

引用本文:李欣绪,周忠启,王志奎,等.长链非编码RNA6030408B16RIK结合微小RNA-326-3p参与腹膜透析超滤衰竭发生的机制[J].安徽医药,2023,27(2):265-270.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.02.012.

◇临床医学◇



长链非编码RNA6030408B16RIK结合微小RNA-326-3p参与腹膜透析超滤衰竭发生的机制

李欣绪¹,周忠启²,王志奎²,张磊²,孙丽娜²,蔺瑜林²

作者单位:¹山东第一医科大学研究生院,山东 泰安 271000;

²临沂市人民医院肾内科,山东 临沂 276000

通信作者:周忠启,男,主任医师,硕士生导师,研究方向为终末期肾病的诊治 Email:zhongqizhou7298@163.com

基金项目:山东省自然科学基金面上项目(ZR2019MH126)

摘要: 目的 研究长链非编码RNA6030408B16RIK(LncRNA6030408B16RIK)结合微小RNA(miRNA-326-3p)致大鼠尿毒症模型腹膜纤维化的机制,为预防超滤衰竭提供新的依据。方法 将36只造模成功的尿毒症大鼠分为六组,每组6只大鼠,分别为:尿毒症组(不行腹膜透析治疗),空白组(腹膜透析4周),NC组(腹膜透析4周+转染空质粒),inhibitor NC组(腹膜透析4周+转染空质粒抑制剂),miR-326-3p mimic组(腹膜透析4周+miR-326-3p模拟物),miR-326-3p inhibitor组(腹膜透析4周+miR-326-3p抑制剂)。构建LncRNA6030408B16RIK原始序列载体及LncRNA6030408B16RIK突变体载体,将miR-326-3p模拟物及模拟物阴性对照(mimic NC)分别与荧光素酶报告载体共同转入HEK-293T细胞中;以双荧光素酶报告实验、RNA pull down实验验证LncRNA6030408B16RIK与miR-326-3p的靶向关系,用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)和蛋白质印迹法(Western blotting)分析包括 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、成纤维细胞特异性蛋白-1(FSP1)、波形蛋白(Vimentin)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)等在内的多种腹膜纤维化相关因子的表达情况。结果 双荧光素酶实验结果:pWt-LncRNA6030408B16RIK(野生型LncRNA6030408B16RIK)的荧光素酶活性[(0.49±0.05)比(1.01±0.11)]明显降低($P<0.05$),而pMut-LncRNA6030408B16RIK(突变型LncRNA6030408B16RIK)的荧光素酶活性[(1.00±0.10)比(1.03±0.12)]没有明显变化($P>0.05$)。与尿毒症组相比,miR-326-3p mimic组中 α -SMA、FSP1、波形蛋白表达量[(0.51±0.06)、(0.22±0.03)、(0.61±0.06)比(0.81±0.09)、(0.62±0.08)、(0.96±0.10)]明显下降,E-钙黏蛋白[(1.99±0.21)比(1.14±0.14)]明显上升($P<0.05$),而与空白组相比,miR-326-3p inhibitor组中 α -SMA、FSP1、波形蛋白表达[(1.57±0.16)、(1.16±0.18)、(1.72±0.17)比(0.92±0.09)、(0.64±0.07)、(0.92±0.10)]明显上升,E-钙黏蛋白表达[(0.62±0.06)比(1.14±0.15)]明显下降($P<0.05$)。结论 LncRNA6030408B16RIK可直接结合miR-326-3p,而过表达miR-326-3p可抑制尿毒症大鼠腹膜透析超滤衰竭的发生。

关键词: 腹膜纤维化; 尿毒症; 超滤; 腹膜透析; microRNA-326-3p; 双荧光素酶报告实验

Mechanism of long noncoding RNA 6030408B16RIK binding to miRNA-326-3p involved in the development of ultrafiltration failure by peritoneal dialysis

LI Xinxu¹, ZHOU Zhongqi², WANG Zhikui², ZHANG Lei², SUN Lina², MAN Yulin²

Author Affiliations:¹School of Postgraduates, Shandong First Medical University, Taian, Shandong 271000, China;

²Department of Nephrology, Linyi People's Hospital, Linyi, Shandong 276000, China

