

[文章编号] 1674-8115(2011)12-1786-04

· 综述 ·

微小 RNA 与肾脏纤维化的研究进展

刘 剑, 王伟铭

(上海交通大学 医学院附属瑞金医院肾脏科, 上海 200025)

[摘要] 微小 RNA(miRNA)是一类长度约为 22 个核苷酸的非编码蛋白质 RNA,通过与 RNA 结合,参与机体的生理和病理过程,并在细胞分化、增殖和凋亡等过程中发挥重要作用。研究发现,miRNA 通过调控胶原沉积、纤维连接蛋白表达、间充质细胞转分化及转化生长因子 β 对肾脏的作用,参与肾脏纤维化的发生和进展。

[关键词] 微小 RNA;纤维化;肾脏

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.12.029

[中图分类号] R363

[文献标志码] A

Research progress of microRNA and renal fibrosis

LIU Jian, WANG Wei-ming

(Department of Nephrology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

[Abstract] microRNA (miRNA), consisted of about 22 nucleotides, are noncoding small RNA. They can impact the target RNA, thus regulating the physiological and pathological processes and possessing an significant action in cell proliferation, apoptosis, and differentiation. It has been reported that miRNA, modulating the deposition of collagen, expression of fibronectin, epithelial-to-mesenchymal transition and effect of transforming growth factor- β in kidney, are involved in the mechanism of renal fibrosis.

[Key words] microRNA; fibrosis; renal

微小 RNA (microRNA, miRNA)是由约 22 个核苷酸组成的非编码 RNA,转录后与 RNA 结合阻断其翻译或引起降解,调控机体生理、病理的过程,在细胞增殖、凋亡和分化等过程中具有非常重要的作用。1993 年 Lee 等^[1]在新秀丽小杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) 中发现了一段不编码蛋白质的基因 (*lin-4*),能以 mRNA-miRNA 互补作用来调节 *lin-14* 的翻译,从而控制胚胎的发育。随着计算机及生物化学等新技术的应用,更多的 miRNA 和相应靶 RNA 被发现,miRNA 的命名也逐渐规范化,以 miRBase 数据库命名规范为例:miRNA 的名称包括表示种族的前缀以及后缀数字;高度同源的 miRNA 可以以小写字母表示如 miR-21a、miR-21b;不同序列产生的相同成熟 miRNA 则以数字区分,如 miR-281-1;植物来源的 miRNA 可以如 *ath-MIR16a* 的形式表示;病毒来源的 miRNA 以其来源的基因位点名称表示^[2]。

1 miRNA

1.1 miRNA 的产生

在细胞核中, RNA 聚合酶 II 作用下转录出一段带有 5' 帽子结构和 3' poly A 的初级 miRNA (pri-miRNA)。miRNA 的成熟一般需要 2 个步骤和 2 种 RNA 聚合酶 III (Drosha 和 Dicer) 的参与。Pri-miRNA 首先在微处理复合物 Drosha-SGCR8 (SGCR8 是一种 RNA 结合蛋白) 剪切后形成前体 miRNA (pre-miRNA)。Mirtrons 可以在无 Drosha 作用下拼接时形成 pre-miRNA。这些带有 70~90 个碱基对的具茎环结构的 pre-miRNA 经输出蛋白 Exportin5-Ran-GTP 转运到胞质后,再由 Dicer 和 TRBP (一种 RNA 结合蛋白) 切去 pre-miRNA 的发夹样结构。miRNA/miRNA 双链中,一条称为成熟 miRNA,其与 AGO 蛋白家族 (Ago2) 及其他蛋白形成 miRNA 介导沉默复合物 (miRNA-induced silencing complex, miRISC) 发挥作用,另一条

[作者简介] 刘 剑(1987—),男,硕士生;电子邮箱: jim_liu@yeah.net。

[通信作者] 王伟铭,电子邮箱: wwiming@medmail.com.cn。

miRNA 则被降解。在哺乳动物中,一些 pre-miRNA 在胞质中经 Dicer 处理前可以在 Ago2 作用下切去 3' 臂,形成 ac-pre-miRNA^[3,4]。Cheloufi 等^[5]通过对 miR-451 的研究发现,pre-miR-451 不经过 Dicer 的加工,能直接与 AGO 相结合。

合成 miRNA 时,参与的因子不完全一致,并且受不同因子的调控。转录因子(如 c-Myc 或 P53)或启动子的甲基化可以控制不同的基因被转录。在 RNA 腺苷脱氨酶(adenosine deaminases acting on RNA, ADARs)的修饰下腺嘌呤转变成次黄嘌呤(A-to-I)^[3]。此外,Davis 等^[6]证实转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)/骨形成蛋白(bone morphogenic protein, BMP)可以通过 Smad 调控相关的一类 miRNA。Triboulet 等^[7]也证实微处理复合物通过剪切 DGCR8 的 5' 非转录区(5' UTR)的发夹样结构对 DGCR 进行调节;因此,miRNA 的形成和成熟是十分复杂的。

