

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.04.001  
文章编号: 1005-8982(2019)04-0001-08

基础研究·论著

## 霉酚酸酯对阿霉素肾病大鼠的保护作用及其机制研究\*

王兴<sup>1</sup>, 白明辉<sup>1</sup>, 季佳<sup>2</sup>, 邹艳红<sup>3</sup>, 杨菲<sup>1</sup>, 邓李玲<sup>1</sup>,  
范琳博<sup>1</sup>, 刘瑶<sup>1</sup>, 邱迪<sup>1</sup>, 刘秋红<sup>1</sup>

(1. 齐齐哈尔医学院附属第三医院 儿科, 黑龙江 齐齐哈尔 161000; 2. 齐齐哈尔医学院附属第三医院 口腔科, 黑龙江 齐齐哈尔 161000; 3. 佳木斯大学附属第一医院 儿科, 黑龙江 佳木斯 154002)

**摘要: 目的** 探讨霉酚酸酯(MMF)对阿霉素肾病(ADN)大鼠足细胞的保护作用, 以及对肾组织 microRNAs(miRNAs)表达的影响。**方法** 将60只SD大鼠随机分为空白对照组(CTL组)、ADN模型组(ADN组)和MMF干预组(MMF组), ADN组和MMF组大鼠一次性尾静脉注射阿霉素6.5 mg/kg, 7 d后开始灌胃给药。28 d后处死所有受试大鼠, 检测24 h尿蛋白量、血尿素氮(BUN)、血清肌酐(Scr)水平, 以及肾组织病理学变化和足细胞凋亡情况; 并借助基因芯片技术, 分析肾组织miRNAs表达的差异性; 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测肾组织miR-23a、miR-300-3p、miR-24和miR-300-3c的表达。**结果** 3组大鼠不同时间点体重、尿蛋白含量比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与CTL组大鼠比较, ADN组大鼠体重减轻( $P < 0.05$ ), 肾组织损伤明显( $P < 0.05$ ), 尿蛋白、BUN、Scr水平升高( $P < 0.05$ ), 足细胞凋亡率较高( $P < 0.05$ ); 而MMF对ADN组大鼠上述变化有改善作用, 但是与CTL组大鼠比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。经基因芯片筛查和qRT-PCR反应, ADN组大鼠肾组织mo-miR-23a和mo-miR-300-3p表达较CTL组上调( $P < 0.05$ ), mo-miR-24、mo-miR-300-3c表达下调( $P < 0.05$ ); 而MMF组大鼠肾组织中mo-miR-24、mo-miR-300-3c表达较ADN组上调( $P < 0.05$ ), mo-miR-23a和mo-miR-300-3p表达下调( $P < 0.05$ )。**结论** MMF具有抑制ADN大鼠肾组织足细胞损伤和蛋白尿生成的作用, 其机制可能是对19号和6号染色体部分miRNAs有干预作用。

**关键词:** 肾病; 阿霉素/多柔比星; 霉酚酸酯/酯类; 大鼠; 足细胞; microRNAs

**中图分类号:** R692

**文献标识码:** A

## Protection and mechanism of mycophenolate mofetil on podocyte injury of adriamycin nephropathy rats\*

Xing Wang<sup>1</sup>, Ming-hui Bai<sup>1</sup>, Jia Ji<sup>2</sup>, Yan-hong Zou<sup>3</sup>, Fei Yang<sup>1</sup>, Li-ling Deng<sup>1</sup>,  
Lin-bo Fan<sup>1</sup>, Yao Liu<sup>1</sup>, Di Qiu<sup>1</sup>, Qiu-hong Liu<sup>1</sup>

(1. Department of Paediatrics, the Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar, Heilongjiang Province 161000, China; 2. Department of Stomatology, the Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical School, Heilongjiang Province 161000, China; 3. Department of Paediatrics, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi Heilongjiang province 154002, China)

**Abstract: Objective** To discuss the protection role of mycophenolate mofetil (MMF) on podocyte injury of adriamycin nephropathy (ADN) rats and the effect on expression of miRNAs in renal tissue. **Methods** Totally 60 healthy male SD rats were randomly divided into CTL group, ADN group and MMF group. SD rats in ADN group

收稿日期: 2018-08-17

\* 基金项目: 黑龙江省教育厅项目基本科研业务费基础研究项目(No: 2016-KYYMF-0606)

[通信作者] 邹艳红, E-mail: wzry0625@163.com; Tel: 15694548416

and MMF group were injected adriamycin (6.5mg/kg) for building ADN models. After 7d, MMF was administrated orally once a day. The levels of 24-hour urinary protein quantity, blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr) were measured after 28d. Histopathological changes in renal tissue were graded through H&E, PAS and Masson staining. The differences and expression levels of miRNAs (including miRNAs-23a, miRNAs-300-3p, miRNAs-24 and miRNAs-300-3c) in kidney were measured by a biochip assay and qRT-PCR. **Results** The weight loss of animals ( $P < 0.05$ ), the degree of kidney tissue injury ( $P < 0.05$ ), the apoptosis rate of podocyte ( $P < 0.05$ ) and the levels of BUN, Scr and urinary protein quantity ( $P < 0.05$ ) in ADN group were higher than those in CTL group, which were attenuated with treatment of MMF ( $P < 0.05$ ). The expression of rno-miR-23a and rno-miR-300-3p in ADN group was higher than those in CTL group, and the expression of rno-miR-24, rno-miR-300-3c was lower ( $P < 0.05$ ). And the expression of rno-miR-24 and rno-miR-300-3c in MMF group was higher than those in ADN group, and the expression of rno-miR-23a, rno-miR-300-3p was lower ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** There are significant evidences that mycophenolate mofetil would attenuate podocyte damage in rats with adriamycin nephropathy by regulating miRNAs on chromosome 6 and 19.

