

· 基础研究 ·

自发性 2 型糖尿病 KKAy 小鼠肾小球 microRNA 表达谱和氯沙坦治疗效应

范秋灵 张丛笑 刘晓丹 杨刚 姜奕 董雪竹 冯江敏 马健飞
张玉侠 王力宁

【摘要】目的 分析糖尿病肾病(DN)发病过程中肾小球 miRNA 表达谱的变化,观察血管紧张素受体拮抗剂(ARB)氯沙坦对 DN 肾小球 miRNA 表达谱的影响,确认在 DN 发病过程中发挥关键作用的 miRNA。**方法** 8 周龄 KKAy 小鼠随机分为氯沙坦治疗组($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和非治疗组,C57BL/6 小鼠作为正常对照组。于 20 周龄检测体质量、随机血糖、尿微量白蛋白、尿肌酐,观察肾脏形态改变。应用磁珠灌注法分离肾小球,提取总 RNA,应用 Affymetrix GeneChip miRNA 芯片,分析 KKAy 小鼠肾小球 microRNA 表达谱的变化,以及氯沙坦对 microRNA 表达谱的影响。**结果** KKAy 小鼠的体质量和血糖较正常对照 C57BL/6 组小鼠显著升高(均 $P < 0.05$),氯沙坦治疗显著改善 2 型糖尿病 KKAy 小鼠的尿白蛋白/肌酐比值 [$539.71 \pm 100.23 \text{ mg/g}$ 比 $(728.00 \pm 177.19) \text{ mg/g}$, $P < 0.05$]和肾脏病理损害,而对血糖无影响。miRNA 芯片分析结果发现,与正常对照 C57BL/6 小鼠相比,20 周龄 KKAy 小鼠肾小球内 10 个 miRNA 的表达上调;12 个 miRNA 的表达下调。与 KKAy 非治疗组小鼠相比,20 周龄氯沙坦治疗组 KKAy 小鼠肾小球内共有 4 个 miRNA 表达下调,其中 miR-503 和 miR-181d 在 KKAy 非治疗组小鼠肾小球内的表达显著上调,氯沙坦治疗可抑制其过表达。**结论** miR-503 和 miR-181d 在糖尿病 KKAy 小鼠肾小球内的表达显著上调,氯沙坦治疗可抑制其在糖尿病状态下的异常表达,可能为糖尿病肾病新的治疗靶点。

【关键词】 糖尿病肾病; 肾小球; 微小 RNAs; 血管紧张素 II 1 型受体拮抗剂; KKAy 小鼠

The glomerular microRNA expression profile in spontaneous type 2 diabetes KKAy mice and the effect of losartan treatment FAN Qiu-ling, ZHANG Cong-xiao, LIU Xiao-dan, YANG Gang, JIANG Yi, DONG Xue-zhu, FENG Jiang-min, MA Jian-fei, ZHANG Yu-xia, WANG Li-ning. Department of Nephrology, the First Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China

【Abstract】Objective To identify susceptible miRNAs for the pathogenesis of diabetic nephropathy (DN) and the molecular targets of losartan treatment. **Methods** The 8-week age KKAy mice were divided into losartan treatment group ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and non-treatment group, C57BL/6 mice were used as the control group. At age of 20 weeks, body weight, random blood glucose, urinary albumin and urinary creatinine were tested, and kidney morphology was observed. Glomeruli were separated by magnetic beads perfusion, and total RNA were extracted. MiRNAs expression profiles were analyzed by the Affymetrix GeneChip miRNAs arrays. **Results** At age of 20 weeks, KKAy mice developed higher body weight, higher blood glucose and higher urinary microalbumin creatinine ratio than C57BL/6 mice, and the glomerular basement membrane thickened, mesangial matrix widened. Losartan treatment markedly improved the level of urinary

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2012.05.010

基金项目:国家自然科学基金(30700369);辽宁省教育厅科学技术研究项目(L2010658);沈阳市科技计划项目(F11-264-1-38)