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of long noncoding RNA 6030408B16RIK (lncRNA6030408B16RIK) binding to microRNA (miRNA-326-3p) causing peritoneal fibrosis in a rat uremic model to provide a new basis for the prevention of ultrafiltration failure. **Methods** A total of 36 successfully modeled uremic rats were divided into 6 groups with 6 rats in each group: the uremic group (without peritoneal dialysis treatment), blank group (peritoneal dialysis for 4 weeks), NC group (peritoneal dialysis for 4 weeks + transfected empty plasmid), inhibitor NC group (peritoneal dialysis for 4 weeks + transfected empty plasmid inhibitor), miR-326-3p mimic group (peritoneal dialysis for 4 weeks + miR-326-3p mimic), and miR-326-3p inhibitor group (peritoneal dialysis for 4 weeks + miR-326-3p inhibitor). The lncRNA6030408B16RIK original sequence vector and lncRNA6030408B16RIK mutant vector were constructed, and the miR-326-3p mimic and mimic negative control (mimic NC) were transferred into HEK-293T cells together with the luciferase reporter vector respectively. Dual-luciferase reporter assay and RNA pull down assay were used to verify the targeting relationship between lncRNA6030408B16RIK and miR-326-3p, and the expression of various peritoneal fibrosis-related factors including α -smooth muscle actin (α -SMA), fibroblast-specific protein-1 (FSP1), vimentin (Vimentin), and E-cadherin. α -SMA, FSP1, vimentin and E-cadherin were analyzed by RT-qPCR and Western blotting. **Results** The dual-luciferase assay showed that the

relative luciferase activity of pWt-lncRNA6030408B16RIK (wild-type lncRNA6030408B16RIK) was significantly lower $[(0.49 \pm 0.05) \text{ vs. } (1.01 \pm 0.11)]$ ($P < 0.05$), while pMut-lncRNA6030408B16RIK (mutant lncRNA6030408B16RIK) had no significant change in luciferase activity $[(1.00 \pm 0.10) \text{ compared to } (1.03 \pm 0.12)]$ ($P > 0.05$). Compared with the uremic group, the expression of α -SMA, FSP1 and vimentin $[(0.51 \pm 0.06), (0.22 \pm 0.03), (0.61 \pm 0.06) \text{ vs. } (0.81 \pm 0.09), (0.62 \pm 0.08), (0.96 \pm 0.10)]$ was significantly decreased in the miR-326-3p mimic group, and E-cadherin $[(1.99 \pm 0.21) \text{ vs. } (1.14 \pm 0.14)]$ was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the blank group, in the miR-326-3p inhibitor group, the expression of α -SMA, FSP1 and vimentin $[(1.57 \pm 0.16), (1.16 \pm 0.18), (1.72 \pm 0.17) \text{ vs. } (0.92 \pm 0.09), (0.64 \pm 0.07), (0.92 \pm 0.10)]$ significantly increased in the miR-326-3p inhibitor group, and E-cadherin $[(0.62 \pm 0.06) \text{ vs. } (1.14 \pm 0.15)]$ was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** lncRNA6030408B16RIK directly binds miR-326-3p, and overexpression of miR-326-3p inhibits the development of peritoneal dialysis ultrafiltration failure in uremic rats.

Key words: Peritoneal fibrosis; Uremia; Ultrafiltration; Peritoneal dialysis; MicroRNA-326-3p; Dual-luciferase reporter assay

终末期肾脏病(end stage renal disease, ESRD)发病率高、病情危重且预后较差,且家庭、社会经济负担高,因而一直是全球关注的重要卫生问题^[1]。腹膜透析(peritoneal dialysis, PD)以清除肾损伤病人尿毒症毒素的方式改善腹膜透析病人生活质量^[2-3]。目前的统计表明,中国过去十年间腹膜透析的使用率急剧上升(超过10倍)^[1]。但长期接触生物不相容性的腹透液会导致明显的腹膜纤维化(peritoneal fibrosis, PF),这些变化包括腹膜间皮细胞间充质转分化、细胞外基质沉积致间皮细胞下层增厚以及血管生成。并且高糖溶液能够引起腹膜组织发生上皮细胞向间充质细胞转化(epithelial-mesenchymal transdifferentiation, EMT)^[4]。反复发生腹膜炎、腹膜纤维化易致腹膜损伤后超滤衰竭(ultrafiltration failure, UFF),成为目前退出腹膜透析最主要、最常见的原因之一。据研究,包括lncRNA、miRNA等内的非编码RNA参与了腹膜透析的超滤衰竭^[5-8]。刘莹等^[9]报道,lncRNA NEAT-1通过miR-34a激活PI3K-AKT信号通路影响上皮间质转分化。本课题组通过生物学预测网站预测了lncRNA6030408B16RIK与miR-326-3p之间的结合位点,并且前期实验已经证实lncRNA6030408B16RIK的表达下调可能改善了腹膜纤维化进程延缓了超滤衰竭的发生。本实验目的在于使用双荧光素酶报告实验以及RNA pull down实验研究lncRNA6030408B16RIK与miR-326-3p的靶向关系,在超滤衰竭的生发、始动环节进行预防,为保护腹膜功能提供新的靶点和思路。本研究于2019年7月至2020年6月通过双荧光素酶报告实验以及RNA pull down实验验证lncRNA6030408B16RIK结合miR-326-3p参与腹膜透析超滤衰竭发生的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 36只使用5/6肾脏切除术造模成功的尿毒症模型Sprague Dawley大鼠,体质量为185~200 g(广东省医学实验动物中心,动物许可证号

