

糖尿病肾病循环 microRNA 差异表达谱的分析^①

彭 睿¹, 查 何², 周 吉², 彭惠民³, 张 政²

1. 重庆医科大学 生物信息学教研室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学 细胞生物学及遗传学教研室, 重庆 400016;
3. 重庆医科大学 实验教学中心, 重庆 400016

摘要: 为了解循环 microRNA 在早期糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)发病机制中的作用, 该文采用芯片筛查结合 real-time PCR 检测早期糖尿病肾病患者循环 microRNA 差异表达谱, 同时应用生物信息学方法预测差异表达谱 microRNA 的靶基因. 结果表明: 芯片筛查出 49 个 microRNA 在 DN 中呈差异表达, 其中信号值在两组中均大于 1 000 的 microRNA 有 22 个, 17 个上调, 5 个下调. 选择其中差异倍数大于 2 的 5 个 microRNA 进行 real-time PCR 验证, 结果与芯片结果一致, 分别为 let-7a, let-7d, let-7f 和 miR-363 在 DN 中低表达, miR-4429 在 DN 中高表达. 同时, 应用生物信息学技术预测了 5 个 microRNA 的靶基因, 主要涉及细胞代谢过程调控、生长因子反应和细胞增殖等的相关基因. DN 差异表达谱的建立为探寻 microRNA 发病中的作用以及 DN 的早期诊治提供了新的思路.

关键词: 糖尿病肾病; microRNA; 表达谱

中图分类号: Q781

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)11-0075-08

微小 RNA(MicroRNA, miRNA)是一类 21~23 个核苷酸的非编码小 RNA 分子, 可通过与靶基因 mRNA 的特定位点结合, 调控基因的表达. 研究发现, miRNA 参与肿瘤、内分泌疾病等多种疾病. 我们的前期研究发现, miRNA 在糖尿病肾病模型小鼠中参与疾病的发生发展^[1-2]. 然而, 在人体中 miRNA 与 DN 的关系如何至今未见明确报道. 血液中存在循环 miRNA, 其具有疾病特异性、组织特异性和较高稳定性的特点, 能被稳定检出^[3-4]. 循环 miRNA 由 Lawrie 等^[5]于 2008 年首次报道, 他们在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者血清中发现 miR-21 显著增高. 此后研究者开始在肿瘤等多种疾病中将循环 miRNA 作为新型生物标记物进行研究, 发现循环 miRNA 在前列腺癌^[6]、胰腺癌^[7]、胃癌^[8]等多种肿瘤、心肌梗死^[9]、败血症^[10]等疾病中有显著变化, 但循环 miRNA 与 DN 的研究, 国内外未见相关报道. 本研究采用糖尿病肾病、单纯性糖尿病患者及正常健康人为研究对象, 采用芯片和 real-time PCR 建立了早期 DN 差异表达谱, 其中 let-7a, let-7d, let-7f 和 miR-363 在 DN 中低表达, miR-4429 在 DN 中高表达. 同时, 应用生物信息学技术预测和分析 DN 差异表达谱的靶基因, 为早期 DN 发生的机制研究提供新的方向和实验室基础.

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2011 年 6 月—2012 年 8 月重庆医科大学第一附属医院内分泌科患者清晨空腹静脉血, 排除肝脏、心

① 收稿日期: 2013-09-14

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(NSFC. 81270912); 重庆市科委自然科学基金面上项目(CSTC2013jcyjA10044).

作者简介: 彭 睿(1982-), 男, 重庆渝中区人, 硕士, 主要从事基因表达调控研究.

通信作者: 张 政, 副教授.

脏、免疫系统、泌尿系统感染等其他肾脏疾病,且符合 1999 年世界卫生组织的糖尿病诊断标准.在 274 例 2 型糖尿病患者中选出年龄、性别及患病年限均匹配的 20 例糖尿病肾病患者和 20 例糖尿病非肾病患者.具体分组如下:① DN 组:尿白蛋白排泄率(urinary albumin excretion rate, UAER)在 20~200 $\mu\text{g}/\text{min}$ 的糖尿病肾病患者;② DM 组:UAER<20 $\mu\text{g}/\text{min}$ 的糖尿病非肾病患者;③ CON 组:另收集 2011 年 6 月—2012 年 8 月重庆医科大学附属一院健康体检者 20 例作为正常对照组,与病例组在年龄、性别及居住区域上均同质,其中 DN 组与 DM 组各选 3 例配对,进行后续芯片检测.

