

# miR-214 靶向 PTEN 介导 PI3K/AKT 信号通路 对糖尿病肾病大鼠的保护机制\*

赵娜 邱国萍 王满庭

(九江市第一人民医院肾内科, 江西 九江 332000)

**【摘要】** 目的 探讨微小 RNA(miR-214)靶向磷酸酶与张力蛋白同源物(PTEN)介导磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)信号通路减轻糖尿病肾病(DN)大鼠的氧化应激和肾间质纤维化的作用和机制。方法 将 40 只 SD 雄性大鼠分为对照组(control 组)、模型组(DN 组)、miR-214 阴性对照组(DN+miR-NC 组)和 miR-214 模拟物组(DN+miR-214 mimics 组),每组 10 只;qRT-PCR 检测各组大鼠肾组织中 miR-214 的表达;电子天平称量各组大鼠体质量和肾质量,计算肾指数;血糖仪测定各组大鼠的空腹血糖(FPG);双缩脲法测定各组大鼠 24 h 尿蛋白(UP)水平;全自动生化分析仪检测各组大鼠血清肌酐(Scr)和血清尿素氮(BUN)的水平;HE 染色观察各组大鼠肾组织病理变化;Masson 染色观察各组大鼠肾组织间质纤维化;ELISA 检测各组大鼠血清中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的表达;免疫组织化学法检测各组大鼠肾组织中转化生长因子  $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )的表达;生物信息学工具预测靶基因;双荧光素酶报告基因检测基因或蛋白之间的相互作用;Western blot 检测各组大鼠肾组织中 PTEN、p-PI3K、p-AKT 和磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)的表达。结果 miR-214 在 DN 大鼠肾组织中呈低表达,在 DN+miR-214 mimics 组大鼠肾组织中表达显著上调(均  $P < 0.001$ );miR-214 mimics 使大鼠的体质量升高,肾指数、FPG、UP、Scr 及 BUN 水平下调(均  $P < 0.05$ );DN+miR-214 mimics 组大鼠肾组织中肾间质中的炎性细胞浸润减少,胶原纤维沉积减少( $P < 0.01$ );miR-214 mimics 使大鼠血清中 MDA 的水平降低,SOD、GSH、GSH-PX 的水平升高(均  $P < 0.05$ ),大鼠肾组织中 TGF- $\beta 1$  的表达水平下降( $P < 0.05$ );miR-214 与 PTEN 存在靶向关系;miR-214 mimics 使大鼠肾组织中 PTEN 蛋白表达下调,p-PI3K、p-AKT 和 p-mTOR 蛋白表达上调(均  $P < 0.05$ )。结论 miR-214 在 DN 大鼠肾组织中低表达,过表达 miR-214 对 DN 大鼠的肾组织有保护作用,可能与降低肾组织的氧化应激水平、TGF- $\beta 1$  蛋白表达和抑制 PI3K/AKT 通路激活有关。

**【关键词】** 糖尿病肾病;微小 RNA;磷酸酶与张力蛋白同源物;磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B;氧化应激;肾间质纤维化

**【中图分类号】** R587.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 03. 009

## Protective mechanism of miR-214 targeting PTEN mediated PI3K/Akt signaling pathway in diabetic nephropathy rats

ZHAO Na, QIU Guoping, WANG Manting

(Department of Nephrology, The First People's Hospital of Jiujiang, Jiujiang 332000, Jiangxi, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the role and mechanism of miR-214 targeting PTEN-mediated PI3K/AKT signaling pathway in reducing oxidative stress and renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy in rats. **Methods** SD rats were divided into control group (control group), model group (DN group), miR-214 negative control group (DN+miR-NC group) and miR-214 mimic group (DN+miR-214 mimics group). qRT-PCR was used to detect the expression of miR-214 in kidney tissue of each group of rats. The electronic balance was used to weigh the body weight and kidney weight of each group of rats, and calculates the renal index. Blood glucose meter was used to measure fasting blood

基金项目:江西省卫生计生委科技计划项目(20194021)

通信作者:邱国萍,主任医师,E-mail:jjqiuguoping@163.com

引用本文:赵娜,邱国萍,王满庭.miR-214 靶向 PTEN 介导 PI3K/AKT 信号通路对糖尿病肾病大鼠的保护机制[J].西部医学,2022,34(3):360-366.374. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 03. 009

glucose (FPG) of rats in each group. Biuret method was used to determine the 24-hour urine protein (UP) level of rats in each group. Automatic biochemical analyzer to detect serum creatinine (Scr) and serum urea nitrogen (BUN) levels in each group of rats. HE staining was used to observe the pathological changes of kidney tissue in each group of rats. Masson staining was used to observe the renal interstitial fibrosis in each group of rats. ELISA was used to detect the expression of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), and glutathione peroxidase (GSH-PX) in the serum of each group of rats; Immunohistochemical method was used to detect the expression of TGF- $\beta$ 1 in kidney tissue of rats in each group. Bioinformatics tools was used to predict target genes. Dual luciferase reporters was used to detect interactions between genes or proteins; Western blot was used to detect the expression of PTEN, p-PI3K, p-AKT and p-mTOR proteins in the kidney tissues of rats in each group. **Results** miR-214 in renal tissue of DN rats was low expressed ( $P < 0.001$ ), and significant up-regulated in renal tissue of DN+miR-214 mimics group rats ( $P < 0.001$ ). miR-214 mimics increased body weight in rats, decreased renal index, FPG, UP levels, Scr levels, and the BUN level (all  $P < 0.05$ ). In the DN+miR-214 mimics group, the infiltration of inflammatory cells in the renal interstitial tissue and the deposition of collagen fibers in the renal interstitial tissue were reduced. miR-214 mimics reduced MDA levels in rat serum, elevated SOD, GSH, GSH-PX levels (all  $P < 0.05$ ), and TGF- $\beta$ 1 expression in rat kidney tissues was decreased ( $P < 0.05$ ). There is a targeting relationship between miR-214 and PTEN. miR-214 mimics down-regulated PTEN protein expression in rat kidney tissues, and up-regulated p-PI3K, p-AKT, and p-mTOR protein expressions (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** miR-214 is under-expressed in the kidney tissues of DN rats, but over-expression of miR-214 has a protective effect on the kidney tissues of DN rats, which may be related to reducing the level of oxidative stress in kidney tissues, the expression of TGF- $\beta$ 1 protein, and inhibiting PI3K/AKT pathway activation is involved.

