

# miRNA、内质网应激在糖尿病肾病中的作用

赵雪, 范秋灵, 徐莉, 曹旭, 刘佳

中国医科大学附属第一临床学院肾内科, 辽宁 沈阳 110001

关键词: 微小 RNA; 糖尿病肾病; 内质网应激

中图分类号: R 587.2 R 692.5 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2016)03-0406-03

据国际糖尿病联盟最新的统计数据报告,2014 年全世界有 3.87 亿糖尿病患者,并预计在 2035 年将有 53% 的增长,其中中国占很大一部分<sup>[1]</sup>。研究发现,有 52.0% 的糖尿病患者至少患有一种慢性并发症,21.4% 的患者患有两种以上并发症<sup>[2]</sup>。而糖尿病肾病(DN)则是糖尿病最常见的微血管并发症,其中有近 40% 的糖尿病患者均伴有 DN<sup>[3]</sup>。

现有研究表明,糖脂代谢紊乱是引发和加剧糖尿病肾脏损害的主要因素,高血糖状态持续存在可产生糖基化终末产物(AGEs),上调蛋白激酶 C 和 TGF- $\beta$  的表达,继而影响细胞增殖、分化和凋亡等生理过程<sup>[4]</sup>。若早期控制血糖,将会延缓肾脏疾病的进程。其次,肾脏的血流动力学改变、遗传易感性、氧化应激反应、炎症反应和多种细胞因子的异常表达等也都被认为在 DN 的发生发展中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。综上所述这些因素,都会引起肾脏结构病理改变,发生肾小球基底膜增厚、系膜基质增宽、肾小球进一步硬化和肾间质纤维化等<sup>[6]</sup>,导致肾脏功能失调,发生 DN。虽然,近年来学者对糖尿病肾病的发病机制进行了大量的研究,但其具体发生机制仍不十分清楚,针对上述机制的药物只能延缓 DN 的进程,并不能逆转其改变,所以研究 DN 的发病机理及找出一种靶向治疗的方案仍然是现在所欠缺的,更多进一步的研究具有非常重要的意义。

微小 RNA(micro RNA)是一类长约 21-25nt 的小分子非编码 RNA,主要通过与其靶 mRNA 的 3' 非翻译区结合,来抑制靶基因的翻译或降解靶基因,参与细胞增殖、凋亡、免疫、神经内分泌以及干细胞分化等生命过程。越来越多的证据表明,miRNA 在调控糖尿病肾病的发生发展中起着重要的作用。本文就 micro RNA、内质网应激参与 DN 发病最近的研究进行综述,并对其作为新的治疗靶点的应用前景进行展望。

## 1 内质网应激简介

内质网(endoplasmic reticulum)是真核细胞内蛋白、糖类代谢及脂类合成、修饰的重要场所。内质网非常敏感,当各种刺激因素如必需营养物质缺乏、缺血缺氧、感染、氧化应激等造成内质网稳态失衡时,内质网合成蛋白速度降低,内质网内大

量的未折叠或错误折叠蛋白蓄积及钙平衡紊乱状态,就会发生内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)反应<sup>[7]</sup>。适度的 ERS 反应对细胞具有保护作用,有利于维护内环境的稳定和恢复。而严重持久的 ERS 则会对细胞产生各种各样的损伤,最终会导致细胞发生凋亡。

ERS 有一系列的复杂过程,目前研究表明有三条通路参与该过程,分别是未折叠蛋白反应(UPR),内质网超负荷反应(EOR)和固醇级联反应。其中比较清楚的通路是未折叠蛋白反应,UPR 是由分子伴侣葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)/免疫球蛋白结合蛋白(BIP)及三种内质网跨膜蛋白所介导的,GRP78 是一种葡萄糖调节性蛋白质,参与糖基化修饰,蛋白折叠<sup>[8]</sup>。ERS 发生时,GRP78 与跨膜蛋白双链 RNA 依赖的蛋白激酶样内质网激酶(PERK)、活化转录因子 6(ATF6)和肌醇需酶 1(IRE1)解离激活,分别启动下游信号通路 PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4、ATF6/XBP1、IRE1/XBP1,促进蛋白的折叠<sup>[9]</sup>,然而在外源应激持续存在下,ERS 通过上述三条通路诱导促凋亡的 UPR 途径,进而激活促凋亡转录因子 CHOP/GADD153、caspase-12、JNK 等的转录活性,增强促细胞凋亡因子的表达。GADD153/CHOP 属于 C/EBP 家族,是特有转录因子,可诱导细胞凋亡或细胞周期停滞<sup>[10]</sup>。发生 ERS 时 GRP78 及 CHOP 表达明显上调,是 ERS 的标志性蛋白,标记 ERS 的发生。另外还有 JNK 及 caspase 凋亡途径,最终细胞凋亡不可避免。