1.2 芯片检测

YM-100 微离心滤器将 3 对 DN 组和 DM 组血清提取 2~5 μg 小 RNA(<300 nt) 用 poly A 聚合酶扩展 3' 末端形成 poly A 尾,然后把一个寡核苷酸标记连接到 ploy A 尾上用于荧光染色.通过微循环泵在 Paraflomicrofluidic 芯片上进行杂交,过夜.在 microfluidic 芯片上,每个检测探针由一个化学修饰核苷酸编码的片段互补地结合到靶 miRNA 或其他 RNA,聚乙二醇的分隔片段促使编码片段从底物中分离出来,检测探针是原位 PCR 化学合成,杂交解链温度的平衡由探针的化学修饰调节完成.杂交反应在 34 $^{\circ}\text{C}$ 下用 100 L 6xSSPE buffer(包含 25% 甲醛胺)平衡.此后,用 tag-specific Cy3 和 Cy5 染料进行荧光标记,用激光扫描器收集杂交的图像.扣除背景,用 LOWESS 滤器规范信号后,根据专业软件分析数据.对于 2 个颜色的实验值,按两组检测信号的比率及 p 值和 t 检验值计算.(此部分在美国休斯顿 LC Science 实验室完成).

1.3 real-time PCR 检测

应用血液 RNA 提取试剂盒(北京天根)提取 RNA,按照说明书操作.采用 Hairpin-itTM miRNAs qPCR Quantitation Kit 试剂盒(上海吉玛),进行逆转录和定量检测.逆转录引物由上海吉玛公司提供,以 U6 为内参.逆转录反应体系为:dNTP(10 mM) 0.75 μL , 5 $\times$ Reverse Transcription Buffer 4 μL , MMLV Reverse Transcriptase(200 U/ μL) 0.2 μL , MiR-RT primers(1 μM) 1.2 μL , RNA 2 ng, RNA-free H₂O 补足至 20 μL 体系.逆转录反应条件为:26 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置.采用 SYBR 法进行定量检测,定量 PCR 反应体积为 20 μL ,包括 2 $\times$ Real-time PCR mix 10 μL (含 SYBR Green),引物(5 μM)0.4 μL , miRNA RT 产物 2 μL , Taq DNA polymerase(5U/ μL)0.2 μL , H₂O 7.4 μL .每个检验指标做 3 个复孔.反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 12 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 40 个循环.最终数据用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 公式分析^[11].

1.4 生物信息学分析

从 PicTar^[12], TargetScan^[13], MiRanda^[14] 的网站下载 miRNA 靶基因预测数据,搜索差异表达 miRNAs 的预测靶基因. PicTar 采用最保守级别(哺乳动物、鸡、鱼)的预测数据. TargetScan 采用保守 miRNA 家族的保守位点预测数据. MiRanda 采用 mirSVR 分值不超过 -0.1 的保守 miRNA 的预测数据.对于每一个差异表达 miRNA,选取从 3 个数据来源均预测到转录本.最后,从转录本找到对应的基因作为预测的靶基因.

应用 Cytoscape^[15] 的插件 BiNGO^[16],对预测到的靶基因做基因本体(Gene Ontology, GO)过度表达(overrepresentation)分析.从 Gene Ontology Consortium^[17] 的网站下载基因本体和人类基因组 GO 注释的数据.其中,基因本体采用最基本的版本(go-basic.obo),过度表达分析采用超几何测试和 Bonferroni 校正,并且以全基因组为参考进行分析.

1.5 统计学分析

应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组组间比较采用 t 检验,两组以上的组间比较采用单因素方差分析, $p < 0.05$ 认为差异有统计学意义.

2 结果与分析

2.1 研究对象的临床特征

DN 组、DM 组和 CON 组的临床特征如表 1 所示.各组年龄、性别均匹配, DN 组和 DM 组患糖尿病年限匹配. DN 组与 DM 组餐后血糖及 HbA1c 均高于 CON 组, DN 组 UAER 高于 DM 组.