**【Key words】** Diabetic nephropathy; MiR-214; PTEN; PI3K/AKT; Oxidative stress; Renal interstitial fibrosis

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最常见的并发症,是肾衰竭的主要原因之一<sup>[1]</sup>。其发病率逐年增加,严重损害人类健康<sup>[1-2]</sup>。DN可逐渐发展为肾小球硬化,间质纤维化以及功能丧失<sup>[3]</sup>。微小RNA(MicroRNA, miRNA)是内源的非编码小RNA分子,长约20~24个核苷酸<sup>[4]</sup>。近年来的研究发现,miRNAs通过基因调控在DN的发生和发展中有着重要的作用,表明miRNAs可能与DN的发生和发展有关<sup>[5]</sup>。磷酸酶与张力蛋白同源物(PTEN)早期被认为是抑癌基因。但是,随着研究的进一步深入,PTEN同时也被认为是AKT的负性调节器<sup>[6]</sup>。研究表明磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)信号通路的激活与肾脏纤维化的发展密切相关<sup>[7]</sup>。本实验通过喂食高糖高脂饮食联合链脲佐菌素(STZ)建立DN大鼠模型,观察miR-214在DN大鼠肾组织中的表达变化,并进一步探讨抑制miR-214对DN大鼠肾组织的治疗作用及可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 40只SD雄性大鼠,SPF级,7周龄,体重(200±20)g,购自九江学院实验动物中心。实验大鼠饲养于标准动物房中,正常饮食饮水,实验动物均符合动物伦理要求,并通过我院伦理委员会严格审查批准。大鼠适应环境两周后进行实验。

1.1.2 细胞 人胚肾(HEK-293T)细胞株细胞购自

中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.1.3 试剂 STZ购自美国Sigma公司。阴性对照(miR-NC)、miR-214 mimics由Genepharma公司合成。尿蛋白(UP)定量试剂盒购自南京建成生物工程研究所。血清尿素氮(BUN)和血清肌酐(Scr)测定试剂盒购自瑞士罗氏公司。TRIzol试剂、PrimeScript™ RT Reagen试剂盒和SYBR Premix EX Taq™ II试剂盒购自日本TaKaRa公司。HE试剂盒、DAB显色盒和Masson试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司。大鼠血清丙二醛(MDA)试剂盒、大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)、大鼠血清谷胱甘肽(GSH)试剂盒和 大鼠血清谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司。DMEM培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司。双荧光素酶活性检测试剂盒、RIPA裂解液和BCA试剂盒购自美国Promega公司。PTEN抗体、p-PI3K抗体、PI3K抗体、p-AKT抗体、AKT抗体、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)抗体、mTOR抗体、 $\beta$ -actin抗体和IgG抗体购自美国Abcam公司。

### 1.2 方法

1.2.1 建立DN大鼠模型 SD大鼠喂食高糖高脂饮食,持续8周。之后SD大鼠经腹腔注射STZ(30 mg/kg),并继续喂食高糖高脂饮食。72 h后,从尾静脉收集血液并测定空腹血糖(FPG)。如果FPG $\geq$ 16.7 mmol/L,则认为糖尿病模型建立成功。大鼠继续喂

食高糖高脂饮食,定期测量血糖。4 周后,如果 UP > 20 mg 且尿液葡萄糖呈阳性,则认为 DN 模型建立成功<sup>[8]</sup>。

1.2.2 分组及给药 将 SD 大鼠分为 4 组:对照组(control 组)、糖尿病肾病模型组(DN 组)、miR-214 阴性对照组(DN + miR-NC 组)和 miR-214 模拟物组(DN + miR-214 mimics 组),每组 10 只。DN 组、DN + miR-NC 组和 DN + miR-214 mimics 组大鼠按 1.2.1 进行 DN 模型制作(糖尿病肾病造模过程中, DN 组一只小鼠状态不佳导致死亡, DN 组造模后剩余 9 只小鼠),其余 control 组大鼠喂养正常的饲料,并经腹腔注射生理盐水。造模成功后, DN + miR-NC 组大鼠经尾静脉注射 miR-NC (30 mg/kg), DN + miR-214 mimics 组大鼠经尾静脉注射 miR-214 mimics (30 mg/kg), control 组和 DN 组大鼠经尾静脉注射等量的生理盐水,每 7 d 注射一次,连续 8 周<sup>[8]</sup>。

1.2.3 qRT-PCR 检测 用 TRIzol 试剂提取肾组织中的总 RNA。使用紫外分光光度计检测总 RNA 的纯度和含量,并将每个配对的样品调节至相同浓度。使用 PrimeScript™ RT Reagen 试剂盒将提取的 RNA 逆转录为 cDNA。miR-214 的正向引物序列为 5'-CACCTTTCTCCCTTCCCTTACTCTCC-3', 反向引物序列为 5'-TTTCATAGGCACCACTCACTTAC-3'; U6 的正向引物序列为 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3', 反向引物序列为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。按照 SYBR Premix EX Taq™ II 试剂盒进行 qRT-PCR。使用 FTC-3000p 实时 PCR 系统完成实验后,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析数据。