**Keywords:** kidney diseases; adriamycin/doxorubicin; mycophenolate mofetil/esters; rats; sertoli cells; microRNAs

霉酚酸酯 (mycophenolatemofetil, MMF) 是临床上治疗肾病综合征 (nephrotic syndrome, NS) 的常用药物<sup>[1-3]</sup>。大量研究证实, 足细胞不可逆损伤是 NS 患者出现蛋白尿的主要机制之一, 因此修复和保护足细胞是阻止肾功能恶化的主要策略<sup>[4]</sup>。microRNAs (miRNAs) 在多种肾疾病发生、发展过程中扮演重要角色<sup>[5]</sup>。寻找 MMF 靶向调控的 miRNAs 分子对明确 MMF 的作用机制具有重要临床意义。笔者首先采用基因芯片技术, 筛选与 NS 密切相关的 miRNAs 作为候选标志物, 并通过探讨 MMF 对阿霉素肾病 (adriamycin nephropathy, ADN) 大鼠模型足细胞的保护作用, 以及对肾组织 miRNAs 的影响, 阐明 MMF 的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

60 只 6 ~ 8 周龄成年健康 SPF 级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠购自广州医药研究总院有限公司, 动物许可证号: SYXK (粤) 2013-0003。体重 180 ~ 220 g, 平均(192.46 ± 6.13)g。将大鼠分笼饲养, 3 或 4 只/笼, 喂以标准饲料及消毒的自来水, 自由活动与进食、进水, 保证动物房内安静、清洁、通风, 温度控制在 (22 ± 1) °C。

### 1.2 受试药物与主要试剂

注射用盐酸多柔比星 (阿霉素) (浙江海正药业股份有限公司), MMF (上海罗氏制药有限公司), PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成并提供, miRelute miRNA 提取分离试剂盒、RT Reagent Kit、cDNA 合成试剂盒、SYBR 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction,

qRT-PCR) 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, 组织蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、DAB 显色试剂盒、TUNEL 染色试剂盒购自北京天根科技生化有限公司, Trizol (美国 Invitrogen 公司), DEPC (美国 Sigma 公司), 兔抗鼠 Nephlin 单克隆抗体、ZO-1 兔抗鼠多克隆抗体、Podoplanin 兔抗鼠多克隆抗体购自美国 Abcam 公司, 辣根过氧化物酶标记二抗 (北京中杉金桥生物科技有限公司)。

### 1.3 主要仪器

Eppendorf 5427 R 台式高速冷冻离心机、各种型号的移液器购自德国 Eppendorf 公司, CFX-96-C1000 qRT-PCR 仪、miRNA PCR Array Data Analysis Software、iMake 多功能酶标仪、SDS-PAGE 电泳仪及电转膜仪购自美国 Bio Rad 公司, CX41 倒置光学显微镜 (日本 Olympus 公司), AUW120 电子分析天平 (日本岛津公司), Amersham 电泳仪 (瑞典 Bioscience 公司), LAS-4000 min 凝胶成像数码分析系统 (日本 FUJIFILM 公司)。

### 1.4 动物模型的复制与分组

经过为期 1 周的适应性饲养后, 称量并记录大鼠体重, 按照随机数字表法, 将 60 只 SD 大鼠随机分为空白对照组 (CTL 组)、ADN 模型组 (ADN 组) 和 MMF 干预组 (MMF 组), 每组 20 只。ADN 组和 MMF 组大鼠都属于 ADN 模型, 笔者按照参考文献 [6] 的方法, 一次性尾静脉注射 6.5 mg/kg 阿霉素溶液 (0.2%) 复制 ADN 模型; 而 CTL 组大鼠以同样的方式注射生理盐水作为对照。1 周后收集大鼠 24 h 尿液, 测定 24 h 尿蛋白量, 尿蛋白 >30 mg/24 h 则表示模型复制成功。最终, ADN 组和 MMF 组分别有 18 和 19 只大鼠模型复制成功, 用于后续实验。

## 1.5 药物干预

每日观察受试大鼠进食、排便、活动、精神状况等,称重1次/d。根据动物体重计算当日给药量。CTL组和ADN组:每天灌胃无菌生理盐水,1 ml/100 g,1次/d,连续给药28 d。MMF组:每天灌胃1% MMF溶液,20 mg/kg,1次/d,连续给药28 d。

## 1.6 标本采集与检测

**1.6.1 肾功能** 给药第0、7、14、21和28天时,用代谢笼采集大鼠24 h尿液,检测尿蛋白。实验结束时,经尾静脉采集外周血3 ml,置于枸橼酸钠真空采集管中,检测各组大鼠血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血清肌酐(serum creatinine, Scr)水平。

**1.6.2 肾组织病理学检查** 待实验结束时,将大鼠颈椎脱臼处死,取出肾组织,用10%甲醛固定,包埋成蜡块。脱蜡水化后,用石蜡切片机切片,厚约2  $\mu$ m,置于载玻片上。烘干48 h后,进行HE、PAS或Masson染色,观察肾组织病理学变化。