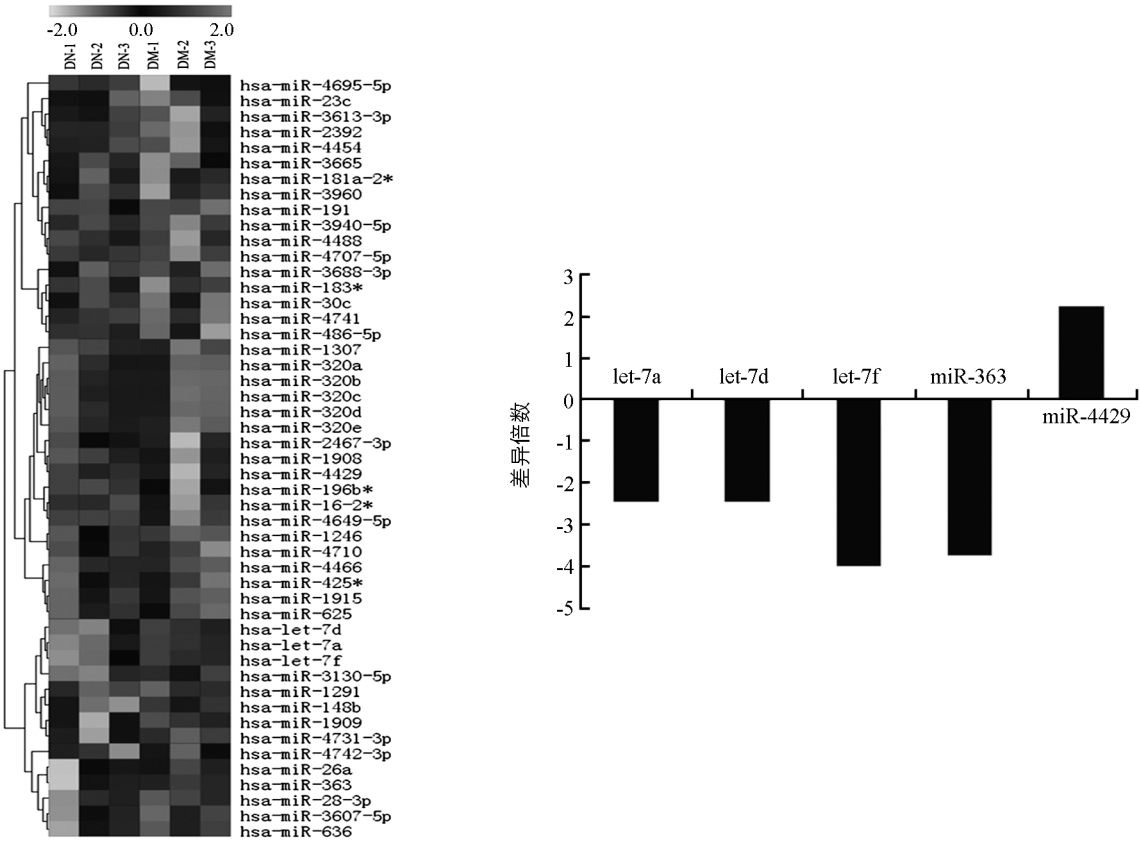
表 1 研究对象的临床病理特征($\bar{x} \pm s$)

	DN($n=20$)	DM($n=20$)	CON($n=20$)
年龄(年)	52.2 $\pm$ 5.1	51.4 $\pm$ 4.6	50.3 $\pm$ 5.7
性别 男	10	10	10
女	10	10	10
糖尿病史(年)	6.3 $\pm$ 3.9	5.5 $\pm$ 3.2	—
餐后血糖/(mmol·L ⁻¹)	14.4 $\pm$ 3.2a	13.5 $\pm$ 2.8a	5.7 $\pm$ 0.5
UAER/(μg·min ⁻¹)	168.2 $\pm$ 20.7b	<20	—
HbA1c/(mmol·L ⁻¹)	9.5 $\pm$ 2.5	8.3 $\pm$ 2.6	—

注: a: $p<0.01$, 与 CON 组比较; b: $p<0.01$, 与 DM 组比较.

