

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.07.001

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2022.07.001>

· 论著 ·

MiR-146b 通过靶向 TRAF6 减轻狼疮性肾炎 肾小球系膜细胞的损伤

林梅, 宋丹, 黄月桂

[中国科学院大学深圳医院(光明)肾内科, 广东 深圳 518000]

[摘要] 目的: 研究微RNA-146b(microRNA-146b, miR-146b)对狼疮性肾炎小鼠肾小球系膜细胞增殖、炎症因子分泌以及细胞周期的影响及其潜在机制。方法: 采用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-146b 和肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)的靶向关系; 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和蛋白质印迹法检测TRAF6蛋白的表达水平; 将肾小球系膜细胞分为miR-control组(转染miR-146b模拟物阴性对照)、miR-146b mimic组(转染miR-146b模拟物)、miR-146b mimic+NC组(共转染miR-146b模拟物和空载质粒pcDNA-NC)和miR-146b mimic+TRAF6组(共转染miR-146b模拟物和TRAF6过表达质粒); 采用细胞计数试剂盒8(CCK-8)和免疫荧光染色法检测细胞增殖; 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞培养上清液中炎症因子的水平; 流式细胞术分析细胞周期。结果: MiR-146b靶向结合TRAF6并负调控TRAF6的表达。与miR-control组比较, miR-146b mimic组细胞的增殖能力显著减弱, 细胞培养上清液中炎症因子白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的水平降低, 细胞发生G₀/G₁期阻滞; 过表达TRAF6显著逆转了miR-146b对肾小球系膜细胞增殖和炎症因子分泌的抑制作用, 减少G₀/G₁期细胞占比, 促使细胞进入S期。结论: MiR-146b可能通过靶向TRAF6减轻狼疮性肾炎肾系膜细胞的炎症损伤。

[关键词] 狼疮性肾炎; 肾小球系膜细胞; 微小RNA-146b; 肿瘤坏死因子受体相关因子6

MiR-146b alleviates glomerular mesangial cell damage in lupus nephritis by targeting TRAF6

LIN Mei, SONG Dan, HUANG Yuegui

[Department of Nephrology, University of Chinese Academy of Sciences, Shenzhen Hospital (Guangming), Shenzhen Guangdong 518000, China]

Abstract **Objective:** To investigate the effects of microRNA-146b (miR-146b) on the proliferation, secretion of inflammatory factors, and cell cycle of mesangial cells in mice with lupus nephritis and its potential mechanism. **Methods:** The targeting relationship between miR-146b and tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) was verified by dual luciferase reporter gene assay. Real-time quantitative polymerase chain reaction

收稿日期 (Date of reception): 2021-07-27

通信作者 (Corresponding author): 林梅, Email: mlqa17208@163.com

基金项目 (Foundation item): 光明区经济发展专项资金 (2020R01017)。This work was supported by the Special Fund for Economic Development in Guangming District, China (2020R01017).

(qRT-PCR) and Western blotting were used to detect TRAF6 expression. The mesangial cells were divided into a miR-control group (negative control transfected with miR-146b mimic), a miR-146b mimic group (transfected with miR-146b mimic), a miR-146b mimic + NC group (co-transfected with miR-146b mimics and empty plasmid pCDNA-NC) and a miR-146b mimic + TRAF6 group (co-transfected with miR-146b mimics and TRAF6 overexpression plasmid). Cell counting kit 8 (CCK-8) and immunofluorescent staining were used to detect cell proliferation. The levels of inflammatory cytokines in supernatant were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cell cycle was analyzed by flow cytometry. **Results:** MiR-146b targeted and negatively regulated the expression of TRAF6. Compared with miR-control group, the proliferation ability of cells in miR-146b mimic group was significantly decreased, the levels of inflammatory factors interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α) in cell supernatant were decreased, and the cells were arrested in G₀/G₁ phase. Overexpression of TRAF6 significantly reversed the inhibitory effect of miR-146b on the proliferation and secretory of inflammatory factors in mesangial cells, reduced the proportion of G₀/G₁ phase cells, and promoted the cells to enter into S phase. **Conclusion:** MiR-146b may alleviate the inflammatory damage of mesangial cells in lupus nephritis by targeting TRAF6.

