

# MiR-155 与 KLF4 的靶向结合对肾小管上皮细胞 MMPs 表达的影响\*

宁雅娴<sup>1</sup>, 王俭勤<sup>1△</sup>, 王晓元<sup>2</sup>

1. 兰州大学第二医院 肾内科(兰州 730030); 2. 兰州大学第二医院 风湿科(兰州 730030)

**【摘要】** 目的 研究 *miR-155* 是否通过下调靶基因 Kruppel 样因子 4(*KLF4*)影响肾小管上皮细胞中基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)和 MMP-9 的表达。方法 首先验证 *miR-155* 是否可以抑制肾小管上皮细胞中 MMPs 的表达和活性及其对 *KLF4* 表达影响;*miR-155-mimic*、*miR-155 mimic*-对照(空质粒)、空白培养基转染离体培养的肾小管上皮细胞,6 h 后,荧光定量 RT-PCR 检测 *miR-155* 表达,免疫印迹试验(Western blot)检测细胞 MMP-2、MMP-9、*KLF4* 的表达,明胶酶谱检测细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的活性。生物信息学预测 *miR-155* 潜在靶基因为 *KLF4* 后,验证 *miR-155* 是否是通过靶向抑制 *KLF4* 发挥其作用;肾小管上皮细胞用过表达 *miR-155* 的质粒转染后,再进一步转染 *KLF4* 过表达质粒或空质粒,6 h 后 Western blot 和明胶酶谱法再次检测上述指标。另取细胞,分别构建包含 *KLF4-3'-UTR* 野生型和突变型序列的荧光素酶质粒,与 *miR-155-mimic* 或者空质粒对照共转染肾小管上皮细胞,24 h 后荧光素酶试验检测 *miR-155* 对 *KLF4* 基因的靶向抑制。结果 相比转染 *miR-155 mimic*-对照的细胞,转染了 *miR-155-mimic* 的细胞 *miR-155* 表达上调,*KLF4* 的表达受到抑制,MMP-2、MMP-9 的表达和活性下降。相比于转染 *miR-155* 质粒和转染 *miR-155*+空质粒,转染过表达 *KLF4*+*miR-155* 质粒的细胞 *KLF4* 表达上调,MMP-2、MMP-9 的表达和活性增加。荧光素酶试验验证 *miR-155* 可与 *KLF4* 靶向结合。结论 *MiR-155* 可以通过靶向作用下调 *KLF4*,从而抑制肾小管上皮细胞中 MMP-2、MMP-9 的表达和活性。

**【关键词】** 慢性肾功能不全 微小 RNA155 Kruppel 样因子 4 基质金属蛋白酶

**MiR-155 Inhibits the Expression of MMPs in HK2 Cells by Targeting KLF4** NING Ya-xian<sup>1</sup>, WANG Jian-qin<sup>1△</sup>, WANG Xiao-yuan<sup>2</sup>. 1. Department of Nephrology, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China; 2. Department of Rheumatology, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China

△ Corresponding author, E-mail: wangjianqingslz@sina.com

**【Abstract】 Objective** To determine whether *miR-155* inhibits the expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in HK2 cells by targeting Kruppel-like factor 4 (KLF4). **Methods** *MiR-155-mimic*, *miR-155-NC* empty plasmid, and culture medium were transfected into renal tubular epithelial cells, respectively. Six hours later, the expression of *miR-155* was detected by real time-PCR; the expressions of MMP-2, MMP-9 and *KLF4* were detected by Western blot; and the activity of MMP-2 and MMP-9 in the cells was detected by gelatin zymography. Because *KLF4* was predicted as the target gene of *miR-155* by bioinformatics. The *miR-155* overexpressed HK2 cells were transfected with *KLF4* overexpression plasmid or empty plasmid. Six hours later, the expressions of MMP-2, MMP-9 and *KLF4*, and the activity of MMP-2 and MMP-9 were measured again. Finally, cells containing luciferase plasmids with *KLF4-3'-UTR* wild type (WT) or mutant (MUT) sequence were constructed and transfected with *miR-155-mimic* or empty plasmid. Luciferase assay was used to confirm whether *KLF4-3'-UTR* was the binding site in targeting *miR-155*. **Results** Compared with the cells transfected with empty plasmid, the expression of *miR-155* was up-regulated and the expressions of MMP-2, MMP-9 and *KLF4* were down-regulated in the cells transfected with *miR-155-mimic*. Compared with the cells transfected with *miR-155 mimic* or *miR-155 mimic*+empty plasmid, the expressions of MMP-2, MMP-9 and *KLF4* were up-regulated in the *KLF4*+*miR-155* transfected cells. Luciferase assays confirmed that *miR-155* binds to *KLF4*, and *KLF4-3'-UTR* is the target gene of *miR-155*. **Conclusion** *MiR-155* inhibits the expressions of MMP-2 and MMP-9 in HK2 cells by targeting *KLF4-3'-UTR*.

