

谢柯欢,郭怀英,韩壤乐,等. 肾原位抑制 miR-146b-5p 表达改善 UUO 小鼠肾纤维化 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 927-934.

Xie KH, Guo HY, Han RY, et al. Renal inhibition of miR-146b-5p expression *in situ* improves renal fibrosis in UUO mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 927-934.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.007

肾原位抑制 miR-146b-5p 表达改善 UUO 小鼠肾纤维化

谢柯欢,郭怀英,韩壤乐,王丽*

(中西医结合研究中心,西南医科大学附属中医医院,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 明确 miR-146b-5p 在小鼠肾纤维化模型中的表达情况,并探讨体内敲低 miR-146b-5p 对小鼠肾损伤及纤维化的影响。**方法** 将 24 只 8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠随机分为假手术组 (sham), UUO 模型组 (UUO), UUO+肾 miR-146b-5p 电转敲低组 (UUO-KD), 每组 8 只。Sham 组仅切开皮肤,暴露且游离右侧肾输尿管,不做结扎或离断处理。UUO 组,行单侧输尿管梗阻 (UUO) 动物模型。UUO-KD 组通过先电转 CRISPR/RfxCas13 d 质粒于小鼠肾进行特异性 miR-146b-5p 敲低,24 h 后按模型组方法建立 UUO 小鼠模型,7 d 后处死小鼠收集肾标本。HE 染色观察肾病理变化,Masson 检测肾间质纤维化程度,免疫组化检测纤维化相关蛋白 (α -SMA、FN、Col-1) 表达,Western Blot、Real-time PCR 检测 miR-146b-5p、 α -SMA、FN、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等基因的变化。**结果** miR-146b-5p 在 UUO 模型中显著升高,电转敲低 miR-146b-5p 后该基因显著下降 ($P<0.05$),同时,IL-1、IL-6、TNF- α 等炎症因子表达出现显著下调 ($P<0.05$) 经 HE、Masson 染色后观察到,UUO-KD 组较 UUO 组相比肾结构良好,肾小管变形轻微,肾损伤及纤维化程度均明显改善。且免疫组化结果发现: α -SMA、FN、Col-1 等纤维化指标在 UUO-KD 组也显著降低 ($P<0.0001$)。**结论** 抑制 UUO 中高表达的 miR-146b-5p 可明显改善肾纤维化,miR-146b-5p 可能是肾纤维化的一个潜在治疗靶标。

【关键词】 miR-146b-5p;靶向电转敲低技术;肾纤维化;慢性肾疾病

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 07-0927-08

Renal inhibition of miR-146b-5p expression *in situ* improves renal fibrosis in UUO mice

XIE Kehuan, GUO Huaiying, HAN Rangyue, WANG Li*

(Research Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Affiliated Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Corresponding author: WANG Li. E-mail:wangli120@swmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate miR-146b-5p expression in mice model of renal fibrosis induced by unilateral renal ureteral ligation, and to suppress miR-146b-5p expression to improve renal fibrosis induced by unilateral renal ureteral ligation in mice. **Methods** Twenty-four 8-week-old C57BL/6 male mice were randomly divided into sham operation group (sham), UUO model group (UUO), UUO+kidney miR-146b-5p knockdown group (UUO-KD), 8 mice in each group. In the sham group, the skin was only cut to expose and free the right kidney and ureter without ligation or disconnection. In the UUO group, the animal model of unilateral ureteral obstruction (UUO) was performed. In the UUO-KD group, miR-146b-5p was specifically knocked down by electrotransferring the CRISPR/RfxCas13 d plasmid in the mouse kidney. After 24 hours, the UUO mouse model was established according to the method of the model group, and the mice were sacrificed 7 days later to collect kidney samples. HE staining was used to observe renal pathological changes, Masson was used to detect the degree of renal interstitial fibrosis, immunohistochemistry was used to detect the expression of

【基金项目】 四川省科技厅项目 (21ZDYF0348, 2020YJ0442), 西南医科大学校级项目 (2021ZKQN124, 2021ZKZD022)。

Funded by Sichuan Provincial Department of Science and Technology Project (21ZDYF0348, 2020YJ0442), Project of Southwest Medical University (2021ZKQN124, 2021ZKZD022).

【作者简介】 谢柯欢 (1996—), 女, 硕士, 研究方向: 中西医结合防治肾纤维化。Email: 554017658@qq.com

【通信作者】 王丽 (1976—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 慢性肾脏病基础与临床研究。Email: wangli120@swmu.edu.cn

fibrosis-related proteins (α -SMA, FN, Col-1), and Western Blot and Real-time PCR were used to detect miR-146b-5p, α -SMA, FN, IL-1 β , IL-6, TNF- α and other gene changes. **Results** Real-time PCR showed that miR-146b-5p was significantly increased in UUO model, and the gene was significantly decreased after electroporation knockdown of miR-146b-5p ($P < 0.05$). Meanwhile, the expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α and other inflammatory factors was significantly down-regulated ($P < 0.05$). It was observed after HE and Masson staining. Compared with the UUO group, the UUO-KD group had a better kidney structure, slightly deformed renal tubules, and less severe renal damage. The degree of fibrosis was significantly improved. And the results of immunohistochemistry showed that α -SMA, FN, Col-1 and other fibrosis indicators were also significantly reduced in the UUO-KD group ($P < 0.0001$). **Conclusions** Inhibition of highly expressed miR-146b-5p in UUO can significantly improve renal fibrosis, and miR-146b-5p may be a potential therapeutic target for renal fibrosis.

