

miR-23b-3p 调控肾间质成纤维细胞成骨样分化 参与 Randall 斑形成的机制研究

雷 波¹, 邱明星¹, 刘健男²

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.012

摘要 目的 探究 miR-23b-3p 对肾间质成纤维(hRIFs)细胞成骨样分化和 Randall 斑形成的影响及其可能机制。方法 采用 qRT-PCR 技术检测草酸钙(CaOx)结石患者 Randall 斑组织(RP)和接受肾切除术的肾肿瘤患者正常乳头状组织(nRP)的 miR-23b-3p 和肌细胞特异性增强因子 2C(MEF2C)、成骨标志物人骨钙蛋白(OCN)、骨桥蛋白(OPN)、Runx 相关转录因子 2(Runx2)的 mRNA 表达水平;体外分离、培养 hRIFs 细胞,将 miR-23b-3p 过表达质粒 pSi-miR-23b-3p 及空载质粒 pSi-NC 和 MEF2C 慢病毒过表达质粒 Lv-MEF2C 及空载质粒 Lv-NC 转染至 hRIFs 细胞中,并诱导细胞成骨分化 14 d;ELISA 法检测细胞碱性磷酸酶(ALP)活性;茜素红染色观察各组细胞矿化结节形成情况;qRT-PCR 检测细胞中 miR-23b-3p 和 MEF2C、OCN、OPN、Runx2 mRNA 表达水平;Western blot 检测细胞中 MEF2C 蛋白表达水平;双荧光素酶报告基因实验验证 miR-23b-3p 与 MEF2C 的靶向关系。结果 ①与 nRP 组比较,RP 组中 miR-23b-3p 低表达,而 MEF2C、OCN、OPN 和 Runx2 mRNA 高表达;②hRIFs 成骨诱导 14 d 后,细胞中 ALP 活性升高,矿化结节形成能力增强,miR-23b-3p 表达水平降低,而 MEF2C、OCN、OPN 和 Runx2 mRNA 表达水平及 MEF2C 蛋白表达水平升高;③miR-23b-3p 过表达降低成骨诱导后 hRIFs 细胞中 ALP 活性,抑制细胞矿化结节形成能力,下调细胞中 OCN、OPN、Runx2 mRNA 表达水平;④MEF2C 过表达可逆转 miR-23b-3p 过表达对 hRIFs 细胞成骨分化的抑制作用;⑤MEF2C 是 miR-23b-3p 下游靶基因。结论 miR-23b-3p 在 RP 组织及 hRIFs 细胞成骨样分化过程中低表达,上调 miR-23b-3p 可抑制 hRIFs 细胞的成骨样分化,其作用机制可能与靶向沉默 MEF2C 有关。

关键词 miR-23b-3p;人肾间质成纤维细胞;肌细胞增强因子 2C;成骨样分化;Randall 斑;草酸钙结石

中图分类号 R 691.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)12-2064-09

2023-09-19 接收

基金项目:四川省自然科学基金青年科学基金(编号:2022NSFSC1583)

作者单位:¹西南医科大学临床学院,泸州 646099

²四川省人民医院泌尿外科,成都 610072

作者简介:雷 波,男,主治医师;

邱明星,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:nixi-aqy337@163.com

肾结石是晶体物质在肾脏的异常聚积所致,是一种常见的泌尿系统疾病。据报道,2016 年我国肾结石的患病率约为 5.8%~7.5%^[1],而 2020 年美国肾结石患病率约为 10%^[2]。目前,临床常采用超声、手术治疗肾结石,但存在易复发、尿路感染及肾脏损伤等隐患。研究^[3]表明,超过 70% 结石类型为草酸钙(calcium oxalate, CaOx)结石,其起源于肾乳头钙化斑块 Randall 斑,而 Randall 斑的形成与肾组织细胞成骨分化有关^[4]。研究^[5]显示,miR-23b-3p 在 Randall 斑与正常肾乳头状组织中差异表达。肌细胞增强因子 2(myocyte enhancer factor 2, MEF2)C 是 MEF2 亚家族的成员之一,在 MgCl₂ 诱导的成骨分化后的小鼠间充质干细胞中表达上调^[6]。上述研究结果提示,miR-23b-3p 和 MEF2C 均参与细胞成骨分化过程,但具体调控机制不明。因此,该研究旨在探讨 miR-23b-3p 是否通过靶向调控 MEF2C 对肾间质成纤维细胞(human renal interstitial fibroblasts, hRIFs)成骨样分化的影响,旨在为防治 CaOx 结石提供新方向。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2019 年 11 月至 2021 年 6 月期间在西南医科大学临床学院治疗的 37 例 CaOx 结石患者的 Randall 斑(Randall plaque, RP)组织作为研究组,另收集同时期 26 例在西南医科大学临床学院接受肾切除术的肾肿瘤患者的正常乳头状(normal Randall plaque, nRP)组织作为对照组。其中研究组患者男性 20 例,女性 17 例,年龄范围:21~63(43±8.57)岁;对照组患者均无泌尿系结石病史,其中男性 14 例,女性 12 例,年龄范围:28~62(41±6.28)岁。两组患者年龄、性别差异无统计学意义。本研究通过本院伦理委员会批准(编号:LZ201901023),患者和家属均签署知情同意书。RP 和 nRP 组织标本通过手术取出后迅速置于液氮中,之后将标本移至-80℃冰箱冻存,用于后续实验。

