

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.24.003

MicroRNA-21 在单侧输尿管梗阻大鼠间质纤维化肾脏组织中的表达及意义*

雷学智,徐小龙,胡建敏,孙光曦,李 民,郭 颖,陈 桦,张焕标,赵 明[△]
(南方医科大学珠江医院器官移植科,广州 510282)

[摘要] **目的** 观察 MicroRNA-21(miRNA-21)在单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾脏组织中的表达,初步探讨其在转化生长因子- β 1(TGF- β 1)/Smad3 致大鼠肾间质纤维化(RIF)信号通路中的机制。**方法** 选择 20 只 SD 雄性大鼠,分为 UUO 组和假手术组(Sham 组),分别于建模后第 3 天、第 7 天各采集每组 5 只大鼠肾脏组织,应用实时荧光定量 PCR(Real-time qPCR)方法检测肾脏组织中 miRNA-21 的表达变化,采用 Masson 染色、苏木素-伊红(HE)染色和免疫组织化学技术评价肾组织纤维化,使用免疫组织化学检测肾脏组织中 TGF- β 1、Smad3、I 型胶原蛋白(Col-I)和 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达情况。**结果** 建模后第 3 天和第 7 天 UUO 组肾脏组织中 miRNA-21 与 Sham 组比较均升高($P < 0.01$),7 d UUO 组肾脏组织中 miRNA-21 与 3 d UUO 组相比升高($P < 0.01$)。建模后 3、7 d UUO 组 Masson 染色纤维化评分、TGF- β 1、Smad3、 α -SMA 及 Col-I 蛋白阳性表达面积较 Sham 组升高($P < 0.01$),以上指标 7 d UUO 组较 3 d UUO 组比较表达增强($P < 0.01$)。UUO 组肾脏组织中 miRNA-21 的表达与肾间质纤维化评分正相关($r = 0.888, P < 0.01$);肾组织 miRNA-21 与 TGF- β 1、Smad3、Col-I、 α -SMA 蛋白表达呈正相关($r = 0.799, 0.849, 0.882, 0.896, P < 0.01$)。**结论** UUO 大鼠肾组织中 miRNA-21 在建模后表达上调,且间质纤维化程度越重表达越高,TGF- β 1/Smad3 信号通路可能是通过上调 miRNA-21 从而介导大鼠肾间质纤维化。

[关键词] 微 RNAs;输尿管;梗死;转化生长因子 β ;Smad3 蛋白质

[中图分类号] R334+.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)24-3319-04

Expression and significance of MicroRNA-21 in renal tubulointerstitial fibrosis tissues of UUO rats*

Lei Xuezhi, Xu Xiaolong, Hu Jianmin, Sun Guangxi, Li Min, Guo Ying, Chen Hua, Zhang Huanbiao, Zhao Ming[△]

(Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression of MicroRNA-21(miRNA-21)in kidney tissue of unilateral ureteral obstruction (UUO) rats and explore mechanisms of miRNA-21 involved in TGF- β 1/Smad3 signaling pathway in renal interstitial fibrosis (RIF). **Methods** Totally 20 adult male SD rats were divided into UUO group and Sham operation group. The left ureter of rats in UUO group were ligated, and the rats in sham group were dissociated left ureter only, but not to be obstructed. The left kidney tissue was collected at the 3rd, 7th days after surgery. Real-time quantitative PCR analysed the expression of miRNA-21. Masson staining, HE staining and immunohistochemistry staining were used to evaluate the degree of RIF. The expression of transforming growth factor- β 1(TGF- β 1), Smad3, α -smooth muscle actin (α -SMA), and collagen I (Col-I) were examined by immunohistochemistry staining. **Results** The expression of miRNA-21 in kidney tissue was higher at 3rd, 7th days after surgery in UUO groups than that in Sham group ($P < 0.01$). The expression in UUO group at 7th day was higher than 3rd day after surgery ($P < 0.01$). The fibrosis score, positive TGF- β 1, Smad3, Col-I, α -SMA area in UUO group were significantly higher than those of Sham group at 3rd, 7th days ($P < 0.01$), which at 7th day were higher than 3rd day in UUO group ($P < 0.01$). The expressions of miRNA-21 in kidney tissue was positive correlations with the fibrosis score ($r = 0.888, P < 0.01$). The expressions of miRNA-21 in kidney tissue was positive correlations with TGF- β 1, Smad3, Col-I, α -SMA ($r = 0.799, 0.849, 0.882, 0.896, P < 0.01$). **Conclusion** The expression of miRNA-21 was upregulated in UUO kidney tissue after model establishment. The RIF degree might be positive correlations with miRNA-21 expression, and TGF- β 1/Smad3 signaling pathway positively regulate miRNA-21 to mediate rats RIF.

