activity in Atg16l1-WT + NC transfection group and Atg16l1-WT + miRNA-142a-3p transfection group were 1.26 ± 0.07 and 0.92 ± 0.10 , respectively, with statistical significance (all $P < 0.05$). **Conclusion** MiR-142a-3p down-regulates the expression of target protein Atg16l1 in renal tissue of adriamycin nephropathy mice, which activates NLRP3 pathway of inflammatory bodies and promotes the progressive development of adriamycin-induced nephropathy.

Key words: adriamycin-induced nephropathy; microRNA-142a-3p; autophagy associated protein 16-like protein-1; inflammatory body

阿霉素肾病模型是一种用于慢性肾病机制研究的理想动物模型^[1]。氧化应激、炎症反应与慢性肾病的发生、发展息息相关^[2]。自噬作为调控炎症与氧化应激损伤的关键机制,与慢性肾病的发展密切联系,且有研究指出该机制可能为延缓慢性肾病进行性发展的核心机制^[3]。微小RNA-142a-3p(miR-142a-3p)在脊椎动物中高度保守,与自噬、炎症的相关性已在心血管疾病、胰腺癌及克罗恩病等疾病中得到证实^[1,4]。本研究旨在探究 miR-142a-3p 通过调控肾自噬介导阿霉素肾病的作用机制,以期为慢性肾病的治疗提供参考。

材料与方法

1 材料

动物 SPF级健康雄性 BALB/c 小鼠,鼠龄为 8 周,体质量为 (20 ± 2) g,购自北京斯贝福生物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。本实验经包头医学院动物伦理委员会批准(伦理编号:2022083)。

细胞 人胚肾 HEK293T 细胞,购自浙江美森细胞科技有限公司。

试剂 微小 RNA 提取试剂盒、微小 RNA 反转录试剂盒、微小 RNA 荧光定量试剂盒,均由北京天根生化科技有限公司生产;miR-142a-3p mimics、NC mimics 及 miR-142a-3p 引物,均由广州锐博生物技术有限公司生产;Lipofectamine® 2000,美国赛默飞世

尔科技公司生产;pmirGLO 质粒,武汉森灵生物科技有限公司生产;野生型重组质粒(pmirGLO-Atg16l1-WT)、突变型重组质粒(pmirGLO-Atg16l1-MUT)均由本实验室构建,并经北京睿博兴科公司测序验证;双荧光素酶检测试剂盒,美国 Promega 公司生产;自噬相关蛋白 16 样蛋白 1 (autophagy related protein 16-like protein-1, Atg16l1)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18)、IL-1 β 兔单克隆抗体,均由武汉 ABclonal 生物科技有限公司生产。

仪器 DM4B + DFC450C 智能荧光显微成像系统,德国 Leica 公司产品;c300 化学发光成像仪,美国 Azure 公司产品;StepOnePlus 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)仪,美国 ABI 公司产品;3001 酶标仪,美国 Thermo 公司产品。

2 实验方法

2.1 动物实验

2.1.1 分组与采样^[5]

将 BALB/c 小鼠随机分为正常组与模型组,模型组小鼠尾静脉一次性注射 $10.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 阿霉素,正常组用相同方法注射等体积 0.9% NaCl。正常饲养 28 d 后,摘取小鼠两侧肾组织,分装编号,置于 -80°C 冰箱保存待用。

2.1.2 RT-qPCR 检测 miR-142a-3p 表达水平^[6]

取正常组与模型组小鼠肾组织,分别添加磁珠与

裂解液,在提前预冷的匀浆仪中进行研磨,用微小 RNA 提取试剂盒提取总 miRNA,检测 RNA 浓度及纯度,选用 A260/ A280 >2.0 的 RNA 样品;微小 RNA 反转录试剂盒进行反转;微小 RNA 荧光定量试剂盒(SYBR Green)进行 RT-qPCR,配制 20 μL 体系,内参为 U6。反应条件为 95 ℃ 15 min;94 ℃ 20 s;60 ℃ 34 s。微小 RNA 的相对表达水平用 2^{-ΔΔCT}方法进行计算。

2.1.3 蛋白质印迹法检测蛋白表达情况^[7]

取正常组与模型组小鼠的肾组织,分别添加磁珠与裂解液,在提前预冷的匀浆仪中进行研磨,用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,孵育一抗(1:1 000),4 ℃ 过夜,洗膜 3 次,每次 10 min,孵育二抗(1:3 000)室温 2 h,洗膜 3 次,每次 10 min; Azure 仪器选择化学发光影像采集模式观察拍照,用 Image J 软件进行目的蛋白相对定量分析统计。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养与转染^[8]

人胚肾 HEK293T 细胞培养于 37 ℃、5% CO₂ 环境下,细胞培养用含有 10% 胎牛血清的杜氏培养液(DMEM)。取一定量生长状态良好的人胚肾 HEK293T 细胞于转染前 1 d 接种于 24 孔板,待贴壁细胞密度约为 70%~80%,用 Lipofectamine® 2000 进行转染,转染 4 h 后,继续培养 20 h。