**【Key words】** Chronic kidney disease *MiR-155* Kruppel-like factor 4 Matrix metalloproteinase

\* 甘肃省自然科学基金项目(No. 1308RJZA246)和甘肃省卫生行业科研计划项目(No. GSWST2013-02)资助

△ 通信作者, E-mail: wangjianqingsla@sina.com

肾脏纤维化是各种原因所致慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)进展至终末期肾衰竭的共同途径<sup>[1]</sup>。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的异常沉积在肾间质纤维化过程中发挥重要的作用,所有引起 ECM 过度合成或者降解的因素,最终都会引起肾间质纤维化的发生。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)可以降解 ECM,其抑制物金属蛋白酶组织抑制物通过抑制 MMPs 的活性参与 ECM 的调控,两者共同维持着 ECM 处于动态平衡的状态<sup>[2]</sup>。在多种肾脏疾病中, MMPs 的分泌和活性的增加,并导致 ECM 平衡紊乱,最终引起肾脏纤维化的发生。目前已经证实转化生长因子(TGF)- $\beta$ 1 可以诱导肾小管上皮细胞 MMPs 的表达与活性<sup>[3]</sup>, TGF- $\beta$ 1 可以促进肾小管上皮细胞向肌细胞转化(EMT),是目前常用的肾小管上皮细胞 EMT 造模工具。所以本实验选择用 TGF- $\beta$ 1 来制备高表达 MMPs 的肾小管上皮细胞模型。

MiR-155 已被证实在 CKD 的发生发展过程中具有重要的作用<sup>[4-5]</sup>,但是目前为止其在 CKD 早期与 CKD 中晚期患者之间的对比尚未有研究,其参与 CKD 进展的作用机制也尚未阐明。本研究拟通过用 miR-155 转染肾小管上皮细胞,检测其对 MMP-2、MMP-9 的表达和活性的影响,并进一步探索 miR-155 与 Kruppel 样因子 4(KLF4)的靶向结合对 MMPs 的影响。

## 1 资料与方法

### 1.1 实验试剂

人肾小管上皮 HK2 细胞株购自上海拜力生物公司;TGF- $\beta$ 1、DMEM 培养液、胰蛋白酶(Sigma 公司);胎牛血清(GIBCO 公司);限制性内切酶 BamH I、Xho I、T4 DNA 连接酶;RNA 提取试剂(Invitrogen 公司);TaKaRa 逆转录试剂盒(大连宝生物公司);SYBR Green 荧光染料试剂盒(Roche 公司);无内毒素质粒小、大提取试剂盒;兔或鼠抗人 MMP-2、MMP-9、KLF4、 $\beta$ -actin、GAPDH 多克隆抗体(ABCAM 公司);脂质体 2000(上海英骏公司);DAPI(Roche 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或者抗鼠二抗、FITC 标记的山羊抗兔 IgG(jackson 公司);Western blot 相关试剂(江苏碧云天生物技术研究所)。

### 1.2 过表达质粒的构建和质粒转染细胞株

MiR-155-mimic 由上海吉玛公司设计合成,

miR-155-mimic 序列为,正义链:5'-UUAAUGCUA AUCGUGAUAGGGGU-3',反义链:3'-CCCUA UCACGAUUAGCAUUAUU-5',扩增引物长度 23 bp。KLF-4 过表达质粒由上海吉玛公司设计合成,通过 PubMed 查找 KLF4 基因的序列,引物根据 GenBank 中 KLF4 mRNA 序列设计引物。其上游引物:5'-CGCGGATCCATGAGCAGCCACC TGGCGAGTC-3';下游引物:5'-CCGCTCGAGTC ATTA AAAATGCCTCTTCATGTGT-3',扩增产物长度 300 bp。MiR-155 和 KLF4 基因与质粒 DNA 连接后,筛选重组质粒,测序验证。以空质粒为 miR-155-mimic-对照及 KLF-4 过表达质粒对照。