【Keywords】 miR-146b-5p; targeted electro-knockdown technology; renal fibrosis; chronic kidney disease

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

近年来,以肾间质纤维化为特征的慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)发病率显著增加,全球发病率超过 10%,其中 70 岁以上患者占 50%以上,目前尚缺乏有效的临床治疗手段^[1]。深入挖掘 CKD 潜在的发病机制,并开发新颖的治疗方法,对于防治 CKD 的发生发展至关重要^[2]。microRNA(miRNA)是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,它们在动植物中广泛参与转录后基因表达调控。多项研究已证实,miRNA 在包括糖尿病肾病、肾小球病变、肾囊肿和肾癌等多种肾疾病的发生和发展中起调控作用^[3]。本课题组前期通过转录组测序,在小鼠 UUO 模型中筛选出包括 miR-146b-5p 在内的多个 miRNA 在肾组织中高表达。有研究报道,miR-146b-5p 可调节肾细胞癌的发生,阻断其表达可长期负向调节肿瘤生长,但 miR-146b-5p 在肾纤维化中的作用和功能未知^[4-5]。电转技术是一种高效的细胞转染技术,其通过脉冲电流在细胞膜上打孔后将目的核酸导入细胞内^[6]。电转不仅用于体外培养细胞的转染,还被广泛用于敲除小鼠的生产、肿瘤治疗、基因治疗和基于细胞的治疗中^[7]。值得注意的是,电转技术已被证明可用于体内组织原位的高效基因转染。为探索 miR146b-5p 在肾纤维化中的作用,本研究建立 UUO 小鼠模型,观察 miR-146b-5p 在小鼠肾纤维化模型中的表达情况,并通过原位电转技术在肾抑制 miR-146b-5p 的表达,探讨下调其表达对小鼠肾纤维化的改善作用,为 CKD 肾纤维化的防治研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 24 只,8 周龄,体重

22~25 g,购自重庆腾鑫生物有限公司【SCXK(川)2020-030】,饲养于西南医科大学实验动物中心【SYXK(川)2020-065】。小鼠均自由摄食饮水,环境温度 20~24℃,相对湿度 50%~60%,12 h/12 h 明暗交替,适应性饲养 1 周开始实验。研究获得西南医科大学动物伦理委员会的批准(2021DW027)。

1.1.2 主要试剂与仪器

TRIzol 试剂(天根生化科技有限公司, Lot# P5207, 中国),无内毒素质粒大提试剂盒(天根生化科技有限公司, Lot#W9623, 中国),兔抗小鼠 α -SMA 抗体(proteinch, 00096457),兔抗小鼠 Gapdh 抗体(Abways, AB0037),兔抗小鼠 College-1(Col-1)抗体(Cell Signaling Technology, 4060),兔抗小鼠 Fibronectin(FN)抗体(Abmart, 334482)小鼠抗小鼠 IL-1 β 抗体(Santa cruz, sc-52012)、小鼠抗小鼠 IL-6 抗体(Santa cruz, sc-32296)、小鼠抗小鼠 TNF- α 抗体(Santa cruz, sc-52746)、兔抗小鼠 Wnt-5a 抗体(Affinity biosciences, DF-6856),兔抗小鼠 β -catenin 抗体(Affinity biosciences, AF6266),荧光定量 PCR 染料试剂(Promega, LS2068),HE 染色试剂盒(Beyotime Biotechnology, C0105),中杉金桥免疫组化试剂盒(ZSGB-BIO, PV-6000),Masson 染色试剂盒(贝索生物公司, BA-40798)。LightCycle 96 荧光定量 PCR 仪(Roche, 瑞士),正置光学显微镜(尼康, Nikon Eclipse E100, 日本),电泳槽和湿转转膜系统(Bio-Rad, 美国),质粒电转仪器(Pulse Generator CUYEDIT II, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

实验分为正常组(WT)、假手术组(sham)、模型组(UUO)和 UUO+miR-146b-5p 靶向电转敲低组(UUO-KD),及 sham+miR-146b-5p 靶向电转敲低组(KD-1day)、绿色荧光质粒电转组