Keywords lupus nephritis; glomerular mesangial cell; microRNA-146b; tumor necrosis factor receptor-associated factor 6

系统性红斑狼疮是一种以免疫系统异常活化和自身抗体异常增多为特征的自身免疫性疾病, 全身多个器官受累, 严重危害人类健康^[1]。狼疮性肾炎是系统性红斑狼疮最常见的并发症之一, 也是影响患者预后的关键危险因素^[2]。狼疮性肾炎的发病机制目前尚不清楚。肾小球系膜细胞异常增殖及炎症因子过度分泌是狼疮性肾炎的重要病理特征^[3]。因此, 探究调控肾小球系膜细胞炎症损伤的机制对于明确狼疮性肾炎的发病十分重要。

微RNA(microRNAs, miRNAs)是一类小的内源性非编码RNA, 在转录后水平调控基因的表达。研究发现miR-146b在多种人类疾病中发挥关键作用^[4], 且过表达miR-146b可以抑制狼疮性肾炎小鼠肾小球系膜细胞增殖, 降低炎症因子水平^[5]。然而miR-146b对狼疮性肾炎肾小球系膜细胞周期调控作用及下游机制尚不清楚。既往研究^[6]表明: 肿瘤坏死因子受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)在狼疮性肾炎患者外周血和狼疮小鼠肾组织中显著上调, 且参与狼疮性肾炎的发病。然而, TRAF6在狼疮性肾炎中表达失调的机制尚不清楚。本研究旨在探讨miR-146b靶向TRAF6对狼疮性肾炎小鼠肾小球系膜细胞增殖、炎症因子以及细胞周期调控的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性MRL/faslpr小鼠由南京大学动物模式研

究所提供, 体重45~55 g, 鼠龄10~12周; 人胚肾细胞株HEK-293T购自中国科学院上海细胞库; DMEM培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司; miR-146b模拟物(miR-146b mimic)和阴性对照(miR-control)、TRAF6过表达质粒(pCDNA-TRAF6)和空载质粒(pCDNA-NC)、RIPA裂解缓冲液均购自上海生工生物公司; TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司; Quantitec反转录试剂盒购自北京金式金生物技术有限公司; SYBR Green Real Time PCR试剂盒购自德国QIAGEN公司; 各基因引物购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司; CCK-8试剂盒、ELISA试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司; 荧光素酶活性检测试剂盒购自美国Promega公司; Annexin V-FITC/PI双染试剂盒、ECL化学发光试剂盒均购自美国赛默飞世尔公司; 一抗和二抗均购自武汉博士德生物公司。

1.2 方法

1.2.1 肾小球系膜细胞分离纯化和培养

采用断颈法处死MRL/faslpr小鼠, 参考文献[4]分离和培养小鼠肾小球系膜细胞。将肾小球系膜细胞置于DMEM培养基中培养, 并向培养基中添加10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素, 培养环境为37℃, 5% CO₂。待细胞生长至80%融合时, 进行传代。取第3~6代的细胞进行实验。本研究经中国科学院大学深圳医院(光明)医学伦理委员会批准(No. 201801009)。

1.2.2 肾小球系膜细胞转染及分组

取对数生长期肾小球系膜细胞, 以每孔 2×10^5 个细胞接种于6孔板, 待细胞生长至融合度为50%~60%, 严格按照Lipofectamine 2000说明书进行转染。

将肾小球系膜细胞分为: 1)miR-control组, 转染miR-control; 2)miR-146b mimic组, 转染miR-146b mimic; 3)miR-146b mimic+NC组, 共转染miR-146b mimic和pcDNA-NC; 4)miR-146b mimic+TRAF6组, 共转染miR-146b mimic和pcDNA-TRAF6。

