

miRNA 与蛋白尿形成关系的研究进展

杜 菲 蒋荣珍

摘 要 肾小球滤过膜对高分子蛋白屏障功能障碍是尿蛋白形成的关键因素,但目前尿蛋白形成的分子基础及其调控机制不明。miRNA 通过调节转录后的基因表达在细胞增殖、凋亡、分化和发育等各种生理病理过程中发挥着重要作用。近期研究发现 miRNA 参与肾小球滤过膜组成部分对高分子蛋白屏障障碍的病理过程,本文就 miRNA 与蛋白尿形成关系的研究进展做一综述。

关键词 miRNA 蛋白尿 屏障功能 诊断与治疗

中图分类号 R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.02.041

蛋白尿是反映肾脏功能损害程度的简单生化指标。肾小球滤过膜包括内皮细胞窗孔、基膜及足细胞。足突间隔膜的结构与功能在防止蛋白丢失的生理过程中起重要作用,肾小球滤过膜任一部分受损均可导致肾小球对高分子蛋白屏障功能障碍,引起蛋白尿生成。miRNA 通过基因转录及转录后水平的调控参与机体多种生物学功能的调节,miRNA 可能通过对肾小球滤过膜上靶基因转录与转录后蛋白翻译进行调控参与尿蛋白的病理过程。miRNA 对尿蛋白形成病理调控机制的阐明有可能为蛋白尿的防治提供新的思路与治疗靶点。

一、miRNA 简介

1993 年,miRNA 首次在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)体内被发现^[1,2]。它是具有 22 个核苷酸长度的非编码蛋白的 RNA 序列。miRNA 由 DNA 上的特定区域 mitron 编码,在 RNA 聚合酶 II 作用下可转录形成长度为几百个核苷酸的多茎环结构 pri-miRNA,在 RNA 酶 III Drosha 和辅助因子 DGCR8 的作用下,加工成为长度约 60~70 个核苷酸的单茎环结构的 miRNA 前体,然后由转运蛋白 exportin5 运送至细胞质,再由 RNA 酶 III Dicer 剪切形成 18~25 个核苷酸的成熟 miRNA。在解旋酶作用下,miRNAs 可被加工为成熟的单链 miRNA,在 RNA 酶 III 作用下被加工为双链 miRNA。双链 miRNA 分子被解链,miRNA 功能链进入核糖蛋白复合体 miRNP(RISC)并

通过该复合体发挥生物学作用。miRNA 通过基因转录及转录后水平的调控参与多种生物学功能的调节。在植物中,miRNA 的碱基与其目标基因完全互补,可促使 mRNA 降解。但在动物体内,miRNA 与目标序列的匹配性较差,或者完全不与目标基因互补,只能抑制转录后翻译^[2]。因此,在基因表达的过程中,miRNA 通常起负调节的作用。此外,miRNA 还参与胚胎发育、细胞增殖分化、细胞凋亡等过程,并且在包括肾脏病在内多种疾病的病理生理过程中起着重要作用。

二、蛋白尿的形成

蛋白尿常见于多种肾脏疾病,尿蛋白升高与肾小球硬化、间质纤维化、慢性肾脏病进展及不良临床预后显著相关。以往有关蛋白尿发生机制的研究集中在肾小球高压这一方面。有关治疗也以降低肾小球压力为主。近年来,研究重点逐渐转移到细胞分子机制上来,肾小球滤过膜屏障(包括内皮细胞、基膜和足细胞)任一部分受损均可导致蛋白尿。现有研究认为内皮细胞与足细胞之间的连接空隙中主要含有保障屏障功能的血管内皮生长因子(VEGF)。这一信号通路障碍可导致足细胞和内皮细胞损伤,已知血管生成素可调节 VEGF 的作用,来源于足细胞的血管生成素 1(angiotensin-1)和 VEGF 可增加内皮细胞对大分子蛋白的屏障作用。血管生成素 2(angiotensin-2)与多种疾病中蛋白尿形成和肾脏损害相关,如狼疮肾炎和糖尿病肾病;足细胞损伤表现为足突收缩引起足细胞变形、裂隙膜蛋白丢失、去分化、黏附和凋亡^[3]。研究表明,足细胞去分化是由转化生长因子 β (TGF- β)作用引起的类似于内皮细胞向间叶细胞化生的过程,TGF- β 不仅参与细胞外基质累积,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81570444)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院妇产科(杜菲),产科重症监护中心、妇产科研究所(蒋荣珍)