2.2 microRNA 芯片检测结果

由于在 DN 的发生中, 患病年限相同的糖尿病患者有的发生糖尿病肾病, 有的却不发生. 因此, 本研究选择早期 DN 患者为疾病组, 与之相配对的患糖尿病年限相同而无 DN 发生的糖尿病患者为对照组, 进行芯片检测. 来自样本总 RNA 经小 RNA 分离后, 分别用 Cy3 和 Cy5 标记, 然后同 miRNA 芯片杂交. 每张芯片由多个重复区域组成. 每个区域的 miRNA 探针序列信息来自于 Sanger miRBase Release 数据库 (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>). 使用 Genepix 4000B 对杂交后的芯片进行图像扫描, 结果如图 1 所示. p 值 <0.05 的显著性差异表达的 miRNA 有 49 个, 其中 35 个 miRNAs 在 DN 组呈高表达, 14 个 miRNAs 在 DN 组呈低表达, 差异倍数为 1.18~4.66. 在这 49 个 miRNAs 中有 5 个 miRNAs 在早期 DN 组和对照组的表达量信号值均大于 1 000, 且差异显著(两组差异大于 2 倍), 在早期 DN 组和对照组的表达量信号值均较高, 提示可靠性、可重复性较好; 差异显著表明与 DN 关系密切. 这 5 个 miRNAs 分别为 let-7a, let-7d, let-7f 和 miR-363 在 DN 中低表达, miR-4429 在 DN 中高表达.

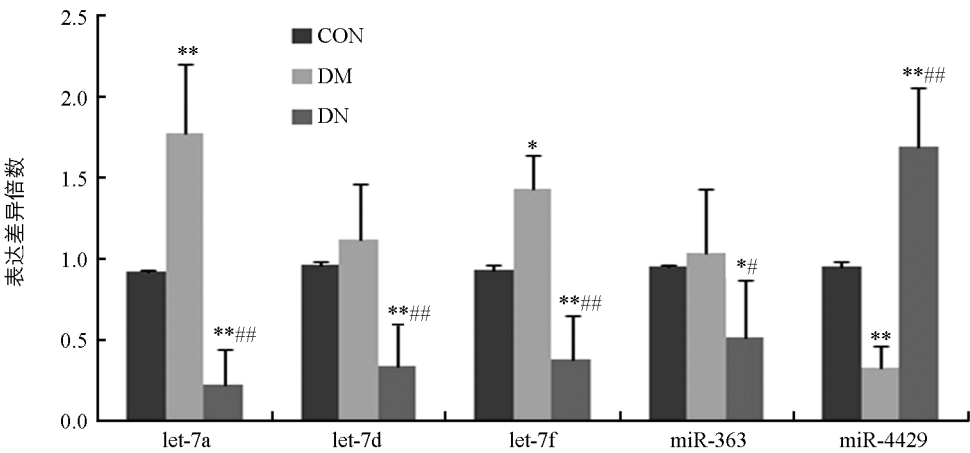


(a) 芯片信号图 (b) DN 差异表达谱 microRNAs 表达差异倍数

图 1 早期 DN 患者及对照循环 microRNA 芯片检测

2.3 Real-time PCR 结果

为进一步验证 microRNA 在 DN 中的差异表达谱,本研究对 DN,DM 和 CON 三组人群进行 let-7a,let-7d,let-7f,miR-363 和 miR-4429 的 real-time PCR 检测.结果显示,let-7a,let-7d,let-7f,miR-363 在 DN 组呈下调趋势,miR-4429 在 DN 组呈上调趋势(图 2),提示定量 PCR 结果与芯片结果趋势一致,表明芯片结果是可靠的.



* : $p < 0.05$, 与 CON 组相比; * * : $p < 0.01$, 与 CON 组相比; # : $p < 0.05$, 与 DM 组相比; # # : $p < 0.01$, 与 DM 组相比.