1.2.4 大鼠 FPG 测定 末次给药结束后, SD 大鼠禁食一晚(12 h), 第二天早晨取大鼠尾静脉血, 使用血糖仪测定大鼠 FPG。

1.2.5 大鼠 UP 水平测定 末次给药结束后, 收集大鼠 24 h 尿液, 采用双缩脲法测定大鼠 24 h 尿蛋白浓度。计算公式: 24 h 尿蛋白量 = 尿蛋白浓度 × 24 h 尿量。

1.2.6 大鼠 Scr 和血清 BUN 水平测定 实验结束后, 各组大鼠经 10% 水合氯醛麻醉后, 于心尖取血, 并置于 1.5 mL EP 管中, 3000 r/min 离心 15 min, 吸取上层血清, 应用全自动生化分析仪检测各组大鼠 Scr 和血清 BUN 水平。

1.2.7 HE 染色 切取新鲜肾组织, 经固定、常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋, 并制成 4 μm 的石蜡切片。按 HE 染色步骤经脱蜡、脱水、染色、冲洗、中性树胶封片, 光镜下观察肾组织的病理变化。

1.2.8 Masson 染色 切取新鲜肾组织, 进行 OCT

包埋, 制作成 6 μm 的冰冻切片。切片上滴加 50 μL Bouin's 2000™ 溶液, 于 60℃ 烤箱中烤片 1~1.5 h, 用纯净水冲洗切片至组织无色。之后将切片置于苏木素中染色 5 min, 纯净水清洗。再滴加猩红-酸品红染色液, 染色 10 min, 纯净水清洗; 滴加一滴磷钼酸染液染色 12 min, 用滤纸吸去多余染液; 滴加一滴苯胺蓝染色 8 min 后, 纯净水清洗切片 2 min; 滴加一滴 1% 的醋酸孵育 4 min。冲洗, 用中性树胶封片, 显微镜观察并拍照。蓝色组织表示肾组织纤维化, 红色组织表示肾组织正常。

1.2.9 ELISA 检测 实验结束后, 各组大鼠经 10% 水合氯醛麻醉后, 于心尖取血, 并置于 1.5 mL EP 管中, 3000 r/min 离心 15 min, 吸取上层血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 用酶联仪在 450 nm 波长依序测定各孔的光密度(OD 值), 根据 OD 值所绘制的标准曲线查出血清中 MDA、SOD、GSH 和 GSH-PX 的表达。

1.2.10 免疫组织化学法检测 肾组织经固定, 包埋, 石蜡切片、脱水、缓冲液清洗, 3% 过氧化氢溶液去除内源性过氧化物酶, 滴加非免疫动物血清 20 min, 滴加一抗、PBS 冲洗、滴加二抗、冲洗后加 ABC 复合物、DAB 显色, 中性树胶封片。在显微镜下观察, 用 MIAS 图像分析系统分析, 按照免疫组化染色阳性细胞数在每一高倍视野中所占比例依次统计。目标蛋白呈棕黄色, 则为阳性表达。

1.2.11 双荧光素酶报告基因 细胞培养: HEK-293T 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱进行培养。取对数期、状态良好的细胞进行后续实验。双荧光素酶检测: 通过 TargetScan 数据库分析 miR-214 的靶基因。将 PTEN 3'UTR wt/mut 克隆到 pmirGLO 载体中, 然后将 NC、miR-214 mimics、pmirGLO-PTEN-wt 或 pmirGLO-PTEN-mut 转染至 HEK-293T 细胞中。48 h 后, 应用双荧光素酶活性检测试剂盒测定 HEK-293T 细胞的荧光素酶活性。

1.2.12 Western blot 检测 各组大鼠肾组织(100 mg)用 RIPA 裂解提取总蛋白, 并经过 BCA 法进行蛋白质定量。将上清液与 2× 样品缓冲液混合, 在 95℃ 下煮沸 5 min, 在 12% SDS-PAGE 上电泳, 然后电转移到聚偏二氟乙烯膜上。将膜在室温下用脱脂牛奶封闭 1 h, 然后与单克隆抗体 β-actin(1:500), PTEN(1:500), p-PI3K(1:500), PI3K(1:500), p-AKT(1:500), AKT(1:500), p-mTOR(1:500) 和 mTOR(1:500) 在 4℃ 下过夜。将膜用 PBS 洗涤 3 次以除去第一抗体, 并与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗

(1:500)在室温下温育 1 h。用 PBS 洗涤 3 次,并用 ECL 显色试剂盒显影曝光,用 Image-Pro Plus 图像分析系统对蛋白条带进行分析。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,正态分布数据资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,率的比较采用  $\chi^2$  检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠肾组织中 miR-214 的表达 qRT-PCR 检测结果显示,与 control 组相比,DN 组和 DN+miR-NC 组大鼠肾组织中 miR-214 的表达水平均显著下调(均  $P < 0.001$ );与 DN 组和 DN+miR-NC 组比较,DN+miR-214 mimics 组大鼠肾组织中 miR-214 的表达水平均显著上调(均  $P < 0.001$ )。见表 1。

2.2 各组大鼠体质量、肾指数、FPG、UP、Scr 和 BUN 水平的变化 与 control 组相比,DN 组和 DN+miR-

表 1 各组大鼠肾组织中 miR-214 的表达( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	miR-214 表达
control 组	10	1.00±0.05
DN 组	9	0.20±0.02 <sup>①</sup>
DN+miR-NC 组	10	0.23±0.02 <sup>①</sup>
DN+miR-214 mimics 组	10	1.67±0.13 <sup>②③</sup>
<i>F</i>		57.894
<i>P</i>		<0.001