[Key words] microRNAs; ureter; infarction; transforming growth factor beta; Smad3 protein

慢性肾脏病(CKD)在中国已经成为最为严重的公共卫生问题之一^[1-2],而肾间质纤维化(RIF)是CKD发展为终末期肾衰竭的共同路径。大量研究证明转化生长因子- β 1(TGF- β 1)/Smad 信号通路在器官纤维化的发展过程中起着主要作用^[3],且有报告指出 TGF- β 1/Smad 信号通路可能通过调控下游多种 microRNA,从而控制上皮间质转化(EMT)及纤维化^[4-6]。目

前国内关于 miRNA-21 在肾脏纤维化机制中的作用报道较少,本实验通过测定 miRNA-21 在单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾脏组织中的表达,初步探讨其在 TGF- β 1/Smad3 信号通路中的机制及意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选择成年 SD 雄性大鼠 20 只,体质量 200~220 g,购于南方医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂和仪器 RNAlater 试剂(美国 Sigma 公司), RT primers(上海百力格生物技术有限公司),兔抗 Smad3 单克隆抗体(美国 Millipore 公司),兔抗 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)单克隆抗体(美国 Millipore 公司),兔抗 TGF- β 1 抗体(英国 Abcam 公司),兔抗 I 型胶原蛋白(Col-I),多克隆抗体(英国 Abcam 公司),免疫组织化学试剂盒(美国 St. Louis 公司),实时定量 PCR 引物(上海康成生物)。ViiA 7 Real-time PCR System(美国 Applied Biosystems)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组、模型建立及标本收集 20 只 SD 大鼠分为 UUO 组和假手术组(Sham 组),以 5% 异戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉满意后,腹部皮肤备皮消毒,取左侧腹部肾区切口进入腹腔,UUO 组大鼠游离左侧输尿管,并在其上 1/3 水平处及肾门处以 4-0 手术线结扎,逐层缝合关闭腹腔。Sham 组大鼠只分离但不结扎左侧输尿管。将上述大鼠在建模后第 3 天、第 7 天在腹腔麻醉下以 0℃ 生理盐水灌注血管,并取两组大鼠左侧肾脏,将部分肾脏组织置于 10% 福尔马林中固定,部分肾脏置于 5 倍体积的 RNA later 试剂中 4℃ 孵育过夜后 -20℃ 保存。

1.2.2 观察及检测

1.2.2.1 肾脏组织苏木素-伊红(HE)、Masson 染色观察 将固定在 10% 福尔马林中的肾脏组织进行脱水、透明、浸蜡、包埋,制成 4 μ m 厚石蜡切片,按常规方法进行 HE、Masson 染色。切片 HE 染色观察肾小管上皮细胞空泡变性,肾小管萎缩和扩张、间质水肿、纤维化及炎症细胞浸润等评价肾小管间质损伤情况。Masson 染色肾脏纤维化半定量评分^[7]:在 200 倍视野下,随机选取每张切片 5 个互不重叠的肾小管间质视野,根据视野中胶原染色阳性面积占整个视野面积的百分比进行半定量分析,标准为:阳性面积小于 2%,0 分;阳性面积 2%~<11% 为轻度病变,1 分;阳性面积 11%~<21% 为中度病变,2 分;阳性面积 21%~30% 为重度病变,3 分;阳性面积大于 30% 为极重度病变,4 分。