转染:将肾小管上皮细胞接种至 6 孔板,生长至 50%~70%密度时,以脂质体 2000 分别转染 miR-155 mimic 或 miR-155 mimic-对照, KLF4 过表达质粒或其空质粒对照,各质粒 100 pmol 转染 24 h 后,提取总 RNA/蛋白后,PCR/Western blot 鉴定转染效率升高一倍以上进行基因和蛋白的检测。

### 1.3 实验分组

TGF- $\beta$ 1 是目前公认的可以诱导肾小管上皮细胞 EMT,可以诱导肾小管上皮细胞 MMPs 表达的药物,且观察重点为 TGF- $\beta$ 1 干预后细胞各因子的改变,所以我们在实验设计的时候没有设不加 TGF- $\beta$ 1 的对照组。每组细胞都先用 10  $\mu$ g/L 的 TGF- $\beta$ 1 干预肾小管上皮细胞,再进行下一步处理。

首先验证 miR-155 是否可以抑制肾小管上皮细胞中 MMPs 的表达和活性及其对 KLF4 表达的影响:将肾小管上皮细胞分为对照组、过表达 miR-155 组和 mimic-对照组 3 组,分别加入空白培养基、100 nmol/L miR155-mimic 和 miR-155 mimic-对照质粒,转染 6 h 后,荧光定量 RT-PCR 检测 miR-155 表达,Western blot 检测 MMP-2、MMP-9、KLF4 蛋白表达量,明胶酶谱法(Zymography)测定肾小管上皮细胞中 MMP-2、MMP-9 的活性。

生物信息学预测 miR-155 的潜在靶基因是 KLF-4,然后验证 miR-155 是否通过靶向抑制 KLF4 发挥其作用。将细胞分为 miR-155 组、miR-155+KLF4 组、miR-155+空质粒组,所有细胞都用过表达 miR-155 的质粒转染,后两组再进一步转染 KLF4 过表达质粒或空质粒,转染干预共 6 h 后 Western blot 检测各组 MMP-2、MMP-9、KLF4 蛋白表达量,明胶酶谱法测定肾小管上皮细胞中 MMP-2、MMP-9 的活性。另取细胞,分别构建含 KLF4-3'-UTR 野生型(WT)和其突变型(MUT)序

列的荧光素酶质粒,与 *miR-155-mimic* 或其空质粒对照共转染肾小管上皮细胞,分为 *miR-155-mimic* + WT-*KLF4-3'-UTR* 组、空质粒 + WT-*KLF4-3'-UTR* 组、*miR-155-mimic* + MUT-*KLF4-3'-UTR* 组、空质粒 + MUT-*KLF4-3'-UTR* 组共 4 组,培养 24 h 后,检测各组细胞荧光素酶活性。

#### 1.4 荧光定量 RT-PCR 检测 *miR-155* 表达

提取细胞中总 RNA,将提取的 RNA 逆转录成 cDNA,反应体系 20  $\mu\text{L}$ ,反应条件:16  $^{\circ}\text{C}$  (30 min),45  $^{\circ}\text{C}$  (30 min),85  $^{\circ}\text{C}$  (5 min)。运用 SYBR Green 法检测 *miR-155* 的表达情况,反应条件为:94  $^{\circ}\text{C}$  (15 min) 灭活逆转录酶,94  $^{\circ}\text{C}$  (30 s) 变性,60  $^{\circ}\text{C}$  (30 s) 退火,72  $^{\circ}\text{C}$  (30 s) 延伸,共循环 40 次;最后 95  $^{\circ}\text{C}$  (15 s) 绘制熔解曲线。每次扩增设置无模板 cDNA 的阴性对照,内参基因 *GAPDH* 为阳性对照。每组样品重复 3 次,实验重复 3 次,使用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算各标本中 *miR-155* 的表达。

