

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.21.027

糖尿病肾病大鼠血清 miR-146a 表达及其与炎症指标和氧化应激指标的相关性

高艳飞

(辽河油田总医院检验科, 辽宁盘锦 124010)

摘要:目的 探讨糖尿病肾病(DKD)大鼠血清 miR-146a 表达及其与炎症指标和氧化应激指标的相关性。方法 100 只 SD 大鼠按照随机数字表法分为对照组和模型组, 每组 50 只, 模型组大鼠高糖高脂饲料喂养+链脲佐菌素(40 mg/kg)腹腔注射, 对照组大鼠基础饲料喂养+等量生理盐水腹腔注射。采用 RT-PCR 法检测血清 miR-146a 表达, 酶联免疫吸附试验检测核转录因子- κ B (NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、高级氧化蛋白产物(AOPPs)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的水平。分析血清 miR-146a 与炎症指标和氧化应激指标的相关性。结果 模型组大鼠血清 miR-146a 表达、SOD 水平低于对照组, 血清 NF- κ B、TNF- α 、IL-1 β 、MDA 和 AOPPs 水平高于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。血清 miR-146a 与 NF- κ B、TNF- α 、IL-1 β 、MDA 和 AOPPs 呈负相关($P < 0.05$), 与 SOD 呈正相关($P < 0.05$)。结论 DKD 大鼠血清 miR-146a 表达降低, 且与炎症指标和氧化应激指标相关, miR-146a 有望成为 DKD 的潜在分子标志物, 从而指导疾病的诊断和治疗。

关键词: miR-146a; 糖尿病肾病; 炎性反应; 氧化应激

中图分类号: R587.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)21-3252-04

The relationship between miR-146a and inflammatory response, oxidative stress in diabetic kidney disease

GAO Yanfei

(Department of Clinical Laboratory, Liaohe Oilfield General Hospital, Panjin, Liaoning 124010, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between miR-146a and inflammatory response and oxidative stress in diabetic kidney disease. **Methods** A total of 100 SD rats were divided into control group according to the random number table method, 50 rats in each group. Rats in the model group were fed with high glucose and high fat diet and injected with streptozotocin (40 mg/kg), while rats in the control group were fed with basic diet and injected with the same amount of normal saline. The serum miR-146a was detected by RT-PCR method. The serum nuclear transcription factor (NF)- κ B, tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and advanced oxidative protein products (AOPPs) were detected by ELISA. The serum malonaldehydesuperoxide dismutase (MDA) and superoxide dismutase (SOD) levels were detected by thiobarbituric acid method and chemical colorimetric method. **Results** The serum miR-146a and SOD level in model group was lower than that in control group, the serum NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , MDA and AOPPs in model group were higher than those in control group. The miR-146a negatively correlated with NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , MDA, AOPPs ($P < 0.05$), and positively correlated with SOD ($P < 0.05$). **Conclusion** The serum miR-146a in DKD model rats decreases, which relates to inflammatory reaction and oxidative stress. miR-146a is expected to be one of the potential molecular markers of DKD, which will guide the diagnosis and treatment of the disease.

Key words: miR-146a; diabetic kidney disease; inflammatory reaction; oxidative stress

糖尿病肾病(DKD)是糖尿病患者常见并发症之一。我国 DKD 的发病率呈不断上升之势, 研究显示 20%~45% 的糖尿病患者存在不同程度的肾脏损伤, 如不及早干预将进展为终末期肾病^[1-2]。有关 DKD 具体发病机制和病理基础尚未完全阐明, 越来越多的证据表明炎性反应和肾脏氧化应激损伤是引起 DKD 发病的重要环节^[3-4]。有关 miRNA 在 DKD 发病过程中发挥的作用逐渐引起众多学者的重视。近年来研究发现 miR-146a 的表达在合并周围神经病变、糖尿病视网膜病变等并发症的糖尿病患者中发生改变^[5-6]。

本研究主要分析 DKD 模型大鼠血清 miR-146a 的表达, 及其与大鼠炎性反应和氧化应激指标的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 雌雄大鼠 100 只, 体质量 203~215 g, 购自中国科学院斯莱克实验动物中心(SCXK 京 2011-0012), 购回后适应性饲养 2 周后再用于实验。按照随机数字表法分为对照组($n=50$)和模型组($n=50$)。