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学附属第一医院肾内科

albumin creatinine ratio [(539.71±100.23) mg/g vs (728±177.19) mg/g, $P<0.05$] and pathological lesion of KKAY mice. The miRNA array analysis showed that there were 22 miRNAs differentially expressed between KKAY non-treatment mice and C57BL/6 mice glomeruli at age of 20 weeks. Among them, 10 miRNAs were up-regulated, and 12 miRNAs were down-regulated. The expression of 4 miRNAs was down-regulated in glomeruli of KKAY mice treated by losartan compared with that of non-treatment mice. The expressions of miRNA-503 and miRNA-181d were significantly up-regulated in the glomeruli of KKAY mice and inhibited by losartan treatment. **Conclusion** The expressions of miRNA-503 and miRNA-181d are significantly up-regulated in the glomeruli of KKAY mice and inhibited by losartan treatment, which may be new therapeutic targets of DN.

【Key words】 Diabetic nephropathy; Glomeruli; miRNAs; Angiotensin II type 1 receptor blockers; KKAY mice

糖尿病肾病(DN)已成为终末期肾衰竭的主要原因,但其发病机制目前尚不十分明确,治疗方法尚有待探索与完善^[1-3]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类约 21~23 个核苷酸的非编码 RNA 分子,通过与靶基因 mRNA 的特定位点结合,抑制该蛋白的合成或诱导该 mRNA 的降解,从而参与基因的表达调控。目前 miRNA 已成为基因表达调控研究的热点领域,与肿瘤、内分泌疾病等多种疾病关系密切。最近的研究表明 miRNA 参与调控糖尿病肾病相关的关键基因的表达^[4-5]。自发性 2 型糖尿病 KKAY 小鼠是目前国际上广为采用的研究早期糖尿病肾病的动物模型,其肾脏损害与人类 DN 非常相似,肾小球内出现系膜细胞增生、系膜基质增宽,基底膜增厚,并且随着年龄的增加逐渐出现显性蛋白尿^[6]。本实验在既往易感基因定位、基因芯片和蛋白组学研究的基础上,应用磁珠灌注法分离 KKAY 小鼠肾小球,分析 DN 发病过程中肾小球 miRNA 表达谱的变化,观察血管紧张素受体拮抗剂(ARB)氯沙坦对 DN 肾小球 miRNA 表达谱的影响,确认在 DN 发病过程中发挥关键作用的 miRNA,从 miRNA 水平探讨 ARB 的治疗机制,为 DN 寻找新的治疗靶点。

材料与方 法

一、材料

1. 实验动物:无特定病原体(SPF)级雄性自发性 2 型糖尿病 KKAY 小鼠[(中国协和医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(京)2005-0013)];SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠[(中国医科大学实验动物部,许可证号:SCXK(辽)2008-0005)]。

2. 主要试剂和仪器:磁珠(德国 Dynal Biotech Introgen),胶原酶 A(德国 Roche),氯沙坦粉末(美国默沙东),ELISA microalbuminuria 试剂盒(美国 R&B),ELISA Creatinine 试剂盒(美国 R&B),Trizol 试剂(德国 Dynal Biotech/Introgen),ACCU-CHEK Performa 血糖仪(德国 Roche),磁力收集器(德国 Dynal Biotech/Introgen),miRNA 芯片(美国 Affymetrix GeneChip)。

二、方法

1. 动物的分组及处理:将 20 只 SPF 级雄性 8 周龄自发性 2 型糖尿病 KKAY 小鼠随机分为氯沙坦治疗组($n=10$),非治疗组($n=10$);雄性 8 周龄 C57BL/6 小鼠作为正常对照组($n=10$)。KKAY 小鼠给予高脂饮食喂养,治疗组从 8 周龄始饮水喂入氯沙坦[$10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$],监测小鼠体质量及饮水量变化情况,动态调整氯沙坦给药浓度,非治疗组普通饮水^[7]。

2. 常规和生化指标检测:定期测定小鼠体质量;于 20 周龄尾静脉取血测随机血糖;于 20 周龄采用提尾反射法收集各组小鼠随机尿液,采用 ELISA 试剂盒检测尿微量白蛋白和尿肌酐,计算尿白蛋白/肌酐比值。于 20 周龄处死小鼠后留取肾脏皮质,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋切片,行 HE 染色、PAS 染色,普通光学显微镜下观察肾脏病理变化。