1.2 主要试剂和仪器 DMEM/F12 培养基、opti-MEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; β -甘油磷酸钠、地塞米松、维生素 C 购自美国 Sigma 公司;青-链霉素(P-S)、成骨细胞矿化结节染色试剂盒(茜素红 S 法)、Triton X-100、牛血清白蛋白(BSA)、Lipo8000™转染试剂、BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;人碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) ELISA 试剂盒购自武汉菲恩生物科技有限公司; miR-23b-3p 过表达质粒 pSi-miR-23b-3p 及其阴性空载质粒 pSi-NC、MEF2C 慢病毒过表达质粒 Lv-MEF2C(滴度: 4.51×10^8 TU/ml)及其空载质粒 Lv-NC(滴度: 1.73×10^8 TU/ml)、miR-23b-3p mimic 及其阴性对照 mimic NC 由上海汉恒生物科技有限公司合成;双荧光素酶报告基因检测试剂盒、pmirGLO 载体购自武汉金开瑞生物工程有限公司;通用逆转录试剂盒、SYBR premix Ex Taq PCR 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒、miRNA qPCR 试剂盒购自武汉艾美捷科技有限公司;引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成;波形蛋白(Vimentin)抗体、钙黏蛋白 E(E-cadherin)抗体、MEF2C 抗体、GAPDH 抗体购自美国 Affinity 公司;Cy3 标记的羊抗兔二抗、HRP 标记的羊抗兔二抗购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。超净工作台(SW-CJ-2D)购自苏州净化设备有限公司;CO₂ 培养箱(MCO-18AC)购自日本松下公司;倒置荧光显微镜(XD-202)南京江南永新光学有限公司;酶标分析仪(AMR-100)购自杭州奥盛仪器有限公司;化学发光成像系统(ChemiDoc Touch)购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 hRIFs 细胞分离、培养及鉴定 主刀医师对肾肿瘤患者行肿瘤切除手术,取距肿瘤边缘 > 5 cm 处 1 mm³ 大小的正常组织块,参考张和平等^[7]胶原酶法分离出 hRIFs 细胞,用含 10% 胎牛血清、1% P-S 的 DMEM/F12 完全培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,每 3~4 d 换液 1 次。显微镜下观察细胞生长状态,待细胞生长至 80%~90% 融合度时,以 1:2 传代比例进行传代培养。选取第 2 代(P2)对数生长期细胞,采用免疫荧光实验鉴定 hRIFs,观察细胞中 Vimentin 和 E-cadherin 蛋白表达及分布情况,Vimentin 阳性表达、E-cadherin 阴性表达即为 hRIFs 细胞。

1.3.2 hRIFs 细胞成骨诱导及成骨分化能力鉴定

取第 3 代对数生长期 hRIFs 细胞,以 1×10^5 个细胞/孔接种至 6 孔板,置于培养箱过夜,更换成骨诱导液(10% 胎牛血清 + 0.1 μ mol 地塞米松 + 10 mmol β -甘油磷酸钠 + 50 μ g/ml 维生素 C + 1% P/S + DMEM/F12)继续培养,每 2~3 d 换液 1 次。分别于第 0、3、5、7、14 天时,取细胞上清按下述 ELISA 法检测 ALP 活性,绘制标准曲线,计算各组细胞上清中 ALP 水平(ng/ml);取细胞按下述 qRT-PCR 法检测成骨标志物(OCN、OPN、Runx2) mRNA 表达水平;于成骨诱导第 14 天采用下述茜素红染色法检测细胞矿化结节形成情况。

1.3.3 实验分组及细胞转染 取第 3 代对数生长期 hRIFs 细胞,以 1×10^5 个细胞/孔接种至 6 孔板,置于培养箱过夜。第一部分探讨 miR-23b-3p 过表达对 hRIFs 细胞成骨样分化的影响,先将 hRIFs 细胞分为 3 组:① blank 组;② pSi-NC 组,转染携带 pSi-NC 质粒至细胞中;③ pSi-miR-23b-3p 组,转染携带 pSi-miR-23b-3p 过表达质粒至细胞中;转染成功后各组均成骨诱导 14 d。第二部分探究 miR-23b-3p 通过调控 MEF2C 基因表达参与 hRIFs 细胞成骨样分化的调节作用,先将 hRIFs 细胞分为 4 组:① pSi-NC 组;② pSi-miR-23b-3p 组;③ pSi-miR-23b-3p + Lv-NC 组,共转染携带 pSi-miR-23b-3p 过表达质粒和 Lv-NC 慢病毒至细胞中;④ pSi-miR-23b-3p + Lv-MEF2C 组,共转染携带 pSi-miR-23b-3p 过表达质粒和 Lv-MEF2C 慢病毒至细胞中,转染成功后均成骨诱导 14 d。参照转染试剂说明书,使用 opti-MEM 培养基和 Lipo8000 转染试剂将 pSi-miR-23b-3p 过表达质粒及其阴性空载质粒 pSi-NC 转入 hRIFs 细胞中,转染 6 h 后更换新鲜培养基,48 h 后收集部分细胞采用 1.3.5 项方法检测转染效率,病毒转染:参照病毒转染说明书,使用含 5 μ g/ml 聚凝胺完全培养基稀释慢病毒,将慢病毒 Lv-MEF2C 及其空载病毒 Lv-NC 以感染复数为 200 感染 hRIFs 细胞,16 h 后更换新鲜培养基,48 h 后置于荧光显微镜下观察感染效率。

1.3.4 茜素红检测细胞矿化结节情况 去除培养液,PBS 洗涤 1 次,4% 多聚甲醛固定 20 min,PBS 洗 3 次,加入适量茜素红 S 染色液,室温孵育 30 min,PBS 洗 3 次,显微镜下观察和拍照细胞矿化结节情况。

1.3.5 qRT-PCR 检测 收集 RP 和 nRP 组织、成骨诱导不同时间(0、3、5、7、14 d)及 1.3.3 项下第一部分和第二部分各组处理后的细胞,加入 TRIzol 裂解

液提取总 RNA, mRNA 检测:使用逆转录试剂盒将样本逆转录为 cDNA,使用 SYBR premix Ex Taq PCR 试剂盒进行 mRNA 荧光定量分析;miRNA 检测:使用 miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒将样本逆转录为 cDNA,使用 miRNA qPCR 试剂盒进行 miRNA 荧光定量分析。引物序列见表 1。反应条件:95 ℃ 预变性 60 s,95 ℃、20 s,65 ℃、30 s,共循环 40 次。以 U6 和 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 RP 和 nRP 组织及各组细胞中 miR-23b-3p 和 MEF2C、OCN、OPN、Runx2 mRNA 表达水平。