1.2 仪器与试剂 链脲佐菌素(Sigma 公司, 美国); TRIzol 总 RNA 提取试剂盒(Invitrogen, 美国); 反转

录试剂盒 (ABI Applied Biosystems, 美国); RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa, 日本); 核转录因子- κ B (NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-1 β 和高级氧化蛋白产物 (AOPPs) 的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒 (美国 R&D Systems 公司); 超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 检测试剂 (上海铭博生物科技有限公司); TBA-40FR 全自动生化分析仪 (日本东芝公司); 尿清蛋白放射免疫测定试剂盒 (中国原子能科学院同位素研究所)。

1.3 DKD 大鼠模型构建 对照组和模型组分别给予基础饲料和高糖高脂饲料 (基础饲料 64%、猪油 8%、蛋黄粉 9%、蔗糖 18%、胆酸钠 1%) 喂养。8 周后, 模型组大鼠采用无菌枸橼酸钠缓冲液配制的链脲佐菌素 (40 mg/kg) 行腹腔注射, 对照组大鼠腹腔注射等量生理盐水, 分别予以之前的饲料继续喂养 4 周。4 周后, 采集大鼠尾静脉血, TBA-40FR 全自动生化分析仪检测空腹血糖 (FPG); 代谢笼留取 24 h 尿液, 采用放射免疫法测定尿清蛋白水平 (μ g/mL), 计算 24 h 尿蛋白排泄率 (UAER, μ g/min) = 尿清蛋白水平 $\times$ 24 h 尿液总量 (mL) / 60 min $\times$ 24 h。若空腹血糖 (FBG) $\geq$ 16.7 mmol/L, UAER $>$ 30 mg/24 h, 则视为造模成功。

1.4 RT-PCR 检测血清 miR-146a 表达 采集 2 组大鼠尾静脉血, TRIzol 法提取血清总 RNA, 按反转录试剂盒操作说明反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 引物 miR-146a 上游: 5'-GGG TGA GAA CTG AAT TCC A-3', 下游: 5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3'。U6 上游: 5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T-3', 下游: 5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C, 10 min; 95 $^{\circ}$ C, 15 s; 60 $^{\circ}$ C, 15 s; 72 $^{\circ}$ C, 15 s; 55 $^{\circ}$ C, 15 s; 共计 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因相对表达 (RQ), $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

1.5 炎症反应和氧化应激指标检测 采集 2 组大鼠尾静脉血, 采用 ELISA 法测定 NF- κ B、TNF- α 、IL-1 β 、AOPPs 水平。采用硫代巴比妥酸法和化学比色法测定 MDA 和 SOD 水平。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理及统计分析, 符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验; 相关分析采用 Pearson 相关, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清 miR-146a 表达比较 对照组和模型组大鼠血清 miR-146a 表达量分别为 23.14 ± 5.81 、 14.67 ± 4.59 , 模型组大鼠血清 miR-146a 表达量明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($t = 5.720$, $P < 0.05$)。

2.2 2 组血清 NF- κ B、TNF- α 和 IL-1 β 水平比较 模型组大鼠血清 NF- κ B、TNF- α 和 IL-1 β 水平均明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 2 组血清 SOD、MDA 和 AOPPs 水平比较 模

型组大鼠血清 MDA 和 AOPPs 水平明显高于对照组, SOD 水平明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 2 组血清 NF- κ B、TNF- α 和 IL-1 β 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	NF- κ B (ng/mL)	TNF- α (ng/L)	IL-1 β (pg/mL)
模型组	50	74.34 $\pm$ 31.09	44.19 $\pm$ 24.83	39.17 $\pm$ 20.54
对照组	50	19.35 $\pm$ 8.67	21.06 $\pm$ 9.33	10.24 $\pm$ 3.37
<i>t</i>		8.519	4.360	6.949
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

表 2 2 组血清 SOD、MDA 和 AOPPs 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	SOD (U/mL)	MDA (nmol/mL)	AOPPs (μ mol/L)
模型组	50	75.31 $\pm$ 10.46	5.04 $\pm$ 1.38	65.98 $\pm$ 20.41
对照组	50	86.37 $\pm$ 16.29	4.06 $\pm$ 1.13	53.28 $\pm$ 13.52
<i>t</i>		2.857	2.747	2.594
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