**1.6.3 大鼠肾脏细胞凋亡情况** 按照TUNEL染色试剂盒说明书进行操作,置于光学倒置显微镜下观察肾脏组织细胞凋亡情况。

**1.6.4 大鼠肾组织 miRNAs 芯片分析** 取大鼠肾组织提取总RNA:取100 mg组织样本置于EP管中,加入MZ裂解液,按照miRelute miRNA提取分离试剂盒说明书步骤进行操作;采用凝胶电泳检测RNA分子量,分光光度计检测RNA浓度。测定浓度和纯度后进行miRNAs芯片分析,后续操作委托上海康成生物工程有限公司完成。

**1.6.5 肾组织 miRNAs** ①提取肾组织总RNA:实验方法同1.6.4。②RNA逆转录:根据逆转录试剂盒说明书操作进行。将cDNA保存至-20℃备用。③qRT-PCR:按照三步法进行PCR扩增。以组织cDNA为模板,以 $\beta$ -actin为内参,将20  $\mu$ l反应体系置于37℃恒温水浴60 min,85℃、5 s,加入去离子水至100  $\mu$ l,各反应孔取2  $\mu$ l进行PCR。冰浴中配

制20  $\mu$ l PCR反应体系,反应条件:95℃预变性30 s,95℃变性5 s,60℃退火30 s,共45个循环。根据NCBI数据库获得的资料设计引物,引物由上海生工生物工程有限公司合成并提供。PCR结果判断:根据使用说明调整基线,将阈值设定在荧光值对数图的线性部分,从软件中读取Ct值。

## 1.7 统计学方法

数据分析采用SPSS 17.0统计学软件。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析,两两比较用LSD-*t*检验,方差不齐则采用Kruskal-Wallis非参数检验。采用Pearson相关性分析miRNAs与尿蛋白的相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠一般情况及体重变化

实验过程中,CTL组大鼠饮食和活动正常;ADN组大鼠出现食欲减退、水肿、脱毛等情况,甚至有2只大鼠出现明显的腹水;与CTL组大鼠相比,MMF组大鼠虽然也存在食欲减退、生长迟缓的情况,但是较ADN组大鼠轻。比较3组大鼠给药后0、7、14、21和28 d的体重变化,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的大鼠体重比较,差异有统计学意义( $F = 243.451, P = 0.000$ );②3组大鼠体重比较,差异有统计学意义( $F = 28.752, P = 0.000$ );③3组大鼠体重变化趋势比较,差异有统计学意义( $F = 11.594, P = 0.000$ )。进一步两两比较经LSD-*t*检验,自给药7 d起,ADN组和MMF组大鼠体重低于CTL组大鼠( $P < 0.05$ );同时MMF组大鼠平均体重高于ADN组( $P < 0.05$ )。见表1和图1。

### 2.2 各组大鼠尿蛋白的变化

3组大鼠尿蛋白含量比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点尿蛋白含量比较,差

表1 各组大鼠不同时间点的体重比较 (g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	给药后0 d	给药后7 d	给药后14 d	给药后21 d	给药后28 d
CTL组	20	224.01 $\pm$ 5.21	237.30 $\pm$ 8.16	250.30 $\pm$ 9.40	265.61 $\pm$ 9.17	285.05 $\pm$ 12.81
ADN组	18	210.39 $\pm$ 6.23	219.00 $\pm$ 10.46 <sup>1)</sup>	228.67 $\pm$ 15.49 <sup>1)</sup>	234.06 $\pm$ 23.29 <sup>1)</sup>	237.78 $\pm$ 28.85 <sup>1)</sup>
MMF组	19	212.42 $\pm$ 6.61	223.42 $\pm$ 10.25 <sup>1)2)</sup>	234.37 $\pm$ 12.25 <sup>1)2)</sup>	245.21 $\pm$ 18.08 <sup>1)2)</sup>	263.32 $\pm$ 22.34 <sup>1)2)</sup>

注:1)与CTL组比较, $P < 0.05$ ;2)与ADN组比较, $P < 0.05$

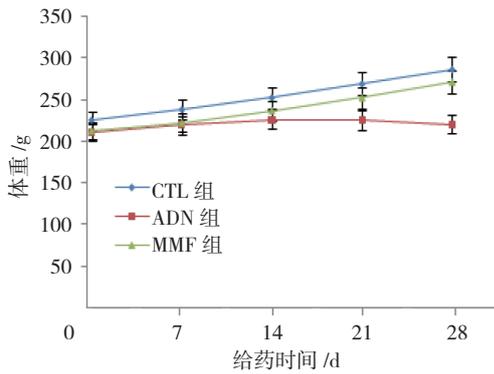


图 1 各组大鼠体重变化趋势 ( $\bar{x} \pm s$ )

异有统计学意义 ( $F = 735.62, P = 0.000$ ); ② 3 组大鼠尿蛋白含量比较, 差异有统计学意义 ( $F = 28.769, P = 0.000$ ); ③ 3 组大鼠的尿蛋白含量变化趋势比较, 差异有统计学意义 ( $F = 54.678, P = 0.000$ )。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 给药当天, ADN 组和 MMF 组大鼠尿蛋白含量高于 CTL 组 ( $P < 0.05$ ); ADN 组和 MMF 组大鼠尿蛋白含量比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 但是自给药 7 d 后, 虽然 MMF 组大鼠尿蛋白含量仍然高于 CTL 组, 但是低于 ADN 组 ( $P < 0.05$ )。见表 2 和图 2。