1.2.3 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-146b 与 TRAF6 靶向关系

构建含野生型(TRAF6-3'UTR-WT)和突变型(TRAF6-3'UTR-MUT)荧光素酶报告基因质粒, 并分别与miR-control和miR-146b mimic共转染至HEK-293T细胞, 命名为miR-control+TRAF6-WT组、miR-146b mimic+TRAF6-WT组、miR-control+TRAF6-MUT组以及miR-146b mimic+TRAF6-MUT组。转染48 h后, 采用荧光素酶活性检测试剂盒检测各组细胞萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性。

1.2.4 实时定量聚合酶链反应检测 TRAF6 mRNA 的表达

使用TRIzol试剂提取细胞总RNA, 然后用Quantitec反转录试剂盒反转录成cDNA。采用SYBR Green Real Time PCR试剂盒检测TRAF6 mRNA表达水平。用GAPDH作为TRAF6的内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。TRAF6正向引物5'-ATGCGGCCATAGGTTCTGC-3', 反向引物5'-TCCTCAAGATGTCTCAGTTCCAT-3'; GAPDH正向引物5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', 反向引物5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'。

1.2.5 蛋白质印迹法检测 TRAF6 蛋白的表达

用RIPA裂解缓冲液分离细胞总蛋白, 然后取20 μ g总蛋白与SDS-PAGE样品缓冲液煮沸变性后, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳转移到聚偏二氟乙烯膜。使用含5%脱脂奶粉的TBST在室温下将膜封闭1 h后, 先加入一抗于4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 再加入二抗于室温孵育1 h。用ECL化学发光试剂盒检测并进行曝光拍照, 分析蛋白的相对表达水平。

1.2.6 CCK-8 检测肾小球系膜细胞增殖

取对数生长期的肾小球系膜细胞, 以 2×10^3 个/孔接种于96孔培养板。细胞分别培养24、48、72和96 h后, 向每孔中加入10 μ L CCK-8试剂, 于37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育4 h, 然后用全自动酶标仪在450 nm波长处测定各孔的吸光度(A值)。

1.2.7 免疫荧光染色检测 Ki-67 表达

取对数生长期的肾小球系膜细胞接种于12孔板, 加入Ki-67一抗, 于4 $^{\circ}$ C孵育过夜, PBS清洗后使用荧光二抗于37 $^{\circ}$ C孵育1 h, PBS清洗3次, 加DAPI避光孵育5 min, 随后在荧光显微镜下拍照。

1.2.8 ELISA 检测炎症因子水平

采用ELISA试剂盒, 根据说明书进行操作, 分别检测各组细胞培养液上清中白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的水平。将各组细胞上清液和不同浓度标准品分别加入酶标板中。于37 $^{\circ}$ C孵育2 h, 加入0.1 mL生物素抗大鼠IL-1 β 、IL-6和TNF- α 抗体工作液, 于37 $^{\circ}$ C培养箱中反应1 h。加入0.1 mL亲和素过氧化物酶复合物的工作液, 继续在37 $^{\circ}$ C反应30 min, 依次加入TMB显色液, 于37 $^{\circ}$ C避光反应30 min, 加入0.1 mL终止液, 采用全自动酶标仪于450 nm波长处测定吸光度(A值)。

1.2.9 流式细胞术检测细胞周期

使用Annexin V-FITC/PI双染试剂盒检测细胞周期。收集各组处理好的细胞, 使用PBS洗涤两次后重悬细胞, 调整为 5×10^5 个/mL的细胞悬液。取100 μ L细胞悬液, 1 000 r/min离心弃去上清液, 加入500 μ L结合缓冲液重悬细胞。先后加入5 μ L Annexin V-FITC和5 μ L碘化丙啶, 混匀后于室温下避光孵育15 min, 然后用流式细胞仪检测各组细胞的周期。

1.3 统计学处理

所有实验重复3次。采用SPSS 22.0统计软件分析数据。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间差异采用两独立样本t检验, 多组间比较采用ANOVA分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TRAF6 是 miR-146b 的靶基因

