

• 基础医学 •

文章编号:1002-0217(2018)06-0519-04

## MiR-199b-5p 过表达在肾小球足细胞中的作用及基因表达特征

龚向前, 鱼敏逸, 陈俊宇, 顾欣雨, 李善文, 张爱青, 甘卫华

(南京医科大学第二附属医院 儿科, 江苏 南京 210003)

**【摘要】**目的:研究 miR-199b-5p 在足细胞凋亡过程中的功能及 miR-199b-5p 过表达足细胞中的基因表达谱特征,探讨足细胞凋亡的潜在分子机制。方法:体外培养小鼠足细胞,用 lipofectamine 2000 分别在小鼠足细胞中瞬时转染 miR-199b-5p 过表达质粒(miR-199b-5p mimics)、miR-199b-5p 过表达质粒阴性对照(NC)组。用 qRT-PCR 检测 miR-199b-5p 在足细胞中表达水平。用流式细胞仪检测足细胞凋亡的变化。运用高通量测序分析转染 miR-199b-5p mimics 后足细胞中差异表达基因,并对 miR-199b-5p 靶基因进行基因功能(GO)富集分析和信号通路(Pathway)富集分析。结果:qRT-PCR 结果显示,转染 miR-199b-5p mimics 足细胞中 miR-199b-5p 表达水平较对照组升高( $P < 0.05$ )。流式细胞仪检测结果显示,NC 组细胞凋亡率( $32.97 \pm 1.45$ )% 转染 mimics 组细胞凋亡率( $25.51 \pm 0.94$ )% 较对照组下降( $P < 0.05$ )。高通量测序发现,过表达 miR-199b-5p 足细胞中有 106 个基因表达较对照组降低大于 1.5 倍。基因功能富集分析结果显示 miR-199b-5p 靶基因可能通过 NF- $\kappa$ B 及 TNF 等信号通路,调控肌动蛋白骨架稳定性等多个方面抑制足细胞凋亡。结论:过表达 miR-199b-5p 能抑制足细胞凋亡,可能通过对其靶基因的调控在足细胞损伤的过程中发挥保护作用。

**【关键词】**miR-199b-5p; 足细胞; 基因表达谱特征; 凋亡

**【中图分类号】**R-332; R 692.6 **【文献标志码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2018.06.003

## Implications of miR-199b-5p gene over-expression in renal podocyte

GONG Xiangqian, YU Minyi, CHEN Junyu, GU Xinyu, LI Shanwen, ZHANG Aiqing, GAN Weihua

Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210003, China

**【Abstract】Objective:** To investigate the function of miR-199b-5p in podocyte apoptosis and the gene expression profiles in podocyte overexpressing miR-199b-5p for the potential molecular mechanism of podocyte apoptosis. **Methods:** Mouse podocytes were cultured *in vitro* and miR-199b-5p overexpression plasmid (miR-199b-5p mimics) and miRNA-199b-5p overexpressed plasmid negative control (negative control, NC) were transiently transfected into mouse podocytes by lipofectamine 2000. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to measure the expression of miR-199b-5p in podocytes. Flow cytometry was used to detect the effect of miR-199b-5p on podocyte apoptosis. The differential gene expression in podocytes transfected with miR-199b-5p mimics was analyzed by high-throughput sequencing. The function of the target genes was predicted via gene ontology (GO) analysis and pathway analysis. **Results:** qRT-PCR results showed that miR-199b-5p expression in podocytes of miR-199b-5p mimics group was higher than that in control group ( $P < 0.05$ ). Flow cytometry indicated that the rate of cellular apoptosis in control group was ( $32.97 \pm 1.45$ )%. The apoptosis rate in transfected mimics group ( $25.51 \pm 0.94$ )% was lower compared with control group ( $P < 0.05$ ). High-throughput sequencing revealed that 106 genes were apparently down-regulated after miR-199b-5p overexpressing in podocytes. Gene enrichment analysis showed that the target genes of miR-199b-5p could inhibit podocyte apoptosis through NF- $\kappa$ B and TNF signaling pathways and regulate the stability of actin cytoskeleton and other biological processes. **Conclusion:** Overexpression of miR-199b-5p could inhibit podocyte apoptosis, suggesting that this gene might play a protective role in the process of podocyte injury by regulating the target gene expression.