通讯作者:蒋荣珍,硕士生导师,电子信箱:jianrz@163.com

纤维化和进行性肾损害,也参与肾小球滤过屏障损伤和蛋白尿的发生。研究表明尿中 TGF- β 水平与蛋白尿的严重程度有关。在肾病模型中直接抑制 TGF- β 可减轻蛋白尿^[4]。肾小球基膜(GBM)也是肾小球滤过屏障的重要组成部分,许多表现为蛋白尿的遗传病发生机制为 GBM 上表达蛋白的缺失。TGF- β 可改变 GBM 的结构和成分,进一步导致肾小球滤过屏障改变和蛋白尿的发生。

三、miRNA 与蛋白尿

近年研究发现,miRNA 在肾脏内可能参与肾脏正常功能相关蛋白表达的调控。Sun 等^[5]应用基因芯片法研究人类、大鼠肾脏及小鼠肾小球,确定了 5 种在人类及大鼠肾脏中含量丰富的 miRNA:miR-192、miR-194、miR-204、miR-215 和 miR-216。Tian 等^[6]应用 miRNA 芯片结合蛋白质组学方法确定了肾皮质和髓质具有不同的 miRNA 表达谱以及几对 miRNA 和靶蛋白,进一步证明了 miRNA 表达具有组织特异性。有研究表明,通过敲除小鼠足细胞特异性 Dicer 酶,可导致小鼠发生蛋白尿和严重肾损害^[7];miR-21、miR-126、miR-155 和 miR-221 均可调控与血管增生相关的基因,如凋亡蛋白 4(PDCD4)、PTEN 基因、VEGF、血管紧张素 II-1 型受体(AT1R)等的表达,参与血管生理功能与病理过程的调节^[8]。另有研究发现,miR-216a 和 miR-217 的作用靶点均为 PTEN 基因,推测二者可能与血管生成和蛋白尿的形成有关^[9]。

1. miRNA-21 与蛋白尿:Kong 等^[8]通过对尿液中 miR-21、miR-126、miR-155 和 miR-221 共 4 种 miRNA 进行定量分析,发现其中仅 miR-21 与微量白蛋白尿及尿蛋白排泄率有关。研究者发现有微量白蛋白尿的患者其尿中 miR-21 水平增高,并推断 miR-21 可能通过抑制足细胞凋亡对肾脏起保护作用,防止微量蛋白尿的产生,提示 miR-21 在微量白蛋白尿的病理过程中起重要作用。Zhang 等^[10]的研究显示,早期糖尿病肾病模型动物与体外实验结果显示,miR-21 的表达均明显降低;动物模型和体外实验提示,高糖环境下,miR-21 高表达可抑制系膜细胞增生;暴露于 miR-21 高表达环境后,糖尿病 db/db 小鼠的尿蛋白排泄率有所下降,提示 miR-21 高表达对肾脏有保护作用。

最近研究表明在 kk-ay 糖尿病肾病小鼠模型中,miR-21 可增加尿蛋白排泄率,加重肾功能损害。研究者利用原位杂交技术发现 miR-21 主要分布在

kk-ay 小鼠肾皮质,少量位于肾髓质及肾乳头。通过实时定量 RT-PCR 检测发现与对照组 C57BL 小鼠相比,kk-ay 糖尿病肾病小鼠体内 miR-21 的表达水平明显增加。同时发现 miR-21 的表达水平与尿白蛋白肌酐比(ACR)、TIMP1、IV 型胶原(Col IV)及纤连蛋白(FN)呈正相关;而与肌酐清除率(Ccr)和 MMP-9 蛋白呈负相关。越来越多证据表明 MMP-9 和 TIMP-1 与糖尿病肾病的发生有关。高糖环境可使 MMP-9 减少同时足细胞中 TIMP-1 的表达增加,从而导致细胞外基质合成与降解失衡引起肾小球基膜异常和蛋白尿的发生。研究者认为 miR-21 通过调节 MMP9/TIMP1 的表达来促进肾脏纤维化及蛋白尿的产生,应用 miR-21 抑制剂可能对肾脏具有一定的保护作用,这一研究为糖尿病肾病的治疗提供了新的思路^[11]。