SCXK,粤2013-0002)。3%戊巴比妥钠麻醉注射液、3% H₂O₂(美国Sigma-Aldrich Chemical Company),4.25%腹透液、一抗兔抗胶原Ⅲ抗体、二抗山羊抗兔免疫球蛋白G(英国Abcam Inc, Cambridge),兔源抗Collagen Ⅲ、CD31抗体,miR-326-3p模拟物、miR-326-3p抑制剂和NCs(广州RiboBio Co, Ltd.)。本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.2 实验方法

1.2.1 尿毒症模型构建及分组 选取40只正常喂养1周的大鼠参照文献^[10-11]进行尿毒症模型构建,首先抽取大鼠尾部血测正常肌酐值,后用3%戊巴比妥钠麻醉,碘伏液消毒,选择左侧距离肋下肌约1.5 cm,平行于脊柱旁开1 cm的位置行纵行切口,依次切开大鼠的皮肤、筋膜层及肌层,识别左侧肾脏。后充分分离肾脏周围组织,结扎后将左侧肾脏的上1/3和下1/3一起取出,后用明胶海绵压迫止血,检查无出血后,逐层缝合切口。1周后以同样方法行右侧肾脏切除,确定右侧肾脏准确位置后,用丝线于肾门处结扎肾脏,后从结扎处切下右肾,检查确认无出血后,依次缝合肌层及皮肤。2次手术后都给予青霉素注射3日预防感染发生。造模手术4周后,抽取大鼠尾部血测肌酐值,测量为正常值的2~3倍者则造模成功。造模手术过程中2只大鼠死亡,后有2只死于腹膜炎,将构建成功的36只大鼠尿毒症模型分为六组,每组6只大鼠(不成功大鼠已经剔除),分别为:尿毒症组(不进行腹膜透析治疗),空白组(腹膜透析4周),NC组(腹膜透析4周+转染空质粒),inhibitor NC组(腹膜透析4周+转染空质粒抑制剂),miR-326-3p mimic组(腹膜透析4周+miR-326-3p模拟物),miR-326-3p inhibitor组(腹膜透析4周+miR-326-3p抑制剂)。

1.2.2 腹膜平衡试验(PET) 大鼠腹膜透析诱导结束2 d后,将2 mL 4.25%的腹膜透析液注入大鼠腹腔中,并留取0.1 mL测量0 h大鼠的超滤量及葡萄糖转运量。透析2 h后,沿腹白线行一切口打开腹

腔,抽取其中的腹透液,而后准确量取腹透液量,并用纱布吸净腹腔内残余液体,称重,后计算超滤量及葡萄糖转运量。计算方法:超滤量(ultrafiltration, UF)=(总出量-入量)mL;葡萄糖转运量(mass transfer of glucose, MTG)=(葡萄糖浓度-初始×透析液量-初始)-(葡萄糖浓度-透析末×透析液量-透析末)mmol/kg。

1.2.3 HE 染色 处死大鼠后收集腹膜组织,切片制作完成后室温下干燥 1.5 h。过滤去除氧化的杂质,经苏木精染色液染色 5 min 后,浸泡入蒸馏水中洗去多余的染色液,后以 1% 的盐酸乙醇分化 5 s。将样品置于流水中至少洗涤 30 min,直到细胞变蓝。用 1% 曙红染液染色 1 min 后,依次在梯度乙醇(70%、80%、95%、100%)中脱水,分别用 95% 和 100% 乙醇洗涤 2 次,每次 5 min。然后经二甲苯(I)、二甲苯(II)清洗,各 5 min,擦去多余的二甲苯,并在二甲苯干燥前以中性胶密封,盖上盖玻片干燥过夜。使用直立显微镜观察样品,并用 CTS 成像系统记录照片。