通过StarBase预测发现TRAF6含有与miR-146b互补的结合位点(图1A)。双荧光素酶报告基因实验验证miR-146b与TRAF6的结合关系(图1B), miR-146b mimic可显著降低TRAF6-WT的荧光素酶活性($P < 0.001$), 而对TRAF6-MUT荧光素酶活性无影响($P > 0.05$)。

2.2 MiR-146b 调控 TRAF6 的表达

采用qRT-PCR和蛋白质印迹法检测miR-146b对

TRAF6的调控作用, 结果显示过表达miR-146b显著抑制了TRAF6 mRNA和蛋白的表达(图2)。

2.3 MiR-146b 靶向 TRAF6 调控肾小球系膜细胞增殖

qRT-PCR和蛋白质印迹法证实, TRAF6过表达质粒可显著促进肾小球系膜细胞中TRAF6 mRNA和蛋白的表达水平(图3A)。

与miR-control组比较, miR-146b mimic组细胞增殖能力显著降低($P<0.01$); 转染TRAF6过表达质粒可部分逆转miR-146b模拟物对肾小球系膜细胞增殖的抑制作用($P<0.05$; 图3B, 3C)。

2.4 MiR-146b 对肾小球系膜细胞炎症因子水平的影响

ELISA结果表明: 与miR-control组相比,

miR-146b模拟物显著降低了肾小球系膜细胞中IL-6、IL-1 β 和TNF- α 的水平($P<0.001$); 与miR-146b mimic+NC组相比, miR-146b mimic+TRAF6组以上3种细胞炎症因子的水平显著升高($P<0.001$, 图4)。

2.5 MiR-146b 对肾小球系膜细胞周期的影响

流式细胞术分析肾小球系膜细胞的周期。相比于miR-control组, miR-146b mimic组G₀/G₁期的细胞显著增多, S期和G₂期细胞数量显著减少(均 $P<0.05$); 相比于miR-146b mimic+NC, miR-146b mimic+TRAF6组G₀/G₁期的细胞减少, S期和G₂期细胞数量显著增多(均 $P<0.05$, 图5)。

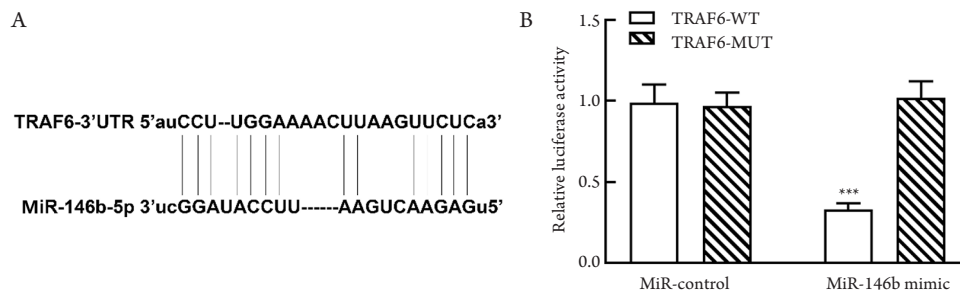


图1 MiR-146b与TRAF6的靶向关系验证

Figure 1 Verification of targeting relationship between miR-146b and TRAF6

与miR-control+TRAF6-WT比较, *** $P<0.001$ 。

Compared with miR-control+TRAF6-WT group, *** $P<0.001$.