2. miR-192 与蛋白尿:Putta 等^[12]研究发现,miR-192 拮抗剂锁核酸抗 miR-192 可显著减少糖尿病肾病小鼠尿蛋白形成,锁核酸抗 miR-192 通过抑制 miR-192 表达,引起 Zeb1/2 表达增加,胶原、TGF- β 和纤连蛋白表达下降,从而减轻糖尿病小鼠的蛋白尿。该研究表明阻断 miR-192 表达对小鼠糖尿病肾病模型尿蛋白具有保护作用,提示 miR-192 表达水平下降可减轻肾纤维化、蛋白尿和微量白蛋白尿,而 TGF- β 可促进 miR-192 表达增加,从而促发其下游的信号转导,导致肾脏损害,形成尿蛋白,从分子水平提示 TGF- β 可能是阻断肾脏疾病进展的重要靶点。Cai 等^[13]通过研究发现与对照组相比,局灶性阶段性肾小球硬化症(FSGS)和微小病变型肾病(MCD)患者血清 miR-192 的表达水平均有所上调,且均与尿蛋白水平呈正相关,但其作用机制有待进一步研究。以上发现为 miR-192 可能成为防治糖尿病肾病、FSGS 和 MCD 的新靶点提供了依据。

3. miR-29 与蛋白尿:研究发现 IgA 肾病患者 miR-29b 和 miR-29c 的水平明显低于对照组,提示 miR-29b 和 miR-29c 低表达可能参与 IgA 肾病的病理过程^[14]。另有研究发现,糖尿病肾病伴微量白蛋白尿患者 miR-92a 水平明显高于无尿蛋白患者,miR-29a 水平与糖尿病视网膜病变发生率呈正相关,miR-29b 水平与颈动脉内膜中层厚度(cIMT)呈正相关^[15]。而 2 型糖尿病中微血管并发症与心血管事件发生关系密切,糖尿病伴微量蛋白尿患者患心血管事件的风险较无微血管并发症的患者高两倍^[16]。因此,研究者推断 miR-29a 与 miR-

29b 可作为评估糖尿病肾损害与心血管事件发生与否的生物学标志物。但是, miR - 29 家族在 IgA 肾病及糖尿病肾病中具体的作用及机制需要更深入的研究。

4. 其他 miRNA 与蛋白尿: 除上述几种 miRNA, Lu 等^[17] 通过对狼疮肾炎及健康人肾小球和小管间质内 miR - 146a、miR - 155、miR - 198、miR - 638 和 miR - 663 的表达水平进行研究, 发现仅狼疮性肾炎患者肾小管间质内 miR - 638 的表达水平与蛋白尿有关, 研究者认为 miR - 638 可作为反应肾功能损害严重程度的临床监测指标。

Zhang 等^[18] 通过对患有合并肾性蛋白尿的节段性局灶性肾小球硬化症 (FSGS)、FSGS 完全缓解、膜性肾病及健康人的血浆 miRNA 水平进行分析发现合并蛋白尿的 FSGS 患者血浆中 miR - 186 浓度升高, 而 FSGS 完全缓解后的患者血浆中 miR - 186 浓度下降, 研究者据此推断 miR - 186 可用于合并蛋白尿的 FSGS 患者病情严重程度的临床评估。

还有研究发现 miRNA 参与自身免疫性肾脏疾病发病。Wang 等^[19] 利用实时定量 PCR 技术对 SLE 患者及健康人的血浆与尿液上清中 miR - 146a 和 miR - 155 的表达水平进行分析, 发现血浆 miR - 146a 水平与蛋白尿和 SLE 活动指数 (SLEDAI) 呈负相关。这一结果与之前的相关研究得到的结论一致^[20]。研究者推断血浆 miR - 146a 参与 SLE 蛋白尿发病机制, 为 miR - 146a 用于 SLE 病情的监测提供了可能。

Zhao 等^[21] 发现与轻度子痫前期患者相比, 重度子痫前期患者间充质干细胞 (MSCs) 中 miR - 136、miR - 495、miR - 16、miR - 29b 和 miR - 494 表达增加, 提示这几种 miRNA 可能与子痫前期病情严重程度有关。蛋白尿可反映子痫前期对肾脏的影响, 临床上常以蛋白尿的严重程度作为评估子痫前期患者肾脏受累和判断病情轻重的指标之一, 因此推测 miRNA 可能参与子痫前期患者蛋白尿形成并与蛋白尿的严重程度相关。子痫前期患者胎盘来源 miRNA 可能通过进入血液循环导致多器官多系统损害。研究人员发现与正常孕妇相比, 子痫前期患者的胎盘中有 13 种 miRNA (miR - 92b、miR - 197、miR - 342 - 3p、miR - 296 - 5p、miR26b、miR - 25、miR - 296 - 3p、miR26a、miR - 198、miR - 202、miR - 191、miR - 95 和 miR - 204) 表达明显增加, 2 种 miRNA (miR - 21 和 miR - 223) 表达下降^[22]。其中, miR - 26a 与 miR -

