

miR-92b 与 PI3K/Akt 在糖尿病肾病中相关性的初步研究

申永超 林佳 冯琪 朱大荣[▲]
杭州市第一人民医院放射科,浙江杭州 310006

[摘要] 目的 探讨 miR-92b 与信号通路 PI3K/Akt 在糖尿病肾病中的相关性。方法 选取 8 周龄的 C57BL/6 雄性小鼠 12 只,随机分为正常对照组和糖尿病肾病组,利用枸橼酸钠建立糖尿病肾病小鼠模型;选取人肾小管上皮 HK-2 细胞 12 瓶,随机分为高糖组、低糖组和左旋葡萄糖组,用高糖刺激建立糖尿病肾病细胞模型。利用实时荧光定量 PCR 检测小鼠肾脏组织和细胞中 miR-92b 表达水平,Western blot 检测小鼠肾脏组织和细胞中 Akt 和 P-Akt 的表达水平。结果 糖尿病肾病组和高糖组 miR-92b 表达水平明显低于对照组($P<0.05$),而 P-Akt/Akt 表达水平明显高于对照组($P<0.05$)。将信号通路 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 加入到高糖诱导的糖尿病肾病细胞模型中,信号通路 PI3K/Akt 被抑制的同时,miR-92b 表达显著升高($P<0.05$)。结论 糖尿病肾病时,miR-92b 与 PI3K/Akt 的表达呈负相关。

[关键词] 糖尿病肾病;miR-92b;PI3K;Akt;LY294002

[中图分类号] R587.2;R364.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-9701(2021)30-0044-05

The preliminary study on the correlation between miR-92b and PI3K/Akt in diabetic nephropathy

SHEN Yongchao LIN Jia FENG Qi ZHU Darong

Department of Radiology, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, China

[Abstract] **Objective** To explore the relationship between miR-92b and PI3K/Akt signaling pathway in diabetic nephropathy. **Methods** Twelve 8-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into a normal control group and a diabetic nephropathy group. The diabetic nephropathy mouse model was established using sodium citrate. 12 bottles of human renal tubular epithelial HK-2 cells were selected and randomly divided into high glucose group, low glucose group and L-glucose group. The diabetic nephropathy cell model was established with high glucose stimulation. The expression levels of miR-92b in mouse kidney tissues and cells were detected by RT-PCR. The expression levels of Akt and P-Akt in mouse kidney tissues and cells were detected by Western blot. **Results** Compared with that of the control group, the expression level of miR-92b in the kidney tissue and cells of the diabetic nephropathy model group was significantly lower ($P<0.05$), and the expression level of P-Akt/Akt was significantly higher ($P<0.05$). The PI3K/Akt signaling pathway inhibitor LY294002 was added to the high glucose-induced diabetic nephropathy cell model. While PI3K/Akt signaling pathway was inhibited, the expression level of miR-92b was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** In diabetic nephropathy, miR-92b is negatively correlated with the expression of PI3K/Akt signaling pathway.

[Key words] Diabetic nephropathy; miR-92b; PI3K; Akt; LY294002

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是由糖尿病长期迁延不愈而致的肾脏微血管并发症,已是当前引起全球终末期肾脏疾病的主要病因之一^[1]。由于导致 DN 的病因复杂多样,医学治疗效果有限,目前临床仍不能彻底治愈 DN,只能维持治疗,延缓进展至终末期肾病。有研究表明^[2],microRNA-92b(miR-92b)可通过激活 DOC-2/DAB2 相互作用蛋白(DAB2 interactive protein, DAB2IP)下游信号通路 PI3K/AKT 促

进胃癌细胞的生长,而此信号通路又在 DN 足细胞损伤、系膜细胞凋亡和肾小管细胞间质化等关键病变过程中起着不可替代的作用^[3-5]。提示 miR-92b 与 PI3K/AKT 信号通路可能在 DN 病理变化中具有一定的相关性,目前国内尚未见与此相关的文献报道。因此,为深入研究 DN 的发病机制,寻找治疗 DN 新的靶基因,本研究拟初步探究 miR-92b 与 PI3K/AKT 信号通路在 DN 中的表达情况及相关性,为进一步深入研究 miR-92b 与 PI3K/AKT 信号通路在 DN 病理变化过程中的具体机制做准备。