3. 肾小球分离:小鼠麻醉后,经腹主动脉灌注冰 PBS 溶液除去肾内血液,将 $4.5\ \mu\text{m}$ 磁珠灌注于肾脏内,摘除肾脏,粉碎并离心,应用磁力收集器,3 步法洗脱程序分离肾小球,离心法除去磁珠,获取肾小球。

4. 提取样本总 RNA:将分离出的肾小球存放于 Trizol 试剂中,按照 Trizol 试剂的标准操作步

骤抽提总 RNA。

5. miRNA 芯片高通量筛选: 将提取的 KKAy 非治疗组、KKAy 氯沙坦治疗组及正常对照 C57BL/6 小鼠肾小球总 RNA 进行靶标制备, 芯片杂交, 芯片清洗染色与扫描后, 应用 miRNA 芯片分析系统 (Affymetrix® GeneChip® Command Console™ 1.1, miRNA QC Tool 软件) 筛选出在 3 组小鼠间表达有差异的 miRNA。筛选标准如下: 上调基因: Detection 在 B 通道为 TRUE; Ratio ≥ 2 ; 下调基因: Detection 在 A 通道为 TRUE; Ratio ≤ 0.5 。参照 miRNA 数据库 the Sanger miRBase miRNA database v11 (April 15, 2008, <http://microrna.sanger.ac.uk>) 确认 miRNA 的序列, 并应用 Cluster 3.0 软件进行聚类分析^[8-9]。

6. 实时 PCR 反应验证基因芯片结果: 选择在糖尿病状态下和氯沙坦治疗后均存在差异表达的 miRNA-503 和 miRNA-181d, 实时 PCR 法验证 miRNA 芯片的结果。试验所用引物序列见表 1。应用 miRNA Specific Stem-Loop RT-Primer 将 miRNA 反转录成 cDNA。以反转录合成的 cDNA 为模板, 应用 miScript Primer Assay 配合 miScript SYBR Green PCR Kit 进行实时 PCR 分析。实时 PCR 条件: 95°C 10 min, 95°C 15 s, 60°C 1 min, 循环 40 次。随后在 60°C~95°C 的区间内进行熔解实验。以 U6 RNA 作为内参照, 循环阈值 (Ct) 比较法进行 miRNA 表达的相对定量分析^[10]。目的基因相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示的是 KKAy 非治疗组和 KKAy 氯沙坦治疗组目的基因表达相对于正常对照 C57BL/6 组的变化倍数。 $\Delta\Delta Ct = (\text{Ct 目的} - \text{Ct 内参})_{\text{实验}} - (\text{Ct 目的} - \text{Ct 内参})_{\text{对照}}$ 。

7. 生物信息学分析: 应用互联网 miRNA 靶基因预测软件 Pictar (<http://pictar.bio.nyu.edu/>)、

TargetsCan (<http://www.targetscan.org/>)、MiRanda (<http://www.microrna.org/>) 在线服务站点搜索差异表达 miRNAs 的预测靶基因。

8. 统计学处理: 实验计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理。

结 果

1. 氯沙坦对自发性 2 型糖尿病 KKAy 小鼠肾脏损害的保护作用: KKAy 小鼠的体质量和血糖较正常对照 C57BL/6 组小鼠显著升高 (均 $P < 0.05$), 20 周龄 KKAy 小鼠尿白蛋白/肌酐比明显增加 ($P < 0.05$), 肾小球基底膜增厚, 系膜基质增宽。氯沙坦治疗显著改善 2 型糖尿病 KKAy 小鼠的尿白蛋白排泄率和肾脏病理损害, 见表 2, 图 1。

2. miRNA 表达谱的系统聚类分析: 本实验成功提取出肾小球 RNA, 纯度 $A_{260}/A_{280} \geq 1.80$, 总量 $\geq 15 \mu\text{g}$, RNA 完整。各项检测参数满足 Affymetrix® miRNA 芯片实验要求, 见表 3。184 个 miRNAs 在 3 组小鼠肾小球存在差异表达, 聚类分析结果见图 2。