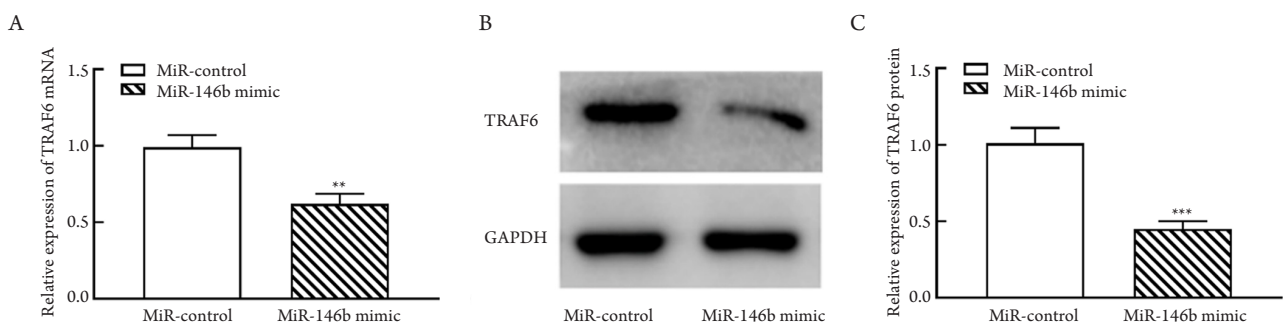


图2 MiR-146b抑制TRAF6的表达

Figure 2 MiR-146b inhibited the expression of TRAF6

(A) qRT-PCR检测TRAF6 mRNA的表达; (B,C)蛋白质印迹法检测TRAF6蛋白的表达。与miR-control比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

(A) Expression of TRAF6 mRNA was detected by qRT-PCR; (B,C) Expression of TRAF6 protein was detected by Western blotting. Compared with miR-control group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

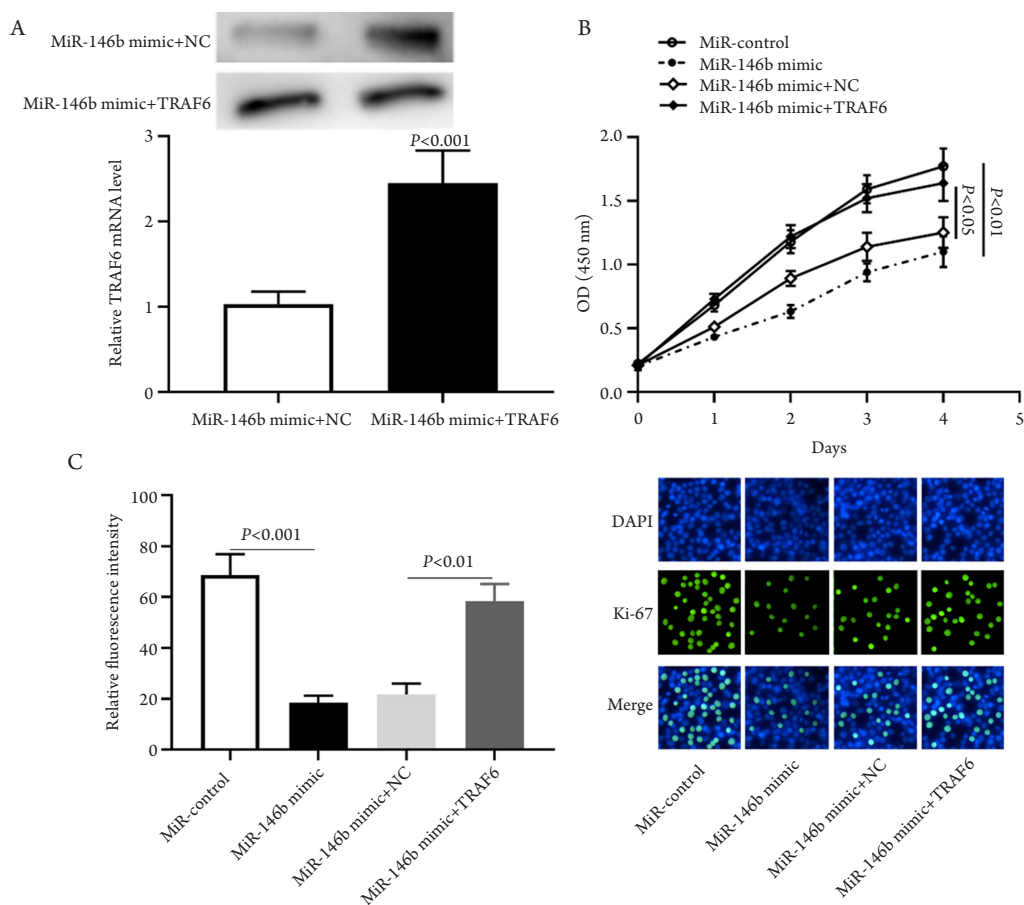


图3 CCK-8法和免疫荧光染色检测肾小球系膜细胞增殖

Figure 3 Proliferation of mesangial cells detected by CCK-8 and immunofluorescent staining