(Electrotransfection)。假手术组仅切开右侧背部皮肤,暴露且游离右侧肾输尿管,不做结扎或离断处理。模型组按参考文献^[8]建立单侧输尿管梗阻小鼠模型,方法如下:腹腔注射 1%戊巴比妥钠成功麻醉小鼠后,在小鼠右侧背部脊柱旁约 1 cm 处切开背部皮肤,分离暴露右肾,游离右侧近端输尿管,于靠近肾门处和输尿管下 1/3 水平分别以 4-0 号丝线结扎输尿管后离断输尿管,缝合腹腔。UUO-KD 组,首先对小鼠进行质粒注射及肾原位电转操作,24 h 后建立单侧输尿管梗阻小鼠模型,具体如下:麻醉小鼠后分离暴露右肾,游离小鼠肾静脉、肾动脉,于近心端处夹闭肾动静脉后,用 36 G 针头注入已提取的质粒约 100 μ L(质粒浓度 = 1 μ g/ μ L),观察肾膨胀且色泽变苍白,即为注射成功。将无菌纸剪成约肾面积大小,浸生理盐水湿润后,覆于肾两侧,用电极轻夹住湿无菌纸包裹的肾,观察电阻 < 500 Ω 时,即可开始电转(参数:电转电压(Pd V) = 50 V,电转电流(Pd A) = 300 mA,瞬时电转持续时长(Pd on) = 50.0 ms,瞬时电转休息时长(Pd off) = 1000 ms,总电转次数(Pd N) = 4 次。常规饲养 24 h 后,观察状况良好,按模型组构建方法,建立肾间质纤维化模型。KD-1 day 组仅对小鼠进行质粒注射及肾原位电转操作,Electrotransfection 组仅进行肾原位电转绿色荧光质粒。造模 1 d 或 7 d 后处死小鼠,取出手术侧肾组织,将 1/4 肾组织置于 4% 多聚甲醛中固定,用于后期病理染色,剩余肾组织迅速置于 -80℃ 冰箱中冻存,用于提取组织蛋白及 RNA。

1.2.2 CRISPR/RfxCas13 d 敲除载体构建

取构建好的质粒 10 μ L 加入 DH5 α 感受态细胞,间歇振荡每次 5 min,共 6 次,置于 42℃ 水浴锅中热激 90 s,加入 LB 培养基 500 μ L,于摇床中震荡 50 min (100 r/min、37℃),后离心 5 min (3000 r/min),倒掉上清液,留 100 μ L 进行重悬后铺板于 AMP 抗性平板上,倒置培养过夜。筛选阳性菌株,培养收集菌液,按质粒提取试剂盒要求提取、纯化质粒(sgRNA 序列(5' $\rightarrow$ 3')): ATGGAATTCAGTTCTCAGAGCCA)。

1.2.3 Real-time PCR 检测各组小鼠肾组织中 miR-146b-5p 的表达

取冻存肾组织,TRIzol 法提取肾组织中总 RNA,Nanodrop 测定总 RNA 浓度。取 1 μ g 总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书操作逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,用 miR-146b-5p 引物参照 PCR 试剂盒说明书构建 PCR 体系后进行 PCR 反应,PCR 反应条件: 95℃,30 s;95℃,3~10 s;60℃,10~30 s;

40 个循环后结束。以 U6 作为 miR-146b-5p 的内参基因,GAPDH 作为 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、 α -SMA 的内参基因。根据内参表达量检测计算目标基因的相对表达,相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法算。序列见表 1。

表 1 引物信息

Table 1 Information of primers	
基因名 Gene names	序列(5' $\rightarrow$ 3') Sequences(5' $\rightarrow$ 3')
miR-146b-5p	F:CGCGTGAGAACTGAATTCCA R:AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
IL-1 β	F: TGCCACCTTTTGACAGTGATG R: AAGGTCCACGGGAAAGACAC
IL-6	F: AAAGAGTTGTGCAATGGCAATTCT R: AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
TNF- α	F: CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA R: TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
α -SMA	F: CTCTGTTGTGTGACAATGGTCC R: CGAAGCTCGTTATAGAAGGAGTG
U6	F: CAAATTCGTGAAGCGTTCCAT R: AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
GAPDH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTC R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

1.2.4 小鼠肾 HE 染色及 Masson 染色

HE 染色:将小鼠肾组织取出后用 4% 多聚甲醛溶液固定 48 h,经梯度乙醇脱水,二甲苯透明后,石蜡浸润包埋,并用切片机制备 4 μ m 切片,行 HE 染色,镜下观察肾组织的病理改变。

Masson 染色:染色前对切片进行常规脱腊复水后,铁苏木素染色 5 min,水洗,1% 盐酸酒精分色,0.5% 氨水促黑 2 min,水洗,丽春红染色 8 ~ 10 min,磷钼酸分色 1 ~ 5 min,加入甲苯胺蓝后水洗,1% 冰醋酸 1 min 后脱水封片,观察镜下肾组织间质纤维化程度。

1.2.5 蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测肾组织纤维化相关蛋白表达

采用蛋白印记法检测 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA),取肾组织 0.1 g 置于裂解液中,并将其置于冰上碾碎,裂解 20 ~ 30 min,后离心取上清液,采用考马斯亮蓝测蛋白浓度法,测出蛋白浓度,并将每个样本蛋白浓度调整为 10 μ g/ μ L,后加入 8 μ L,到 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,转膜至 PVDF 膜后按 1 : 1000 的稀释比例加入多克隆抗体 α -SMA 于 4℃ 孵育过夜,后加入 HRP 偶联二抗常温孵育 1 h。加入 ECL 显色,凝胶成像分析仪成像,结果以目标蛋白/内参相对灰度值表分析。

1.2.6 小鼠肾组织免疫组化

将小鼠肾组织取出后用 4% 多聚甲醛溶液固定 48 h, 经梯度乙醇脱水, 二甲苯透明后, 石蜡浸润包埋, 并用切片机制备 4 μm 厚度石蜡切片。经脱蜡复水, 抗原修复后, 封闭, 滴加多克隆抗体 α -SMA、Col-1、FN 并按 1 : 200 稀释比例, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 再滴加生物素化二抗, 室温孵育 15 min, DAB 显色, 苏木素复染, 流水冲洗反蓝 15 min, 脱水透明后, 封片, 镜下观察 α -SMA、Col-1、FN 表达。