#### 1.5 Western blot 检测 MMP-2、MMP-9、KLF4 蛋白表达量

提取细胞总蛋白,BCA 法定量蛋白,SDS-PAGE 胶每孔加入 30  $\mu\text{L}$  样品,70 V 30 min 进行蛋白浓缩,100 V 2 h 进行蛋白分离电泳,并用孔径为 0.45  $\mu\text{m}$  的 PVDF 膜 250 mA 90 min 进行转膜。转膜后常温下 TBST 洗膜 3 次、封闭 1 h 后,以 1:1 000 浓度加入兔(鼠)抗人 MMP-2 一抗(或抗 MMP-9、抗 KLF4、抗内参蛋白  $\beta$ -actin),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,常温下 TBST 洗膜 3 次,辣根过氧化物酶标记羊抗兔(鼠)二抗孵育后 ECL 化学发光法检测。柯达胶片暗室显影,Quantity One 软件分析条带灰度值,以各条带与内参蛋白条带灰度值的比值为目的蛋白表达量。

#### 1.6 明胶酶谱法(Zymography)测定肾小管上皮细胞中 MMP-2、MMP-9 的活性

取 30  $\mu\text{L}$  蛋白样品于含 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  明胶的聚丙烯酰胺凝胶上电泳,在电泳结束后,用 2.5% Triton X-100 洗涤液洗涤 30 min;37  $^{\circ}\text{C}$  平摇孵育(pH 8.8,50 mmol/L Tris-HCl,5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ )。染色 2 h(含 0.1% 考马斯亮兰 R-250 溶液,10% 冰乙酸,45% 甲醇溶液,45% 去离子水),脱色(10% 冰乙酸,45% 甲醇溶液,去离子水 45%),蓝色背景下显现白色条带,即表示 MMP-2、MMP-9,双蒸水冲洗 2 遍,在凝胶成像系统下拍照,Quantity One 软件定量分析条带灰度值<sup>[6]</sup>。

#### 1.7 荧光素酶试验检测 *miR-155* 对 *KLF4* 基因的

#### 靶向抑制

设计合成 *KLF4-3'-UTR* 的野生序列及突变序列,以 *KLF4* 质粒为载体,分别构建能够表达荧光素酶的包含 *KLF4-3'-UTR* 和 *KLF4-3'-UTR* 突变序列的质粒,然后将肾小管上皮细胞按每孔  $1 \times 10^5$  接种至 24 孔板,24 h 后,① *miR-155-mimic* + WT-*KLF4-3'-UTR* 组转染 60 pmol *miR-155-mimic*、200 ng 包含 *KLF4-3'-UTR* 序列的荧光素酶质粒和 80 ng 海肾荧光质粒;② 空质粒 + WT-*KLF4-3'-UTR* 组转染 60 pmol *miR-155-mimic*-对照、200 ng 包含 *KLF4-3'-UTR* 序列的荧光素酶质粒和 80 ng 海肾荧光质粒;③ *miR-155-mimic* + MUT-*KLF4-3'-UTR* 组转染 60 pmol *miR-155-mimic*、200 ng 包含 *KLF4-3'-UTR* 突变序列的荧光素酶质粒和 80 ng 海肾荧光质粒;④ 空质粒 + MUT-*KLF4-3'-UTR* 组转染 60 pmol *miR-155-mimic*-对照、200 ng 包含 *KLF4-3'-UTR* 突变序列的荧光素酶质粒和 80 ng 海肾荧光质粒。48 h 后用荧光检测仪检测荧光强度,海肾荧光作为内参照,每组实验重复 3 次。活性越强,说明靶基因 *KLF4* 表达越强,*miR-155* 的抑制作用越弱。

#### 1.8 统计学方法

多组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),两组间比较用 LSD 法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *MiR-155* 对肾小管上皮细胞 MMP-2、MMP-9 表达和活性的影响

*MiR-155-mimic* 转染肾小管上皮细胞后,荧光定量 RT-PCR 检测结果发现:过表达 *miR-155* 组 *miR-155* 的表达较 mimic-对照组(以 mimic-对照组表达量为 1)升高 2.7 倍,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。Western blot 检测发现,相比于对照组和 mimic-对照组,过表达 *miR-155* 组细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的表达减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 1A;设对照组 MMPs 活性为 1,明胶酶谱检测发现,相比于对照组和 mimic-对照组,过表达 *miR-155* 组细胞 MMP-2 和 MMP-9 的活性降低( $P < 0.01$ ),见图 1B。