2.4 miR-146a 与各指标的相关分析 模型组大鼠血清 miR-146a 与 NF- κ B、TNF- α 、IL-1 β 、MDA 和 AOPPs 呈显著负相关 ($P < 0.05$), 与 SOD 呈显著正相关 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 miR-146a 表达与各指标的相关分析					
指标	<i>r</i>	<i>P</i>	指标	<i>r</i>	<i>P</i>
NF- κ B	-0.704	0.002	MDA	-0.674	0.009
TNF- α	-0.632	0.011	SOD	0.809	0.000
IL-1 β	-0.761	0.000	AOPPs	-0.613	0.014

3 讨 论

miR-146a 定位于人类基因染色体的 5q34 位点上, 是一个典型的多靶基因调节器。已有研究显示 miR-146a 在糖尿病周围神经病变和糖尿病视网膜病变等糖尿病并发症患者中的表达下降^[5-6]。那么 miR-146a 在 DKD 发生、发展中扮演何种角色? miR-146a 与慢性炎症反应和肾脏氧化应激损伤之间又存在何种联系? 目前仍鲜有文献报道。本研究结果显示, 模型组大鼠血清 miR-146a 表达明显低于对照组, 这说明 miR-146a 可能在 DKD 的发生、发展中起重要作用。

NF- κ B 信号通路是重要的炎症反应通路, 在免疫应答、炎症反应、细胞增殖和凋亡等多种过程中发挥调控作用。TAGANOV 等^[7]学者研究发现, 在 TNF- α 和 IL-1 β 等刺激下, 通过 NF- κ B 通路上调 miR-146a 表达; 而 miR-146a 反过来通过 TNF 受体相关因子 6 (TRAF6) 和 IL-1 受体相关激酶 1 (IRAK1), 减少下游 IL-6、IL-8、IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子的表达, 从而形成一个负反馈调控过程。此外, HE 等^[8]学者证实, miR-146a 是 Notch 的直接靶基因, 可通过 Notch 信号通路途径调控其下游各种炎症因子的表达。本研究结果发现, 模型组大鼠血清 NF- κ B、TNF- α 和 IL-1 β 的水平均明显高于对照组, 相关性分析显示模型组大鼠血清 miR-146a 表达与 NF- κ B 和 TNF- α 呈负相关。这也进一步证实了 miR-146a 可通过调节 NF- κ B 及其下游炎症因子的表达参与 DKD 的发生、发展。

氧化应激损伤在 DKD 的发生、发展中起关键作用。高糖诱导细胞内活性氧(ROS)产生增加,导致 ROS 生成和清除失衡^[9-10]。一方面,ROS 增加会导致肾小球滤过膜上的负电荷丢失,破坏肾小球滤过屏障,带负电荷的清蛋白易于从肾小球滤过膜溢出。长期蛋白尿会导致肾小球和肾小管损伤。另一方面,ROS 引起的氧化应激反应,致使脂质过氧化产物蓄积,引起肾脏损伤。SOD、MDA 和 AOPPs 是评价机体氧化应激状态的常用指标,其水平反映了机体氧化应激损伤的严重程度。血清 miR-146a 表达变化与机体氧化应激损伤之间存在何种联系?尹斌等^[11]学者研究显示,miR-146a 可减轻过氧化氢所致人胃腺癌细胞株的氧化应激损伤,过表达 miR-146a 可明显增加细胞 SOD 活力,减少 MDA 水平。本研究结果显示,模型组大鼠血清 MDA 和 AOPPs 水平明显高于对照组,SOD 水平明显低于对照组,说明模型组大鼠存在明显的氧化应激反应,肾脏氧化应激损伤可能是导致 DKD 发生、发展的重要原因。

综上所述,DKD 大鼠血清 miR-146a 表达降低,可能参与了炎症反应和肾脏氧化应激损伤,从而参与 DKD 的发生、发展。miR-146a 有望成为 DKD 的潜在分子标志物之一,从而指导疾病的诊断和治疗。

参考文献

[1] 杨立勇.关注糖尿病微血管并发症研究进展[J].中华糖尿病杂志,2016,8(8):449-451.
[2] 罗萍,毛继明,汪浩,等.相关生物标志物在糖尿病肾病早期诊断的临床意义[J].检验医学与临床,2017,14(14):2082-2085.
[3] ELMARAKBY A A, SULLIVAN J C. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy[J]. Cardiovasc Ther, 2012, 30(1): 49-

59.