1.2.7 基于全转录组的 miRNA 测序

测序工作由广州基迪奥生物公司完成, 提取高质量 RNA 后采用 Illumina HiSeq 测序仪进行测序。

1.3 统计学分析

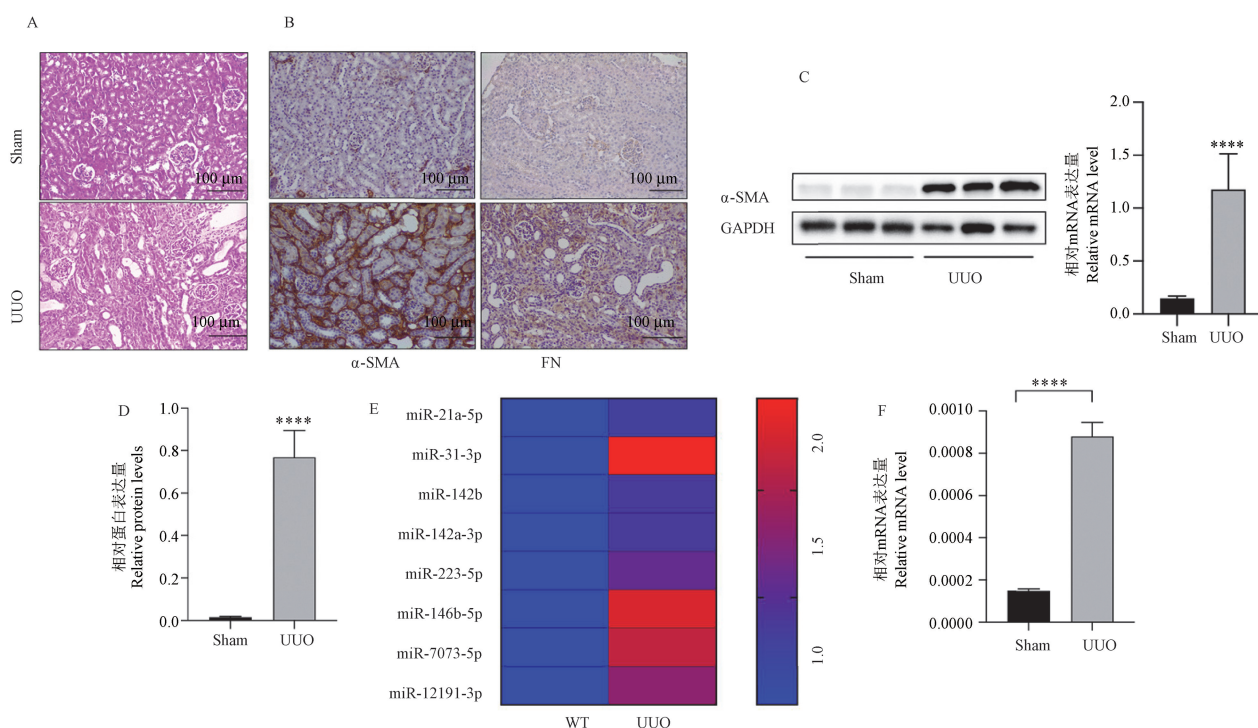
采用 SPSS 21.0 对数据进行统计分析, 计量资料若符合正态分布采用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 若不符合正态分布采用中位数表示。两组间差异性的比较, 服从正态分布且方差齐则采用非配对 t 检验, 方差不齐采用 Welch's 校正非配对 t 检验。多组间差异性的比较, 各组均符合正态分布且方差

齐则采用单因素 ANOVA 检验, 组间多重比较采用 LSD 法, 各组资料不符合正态分布或方差不齐, 采用 Kruskal-Wallis H 检验, 若提示组间存在差异, 进一步采用独立样本的非参数检验进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 测序分析 UUO 部分 miRNA 表达, miR-146b-5p 在 UUO 中显著增高

HE 染色结果显示 UUO 小鼠较 sham 组小鼠肾小管扩张明显, 肾小球变形破坏严重, 肾间质增宽。免疫组化结果显示 UUO 组较 sham 组肾间质 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA), FN 纤维蛋白沉积显著增多与免疫印记、PCR 结果一致 ($P < 0.0001$)。采用全转录组测序发现多种 miRNA 在 UUO 小鼠肾中高表达, 其中 miR-146b-5p 的上升幅度最为明显, PCR 结果验证 miR-146b-5p 在 UUO 小鼠体内表达增加与测序结果一致, 较 sham 组显著增加 ($P < 0.0001$), 见图 1。



注: A: HE 染色结果; B: 免疫组化结果; C: α -SMA 的 Western Blot 结果; D: α -SMA 的 PCR 结果; E: 测序结果图; F: miR-146b-5p 的 PCR 结果; 与 Sham 组相比, **** $P < 0.0001$ 。

图 1 miR-146b-5p 在 UUO 小鼠肾中显著增高

Note. A. HE staining result. B. Immunohistochemistry result. C. Western Blot result of α -SMA protein. D. PCR result of α -SMA. E. Sequencing result. F. PCR result of miR-146b-5p. Compared with sham group, **** $P < 0.0001$.