注:与 control 组相比,① $P < 0.001$ ;与 DN 组相比,② $P < 0.001$ ;与 DN+miR-NC 组相比,③ $P < 0.001$

NC 组大鼠体质量均明显下降(均  $P < 0.01$ ),肾指数、FPG、UP、Scr 及 BUN 水平均明显升高(均  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ );与 DN 组和 DN+miR-NC 组相比,DN+miR-214 mimics 组大鼠体质量均升高(均  $P < 0.05$ ),肾指数、FPG、UP、Scr 及 BUN 水平均下降(均  $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠体质量、肾指数、FPG、UP、Scr 和 BUN 水平的变化( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Changes in body mass, renal index, FPG, UP, Scr and BUN levels of rats in each group

组别	<i>n</i>	体质量(g)	肾指数(mg/g)	FPG(mmol/L)	UP(mg/d)	Scr( $\mu$ mol/L)	BUN(mmol/L)
control 组	10	372.45±12.34	3.56±1.02	5.86±1.04	5.98±1.01	35.67±1.45	4.64±0.87
DN 组	9	270.34±7.43 <sup>①</sup>	7.12±1.45 <sup>①</sup>	28.32±2.03 <sup>②</sup>	23.14±2.16 <sup>②</sup>	72.53±2.41 <sup>①</sup>	10.13±1.43 <sup>①</sup>
DN+miR-NC 组	10	272.56±6.46 <sup>①</sup>	7.32±1.53 <sup>①</sup>	28.03±1.95 <sup>②</sup>	23.02±2.08 <sup>②</sup>	71.78±2.32 <sup>①</sup>	10.01±1.32 <sup>①</sup>
DN+miR-214 mimics 组	10	312.87±7.05 <sup>③④</sup>	5.67±1.14 <sup>③④</sup>	17.76±1.32 <sup>③④</sup>	15.49±1.05 <sup>③④</sup>	50.64±1.37 <sup>③④</sup>	7.42±1.02 <sup>③④</sup>
<i>F</i>		24.563	25.431	37.785	35.452	26.893	22.128
<i>P</i>		0.004	0.004	<0.001	<0.001	0.003	0.005

注:与 control 组相比,① $P < 0.01$ ,② $P < 0.001$ ;与 DN 组相比,③ $P < 0.05$ ;与 DN+miR-NC 组相比,④ $P < 0.05$

2.3 各组大鼠肾组织病理学的变化 HE 染色结果显示,control 组大鼠肾组织形态正常,炎性细胞浸润很少;与 control 组相比,DN 组和 DN+miR-NC 组大鼠肾组织中出现不规则的肾小球,肾小管水肿伴部分坏死,肾间质炎性细胞浸润显著增加( $P < 0.001$ );与

DN 组和 DN+miR-NC 组相比,DN+miR-214 mimics 组大鼠肾组织中可见规则的肾小球,轻度浮肿的肾小管,肾间质炎性细胞浸润明显减少( $P < 0.01$ )。见图 1、表 3。

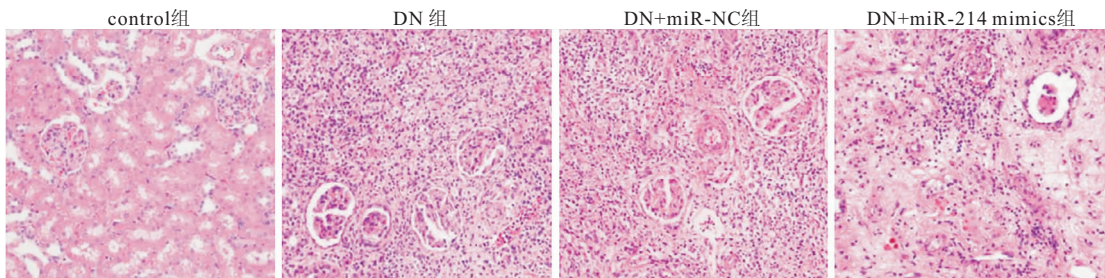


图 1 HE 染色观察各组大鼠肾组织病理变化(200×)

Figure 1 HE staining used to observe the pathological changes of rat kidney tissues in each group

2.4 各组大鼠肾组织间质纤维化的变化 Masson 染色结果显示,蓝色胶原纤维沉积代表间质化纤维面积,control 组大鼠肾组织间质纤维化面积积极少;与 control 组相比,DN 组和 DN+miR-NC 组大鼠肾组织

间质纤维化面积显著增加( $P < 0.001$ );与 DN 组和 DN+miR-NC 组相比,DN+miR-214 mimics 组大鼠肾组织间质纤维化面积明显减少( $P < 0.01$ )。见图 2、表 4。

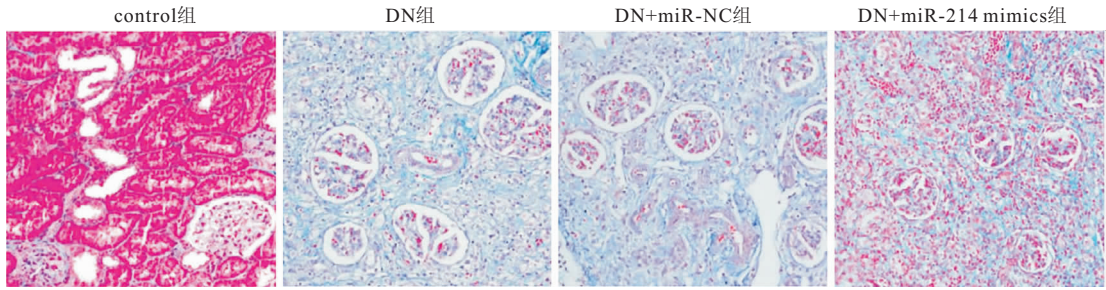


图 2 Masson 染色观察各组大鼠肾组织间质纤维化(200×)