3. KKAy 非治疗组小鼠与正常对照 C57BL/6 小鼠肾小球内差异表达 miRNAs: 22 个 miRNAs 在 KKAy 非治疗组小鼠和正常对照 C57BL/6 小鼠肾小球内表达差异大于 2 倍, 其中 10 个 miRNA

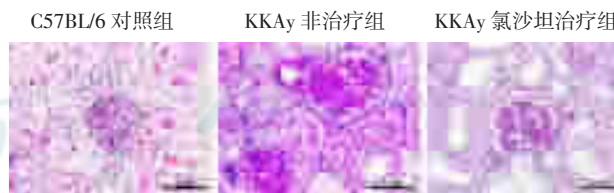


图 1 各组小鼠肾脏病理改变 (PAS $\times 400$)

表 1 实时 PCR 反应所用引物序列

基因	引物序列 (5'→3')
U6-上游	CTCGCTTCGGCAGCAC
U6-下游	AACGCCTTCACGAATTTGCGT
miRNA 通用正义链引物	GTGCAGGGTCCGAGCT
mmu-miR-503-star	GAGTATGTTTCCACTGCCTGG
mmu-miR-503-star-反转录	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACccagge
mmu-miR-503-star-反义链	GCTGAGTATTGTTTCCACTGCC
mmu-miR-181d	AACATTCATTGTTGTCGGTGGGT
mmu-miR-181d-反转录	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACceccac
mmu-miR-181d-反义链	TGATACATTTCATTGTTGTCGGT

表 2 各组小鼠的生化及代谢指标($\bar{x} \pm s$)

项目	C57BL/6 对照组(n=10)	KKAy 非治疗组(n=10)	KKAy 氯沙坦治疗组(n=10)
体质量(g)	30.32±1.30	46.88±2.61 ^a	45.08±1.96 ^a
随机血糖(mmol/L)	11.07±1.26	29.62±3.99 ^a	30.41±3.83 ^a
Scr(μ mol/L)	32.67±4.51	30.33±5.82	35.20±17.68
BUN(mmol/L)	11.03±2.97	12.30±3.18	9.50±2.74
尿白蛋白/肌酐比值(mg/g)	49.37±18.77	728.00±177.19 ^a	539.71±100.23 ^{ab}

注:与 C57BL/6 正常对照组相比,^a $P < 0.05$;与 KKAy 非治疗组相比,^b $P < 0.05$

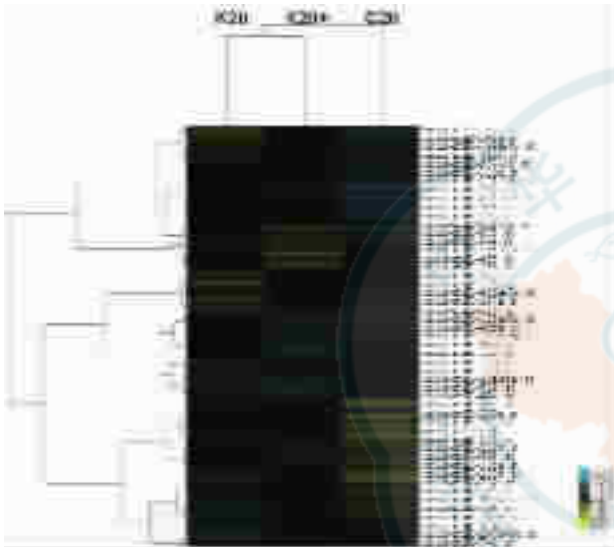


图 2 3 组小鼠肾小球 microRNAs 表达的聚类分析
注:K20:20 周龄 KKAy 非治疗组小鼠肾小球;K20+:20 周龄 KKAy 氯沙坦治疗组小鼠肾小球;C20:20 周龄 C57BL/6 小鼠肾小球

表 3 microRNA 芯片检测结果

组别	平均强度	检测到的探针数
C57BL/6 小鼠肾小球	197.7432	1926
KKAy 非治疗组小鼠肾小球	184.8056	1858
KKAy 氯沙坦治疗组小鼠肾小球	183.8406	1959