[基金项目] 浙江省医药卫生科技计划项目(2020RC092)

▲通讯作者

1 材料与方法

1.1 实验材料

雄性 C57BL/6 小鼠(上海斯莱克公司);人肾小管上皮 HK-2s 细胞株(中国科学院上海细胞库);小鼠代谢笼(美国 Columbus);链佐星(美国 Sigma);miR-92 引物(广州瑞博生物科技有限公司);SYBRGreen-Master(瑞士 Roche);DMEM 培养基及胎牛血清(上海联硕);胰酶(美国 Gibco);LY294002 抑制剂(北京百奥莱博科技有限公司);鼠源性 P-Akt 及 Akt 单克隆抗体、抗 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶 HRP(英国 Abcom);RNA 提取试剂盒及反转录试剂盒(瑞士 Roche);BSA 封闭液及 RIPA 裂解液(北京索莱宝科技有限公司);PVDF 膜(美国 MiLipore);CO₂ 培养箱(美国 Thermo);MyCycler PCR 扩增仪(美国伯乐公司);实时定量 PCR 仪(美国 Life Technologies)。

1.2 糖尿病肾病小鼠模型的建立

把 12 只 C57BL/6(8 周龄)雄性小鼠随机分为糖尿病肾病实验组(Dia 组)和正常对照组(Con 组),禁食 12 h 后称体重并测量空腹血糖。Dia 组按 70 mg/kg 左下腹注射用枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液配制的链佐星溶液,两日注射 1 次,共 3 次;Con 组也按 70 mg/kg 左下腹注射枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液,2 d 注射 1 次,共 3 次。两组小鼠在同一动物房内分笼饲养,标准饮食,每 3 天换一次垫料,并观察小鼠饮水、饮食、排尿的变化。连续 3 d 随机测定两组小鼠血糖值,若 Dia 组小鼠血糖值 ≥ 16.67 mmol/L,建立的糖尿病模型已达标。再继续喂养 3 个月,DN 小鼠模型(1 型)基本建立成功。

1.3 糖尿病肾病细胞模型的建立

以人肾小管上皮细胞 HK-2 为实验对象,采用高糖诱导的方法建立糖尿病肾病细胞模型。按实验要求培养 12 瓶 HK-2 细胞,随机分为三组:高糖组(HG 组)、低糖组(LG 组)和左旋葡萄糖组(DG 组),每组 4 瓶。三组细胞均以无血清培养基饥饿 24 h 后,按实验要求加入干预因素刺激 24 h,HG 组用 25 mmol/L 右旋葡萄糖刺激;LG 组用 5 mmol/L 右旋葡萄糖刺激;DG 组用 25 mmol/L 左旋葡萄糖刺激。24 h 后收集细胞用于 RNA 的反转录和 cDNA 的聚合酶链式扩增(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)及免疫印迹试验(Western blot)。

1.4 小鼠标本的收集及指标测定

小鼠造模期间每周称体重,每隔 2 周经小鼠尾静脉取血液标本并测血糖值。处死小鼠前 1 d 用代谢笼收集 24 h 尿液标本,检测尿液中微量白蛋白(Microalbuminuria, MAU)和尿 N-乙酰- β -D 氨基葡萄糖甙(Urinary N-acetyl-beta-D glucosamine glucoside en-

zyme, NAG)。处死小鼠,称体重后解剖小鼠,取肾组织,记录各组小鼠肾脏重量,计算肾指数(肾重量/小鼠体重)。

1.5 细胞培养和处理

HK-2 细胞培养于 RPMI-1640 培养基中,选取对数生长期细胞,传代于 24 个细胞瓶中,按实验要求平分为 6 组,分别为 -LY294002 的 HG 组、LG 组、DG 组和 +LY294002 的 HG 组、LG 组、DG 组。-LY294002 的 HG 组、LG 组和 DG 组细胞按 1.3 实验方法进行高糖刺激,+LY294002 的 HG 组、LG 组和 DG 组细胞用高糖刺激的同时加入 LY294002 (25 μ mol/L),加入 LY294002 1 h 后收集细胞,为进行 RT-PCR 做准备。