图 2 real-time PCR 检测 DN 相关 microRNAs 表达

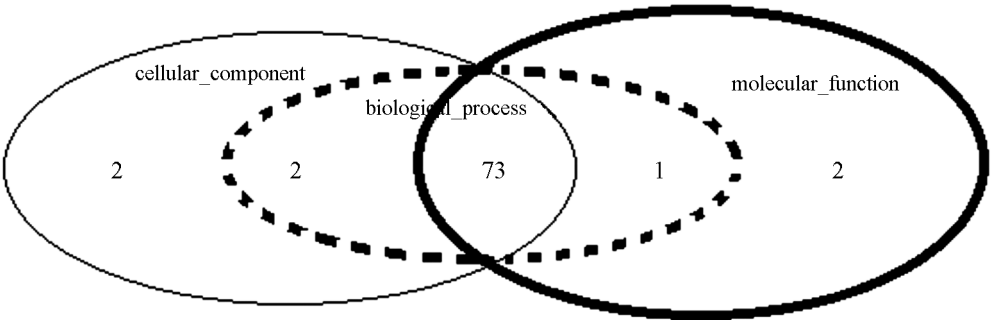
2.4 差异表达 miRNAs 靶基因预测以及靶基因的 GO 分析结果

选择早期 DN 差异表达谱 5 个 microRNAs(let-7a,let-7d,let-7f,miR-363 和 miR-4429)进行靶基因预测,搜索 PicTar,TargetScan 和 MiRanda 的靶基因预测数据,预测它们可能与 DN 相关的靶基因.为了减少假阳性,选取从 3 个数据来源均预测到转录本,再从转录本找到对应的基因作为预测的靶基因.由于从 Miranda 没有预测到 miR-4429 的靶基因,所以对 miR-4429 只考虑 TargetScan 和 PicTar 的预测结果.如表 2 所示,let-7a 预测靶基因 29 个,let-7d 预测靶基因 26 个,let-7f 预测靶基因 30 个,miR-363 预测靶基因 45 个,miR-4429 预测靶基因 12 个.

表 2 靶基因预测结果

miRNA	靶 基 因
let-7a	A2BP1, CHD7, COL1A1, COL1A2, COL24A1, CPEB2, CPEB3, CPEB4, DLC1, DUSP1, FAM189A1, FIGN, FOXP2, GDF6, HMGA2, IGDCC3, MAP3K1, MAPK6, MEIS2, MYCN, NID2, PRTG, RBMS1, RNF165, SYNCRIP, THBS1, TRIM71, USP6, WASL
let-7d	A2BP1, CHD7, COL1A2, COL24A1, CPEB2, CPEB3, CPEB4, DUSP1, FAM189A1, FIGN, FOXP2, GDF6, HMGA2, IGDCC3, MAP3K1, MAPK6, MEIS2, MYCN, NID2, PRTG, RBMS1, RNF165, SYNCRIP, THBS1, TRIM71, WASL
let-7f	A2BP1, CHD7, COL1A1, COL1A2, COL24A1, CPEB2, CPEB3, CPEB4, DUSP1, FAM189A1, FIGN, FOXP2, GDF6, HMGA2, IGDCC3, MAP3K1, MAPK6, MEIS2, MYCN, NID2, NLK, PRTG, RBMS1, RNF165, RNF44, SYNCRIP, THBS1, TRIM71, USP6, WASL
miR-363	ARRDC3, BCL11A, CBFA2T3, CIC, CPEB2, CPEB3, CPEB4, CXXC5, DAB2IP, DSCAML1, EIF4G2, FBXO33, FBXW7, FMR1, FNDC3B, FXR1, FZD10, GLRA1, GRAMD1B, HAND2, HIVEP1, IRS2, JARID2, MYCBP2, NFIB, NIPBL, PCDH10, PCDH9, PPP1R12A, QSER1, RNF38, RNF44, SERTAD2, SMAD7, SNAP91, SNX13, SORL1, SOX11, SOX4, TOB1, TRIO, WASL, ZEB2, ZFHx4, ZNF238
miR-4429	AGFG1, AUTS2, FIGN, GSPT1, KIAA2022, MAGI1, ONECUT1, RAP1A, RBPJ, RUNX1T1, SRRM1, ZFHx4

同时, 将这 5 个 miRNAs 的 81 个预测靶基因合并到一起进行 GO 过度表达分析, 分别对 3 个 GO namespace(biological process,cellular component,molecular function)进行研究, p 值的界限设置为 0.05. 结果发现, 73 个基因在 3 个 namespace 里都被注释, 2 个基因在 biological process 和 cellular component 里被注释, 1 个基因在 biological process 和 molecular function 里被注释, 2 个基因仅在 cellular component 里被注释, 2 个基因仅在 molecular function 里被注释, 只有 1 个基因(QSER1)没有在任何 一个 namespace 里被注释(图 3). 结果提示, 这些预测靶基因无论在细胞组分还是分子功能中与生物学过程都关系密切. 在对预测靶基因 3 个 GO namespace 的深入研究中发现, 靶基因与 cellular components 中细胞核等 4 类细胞组分, 与 molecular function 中 RNA 聚合酶 II 启动子区域序列特异性 DNA 转录因子活性等 13 种分子功能, 以及 biological process 中细胞代谢、系统发育、干细胞增殖等 104 个生物学过程均相关. 由于细胞代谢、干细胞增殖和生长因子反应与 DN 关系密切, 进一步将这 3 个生物学过程涉及的预测靶基因和 DN 差异表达 microRNA 进行整合(表 3).



在每个 namespace 里被注释的基因数量, 虚线代表 biological_process, 细线代表 cellular_component, 粗线代表 molecular_function.