表 2 各组大鼠不同时间点的尿蛋白比较 (mg/24 h,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	给药后 0 d	给药后 7 d	给药后 14 d	给药后 21 d	给药后 28 d
CTL 组	20	18.85 ± 5.69	19.47 ± 5.22	17.13 ± 6.91	17.45 ± 7.47	18.26 ± 6.29
ADN 组	18	40.13 ± 11.08 <sup>1)</sup>	95.87 ± 23.71 <sup>1)</sup>	142.39 ± 45.46 <sup>1)</sup>	229.35 ± 76.15 <sup>1)</sup>	240.11 ± 106.02 <sup>1)</sup>
MMF 组	19	40.72 ± 9.34 <sup>1)</sup>	51.56 ± 16.42 <sup>1)2)</sup>	58.96 ± 15.65 <sup>1)2)</sup>	61.71 ± 16.23 <sup>1)2)</sup>	60.78 ± 19.87 <sup>1)2)</sup>

注: 1) 与 CTL 组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 ADN 组比较,  $P < 0.05$

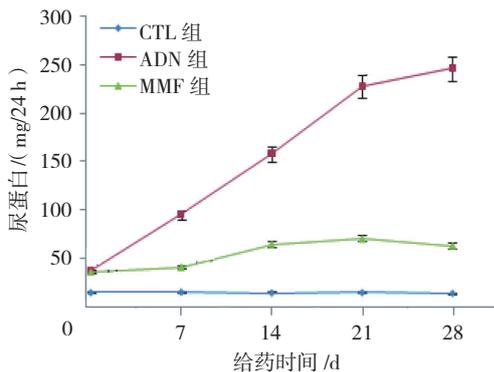


图 2 各组大鼠尿蛋白变化趋势 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 2.4 各组大鼠肾组织病理学变化

光镜下观察 CTL 组大鼠肾小球形态基本正常, 未见系膜增生, 上皮细胞足突清晰可见; 而 ADN 组大鼠肾小球肥大, 系膜细胞增生, 上皮细胞足突广泛融合, 毛细血管腔狭窄, 间质出现轻、中度纤维化; MMF 组大鼠肾小球变化较 ADN 组轻, 但是与 CTL 组比较, 仍可见明显差异。见图 3。

### 2.5 各组大鼠肾组织细胞凋亡情况

TUNEL 荧光染色定位于细胞核。CTL 组、ADN 组、MMF 组大鼠肾组织细胞凋亡率分别为 ( $3.56 \pm 1.32$ )%、( $31.75 \pm 6.44$ )% 和 ( $14.73 \pm 5.18$ )%, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 172.608, P = 0.000$ )。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, ADN 组大鼠肾组织细胞凋亡率高于 CTL 组 ( $P < 0.05$ ); MMF 组大鼠肾组织细胞凋亡率虽然高于 CTL 组 ( $P < 0.05$ ), 但是低于 ADN 组 ( $P < 0.05$ )。见图 4、5。

### 2.6 各组大鼠肾组织 miRNAs 芯片分析结果

采用 GenePix Pro 6.0 读取芯片扫描结果, 提取探针信号值, 将相同的探针值中值合并, 对芯片结果进行中值标准化, 筛选差异表达的 miRNAs (Fold > 1.5 且  $P < 0.05$ )。各组芯片之间信号强度相关性分析: CTL 组与 ADN 组的相关系数为 0.715, ADN 组与 MMF 组的相关系数为 0.632, CTL 组与 MMF 组的相关系数为 0.979。与 CTL 组相比, ADN 组主要有 19 个 miRNAs 表达上调, 23 个 miRNAs 表达下调。与 ADN 组相比,

### 2.3 各组大鼠生化指标比较

实验结束时, 3 组大鼠外周血 BUN 和 Scr 水平比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, ADN 组、MMF 组大鼠血清 BUN 和 Scr 含量高于 CTL 组 ( $P < 0.05$ ); 与 ADN 组比较, MMF 组大鼠血清 BUN 和 Scr 含量降低 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 各组大鼠生化指标比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	BUN/ (mmol/L)	Scr/ (μmol/L)
CTL 组	20	7.59 ± 0.74	29.75 ± 2.56
ADN 组	18	18.12 ± 0.83 <sup>1)</sup>	62.53 ± 2.98 <sup>1)</sup>
MMF 组	19	14.65 ± 0.79 <sup>1)2)</sup>	38.27 ± 2.61 <sup>1)2)</sup>
F 值		894.48	732.59
P 值		0.000	0.000

注: 1) 与 CTL 组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 ADN 组比较,  $P < 0.05$