342 - 3p 在子痫前期患者血浆中的表达也同样增加, 提示 miRNA 与子痫前期的发病有着密切联系。但是, miRNA 在子痫前期患者发病过程中的作用及机制有待于深入研究^[23]。

miRNA 在糖尿病肾病、IgA 肾病、高血压肾损害、免疫相关性肾损害、子痫前期等各种肾脏疾病中均存在异常表达。miRNA 表达水平与蛋白尿的相关关系提示 miRNA 可能参与尿蛋白形成的病理过程, 但 miRNA 在蛋白尿发生过程中的具体作用及调控机制尚未明确。相信随着检测技术不断创新, 人们对 miRNA 在肾病病理过程中研究的不断深入, miRNA 与尿蛋白屏障相关调控蛋白、信息调控分子间的相互作用将被呈现, miRNA 在尿蛋白病理过程中作用机制的阐明, 将为各种肾脏疾病的诊治提供新的思路与治疗靶点。

参考文献

- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin - 4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin - 14* [J]. *Cell*, 1993, 75 (5): 843 - 854
- Li JYZ, Yong TY, Michael MZ, *et al.* Review: The role of microRNAs in kidney disease [J]. *Nephrology*, 2010, 15 (6): 599 - 608
- Gnudi L. Molecular mechanisms of proteinuria in diabetes [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2008, 36 (5): 946 - 949
- Saegusa Y, Sadakane C, Koseki J, *et al.* TJN - 331 improves anti - glomerular basement membrane nephritis by inhibiting the production of intraglomerular transforming growth factor - (beta) 1 [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2010, 33 (8): 1349 - 1354
- Sun Y, Koo S, White N, *et al.* Development of a micro - array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32 (22): e188
- Tian Z, Greene AS, Pietrusz JL, *et al.* MicroRNA - target pairs in the rat kidney identified by microRNA microarray, proteomic, and bioinformatic analysis [J]. *Genome Research*, 2008, 18 (3): 404 - 411
- Shi S, Yu L, Chiu C, *et al.* Podocyte - selective deletion of *dicer* induces proteinuria and glomerulosclerosis [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2008, 19 (11): 2159 - 2169
- Kong AP, Xiao K, Choi KC, *et al.* Associations between microRNA (miR - 21, 126, 155 and 221), albuminuria and heavy metals in Hong Kong Chinese adolescents [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2012, 413 (13 - 14): 1053 - 1057
- Kato M, Putta S, Wang M, *et al.* TGF - beta activates Akt kinase through a microRNA - dependent amplifying circuit targeting PTEN [J]. *Nature Cell Biology*, 2009, 11 (7): 881 - 889
- Zhang Z, Peng H, Chen J, *et al.* MicroRNA - 21 protects from mesangial cell proliferation induced by diabetic nephropathy in db/db mice [J]. *FEBS Letters*, 2009, 583 (12): 2009 - 2014
- Wang J, Gao Y, Ma M, *et al.* Effect of miR - 21 on renal fibrosis by