**【Key words】** miR-199b-5p; podocyte; gene expression profiles; apoptosis

足细胞是一种高度分化的上皮细胞,在保持肾小球滤过屏障的完整性中起重要作用,防止蛋白尿的发生。足细胞易受到各种损伤,且增殖能力较差,

损伤后很难再生<sup>[1]</sup>,足细胞损伤后导致肾小球滤过屏障减弱,引起蛋白尿的发生<sup>[2]</sup>。蛋白尿是导致肾功能损伤的危险因素,因足细胞损伤引起的肾脏方

基金项目:江苏省高校自然科学研究面上项目(15KJD320005);江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(201710312039Y);国家自然科学基金项目(81670650);南京医科大学科技发展基金项目(2015NJMUZD028)

收稿日期:2018-01-05

作者简介:龚向前(1990-),男,2015级硕士研究生,(电话)13813287754,(电子信箱)1210101459@qq.com;  
甘卫华,女,主任医师,(电子信箱)weihuagan@njmu.edu.cn,通信作者。

面疾病是全球性问题。microRNAs 是一大类小型非编码 RNA ,可以诱导靶基因的转录后沉默 ,调控众多的生物学过程 ,在细胞发育及凋亡中均发挥重要作用<sup>[3]</sup>。研究发现 ,microRNAs( miRNAs) 是维持足细胞体内平衡所必需的 ,在肾脏的病理和生理过程中有重要的调控作用 ,miRNAs 的缺失会引起足细胞损伤 ,导致蛋白尿的产生<sup>[4]</sup>。前期研究中发现 miR-199b-5p 在正常小鼠和阿霉素肾病小鼠中差异表达 ,miR-199b-5p 保守性相对较高 ,在多个物种中都有表达(表 1)。本研究通过高通量测序了解足细胞过表达 miR-199b-5p 后基因表达变化及在足细胞凋亡中的作用 ,旨在为临床治疗肾脏疾病提供新的理论依据及治疗手段。

表 1 不同物种 miR-199b-5p 成熟序列

序列号	物种	碱基序列
MIMAT0000263	hsa-miR-199b-5p	cccaguguuuagacuauucuguuc
MIMAT0000672	mmu-miR-199b-5p	cccaguguuuagacuaccuguuc
MIMAT0013780	eca-miR-199b-5p	cccaguguuuagacuauucuguuc
MIMAT0017339	ssc-miR-199b-5p	cccaguguuuagacuauucuguu

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 正常小鼠足细胞( Mundel 教授惠赠: Albert Einstein college of Medicine); 胰蛋白酶、1640 培养液( 美国 Gibco 公司); 干扰素- $\gamma$ ( 英国 pepco Tech 公司); lipofectamine 2000、miR-199b-5p mimics、miRNA NC( 上海吉玛公司); qRT-PCR 试剂盒( 锐博公司); 凋亡试剂盒( BD 公司); Trizol 试剂盒( 美国 invitrogen 公司); PCR 仪、FACSVerser 流式细胞仪( 法国 BD 公司)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 永生化小鼠足细胞在添加 10% 胎牛血清、10  $\mu$ L/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素、10 U/ mL 重组小鼠干扰素- $\gamma$  的 RPMI 1640 培养基中 ,含有 5%CO<sub>2</sub> 的加湿培养箱中 33 $^{\circ}$ C 促进生殖传代 ,在细胞生长至约 80%融合时 ,用 0.25%胰酶消化传代。传代 2 次后在 37 $^{\circ}$ C 不含干扰素- $\gamma$  培养基中诱导细胞分化成熟 ,待培育 12d 分化成熟后用于实验。

1.2.2 细胞转染 小鼠足细胞按每 10<sup>4</sup>/孔左右接种在 6 孔板中 ,当细胞生长至 70%~80%融合时弃去培养液进行瞬时转染。将 6 孔板分为空载对照( NC) 组和过表达质粒组( mimics 组) ,每孔使用 200  $\mu$ L 无血清培养基分别稀释 5.0  $\mu$ L miRNA NC、miR-199b-5p mimics ,同时取 6  $\mu$ L lipofectamine 2000 稀