的表达上调,包括 miR-503、miR-669、miR-181d 和 miR-29b 等,见表 4;12 个 miRNA 的表达下调,包括 miR-16、miR-194 以及 miR-200a-c 等,见表 5。

4. 氯沙坦治疗对 2 型糖尿病 KKAy 小鼠肾小球 miRNA 表达谱的影响:与 KKAy 非治疗组相比,氯沙坦治疗组 KKAy 小鼠肾小球内共有 4 个 miRNA 表达下调,包括 miR-21、miR-196、miR-503 和 miR-181d,见表 6。miR-503 和 miR-181d 在糖尿病 KKAy 小鼠肾小球内表达上调;KKAy 非

表 4 20 周龄 2 型糖尿病 KKAy 小鼠肾小球内表达上调的 miRNAs

miRNA	肾小球杂交信号强度		变化倍数
	KKAy 小鼠	C57BL/6 小鼠	
miR-503-star	27.87	2.27	12.29
miR-669b	33.49	4.24	7.89
miR-181d	26.21	7.80	3.36
miR-146a	189.20	62.39	3.03
miR-615-3p	28.11	10.08	2.79
miR-669c	32.14	11.95	2.69
miR-297a	39.83	15.90	2.51
miR-133a	31.55	12.84	2.46
miR-29b	21.17	9.67	2.19
miR-574-3p	243.55	114.68	2.12

注:变化倍数=KKAy 非治疗组小鼠肾小球/C57BL/6 小鼠肾小球

表 5 20 周龄 2 型糖尿病 KKAy 小鼠肾小球内表达下调的 miRNAs

miRNA	肾小球杂交信号强度		变化倍数
	KKAy 小鼠	C57BL/6 小鼠	
miR-127_st	7.99	51.71	0.16
miR-379_st	10.45	36.22	0.29
miR-200c_st	67.63	167.86	0.40
miR-709_st	1996.23	4900.21	0.41
miR-714_st	95.39	227.38	0.42
miR-429_st	16.90	38.73	0.44
miR-194_st	134.08	305.91	0.44
miR-200b_st	46.32	100.62	0.46
miR-200a_st	33.05	68.59	0.48
miR-874_st	26.89	54.29	0.50
miR-16-star	23.37	46.94	0.50
miR-760	17.83	35.83	0.50

注:变化倍数=KKAy 非治疗组小鼠肾小球/C57BL/6 小鼠肾小球

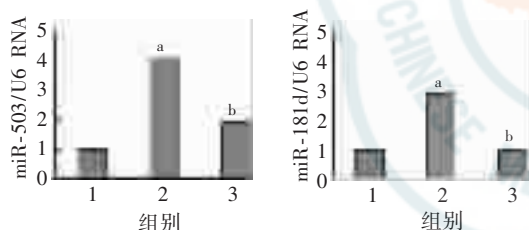
表6 氯沙坦治疗后2型糖尿病KKAy小鼠肾小球内表达下调的miRNAs

miRNA	肾小球杂交信号强度		变化倍数
	治疗组	非治疗组	
mmu-miR-181d	9.73	26.21	0.37
miR-503-star	11.29	27.87	0.41
miR-196a	19.70	44.17	0.45
miR-21	20.44	43.47	0.47

注:变化倍数=KKAy 氯沙坦治疗组小鼠肾小球/KKAy 非治疗组小鼠肾小球

治疗组/C57BL/6小鼠肾小球分别为12.292和3.363。氯沙坦治疗抑制了miR-503和miR-181d的异常表达:KKAy 氯沙坦治疗组/KKAy 非治疗组小鼠肾小球分别为0.405和0.371。

5. 实时PCR反应证实了miRNA基因芯片的结果:PCR反应的结果见图3,miR-503和miR-181d在糖尿病KKAy小鼠肾小球内表达上调,氯沙坦治疗抑制了其异常表达。



注:1:C57BL/6小鼠肾小球;2:KKAy非治疗组小鼠肾小球;3:KKAy氯沙坦治疗组小鼠肾小球;与C57BL/6组比较,^a $P < 0.01$;与KKAy非治疗组比较,^b $P < 0.05$

