

miR-222 下调高糖下小鼠系膜细胞 TIMP3 表达

刘应兰, 曹仁贤, 杨 靖

(南华大学附属第一医院内分泌科, 湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 探讨 miR-222 是否通过靶向调控 TIMP3 表达参与糖尿病肾病的发生过程, 从而进一步揭示糖尿病肾病的发病机制。 **方法** 运用 qRT-PCR 检测经 25 mmol/L 葡萄糖处理的小鼠系膜细胞(HG 组)和对照小鼠系膜细胞(5 mmol/L 葡萄糖, NG 组)中 miR-222 和 TIMP3 的表达; 将 miR-222 mimics 转染小鼠系膜细胞, 以 TIMP3 siRNA 为阳性对照, 采用 Western blot 检测其对 TIMP3 蛋白表达水平的影响。 **结果** qRT-PCR 检测结果显示, miR-222 在经高糖处理的小鼠系膜细胞中的表达相对比正常浓度糖处理的小鼠系膜细胞中明显上调, 而 TIMP3 在经高糖处理的小鼠系膜细胞中 mRNA 的表达相对比正常浓度糖处理的小鼠系膜细胞中明显下调; Western blot 结果显示, 过表达 miR-222 或干扰 TIMP3 可抑制 TIMP3 蛋白的表达($P < 0.05$)。 **结论** miR-222 可能通过调控 TIMP3 的表达参与糖尿病肾病的发生发展。

关键词: miRNA-222; 糖尿病肾病; 金属蛋白酶组织抑制因子 3

中图分类号: R587.1 **文献标识码:** A

miR-222 Downregulates the Expression of TIMP3 in Mouse High Glucose Mesangial Cells

LIU Yinglan, CAO Renxian, YANG Jing

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To explicit whether miR-222 involved in diabetic nephropathy progression by targeting TIMP3, thus to reveal molecular mechanism of diabetic nephropathy. **Methods** A qRT-PCR was conducted for detect the expression of miR-222 and TIMP3 mRNA in high glucose condition (25 mmol/L glucose) and normal glucose condition (5 mmol/L glucose) in SV40 MES 13 mouse mesangial cells. SV40 MES 13 mouse mesangial cells were transfected with miR-222 mimics, and TIMP3 siRNA as for positive control, Western blot was performed to detect the expressions of TIMP3 protein. **Results** qRT-PCR showed that miR-222 was up-regulated in high glucose condition, however, the mRNA of TIMP3 was down-regulated in high glucose condition. Western blot showed that the expressions of TIMP3 protein was inhibited by transfected with miR-222 or siR TIMP3 in SV40 MES 13 mouse mesangial cells. **Conclusion** miR-222 may involved in diabetic nephropathy progression by regulating TIMP3.

Key words: miR-222; diabetic nephropathy; TIMP3

miRNAs 是一类高度保守的非编码小 RNA 分子, 能与靶基因 3' 非编码区特异性结合, 在转录后水平调控基因的表达, 从而导致靶 mRNA 降解和翻译阻遏^[1]。miRNAs 大约调控人类三分之一的蛋白编码基因的表达。miRNAs 调控很多重要的生物学

过程, 包括发育、细胞增殖和凋亡、细胞分化、代谢等^[2], 并且在很多疾病中表达异常, 包括糖尿病。金属蛋白酶组织抑制因子 3 (TIMP3) 是 TIMPs 家族成员之一。研究表明, TIMP3 多态性与 I 型糖尿病肾病的发病明显相关^[3], 并且 TIMP3 在人糖尿病肾小球中差异表达^[4]。研究表明, miR-222 通过调控 TIMP3 参与胃癌的发生发展^[5]。在高糖环境下, TIMP3 在患糖尿病肾病的人和小鼠的肾脏中表达下

调^[6]。本研究拟通过采用 qRT-PCR、荧光素酶报告系统以及 Western blot 检测 miR-222 是否通过靶向 TIMP3 参与糖尿病肾病的发生发展,为进一步阐明糖尿病肾病的发病机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞处理

SV40 MES 13 细胞系小鼠系膜细胞株,由中山大学附属肿瘤医学研究所惠赠。SV40 MES 13 细胞用低糖 DMEM 培养基培养。消化细胞接种于 6 孔板中,分别用 25 mmol/L 葡萄糖 (HG 组) 和 5 mmol/L 葡萄糖 (NG 组) 处理 SV40 MES 13 细胞 48 h。