表 1 引物序列表

基因名称	序列(5'-3')
miR-23b-3p	F: GGAAATCCCTGGCAATGT R: TAATCCCTGGCAATGTGA
U6	F: CAAATTCGTGAAGCGTTCCA R: AGTGCAGGCTCCGAGGTATT
MEF2C	F: GAAAGGCACTGGTGCCAAAG R: CTGCATT CGTTCCTGCACAT
OCN	F: CACCGAGACACCATGAGAGC R: CTGCTTGGACACAAAGGCTGC-3
OPN	F: AGCAGCTTTACAACAAATACCCAG R: TTAAGCTTGAAGGGTCTGTGGG
Runx2	F: CGCCTCACAAACAACACAG R: ACTGCTTG CAGCCTTAAATGAC
GAPDH	F: AAGCCTGCCGGTACTAAC R: GCATCACCCGGAGGAGAAAT

1.3.6 Western blot 检测 消化离心收集成骨诱导不同时间(0、3、5、7、14 d)及 1.3.3 项下第一部分和第二部分各组处理后的细胞,加入预冷 PBS 洗涤 1 次,加入适量含蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液,冰上裂解 30 min 后于 4 ℃、12 000 r/min 离心提取总蛋白。使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,将蛋白样品使用金属浴煮沸 10 min 变性,各组取 40 μg 蛋白上样进行电泳,进行转膜处理后加入封闭液室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,加入一抗 MEF2C 抗体(1:1 000),GAPDH 抗体(1:5 000),4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:2 000),室温孵育 1 h,滴加 ECL 显影液,曝光,采用 ImageJ 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值/GAPDH 条带灰度值。

1.3.7 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-23b-3p 与 MEF2C 靶向关系 采用 miRNA 靶基因在线预测网站 TargetScanHuman 7.2 预测 miR-23b-3p 与

MEF2C 的靶向结合位点,并在 hRIFs 细胞中验证 miR-23b-3p 与 MEF2C 的靶向关系。将野生型(WT)和突变型(MUT)MEF2C 序列构建入 pmirGLO 载体中(WT-MEF2C 和 MUT-MEF2C)。取 P3 代对数生长期 hRIFs 细胞,以 5 104 个/孔接种至 24 孔板中,采用 Lipo8000 转染试剂将 WT-MEF2C 和 MT-MEF2C 质粒与 miR-23b-3p mimic 或 mimic NC 共转染 48 h。参照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书进行检测,采用荧光酶标仪测定相对光度(relative light unit,RLU)值并计算荧光素酶活性。荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶 RLU 值/海肾荧光素酶 RLU 值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据均符合正态分布,多组间数据比较采用单因素方差分析,事后两组间比较采用 LSD-*t* 检验。采用 Pearson 相关性分析探究 RP 组织中 miR-23b-3p 与 MEF2C mRNA 表达水平的相关关系。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CaOx 结石患者 Randall 斑组织中 miR-23b-3p 与 MEF2C 表达水平及其相关性 与 nRP 组织比较,RP 组织中 miR-23b-3p 表达水平明显降低($P < 0.05$),而 MEF2C mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$)。见图 1A、B。Pearson 相关性分析结果显示,在 RP 组织中,miR-23b-3p 与 MEF2C mRNA 表达水平呈负相关关系($r = -0.462, P = 0.004$)见图 1C。

2.2 Vimentin 和 E-cadherin 在 hRIFs 细胞中的分布特点 免疫荧光结果显示,细胞中 Vimentin 蛋白呈阳性表达,E-cadherin 蛋白呈阴性表达,提示 hRIFs 细胞分离成功。见图 2。

2.3 成骨诱导液对 hRIFs 细胞矿化结节、ALP 水平及成骨标志物的变化 茜素红染色结果显示,与 0 d 比较,成骨诱导至 14 d 时细胞时出现矿化结节。见图 3A。ELISA 结果显示,不同成骨诱导时间(3、5、7、14 d) ALP 水平分别为(12.12 ± 0.68) ng/ml、(20.33 ± 3.57) ng/ml、(30.65 ± 2.88) ng/ml、(45.81 ± 3.33) ng/ml、(80.26 ± 5.49) ng/ml;细胞中 ALP 水平随成骨诱导时间延长呈上升趋势($t = 3.91、10.86、17.19、21.34$,均 $P < 0.05$)。见图 3B。qRT-PCR 结果显示,不同时间点的细胞中 OCN、OPN、Runx2 mRNA 表达水平差异具有统计学意义($t_{OCN} = 9.82、16.93、9.93、16.90$,均 $P < 0.05$; $t_{OPN} =$

5.05、10.35、13.94、23.25, 均 $P < 0.05$; $t_{\text{Runx2}} = 15.24, 21.55, 9.58, 14.72$, 均 $P < 0.05$), 且随着时