图3 miR-503和miR-181d的mRNA表达(实时PCR)

讨 论

据报道,至少5个miRNAs(miR-192、-194、-204、-215和-216)高度特异地在肾脏表达,其中miR-192参与TGF- β 1介导的I型胶原和III型胶原的合成^[11-12]。DN状态下miR-377表达上调,增加纤连蛋白的生成^[13]。miR-21的过表达抑制糖尿病db/db小鼠系膜细胞增殖,减少24h尿白蛋白排泄率^[14]。miR-25作为一个内源性的基因沉默因子,是DN状态下的NOX4基因表达的重要调控因子^[15]。然而,既往的研究多为肾皮质或系膜细胞的研究,糖尿病状态下肾小球miRNA表达谱的变化尚未见报道,miRNA体内干扰对DN作

用的研究亦鲜有报道^[16]。同样肾素-血管紧张素-醛固酮(RAAS)系统阻断剂对DN肾小球miRNA表达谱的影响亦未见报道。

为明确在DN发病过程中发挥关键作用的miRNA,以及氯沙坦治疗对DN肾小球miRNA表达谱的影响,本实验应用磁珠灌注法分离肾小球,应用快速有效的miRNA芯片技术,结果发现,与正常对照C57BL/6小鼠相比,20周龄KKAy小鼠肾小球内10个miRNA的表达上调,12个miRNA的表达下调。氯沙坦治疗后,KKAy小鼠肾小球内共有4个miRNAs表达下调,其中miR-503和miR-181d在KKAy小鼠肾小球内的表达显著上调,氯沙坦治疗可抑制其表达,可能为DN新的治疗靶点。

我们的研究结果显示miR-29b和miR146a在糖尿病KKAy小鼠肾小球中的表达分别上调了2.189和3.032倍,而miR-194和miR-200c的表达则分别下调了2.283和2.481倍,氯沙坦治疗抑制了miR-21的表达2.128倍。而Saal等^[4]证实miR-21、miR-29b、miR146a、miR-194以及miR-200c在人类和小鼠肾脏中均有表达。因此我们推测在小鼠肾小球发现的这些差异性表达的miRNA,可能同样参与了人类DN的发生发展。

本研究中,miR-503在KKAy小鼠肾小球内的表达显著上调,氯沙坦治疗可抑制其表达。miR-503可以调控泛素特异性肽酶、锌指蛋白423和Smad特异性E3泛素蛋白连接酶1等299个靶基因的表达。Caporali等^[17]报道,高糖显著上调了人内皮细胞miR-503的表达,糖尿病状态下小鼠缺血的肢体肌肉中miR-503的表达上调,上调表达的miR-503抑制了内皮细胞增殖和内皮网状结构的形成,而抑制miR-503的活性加速了糖尿病肢体缺血小鼠模型的血管愈合和血流量的恢复。因此,调控miR-503表达可能是新的促进糖尿病患者血管新生的手段。在诊断方面,需开展进一步的研究来证明miR-503作为进展性血管疾病的生物标志物的价值。miR-503在DN中的表达变化和和功能研究目前尚未见报道。

miR-181d在KKAy小鼠肾小球内的表达显著上调,氯沙坦治疗可抑制其表达。miR-181可以调控691种预测靶基因的表达,其中包括转化生长因子 β 诱导的,有丝分裂原激活蛋白激酶4、激酶7、激酶10,AMP活化的 γ 2等多种在DN发

病过程中发挥着重要作用的生长因子和信号转导蛋白^[18]。miR-181 可以下调同源异型框蛋白 A11 (Hox-A11, 一种分化过程的抑制物), 影响肌细胞的终末分化^[19]。Li 等^[20]建立了一个特异地表达针对 miR-181 的小干扰 RNA (siRNA) 慢病毒质粒, 发现该质粒转染后通过抑制 miR-181 的表达, 显著减少了心肌梗死大鼠骨骼肌细胞移植后心律失常的发生。miR-181 在 DN 中的表达变化和功能研究目前尚未见报道。