### 2.2 *MiR-155* 对肾小管上皮细胞 KLF4 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示,相比于对照组( $2.45 \pm 1.27$ )和 mimic-对照组( $2.67 \pm 1.44$ ),*miR-*

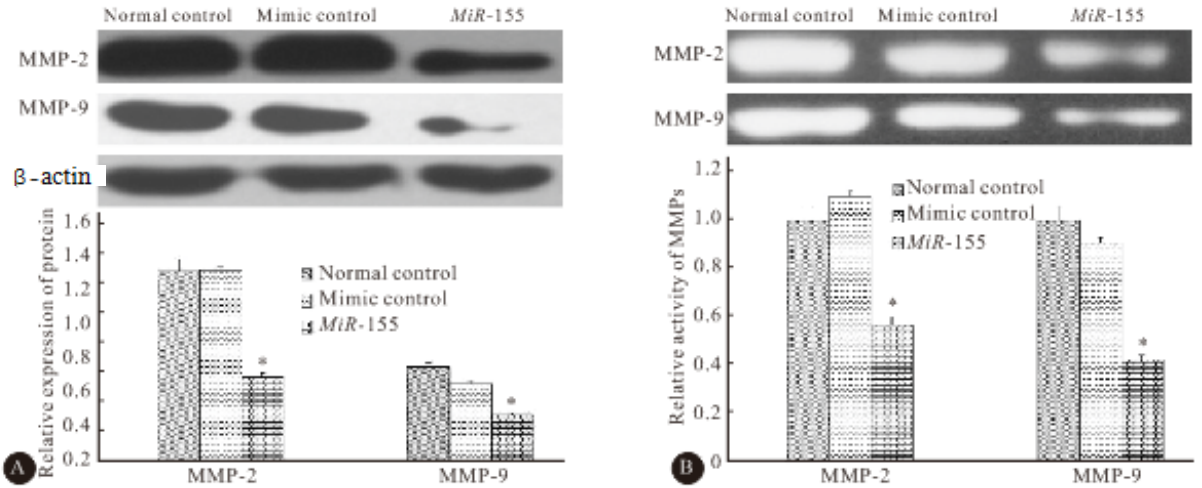


图 1 *MiR-155* 对细胞 MMPs 表达(A)和 MMPs 活性(B)的抑制作用

Fig 1 *MiR-155* inhibits the expression (A) the activity (B) of MMPs in HK2 cells (\*  $P < 0.01$ , vs. other groups)

155 组( $1.03 \pm 0.39$ )肾小管上皮细胞中 *KLF4* 表达减少( $P < 0.01$ )。见图 2。说明 *miR-155* 可抑制 *KLF4* 的表达。

### 2.3 过表达 *KLF4* 质粒转染后各组 MMPs、*KLF4* 的蛋白表达水平和 MMPs 活性

过表达 *KLF4* 的质粒转染肾小管上皮细胞后, 相比于 *miR-155* 组( $0.89 \pm 0.27$ )和 *miR-155* + 空质粒组( $0.94 \pm 0.34$ ), *miR-155* + *KLF4* 组( $2.48 \pm 0.81$ )细胞中 *KLF4* 蛋白的表达增加( $P < 0.01$ )。相比于 *miR-155* 组和 *miR-155* + 空质粒组, *miR-155* + *KLF4* 组中肾小管上皮细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达增加和活性(设 *miR-155* 组活性为 1)增加( $P < 0.01$ ), 见图 3。

### 2.4 荧光素酶试验检测 *MiR-155* 对 *KLF4* 基因的

### 靶向抑制作用

图 4A 为 *miR-155* 与 *KLF4* 的结合位点序列。图 4B 示 *miR-155*-mimic + WT-*KLF4*-3'-UTR 组 *KLF4* 的表达低于空质粒 + WT-*KLF4*-3'-UTR 组( $P < 0.01$ ), 即与转染空质粒相比, 转染 *miR-155*-mimic 对野生型 *KLF4*-3'-UTR 有抑制作用。*MiR-*