Figure 2 Masson staining used to observe the interstitial fibrosis of the renal tissue of rats in each group

表 3 各组大鼠肾组织中炎性细胞浸润程度( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 The degree of inflammatory cell infiltration in the kidney tissue of each group

组别	n	炎性细胞浸润程度(%)
control 组	10	5.12±0.16
DN 组	9	74.01±2.67 <sup>①</sup>
DN+miR-NC 组	10	73.13±2.54 <sup>①</sup>
DN+miR-214 mimics 组	10	53.78±1.65 <sup>②③</sup>
F		56.783
P		<0.001

注:与 control 组相比,①P<0.001;与 DN 组相比,②P<0.01;与 DN+miR-NC 组相比,③P<0.01

表 4 各组大鼠肾组织间质纤维化面积( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Areas of interstitial fibrosis in kidney tissue of rats in each group

组别	n	肾间质纤维化面积(%)
control 组	10	8.45±0.78
DN 组	9	30.23±1.12 <sup>①</sup>
DN+miR-NC 组	10	32.56±1.07 <sup>①</sup>
DN+miR-214 mimics 组	10	22.56±1.04 <sup>②③</sup>
F		32.763
P		<0.001

注:与 control 组相比,①P<0.001;与 DN 组相比,②P<0.01;与 DN+miR-NC 组相比,③P<0.01

2.5 各组大鼠血清中氧化应激水平的表达 ELISA 结果显示,与 control 组相比, DN 组和 DN+miR-NC 组大鼠血清 MDA 的水平显著升高(P<0.001), SOD、GSH、GSH-PX 的水平明显降低(均 P<0.01);

与 DN 组和 DN+miR-NC 组相比, DN+miR-214 mimics 组大鼠血清中 MDA 的水平降低(均 P<0.05), SOD、GSH、GSH-PX 的水平升高(均 P<0.05)。见表 5。

表 5 各组大鼠血清中 MDA、SOD、GSH 和 GSH-PX 的表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 The expression levels of MDA, SOD, GSH and GSH-PX in serum of rats in each group

组别	n	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)	GSH(ug/g)	GSH-PX(U/mg)
control 组	10	5.34±1.02	80.45±2.03	65.78±1.56	52.67±1.43
DN 组	9	18.56±1.56 <sup>①</sup>	25.21±1.45 <sup>②</sup>	19.98±0.95 <sup>②</sup>	16.78±0.76 <sup>②</sup>
DN+miR-NC 组	10	18.23±1.45 <sup>①</sup>	24.89±1.32 <sup>②</sup>	20.12±1.04 <sup>②</sup>	16.03±1.02 <sup>②</sup>
DN+miR-214 mimics 组	10	10.34±1.23 <sup>③④</sup>	54.56±1.13 <sup>③④</sup>	43.56±1.12 <sup>③④</sup>	38.98±0.45 <sup>③④</sup>
F		45.342	29.453	27.564	26.325
P		<0.001	0.003	0.003	0.004

注:与 control 组相比,①P<0.001;②P<0.01;与 DN 组相比,③P<0.05;与 DN+miR-NC 组相比,④P<0.05

2.6 各组大鼠肾组织中 TGF-β1 的表达 免疫组化结果显示,与 control 组相比, DN 组和 DN+miR-NC 组大鼠肾组织中 TGF-β1 的表达水平均明显升高

(P<0.01);与 DN 组和 DN+miR-NC 组相比, DN+miR-214 mimics 组大鼠肾组织中 TGF-β1 的表达水平下降(P<0.05)。见图 3、表 6。

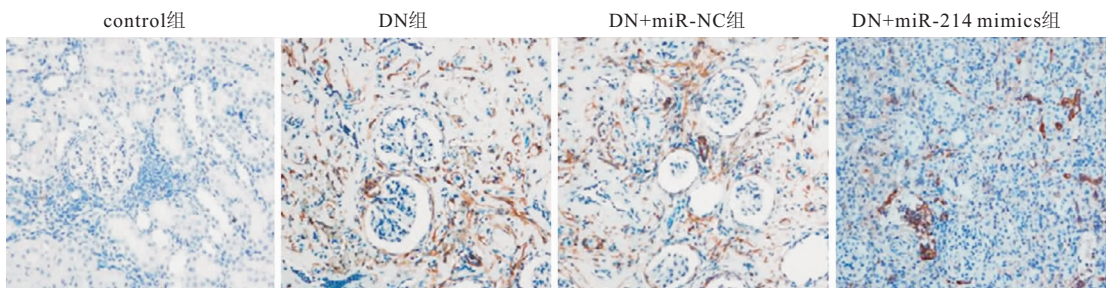


图 3 免疫组织化学检测各组大鼠肾组织中 TGF-β1 的表达(200×)

Figure 3 Immunohistochemical detection of the expression of TGF-β1 in the kidney tissue of rats in each group

表 6 各组大鼠肾组织中 TGF-β1 的表达( $\bar{x} \pm s$ )

Table 6 Expression of TGF-β1 in kidney tissue of rats in each group

组别	n	TGF-β1 阳性表达率(%)
control 组	6	4.56±0.98
DN 组	6	20.78±1.13 <sup>①</sup>
DN+miR-NC 组	6	21.65±1.12 <sup>②</sup>
DN+miR-214 mimics 组	6	11.34±1.03 <sup>③④</sup>
F		24.658
P		0.003

注:与 control 组相比,① $P < 0.01$ ;与 DN 组相比,② $P < 0.05$ ;与 DN+miR-NC 组相比,③ $P < 0.05$