1.2.2.2 肾脏组织免疫组织化学 SP 染色观察 大鼠肾脏组织切片脱蜡和梯度乙醇脱水,在 3% H_2O_2 室温下孵育阻断内源性 H_2O_2 酶,95℃ 煮沸行抗原修复,胎牛血清工作液封闭,一抗分别加入抗 TGF- β 1(1:100)、抗 Smad3(1:200)、抗 α -SMA(1:200)、抗 Col-I(1:200),4℃ 孵育过夜,再依次加入生物素偶联二抗、辣根过氧化物酶标记链霉素卵白素、DAB 显色、苏木素复染,最后依次进行梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。在光学显微镜 200 倍视野下观察,每张切片随机取 5 个互不重叠视野拍照。Image-Pro Plus 6.0 软件分析每张照片中阳性染色面积。TGF- β 1、Smad3、Col-I 和 α -SMA 表达量以阳性面积百分比表示。

1.2.2.3 实时荧光 PCR 检测 microRNA-21 的表达 UUO 组和 Sham 组大鼠第 3 天及第 7 天肾脏组织 RNA 抽提按照 Trizol 试剂说明书进行,并使用紫外吸收对抽提出的 RNA 进行纯度和浓度检测,测得 A260/A280 比值 1.8~2.1,变性琼脂糖凝胶电泳显示总 RNA 完整。使用抽提出的肾脏组织 RNA 进行 cDNA 合成,配备 RT 反应液后在 PCR 扩增仪进行 RT 反应。实时荧光定量 PCR(Real-time qPCR)检测组织中

microRNA-21,使用 U6 作为内参,引物设计 U6, F: 5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T-3', R: 5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'; rno-miR-21, GSP, 5'-GGG GGG TAG CTT ATC AGA CTG-3', R: 5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3',将所有 cDNA 样品分别配置 Real-time qPCR 反应体系,5 000 r/min 短暂离心。将 8 μ L 混合液加到 384-PCR 板对应的每个孔中,再加入对应的 2 μ L cDNA,短暂离心混合,在设置 PCR 程序前将准备好的 PCR 板放在冰上,将上述 384-PCR 板置于 Real-time PCR 仪上进行 PCR 反应。U6 指标均按以下程序进行:95℃,10 min,40 个 PCR 循环。为了建立 PCR 产物的熔解曲线,扩增反应结束后,按 95℃,10 s;60℃,60 s;95℃,15 s,从 60℃ 缓慢加热到 99℃(仪器自动进行-Ramp Rate 为 0.05℃/s)。各样品的目的 miRNA 和内参(U6)分别进行 Real-time qPCR 反应,数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析,Sham 组 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 为 1 作为基准校正。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行分析,计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,相关性分析采用 Spearman 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肾脏病理结果 观察 HE 染色切片,Sham 组肾单位大小形态未见异常;UUO 组建模后 3 d 见肾小管轻度扩张、小管上皮空泡样变,间质轻度水肿并散在炎症细胞,建模后 7 d 即可观察到明显的肾间质增宽、胶原沉积增加、肾小管萎缩等,炎症细胞浸润明显,证明建模成功。在光镜下观察 Masson 染色大鼠肾脏组织,Sham 组第 3 天和第 7 天肾单位及间质未见异常;UUO 组建模后第 3 天,可见肾小管管腔轻度扩张,部分间质可见少量淡蓝色胶原组织沉积,UUO 组建模后第 7 天,肾小管较第 3 天模型组明显扩张,间质水肿增宽明显伴单核细胞及淋巴细胞广泛浸润,间质胶原纤维进行性增多、面积扩大、蓝染加重(图 1)。UUO 组和 Sham 组 3 d、7 d 组织 Masson 染色胶原阳性面积评分组间比较差异有统计学意义($F = 194.228$, $P < 0.01$),UUO 组 3 d 和 7 d 肾脏组织纤维化程度评分明显高于同时期 Sham 组($P < 0.01$),UUO 组 7 d 纤维化面积与 3 d 相比显著增多($P < 0.01$),见图 2。