1.6 RNA 提取与 RT-PCR 检测

按照 RNA 提取试剂盒操作说明书对小鼠肾组织和 HK-2 细胞进行总 RNA 提取,然后紫外分光光度计检测 RNA 浓度及纯度,并按照反转录试剂盒操作说明书将 RNA 逆转录为 cDNA。然后配制 RT-PCR 混合反应体系(2 μ L 的 cDNA,0.8 μ L 的 RT 引物,6.4 μ L 的 SYBR Green Mix 和 10 μ L 无菌蒸馏水,共 20 μ L)。反应条件为 50 $^{\circ}$ C, 2 min;95 $^{\circ}$ C, 10 min;95 $^{\circ}$ C, 15 s;60 $^{\circ}$ C, 1 min;增至 40 个循环。PCR 仪把 U6 作为内参对实验结果进行分析。

1.7 Western blot 检测

用裂解液对小鼠肾脏组织及 HK-2 细胞进行裂解后,4 $^{\circ}$ C, 12 000 rpm,离心 5 min,取上清分装至 0.5 mL 离心管中。测定蛋白质浓度,并用酶标仪在 562 nm 处测定紫外吸收峰,算出蛋白浓度后并对蛋白样品进行处理。配制分离胶和堆积胶,电泳,转膜,封闭,双抗 4 $^{\circ}$ C 孵育,蛋白显影。用 Image J 图像分析软件对实验结果进行灰度分析。

1.8 统计学方法

本研究所得数据用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用 *one-way Anova* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立糖尿病肾病小鼠模型的结果

糖尿病肾病小鼠模型建立后,测两组小鼠体重、肾指数、血糖。与 Con 组相比,Dia 组体重明显降低($P < 0.01$),肾指数、血糖显著升高($P < 0.001$)。见图 1。同时为了验证 Dia 组小鼠合并肾脏并发症,测小鼠 24 h 尿液中 MAU、NAG 含量。与 Con 组相比,Dia 组 MAU、NAG 含量显著升高($P < 0.05$)。见图 2。

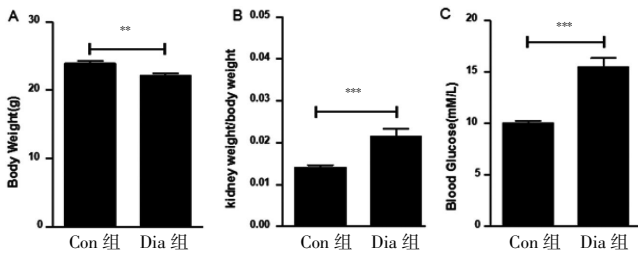


图1 造模后小鼠体重、肾指数、血糖变化情况

A:小鼠体重变化;B:小鼠肾指数变化;C:小鼠血糖变化
注:与 Con 组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

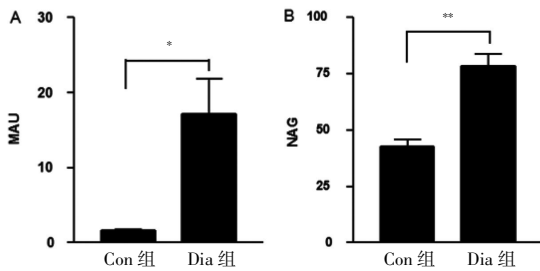


图2 造模后小鼠尿液中 MAU、NAG 的含量

A:小鼠尿液中 MAU 的含量;B:小鼠尿液中 NAG 的含量
注:与 Con 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.2 miR-92b、P-Akt 和 Akt 在糖尿病肾病小鼠模型中的表达检测

通过对小鼠肾脏组织 miR-92b 的表达分析,发现 Dia 组明显低于 Con 组($P<0.05$)。见图 3。通过 Western blot 对小鼠肾脏组织 Akt、P-Akt 显影,灰度分析发现,与 Con 组相比,Dia 组 P-Akt/Akt 比值明显升高($P<0.05$)。见图 4。