(A) qRT-PCR检测TRAF6 mRNA的表达; (B) CCK-8实验检测每组吸光度; (C) 免疫荧光染色检测Ki-67阳性细胞 ($\times 200$)。

(A) Expression of TRAF6 mRNA detected by qRT-PCR; (B) Absorbance of each group detected by CCK-8 assay; (C) Immunofluorescent staining detecting the Ki-67-positive cells ($\times 200$).

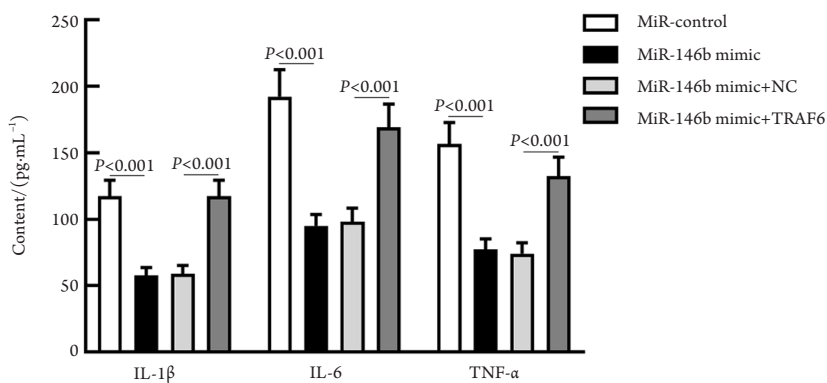


图4 各组系膜细胞炎症因子的水平

Figure 4 Levels of inflammatory factors in mesangial cells of each group

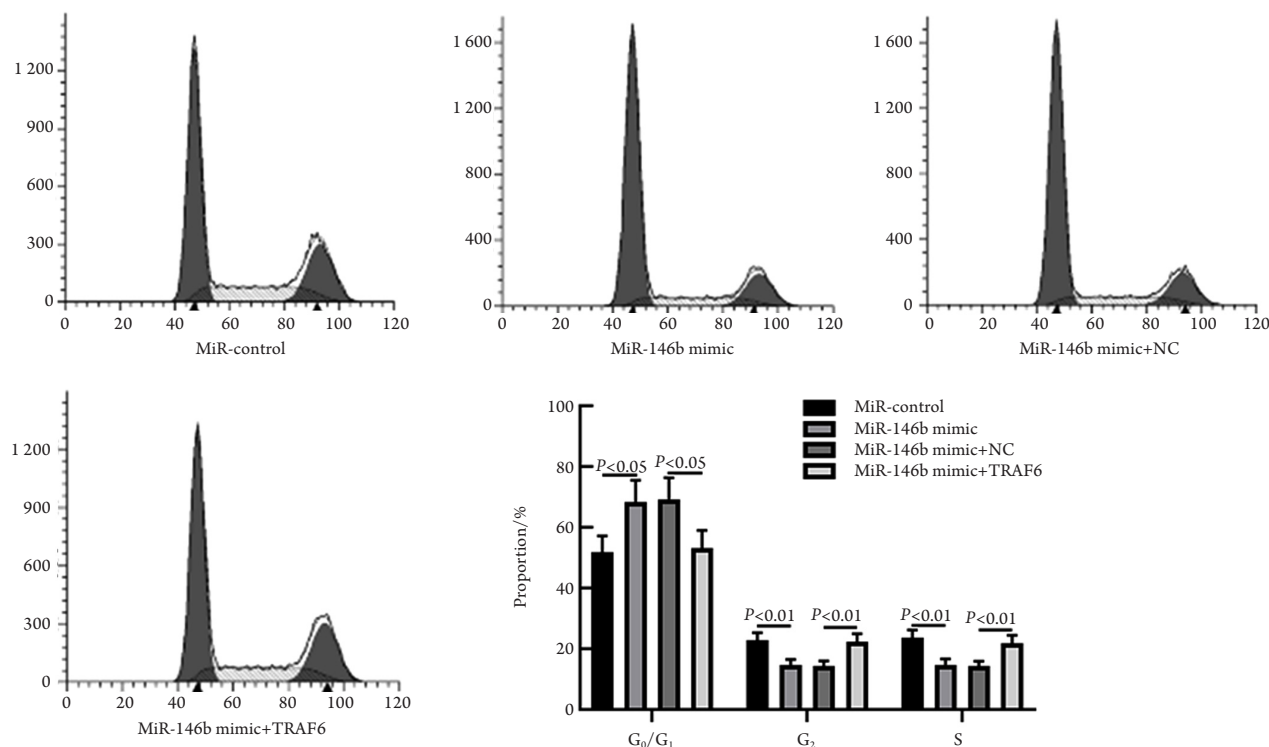


图5 流式细胞术分析肾小球系膜细胞细胞周期

Figure 5 Flow cytometry analysis of glomerular mesangial cell cycle

3 讨论

狼疮性肾炎肾小球系膜细胞过度增殖是肾损伤的重要原因^[7], 抑制肾小球系膜细胞过度增殖可改善狼疮性肾炎预后。MiRNAs已被证实通过与靶基因3'UTR结合并负向调控靶基因的表达, 在细胞增殖、迁移、凋亡等多种细胞活动中起重要作用^[8]。有报道^[9]表明miRNAs在狼疮性肾炎中表达失调, 并发挥重要作用。