2.7 PTEN 是 miR-214 的靶基因 TargetScan 数据库分析结果显示,PTEN 可能是 miR-214 的候选目标(图 4)。双荧光素酶报告基因测定结果显示,miR-214 mimics 明显抑制了携带 PTEN 3'UTR wt 的荧光素酶活性( $P < 0.001$ ),但当报告质粒携带 PTEN 3'UTR mut 时未观察到明显的抑制作用( $P > 0.05$ ),见表 7。

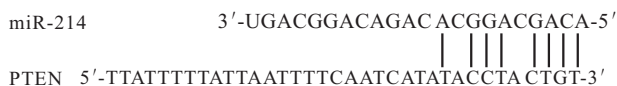


图 4 miR-214 与 PTEN 的结合位点

Figure 4 The binding site of miR-214 and PTEN

表 7 双荧光素酶报告基因结果( $\bar{x} \pm s$ )

Table 7 Results of dual luciferase reporter gene

组别	PTEN 3' UTR wt	PTEN 3' UTR mut
NC 组	1.00±0.12	0.99±0.07
miR-214 mimics 组	0.24±0.03 <sup>①</sup>	1.01±0.06
t	27.764	0.253
P	<0.001	>0.05

注:与 NC 组相比, $P < 0.001$

2.8 各组大鼠肾组织中相关蛋白的表达 Western blot 结果显示,与 control 组比较,DN 组和 DN+miR-NC 组大鼠肾组织中 PTEN 蛋白表达显著下调( $P < 0.001$ ),PI3K、AKT、mTOR 蛋白的磷酸化程度均显著升高(均  $P < 0.001$ );与 DN 组和 DN+miR-NC 组比较,DN+miR-214 mimics 组大鼠肾组织中 PTEN 蛋白表达上调( $P < 0.05$ ),PI3K、AKT、mTOR 蛋白的磷酸化程度均明显下降(均  $P < 0.01$ )。见图 5、表 8。

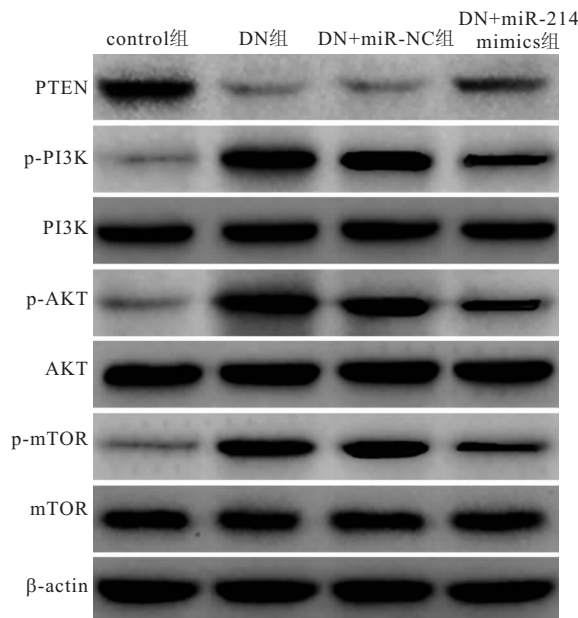


图 5 Western blot 检测各组大鼠肾组织中相关蛋白的表达

Figure 5 Western blot detection of the expression of related proteins in the kidney tissue of each group

表 8 各组大鼠肾组织中相关蛋白的表达( $\bar{x} \pm s$ )

Table 8 Expression of related proteins in kidney tissue of rats in each group

组别	n	PTEN/β-actin	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT	p-mTOR/mTOR
control 组	6	0.77±0.05	0.10±0.02	0.11±0.01	0.12±0.02
DN 组	6	0.12±0.02 <sup>①</sup>	1.12±0.12 <sup>①</sup>	0.96±0.14 <sup>①</sup>	1.23±0.15 <sup>①</sup>
DN+miR-NC 组	6	0.13±0.02 <sup>①</sup>	1.01±0.11 <sup>①</sup>	0.90±0.12 <sup>①</sup>	1.19±0.14 <sup>①</sup>
DN+miR-214 mimics 组	6	0.23±0.03 <sup>②④</sup>	0.33±0.03 <sup>③⑤</sup>	0.25±0.03 <sup>③⑤</sup>	0.28±0.03 <sup>③⑤</sup>
F		29.674	34.438	31.985	37.021
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 control 组相比,① $P < 0.001$ ;与 DN 组相比,② $P < 0.05$ ;与 DN 组相比,③ $P < 0.01$ ;与 DN+miR-NC 组相比,④ $P < 0.05$ ;与 DN+miR-NC 组相比,⑤ $P < 0.01$

### 3 讨论

糖尿病已成为主要的公共卫生问题之一。在中国,2013 年成人糖尿病的患病率达到了 10.9%<sup>[9]</sup>。DN 是糖尿病的常见慢性微血管并发症,并且也是终末期肾脏疾病的重要原因。大约 40% 的糖尿病患者患有 DN<sup>[10]</sup>。肾小球结构肥大,肾小球基底膜增厚,肾小球系膜细胞增生,肾小管间质扩张以及细胞外基质成分(如胶原蛋白和纤连蛋白)的异常堆积是 DN 的主

要病理特征<sup>[11]</sup>。因此,深入研究 DN 的发病机制并认识到治疗 DN 的新靶点变得尤为重要和紧迫,这为 DN 的临床预防和治疗提供了新的依据。

miRNA 是一类小的(约 21 个核苷酸长)非编码 RNA,通过翻译抑制或促进 RNA 降解来介导目标基因的转录后调控<sup>[12]</sup>。miRNA 参与许多关键生物学过程的调控,包括细胞增殖、分化、代谢,尤其是细胞凋亡<sup>[13-14]</sup>。大量研究表明,miRNA 在 DN 的发病机制