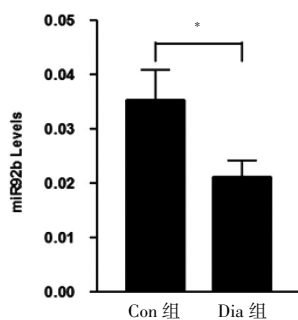


图3 小鼠肾组织中 miR-92b 的表达水平

注:与 Con 组比较,* $P<0.05$

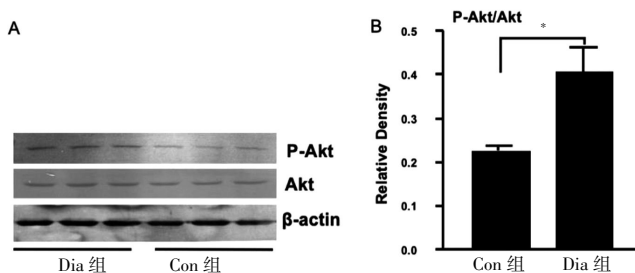


图4 小鼠肾组织 Akt 和 P-Akt 蛋白的表达

A: Akt 与 P-Akt 蛋白 Western blot 检测条带;B: P-Akt 与 Akt 蛋白灰度比值

注:与 Con 组比较,* $P<0.05$

2.3 miR-92b、P-Akt 和 Akt 在糖尿病肾病细胞模型中的表达检测

采用高糖针对 HK-2s 细胞株进行 24 h 诱导建立糖尿病肾病细胞模型,通过对各组细胞 miR-92b 的表达检测分析,与 LG 组相比,HG 组 miR-92b 明显表达量降低($P<0.001$)。见图 5。Western blot 检测各组细胞中 P-Akt 和 Akt 表达水平,与 LG 组相比,HG 组细胞中 P-Akt/Akt 比值明显升高($P<0.05$)。见图 6。

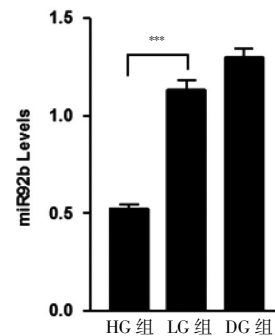


图5 各组细胞中 miR-92b 的表达水平

注:与 Con 组比较,*** $P<0.001$

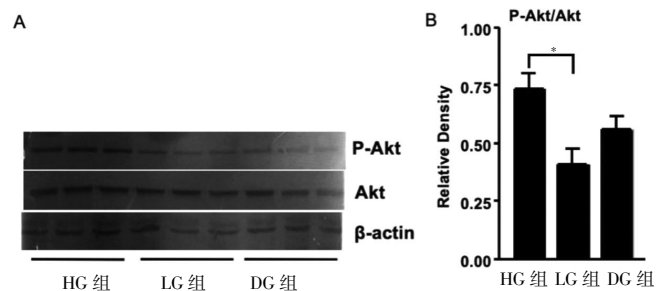


图6 各组细胞 Akt 和 P-Akt 的表达

A: Akt、P-Akt 蛋白 Western blot 检测条带;B: P-Akt 与 Akt 蛋白灰度比值

注:与 Con 组比较,* $P<0.05$

2.4 加入抑制剂 LY294002 后糖尿病肾病细胞模型中 miR-92b 的表达检测

仍选用 HK-2 为研究对象,通过 RT-PCR 分析加入 LY294002 后各组细胞中 miR-92b 的表达量,-LY294002 的 HG 组细胞中 miR-92b 表达量仍然明显低于+LY294002 的 LG 组($P<0.001$)。而+LY294002 的 HG 组细胞中 miR-92b 表达量明显高于-LY294002 的 HG 组($P<0.001$)和 LG 组($P<0.05$)及+LY294002 的 LG 组($P<0.001$)。见图 7。

3 讨论

DN 不仅是糖尿病严重的微血管并发症,也是引起糖尿病死亡的主要病因之一。目前,DN 临床治疗尚无有效的治疗措施,除非肾移植,但肾移植不仅肾源

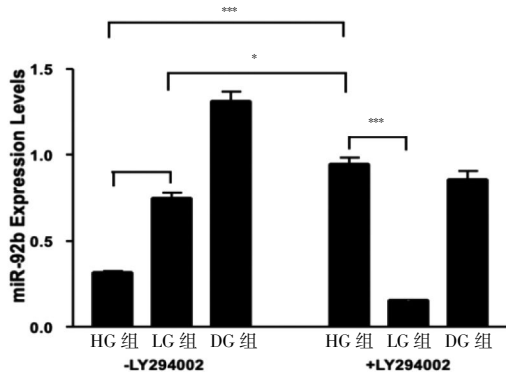


图7 加入 LY294002 后各组细胞中 miR-92b 的表达

注:与-LY294002 的 HG 组比较,*** $P < 0.001$;与 LY294002 的 LG 组比较,* $P < 0.05$;与+LY294002 的 LG 组比较,*** $P < 0.001$