1.2 主要材料

DMEM 培养液购自 invitrogen 公司; miR-222 mimics 与 scramble 购自 Exiqon 公司; TIMP3 siRNA 质粒购自 santa cruz 公司; TIMP3 抗体和 β -actin 抗体购自 CST 公司; Trizol 和 Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; 用于 qRT-PCR 的引物由 invitrogen 公司合成; qRT-PCR miRNA 和 mRNA Detection Kit 购自广州锐博生物技术公司。

1.3 qRT-PCR

采用 Trizol 法抽提细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA。PCR 扩增反应为 20 μ L 体系,包括 Taq DNA polymerase 5U/ μ L 0.2 μ L, 2 $\times$ SYBR Mix 10 μ L, miRNA RT product 2.0 μ L, MiR-PCR primers (5 mmol/L) 0.4 μ L, 灭菌蒸馏水 7.4 μ L。循环体系为: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 12 s, 62 $^{\circ}$ C 35 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。以 β -actin 为内参,所测定的 mRNA 的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析。

1.4 Western blot

为了明确 miR-222 对 TIMP3 的蛋白质表达的调控,运用将 Western blot 检测外源表达 miR-222 对 TIMP3 蛋白表达水平的改变。将 miR-222 mimics 转染 SV40 MES 13 细胞,以转染 miR-222-scramble 为阴性对照,转染 TIMP3 siRNA 为阳性对照,转染 48 h 后收集蛋白,并进行蛋白浓度测定。各组取等量样本,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭,加入 TIMP3 抗体或 β -actin 抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜。TBST 洗膜,加入二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗膜,然后加 ECL 发光剂, X 片曝光、显影、定影。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SV40 MES 13 小鼠系膜细胞中 miR-222 和 TIMP3 表达水平的检测

qRT-PCR 结果显示, miR-222 在高糖环境下 SV40 MES 13 细胞中的表达 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 为 4.173 ± 0.072 , 在低糖环境下的 SV40 MES 13 细胞中的表达 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) 为 0.528 ± 0.132 , NG 组明显低于 HG 组 ($P < 0.05$); TIMP3 在高糖环境下 SV40 MES 13 细胞中的表达为 0.237 ± 0.246 , 在低糖环境下的 SV40 MES 13 细胞中的表达为 1.216 ± 0.163 , NG 组明显高于 HG 组 ($P < 0.05$)。

2.2 miR-222 对 TIMP3 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示, 转染 miR-222 组 TIMP3 和 TIMP3 siRNA 组蛋白表达水平较阴性对照组明显降低, 提示, 在 SV40 MES 13 小鼠系膜细胞中 miR-222 能下调 TIMP3 蛋白的表达 (图 1)。

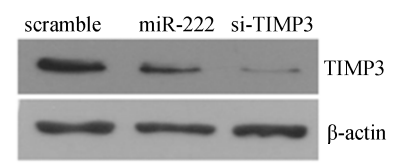


图 1 Western blot 检测外源表达 miR-222 对 TIMP3 蛋白表达的影响

3 讨 论

糖尿病肾病 (DN) 是慢性肾脏疾病的主要病因之一,在很大程度上促使了糖尿病患者的死亡率。从形态学上,糖尿病肾病主是以肾小管-间质纤维化,肾小球基底膜增厚,系膜外基质增生,从而导致纤维化,其主要原因是细胞外基质 (ECM) 的积聚所致。而细胞外基质的稳态主要受基质金属蛋白酶 (MMPs) 和金属蛋白酶组织抑制因子 (TIMPs) 两者之间的平衡所调控。TIMP3 在肾脏中大多高表达,在小鼠中 TIMP3 表达缺失与炎症、肾脏纤维化和肾小管间质损伤相关^[7-8]。TIMP3 也是调节组织微环境包括控制炎症和纤维化的关键因子^[8-9]。众所周

知,炎症在糖尿病肾病的发病机理中起主导作用^[10],在人类或小鼠模型研究表明,TIMP3 表达下调与糖尿病并发症和代谢炎症明显相关^[11-12]。

TIMPs 和 MMPs 之间的动态生理平衡决定细胞外基质 (ECM) 和组织微环境的稳态。研究显示,TIMP3 是 TIMPs 家族中在肾脏中表达最高的一种^[8],TIMP3 在小鼠中表达缺失,表现出对心脏病^[13]和肾质性肾炎和纤维化^[8]的敏感性增高。研究表明,TIMP3 表达缺失能加重糖尿病的肾脏损害,主要表现为肾脏的重量增加,肾小球系膜基质增厚,尿蛋白排泄增加,而这些都是糖尿病肾病的早期特征^[14]。TIMP3 是 MMP2 活性的重要抑制因子^[8,15],在 Akita 糖尿病的小鼠肾脏中 TIMP3 表达缺失能导致 MMP2 的活性增强。