1.2.4 Masson 染色 切片脱蜡后,依次经自来水、蒸馏水洗涤,细胞核用 Regaud 苏木精染液染色。水洗后,将切片在 Ponceau 酸液中浸泡 8 min,在 2% 冰醋酸溶液中浸泡 1 min。甩干玻片上的水分后以 1% 磷钼酸水溶液分化 4 min,擦掉多余液体后,用苯胺盐染色 5 min。将切片置于 0.2% 冰醋酸溶液和 95% 无水乙醇中浸泡 2 min,以去除多余染液。最后,经二甲苯清洗后,以中性树胶封固。

1.2.5 免疫组化 将切片于 60 °C 的恒温箱里加热 1 h,浸入二甲苯溶液中脱蜡,而后依次置于梯度乙醇中脱水,然后在 37 °C 的 3% H₂O₂ 中孵育 30 min,经磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,浸入 95 °C 的 1% 柠檬酸缓冲液中煮沸 20 min。冷却至室温后,切片用 PBS 冲洗,在 37 °C 下用山羊血清封闭 10 min,后加入一抗兔抗胶原Ⅲ抗体,于 4 °C 下放置 12 h。然后 PBS 冲洗后,加入二抗山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG),于 37 °C 下孵育 10 min。在标本中滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素溶液,并孵育 10 min。然后将 DAB 显色剂加入样本中,置于室温暗室中显色 8 min。切片用苏木精复染,脱水封片后,在光学显微镜下观察。

1.2.6 双荧光素酶报告实验 使用生物学预测网站(<https://cm.jefferson.edu/rna22/>)进行 miR-326-3p 与 LncRNA6030408B16RIK 的结合位点分析,并获取含有作用位点的片段序列。克隆 LncRNA6030408B16RIK 的全长到 pmirGLO Luciferase 载体上,命名为 pLncRNA6030408B16RIK-Wt。利用生物信息软

件预测 miR-326-3p 与 LncRNA6030408B16RIK 的结合位点,定点突变。构建 pLncRNA6030408B16RIK-Mut 载体,将 miR-326-3p 模拟物及 miR-326-3p 阴性对照物分别与荧光素酶报告载体共转染入 HEK-293T 细胞,然后用荧光检测仪器检测荧光强度。

1.2.7 RNA Pull Down 实验 将 50 nmol/L 生物素化的 Wt-miR-326-3p 和 Mut-miR-326-3p 转染到大鼠腹膜间皮细胞。48 h 后,收获细胞并在特异性裂解缓冲液中孵育 10 min。将细胞裂解物与预涂有无 RNase 的牛血清白蛋白(BSA)和酵母转移 RNA(tRNA)的 M280 链霉亲和素磁珠一起孵育。然后将小珠在 4 °C 下孵育 3 h,加入预冷的细胞裂解液洗涤 2 次。将小珠分别经低盐缓冲液洗涤 3 次,再用高盐缓冲液洗涤 1 次。通过 Trizol 试剂纯化的 RNA,经实时定量 PCR 以检测 LncRNA6030408B16RIK 的富集。

1.2.8 实时定量 PCR 使用 Trizol 试剂提取大鼠腹膜间皮细胞和大鼠腹膜组织中的 RNA,读取 260 nm 及 280 nm 处分光光度计值,后用 Nano Drop2000 测定 RNA 的浓度和纯度。采用 primer5.0 和 mirprimer2 软件设计 RT-qPCR 的引物,确认后由上海吉玛有限公司(中国上海)合成。使用 ABI PRISM 7500 系统进行 RT-qPCR。内参选用 β -肌动蛋白和 U6,并计算目标基因的表达。

1.2.9 蛋白质印迹法(Western blotting) 从大鼠腹膜间皮细胞和大鼠腹膜组织中提取总蛋白质,用二辛可宁酸(BCA)试剂确定每个蛋白质的浓度。蛋白质经 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,在 100 mV 的恒定压力下使用湿转移法将印迹转移到 PVDF 膜上。加入浓度 5% BSA,室温下封闭 1 h,然后用抗 β -肌动蛋白、 α -SMA 的一抗兔抗体在 4 °C 下封闭过夜。洗涤后,加入二抗山羊抗兔 IgG,并在室温下孵育 1 h,然后使用化学发光试剂显影。使用 Image J 软件来量化谱带强度。 β -肌动蛋白用作内参,靶条带与 β -肌动蛋白的灰度值之比表示相对蛋白表达。