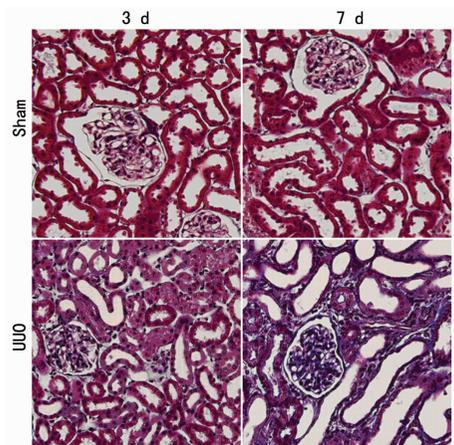
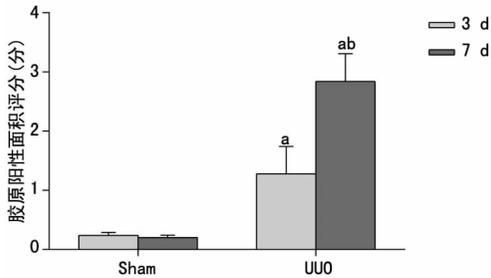


图 1 两组大鼠肾脏组织病理形态(Masson $\times 200$)

2.2 不同时间点肾脏中 microRNA-21 的表达 建模后 3、7 d UUO 和 Sham 组肾脏组织中 miRNA-21 表达组间存在差异 [(2.33 ± 0.46) vs. (3.50 ± 0.41)], $F = 61.381$, $P < 0.01$];两两比较发现,大鼠肾脏组织中 miRNA-21 在 UUO 组 3 d 和 7 d 的

表达量与 Sham 组(1.00±0.00)比较明显升高($P<0.01$),7 d UUO 组肾组织中 miRNA-21 较 3 d UUO 组明显升高($P=0.008$)。



a: $P<0.01$, 与相同时间点 Sham 组比较; b: $P<0.01$, 与 UUO 组建模后 3 d 比较。

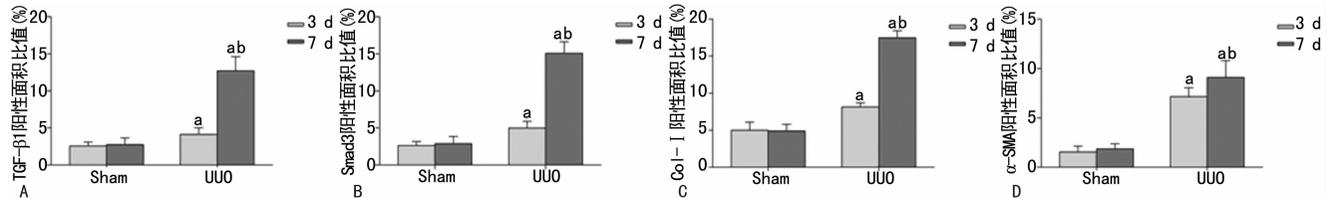
图 2 两组大鼠肾脏 Masson 染色胶原面积评分

2.3 两组大鼠肾脏组织不同时间点 TGF- β 1、Smad3、Col-I、 α -SMA 免疫组织化学表达 Sham 组大鼠 3 d 及 7 d 肾脏组织中 TGF- β 1 仅在肾小管上皮细胞中少量表达,间质中无表达,且各时间点无明显变化。与 Sham 组相比,UUO 组 3 d、7 d TGF- β 1 在肾小管上皮细胞和组织间质表达面积随时间逐渐增多,阳性染色逐渐加深。UUO 组和 Sham 组 3 d、7 d 肾脏组织 TGF- β 1 阳性面积组间差异有统计学意义($F=423.844, P<0.01$),UUO 组 TGF- β 1 阳性面积与同时期 Sham 组比较差异