我们的实验首次发现 miR-503 和 miR-181d 在 20 周龄 2 型糖尿病 KKAy 小鼠肾小球内的表达显著上调, 氯沙坦治疗可抑制其表达, 同时减轻 KKAy 小鼠的尿白蛋白排泄率和肾脏病理损害。同时进行的蛋白组学研究也发现了 miR-503 和 miR-181d 的预测靶基因三磷酸腺苷酶, Na⁺/K⁺ 运输, β 1 多肽、热休克蛋白和 B 细胞慢性淋巴细胞白血病/淋巴瘤 3 的表达变化, 提示血管紧张素 II 受体拮抗剂对 DN 的保护作用可能是通过影响 miR-503 和 miR-181d 调控网络实现的。我们将进一步通过转染 miR-503 和 miR-181d 的 siRNA, 调控其靶基因的表达, 观察 2 型糖尿病 KKAy 小鼠 DN 临床和病理损害的变化, 有望为 DN 发病机制的阐明和基因治疗提供新策略和新方法。

参 考 文 献

- Gray SP, Cooper ME. Diabetic nephropathy in 2010: Alleviating the burden of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7: 71-73.
- Doria A. Genetics of diabetes complications. *Curr Diab Rep*, 2010, 10: 467-475.
- Nawroth PP, Isermann B. Mechanisms of diabetic nephropathy—old buddies and newcomers part 1. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2010, 118: 571-576.
- Saal S, Harvey SJ. MicroRNAs and the kidney: coming of age. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009, 18: 317-323.
- Kato M, Arce L, Natarajan R. MicroRNAs and their role in progressive kidney diseases. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009, 4: 1255-1266.
- Diani AR, Sawada GA, Zhang NY, et al. The KKAy mouse: A model for the rapid development of glomerular capillary basement membrane thickening. *Blood Vessels*, 1987, 24: 297-303.
- Sasaki M, Uehara S, Ohta H, et al. Losartan ameliorates progression of glomerular structural changes in diabetic KKAy mice. *Life Sci*, 2004, 75: 869-880.
- de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, et al. Open source clustering software. *Bioinformatics*, 2004, 20: 1453-1454.
- Saldanha AJ. Java Treeview-extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics*, 2004, 20: 3246-3248.
- Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, et al. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*, 2008, 44: 31-38.
- Sun Y, Koo S, White N, et al. Development of a microarray to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32: e188.
- Kato M, Zhang J, Wang M, et al. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF- β -induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 3432-3437.
- Wang Q, Wang Y, Minto AW, et al. MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy. *FASEB J*, 2008, 22: 4126-4135.
- Zhang Z, Peng H, Chen J, et al. MicroRNA-21 protects from mesangial cell proliferation induced by diabetic nephropathy in db/db mice. *FEBS Lett*, 2009, 583: 2009-2014.
- Fu Y, Zhang Y, Wang Z, et al. Regulation of NADPH oxidase activity is associated with miRNAs-25-mediated NOX4. *Am J Nephrol*, 2010, 32: 581-589.
- Long J, Wang Y, Wang W, et al. MicroRNA-29c is a signature microRNA under high glucose conditions that targets Sprouty homolog 1, and its in vivo knockdown prevents progression of diabetic nephropathy. *J Biol Chem*, 2011, 286: 11837-11848.
- Caporali A, Meloni M, Völlenkle C, et al. Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after Limb Ischemia. *Circulation*, 2011, 123: 282-291.
- Wang B, Hsu SH, Majumder S, et al. TGF beta-mediated upregulation of hepatic miR-181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3. *Oncogene*, 2010, 29: 1787-1797.
- Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Poleskaya A, et al. The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol*, 2006, 8: 278-284.
- Li YG, Zhang PP, Jiao KL, et al. Knockdown of microRNA-181 by lentivirus mediated siRNA expression vector decreases the arrhythmogenic effect of skeletal myoblast transplantation in rat with myocardial infarction. *Microvasc Res*, 2009, 78: 393-404.

(收稿日期: 2011-10-28)

(本文编辑: 王欣)