1.3 统计学方法 本课题分析数据使用 SPSS 21.0 软件。服从正态分布和方差均匀性的数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。使用独立样本的 t 检验比较两组之间的数据,而用单因素方差分析比较多组之间的数据,而后进行 Tukey 后检验。 $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 下调 miR-326-3p 对腹膜组织结构及功能变化和腹膜纤维化的影响 (1)腹膜透析 4 周后,通过 HE 染色、Masson 染色、免疫组化的实验结果观察腹膜组织结构发生的变化,与 inhibitor NC 组相比,miR-326-3p inhibitor 组细胞变为明显的圆形,间皮

基质增加并伴有许多成纤维样细胞;相反,与 mimic NC 组相比,miR-326-3p mimic 组的尿毒症大鼠间皮细胞成规律的扁平状,无明显巨噬细胞浸润及胶原纤维沉积。此外,miR-326-3p mimic 组大鼠的腹膜厚度降低,胶原蛋白Ⅲ和 CD31 表达量下降,而 miR-326-3p inhibitor 组腹膜厚度增加,胶原蛋白Ⅲ和 CD31 阳性表达量明显增加。见表 1。

表 1 大鼠腹膜形态比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	腹膜厚度/mm	Collagen Ⅲ /%	CD31/%
mimic NC 组	6	18.57±1.95	22.44±2.45	14.22±5.04
miR-326-3p 组	6	13.11±1.36 ^①	6.44±0.74 ^①	3.94±0.82 ^①
inhibitor NC 组	6	17.32±1.88	20.09±3.08	16.49±5.63
miR-326-3p inhibitor 组	6	27.18±2.82 ^②	44.69±5.12 ^②	32.60±5.48 ^②
F 值		48.84	142.56	38.43
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:①与模拟物空白组相比, $P<0.001$ 。②与抑制物空白组相比, $P<0.001$ 。

(2)通过腹膜平衡实验观察腹膜功能变化,miR-326-3p mimic 组大鼠的超滤能力较 mimic NC 组明显增加,葡萄糖转运量明显下降;而 miR-326-3p inhibitor 组相比 inhibitor NC 组,超滤量明显下降,而葡萄糖转运量增加。见表 2。

(3)RT-PCR 和 Western blotting 的结果显示,miR-326-3p mimic 组中,间皮细胞转分化的标志物 α

表 2 大鼠腹膜超滤量及葡萄糖转运量/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	超滤量/mL	MTG/(mmol/kg BW)
mimic NC 组	6	5.10±0.52	12.54±1.27
miR-326-3p 组	6	7.02±0.71 ^①	6.12±0.65 ^①
inhibitor NC 组	6	5.12±0.52	12.16±1.24
miR-326-3p inhibitor 组	6	3.01±0.31 ^②	19.64±1.99 ^②
F 值		56.12	97.28
P 值		<0.001	<0.001

注:MTG 为葡萄糖转运量。

①与模拟物空白组相比, $P<0.001$ 。②与抑制物空白组相比, $P<0.001$ 。

-SMA、FSP1 和波形蛋白表达下降,E-钙黏蛋白表达增加,在 miR-326-3p inhibitor 组中结果相反。见表 3,表 4。

2.2 LncRNA6030408B16RIK 与 miR-326-3p 靶向关系验证 通过生物学预测网站分析 miR-326-3p 与 LncRNA6030408B16RIK 的结合位点,双荧光素酶实验结果显示与 miR-326-3p mimic 相结合的 LncRNA6030408B16RIK-Wt 的荧光带强度明显下降,而 LncRNA6030408B16RIK-Mut 的强度相较于 NC 组则无明显变化;RNA pull down 实验中,与 Wt-miR-326-3p 结合的 LncRNA6030408B16RIK 富集量明显高于 Mut-miR-326-3p 组。结果说明 LncRNA6030408B16RIK 特异性结合 miR-326-3p。见表 5,6。