Figure 1 miR-146b-5p is significantly increased in UUO mice kidney

2.2 原位肾电转效率检测

采用肾原位电转的方式将绿色荧光质粒电转染至肾中,并观察到了大量荧光信号,说明肾原位电转效率高,可为后续 miRNA 敲低质粒的原位电转染提供良好的实验基础。其有效电转参数为:正反向电转模式,电转电压(Pd V)= 50 V,电转电流(Pd A)= 300 mA,瞬时电转持续时长(Pd on)= 50.0 ms,瞬时电转间隔时长(Pd off)= 1000 ms,总电转次数(Pd N)= 2,见图 2。

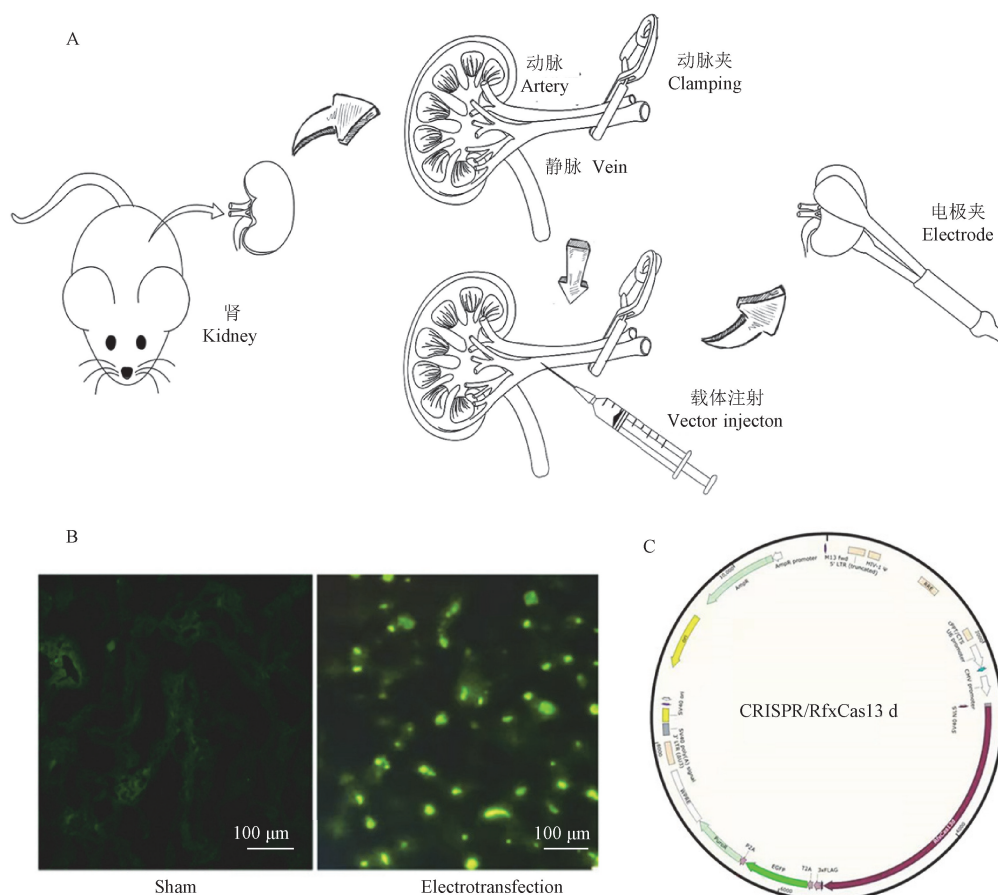
2.3 电转抑制 miR-146b-5p 对 UUO 肾病理改变的影响

正常小鼠肾电转 miR-146b-5p 敲低质粒 1 d 后,通过 Real-time PCR 检测到 miR-146b-5p 表达量显著下降($P < 0.01$);且电转 7 d 后肾功能变化差异无显著性,证实电转不会对肾造成病理损伤。电转 7 d 后,免疫印记结果显示 UUO-KD 组 α -SMA 蛋白表达显著下降($P < 0.01$),且与 PCR 结果显示一致

($P < 0.001$),HE 染色结果及 Masson 染色结果显示 UUO 组小鼠肾组织中,肾小管明显扩张,肾小球破坏明显,且间质增宽,经电转靶向敲低后,小鼠肾病理损伤显著好转。且经 miR-146b-5p 靶向电转敲低后小鼠肾间质损伤明显减轻,胶原成分减少,间质纤维化面积显著降低,见图 3。

2.4 电转抑制 miR-146b-5p 后可降低 UUO 小鼠炎症及纤维化改变

UUO-KD 组较 UUO 组可显著下调 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 炎症指标 mRNA 表达量,且差异具有显著性($P < 0.01$);免疫组化结果显示:UUO-KD 组较 UUO 组肾间质 α -SMA、Col-1 沉积显著减少,且肾组织结构完整,损伤轻微,Western Blot 结果发现,UUO 组中 wnt5a、 β -catenin 在蛋白水平上均高表达,UUO-KD 组 wnt5a、 β -catenin 表达均显著下降,说明电转抑制 miR-146b-5p 后可显著下调 UUO 小鼠炎症及纤维化,见图 4。