[4] HU C, SUN L, XIAO L, et al. Insights into the mechanisms involved in the expression and regulation of extracellular matrix proteins in diabetic nephropathy[J]. Curr Med Chem, 2015, 22(24): 2858-2870.
[5] YOUSEFZADEH N, ALIPOUR M R, SOUFI F G. De-regulation of NF-kappa B-miR-146a negative feedback loop May be involved in the pathogenesis of diabetic neuropathy[J]. J Physiol Biochem, 2015, 71(1): 51-58.
[6] WANG Q, BOZACK S N, YAN Y, et al. Regulation of retinal inflammation by rhythmic expression of mi R-146a in diabetic retina rats[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(7): 4402-4409.
[7] TAGANOV K D, BOLDIN M P, CHANG K J, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(33): 12481-12486.
[8] HE Y, SUN X, HUANG C, et al. MiR-146a regulates IL-6 production in Lipopolysaccharide-Induced RAW264. 7 macrophage cells by inhibiting notch1[J]. Inflammation, 2014, 37(1): 71-82.
[9] LINDBLOM R, HIGGINS G, COUGHLAN M. Targeting mitochondria and reactive Oxygen Species-Driven pathogenesis in diabetic nephropathy[J]. Rev Diabet Stud Rds, 2015, 12(1/2): 134-156.
[10] 夏莉莉,汤瑜斌,邵侃.前列地尔对糖尿病肾病患者血液流变学、免疫功能及 MDA、SOD、ROS 的影响[J].海南医学院学报,2016,22(14):1528-1531.
[11] 尹斌,刘真,张亚洁,等. miRNA-146a 对过氧化氢所致人胃腺癌细胞株 AGS 氧化应激损伤的影响[J/CD]. 中华损伤与修复杂志(电子版),2016,11(6):416-421.

(收稿日期:2018-01-22 修回日期:2018-05-14)

(上接第 3250 页)

K, et al. Can we improve implantation by cancellation of fresh embryo transfer? [J]. Mid East Fertil Socie J, 2013, 18: 9-12.
[3] 吴黎,刘群,任新玲,等.冻融胚胎复苏后移植时间对妊娠结局的影响[J].中国妇幼保健,2012,27(15):2309-2311.
[4] VELEVA Z, ORAVA M, NUOJUA-HUTTUNEN S, et al. Factors affecting the outcome of frozen-thawed embryo transfer[J]. Hum Reprod, 2013, 28(9): 2425-2431.
[5] 马晓娟,孙丽君,宋娜,等.影响冻融胚胎移植妊娠结局的相关因素分析[J].生殖与避孕,2014,34(8):677-680.
[6] 李伟,施文浩,李明昭,等.玻璃化冻融后胚胎卵裂球的损伤与生长融合对移植结局的影响[J].生殖医学杂志,2015,24(7):542-545.
[7] RATO M L, GOUVEIA-OLIVEIRA A, PLANCH A C E. Influence of post-thaw culture on the developmental potential of human frozen embryos[J]. J Assist Reprod Genet, 2012, 29(8): 789-795.
[8] 骆荣,胡慧,洪焱,等.玻璃化冻融胚胎提前解冻与当日解

冻移植结局比较[J].生殖医学杂志,2015,24(1):17-20.

[9] 秦祖兴,唐永梅,牟联俊,等.冻融 D3 胚胎当天和过夜培养后移植临床结局分析[J].中国优生与遗传杂志,2015, 23(2):102-103.
[10] GUO L, LUO C, QUAN S, et al. The outcome of different post-thawed culture period in frozen-thawed embryo transfer cycle[J]. J Assist Reprod Genet, 2013, 30(12): 1589-1594.
[11] 王钦,刘琳琳,金真真,等. D3 卵裂期胚胎冻融后移植与冻融后培养至囊胚移植临床结局分析[J].中国优生与遗传杂志,2017,25(1):122-124.
[12] 王伟周,魏德莉,沈玉良,等.冻融胚胎移植妊娠结局的影响因素分析[J].生殖医学杂志,2016,25(6):517-521.
[13] CHECK J H, KATSOFF B, WILSON C, et al. Pregnancy outcome following fresh vs frozen embryo transfer into gestational carriers using a simplified slow freeze protocol [J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2012, 39(1): 23-24.

(收稿日期:2018-01-21 修回日期:2018-04-28)