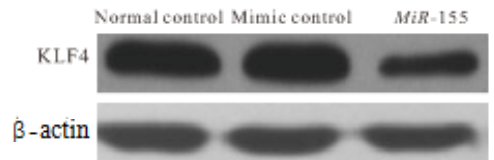


图 2 *MiR-155* 对细胞 *KLF4* 蛋白表达的影响

Fig 2 *MiR-155* inhibits the expression of *KLF4* in HK2 cells

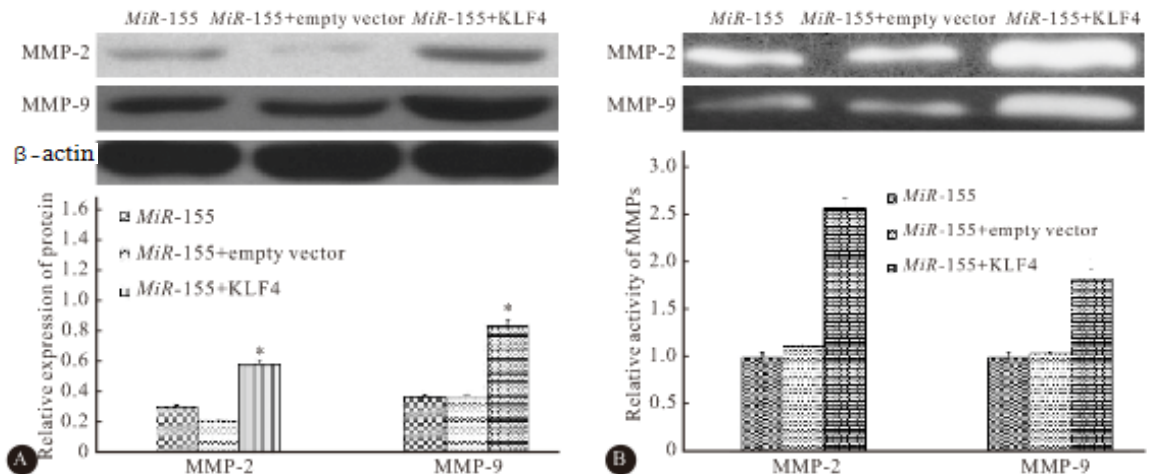


图 3 过表达 *KLF4* 促进肾小管上皮细胞 MMPs 的表达(A)和活性(B)

Fig 3 Over-expressed *KLF4* increases the expression (A, Western blot) and activity (B, gelatin zymography) of MMPs

\*  $P < 0.01$ , vs. *miR-155* + empty vector group

155-mimic + MUT-*KLF4*-3'-UTR 组和空质粒 + MUT-*KLF4*-3'-UTR 组荧光素酶活性差异无统计学意义,即 *miR-155*-mimic 无法靶向结合 *KLF4*-3'-UTR 的突变序列,其对荧光素酶表达的抑制作用消失,与转染空质粒效果相当。以上说明 *miR-155* 对 *KLF4* 的抑制具有靶向性,可通过识别 *KLF4*-3'-UTR 抑制靶基因 *KLF4* 的表达。

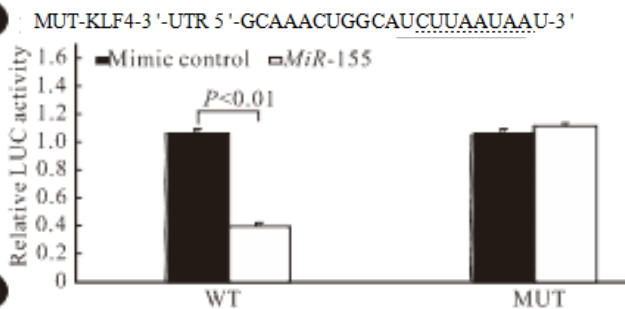
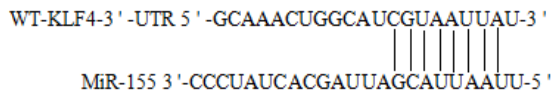


图 4 *MiR-155* 通过识别 3'-UTR 抑制 *KLF4* 的表达

Fig 4 *MiR-155* inhibits *KLF4* expression by targeting 3'-UTR

A: WT-*KLF4*-3'-UTR binding sites; B: Luciferase activity;