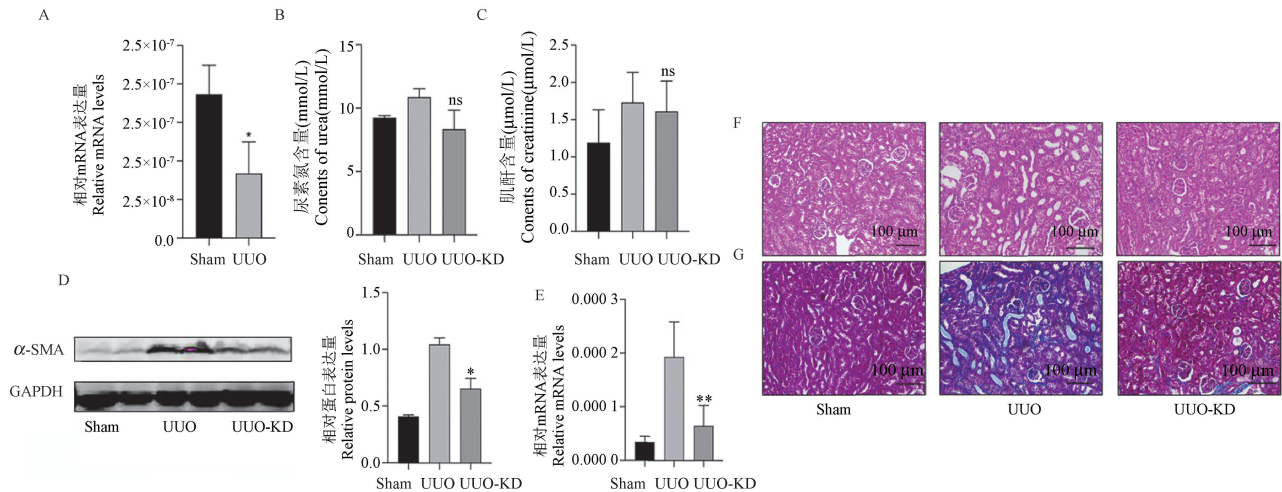


注:A:小鼠电转流程示意图;B:为光镜下肾原位电转后荧光图;C:CRISPR/RfxCas13 d 载体序列示意图。

图 2 原位肾电转流程

Note. A. Schematic diagram of mouse electroporation process. B. Luorescence image of kidney *in situ* electroporation under light microscope. C. Schematic diagram of CRISPR/RfxCas13 d vector sequence.

Figure 2 Process of renal electroporation

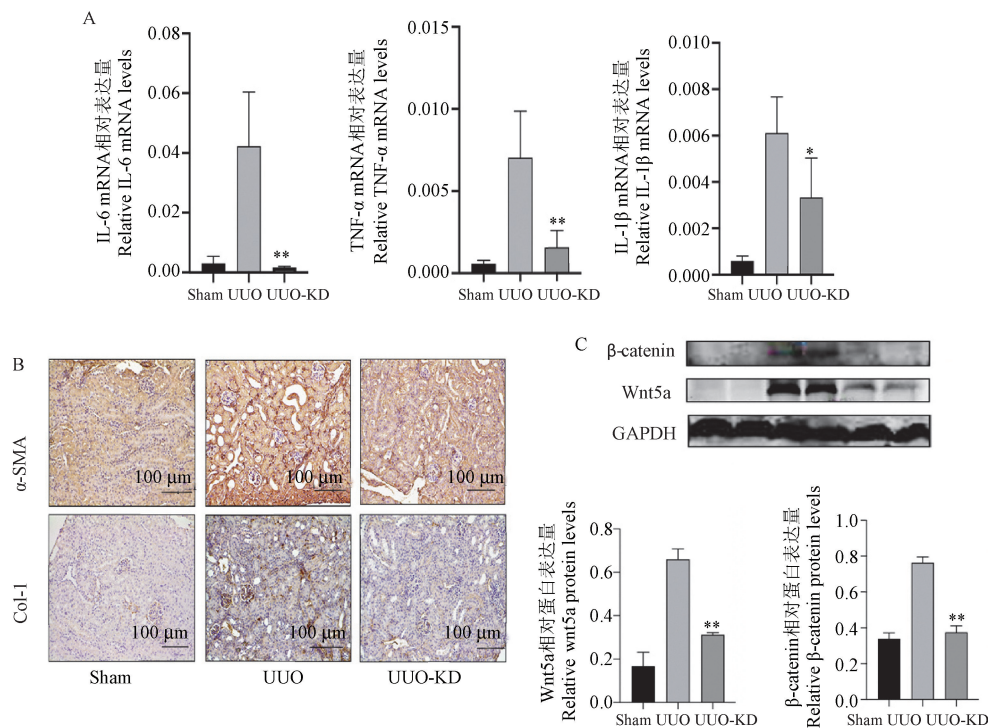


注: A: KD-1day 组电转后 1 d, 小鼠肾 miR-146b-5p PCR 结果; B: 尿素氮结果; C: 肌酐测试结果; D: α -SMA 的 Western Blot 结果, 蛋白量化结果; E: UUO 小鼠电转后 PCR 结果; F: HE 染色结果; G: Masson 染色结果。与 UUO 组相比, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ 。(下同)

图 3 电转抑制 miR-146b-5p 对 UUO 肾病理改变的影响

Note. A. One day after electroporation, the PCR results of miR-146b-5p mRNA expression in mouse kidney. B. Urea nitrogen results. C. Creatinine test results. D. Western Blot results of α -SMA, protein quantification results. E. PCR results after electroporation of UUO mice. F. HE staining results. G. Masson staining results. Compared with UUO group, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 3 Effect of electrotransduction inhibition of miR-146b-5p on the pathological changes of UUO kidney



注: A: 各炎症指标 PCR 结果; B: α -SMA、Col-1 免疫组化结果; C: Wnt5a、 β -catenin 的 Western Blot 结果和蛋白量化结果。

图 4 电转抑制 miR-146b-5p 后可降低 UUO 小鼠炎症及纤维化改变

Note. A. PCR results of inflammation indexes. B. Immunohistochemistry results of α -SMA and Col-1. C. Western Blot results of wnt5a, β -catenin, protein quantification results.