表 3 大鼠腹膜中 mRNA 的表达水平/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	FSP1	α -SMA	Vimentin	E-cadherin	miR-326-3p
mimic NC 组	6	1.02±0.14	0.99±0.10	1.00±0.10	1.01±0.12	1.01±0.13
miR-326-3p 组	6	0.38±0.04 ^①	0.42±0.04 ^①	0.59±0.06 ^①	1.90±0.19 ^①	2.56±0.26 ^①
Inhibitor NC 组	6	1.01±0.12	1.03±0.12	0.99±0.10	1.02±0.12	1.01±0.11
miR-326-3p inhibitor 组	6	1.69±0.18 ^②	1.54±0.16 ^②	1.63±0.17 ^②	0.58±0.05 ^②	0.31±0.04 ^②
F 值		104.26	103.95	88.87	108.05	221.15
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:FSP1 为成纤维细胞特异性蛋白-1, α -SMA 为 α -平滑肌肌动蛋白,Vimentin 为波形蛋白,E-cadherin 为 E-钙黏蛋白。

①与模拟物空白组相比, $P<0.001$ 。②与抑制物空白组相比, $P<0.001$ 。

表 4 大鼠腹膜中蛋白质的表达水平/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	α -SMA	FSP1	Vimentin	E-cadherin
mimic NC 组	6	0.81±0.09	0.62±0.08	0.96±0.10	1.14±0.14
miR-326-3p 组	6	0.51±0.06 ^①	0.22±0.03 ^①	0.61±0.06 ^①	1.99±0.21 ^①
inhibitor NC 组	6	0.92±0.09	0.64±0.07	0.92±0.10	1.14±0.15
miR-326-3p inhibitor 组	6	1.57±0.16 ^②	1.16±0.18 ^②	1.72±0.17 ^②	0.62±0.06 ^②
F 值		107.78	82.80	101.60	85.01
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: α -SMA 为 α -平滑肌肌动蛋白,FSP1 为成纤维细胞特异性蛋白-1,Vimentin 为波形蛋白,E-cadherin 为 E-钙黏蛋白。

①与模拟物空白组相比, $P<0.001$ 。②与抑制物空白组相比, $P<0.001$ 。

表5 与miR-326-3p结合LncRNA6030408B16RIK的
荧光强度 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	pWt-LncRNA60304 08B16RIK	pMut-LncRNA6030 408B16RIK
mimic NC组	6	1.01±0.11	1.03±0.12
miR-326-3p组	6	0.49±0.05	1.00±0.10
F值		53.88	0.09
P值		<0.001	<0.001

表6 与LncRNA6030408B16RIK结合miR-326-3p的
富集量 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	miR-326-3p
NC组	6	1.01±0.12
Wt-miR-326-3p组	6	2.87±0.29 ^①
Mut-miRNA-326-3P组	6	1.02±0.12
F值		90.98
P值		<0.001

注:①与空白组相比, $P<0.001$ 。

3 讨论

腹膜透析(PD)是终末期肾病治疗常用的重要连续替代方案,在生存、病人独立性和医疗保健成本方面具有相当大的初始益处^[3]。然而,其更广泛使用的障碍之一是基于葡萄糖的PD溶液由于纤维化对腹膜的形态完整性和功能产生影响。主要是由高糖刺激引起的,通过激活多种细胞因子和转录因子信号通路影响胶原蛋白和其他细胞外膜成分的合成,使腹膜发生上皮间充质转分化,致超滤衰竭的发生,但具体机制尚不清楚^[12]。越来越多的证据证明了不同类别的非编码RNA(ncRNA)在腹膜纤维化中的调节作用。miRNA属于一类独特的ncRNA,目前研究显示miRNA通过介导多种信号通路参与了上皮间质转分化过程^[13-16]。miR-326-3p在肾脏肿瘤疾病中对细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡有重要影响,且在一些女性相关疾病(包括宫颈癌、子宫内膜癌、乳腺癌和多种自身免疫性疾病)中存在异常表达^[17-20]。本课题探讨了miR-326-3p是否通过EMT参与了腹膜纤维化过程,HE染色、Masson染色、免疫组化结果表明miRNA-326-3p mimic组细胞排列规则,形态呈扁平状,无明显间皮细胞脱落、间质增厚、巨细胞浸润表现;而miRNA-326-3p inhibitor组中作为间皮细胞转分化标志物的 α -SMA和波形蛋白表达上调,而E-钙黏蛋白表达下调说明发生了腹膜纤维化。Katsunori等^[21]发现,与正常小鼠相比,腹膜纤维化的小鼠中miRNA表达异常。大量研究表明miR-15b、miR-21促进腹膜纤维化的发生,而miR-200c、miR-29b和miR-30a则一定程度上抑制纤维化的发生^[13]。这些研究间接验证了我们的实验