释到 200  $\mu$ L 无血清培养基中 ,两者在 5 min 内混匀 ,室温放置 20 min 后加入不含血清的 2 mL 培养液中 ,6 h 后更换成新鲜无血清培养基 ,培养 48 h 诱导足细胞损伤。

1.2.3 RNA 提取及 qRT-PCR 细胞转染 48 h 后 ,按 Trizol 试剂盒说明书操作 ,每孔加 0.5 mL Trizol 提取 NC 组和 mimics 组细胞的总 RNA。使用紫外分光光度计测定 A260/A280 处 RNA 吸收峰 ,并对总 RNA 进行定量。按照 qRT-PCR 试剂盒 ,反应总体积为 10  $\mu$ L ,将得到的 RNA 逆转录为 cDNA。实时荧光定量 PCR 选用 20  $\mu$ L 反应体系 ,每个体系含 10  $\mu$ L SYBR Green 2  $\mu$ L 模板 cDNA ,上下游引物各 0.8  $\mu$ L; 反应条件如下: 预变性( 95 $^{\circ}$ C ,10 min)、变性( 95 $^{\circ}$ C ,10 s)、退火( 60 $^{\circ}$ C ,20 s)、延伸( 70 $^{\circ}$ C ,10 s) 40 个循环。以内源性 U6 作为对照基因使数据标准化 ,每组重复 3 次 ,按照 2<sup>-( $\Delta\Delta C_t$ )</sup> 法 ,计算目的基因相对表达量。

### 1.2.4 流式 Annexin V-PE/7-AAD 检测足细胞凋亡

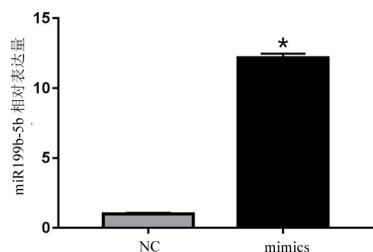
足细胞在无血清培养液中培养 48 h 诱导足细胞损伤 ,每组重复 3 次 ,用不含 EDTA 胰酶消化后收集足细胞 ,用 4 $^{\circ}$ C 磷酸盐缓冲液( PBS) 洗涤细胞并离心 ,加入 Binding Buffer 重悬足细胞 ,各加入 5  $\mu$ L Annexin V-PE 和 7-AAD ,室温环境中避光孵育 20 min ,使用流式细胞仪在 586/42nm AV-PE 和 527/32 nm 7-AAD 条件下进行细胞凋亡分析并定量 ,凋亡细胞通过早期凋亡和晚期凋亡总和( LR+UR) 表示。

1.2.5 RNA 高通量测序 提取的总 RNA 样品送至上海康成公司 经琼脂糖电泳及 Nanodrop 质检和定量后 ,用 oligo( dT) 磁珠富集 mRNA; RNA 测序文库由试剂盒完成 ,用 Agilent 2100 对 RNA 文库进行质检 ,并由 qPCR 方法进行文库定量 ,使用 Illumina Hiseq 4000 测序仪进行测序。

1.3 统计分析 数据应用 SPSS 17.0 软件进行分析 ,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示 ,组间数据采用 *t* 检验 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 转染 miR-199b-5p mimics 后足细胞中 miR-199b-5p 的表达 细胞转染 48 h 后使用 qRT-PCR 检测足细胞中 miR-199b-5p 表达水平结果显示 ,与 NC 组( 1.00 $\pm$ 0.08) 相比 ,转染 miR-199b-5p mimics 足细胞中 miR-199b-5p 的相对表达水平( 12.17 $\pm$ 0.31) 较 NC 组升高 ,差异有统计学意义( *t*=71.084 ,*P*<0.05) ( 图 1)。