WT: Wild type; MUT: Mutant; LUC: Luciferase

### 3 讨论

MMPs 在肾间质纤维化过程中具有重要作用,抑制 MMPs 的表达可以延缓 CKD 的进展<sup>[2]</sup>。目前已知的 MMPs 有十多种,其中以 MMP-2 和 MMP-9 这两种明胶酶与 CKD 之间的联系最为密切。MMPs 的大量分泌和激活可能导致 ECM 的大量降解,增加局部的炎症反应,最终导致肾脏纤维化的发生<sup>[7]</sup>。最近的研究还发现 MMPs 除了降解 ECM 的作用之外,还可以通过诱导细胞分泌生长因子、降解细胞间黏附分子、激活其它的 MMPs 等路径调节细胞内信号的改变,从而在 ECM 重构及肾间质纤维化的发生发展中发挥重要的作用<sup>[8]</sup>。国内薛痕等<sup>[9]</sup>的研究发现 MMP-9 参与调节肾小管基底膜代谢,促进肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转变,在肾脏纤维化的过程中发挥重要的作用。

血液中的 miRNA 称为循环 miRNA,主要存在于微囊泡(microvesicle, MV)中。MV 稳定性极强,能够抵抗极端 pH 环境、煮沸、反复冻融以及血清 RNA 酶的影响,同时 MV 也是一种细胞间信号转导的载体,可以向靶细胞传递多种信号物质,如 mRNA、miRNA 等,参与细胞的多种功能活动。

CANTALUPPI 等<sup>[10]</sup>的研究通过将内皮祖细胞来源的 MV 注入缺血再灌注模型大鼠尾静脉,发现这些 MV 可以归巢到受损的肾小球及肾小管,而且可以抑制肾小管上皮细胞凋亡并促进血管生成,同时还具有抗肾脏纤维化的作用。此研究提示血液中的 miRNA 可以进入肾脏,甚至可以调节肾小管上皮细胞的生物学功能。*MiR-155* 已被证实在 CKD 的发生发展过程中具有重要的作用,可以通过多种机制调控肾脏纤维化的发生<sup>[4-5]</sup>。KAGA 等<sup>[11]</sup>通过提取狼疮性肾炎患者外周血单个核细胞,发现 *miR-155*、*miR-17* 和 *miR-181b* 的表达减少。LIU 等<sup>[12]</sup>的研究发现 TLR9 通过上调 *miR-155* 和 *Ets-1* 的表达,从而抑制 CKD 患者 B 细胞中 CD1d 的表达。最近 RASMUSSEN 等<sup>[13]</sup>的研究还发现 *miR-155* 可以抑制肾小管上皮细胞的凋亡。我们通过用 *miR-155* 干预肾小管上皮细胞,发现 *miR-155* 可以抑制肾小管上皮细胞中 MMP-2、MMP-9 的表达和活性,与上述研究结果相符。

*KLF4* 是真核锌指蛋白转录因子,在细胞增殖分化、血管生成和肿瘤转移进展等多种生理、病理过程中起着重要作用<sup>[14]</sup>。过去的研究显示 *KLF4* 在血管平滑肌细胞表型转化、干细胞分化的调控中都具有重要作用<sup>[14]</sup>。之后 SUN 等<sup>[15]</sup>的研究发现抑制 *KLF4* 可以引起纤溶酶原激活物抑制剂-1 的下调,从而抑制肺上皮细胞向肌成纤维细胞转变。最近国内 CHEN 等<sup>[16]</sup>发现 *KLF4* 的过表达在 CKD 肾脏外基质的沉积和纤维化中具有重要作用。与上述实验结果相符,我们通过荧光素酶试验发现 *miR-155* 可以与 *KLF4* 的 3'-UTR 靶向结合,减少靶基因 *KLF4* 的表达。鉴于 *KLF4* 在肾脏纤维化中的重要性,我们用 *KLF4* 过表达质粒转染肾小管上皮细胞,发现 *KLF4* 过表达质粒的转染可以逆转 *miR-155* 抑制肾小管上皮细胞表达 MMP-2、MMP-9 的作用,最终证实 *miR-155* 是通过抑制 *KLF4* 的表达,从而发挥抑制肾小管上皮细胞 MMP-2、MMP-9 的表达和活性的作用。

本研究也具有一定的局限性:仅仅从细胞离体水平证实 *miR-155* 可以抑制肾小管上皮细胞 MMP-2、MMP-9 的表达和活性,没有动物在体实验以及临床研究的证实。本课题组拟在下一步研究中通过 *miR-155* mimic 干预 CKD 小鼠模型,以期进一步在动物水平证实 *miR-155* 的作用。