## 2 ERS 与 DN

越来越多的研究表明,ERS 参与许多疾病的进程,如糖尿病中过度的 ERS 可介导  $\beta$  细胞的凋亡及进行性丢失<sup>[11]</sup>,而新近研究也发现 ERS 参与了 DN 的发病过程<sup>[12]</sup>。有研究表明,体外高糖培养足细胞中 ERS 标志蛋白 GRP78、chop 及 caspase12 表达均较正常组显著上调,且与凋亡相关<sup>[13]</sup>。Fukami 等<sup>[14]</sup>的实验也证明,AGEs 能引起足细胞 GRP78 表达上调,然后经一系列反应激活 ERS,最后导致细胞发生凋亡。有理由相信,高糖条件下足细胞发生 ERS 反应,激活 UPR,UPR 起初是维持内质网稳定的,但这个过程非常短暂,便进入促凋亡的 UPR 反应,诱导肾脏固有细胞如足细胞发生凋亡,而足细胞为终末分化上皮细胞,不能再生<sup>[15]</sup>。Hayakawa 等<sup>[16]</sup>证明系膜细胞中也存在 ERS,且其部分通过 PERK 和 IRE1 途径介导的 C/EBP $\beta$  来下调 NF- $\kappa$ B 调控细胞功能。体内实验也有同样的发现,Lindenmeyer 等<sup>[17]</sup>发现 DN 患者的肾活检组织中 HSPA5、HYOU1 和 XBP1 表达水平较对照组显著上调,且

与病变程度密切相关。Inagi 等<sup>[18]</sup>认为大量蛋白尿会加重肾小管负担,激活 ERS,并参与 DN 中小管间质性炎症的发生。

**2.1 micro RNA 的发现与作用机制** micro RNA 是一类小分子非编码 RNA,长度约为 21~25 个核苷酸(nt),由长约 70 nt 的可形成茎环的前体加工而得到。micro RNA 主要通过靶标 mRNA 的 3'非翻译区结合,来抑制靶基因的翻译或者降解靶基因<sup>[19]</sup>。新近研究也表明,micro RNA 可以与 5'非编码区结合抑制靶基因翻译<sup>[20]</sup>。最早发现的 micro RNA 是 let-7<sup>[21]</sup>和 lin-4<sup>[22]</sup>,在线虫中被发现的。micro RNA 广泛存在于真核生物中,进化上高度保守,表达上有严格的时空性和组织特异性。参与复杂的基因调控,决定发育和生长等生命过程的变化。

现有研究已表明,micro RNA 在许多疾病的发生发展中都发挥着重要的作用。Joshua Mendell 利用体内导入方法证明了抑癌分子 micro RNA-26 可以抑制原发性肝癌的产生<sup>[23]</sup>。而 micro RNA-29 通过 Smad3 依赖途径参与心肌纤维化的过程,血管紧张素 II 可以调控该过程<sup>[24]</sup>。

**2.2 micro RNA 与 DN** 越来越多的研究表明,micro RNA 也同样参与了 DN 的发生。DN 状态下上调的 micro RNA 主要有 miR-192、miR-216a、miR-217、miR-200b/c、miR-21、miR-377、miR-195、miR-215、miR-124、miR-29c、miR-1207-5p、miR-135a<sup>[25]</sup>、miR-26a 等。其中,miR-192<sup>[26]</sup>、miR-216a/217<sup>[27]</sup>、miR-21<sup>[28]</sup>等均通过直接或间接与 TGF- $\beta$  相互作用,参与肾脏组织中细胞外基质(extracellular matrix,ECM)增生、堆积,上调 FN 及肾脏纤维化等 DN 相关发病过程;miR-135a 则是通过调控 TRPC1 参与 DN 中的肾脏纤维化<sup>[29]</sup>;miR-195 通过调控 BCL-2 在足细胞及系膜细胞 caspase 介导的凋亡中发挥重要作用<sup>[30-31]</sup>;miR-26a 可以激活 mTORC1 促进系膜细胞肥大及相关蛋白纤连蛋白和 I 型胶原的表达<sup>[32]</sup>等。下调的 miRNA 主要有 miR-200a、miR-29a/b/c、miR-451、miR-93 等。其中, DN 中 miR-200a 可以抑制 TGF- $\beta$  介导的 EMT 和肾脏的纤维化<sup>[33]</sup>;DN 状态下 miR-451 通过调控 p38 MAPK 信号通路抑制系膜过度肥大<sup>[34]</sup>;miR-93 则是靶向 VEGF 发挥保护作用的等<sup>[35]</sup>。

可见,micro RNA 广泛参与了 DN 的发生发展的各个过程中,但其具体作用机制尚不十分清楚,需进一步探索,micro RNA 有望成为未来治疗 DN 的新靶点,为临床诊疗提供一个新的思路,开辟一条新的道路。