2.2.2 实验分组

将人胚肾 HEK293T 细胞分成 pmirGLO + NC 转染组(转染 pmirGLO 和 NC mimics)、pmirGLO + miRNA-142a-3p 转染组(转染 pmirGLO 和 miR-142a-3p mimics)、Atg16l1-WT + NC 转染组(转染 pmirGLO-Atg16l1-WT 和 NC mimics)、Atg16l1-WT + miRNA-142a-3p 转染组(转染 pmirGLO-Atg16l1-WT 和 miR-142a-3p mimics)、Atg16l1-MUT + NC 转染组(转染 pmirGLO-Atg16l1-MUT 和 NC mimics)、Atg16l1-MUT + miRNA-142a-3p 转染组(转染 pmirGLO-Atg16l1-MUT 和 miR-142a-3p mimics)。

2.2.3 双荧光素酶实验^[9]

将转染后的 HEK293T 细胞进行清洗,加入裂解液,轻缓晃动 15 min 使细胞充分裂解,收集待测样品。在避光 96 孔板中加入待测样品后,依次加入 2 种荧光素酶试剂,用酶标仪检测相应的光密度值。

3 统计学处理

用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较用非配对样本 *t* 检验,多

组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA)。

结 果

1 miR-142a-3p 的相对表达情况

将小鼠随机分为正常组(注射等体积 0.9% NaCl)与模型组(注射 10.5 mg·kg⁻¹ 阿霉素)。

正常组与模型组肾组织中 miR-142a-3p 相对表达水平分别为 1.20 ± 0.27、2.02 ± 0.14,在统计学上差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

2 miR-142a-3p 调控肾组织中炎症相关蛋白的表达情况

2.1 miR-142a-3p 表达对 Atg16l1 表达的影响

正常组与模型组小鼠肾组织中 Atg16l1 的相对表达水平分别为 0.81 ± 0.13、0.57 ± 0.12,在统计学上差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 1。

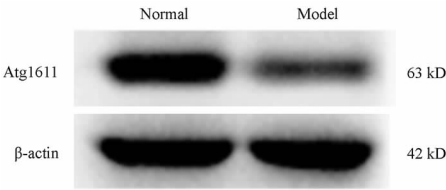


图 1 正常组与模型组肾组织中自噬相关蛋白 16 样蛋白 1 (Atg16l1) 蛋白表达情况

Figure 1 Expression of autophagy related protein 16-like protein-1 (Atg16l1) in kidney tissue of normal group and model group.

Model group: Male BALB/c mice were injected with 10.5 mg·kg⁻¹ doxorubicin in the tail vein; Normal group: Using the same method of injection of equal volume 0.9% NaCl.

2.2 Atg16l1 的表达减少促进炎症相关蛋白的表达情况

正常组与模型组肾组织中 NLRP3、IL-18、IL-1β 蛋白的相对表达水平均显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05),见表 1。

表 1 正常组与模型组肾组织中炎症相关蛋白相对表达水平 (*n* = 5, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 The relative expression levels of inflammation-related proteins in kidney tissues of normal group and model group(*n* = 5, $\bar{x} \pm s$)

Group	NLRP3	IL-1β	IL-18
Normal	0.49 ± 0.11	0.55 ± 0.11	0.41 ± 0.15
Model	0.82 ± 0.14 *	0.84 ± 0.08 *	0.74 ± 0.09 *

NLRP3: NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3; IL: Interleukin; Compared with normal group, * *P* < 0.05.

3 miR-142a-3p 与 Atg161l 的靶向关系

pmirGLO + NC 转染组、pmirGLO + miRNA-142a-3p 转染组相对荧光活性分别为 1.00 ± 0.02 、 1.00 ± 0.00 、Atg161l-WT + NC 转染组、Atg161l-WT + miRNA-142a-3p 转染组分别为 1.26 ± 0.07 、 0.92 ± 0.10 、Atg161l-MUT + NC 转染组、Atg161l-MUT + miRNA-142a-3p 转染组分别为 1.03 ± 0.02 、 1.01 ± 0.02 。Atg161l-WT + miRNA-142a-3p 转染组与 Atg161l-WT + NC 转染组相比,荧光素酶活性明显降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