难寻,移植后需长期服用免疫抑制剂,还不能防止 DN 的再发生和改善其他糖尿病并发症。随着病情的蔓延,患者将最终因肾功能衰竭而死亡。DN 的病变涉及到多种因素,如代谢、高血压、肾素-血管紧张素系统等,它们或单一因素或多因素相互作用共同导致 DN^[6-7]。因 DN 病因复杂,本研究对防治 DN 的有效措施难以寻找。

miRNA 的发现为研究 DN 的基因病变和基因治疗指明了新的方向。miRNA 是一种在生物种内高度保守的小非编码 RNA 分子,主要通过信使 RNA(mRNA)的翻译抑制或降解来调节各种基因表达,从而调节机体正常发育和各种疾病的病理演变过程^[8-12]。以往学者的研究表明,miR-92b 作为一种癌基因,其异常表达与肿瘤大小、肿瘤分化和较差的总体生存率密切相关,如胃癌、乳腺癌、宫颈癌等^[2,13-14]。本研究显示,无论是体内实验还是体外实验结果,与正常对照组相比,miR-92b 在小鼠和细胞 DN 模型组的表达明显下降,表明 miR-92b 不仅是一种癌基因,还在机体高血糖时表达异常,并且与 DN 病变相关。

PI3K 于 1985 年被发现,是一种磷酸化磷脂酰肌醇的脂质激酶,磷脂酰肌醇是真核细胞膜的组成部分^[15]。激活受体酪氨酸激酶(RTKs)和 G 蛋白偶联受体(GPCR)通过激活 Ras,进而激活 PI3K。活化的 PI3K 使底物磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(P1P2)磷酸化,在真核细胞内膜上形成磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸(PIP3),随后募集信号蛋白,如 Akt 蛋白^[16-17]。Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,需通过两个关键的磷酸化过程被激活。首先,PIP3 与 Akt 和磷脂酰肌醇依赖性蛋白激酶 1(PDK1)结合,促使 PDK1 磷酸化 AKT 蛋白的苏氨酸 308 位点,导致 AKT 部分被激活,随后通过 mTOR 复合物 2(mTORC2)磷酸化 Akt 蛋白的丝氨酸 473 位点,激活 Akt 的全部酶活性,该活化过程由 PI3K 依赖性机制激活^[18]。所以 Akt 被磷酸化的前

提是 PI3K 被激活。数十年已经过去了,PI3K/Akt 通路由于其有多种功能,仍然是当今科研的热点。已有研究表明,机体高血糖时,异常表达的 miRNA 可通过激活的 PI3K/Akt 通路发挥其调节机制^[19-21]。本研究体内实验结果显示,与 Con 组相比,Dia 组小鼠肾组织 P-Akt/Akt 比值升高;体外实验结果显示,与 LG 组相比,HG 组细胞 P-Akt/Akt 比值同样升高。P-Akt/Akt 比值升高,说明 DN 时 PI3K 被激活,Akt 磷酸化水平升高,即 PI3K/Akt 通路被激活,这与以往学者的研究结果一致。

以上研究结果表明,DN 时 miR-92b 表达下调,信号通路 PI3K/Akt 活性表达上调。那么是否在 DN 病变过程中 miR-92b 与信号通路 PI3K/Akt 存在关联性?为此,本研究仍以 HK-2 细胞为研究对象,向高糖诱导的 DN 细胞模型中加入 PI3K 抑制剂 LY294002,实时荧光定量 PCR 检测细胞中的 miR-92b。结果发现,与-LY294002 的 HG 组、-LY294002 的 LG 组和+LY294002 的 LG 组相比,+LY294002 的 HG 组 miR-92b 表达水平升高,说明当 DN 病变时,抑制信号通路 PI3K/Akt 可以上调 miR-92b 表达水平。