NC: 空载对照组; mimics: 过表达组; \*  $P < 0.05$  vs NC 组。

图1 足细胞中 miR-199b-5p 的相对表达水平

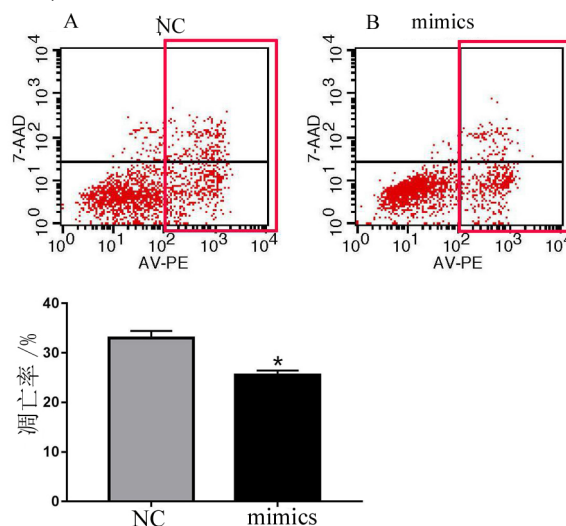
### 2.2 过表达 miR-199b-5p 对足细胞凋亡的影响

无血清培养基培养足细胞 48 h 诱导足细胞损伤,流式细胞仪检测足细胞凋亡结果显示(红色框内):对照组足细胞凋亡率为(32.97±1.45)%,过表达 mimics 组为(25.51±0.94)%,与 NC 组相比,过表达 miR-199b-5p 可以抑制足细胞凋亡,差异有统计学意义( $t = 8.521$   $P < 0.05$ ) 见图 2。

2.3 基因表达谱变化 高通量测序基因表达谱显示,过表达 miR-199b-5p 足细胞中较 NC 组的基因差异表达,红色表示上调基因,绿色表示下调基因(图 3A);与 NC 组相比,过表达 miR-199b-5p 后,有 11 114 个基因表达发生变化,其中 106 个基因下调大于 1.5 倍,99 个基因上调大于 1.5 倍(图 3B)。

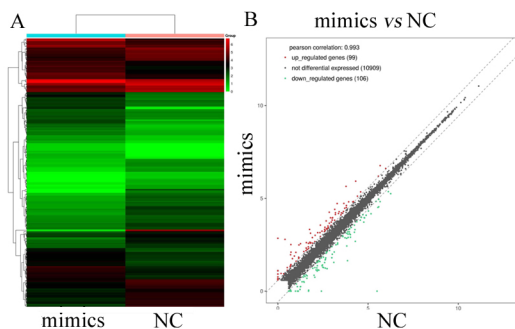
2.4 基因功能富集分析 对下调大于 1.5 倍的基因进行基因功能(GO)和信号通路(Pathway)富集分析来鉴定这些差异表达基因功能,采用 DAVID 数据库的 GO 方法工具了解差异基因的生物学过程和途径。根据分析结果显示,这些基因丰富了转录的生物学过程,参与了 NF- $\kappa$ B 和 TNF 信号通路的调控、

肌动蛋白骨架构成、细胞周期、凋亡、自噬等多方面(图 4)。



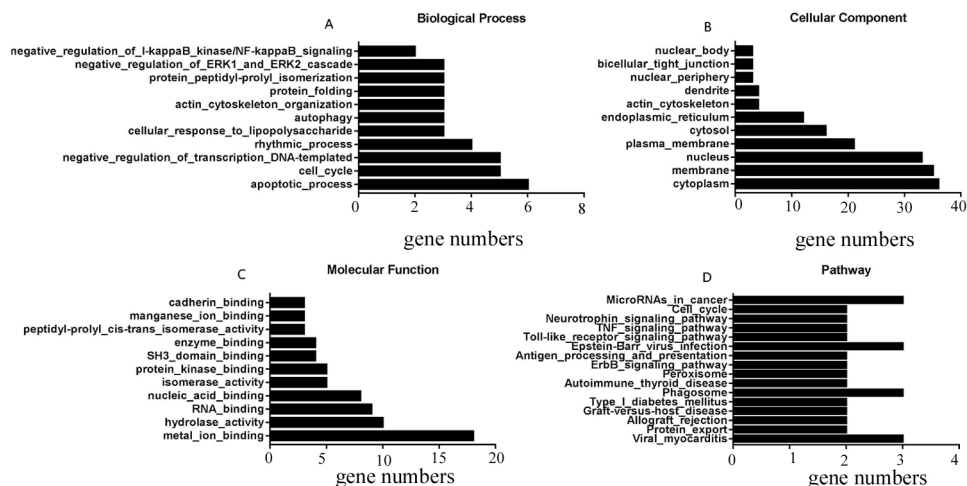
NC: 空载对照组; mimics: 过表达组; \*  $P < 0.05$  vs NC 组。