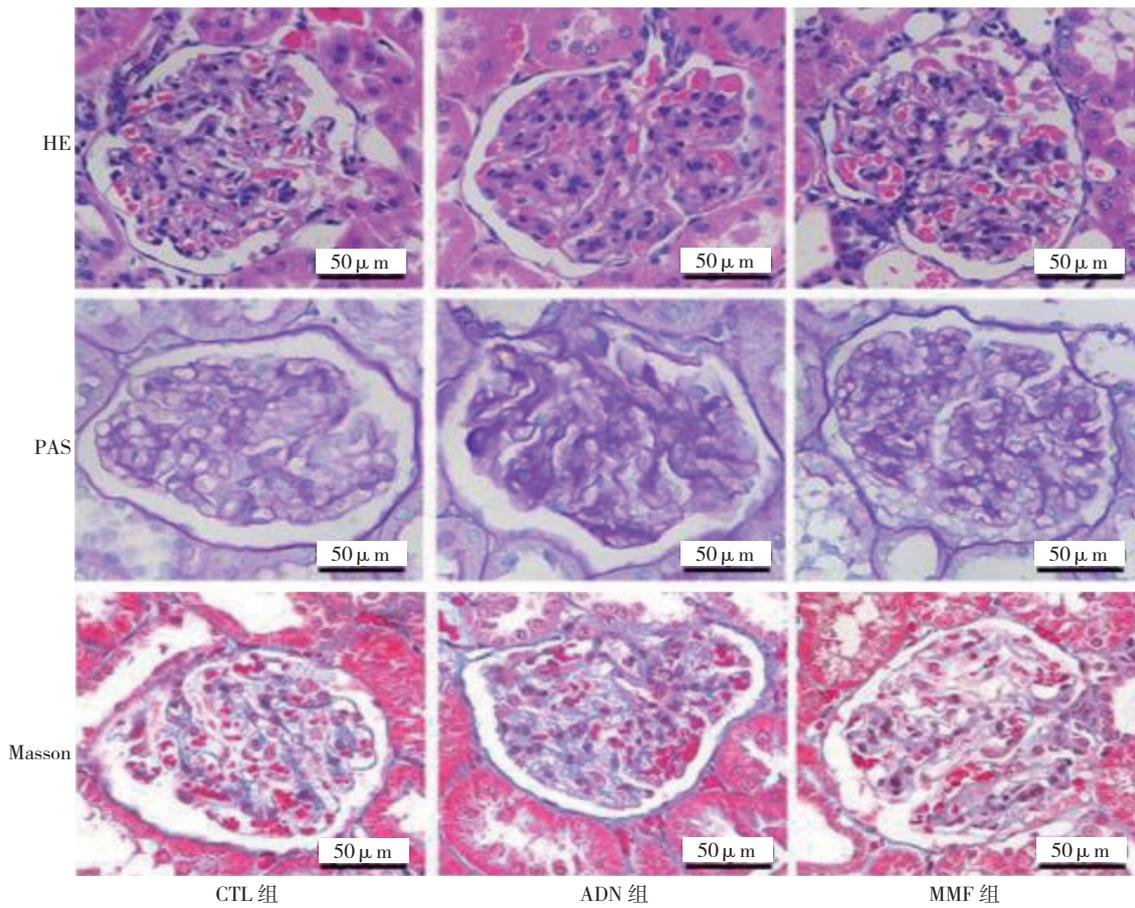


图 3 各组大鼠肾组织病理学变化

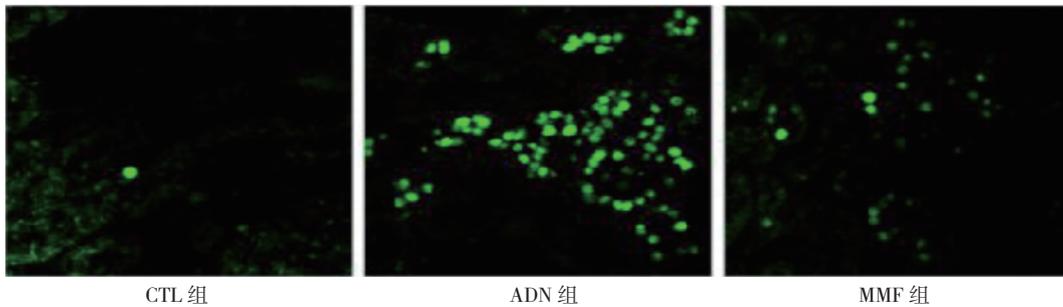
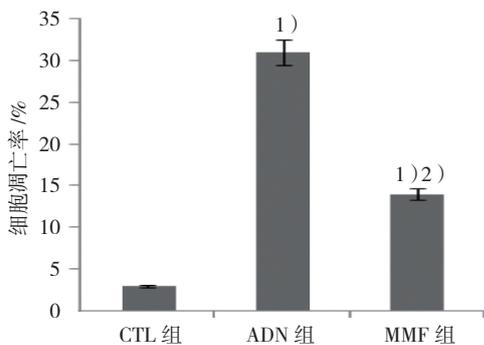


图 4 各组大鼠肾组织细胞凋亡情况 (TUNEL × 400)