间的延长, 细胞中 OCN、OPN、Runx2 mRNA 表达水平逐渐上升。见图 3C。

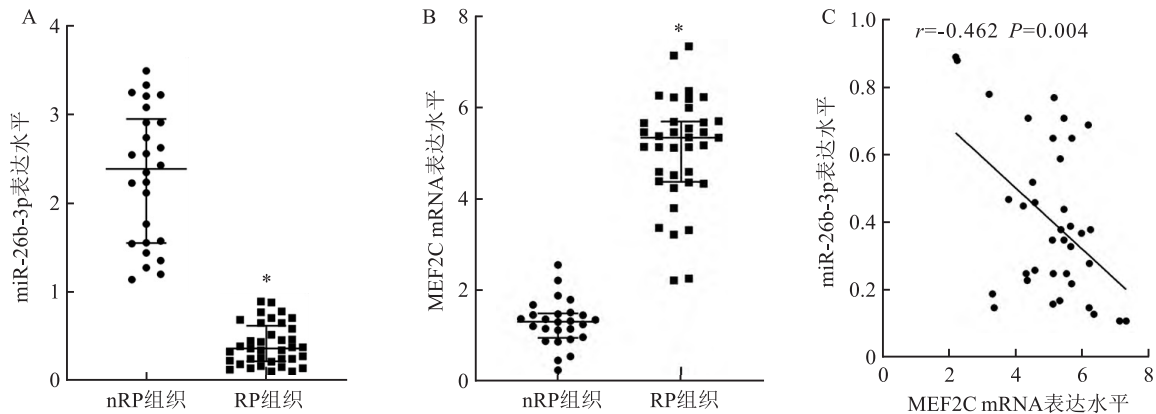


图1 CaOx 结石患者 Randall 斑组织中 miR-23b-3p 与 MEF2C 表达水平及其相关性分析

A、B: qRT-PCR 检测 RP、nRP 组织中 miR-23b-3p 和 MEF2C mRNA 表达水平; C: miR-23b-3p 与 MEF2C mRNA 在 RP 组织中的相关关系; 与 nRP 组织比较: * $P < 0.05$

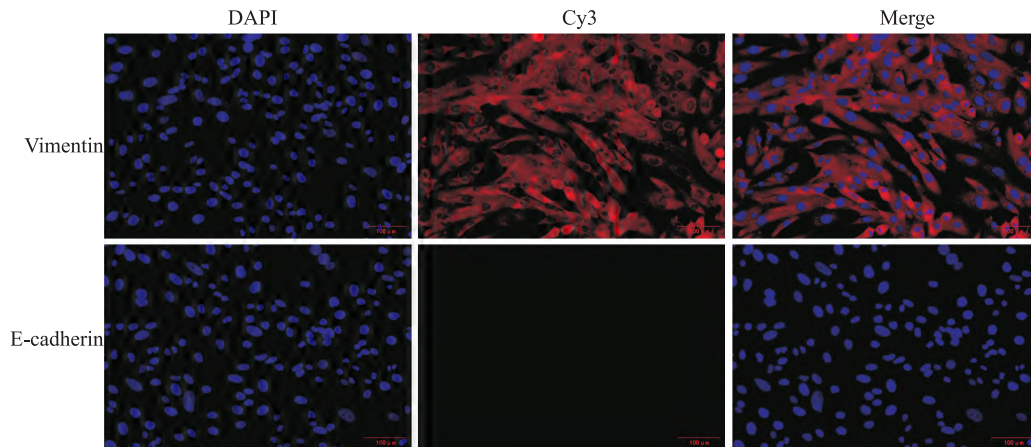


图2 hRIFs 细胞中 Vimentin 蛋白和 E-cadherin 蛋白表达 免疫荧光 $\times 400$

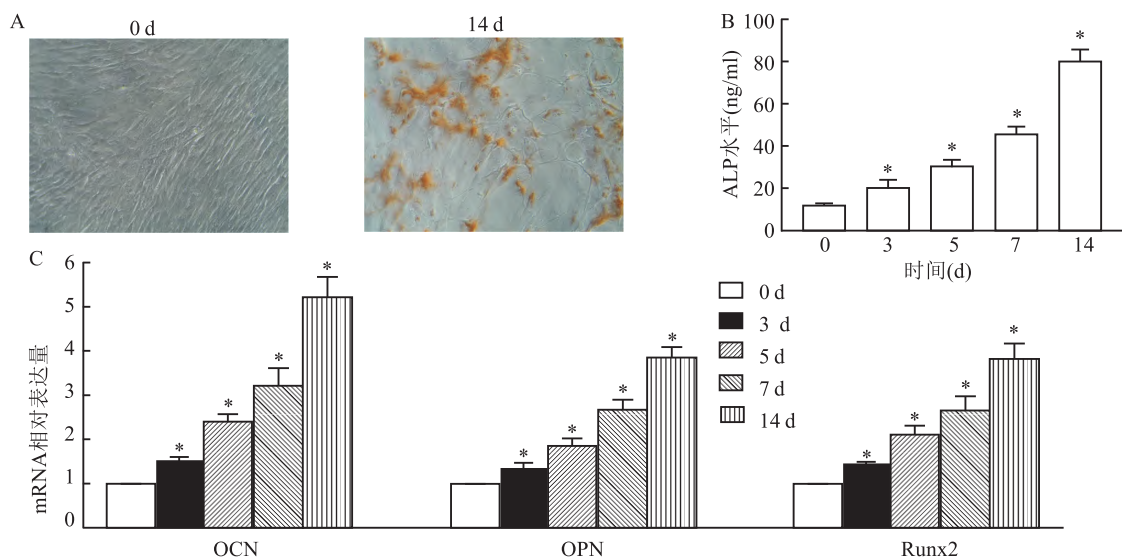


图3 hRIFs 细胞成骨诱导分化鉴定

A: 茜素红染色观察细胞矿化结节形成情况 $\times 200$; B: ELISA 检测不同诱导时间细胞中 ALP 水平; C: qRT-PCR 检测不同诱导时间细胞中 OCN、OPN、Runx2 mRNA 表达水平; 与 0 d 组比较: * $P < 0.05$

2.4 miR-23b-3p 过表达对 hRIFs 细胞成骨样分化的影响 qRT-PCR 结果显示,与 0 d 比较,随着成骨诱导时间(3、5、7、14 d)的延长,细胞中 miR-23b-3p 表达水平均逐渐降低($t = 6.43、6.33、22.58、154.20$,均 $P < 0.05$)。见图 4A。与 blank 组或 pSi-NC 组比较, pSi-miR-23b-3p 组 hRIFs 细胞中 miR-23b-3p 表达水平明显升高($t = 18.20、18.04$,均 $P < 0.05$),提示 miR-23b-3p 过表达成功。见图 4B。各组 hRIFs 细胞成骨诱导 14 d 后,与 blank 组或 pSi-NC 组比较, pSi-miR-23b-3p 组细胞中成骨标志物 OCN、OPN、Runx2 mRNA 表达水平均明显降低($t = 22.25、12.18、10.39、8.59、53.96、20.91$,均 $P < 0.05$)。见图 4C。茜素红染色结果显示,各组 hRIFs