图2 过表达 miR-199b-5p 对足细胞凋亡的影响



NC: 空载对照组; mimics: 过表达组。

图3 过表达 mimics 组和对照组 NC 基因表达变化



A.生物过程; B.细胞组成; C.分子功能; D.信号通路。

图4 下调基因功能富集分析

### 3 讨论

足细胞损伤是多种肾脏疾病共有的病理生理变化,广泛存在于微小病变性肾病、局灶节段性肾小球硬化、IgA 肾病等肾脏疾病中<sup>[5]</sup>,遗传、机械、免疫应

激以及毒素在内的许多因素都可引起足细胞损伤<sup>[6]</sup>,足细胞长期持续损伤会引起肾小球的减少,最终导致肾脏功能的丧失。

近年来 miR-199b-5p 被广泛研究,其在红细胞

产生<sup>[7]</sup>,髓母细胞瘤<sup>[8]</sup>中都有重要调节作用。在本研究中,过表达 miR-199b-5p 可提高足细胞存活力,减少足细胞凋亡,这一研究结果初步提示 miR-199b-5p 过表达在足细胞凋亡中的保护作用。为进一步阐述 miR-199b-5p 保护足细胞的分子机制,通过高通量测序检测 miR-199b-5p mimics 组和 NC 组足细胞中基因表达谱变化。结果显示,与 NC 组比较有 11 114 个差异表达基因,其中 106 个基因下调大于 1.5 倍,考虑到 miRNAs 主要通过抑制靶基因的表达发挥其生物学功能,因此主要针对下调的基因进行功能富集分析,结果发现,这些潜在靶基因可能通过 NF-κB 和 TNF 信号通路、调控肌动蛋白骨架稳定性、细胞周期、凋亡等多个方面参与对足细胞凋亡的保护作用。

通过 TargetScan 和 miRDB 数据库预测 miR-199b-5p 的靶基因,结合高通量测序结果中下调的差异基因,发现 miR-199b-5p 可能通过不同的靶基因在细胞凋亡过程中发挥调节作用: ① UBL3 是一种泛素样蛋白,Verma 等<sup>[9]</sup>在细胞黏附、细胞骨架组织的通路中发现 UBL3 基因的改变。肌动蛋白细胞骨架的稳定对维持正常足细胞结构起着至关重要的作用,肌动蛋白细胞骨架的重排是蛋白尿发生的关键,导致肾脏疾病进行性加重<sup>[10]</sup>。② 靶基因脂肪细胞质膜相关蛋白( APMAP) 在脂肪细胞分化中发挥重要作用<sup>[11]</sup>,另外, APMAP 在 NF-κB 信号通路中也有重要调控作用,下调 APMAP 可以促进 NF-κB 信号通路的激活<sup>[12]</sup>,NF-κB 信号通路的激活可降低 TNF 诱导的细胞凋亡,而在 NF-κB 活性缺乏的情况下, TNF 诱导的细胞凋亡的敏感性将显著增加<sup>[13]</sup>。③ G 蛋白信号传导( RGS) 蛋白超家族具有巨大的结构和功能多样性,与细胞功能及疾病发生有着密切相关性<sup>[14]</sup>。RGS10 是 RGS 家族中较小的一个,在多个组织中都有表达,研究发现,敲低 RGS10 可以促进肿瘤细胞的生长、存活,减少细胞凋亡<sup>[15]</sup>,提示了下调 RGS10 在细胞凋亡中的保护作用。同时, Altman 等<sup>[16]</sup>发现,抑制 RGS10 可以诱导 mTOR 信号通路的激活,激活的 mTOR 可以通过 Akt 途径提高细胞存活率,减少细胞凋亡。