**2.3 microRNA 与 ERS** micro RNA 在细胞的生命过程中发挥重要作用。而细胞受到刺激时会发生 ERS,诱导细胞损伤,导致其功能失调。那么 micro RNA 是否也可以通过调控细胞内 ERS 发挥作用。不同组织中分别有报道:人肝细胞癌中 miR-15b-5p 就可以通过抑制 Rab1A 诱导肝细胞发生 ERS 反应并凋亡<sup>[36]</sup>。人眼小梁网细胞中 miR-204 可以显著下调衣霉素诱导的 ERS 标志物(GRP94,GRP78/BIP 和 CHOP/DDIT)的表达<sup>[37]</sup>。人脐静脉内皮细胞和冠状动脉内皮细胞中 miR-663 可以调控 UPR 的分支 ATF4 mRNA 的表达,且沉默 miR-663 可观察到 ATF4 显著下调<sup>[38]</sup>。人胚肾细胞(HEK293T)中 miR-23a~27a~24-2 簇参与多种生命过程,其中就包括 ERS,该

细胞中 miR-23a~27a~24-2 表达上调,诱导产生活性氧(reactive oxygen species,ROS),影响内质网稳态,激活 PERK 和 IRE1/ASK1/JNK,同时影响内质网  $Ca^{2+}$  的释放,通过 caspase 依赖或不依赖途径诱导细胞发生凋亡<sup>[39-41]</sup>。由此可见 micro RNA 广泛参与了 ERS 反应的每个阶段,而研究他们之间的具体作用机制则对我们的临床工作也有一定的指导意义。

### 3 展 望

micro RNA 是近年新发现的小分子非编码 RNA,较短的时间内,对其进行了深入研究,micro RNA 广泛参与各种疾病,尤其是参与肿瘤发病的重要过程。但 micro RNA 在 DN 中的具体作用目前尚不十分清楚。DN 中 micro RNA 的具体作用机制,其与靶基因 micro RNA 如何相互作用,各种 micro RNA 之间是否也具有相互调控关系,以及如何能将研究得到的有意义的发病相关 micro RNA 分离出来,并于临床工作中将其应用于靶向治疗,仍需更为深入的研究。而一些新兴技术的发展,如基因芯片和生物信息学等,将有助于我们对差异表达 micro RNA 的进一步筛选及其功能验证、靶基因的预测,以及靶向药物的研制。这会为我们治疗 DN 提供一条全新的思路,有望对 DN 的发病有更深层次的了解。

### 参考文献

- [1] International Diabetes Federation. The Diabetes Atlas 2014. 6th edn. Available from: [http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014\\_EN.pdf](http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_EN.pdf).
- [2] Liu Z, Fu C, Wang W, et al. Prevalence of chronic complications of type 2 diabetes mellitus in outpatients—a cross-sectional hospital based survey in urban China[J]. Health Qual Life Outcomes, 2010, 8:62.
- [3] 李淑梅. 糖尿病肾病的治疗研究进展[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2011, 14(7):1099-1101.
- [4] Shahbazian H, Rezaei I. Diabetic kidney disease; review of the current knowledge[J]. J Renal Inj Prev, 2013, 2(2):73-80.
- [5] Reidy K, Kang HM, Hostetter T, et al. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease[J]. J Clin Invest, 2014, 124(6):2333-2340.
- [6] Singh VP, Bali A, Singh N, et al. Advanced glycation end products and diabetic complications[J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2014, 18(1):1-14.
- [7] Bravo R, Parra V, Gatica D, et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2013, 301:215-290.
- [8] Pfaffenbach KT, Lee AS. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress[J]. Curr Opin Cell Biol, 2011, 23(2):150-156.
- [9] Lin JH, Walter P, Yen TS. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis[J]. Annu Rev Pathol, 2008, 3:399-425.
- [10] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/UADD153 in endoplasmic reticulum stress[J]. Cell Death Differ, 2004, 11(4):381-389.
- [11] Zhu M, Guo M, Fei L, et al. 4-phenylbutyric acid attenuates endoplasmic reticulum stress mediated pancreatic  $\beta$ -cell apoptosis in rats with streptozotocin induced diabetes[J]. Endocrine, 2014, 47(1):

129 – 137.