细胞成骨诱导 14 d 后,与 blank 组或 pSi-NC 组比较, pSi-miR-23b-3p 组细胞形成矿化结节能力减弱。见图 4D。

2.5 MEF2C 基因参与 hRIFs 细胞成骨样分化的调节 qRT-PCR 和 Western blot 结果显示,与 0 d 比较,随着成骨诱导时间(3、5、7、14 d)的延长,细胞中 MEF2C mRNA 和蛋白表达水平逐渐升高($t_{\text{mRNA}} = 4.07、11.17、9.01、14.45$,均 $P < 0.05$; $t_{\text{蛋白}} = 5.42、14.72、14.79、8.91$,均 $P < 0.05$)。见图 5。

2.6 miR-23b-3p 通过调控 MEF2C 基因表达参与 hRIFs 细胞成骨样分化的调节 细胞转染后, qRT-PCR 和 Western blot 结果显示,与 pSi-NC 组比较, pSi-miR-23b-3p 组和 pSi-miR-23b-3p + Lv-NC 组

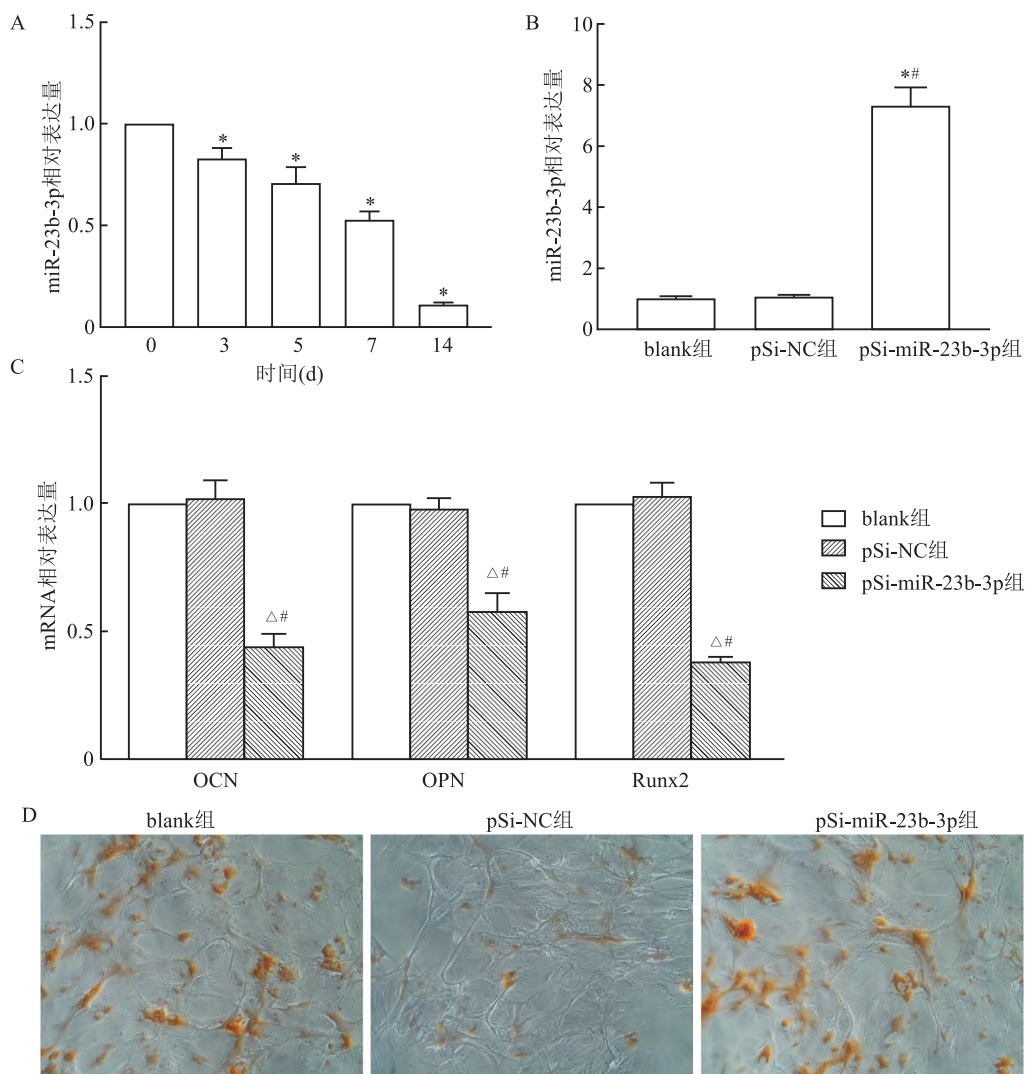


图4 miR-23b-3p 过表达对 hRIFs 细胞成骨样分化的影响

A: qRT-PCR 检测 hRIFs 细胞中 miR-23b-3p 表达; B: qRT-PCR 检测 hRIFs 细胞转染效率; C: qRT-PCR 技术检测成骨诱导 14 d 后各组细胞中成骨标志物 OCN、OPN、Runx2 mRNA 水平; D: 茜素红染色观察成骨诱导 14 d 后各组细胞矿化结节形成情况($\times 200$); 与 0 d 组比较; * $P < 0.05$; 与 blank 组比较; $\Delta P < 0.05$; 与 pSi-NC 组比较; $\# P < 0.05$