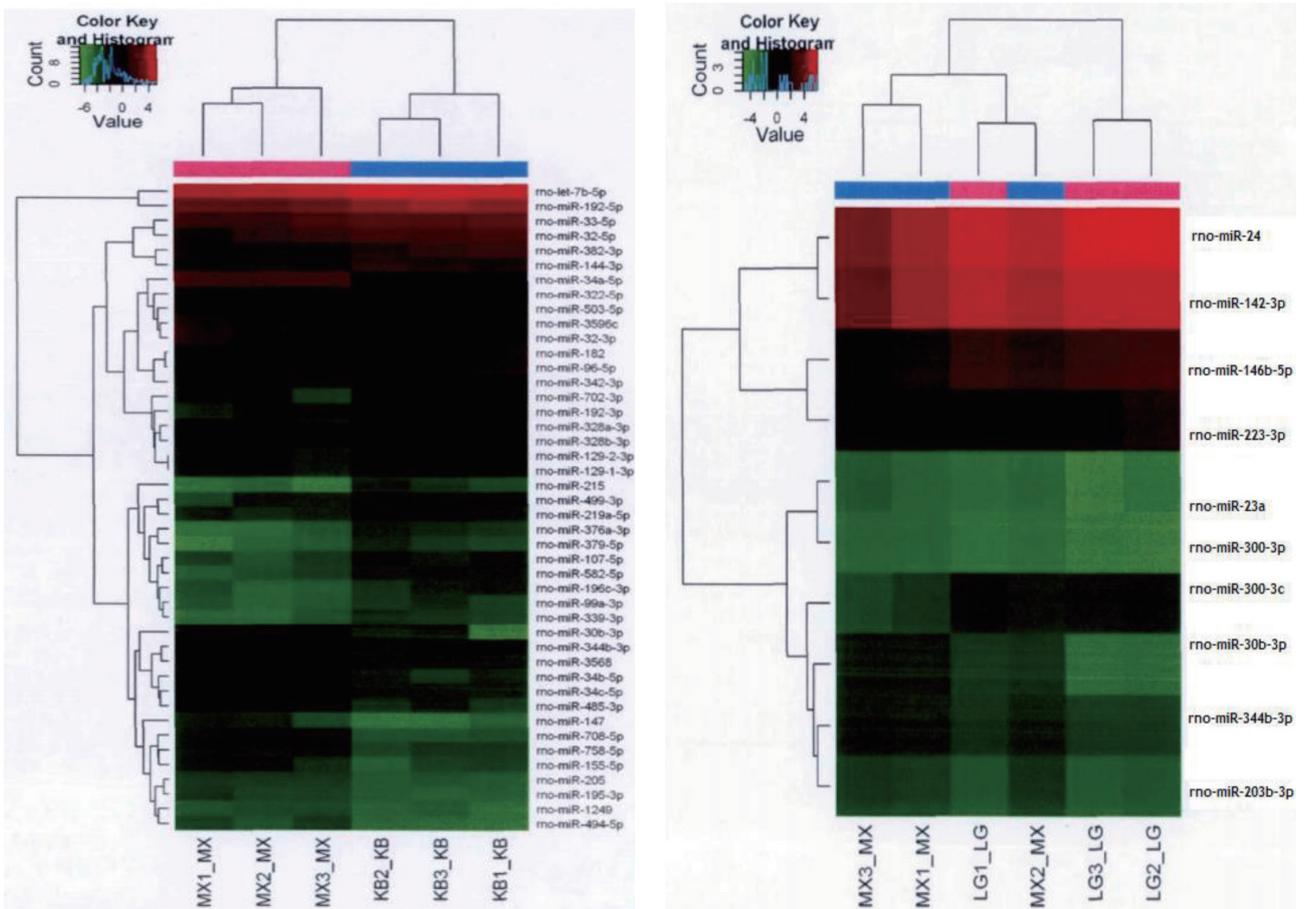


1) 与 CTL 组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 ADN 组比较,  $P < 0.05$   
图 5 各组大鼠肾组织细胞凋亡率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

MMF 组主要有 7 个 miRNAs 表达上调, 8 个 miRNAs 表达下调。其中, 相较于 CTL 组, ADN 组大鼠肾组织中 rno-miR-23a 和 rno-miR-300-3p 表达上调, rno-miR-24、rno-miR-300-3c 表达下调, 而与 ADN 组相比, MMF 组大鼠肾组织中 rno-miR-24、rno-miR-300-3c 表达上调, rno-miR-23a 和 rno-miR-300-3p 表达下调。见图 6。

### 2.7 各组大鼠肾组织 miRNAs 含量比较

3 组大鼠肾组织 rno-miR-23a、rno-miR-300-3p、rno-miR-24、rno-miR-300-3c 表达水平比较, 经



A: CTL 组和 ADN 组层次聚类图; B: ADN 组和 MMF 组层次聚类图。红色示表达上调的 miRNAs, 绿色示表达下调的 miRNAs。聚类图顶端为样品聚类, 底端为样品名。

图 6 层次聚类图

单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步两两比较经 LSD- $t$  检验, 与 CTL 组相比, ADN 组大鼠肾组织 rno-miR-23a 和 rno-miR-300-3p 表达上调 ( $P < 0.05$ ), 而 rno-miR-24 和 rno-miR-300-3c 下调 ( $P < 0.05$ ); 与 ADN 组相比, MMF 组大鼠肾组织 rno-miR-24 和 rno-miR-300-3c 表达上调 ( $P < 0.05$ ),

rno-miR-23a 和 rno-miR-300-3p 下调 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

### 2.8 大鼠肾组织 miRNAs 与尿蛋白的相关性

经 Pearson 相关性分析, rno-miR-23a、rno-miR-300-3p 与尿蛋白呈正相关 ( $r = 0.773$  和  $0.695$ , 均  $P = 0.000$ ); 而 rno-miR-24、rno-miR-300-3c 与尿蛋白呈负相关 ( $r = -0.664$  和  $-0.647$ , 均  $P = 0.000$ )。