中miRNA-326-3p过表达可延缓腹膜纤维化的进程。

本课题组前期实验已经证实下调LncRNA6030408B16RIK的表达可延缓大鼠超滤衰竭的发生,且经生物学预测网站分析LncRNA6030408B16RIK与miRNA-326-3p存在靶向结合位点。有研究显示LncRNA结合miRNA介导不同的通路,调节下游蛋白质的表达,对细胞的增殖、转移和上皮间质转分化产生影响^[22-28]。本实验采用RT-PCR、Western blotting等方法,检测大鼠腹膜组织中LncRNA6030408B16RIK与miR-326-3p相关基因和蛋白的表达水平,且通过双萤光素酶实验对LncRNA6030408B16RIK与miR-326-3p的靶向关系进行研究。结果显示miR-326-3p mimic组与mimic NC组相比LncRNA6030408B16RIK-Wt富集量明显升高,而LncRNA6030408B16RIK-Mut的富集量在两组中差异无统计学意义;且与NC组以及LncRNA6030408B16RIK-Mut组相比,miR-326-3p与LncRNA6030408B16RIK-Wt相结合的荧光强度明显下降,说明LncRNA6030408B16RIK与miR-326-3p存在相互作用。通过本实验可得出结论,LncRNA6030408B16RIK通过结合miR-326-3p参与腹膜透析大鼠的超滤衰竭,过表达miR-326-3p可一定程度上抑制尿毒症大鼠腹膜透析超滤衰竭的发生,或可为我们预防超滤衰竭延缓腹膜纤维化提供新的思路。目前有文献表明mi-RNA可调控WISP因子影响足细胞的上皮间质转分化以及器官的纤维化^[29-31]。目前经过生物预测网站分析,miR-326-3p与WISP因子存在靶向结合位点,可在以后阅读大量文献后,设计更加科学的实验以此作为进一步研究的方向。

参考文献

- [1] KALANTAR-ZADEH K, LI P K T, TANTISATTAMO E, et al. Living well with kidney disease by patient and care-partner empowerment; kidney health for everyone everywhere[J]. Kidney Dis (Basel), 2021, 7(4): 247-253.
- [2] 廖梦, 陈思洁, 汤日宁, 等. 内皮-间充质转分化在腹膜透析相关腹膜纤维化中的研究进展[J]. 临床肾脏病杂志, 2021, 21(10): 848-855.
- [3] 倪兆慧, 金海蛟. 中国腹膜透析发展70年[J]. 中国血液净化, 2019, 18(10): 661-663.
- [4] FUH KF, SHEPHERD RD, WITHELL JS, et al. Fluid flow exposure promotes epithelial-to-mesenchymal transition and adhesion of breast cancer cells to endothelial cells[J]. Breast Cancer Res, 2021, 23(1): 97.
- [5] 徐小桐, 王正书, 张昕等. 急性肾损伤模型中miRNA-21对肾小管上皮细胞保护作用的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(1): 32-36, 292.
- [6] PRAJAPATI KS, SHUAIB M, KUSHWAHA PP, et al. Identifica-