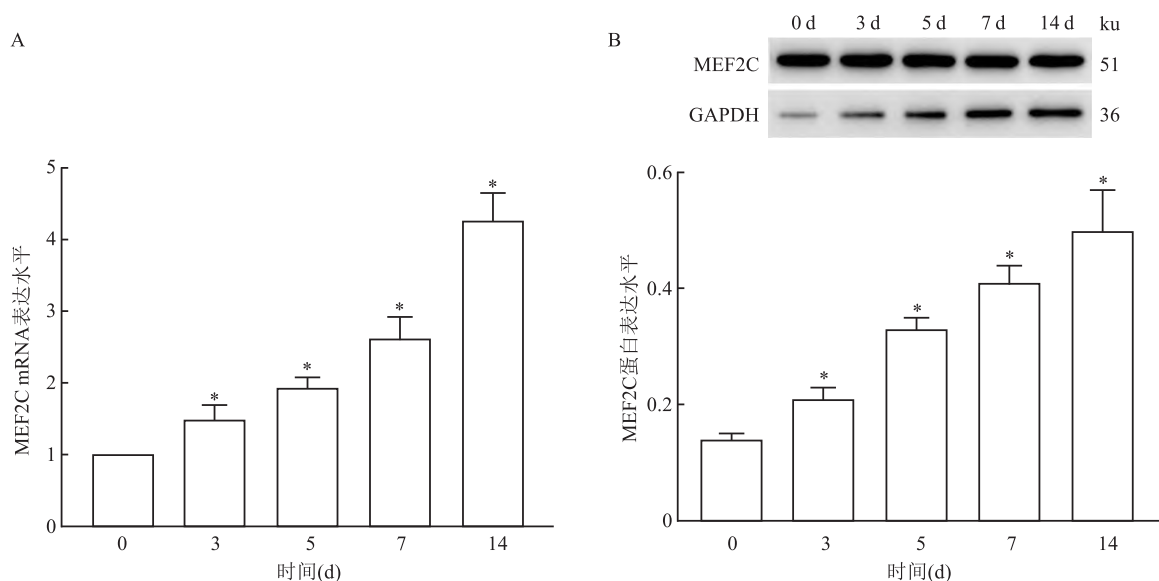


图5 qRT-PCR(A)和Western blot(B)检测不同成骨诱导时间点细胞中MEF2C mRNA和蛋白表达水平
与0 d组比较: * $P < 0.05$

hRIFs 细胞中 MEF2C mRNA 和蛋白表达水平明显降低(均 $P < 0.05$);与 pSi-miR-23b-3p + Lv-NC 组比较, pSi-miR-23b-3p + Lv-MEF2C 组 hRIFs 细胞中 MEF2C mRNA 和蛋白表达水平明显升高(均 $P < 0.05$)。见图 6A、6B。成骨诱导 14 d 后,与 pSi-NC 组比较, pSi-miR-23b-3p 组和 pSi-miR-23b-3p + Lv-NC 组细胞中 OCN、OPN、Runx2 等 mRNA 表达水平明显降低(均 $P < 0.05$);pSi-miR-23b-3p + Lv-NC 组比较, pSi-miR-23b-3p + Lv-MEF2C 组细胞中 OCN、OPN、Runx2 等 mRNA 表达明显升高(均 $P < 0.05$)。见图 6C。茜素红染色结果显示,与 pSi-NC 组比较, pSi-miR-23b-3p 组和 pSi-miR-23b-3p + Lv-NC 组细胞矿化结节形成能力减弱;与 pSi-miR-23b-3p + Lv-NC 组比较, pSi-miR-23b-3p + Lv-MEF2C 组细胞矿化结节能力形成增强。见图 6D。

2.7 miR-23b-3p 靶向负调控 MEF2C miRNA 靶基因在线预测网站 TargetScanHuman 7.2 预测结果显示, miR-23b-3p 与 MEF2C 3'-UTR 区域存在互补的结合位点。见图 7A。双荧光素酶基因检测报告结果显示,在 MUT-MEF2C 细胞中,与 mimic NC 组 (1.01 ± 0.04) 比较, miR-23b-3p mimic 组细胞荧光素酶活性 (0.23 ± 0.01) 明显降低 ($P < 0.05$);然而,在 WT-MEF2C 细胞中,与 mimic NC 组 (1.02 ± 0.05) 比较, miR-23b-3p mimic 组细胞荧光素酶活性 (0.98 ± 0.04) 无明显变化 ($P > 0.05$)。见图 7B。表明 miR-23b-3p 能靶向负调控 MEF2C 表达。另外, qRT-PCR 和 Western blot 结果显示,与 blank 组

或 pSi-NC 组比较, pSi-miR-23b-3p 组细胞中 MEF2C mRNA 和蛋白表达水平明显降低(均 $P < 0.05$)。见图 7C、7D。

3 讨论

Randall 斑是一种肾乳头上皮组织下存在的钙化斑块,始发于髓袢细段肾小管上皮细胞的基底膜,逐渐延伸至肾髓质的间质,最后沉积在肾乳头的间质组织中。O'Kell et al^[8]认为, Randall 斑是特发性 CaOx 结石形成的先决条件, CaOx 成核并附着于 Randall 斑上,进一步发展形成结石。临床研究^[9]发现, Randall 斑覆盖的面积与 CaOx 结石数量呈正相关。张一帆等^[10]研究通过分析 Randall 斑结石患者 24 h 尿液成分分析发现 Randall 斑患者 24 h 尿液中草酸、磷酸、钠、钙含量显著升高。因此, Randall 斑与 CaOx 结石形成关系密切,值得深入研究。

近年来, miR-23b-3p 在骨代谢的作用机制受到广泛关注。Li et al 研究^[11]表明, miR-23b-3p 在绝经后骨质疏松症的小鼠骨组织中表达上调,降低其表达可上调 Runx2、OCN、Osterix 的表达和提高 ALP 活性从而促进小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化。Yu et al 研究^[12]显示, lncRNA RP11-84C13.1 通过吸收 miRNA-23b-3p 上调 Runx2 表达,从而诱导人骨髓间充质干细胞成骨分化。Zhu et al^[13]研究显示, hRIFs 成骨样分化增强可促进 Randall 斑的形成。而本研究结果显示,与正常乳头状组织比较, CaOx 结石患者 Randall 斑组织中 miR-23b-3p 表达