表 4 各组大鼠肾组织 miRNAs 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	rno-miR-23a	rno-miR-300-3p	rno-miR-24	rno-miR-300-3c
CTL 组	20	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.03
ADN 组	18	2.89 ± 0.12 <sup>1)</sup>	2.71 ± 0.04 <sup>1)</sup>	0.61 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.54 ± 0.04 <sup>1)</sup>
MMF 组	19	1.23 ± 0.08 <sup>1)2)</sup>	1.47 ± 0.04 <sup>1)2)</sup>	0.86 ± 0.04 <sup>1)2)</sup>	0.95 ± 0.05 <sup>1)2)</sup>
<i>F</i> 值		2350.62	10772.77	1832.87	714.06
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与 CTL 组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 ADN 组比较,  $P < 0.05$

### 3 讨论

随着人们饮食习惯的改变,加之环境因素的影响和生活工作压力的增大,我国慢性肾病患者人群呈逐年增加的趋势,成为威胁人类健康的主要原因之一<sup>[7]</sup>。目前普遍认为,足细胞损伤是糖尿病肾病患者主要的发病机制之一<sup>[8]</sup>。足细胞是位于肾小球基底膜外侧的最后一道滤过屏障,足细胞损伤导致肾小球基底膜通透性增加,肾小球滤过率降低,从而形成蛋白尿<sup>[9]</sup>。蛋白尿是绝大多数肾脏疾病早期出现的最常见的临床症状<sup>[10]</sup>。目前大多数关于NS发病机制的研究都是集中在足细胞特异性表达分子上,如Nephrin、ZO-1、Podoplanin等,尤其是Nephrin蛋白表达下调与足细胞损伤关系最为密切<sup>[11]</sup>,但是关于Nephrin蛋白的调控机制仍未明确。近几年,随着基因组学研究的深入及基因芯片技术的发展,越来越多的学者开始重视miRNAs在各种疾病发生、发展过程中发挥的重要作用。

miRNAs是广泛存在于真核生物细胞中仅具有22个核苷酸长度的内源性小分子物质,与人体内1/3基因的表达密切相关,因具有特异性、高度保守性、簇簇性等特点,成为多种疾病研究的新靶点<sup>[12]</sup>。同样,也有大量miRNAs高表达于肾组织细胞,在肾脏发育和肾功能调控过程中发挥重要作用<sup>[13]</sup>。既往研究显示,miR-200家族、miR-300家族、miR-23家族、miR-26家族都与肾组织纤维化密切相关<sup>[14]</sup>。因此,探讨miRNAs与足细胞损伤的关系对于NS发病机制的研究及新药研发具有十分重要的临床价值。

目前,糖皮质激素一直是NS患者的首选药物,但是对于反复发作、激素依赖性/耐药性NS患者,临床建议选择免疫抑制剂治疗<sup>[15]</sup>。上个世纪末才开始将MMF用于激素抵抗性或复发性NS的治疗<sup>[16]</sup>。虽然降低蛋白尿的临床疗效已经得到普遍认可,但是其作用机制仍尚未明确。ADN大鼠是公认的、使用最为普遍的肾脏微小病变动物模型,关于模型复制方法,目前没有统一标准。有文献认为一次性注射大剂量阿霉素( $\geq 7.5$  mg/kg),虽然模型复制快,病变显著,但是易出现呕吐等副作用,大鼠死亡率较高<sup>[17]</sup>。而有文献建议多次注射小剂量阿霉素( $\leq 5$  mg/kg),虽然症状适中,模型复制成功率较高,但是症状出现缓慢,模型复制周期长<sup>[18]</sup>。因此,笔者基于多年实验经验,选择一次性尾静脉注射6.5 mg/kg,大鼠生理状况良好,死亡率低,症状适中。根据HE、PAS、Masson染色结果显示,模型大鼠具备典型的急性足细

胞损伤的特征,不仅出现蛋白尿,而且可观察到肾小球肥大、系膜细胞增生、足细胞足突广泛融合、毛细血管腔狭窄、间质出现轻、中度纤维化等足细胞损伤特征。同时笔者采用TUNEL染色法,证实模型大鼠足细胞凋亡率明显升高。但是经MMF作用28 d后,上述肾组织损伤、蛋白尿症状及足细胞凋亡情况都得到显著改善。为进一步证实MMF对足细胞保护的作用机制,笔者采用基因芯片技术筛查差异性表达的miRNAs,结果显示,与CTL组相比,ADN组有19个miRNAs表达上调,23个miRNAs表达下调。并且层次聚类图显示,miRNAs具有簇集分布的特点。另外,与ADN组相比,MMF组主要有7个miRNAs表达上调,有8个miRNAs表达下调。这其中都包括rno-miR-23a、rno-miR-300-3p、rno-miR-24和rno-miR-300-3c。rno-miR-23a和rno-miR-24位于19号染色体<sup>[19]</sup>,而miR-300-3p和miR-300-3c位于6号染色体<sup>[20]</sup>,因此笔者推测,19号和6号染色体的基因可能与NS发病密切相关,而且彼此在调控生物学行为过程中可能具有协同作用。为证实上述结论,本实验进一步采取qRP-PCR检测各组大鼠肾组织rno-miR-23a、rno-miR-300-3p、rno-miR-24和rno-miR-300-3c的表达差异,结果与芯片结果基本一致。并且rno-miR-23a、rno-miR-300-3p、rno-miR-24和rno-miR-300-3c表达水平都与尿蛋白密切相关。以往,关于miR-23a/24/300-3p/300-3c的研究证实,这几种基因都属于靶向炎症因子的重要基因,除与炎症的发生、发展密切相关外,还参与细胞的分化、增殖等生物学行为。但是尚没有研究关注其与足细胞损伤的关系。笔者只是初步探讨miR-23a/24/300-3p/300-3c可能参与蛋白尿的生成和足细胞损伤过程,为MMF作用机制的研究提供新思路,并且为进一步药物研究提供潜在的靶点基因,但是还需要后续研究探讨具体对下游蛋白分子或信号通路的影响。