Figure 4 Electrotransduction inhibition of miR-146b-5p can reduce inflammation and fibrosis in UUO mice

3 讨论

肾小管间质纤维化是一个慢性进行性的疾病过程,是慢性肾疾病发展为终末期肾病的必经途径,其机制复杂多样。纤维化是正常伤口愈合过程的病理性扩展,特征为组织损伤及炎症,成纤维细胞活化和迁移以及基质沉积和重塑^[8]。在 CKD 的发病过程中,肾小管间质纤维化基质沉积进行性加重,最终破坏器官结构,减少血液供应导致肾衰竭。目对于肾纤维化的治疗及控制,在临床上的进展仍然十分缓慢,除了部分支持治疗可提高患者的生存质量外,尚且缺乏有效的治疗措施。

国内外大量研究表明,microRNA 与多种器官的纤维化相关,且是参与器官纤维化的一个重要成分^[9-10]。microRNA 是小型非编码 RNA,具有巨大潜力的生物学功能,参与各种生理和病理过程^[11]。且 miRNA 介导 mRNA 的抑制或去稳定作用,并导致翻译抑制,是基因表达的重要调节剂^[12],参与了多种肾疾病的纤维化进程。本团队通过前期转录组测序筛选出多个 miRNA 在肾纤维化 UUO 小鼠模型中高表达,通过前期实验验证后发现 miR-146b-5p 的表达变化尤为显著。目前国内外的相关研究已证实 miR-146b-5p 参与多种肾病理过程。研究表明,miR-146b-5p 在狼疮性肾病中激活 NF- κ B 的表达加重了肾炎症表型^[13]。Ichii 等^[14]和 Paterson 等^[15]报道,慢性肾病肾中 miR-146b 的表达及其尿液排泄与肾间质病变的发展相关,并与炎症细胞浸润相关,镉肾毒性与大鼠肾皮质 miR-146b-5p 的表达改变有密切关系。然而 miR-146b-5p 在肾纤维化中的作用未知。为此,本团队计划探索 miR-146b-5p 在肾纤维化中的作用。本研究发现,肾纤维化病理状态时,miR-146b-5p 显著升高,电转敲低 miR-146b-5p 会明显减轻 UUO 模型肾纤维化程度。这些结果提示 miR-146b-5p 可能促进肾纤维化的进程。

为了研究 miR-146b-5p 在小鼠肾纤维化中的作用,我们计划采用肾原位转染敲低质粒的方法下调 miR-146b-5p 在 UUO 小鼠肾中的表达。目前肾原位转染技术主要包括病毒转染、超声微泡转染、电转染等方法。其中电转染是目前一种新型基因转染技术,早在 1982 年,Neumann 等^[16-17]第一次利用电转脂质双分子层理论对小鼠进行基因转染。电转染是指在外加电场的作用下,使细胞膜具有高通透

性,从而将基因导入细胞或组织中的方法,较传统的病毒载体编辑基因的方法具有成本低、效率高、方便安全的优点^[18],相比较超声靶向微泡技术而言,超声微泡所需试剂价格昂贵,且超声过程中探头易产热对组织造成二次损伤,加重组织病理损伤改变^[19]。本研究在前期实验中验证了电转染与超声微泡转染技术的转染效率,其中电转染体现了优良的转染效率,特别是在摸索出合适的电转参数后,电转染较超声微泡法的效率高,经 HE 染色及肾功能检测后发现经原位电转的肾较模型组比,组织结构完整,形态规则,无明显病理损伤,血肌酐、尿素氮测试显示经电转后,小鼠肾功能与假手术组基本一致,无明显变化,证明经电转后,对小鼠肾无特别损伤。经过前期摸索测试,我们发现采用电转染法可以成功敲低小鼠肾 miR-146b-5p,且明显抑制 UUO 小鼠肾小管间质纤维化的病理改变,进而揭示:靶向电转敲低 miR-146b-5p 后可抑制 miR-146b-5p 的表达从而改善小鼠单侧肾输尿管结扎诱导的肾纤维化。