中起重要作用,例如,miR-30e 靶向 BNIP3L 来防止醛固酮诱导的足细胞凋亡和线粒体功能障碍<sup>[15]</sup>。在 DN 大鼠外周血中 miR-214 的表达水平下调<sup>[16]</sup>。本实验中我们发现,miR-214 在 DN 大鼠肾组织中低表达,与上述文献报道一致。进一步探讨 miR-214 对 DN 的作用,结果发现,过表达 miR-214 可以使 DN 大鼠的体质量增加,肾指数、FPG、UP、Scr 及 BUN 水平下降,也可使 DN 大鼠肾组织中肾间质中的炎性细胞浸润减少,胶原纤维沉积减少。

氧化应激标记物是一系列生物化学物质,可反映体内氧化应激水平<sup>[17]</sup>。其中,ROS、活性氮和脂质过氧化物常用于糖尿病检测,氧化应激标志物的测定在揭示糖尿病的发生和发展与氧化应激的相关性中起着重要的作用<sup>[18]</sup>。在本研究中,我们发现过表达 miR-214 可降低 DN 大鼠的氧化应激。Gao 等<sup>[19]</sup>发现 miR-214 通过靶向 ATF4 和 EZH2 的增强子来保护红系细胞免受氧化应激。这些结果证明 miR-214 的过表达降低了 DN 中的氧化应激。

PTEN 是经典的促凋亡基因<sup>[20]</sup>,并且已发现在糖尿病及其并发症中起着重要作用<sup>[21]</sup>。Mahimainatha 等<sup>[22]</sup>发现高血糖引起的系膜细胞肥大与 PTEN 表达的降低有关。此外,已证明 PI3K/AKT 信号通路在糖尿病的增殖,细胞周期进程和细胞生存力中起着至关重要的作用<sup>[23]</sup>。PTEN 是 PI3K 信号的负调控因子,可以抑制 AKT 的激活<sup>[24]</sup>。本研究中发现, DN 大鼠肾组织中 PTEN 蛋白显著降低,PI3K、AKT、mTOR 蛋白的磷酸化程度显著升高。表明 PTEN 是 miR-214 的直接靶标,且过表达 miR-214 可以上调 PTEN 蛋白的表达、降低 PI3K、AKT、mTOR 蛋白的磷酸化程度。

#### 4 结论

miR-214 在 DN 大鼠肾组织中表达下降,过表达 miR-214 对 DN 大鼠的肾组织起到治疗作用,其作用机制可能与减轻肾组织的氧化应激水平、TGF-β1 蛋白表达和 PI3K/AKT 通路有关,可能是 DN 诊断和治疗的潜在靶点。

#### 【参考文献】

[1] LINDHARDT M, PERSSON F, CURRIE G, *et al.* Proteomic prediction and Renin angiotensin aldosterone system Inhibition prevention Of early diabetic nephropathy in TYpe 2 diabetic patients with normoalbuminuria (PRIORITY): Essential study design and rationale of a randomised clinical multicentre trial[J]. *BMJ Open*, 2016,6(3):e010310.

[2] AGHADAVOD E, SOLEIMA A, AMIRANI E, *et al.* Comparison between biomarkers of kidney injury, inflammation, and

oxidative stress in patients with diabetic nephropathy and type 2 diabetes mellitus[J]. *Iran J Kidney Dis*, 2020,14(1):31-35.

[3] AHANGARPOUR A, OROOJAN A A, KHORSANDI L, *et al.* Antioxidant, anti-apoptotic, and protective effects of myricitrin and its solid lipid nanoparticle on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic nephropathy in type 2 diabetic male mice [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2019,22(12):1424-1431.

[4] NASSIRPOUR R, RAJ D, TOWNSEND R, *et al.* MicroRNA biomarkers in clinical renal disease: From diabetic nephropathy renal transplantation and beyond [J]. *Food Chem Toxicol*, 2016,98(Pt A):73-88.

[5] ROVIRA-LIOPIS S, ESCRIBANO-LOPEZ I, DIAZ-MORALES N, *et al.* Downregulation of miR-31 in diabetic nephropathy and its relationship with inflammation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018,50(3):1005-1014.

[6] LI L, ZHU X, SHOU T, *et al.* MicroRNA-28 promotes cell proliferation and invasion in gastric cancer via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018,17(3):4003-4010.

[7] ZHOU J, ZHONG J, LIN S, *et al.* Inhibition of PTEN activity aggravates post renal fbrosis in mice with ischemia reperfusion-induced acute kidney injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017,43(5):1841-1854.

[8] 刘新磊, 宋卫敏, 高志强, 等. 抑制 miR-200c 表达对糖尿病肾病大鼠肾组织的保护作用及机制研究 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2019,37(6):668-672.

[9] 单忠艳. 根据 2018 年美国糖尿病学会标准诊断中国糖尿病患病率:全国横断面研究 [J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2020,40(5):314-314.

[10] 陈彦, 陈刚. 糖尿病肾病的诊断策略 [J]. *诊断学理论与实践*, 2018,17(01):11-18.

[11] YU S, ZHAO H, YANG W, *et al.* The alcohol extract of *Corcopsis tinctoria* nutt ameliorates diabetes and Diabetic nephropathy in db/db mice through miR-192/miR-200b and PTEN/AKT and ZEB2/ECM pathways [J]. *Biomed Res Int*, 2019,2019:5280514.

[12] 黎文华, 王鹏, 陆伦根. microRNA-454 在肿瘤中的研究进展 [J]. *中国临床研究*, 2019,32(2):264-266.

[13] XIONG H, YAN T, ZHANG W, *et al.* miR-613 inhibits cell migration and invasion by downregulating Daaml in triple-negative breast cancer [J]. *Cell Signal*, 2018,44:33-42.