有统计学意义($P<0.01$),UUO 组 7 d TGF- β 1 阳性面积较 UUO 组 3 d 增多($P<0.01$),见图 3A。

Sham 组大鼠 3 d 及 7 d 肾脏组织中 Smad3 表达无明显变化,表达于少部分肾小管上皮细胞中。UUO 组 3 d、7 d Smad3 与 Sham 组相比,在肾小管上皮细胞、组织间质表达面积明显增多,且强阳性表达于 UUO 组 7 d 组织。UUO 组和 Sham 组各时间点肾脏组织 Smad3 阳性面积组间差异有统计学意义($F=768.544, P<0.01$),UUO 组 Smad3 阳性面积明显多于同时期 Sham 组($P<0.01$),UUO 组 7 d Smad3 阳性面积多于 UUO 组 3 d($P<0.01$),见图 3B。

Sham 组 Col-I 在肾小管间质少量表达,与同时期 Sham 组比较,UUO 组大鼠肾脏组织 Col-I 蛋白表达面积明显增多,建模后时间越长,阳性面积表达越多(图 4)。组间 Col-I 表达面积差异有统计学意义($F=1108.079, P<0.01$),各组间两两比较,UUO 组 Col-I 阳性面积多于同时期 Sham 组($P<0.01$),UUO 组 7 d Col-I 阳性面积多于 UUO 组 3 d($P<0.01$)(图 3C)。 α -SMA 在 Sham 组阳性面积较少,UUO 组 α -SMA 在肾组织间质中表达面积随建模后时间延长增多,7 d 阳性染色最深(图 4)。组间 α -SMA 表达面积具有明显差异有统计学意义($F=292.363, P<0.01$),各组间两两比较,UUO 组 α -SMA 阳性面积多于同时期 Sham 组($P<0.01$),UUO 组 7 d α -SMA 阳性面积明显较 UUO 组 3 d 增多($P<0.01$)(图 3D)。



A: 肾脏组织 TGF- β 1 蛋白阳性面积比较; B: 肾脏组织 Smad3 蛋白阳性面积比较; C: 肾脏组织 Col-I 蛋白阳性面积比较; D: 肾脏组织 α -SMA 蛋白阳性面积比较。a: $P<0.01$, 与相同时间点 Sham 组比较; b: $P<0.01$, 与 UUO 组建模后 3 d 比较。