目前,对于肾纤维化机制及通路的探讨存在多样性,本研究前期我们通过测序发现 miR-146b-5p 在 UUO 小鼠肾中显著增加,并验证了肾纤维化模型中 miR-146b-5p 表达结果与前期预测一致,大量研究显示,wnt/ β -catenin 信号通路参与肾损伤及各种损伤后的修复,激活肾小管中的 wnt/ β -catenin 可防止肾小管细胞死亡和 AKI 的发生,而肾小管中 Wnt/ β -catenin 的持续激活可能导致进行性肾纤维化^[20-21],通过 Western Blot 结果发现,模型组中 wnt5a、 β -catenin 在蛋白水平上均高表达,经靶向电转敲低后,wnt5a、 β -catenin 表达均显著下降,我们猜想 miR-146b-5p 可能是通过此机制调控了小鼠肾纤维化的进程及转变,并产生了以 α -SMA、Col-1 为标志的纤维化改变,后期我们将在肾小管上皮细胞中下调 miR-146b-5p 表达,检测纤维化相关 mRNA 的变化,预测其信号通路证实相关的纤维化机制。

综上所述,miR-146b-5p 在小鼠单侧肾输尿管结扎诱导的肾纤维化模型中高表达,肾原位抑制 miR-146b-5p 的表达可改善小鼠单侧肾输尿管结扎诱导的肾纤维化。表明 miR-146b-5p 可能是肾纤维化的治疗靶标,从而为肾纤维化的治疗提供新的研究方向。

参 考 文 献 (References)

- [1] Cho MH. Renal fibrosis [J]. Korean J Pediatr, 2010, 53(7):

- 735–740.
- [2] Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S, Lamas S, et al. Targeting the progression of chronic kidney disease [J]. Nat Rev Nephrol, 2020, 16(5): 269–288.
- [3] Petrillo F, Iervolino A, Zaccchia M, et al. MicroRNAs in renal diseases: a potential novel therapeutic target [J]. Kidney Dis (Basel), 2017, 3(3): 111–119.
- [4] Meng G, Li G, Yang X, et al. Inhibition of miR146b-5p suppresses CT-guided renal cell carcinoma by targeting TRAF₆ [J]. J Cell Biochem, 2018, 10: 11–16.
- [5] Matis S, Recchia AG, Colombo M, et al. MiR-146b-5p regulates IL-23 receptor complex expression in chronic lymphocytic leukemia cells [J]. Blood Adv, 2022, 6(20): 5593–5612.
- [6] Huang CC, Carcagno A. Electroporation of postimplantation mouse embryos in utero [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2018, 2018(2): prot094060.
- [7] Kobayashi R, Endo K, Ohmori Y, et al. A novel method of gene transduction to the murine endometrium using *in vivo* electroporation [J]. J Vet Med Sci, 2017, 79(9): 1573–1577.
- [8] Humphreys BD. Mechanisms of renal fibrosis [J]. Annu Rev Physiol, 2018, 80: 309–326.
- [9] Zhao Z, Lin CY, Cheng K. siRNA- and miRNA-based therapeutics for liver fibrosis [J]. Transl Res, 2019, 214: 17–29.
- [10] Conserva F, Barozzino M, Pesce F, et al. Urinary miRNA-27b-3p and miRNA-1228-3p correlate with the progression of kidney fibrosis in diabetic nephropathy [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 11357.
- [11] Li ML, Li RN, Ma YM, et al. MiRNA-1297 inhibits myocardial fibrosis by targeting ULK1 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(4): 2070–2076.
- [12] Fan Y, Chen H, Huang Z, et al. Emerging role of miRNAs in renal fibrosis [J]. RNA Biol, 2020, 17(1): 1–12.
- [13] Zhang LH, Xiao B, Zhong M, et al. LncRNA NEAT1 accelerates renal mesangial cell injury via modulating the miR-146b/TRAF6/NF- κ B axis in lupus nephritis [J]. Cell Tissue Res, 2020, 382(3): 627–638.
- [14] Ichii O, Otsuka S, Sasaki N, et al. Altered expression of microRNA miR-146a correlates with the development of chronic renal inflammation [J]. Kidney Int, 2012, 81(3): 280–292.
- [15] Paterson MR, Geurts AM, Kriegel AJ. miR-146b-5p has a sex-specific role in renal and cardiac pathology in a rat model of chronic kidney disease [J]. Kidney Int, 2019, 96(6): 1332–1345.
- [16] Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, et al. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields [J]. EMBO J, 1982, 1(7): 841–845.
- [17] Neumann E, Judex M, Kullmann F, et al. Inhibition of cartilage destruction by double gene transfer of IL-1 α and IL-10 involves the actinin pathway [J]. Gene Ther, 2002, 9(22): 1508–1519.
- [18] Qin S, Caskey CF, Ferrara KW. Ultrasound contrast microbubbles in imaging and therapy: physical principles and engineering [J]. Phys Med Biol, 2009, 54(6): R27–R57.
- [19] Dauba A, Goulas J, Colin L, et al. Evaluation of capacitive micromachined ultrasonic transducers for passive monitoring of microbubble-assisted ultrasound therapies [J]. J Acoust Soc Am, 2020, 148(4): 2248.
- [20] Feng Y, Ren J, Gui Y, et al. Wnt/ β -catenin-promoted macrophage alternative activation contributes to kidney fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2018, 29(1): 182–193.
- [21] 严颖, 谭睿彤, 赵长英, 等. 姜黄素对 5/6 肾结扎诱导的慢性肾病小鼠模型肾纤维化的保护作用 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(1): 52–58.
- Yan Y, Tan RZ, Zhao GY, et al. Protective effect of curcumin on renal fibrosis induced by 5/6 kidney ligation in the mouse model of chronic renal disease [J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2019, 27(1): 52–58.

[收稿日期] 2021–11–08