本研究通过 qPT-PCR 检测发现,miR-222 在高糖环境中的小鼠系膜细胞中表达上调,而 TIMP3 在高糖环境中的小鼠系膜细胞中表达下调。研究已证实 TIMP3 是 miR-222 直接调控的靶基因^[16],本实验还通过蛋白质印迹试验证实了在小鼠系膜细胞中高表达 miR-222 能下调 TIMP3 蛋白的表达,表明 TIMP3 表达下调可能部分是由于 miR-222 表达上调所致。综上所述,本研究通过证实 miRNA-222 在转录后调控 TIMP3 的表达,从而参与糖尿病肾病的发生发展,为糖尿病肾病发展的可能分子机制提供了新的观点,也为其治疗提供了新的治疗靶点。

参考文献:

- [1] Tang H, Deng M, Tang Y, et al. miR-200b and miR-200c as prognostic factors and mediators of gastric cancer cell progression [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19 (20): 5602-5612.
- [2] Tang H, Kong Y, Guo J, et al. Diallyl disulfide suppresses proliferation and induces apoptosis in human gastric cancer through Wnt-1 signaling pathway by up-regulation of miR-200b and miR-22 [J]. Cancer Lett, 2013, 340 (1): 72-81.
- [3] Ewens KG, George RA, Sharma K, et al. Assessment of 115 candidate genes for diabetic nephropathy by transmission/disequilibrium test [J]. Diabetes, 2005, 54 (11): 3305-3018.
- [4] Woroniecka KI, Park AS, Mohtat D, et al. Transcriptome analysis of human diabetic kidney disease [J]. Diabetes, 2011, 60 (9): 2354-2369.
- [5] 唐海林, 苏坚, 邓敏, 等. 胃癌组织中 miR-222 与 TIMP3 的表达及临床意义 [J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39 (4): 194-197.
- [6] Fiorentino L, Cavallera M, Menini S, et al. Loss of TIMP3 underlies diabetic nephropathy via FoxO1/STAT1 interplay [J]. EMBO Mol Med, 2013, 5 (3): 441-455.
- [7] Basu R, Lee J, Wang Z, et al. Loss of TIMP3 selectively exacerbates diabetic nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2012, 303 (9): F1341-1352.
- [8] Kassiri Z, Oudit GY, Kandam V, et al. Loss of TIMP3 enhances interstitial nephritis and fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20 (6): 1223-1235.
- [9] Kassiri Z, Defamie V, Hariri M, et al. Simultaneous transforming growth factor beta-tumor necrosis factor activation and cross-talk cause aberrant remodeling response and myocardial fibrosis in Timp3-deficient heart [J]. J Biol Chem, 2009, 284 (43): 29893-29904.
- [10] Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19 (3): 433-442.
- [11] Federici M, Hribal ML, Menghini R, et al. Timp3 deficiency in insulin receptor-haploinsufficient mice promotes diabetes and vascular inflammation via increased TNF-alpha [J]. J Clin Invest, 2005, 115 (12): 3494-3505.
- [12] Casagrande V, Menghini R, Menini S, et al. Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in macrophages reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32 (1): 74-81.
- [13] Kassiri Z, Oudit GY, Sanchez O, et al. Combination of tumor necrosis factor-alpha ablation and matrix metalloproteinase inhibition prevents heart failure after pressure overload in tissue inhibitor of metalloproteinase-3 knockout mice [J]. Circ Res, 2005, 97 (4): 380-390.
- [14] Cardellini M, Menghini R, Martelli E, et al. TIMP3 is reduced in atherosclerotic plaques from subjects with type 2 diabetes and increased by SirT1 [J]. Diabetes, 2009, 58 (10): 2396-23401.
- [15] Moore L, Fan D, Basu R, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in heart failure [J]. Heart Fail Rev, 2012, 17 (4-5): 693-706.
- [16] Zhang C, Zhang J, Hao J, et al. High level of miR-221/222 confers increased cell invasion and poor prognosis in glioma [J]. J Transl Med, 2012, 10: 119.

(此文编辑:朱雯霞)