- [12] Cunard R, Sharma K. The endoplasmic reticulum stress response and diabetic kidney disease [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 300 (5): F1054 – F1061.
- [13] Cao Y, Hao Y, Li H, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in apoptosis of differentiated mouse podocytes induced by high glucose [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(4): 809 – 816.
- [14] Fukami K, Yamagishi S, Ueda S, et al. Role of AGEs in diabetic Nephropathy [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(10): 946 – 952.
- [15] Cao Y, Hao Y, Li H, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in apoptosis of differentiated mouse podocytes induced by high glucose [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(4): 809 – 816.
- [16] Hayakawa K, Nakajima S, Hiramatsu N, et al. ER stress depresses NF-kappaB activation in mesangial cells through preferential induction of C/EBP beta [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(1): 73 – 81.
- [17] Lindenmeyer MT, Rastaldi MP, Ikehata M, et al. Proteinuria and hyperglycemia induce endoplasmic reticulum stress [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(11): 2225 – 2236.
- [18] Inagi R, Nangaku M, Onogi H, et al. Involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in podocyte injury induced by excessive protein accumulation [J]. *Kidney Int*, 2005, 68(6): 2639 – 2650.
- [19] Zhang B, Stellwag EJ, Pan X. Large-scale genome analysis reveals unique features of microRNAs [J]. *Gene*, 2009, 443(1/2): 100 – 109.
- [20] Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(23): 9667 – 9672.
- [21] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 901 – 906.
- [22] 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.
- [23] Kota J, Chivukula RR, O' Dannell KA, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1005 – 1017.
- [24] Zhang Y, Huang XR, Wei LH, et al. miR-29b as a therapeutic agent for angiotensin II-induced cardiac fibrosis by targeting TGF- $\beta$ /Smad3 signaling [J]. *Mol Ther*, 2014, 22(5): 974 – 985.
- [25] Wu H, Kong L, Zhou S, et al. The role of microRNAs in diabetic nephropathy [J]. *J Diabetes Res*, 2014, 2014: 920134.
- [26] Putta S, Lanting L, Sun G, et al. Inhibiting MicroRNA-192 ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(3): 458 – 469.
- [27] 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.
- [28] Dey N, Das F, Mariappan MM, et al. MicroRNA-21 orchestrates high glucose-induced signals to TOR complex 1, resulting in renal cell pathology in diabetes [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(29): 25586 – 25603.
- [29] He F, Peng F, Xia X, et al. MiR-135a promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by regulating TRPC1 [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(8): 1726 – 1736.
- [30] Chen YQ, Wang XX, Yao XM, et al. MicroRNA-195 promotes apoptosis in mouse podocytes via enhanced caspase activity driven by BCL2 insufficiency [J]. *Am J Nephrol*, 2011, 34(6): 549 – 559.
- [31] Chen YQ, Wang XX, Yao XM, et al. Abated microRNA-195 expression protected mesangial cells from apoptosis in early diabetic renal injury in mice [J]. *J Nephrol*, 2012, 25(4): 566 – 576.
- [32] Dey N, Bera A, Das F, et al. High glucose enhances microRNA-26a to activate mTORC1 for mesangial cell hypertrophy and matrix protein [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(7): 1276 – 1285.
- [33] Wang B, Koh P, Winbanks C, et al. miR-200a Prevents renal fibrogenesis through repression of TGF- $\beta$ 2 expression [J]. *Diabetes*, 2011, 60(1): 280 – 287.
- [34] Zhang Z, Luo X, Ding S, et al. MicroRNA-451 regulates p38 MAPK signaling by targeting of Ywhaz and suppresses the mesangial hypertrophy in early diabetic nephropathy [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(1): 20 – 26.
- [35] Long J, Wang Y, Wang W, et al. Identification of microRNA-93 as a novel regulator of vascular endothelial growth factor in hyperglycemic conditions [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(30): 23457 – 23465.
- [36] Yang Y, Hou N, Wang X, et al. miR-15b-5p induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human hepatocellular carcinoma, both in vitro and in vivo, by suppressing Rab1A [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(18): 16227 – 16238.
- [37] Li G, Luna C, Qiu J, et al. Role of miR-204 in the regulation of apoptosis, endoplasmic reticulum stress response, and inflammation in human trabecular meshwork cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(6): 2999 – 3007.
- [38] Afonyushkin T, Oskolkova OV, Bochkov VN. Permissive role of mir-663 in induction of VEGF and activation of the ATF4 branch of unfolded protein response in endothelial cells by oxidized phospholipids [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 225(1): 50 – 55.
- [39] Chhabra R, Dubey R, Saini N. Gene expression profiling indicate role of ER stress in mir-23a ~ 27a ~ 24-2 cluster induced apoptosis in HEK293T cells [J]. *RNA Biol*, 2011, 8(4): 648 – 664.
- [40] Chhabra R, Dubey R, Saini N. Cooperative and individualistic functions of the microRNAs in the mir-23a ~ 27a ~ 24-2 cluster and its implication in human diseases [J]. *Mol Cancer*, 2010, 9: 232.
- [41] Chhabra R, Adlakha YK, Hariharan M, et al. Upregulation of mir-23a-27a-24-2 cluster induces caspase-dependent and -independent apoptosis in human embryonic kidney cells [J]. *PLoS One*, 2009, 4(6): e5848.

收稿日期: 2015 – 10 – 11 编辑: 王国品