MiR-146b作为miRNAs中的一员, 既往研究^[5,10]表明: miR-146b在狼疮性肾炎患者中显著下调, 且可通过蛋白酪氨酸激酶1/信号转导子与转录激活子1(JAK1/STAT1)信号通路抑制狼疮性肾炎体外模型的炎症反应和细胞增殖。本研究与该结果相似, 通过构建狼疮性肾炎小鼠发现miR-146b可抑制狼疮性肾炎小鼠肾小球系膜细胞增殖和炎症反应。然而其下游机制尚不清楚。

TRAF6是TNF超家族和Toll样/白细胞介素-1(Toll/IL-1)受体超家族的结合蛋白之一, 具有特殊的结构和生物学功能, 可以与多种激酶结合, 在先天免疫和获得性免疫中发挥重要作用^[11]。TRAF6与包括系统性红斑狼疮等多种人类疾病密切相关^[12]。研究显示: 狼疮性肾炎患者外周血中miR-146a显

著下调, TRAF6显著上调, 且可作为诊断和判断疾病进展的生物标志物^[13]; 下调TRAF6可通过抑制核因子- κ B(NF- κ B)进而抑制肾小球系膜细胞炎症反应^[14]。本研究通过生物信息学在线数据库预测, 并通过双荧光素酶报告基因实验证实miR-146b靶向结合TRAF6 3'UTR并负调控其表达, miR-146b模拟物抑制了狼疮性肾炎小鼠肾小球系膜细胞的增殖和炎症因子的分泌, 使较多细胞停滞在G₀/G₁期; 过表达TRAF6显著减弱了上调miR-146b对小鼠肾小球系膜细胞增殖和炎症因子的抑制作用, 诱导更多细胞进入S期。

综上所述, 本研究证实了miR-146b通过靶向TRAF6抑制肾小球系膜细胞的增殖, 抑制细胞炎症损伤, 并阻滞细胞从G₀/G₁向S期过渡。MiR-146b/TRAF6轴可能成为治疗狼疮性肾炎的重要靶点。