综上所述,DN 病变时,miR-92b 表达下调,miR-92b 表达水平与 PI3K/Akt 活性呈负相关性。此次研究仅对 miR-92b 和 PI3K/Akt 在 DN 病变时的表达变化及其关联性进行了初步研究,但为进一步研究 miR-92b 与 PI3K/Akt 在 DN 病变中的具体调节机制和寻找治疗 DN 新的靶基因做了预实验准备。

[参考文献]

- [1] Magee C, Grieve DJ, Watson CJ, et al. Diabetic nephropathy: A tangled web to unweave[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2017, 31(5-6): 579-592.
- [2] Ni QF, Zhang Y, Yu JW, et al. miR-92b promotes gastric cancer growth by activating the DAB2IP-mediated PI3K/AKT signalling pathway[J]. Cell Prolif, 2020, 53(1): e12 630.
- [3] Huang G, Lv J, Li T, et al. Notoginsenoside R1 ameliorates podocyte injury in rats with diabetic nephropathy by activating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2016, 38(4): 1179-1189.
- [4] Wang Y, He Z, Yang Q, et al. XBP1 inhibits mesangial cell apoptosis in response to oxidative stress via the PTEN/AKT pathway in diabetic nephropathy[J]. FEBS Open Bio, 2019, 9(7): 1249-1258.
- [5] Ma Y, Chen F, Yang S, et al. Silencing of TRB3 ameliorates diabetic tubule interstitial nephropathy via PI3K/AKT signaling in rats[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 2816-2824.

- [6] Yu SM, Bonventre JV. Acute kidney injury and progression of diabetic kidney disease[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2018, 25(2): 166–180.
- [7] Dounousi E, Duni A, Leivaditis K, et al. Improvements in the management of diabetic nephropathy[J]. *Rev Diabet Stud*, 2015, 12(1–2): 119–133.
- [8] Hayes CN, Chayama K. MicroRNAs as biomarkers for liver disease and hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3): 280.
- [9] Kamran F, Andrade AC, Nella AA, et al. Evidence that up-regulation of MicroRNA-29 contributes to postnatal body growth deceleration[J]. *Molecular Endocrinology*, 2015, 29(6): 921–932.
- [10] Shenoy A, Blalock RH. Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(9): 565–576.
- [11] Humphries B, Wang Z, Yang C. The role of microRNAs in metal carcinogen-induced cell malignant transformation and tumorigenesis[J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 98(Pt A): 58–65.
- [12] Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, et al. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6249.
- [13] Liu F, Sang M, Meng L, et al. miR92b promotes autophagy and suppresses viability and invasion in breast cancer by targeting EZH2[J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(4): 1505–1515.
- [14] Sun Y, Feng Y, Zhang G, et al. The endonuclease APE1 processes miR-92b formation, thereby regulating expression of the tumor suppressor LDLR in cervical cancer cells[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2019, 11: 1–20.
- [15] David A, Fruman REM, Lewis C. Cantley. Phosphoinositide kinases[J]. *Annu Rev Biochem*, 1998(10): 481–507.
- [16] Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, et al. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signaling[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11(5): 329–341.
- [17] Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, et al. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate [J]. *Science*, 1997, 275(5300): 665–673.
- [18] Huang X, Liu G, Guo J, et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1483–1496.
- [19] Zhang Y, Zhao S, Wu D, et al. MicroRNA-22 promotes renal tubulointerstitial fibrosis by targeting PTEN and suppressing autophagy in diabetic nephropathy[J]. *J Diabetes Res*, 2018, 2018: 4728645.
- [20] Xue M, Cheng Y, Han F, et al. Triptolide attenuates renal tubular epithelial-mesenchymal transition via the MiR-188-5p-mediated PI3K/AKT pathway in diabetic kidney disease[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1545–1557.
- [21] Chen SH, Liu XN, Peng Y. MicroRNA-351 eases insulin resistance and liver gluconeogenesis via the PI3K/AKT pathway by inhibiting FLOT2 in mice of gestational diabetes mellitus[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(9): 5895–5906.

(收稿日期: 2020-11-08)