1.2 miRNA 作用机制

Lee 等^[1]发现 lin-4 RNA 有与 lin-14 mRNA 的 3' 非转录区(3' UTR)互补的序列,而这段序列在之前就被认为与 lin-14 的表达受抑制有关。miRNA 的引导链与 mRNA 3' UTR 的种子序列(seed sequence, 其在进化中高度保守)相结合,启动 AGO 对 mRNA 的分解或对 mRNA 的表达抑制。GW182(由甘氨酸和色氨酸组成的相对分子质量为 182 000 的蛋白质,是 miRISC 的组成之一)使 miRNA 脱腺苷化发挥作用^[2,8]。

人类中有 4 种 AGO: AGO1、AGO2、AGO3 和 AGO4。Wang 等^[9]认为,人类的 AGO1 和 AGO2 能以不依赖 ATP 的方式分开 miRNA 的双链。此时,AGO 蛋白起 RNA 伴侣的作用,而不是 RNA 螺旋酶的作用;并且,AGO1 主要促使 miRNA 双链分开,而 AGO2 主要起降解 RNA 的作用。

2 miRNA 与肾脏纤维化的机制

大部分肾脏疾病的终末阶段均存在肾脏的纤维化。纤维化的过程不仅是瘢痕的形成,更是一个包括细胞外基质(extracellular matrix, ECM)形成和不同细胞相互作用、转化的动态系统。肌成纤维细胞是纤维化的特征,也是分泌 ECM 的最主要细胞,它可以来自间充质细胞,包括成纤维细胞、外膜细胞和血管周围细胞以及原位的间充质干细胞等;同时,血小

板衍生生长因子和 TGF- β 作用于相应受体激活不同的信号转导途径可以促进纤维化,而子宫敏感性相关基因(uterine sensitization-associated gene, USAG-1)和 BMP-7 可以减轻纤维化。上皮细胞可以通过 TGF- β /Smad、integrin/ILK 和 Wnt/ β -catenin 途径向间充质细胞转分化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT),三种途径在纤维化过程中发挥重要的作用;其他细胞和细胞因子也参与了纤维化的整个过程^[10,11]。

2.1 miRNA 与胶原、纤维连接蛋白

Kato 等^[12]对糖尿病小鼠的肾小球组织与 TGF- β_1 培养的小鼠系膜细胞的研究发现:TGF- β_1 能增加 miR-192 的表达,进而通过减少 E-Box 的抑制物 Zeb2 增加胶原沉积,促进肾脏纤维化;此外,研究又发现 TGF- β_1 能增加 miR-216a 的表达,从而减少 RNA 结合蛋白 Ybx1 的合成,增加游离的 Tsc-22。Tsc-22 能与 Tfe3 作用进而增加胶原沉积^[13]。Wang 等^[14]研究结果显示:NOD 小鼠和糖尿病模型小鼠的肾皮质以及高糖培养的正常人和小鼠系膜细胞高表达 miR-377、miR-337 和 miR-129,调节纤维连接蛋白的表达。在转染 miR-377 的系膜细胞中 miR-377 通过抑制 p21 激活激酶 1(p21 activated kinase-1, PAK1)、超氧化物歧化酶 1 和超氧化物歧化酶 2,增加纤维连接蛋白的表达及氧化应激的敏感性。Du 等^[15]研究 miRNA 在糖尿病肾病的小管上皮细胞上的作用时发现:HK-2 细胞表达的 miRNA 与系膜细胞不完全相同,HK-2 在高糖或 TGF- β 刺激下 miR-29a 减少,在 HK-2 中 miR-29a 作用于 col4a1 和 col4a2 使 IV 型胶原的表达减少。Liu 等^[16]对 Dahl 盐敏感性高血压(SS)大鼠和 SS-13BN 大鼠进行高盐饲养后观察发现:SS 大鼠的肾髓质高盐时 miR-29b 表达降低,且 miR-29b 对胶原和一些基质有调节作用,提示 miR-29b 对 SS 大鼠具有抗纤维化的作用。

此外,Maurer 等^[17]发现:系统性硬化患者的纤维母细胞和皮肤组织的 miR-29a 表达低于正常人;正常人的纤维母细胞 miR-29a 基因表达减少后引起 I 型和 III 型胶原的增加, TGF- β 和血小板衍生生长因子 B 通路参与这一过程的调控。

2.2 miRNA 与 EMT

现已证实 miRNA 是细胞生长和分化的重要调节因子。在 EMT 过程中,上皮细胞失去其特征如细胞之间的连接(cell to cell contact)、微绒毛、紧密连接蛋白和极性等,获得间充质细胞的特征,如张力纤