参考文献

1. 吴海竞, 陆前进. 系统性红斑狼疮发病机制的研究进展[J]. 皮肤科学通报, 2018, 35(3): 249-257.
WU Haijing, LU Qianjin. The progress in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. China Medical Abstracts of Dermatology,

- 2018, 35(3): 249-257.
- 袁昶, 黄文彦. 儿童狼疮性肾炎诱导治疗药物的相关进展[J]. 中华儿科杂志, 2021, 59(1): 71-74.
YUAN Chang, HUANG Wenyan. Advances in induction therapy drugs of lupus nephritis for children[J]. Chin J Pediatr, 2021, 59(1): 71-74.
 - Liu Q, Zhang W, Li Y, et al. Knockdown of TRIM27 expression suppresses the dysfunction of mesangial cells in lupus nephritis by FoxO1 pathway[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 11555-11566.
 - 邢子禾, 张荣雪, 李杨, 等. miRNA146b在多种疾病中的作用及其机制研究进展[J]. 江苏大学学报(医学版), 2018, 28(5): 454-458.
XING Zihe, ZHANG Rongxue, LI Yang, et al. The role and mechanism of miRNA146b in various diseases[J]. Journal of Jiangsu University. Medicine Edition, 2018, 28(5): 454-458.
 - Sheng ZX, Yao H, Cai ZY. The role of miR-146b-5p in TLR4 pathway of glomerular mesangial cells with lupus nephritis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(6): 1737-1743.
 - 钟苗. TRAF6对狼疮性肾炎肾小球系膜细胞增殖的影响及临床分析[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2020.
ZHONG Miao. Effect of TRAF6 on the proliferation of mesangial cells in lupus nephritis and its clinical analysis[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2020.
 - 王铭浩, 周淑红, 周静, 等. 狼疮性肾炎小鼠肾脏组织中Wnt3a、 β -catenin基因的异常表达[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(3): 15-17.
WANG Minghao, ZHOU Shuhong, ZHOU Jing, et al. Expression of the gene level of Wnt3 a and β -catenin on lupus nephritis in MRL/lpr mice[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology, 2019, 20(3): 15-17.
 - Kabekkodu SP, Shukla V, Varghese VK, et al. Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases[J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2018, 93(4): 1955-1986.
 - 梁钊, 林栩. microRNA在狼疮性肾炎发病机制中的研究进展[J]. 右江医学, 2020, 48(1): 1-6.
LIANG Zhao, LIN Xu. Research progress of microRNA in the pathogenesis of lupus nephritis[J]. Youjiang Medical Journal, 2020, 48(1): 1-6.
 - Zhang LH, Jiang SZ, Guo X, et al. MiR-146b-5p targets IFI35 to inhibit inflammatory response and apoptosis via JAK1/STAT1 signalling in lipopolysaccharide-induced glomerular cells[J]. Autoimmunity, 2021, 54(7): 430-438.
 - Dou Y, Tian X, Zhang J, et al. Roles of TRAF6 in central nervous system[J]. Curr Neuropharmacol, 2018, 16(9): 1306-1313.
 - Zhang L, Zhang X. Downregulated miR-203 attenuates IL- β , IL-6, and TNF- α activation in TRAF6-treated human renal mesangial and tubular epithelial cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2020, 13(2): 324-331.
 - Zhu Y, Xue Z, Di L. Regulation of miR-146a and TRAF6 in the diagnosis of lupus nephritis[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 2550-2557.
 - Zheng CZ, Shu YB, Luo YL, et al. The role of miR-146a in modulating TRAF6-induced inflammation during lupus nephritis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(5): 1041-1048.

本文引用: 林梅, 宋丹, 黄月桂. MiR-146b通过靶向TRAF6减轻狼疮性肾炎肾小球系膜细胞的损伤[J]. 临床与病理杂志, 2022, 42(7): 1513-1519. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.07.001

Cite this article as: LIN Mei, SONG Dan, HUANG Yuegui. MiR-146b alleviates glomerular mesangial cell damage in lupus nephritis by targeting TRAF6[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2022, 42(7): 1513-1519. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.07.001