### 参 考 文 献

[1] CHENG M, LIU H, ZHANG D, et al. HMGB1 enhances

- the AGE-induced expression of CTGF and TGF-beta via RAGE-dependent signaling in renal tubular epithelial cells. *Am J Nephrol*, 2015, 41(3): 257-266.
- [2] WANG J, GAO Y, MA M, *et al.* Effect of *miR-21* on renal fibrosis by regulating MMP-9 and TIMP1 in kk-ay diabetic nephropathy mice. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67(2): 537-546.
- [3] 张 翥, 秦中豪, 白继琼, 等. 积雪草对 TGF- $\beta$ 1 诱导的体外培养肾小管上皮细胞 MCP-1、HGF、MMP-2、TIMP-2 表达的影响. *中华中医药杂志*, 2015, 32(7): 2541-2543.
- [4] LASHINE YA, SALAH S, ABOELENEIN HR, *et al.* Correcting the expression of *miRNA-155* represses PP2Ac and enhances the release of IL-2 in PBMCs of juvenile SLE patients. *Lupus*, 2015, 24(3): 240-247.
- [5] XIN Q, LI J, DANG J, *et al.* MiR-155 deficiency ameliorates autoimmune inflammation of systemic lupus erythematosus by targeting *Slpr1* in *Faslpr/lpr* Mice. *J Immunol*, 2015, 194(11): 5437-5445.
- [6] 孟立平, 周昌钻, 郭 艳, 等. 黄酒中抑制同型半胱氨酸诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖和迁移成分的探讨. *中国应用生理学杂志*, 2015, 31(5): 437-442.
- [7] 孙东立, 张林霞, 李 颖, 等. 醛固酮对人肾小管上皮细胞 *MMP-1/TIMP-1* 基因表达和合成分泌纤维连接蛋白的影响. *中国现代医学杂志*, 2012(18): 28-31.
- [8] FU W, WANG Y, JIN Z, *et al.* Losartan alleviates renal fibrosis by down-regulating HIF-1 $\alpha$  and up-regulating MMP-9/TIMP-1 in rats with 5/6 nephrectomy. *Ren Fail*, 2012, 34(10): 1297-1304.
- [9] 薛 痕, 陈 亮, 樊均明, 等. MMP-9 与 TIMP-1 在肾小管上皮细胞转分化中的作用. *四川大学学报(医学版)*, 2008, 39(1): 34-38.
- [10] CANTALUPPI V, GATTI S, MEDICA D, *et al.* Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int*, 2012, 82(4): 412-427.
- [11] KAGA H, KOMATSUDA A, OMOKAWA A, *et al.* Downregulated expression of *miR-155*, *miR-17*, and *miR-181b*, and upregulated expression of activation-induced cytidine deaminase and interferon-alpha in PBMCs from patients with SLE. *Mod Rheumatol*, 2015, 25(6): 865-870.
- [12] LIU F, FAN H, REN D, *et al.* TLR9-induced *miR-155* and *Ets-1* decrease expression of *CD1d* on B cells in SLE. *Eur J Immunol*, 2015, 45(7): 1934-1945.
- [13] RASMUSSEN TK, ANDERSEN T, BAK R O, *et al.* Overexpression of microRNA-155 increases IL-21 mediated STAT3 signaling and IL-21 production in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17: 154 [2016-05-18]. <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-015-0660-z>. doi: 10.1186/s13075-015-0660-z.
- [14] LIAO X, ZHANG R, LU Y, *et al.* Kruppel-like factor 4 is critical for transcriptional control of cardiac mitochondrial homeostasis. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3461-3476.
- [15] SUN F, HU K. Kruppel-like factor 4 inhibits the transforming growth factor-beta1—promoted epithelial-to-mesenchymal transition via downregulating plasminogen activator inhibitor-1 in lung epithelial cells. *Dis Markers*, 2015, 2015: 473742 [2016-06-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4709646/>. doi: 10.1155/2015/473742.
- [16] CHEN WC, LIN HH, TANG MJ. Matrix-stiffness-regulated inverse expression of kruppel-like factor 5 and kruppel-like factor 4 in the pathogenesis of renal fibrosis. *Am J Pathol*, 2015, 185(9): 2468-2481.

(2016-09-09 收稿, 2016-12-03 修回)

编辑 吕 熙