维、丝状伪足^[18]。大量文献报道 miRNA 在肿瘤 EMT 中的作用及与肿瘤转移的关系,如 miR-200 家族和 miR-205 能下调锌指增强子结合蛋白 1(zinc finger enhancer binding protein-1, ZEB1)和 ZEB2,抑制 β -catenin/Wnt 通路而减少 EMT 的发生^[19,20]。Wang 等^[21]研究发现:IgA 肾病患者尿液中 miR-200a、miR-200b 和 miR-429 表达减少,EMT 的标志物如波形蛋白的表达与 miR-200a、miR-200b 和 miR-429 的表达呈负相关,ZEB2 的表达与 miR-200b 的表达呈负相关。对高血压性肾纤维化患者的肾脏组织的研究^[22]发现:miR-200a、miR-200b、miR-141、miR-429、miR-205 和 miR-192 的表达增多,而 EMT 相关的转录因子 ZEB1 的表达与 miR-429 的表达呈负相关,ZEB2 表达与 miR-200a、miR-200b、miR-429 的表达呈负相关。Kong 等^[23]发现:经 TGF- β 处理后的小鼠乳腺表皮细胞的 miR-155 表达增加,通过下调 RhoA(属于 Rho 亚家族,是 ras 基因超家族的一员)的表达而促进 EMT 的发生。不同的 miRNA 在不同的组织和细胞中发挥不同的作用。

Wang 等^[24]对大鼠近端小管细胞株、系膜细胞、HK-2 和糖尿病大鼠模型的研究证实:TGF- β 能引起 EMT 的标志蛋白表达增加、miR-192/215 表达减少;miR-192/215 能通过与 ZEB2 的 3' UTR 结合而直接增加上皮细胞的标志物 E-钙黏素的表达,这一过程可以不需要 TGF- β 的刺激,且不影响 ECM 的产生。Krupa 等^[25]证实在肾小管上皮细胞上,miR-192 可减少 ZEB1/2 对 E-box 的抑制,使 E-钙黏素的表达增加。Oba 等^[26]发现 miR-200b 能缓解单侧输尿管结扎引起的纤维化。进一步对 HK-2 的研究发现 miR-200b 能通过抑制 ZEB1/2 减少肾脏的 EMT 和纤维化。此外,在 HK-2 细胞中下调 miR-382 表达水平后能减轻 TGF- β_1 导致的 E-钙黏素表达减少^[27]。

2.3 miRNA 与 TGF- β

TGF- β 是各个脏器纤维化进程中的重要因子之一,也是研究比较多的因子。在纤维化中主要起作用的是 TGF- β_1 ^[9,10]。研究^[11,28]发现:在系膜细胞中 TGF- β_1 可增加 miR-192 的表达,后者使 E-Box 受抑可使 miR-216a、miR-217 表达增加,进而通过降低磷酸酶张力蛋白同系物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)的表达使 Akt 活化,Akt 的活化与 ECM 沉积、细胞肥大和氧化应激相关,从而促进纤维化。Krupa 等^[25]发现:在糖尿病肾病患者,尤其是估算肾小球滤

过率 < 15 mL/min 患者的肾组织中的 miR-192 表达下降;TGF- β_1 处理后的 HK-2 miR-192 表达也减少。

为研究 TGF- β 引起 miR-192 表达增加的机制,Chung 等^[29]通过对单侧输尿管结扎小鼠肾脏、大鼠残余肾脏模型以及 MRK52E 的研究发现:miR-192 表达增加与 TGF- β /Smad3 通路相关,且 Smad7 可使 TGF- β 预处理后的 miR-192 表达减少。有研究者^[5]发现:TGF- β /BMP 可促进 Smad 的 MH1 区域与 miRNA 上的与 Smad 结合元件类似的部位相结合,以招募 Droshe 到相应的 pri-miRNA,并使之成熟。

此外,HK-2 在高糖或 TGF- β 刺激下 miR-29a 减少^[14];UUO 小鼠和 TGF- β 作用的 HK-2 中 miR-200 家族的表达增加,且 miR-200b 能缓解纤维化^[25]。对 NRK52E 细胞和糖尿病小鼠模型的研究^[30]发现:TGF- β_1 和 TGF- β_2 均促进细胞 EMT,使 miR-200a 表达减少;miR-141 和 miR-200a 能使 ECM 蛋白减少,miR-200a 能使 smd3 减少,且 miR-141 和 miR-200a 能直接与 TGF- β_2 的 3' UTR 结合,使其翻译减少,从而减轻纤维化。