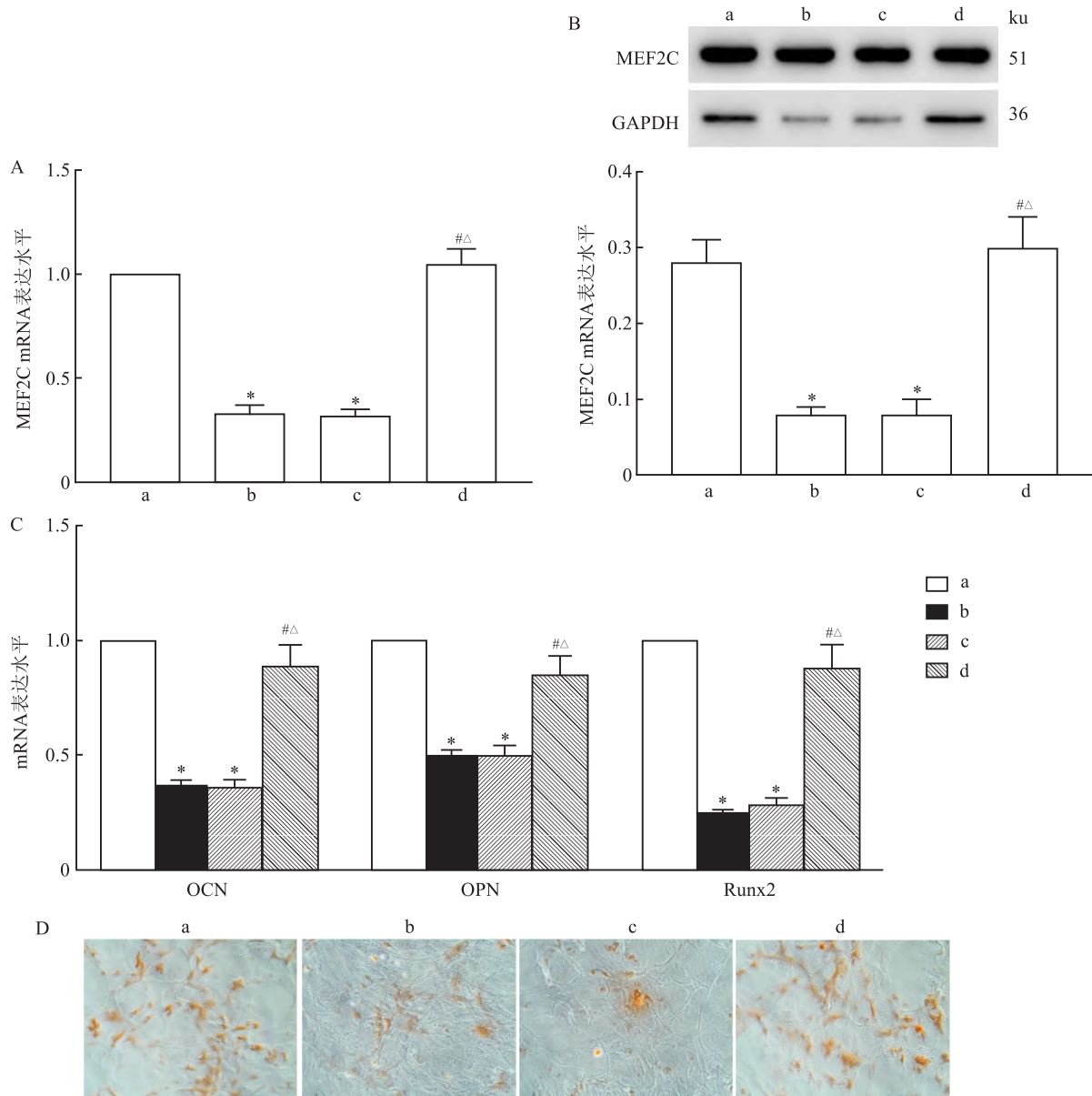


图6 miR-23b-3p通过调控MEF2C基因表达参与hRIFs细胞成骨样分化的调节

A、B: qRT-PCR和Western blot检测转染后各组细胞中MEF2C mRNA和蛋白表达水平; C: qRT-PCR检测成骨诱导14 d后各组细胞中OCN、OPN、Runx2 mRNA表达水平; D: 茜素红染色观察成骨诱导14 d后各组细胞矿化结节形成情况 ×200; a: pSi-NC组; b: pSi-miR-23b-3p组; c: pSi-miR-23b-3p + Lv-NC组; d: pSi-miR-23b-3p + Lv-MEF2C组; 与pSi-NC组比较: * $P < 0.05$; 与pSi-miR-23b-3p组比较: # $P < 0.05$; 与pSi-miR-23b-3p + Lv-NC组比较: △ $P < 0.05$

水平下调;且体外细胞实验结果显示,miR-23b-3p高表达可下调成骨标志物(OCN、OPN、Runx2) mRNA表达水平,降低细胞矿化结节形成的能力,从而抑制hRIFs细胞成骨分化。提示miR-23b-3p可能具有通过抑制hRIFs成骨样表型进而阻止Randall斑形成的潜能。

MEF2C是MEF2家族转录因子之一,其编码的蛋白质参与多种生物进程,如心血管系统发育、肌肉生成和骨代谢。近年来研究^[14]显示,MEF2C在骨

代谢过程中发挥促进作用。Jiang et al研究^[15]发现,MEF2C在成骨分化后的人骨髓间充质干细胞中表达上调,沉默其表达可抑制骨髓间充质干细胞成骨分化。因此,MEF2C可能成为抑制细胞成骨分化的重要靶点,从而抑制Randall斑形成。本研究结果显示,与正常乳头状组织比较,CaOx结石患者Randall斑组织中MEF2C表达水平上调,推测MEF2C高表达可能促进Randall斑形成,确定其作用机制可以为CaOx结石的早期诊断和治疗提供新的理论