图 3 预测靶基因 GO 分析

表 3 GO 分析结果

GO term	GO namespace	p 值	基因	miRNA
细胞代谢 (GO: 31323)	Biological process	3. 7174E-8	DLC1, CPEB2, CPEB3, GDF6, SORL1, SYN- CRIP, ZEB2, CBFA2T3, SERTAD2, DAB2IP, IRS2, MAGI1, SOX11, FMR1, RUNX1T1, HMGA2, ARRDC3, MYCN, EIF4G2, ZNF238, COL1A1, WASL, SNX13, USP6, ONECUT1, AGFG1, SOX4, CIC, TRIM71, MYCBP2, FBXW7, NIPBL, CHD7, MEIS2, HAND2, MAP3K1, BCL11A, PPP1R12A, THBS1, SMAD7, JARID2, NLK, TRIO, FOXP2, FXR1, ZFHX4, FZD10, DUSP1, A2BP1, RAP1A, HIVEP1, RBPJ, NFIB, TOB1	let-7a, let-7d, let- 7f, miR-363, miR- 4429
干细胞增殖 (GO: 72091)			IRS2, SOX11, HMGA2, NFIB, FOXP2, MY- CN	let-7a, let-7d, let- 7f, miR-363
生长因子反应 (GO: 70848)			IRS2, DAB2IP, MEIS2, SMAD7, NLK, MAP3K1, COL1A2, RAP1A, TRIO, COL1A1, THBS1, TRIM71	let-7a, let-7d, let- 7f, miR-363, miR- 4429

3 讨 论

microRNA 是一类非编码的小 RNA 分子,有 5 端磷酸基和 3 端羟基,定位于 RNA 前体的 3 端或 5 端.自第 1 个 miRNA 分子在线虫中被发现以来^[18],迄今为止已在包括人类、果蝇、植物等多种生物物种中鉴别出超过万种 miRNA 分子.目前越来越多的研究表明,miRNA 通过与靶基因的相互作用,调控着人类至少 1/3 基因的表达,在生理和病理过程中均具有重要作用^[19].

生物芯片(biochip)技术作为 20 世纪 90 年代初发展起来的新技术,具有高通量、高集成、微型化、连续化和自动化等特点.目前芯片技术已经成熟运用到 mRNA 水平基因表达检测上,是检测细胞或组织 miRNA 表达谱的理想方法.由于 RNA 分子易于降解,循环 RNA 的含量一般降低,因此制约了 RNA 分子作为生物标志物的应用.然而循环 microRNA 却具有组织特异性和高稳定性,由此推测 miRNA 可能是一个理想的疾病检测生物学标志物.在不同的疾病中建立特异的循环 miRNA 指纹谱,对疾病的早期诊断具有价值.虽然循环 miRNA 在体液中的存在量高低不等,但完全可以采用基因扩增技术进行检测^[20].

本实验通过 miRNA 芯片检测 DN 组和对照组 miRNA 差异表达谱, DN 组和对照组的 49 个循环 miRNAs 表达有显著性差异($p < 0.05$),其中 35 个 miRNAs 在 DN 组呈高表达,14 个 miRNAs 在 DN 组呈低表达,差异倍数为 1.1~4.66.结合 real-time PCR,本研究发现 5 个 miRNAs 在 DN 中呈差异表达,分别是 let-7a, let-7d, let-7f 和 miR-363 在 DN 中低表达, miR-4429 在 DN 中高表达.由此提示部分循环 miRNAs 在 DN 患者中存在差异表达,可能参与了 DN 发生的分子机制.上述研究结果与国外学者在糖尿病及其并发症同 miRNAs 相关的结论有一致性.研究发现 hsa-miR-657 通过靶向人 IGF2R 基因对 2 型糖尿病的发展产生影响^[21];包括 miR-29a, miR-29b 和 miR-29c 的 miR-29 家族在 2 型糖尿病中发挥一定的作用^[22];过度表达 miR-375 可以抑制小鼠胰腺 β 细胞的胰岛素分泌,导致糖尿病的发生^[23]; miR-133 通过抑制 ERG 基因钾离子通道,促进糖尿病心脏病变的发生^[24].因此,miRNAs 确实在糖尿病及其并发症中发挥作用.在 miRNAs 与 DN 关系的研究中, Kato 等^[25]发现 miR-192 在 DN 中显著增高; Wang 等^[26]通过对高低糖培养的人肾小球系膜细胞进行芯片检测,发现高表达 miR-377 可引起糖尿病肾病纤维粘连蛋白的增加,从而对糖尿病肾病产生作用.本课题组的前期研究也发现 miR-21 和 miR-451 可通过靶向调控基因的信号途径参与 DN 小鼠肾小球系膜细胞增殖^[1-2].以上均提示 miRNAs 可能是参与调控 DN 的重要分子.但同样在 DN 中,具体的 DN 相关 miRNAs 却有差异,提示 miRNAs 的表达可能与 miRNAs 的种属特异性、种族特异性、组织特异性、发育阶段特异性有关,因此将人类疾病的研究回归到人体上,同时在疾病不同的发展阶段进行相关 miRNAs 研究十分必要.