- tion of cancer stemness related miRNA(s) using integrated bioinformatics analysis and in vitro validation [J]. *3 Biotech*, 2021, 11(10): 446.
- [7] REFEAT MM, HASSAN NAM, AHMAD IH, et al. Correlation of circulating miRNA-33a and miRNA-122 with lipid metabolism among egyptian patients with metabolic syndrome [J]. *J Genet Eng Biotechnol*, 2021, 19(1): 147.
- [8] ZARE M, BASTAMI M, SOLALI S, et al. Aberrant miRNA promoter methylation and EMT-involving miRNAs in breast cancer metastasis: diagnosis and therapeutic implications [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(5): 3729-3744.
- [9] 刘莹, 谢锦霞, 李恒. 长链非编码RNA NEAT1通过miR-34a靶向GAS1激活PI3K-AKT信号通路对宫颈癌的增殖、侵袭和上皮细胞-间充质转化的影响研究[J]. *中国性科学*, 2021, 30(5): 59-63.
- [10] MAKHLOUFI C, CRESCENCE L, DARBOUSSET R, et al. Assessment of thrombotic and bleeding tendency in two mouse models of chronic kidney disease: adenine-diet and 5/6th nephrectomy [J]. *TH Open*, 2020, 4(2): 66-76.
- [11] 杨枫, 钟晓容, 林贞明等. 不同腹膜透析模式对尿毒症大鼠残余肾功能的影响[J]. *内科急危重症杂志*, 2018, 24(4): 324-327.
- [12] 王玉浔, 姜埃利. 长链非编码RNA在腹膜纤维化中的表达谱变化[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(11): 2089-2091.
- [13] 林文珊, 周添标. 腹膜透析相关性腹膜纤维化发生机制及治疗新进展[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(1): 4-9.
- [14] ANELISA J, PADMINI G, MICHAEL L, et al. The role of miRNA-21 and epithelial mesenchymal transition (EMT) process in colorectal cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2017, 70(4): 331-356.
- [15] EVGENIA N, ANNALISA M. Functional impacts of non-coding RNA processing on enhancer activity and target gene expression [J]. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11(10): 868-879.
- [16] STEPHANIE CM, SHIRLEY J, YAINYRETTE RR, et al. Mitotic kinases as drivers of the epithelial-to-mesenchymal transition and as therapeutic targets against breast cancers [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2021, 246(9): 1036-1044.
- [17] GOLAMREZA J, K-HALIL A, EBRAHIM S, et al. Diagnostic biomarker and therapeutic target applications of miR-326 in cancers: a systematic review [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 21560-21574.
- [18] GOLAMREZA J, K-HALIL A, EBRAHIM S, et al. The microRNA-326: autoimmune diseases, diagnostic biomarker, and therapeutic target [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(12): 9209-9222.
- [19] THOMAS C, EVGENIA N, BENJAMIN L, et al. Determination of primary microRNA processing in clinical samples by targeted pri-miR-sequencing [J]. *RNA*, 2020, 26(11): 1726-1730.
- [20] 尹佳琦, 魏明刚, 黄星星等. 芪归益肾方通过调控miR-141对UUO小鼠肾脏纤维化的影响[J]. *中成药*, 2018, 40(4): 765-770.
- [21] KATSUNORI Y, HIROKI I, AKINORI AA, et al. MicroRNAs in peritoneal fibrosis: a systematic review [J]. *Discov Med*, 2018, 26(146): 271-280.
- [22] 高铭, 杨春宇, 王彤, 等. lncRNA和miRNA在胃癌中的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(17): 3853-3858.
- [23] MOLYKUTTY A, SHANNON MO, MICHELLE B, et al. Analysis of lncRNA-miRNA-mRNA expression pattern in heart tissue after total body radiation in a mouse model [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1): 336.
- [24] STRIBLING D, LEI Y, GUARDIA CM, et al. A noncanonical microRNA derived from the snaR-A noncoding RNA targets a metastasis inhibitor [J]. *RNA*, 2021, 27(6): 694-709.
- [25] NTINI E, LOULOUPI A, LIZ J, et al. Long ncRNA A-ROD activates its target gene DKK1 at its release from chromatin [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1636.
- [26] 李欢, 何丽洁, 娄未娟, 等. lnc-MGC对高糖诱导的人腹膜间皮细胞转分化的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2018, 43(3): 189-194.
- [27] PARASKEVOPOULOU MD, KARAGKOUNI D, VLACHOS I, et al. MicroCLIP super learning framework uncovers functional transcriptome-wide miRNA inter-actions [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3601.
- [28] 石文浩, 孟军, 张朋, 等. 融合CNN和Bi-LSTM的miRNA-lncRNA互作关系预测模型[J]. *计算机研究与发展*, 2019, 56(8): 1652-1660.
- [29] DAS A, DHAR K, MAITY G, et al. Deficiency of CCN5/WISP-2-driven program in breast cancer promotes cancer epithelial cells to mesenchymal stem cells and breast cancer growth [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1220.
- [30] 李梦岚, 谭琴, 徐秀. miRNA-192靶向调控WT1在高糖诱导足细胞EMT中的作用[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2020, 40(6): 361-366.
- [31] 李东亮, 李志猛. 微小RNA-452通过Wnt/ β -连环蛋白对胃癌细胞上皮-间充质转化的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(9): 1590-1593.

(收稿日期: 2021-09-19, 修回日期: 2021-11-06)