综上所述,通过复制ADN大鼠模型,笔者证实MMF具有抑制足细胞损伤和蛋白尿生成的作用,其机制可能是对19号和6号染色体部分miRNAs有干预作用。但是本项研究只是初步分析MMF对某些重要miRNAs的影响,为NS发病机制的研究及潜在治疗靶点的发现提供理论证据,仍然需要进一步研究证实miRNAs对其相应信号通路及蛋白的调控作用。

#### 参考文献:

- [1] MAHALINGASIVAM V, BOOTH J, SHEAFF M, et al. Nephrotic

- syndrome in adults[J]. *Acute Med*, 2018, 17(1): 36-43.
- [2] MCCLOSKEY O, MAXWELL A P. Diagnosis and management of nephrotic syndrome[J]. *Practitioner*, 2017, 261(1801): 11-15.
- [3] BRYER J S, SUSZTAK K. Screening drugs for kidney disease: targeting the podocyte[J]. *Cell Chem Biol*, 2018, 25(2): 126-127.
- [4] LI S, YANG H, GUO P, et al. Efficacy and safety of immunosuppressive medications for steroid-resistant nephrotic syndrome in children: a systematic review and network meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(42): 73050-73062.
- [5] 谢沂均, 张倩, 薛耀明. microRNA 在糖尿病肾病小管间质纤维化中的作用 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2017, 26(5): 457-461.
- [6] NAJI EBRAHIMI YAZD Z, HOSSEINIAN S, SHAFEI M N, et al. Protection against doxorubicin-induced nephropathy by plantago major in rat[J]. *Iran J Kidney Dis*, 2018, 12(2): 99-106.
- [7] 张茵, 银永革. 肾病综合征的治疗进展 [J]. *医学综述*, 2014, 20(2): 260-262.
- [8] ZHANG X, SONG S, LUO H. Regulation of podocyte lesions in diabetic nephropathy via miR-34a in the Notch signaling pathway[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(44): e5050.
- [9] 高霞, 雷晓燕, 刘姝娆, 等. 小鼠肾脏足细胞的原代培养和鉴定 [J]. *吉林大学学报 (医学版)*, 2017, 43(1): 186-189.
- [10] HERMAN-EDELSTEIN M, THOMAS M C, THALLAS-BONKE V, et al. Dedifferentiation of immortalized human podocytes in response to transforming growth factor- $\beta$ : a model for diabetic podocytopathy[J]. *Diabetes*, 2011, 60(6): 1779-1788.
- [11] KASAGI Y, CHANDRAMOULEESWARAN P M, WHELAN K A, et al. The esophageal organoid system reveals functional interplay between Notch and cytokines in reactive epithelial changes[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018, 5(3): 333-352.
- [12] LEIERER J, MAYER G, KRONBICHLER A. Primary focal segmental glomerulosclerosis: miRNAs and targeted therapies[J]. *Eur J Clin Invest*, 2016, 46(11): 954-964.
- [13] 李晓莉. miRNA 在肾脏疾病发生发展及诊断治疗中的作用研究进展 [J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2016, 5(3): 135-137.
- [14] QUAN H, FAN Q, LI C, et al. The transcriptional profiles and functional implications of long non-coding RNAs in the unfolded protein response[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4981.
- [15] 陈楠, 任红. KDIGO 指南解读: 成人微小病变肾病和特发性局灶节段性肾小球硬化治疗 [J]. *中国实用内科杂志*, 2012, 32(12): 918-920.
- [16] 傅君舟. 成人难治性肾病综合征治疗的免疫抑制剂选择 [J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2015, 4(6): 281-285.
- [17] DEEPA P R, VARALAKSHMI P. Influence of a low-molecular-weight heparin derivative on the nitric oxide levels and apoptotic DNA damage in adriamycin-induced cardiac and renal toxicity[J]. *Toxicology*, 2006, 217(2/3): 176-183.
- [18] GALLI L G, VOLPINI R A, COSTA R S, et al. Tubular cell lesion, albuminuria, and renal albumin handling in rats treated with adriamycin[J]. *Ren Fail*, 2001, 23(5): 693-703.
- [19] QUAN J, LIU S, DAI K, et al. MicroRNA-23a/24-2/27a as a potential diagnostic biomarker for cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Mol Clin Oncol*, 2018, 8(1): 159-169.
- [20] 孙伟, 李春庆, 陈继红, 等. 嘌呤霉素肾病模型肾组织微小 RNA 的差异性表达及雷至胶囊的干预作用 [J]. *中国中药*, 2013, 38(1): 81-90.

(童颖丹 编辑)