图 3 两组大鼠肾组织 TGF- β 1、Smad3、Col-I 和 α -SMA 蛋白阳性面积比较

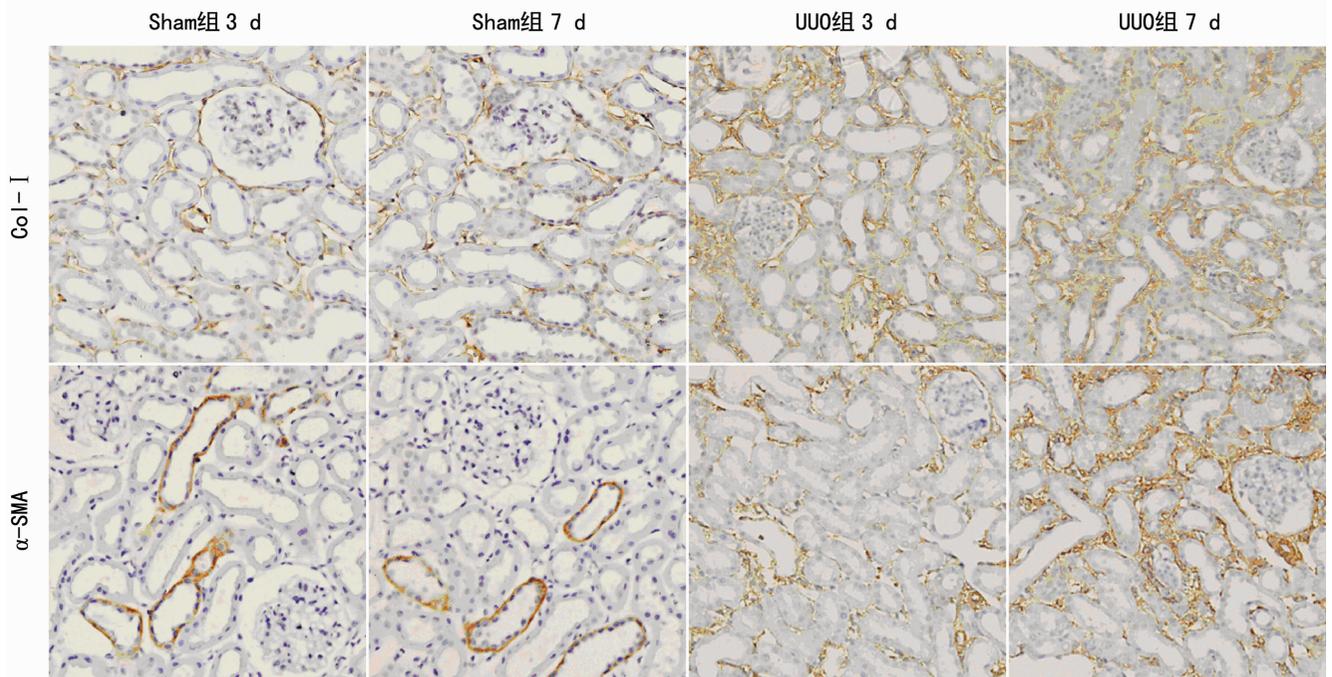


图 4 两组大鼠肾组织不同时间点 Col-I 和 α -SMA 蛋白表达比较(免疫组织化学染色 $\times 200$)

2.4 相关性分析 TGF- β 1、Smad3 与肾组织中 miRNA-21 呈正相关($r=0.799, 0.849, P<0.01$), 肾组织 miRNA-21 与肾组织纤维化程度、Col-I 和 α -SMA 呈正相关($r=0.888, 0.882, 0.896, P<0.01$)。

3 讨论

纤维化是以细胞外基质(ECM)过度积聚、成纤维细胞增生,以及肾单位萎缩消失等为病理特点^[4],是肾、心、肺、肝等器官发生渐进性疾病,最终发展为终末期器官衰竭的共同通路,但是对于肾脏纤维化发生的分子机制认识尚不完全明确^[8]。MicroRNAs 是一类广泛存在于动植物基因组中的功能性非编码小分子 RNA,主要功能是通过与靶基因 mRNA 特定位点结合,在转录水平参与基因的表达和调控,近年来研究发现,miRNA 参与几乎每个细胞的生理及病理发生过程,而且 miRNAs 的异常调节与包括 CKD 在内的众多人类疾病密切相关。

UUO 大鼠是肾脏炎症及 RIF 公认经典模型,HE 染色显示随着 UUO 建模时间延长,肾间质损害逐渐加重,Masson 染色也观察到实验组术后间质纤维化程度加重,证明大鼠肾脏间质纤维化模型建模成功。TGF- β 1/Smad3 是纤维化发生机制中重要的信号通路之一^[3],TGF- β 1 通过下游受体激活型介质 Smad3、Smad2 正向调控致纤维化基因表达从而介导 EMT^[9],另一方面,大部分 RIF 来源于损伤肾组织通过 II 型 EMT 而来的肾小管上皮细胞,通过 EMT 机制,肾小管上皮细胞失去顶点-基底极性,形态变细长,破坏基底膜从而侵入肾小管间隙,并表达 α -SMA 等间皮细胞标志,产生以 I、III 型胶原为主的 ECM^[10]。在本实验中,3 d UUO 组肾组织纤维化评分较低,肾脏组织中 TGF- β 1、Smad3 蛋白少量表达,且 α -SMA 和 Col-I 亦有阳性表达,说明是肾脏纤维化和 EMT 的初期阶段,但是 7 d UUO 组肾脏组织 masson 染色纤维化评分较 3 d 组明显升高,肾组织中 TGF- β 1、Smad3、 α -SMA、Col-I 阳性面积较 3 d UUO 组显著增多、染色加深,可见随着建模后时间延长,TGF- β 1/Smad3 信号通路被激活,组织纤维化和 EMT 程度伴随 TGF- β 1、Smad3 表达增强进行性加重。