讨 论

自噬与阿霉素肾病密切相关,高水平基础自噬可以发挥肾保护作用,如真武汤和越婢汤可以通过升高阿霉素肾病大鼠肾组织自噬水平,改善大鼠肾功能和病理损伤^[10],而在肾组织损伤及蛋白尿产生初期,肾自噬水平低,肾病进程加速。在众多的自噬相关基因中,Atg161l 是自噬过程中蛋白质复合体必不可少的组分,有研究者建议将 pAtg161l^{s278} 作为新的自噬标志物,检测自噬水平^[11]。此外,在异常骨肉瘤细胞中 Atg161l 是 miR-410 的一个靶蛋白,miR-410 抑制骨肉瘤细胞自噬水平,从而增强了西罗莫司和阿霉素等化疗药物治疗的敏感性^[12]。

miRNAs 表达失调与肾疾病的发生发展有关^[13],如 miR-141 表达水平升高加速糖尿病肾病患者肾病理损害^[14]。本实验发现炎症相关 miR-142a-3p 在阿霉素肾病肾组织中表达水平显著升高,负向调节靶蛋白 Atg161l,降低了肾自噬水平。自噬功能障碍会导致 NLRP3 炎症小体过度活化,招募并活化半胱氨酸蛋白酶-1(cysteiny aspartate specific proteinase-1, Caspase-1),Caspase-1 切割消皮素 D(Gasdermin D, GSDMD),释放 N 端活性片段,使其结合到膜上产生膜孔,导致细胞膜内外渗透压的变化,细胞胀大,最终破裂,释放 IL-18、IL-1 β 炎症因子等内容物,从而引发炎症疾病^[15],自噬被认为是 NLRP3 的主要调节者,在一些与 NLRP3 炎症小体相关的炎症性疾病中具有保护作用^[16]。本研究发现阿霉素肾病肾组织炎症相关分子、IL-18、NLRP3-1 β 蛋白的相对表达水平均显著升高。

本实验发现阿霉素肾病小鼠肾组织 miR-142a-3p 相对表达水平升高,其靶蛋白 Atg161l 表达下调,炎症小体通路蛋白表达升高,表明 miR-142a-3p 参与阿霉素肾病进程,其机制是通过靶向调控 Atg161l,降低自噬水平,加重肾炎症反应,加速肾病进程。本研究

为 miR-142a-3p 可能作为慢性肾病评估的生物标志物和慢性肾病的治疗提供了参考。

参考文献:

- [1] WANG C S, GREENBAUM L A. Nephrotic syndrome [J]. *Pediatr Clin North Am*, 2019, 66(1): 73—85.
- [2] 贺升升,李爱平,张王宁,等.阿霉素肾病模型及其病理机制研究进展[J].*中草药*, 2018, 49(22): 5426—5434.
- [3] 范桢亮,孙可,杨梦凡,等.线粒体自噬-NLRP3 炎症小体 Cross-Talk 在肾间质纤维化中的作用[J].*中国中西医结合肾病杂志*, 2023, 24(5): 462—464.
- [4] YANG Y, YANG C, GUO Y F, et al. MiR-142a-3p alleviates Escherichia coli derived lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting TAB2 [J/OL]. *Microb Pathog*, 2019, 136: e721—e728. 2019-09-05 [2024-07-14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31494298/>.
- [5] 徐成. CDDO-Me 对阿霉素肾病小鼠足细胞的保护作用及机制探讨[D]. 广东广州:南方医科大学, 2020.
- [6] 林莉. miRNA-21 对大鼠糖尿病肾病 TGF- β /Smad 信号通路的调控机制研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2014.
- [7] 王知广. miRNA 182-5p 靶向 NOX4/DRP1/NLRP3 信号轴缓解哮喘气道炎症的作用及机制研究[D]. 吉林 延边:延边大学, 2021.
- [8] 张先燎. 环状 RNA circRNA-0102049 通过 miRNA-520g-3p/PLK2 促进骨肉瘤进展的机制研究[D]. 广东广州:南方医科大学, 2022.
- [9] ZHANG H, ZHU C, HE Z, et al. LncRNA PSMB8-AS1 contributes to pancreatic cancer progression via modulating miR-382-3p/STAT1/PD-L1 axis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 179—192.
- [10] 宋纯东,宋丹,段风阳,等.真武汤、越婢汤对阿霉素肾病大鼠肾组织自噬相关基因 PTEN/LC3 的影响[J].*中华中医药学刊*, 2023, 41(1): 259—260.
- [11] TIAN W, ALSAADI R, GUO Z, et al. An antibody for analysis of autophagy induction [J]. *Nat methods*, 2020, 17(2): 232—239.
- [12] CRUZEIRO G A V, DOS REIS M B, SILVEIRA V S, et al. HIF1A is overexpressed in medulloblastoma and its inhibition reduces proliferation and increases EPAS1 and ATG16L1 methylation [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2018, 18(3): 287—294.
- [13] MAHTAL N, LENOIR O, TINEL C, et al. MicroRNAs in kidney injury and disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2022, 18(10): 643—662.
- [14] 李杨. miR-141 靶向 FZD4 调节 Wnt/ β -catenin 信号通路促进糖尿病肾病的进展[J].*中华航海医学与高气压医学杂志*, 2023, 30(4): 449—455.
- [15] HUANG Y, XU W, ZHOU R. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2114—2127.
- [16] KABAT A M, HARRISON O J, RIFFELMACHER T, et al. The autophagy gene Atg16l1 differentially regulates Treg and TH2 cells to control intestinal inflammation [J]. *Elife*, 2016, 24(5): 12444—12454.

(收稿日期 2024-08-10)