综上所述,过表达 miR-199b-5p 可能在足细胞损伤中发挥重要保护作用,通过对靶基因表达的调控,影响 NF-κB、TNF、mTOR 等信号通路,调控肌动蛋白骨架稳定等多个方面抑制足细胞的凋亡。目前还尚未报道 miR-199b-5p 与足细胞损伤相关方面的研究,而本研究可以帮助阐明 miR-199b-5p 在肾脏足细胞损伤中的调控作用,提供新的研究方向,尽可

能地为各种因足细胞损伤引起的肾脏疾病提供干预方案。

【参考文献】

[1] LIU M ,LIANG K ,ZHEN J *et al.*Sirt6 deficiency exacerbates podocyte injury and proteinuria through targeting Notch signaling [J]. Nat Commun 2017 8( 1) : 413.

[2] LEE HW ,KHAN SQ ,FARIDI MH *et al.*A podocyte-based automated screening assay identifies protective small molecules [J].J Am Soc Nephrol 2015 26( 11) : 2741-2752.

[3] ZUBERI M ,KHAN I ,MIR R *et al.*Utility of serum miR-125b as a diagnostic and prognostic indicator and its alliance with a panel of tumor suppressor genes in epithelial ovarian cancer [J].PLoS One , 2016 ,11( 4) : e0153902.

[4] YANG Q ,SUN M ,CHEN Y *et al.*Triptolide protects podocytes from TGF-β-induced injury by preventing miR-30 downregulation [J].Am J Transl Res 2017 9( 11) : 5150-5159.

[5] LIU S ,SHI W ,XIAO H *et al.*Receptor activator of NF-kappaB and podocytes: towards a function of a novel receptor-ligand pair in the survival response of podocyte injury [J].PLoS One 2012 7( 7) : e41331.

[6] MATSUSAKA T ,SANDGREN E ,SHINTANI A *et al.*Podocyte injury damages other podocytes [J].J Am Soc Nephrol ,2011 ,22 ( 7) : 1275-1285.

[7] LI Y ,BAI H ,ZHANG Z *et al.*The up-regulation of miR-199b-5p in erythroid differentiation is associated with GATA-1 and NF-E2 [J].Mol Cells 2014 37( 3) : 213-219.

[8] ANDOLFO I ,LIGUORI L ,DE ANTONELLIS P *et al.*The micro-RNA 199b-5p regulatory circuit involves Hes1 ,CD15 ,and epigenetic modifications in medulloblastoma [J].Neuro Oncol 2012 14 ( 5) : 596-612.

[9] VERMA M.Genome-wide association studies and epigenome-wide association studies go together in cancer control [J].Future Oncol , 2016 ,12( 13) : 1645-1664.

[10] BURFORD JL ,VILLANUEVA K ,LAM L *et al.*Intravital imaging of podocyte calcium in glomerular injury and disease [J].J Clin Invest 2014 124( 5) : 2050-2058.

[11] IILHAN A ,GARTNER W ,NABOKIKH A *et al.*Localization and characterization of the novel protein encoded by C20orf3 [J].Biochem J 2008 414( 3) : 485-495.

[12] MA Y ,GAO J ,YIN J *et al.*Identification of a novel function of adipocyte plasma membrane-associated protein ( APMAP) in gestational diabetes mellitus by proteomic analysis of omental adipose tissue [J].J Proteome Res 2016 15( 2) : 628-637.

[13] CHEN G ,GOEDDEL DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway [J].Scienc 2002 296( 5573) : 1634-1635.

[14] HOOKS SB ,MURPH MM. Cellular deficiency in the RGS10 protein facilitates chemoresistant ovarian cancer [J].Future Med Chem , 2015 7( 12) : 1483-1489.

[15] CACAN E ,ALI MW ,BOYD NH *et al.*Inhibition of HDAC1 and DNMT1 modulate RGS10 expression and decrease ovarian cancer chemoresistance [J].PLoS One 2014 9( 1) : e87455.

[16] ALTMAN MK ,ALSHAMRANI AA ,JIA W *et al.*Suppression of the GTPase-activating protein RGS10 increases Rheb-GTP and mTOR signaling in ovarian cancer cells [J].Cancer Lett 2015 369( 1) : 175-183.