miRNAs 通过对靶基因的表达调控而发挥作用,因此我们对在早期 DN 差异表达谱的 5 个 microRNAs 进行靶点预测,以期进一步认识其与早期 DN 的关系.结果表明 let-7a 共筛选出 29 个基因, let-7d 共筛选出 26 个基因, let-7f 共筛选出 30 个基因, miR-363 共筛选出 45 个基因, miR-4429 共筛选出 12 个基因.这些 miRNAs 作用靶点广泛,涉及细胞代谢、干细胞增殖和生长因子反应的相关基因,而其中胰岛素受体底物 2 基因(insulin receptor substrate2, IRS2)、丝裂原活化蛋白激酶的激酶基因(mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, MAP3K1)、SMAD7(mothers against decapentaplegic homolog 7)、I 型胶原 $\alpha 2$ 链基因(collagen type I 2, COL1A2)等均是与糖尿病及糖尿病肾病关系密切的基因,由此提示 miRNAs 的靶基因预测为深入研究 miRNAs 在早期 DN 发生中的机制提供重要线索.

本实验对早期 2 型糖尿病肾病患者循环 microRNA 进行初步筛查,结合 real-time PCR,建立了由在 DN 中低表达的 let-7a, let-7d, let-7f, miR-363 和在 DN 中高表达的 miR-4429 组成的早期 DN 循环 microRNA 差异表达谱.通过靶基因预测显示, DN 差异表达的循环 microRNAs 的靶点作用广泛,涉及细胞代谢、细胞增殖、生长因子反应等,为深入研究其在早期 DN 中的作用奠定了基础,但 miRNAs 与基因间的调控网络十分复杂,其在早期 2 型糖尿病肾病的具体分子机制还有大量的工作需要完成.

参考文献:

- [1] ZHANG Z, PENG H M, CHEN J X, et al. MicroRNA-21 Protects from Mesangial Cell Proliferation Induced by Diabetic Nephropathy in db/db Mice [J]. FEBS Lett, 2009, 583(12): 2009—2014.
- [2] ZHANG Z, LUO X M, DING S T, 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.
- [3] XI Y, NAKAJIMA G, GAVIN E, et al. Systematic Analysis of microRNA Expression of RNA Extracted from Fresh Frozen and Formalin Fixed Paraffin-Embedded Samples [J]. RNA, 2007, 13(10): 1668—1674.
- [4] NELSON P T, BALDWIN D A, KLOOSTERMAN W P, et al. RAKE and LNA-ISH Reveal microRNA Expression and Localization in Archival Human Brain [J]. RNA, 2006, 12(2): 187—191.
- [5] LAWRIE C H, GAL S, DUNLOP H M, et al. Detection of Elevated Levels of Tumor-Associated MicroRNAs in Serum of Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma [J]. Br J Haematol, 2008, 141(5): 672—675.
- [6] MITCHELL P S, PARKIN R K, KROH E M, et al. Circulating MicroRNAs as Stable Blood-Based Markers for Cancer Detection [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(30): 10513—10518.
- [7] SCHULTZ N A, DEHLENDORFF C, JENSEN B V, et al. MicroRNA Biomarkers in Whole Blood for Detection of Pancreatic Cancer [J]. JAMA, 2014, 311(4): 392—404.
- [8] TSUJIURA M, ICHIKAWA D, KOMATSU S, et al. Circulating microRNAs in Plasma of Patients with Gastric Cancers [J]. Br J Cancer, 2010, 102(7): 1174—1179.
- [9] D'ALESSANDRA Y, DEVANNA P, LIMANA F, et al. Circulating microRNAs are New and Sensitive Biomarkers of Myocardial Infarction [J]. Eur Heart J, 2010, 31(22): 2765—2773.
- [10] WANG J F, YU M L, Yu G, et al. Serum miR-146a and miR-223 as Potential New Biomarkers for Sepsis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(1): 184—188.
- [11] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C (T))} Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402—408.
- [12] KREK A, GRÜN D, POY M N, et al. Combinatorial microRNA Target Predictions [J]. Nat Genet, 2005, 37(5): 495—500.
- [13] LEWIS B P, BURGE C B, BARTEL D P, et al. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates That Thousands of Human Genes Are microRNA Targets [J]. Cell, 2005, 120(1): 15—20.
- [14] BETEL D, KOPPAL A, AQIUS P, et al. Comprehensive Modeling of microRNA Targets Predicts Functional Non-Conserved and Non-Canonical Sites [J]. Genome Biol, 2010, 11(8): R90.
- [15] SAITO R, SMOOT M E, ONO K, et al. A Travel Guide to Cytoscape Plugins [J]. Nat Methods, 2012, 9(11): 1069—1076.
- [16] MAERE S, HEYMANS K, KUIPER M, et al. BiNGO: a Cytoscape Plugin to Assess Overrepresentation of Gene Ontology Categories in Biological Networks [J]. Bioinformatics, 2005, 21(16): 3448—3449.
- [17] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, et al. Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. The Gene Ontology Consortium [J]. Nat Genet, 2000, 25(1): 25—29.
- [18] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The C. Elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes small RNAs with Anti-sense Complementarity to lin-14 [J]. Cell, 1993, 75(5): 843—854.
- [19] LEWIS B P, BURGE C B, BARREL D P. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates That Thousands of Human Genes are microRNA Targets [J]. Cell, 2005, 120(1): 15—20.
- [20] MITCHELL P S, PARKIN R K, KROH E M, et al. Circulating microRNAs as Stable Blood-Based Markers for Cancer Detection [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(30): 10513—10518.
- [21] LV K, GUO Y, ZHANG Y, et al. Allele-Specific Targeting of Hsa-miR-657 to Human IGF2R Creates a Potential Mechanism Underlying the Association of ACAA-Insertion/Deletion Polymorphism with Type 2 Diabetes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(1): 101—105.

- [22] HE A, ZHU L, GUPTA N, et al. Overexpression of Micro Ribonucleic Acid 29, Highly Up-Regulated in Diabetic Rats, Leads to Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes [J]. Mol Endocrinol, 2007, 21(11): 2785—2794.
- [23] POY M N, ELIASSON L, KRUTZFELDT J, et al. A Pancreatic Islet-Specific microRNA Regulates Insulin Secretion [J]. Nature, 2004, 432(7014): 226—230.
- [24] XIAO J, LUO X, LIN H, et al. MicroRNA miR-133 Represses HERG K⁺ Channel Expression Contributing to QT Prolongation in Diabetic Hearts [J]. J Biol Chem, 2007, 282(17): 12363—12367.
- [25] 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 USA, 2007, 104(9): 3432—3437.
- [26] WANG Q, WANG Y, MINTO A W, 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.

A Study on the Differential Expression Profiling of Circulating MicroRNAs in Diabetic Nephropathy

PENG Rui¹, ZHA He², ZHOU Ji²,
PENG Hui-min³, ZHANG Zheng²

1. Department of Bioinformatics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Cell Biology and Medical Genetics, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

3. Department of Experimental Teaching Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective: To explore the circulating microRNA (miRNA) differential expression profile between diabetic nephropathy (DN) patients and their controls, and to provide evidence that miRNAs are involved in the molecular pathogenesis of DN. Methods: miRNA array and real-time PCR were used to test the expression of circulating miRNAs in early DN patients. The target genes were predicted by bioinformatics methods. Results: miRNA array results showed that 49 miRNAs were differentially expressed in DN, of which 22 had high signal value ($>1\ 000$), with 17 up-regulated and 5 down-regulated. Five miRNAs with high fold change (>2) were chosen to be tested by real-time PCR, and the data of miRNA array was confirmed by real-time PCR. Data showed let-7a, let-7d, let-7f and miR-363 were down-regulated, while miR-4429 was up-regulated in DN. Moreover, the target genes were predicted, including DN related genes in cellular metabolic process, growth factor response and cell proliferation, by bioinformatics technology. Conclusion: Some miRNAs were expressed differentially between DN patients and the control, suggesting that they may be involved in the pathogenesis of early DN.

Key words: diabetic nephropathy; microRNA; expression profile

责任编辑 夏 娟