[14] 刘娇. MicroRNA 9-5p/SIRT1 分子通路参与多囊卵巢综合征发病的机制研究 [D]. 天津:天津医科大学, 2020.

[15] GUO Y, DENG X, CHEN S, *et al.* MicroRNA-30e targets BNIP3L to protect against aldosterone-induced podocyte apoptosis and mitochondrial dysfunction [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017,312(4):F589-F598.

[16] YANG S, FEI X, LU Y, *et al.* miRNA214 suppresses oxidative stress in diabetic nephropathy via the ROS/Akt/mTOR signaling pathway and uncoupling protein 2 [J]. *Exp Ther Med*, 2019,17(5):3530-3538.

[17] 李萍, 方莉, 蔡秋萍, 等. 糖尿病肾病患者微炎症和氧化应激水平及其影响因素分析 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016,36(2):214-217.

- [6] 熊乐, 卢婧, 刘安文. 长链非编码 RNA TUG1 在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(4): 425-428.
- [7] ZHANG X, LI H, LI Q, *et al.* Application of red light phototherapy in the treatment of radioactive dermatitis in patients with head and neck cancer[J]. *World J Surg Oncol*, 2018, 16(1): 222.
- [8] 胡锦涛, 钟田雨, 胡晓梅, 等. LncRNAs 在鼻咽癌中作用机制的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(6): 823-826.
- [9] LI Y S, ZHENG D, PAN L T, *et al.* Knockdown of TUG1 by shRNA inhibited renal cell carcinoma formation by miR-299-3p/VEGF axis in vitro and in vivo[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 860: 172536.
- [10] LI T, KANG G, WANG T, *et al.* Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(1): 687-702.
- [11] 张万里, 刘璇, 章雄文. 外泌体调控肿瘤恶病质的研究进展[J]. 生命科学, 2020, 32(11): 1212-1217.
- [12] 崔虎军, 张亚男, 李慧亭. 外泌体 miRNA29 在宫颈癌转移中作用机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(19): 1365-1370.
- [13] 解学军, 张冰. 外泌体 MicroRNA-1246 促进星形胶质瘤细胞增殖与侵袭的研究[J]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2018, 8(5): 292-296.
- [14] 韩飞, 蒲沛东, 马青源, 等. 骨肉瘤外泌体 miR-1307 与骨肉瘤细胞的增殖和凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(13): 2036-2042.
- [15] LU J, LIU Q H, WANG F *et al.* Exosomal miR-9 inhibits angiogenesis by targeting MDK and regulating PDK/AKT pathway in nasopharyngeal carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 147.
- [16] 张强, 王长利. 长链非编码 RNA 及与肿瘤相关性的研究进展[J]. 国际生物医学工程杂志, 2018, 41(6): 556-561.
- [17] 王培, 汤春波, 李斌, 等. LncTUG1 通过靶向 miR-212-3p 对口腔鳞状细胞癌细胞 NK 细胞杀伤敏感性的影响[J]. 上海口腔医学, 2019, 28(6): 567-571.
- [18] QIAN W, REN Z T, LU X G. Knockdown of long non-coding RNA TUG1 suppresses nasopharyngeal carcinoma progression by inhibiting epithelial-mesenchymal transition (EMT) via the promotion of miR-384 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(1): 56-63.
- [19] FAN Q, YANG L, ZHANG X D, *et al.* The emerging role of exosome-derived non-coding RNAs in cancer biology[J]. *Cancer Lett*, 2018, 414: 107-115.
- [20] 常文婧, 李冬, 孙祖俊. 外泌体长链非编码 RNA: 肿瘤分子诊断新型标志物[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(15): 1793-1799.
- [21] DONG H Y, WANG W, CHEN R, *et al.* Exosome-mediated transfer of lncRNA-SNHG14 promotes trastuzumab chemoresistance in breast cancer[J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(3): 1013-1026.
- [22] QIU J J, LIN X J, TANG X Y, *et al.* Exosomal Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 Promotes Angiogenesis and Predicts Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(14): 1960-1973.

(收稿日期: 2021-02-22; 修回日期: 2021-10-18; 编辑: 刘灵敏)

(上接第 366 页)

- [18] 孙华, 冯强, 李圆, 等. 2 型糖尿病患者糖、脂代谢与氧化应激和炎症反应的典则相关分析[J]. 上海医学, 2017, 40(7): 434-438.
- [19] GAO M, LIU Y, CHEN Y, *et al.* miR-214 protects erythroid cells against oxidative stress by targeting ATF4 and EZH2[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 92: 39-49.
- [20] LIU K, LIU S, ZHANG W, *et al.* miR-494 promotes cell proliferation, migration and invasion, and increased sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma by targeting PTEN[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(2): 1003-1010.
- [21] XUE R, ZHAI R, XIE L, *et al.* Xuesaitong Protects Podocytes from Apoptosis in Diabetic Rats through Modulating PTEN-PDK1-Akt-mTOR Pathway[J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 9309768.
- [22] MAHIMAINATHAN L, DAS F, VENKATESAN B. Choudhury, Mesangial cell hypertrophy by high glucose is mediated by down-regulation of the tumor suppressor PTEN[J]. *Diabetes*, 2006, 55(7): 2115-2125.
- [23] 黄为钧, 赵进喜, 王世东, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探索益气活血祛风络法治疗糖尿病肾病的作用机制[J]. 环球中医药, 2018, 11(8): 1196-1203.
- [24] 严瑞. PPAR $\gamma$  调控 PTEN/AKT/FAK 通路影响糖尿病肾病肾小管间质纤维化的机制研究[D]. 贵州: 贵州医科大学, 2017.

(收稿日期: 2021-01-13; 修回日期: 2021-11-07; 编辑: 刘灵敏)