3 总结与展望

从 miRNA 发现至今,人们对其在生理和病理过程的作用已有所认识。miRNA 在不同的研究组织和预处理后,表达谱改变不完全相同,不同的疾病过程中发挥的作用也不完全相同。因此,以何种处理方式和何种动物模型研究 miRNA 表达谱的改变更接近于人类,需要进一步的研究和探讨。

miRNA 在肾脏疾病的发生和发展过程中发挥重要的调控作用,因此提出设想:通过检测某种或一类的 miRNA 可使疾病得以早期诊断,或通过阻断某关键的 miRNA 可阻断肾脏纤维化的进展。目前,对 miRNA 在肾脏纤维化中具体作用及其机制尚未明确,并且寻找靶 mRNA 的方法还有待改进。相信随着研究的不断深入,miRNA 在疾病的诊断和治疗方面具有广阔的应用前景。

【参考文献】

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, et al. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.
- [2] Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, et al. miRBase: tools for microRNA genomics[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(Database issue): D154-D158.

- [3] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay [J]. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 597–610.
- [4] Winter J, Jung S, Keller S, et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(3): 228–234.
- [5] Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, et al. A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis [J]. *Nature*, 2010, 465(7298): 584–589.
- [6] Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, et al. Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha [J]. *Mol Cell*, 2010, 39(3): 373–384.
- [7] Triboulet R, Chang HM, Lapierre RJ, et al. Post-transcriptional control of DGCR8 expression by the Microprocessor [J]. *RNA*, 2009, 15(6): 1005–1011.
- [8] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297.
- [9] Wang B, Li S, Qi HH, et al. Distinct passenger strand and mRNA cleavage activities of human Argonaute proteins [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(12): 1259–1266.
- [10] Boor P, Ostendorf T, Floege J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2010, 6(11): 643–656.
- [11] Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis [J]. *J Pathol*, 2008, 214(2): 199–210.
- [12] Kato M, Zhang J, Wang M, et al. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(9): 3432–3427.
- [13] Kato M, Wang L, Putta S, et al. Post-transcriptional up-regulation of Tsc-22 by Ybx1, a target of miR-216a, mediates TGF-beta-induced collagen expression in kidney cells [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(44): 34004–34015.
- [14] Wang Q, Wang Y, Minto AW, et al. MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy [J]. *FASEB J*, 2008, 22(12): 4126–4135.
- [15] Du B, Ma LM, Huang MB, et al. High glucose down-regulates miR-29a to increase collagen IV production in HK-2 cells [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(4): 811–816.
- [16] Liu Y, Taylor NE, Lu L, et al. Renal medullary microRNAs in Dahl salt-sensitive rats: miR-29b regulates several collagens and related genes [J]. *Hypertension*, 2010, 55(4): 974–982.
- [17] Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(6): 1733–1743.
- [18] Burns WC, Thomas MC. The molecular mediators of type 2 epithelial to mesenchymal transition (EMT) and their role in renal pathophysiology [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2010, 12: e17.
- [19] Mongroo PS, Rustgi AK. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(3): 219–222.
- [20] Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, et al. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(20): 3112–3118.
- [21] Wang G, Kwan BC, Lai FM, et al. Expression of microRNAs in the urinary sediment of patients with IgA nephropathy [J]. *Dis Markers*, 2010, 28(2): 79–86.
- [22] Wang G, Kwan BC, Lai FM, et al. Intrarenal expression of miRNAs in patients with hypertensive nephrosclerosis [J]. *Am J Hypertens*, 2010, 23(1): 78–84.
- [23] Kong W, Yang H, He L, et al. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(22): 6773–6784.
- [24] Wang B, Herman-Edelstein M, Koh P, et al. E-cadherin expression is regulated by miR-192/215 by a mechanism that is independent of the profibrotic effects of transforming growth factor-beta [J]. *Diabetes*, 2010, 59(7): 1794–1802.
- [25] Krupa A, Jenkins R, Luo DD, et al. Loss of MicroRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(3): 438–447.
- [26] Oba S, Kumano S, Suzuki E, et al. miR-200b precursor can ameliorate renal tubulointerstitial fibrosis [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13614.
- [27] Kriegel AJ, Fang Y, Liu Y, et al. MicroRNA-target pairs in human renal epithelial cells treated with transforming growth factor beta 1: a novel role of miR-382 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(22): 8338–8347.
- [28] Kato M, Putta S, Wang M, et al. TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(7): 881–889.
- [29] Chung AC, Huang XR, Meng X, et al. miR-192 mediates TGF-beta/Smad3-driven renal fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(8): 1317–1325.
- [30] Wang B, Koh P, Winbanks C, et al. miR-200a Prevents renal fibrogenesis through repression of TGF-beta2 expression [J]. *Diabetes*, 2011, 60(1): 280–287.

[收稿日期] 2011-03-25

[本文编辑] 王淑平