在肾实质细胞,很多 miRNAs 接受 TGF- β 1 的调控,例如 miRNA-21、miRNA29 家族、miRNA93、miRNA377、miR-216a、miRNA200 家族^[11],在 RIF 发展过程中,上述 miRNAs 表达是通过 TGF- β 1/Smad3 这一信号通路实现^[12-13],而不是依赖 Smad2^[12],保守的 Smad3 结合在 miRNA-21、miRNA29、miRNA-192 启动子区域位点,所以 miRNAs 可能是 TGF- β 1/Smad3 信号通路调控肾脏纤维化的重要下游介质^[4]。本次实验发现,UUO 组大鼠肾脏组织中 miRNA-21 在建模后 3 d、7 d 呈增加趋势,并与 TGF- β 1/Smad3 蛋白、肾组织纤维化评分、 α -SMA、Col-I 呈正相关,所以 TGF- β 1/Smad3 可能通过上调 miRNA-21 从而诱导 EMT 导致 RIF。

综上所述,UUO 大鼠肾组织中 miRNA-21 随纤维化程度加重表达上调,TGF- β 1/Smad3 信号通路可能通过正向调控

miRNA-21 从而诱导 RIF。随着检测技术及对 miRNA 进一步研究,miRNA 有望成为预测及诊断 CKD 新型标志物。

参考文献

- [1] Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, et al. TGF-beta and fibrosis in different organs-molecular pathway imprints[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(8): 746-756.
- [2] 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/CD]. *中华肾病研究电子杂志*, 2012, 1(1): 41-44.
- [3] Kopp JB. TGF-beta signaling and the renal tubular epithelial cell: too much, too little, and just right[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(8): 1241-1243.
- [4] Lan HY. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation[J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(7): 1056-1067.
- [5] Zavadil J, Narasimhan M, Blumenberg M, et al. Transforming growth factor-beta and microRNA: mRNA regulatory networks in epithelial plasticity[J]. *Cells Tissues Organs*, 2007, 185(1/3): 157-161.
- [6] Chung AC, Huang XR, Meng X, et al. miR-192 mediates TGF-beta/Smad3-driven renal fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(8): 1317-1325.
- [7] 谢盛彬, 王伟铭, 陈楠. UUO 模型大鼠肾间质纤维化动态进展及 α -SMA、TGF- β 1 和 VDR 表达变化[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2010, 30(7): 752-757, 796.
- [8] Boor P, Ostendorf T, Floege J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2010, 6(11): 643-656.
- [9] Chung AC, Dong Y, Yang WQ, et al. Smad7 suppresses renal fibrosis via altering expression of TGF-beta/Smad3-regulated microRNAs[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(2): 388-398.
- [10] Iwano M, Plieth D, Danoff TM, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(3): 341-350.
- [11] Kantharidis P, Wang B, Carew RM, et al. Diabetes complications: the microRNA perspective[J]. *Diabetes*, 2011, 60(7): 1832-1837.
- [12] Qin W, Chung AC, Huang XR, et al. TGF- β /Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(8): 1462-1474.
- [13] 汪靖杰. 小 RNA 在器官纤维化上皮-间质转化(EMT)中的作用[J]. *复旦学报: 医学版*, 2013, 40(6): 744-747.

(收稿日期: 2015-02-18 修回日期: 2015-08-05)