- regulating MMP-9 and TIMP1 in kk-ay diabetic nephropathy mice [J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 2013, 67(2): 537-546
 - 12 Putta S, Lanting L, Sun G, *et al.* Inhibiting microRNA-192 ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy [J]. Journal of the American Society of Nephrology, 2012, 23(3): 458-469
 - 13 Cai X, Xia Z, Zhang C, *et al.* Serum microRNAs levels in primary focal segmental glomerulosclerosis [J]. Pediatric Nephrology, 2013, 28(9): 1797-1801
 - 14 Wang G, Kwan BCH, Lai FMM, *et al.* Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: Novel biomarkers of fibrosis [J]. American Journal of Nephrology, 2012, 36(5): 412-418
 - 15 Peng H, Zhong M, Zhao W, *et al.* Urinary miR-29 correlates with albuminuria and carotid intima-media thickness in type 2 diabetes patients [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82607
 - 16 Rosenson RS, Fioretto P, Dodson PM. Does microvascular disease predict macrovascular events in type 2 diabetes? [J]. Atherosclerosis, 2011, 218(1): 13-18
 - 17 Lu J, Kwan BC, Lai FM, *et al.* Glomerular and tubulointerstitial miR-638, miR-198 and miR-146a expression in lupus nephritis [J]. Nephrology, 2012, 17(4): 346-351
 - 18 Zhang C, Zhang W, Chen HM, *et al.* Plasma microRNA-186 and proteinuria in focal segmental glomerulosclerosis [J]. American Journal of Kidney Diseases, 2014
 - 19 Wang G, Tam LS, Li EKM, *et al.* Serum and urinary cell-free MiR-146a and MiR-155 in patients with systemic lupus erythematosus [J]. Journal of Rheumatology, 2010, 37(12): 2516-2522
 - 20 Tang Y, Luo X, Cui H, *et al.* MicroRNA-146a contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins [J]. Arthritis and Rheumatism, 2009, 60(4): 1065-1075
 - 21 Zhao G, Zhou X, Chen S, *et al.* Differential expression of microRNAs in decidua-derived mesenchymal stem cells from patients with pre-eclampsia [J]. Journal of Biomedical Science, 2014, 21(1): 81
 - 22 Choi SY, Yun J, Lee OJ, *et al.* MicroRNA expression profiles in placenta with severe preeclampsia using a PNA-based microarray [J]. Placenta, 2013, 34(9): 799-804
 - 23 Wu L, Zhou H, Lin H, *et al.* Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies [J]. Reproduction, 2012, 143(3): 389-397
- (收稿日期:2015-07-18)
- (修回日期:2015-07-29)
-
- (上接第 155 页)
- 11 Palazzo B, Gallo A, Casillo A, *et al.* Fabrication, characterization and cell cultures on a novel composite chitosan-nano-hydroxyapatite scaffold [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2011, 24(Suppl 2): 73-78
 - 12 Si HP, Lu ZH, Lin YL, *et al.* Transfect bone marrow stromal cells with pcDNA3.1-VEGF to construct tissue engineered bone in defect repair [J]. Chin Med J: Engl, 2012, 125(5): 906-911
 - 13 陆珏, 王鑫, 甘朝兵, 等. 可注射性纳米羟基磷灰石/壳聚糖支架材料复合成骨细胞的异位成骨研究 [J]. 生物骨科材料与临床研究, 2012, 9(1): 21-25
 - 14 刘阳, 朱立新, 杨宏, 等. 可注射性纳米羟基磷灰石/壳聚糖复合骨髓间充质干细胞促进骨缺损的修复 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(34): 6278-6282
 - 15 Sellers RS, Peluso D, Morris EA. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage [J]. J Bone Joint Surg Am, 1997, 79(10): 1452-1463
 - 16 Hayashi M, Muneta T, Ju YJ, *et al.* Weekly intraarticular injections of bone morphogenetic protein-7 inhibits osteoarthritis progression [J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(5): R118
 - 17 Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ. BMP-6 enHAPneces chondrogenesis in a subpopulation of human marrow cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 284(2): 411-418
 - 18 Taniyama T, Masaoka T, Yamada T, *et al.* Repair of osteochondral defects in a rabbit model using a porous hydroxyapatite collagen composite impregnated with bone morphogenetic protein-2 [J]. Artif Organs, 2015, 39(6): 529-535
 - 19 Feng B, Hu DX, Zhang YD. Accelerated bone regeneration by chitosan/nanometer hydroxyapatite/collagen composite incorporating bmp-7 mimetic peptide [J]. J Hard Tissue Biol, 2012, 21(4): 481-487
 - 20 Maehara H, Sotome S, Yoshii T, *et al.* Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAP/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) [J]. J Orthop Res, 2010, 28(5): 677-686
 - 21 Seo SJ, Mahapatra C, Singh RK, *et al.* Strategies for osteochondral repair: focus on scaffolds [J]. J Tissue Eng, 2014, 5: 2041731414541850
 - 22 Lopa S, Madry H. Bioinspired scaffolds for osteochondral regeneration [J]. Tissue Eng Part A, 2014, 20(15-16): 2052-2076
 - 23 Hasegawa S, Neo M, Tamura J, *et al.* In vivo evaluation of a porous hydroxyapatite/poly-DL-lactide composite for bone tissue engineering [J]. J Biomed Mater Res A, 2007, 81(4): 930-938
 - 24 曹彦南, 曾曙光, 高文峰, 等. 聚乳酸-纳米羟基磷灰石-丝素蛋白引导骨再生膜的制备及表面特征 [J]. 广东牙病防治, 2013, 21(5): 240-245
 - 25 Zong C, Qian X, Tang Z, *et al.* Biocompatibility and bone-repairing effects: comparison between porous poly-lactic-co-glycolic acid and nanohydroxyapatite/poly(lactic acid) scaffolds [J]. Biomed Nanotechnol, 2014, 10(6): 1091-1104
- (收稿日期:2015-07-30)
- (修回日期:2015-08-26)