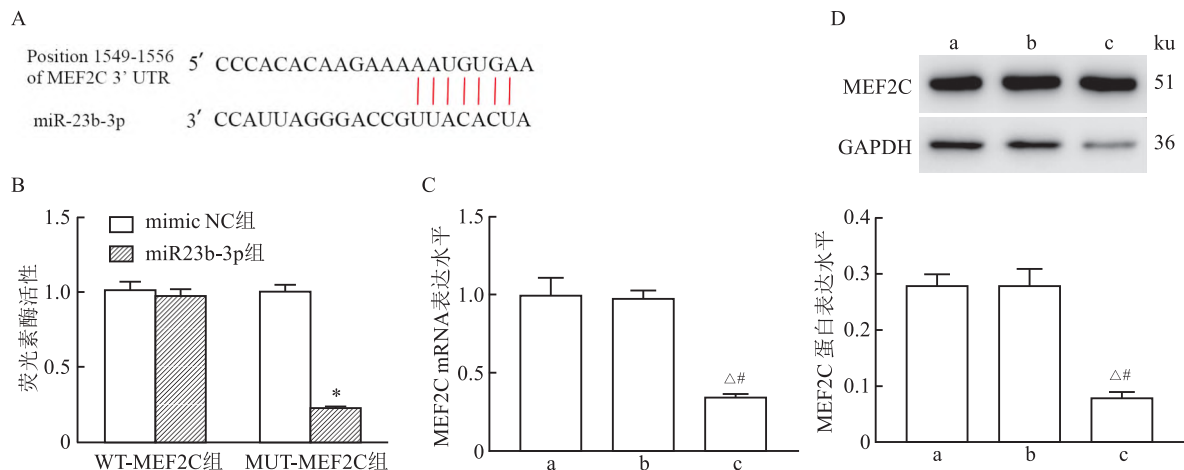


图7 miR-23b-3p与MEF2C靶向关系验证

A: miR-23b-3p与MEF2C靶向位点预测; B: 各组细胞中荧光素酶活性检测; C、D: qRT-PCR和Western blot检测各组细胞中MEF2C mRNA和蛋白表达水平; a: blank组; b: pSi-NC组; c: pSi-miR-23b-3p组; 与mimic NC比较: * $P < 0.05$; 与blank组比较: $\Delta P < 0.05$; 与pSi-NC组比较: $\# P < 0.05$

基础。然而 miR-23b-3p 与 MEF2C 是否调控 hRIFs 细胞成骨分化从而参与 Randall 斑形成尚未可知。因此,本研究将 miR-23b-3p 过表达质粒转入 hRIFs 细胞中,发现 miR-23b-3p 过表达可下调 MEF2C 表达水平,双荧光素酶实验结果也表明 miR-23b-3p 可靶向调控 MEF2C,提示 miR-23b-3p 可能通过靶向下调 MEF2C 从而抑制细胞成骨分化,从而抑制 Randall 斑形成。为进一步验证结论,本研究将 miR-23b-3p 过表达质粒和 MEF2C 过表达质粒共转染 hRIFs 细胞,显示 MEF2C 过表达可逆转 miR-23b-3p 过表达对 hRIFs 细胞成骨分化抑制作用,提示 miR-23b-3p 可通过靶向调控 MEF2C 抑制 hRIFs 细胞成骨分化从而参与 Randall 斑形成。

综上所述,miR-23b-3p 在 CaOx 结石患者 Randall 斑组织中低表达,且 miR-23b-3p 可靶向调控 MEF2C 抑制 hRIFs 细胞成骨分化,从而参与 Randall 斑形成,最终导致 CaOx 结石产生,本研究为 CaOx 结石的防治提供了一个新的潜在靶点。但仍存在一些不足之处,本研究仅从细胞层面研究了 miR-23b-3p 与 MEF2C 调控肾间质成纤维细胞成骨分化,后续将从动物层面着手,构建 CaOx 结石动物模型,深入探究 miR-23b-3p 与 MEF2C 对体内 CaOx 结石的作用机制。

参考文献

[1] Wang W, Fan J, Huang G, et al. Prevalence of kidney stones in mainland China: a systematic review [J]. Sci Rep, 2017, 7: 41630.

[2] Tundo G, Vollstedt A, Meeks W, et al. Beyond prevalence: annual cumulative incidence of kidney stones in the United States [J]. J Urol, 2021, 205(6): 1704-9.

[3] Siener R, Herwig H, Rüdiger J, et al. Urinary stone composition in Germany: results from 45,783 stone analyses [J]. World J Urol, 2022, 40(7): 1813-20.

[4] Zhu Z, Huang F, Xia W, et al. Osteogenic differentiation of renal interstitial fibroblasts promoted by lncRNA MALAT1 may partially contribute to Randall's plaque formation [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 8: 596363.

[5] Xia Y, Zhou X, Ye Z, et al. Construction and analysis of immune infiltration-related ceRNA network for kidney stones [J]. Front Genet, 2021, 12: 774155.

[6] Ni S, Xiong X B, Ni X Y. MgCl2 promotes mouse mesenchymal stem cell osteogenic differentiation by activating the p38/Osx/Runx2 signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(5): 3904-10.

[7] 张和平, 谢荣, 刘佳丽, 等. 抑制 P2X7 受体表达对高糖诱导的肾间质成纤维细胞 TGF- β 1/p38MAPK 信号通路的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(14): 3537-40.

[8] O'Kell A L, Lovett A C, Canales B K, et al. Development of a two-stage model system to investigate the mineralization mechanisms involved in idiopathic stone formation: stage 2 *in vivo* studies of stone growth on biomimetic Randall's plaque [J]. Urolithiasis, 2019, 47(4): 335-46.

[9] 武涛, 刘志伟, 唐启胜, 等. Randall 斑研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2021, 34(7): 770-4.

[10] 张一帆, 许长宝, 万优, 等. Randall 斑泌尿系结石患者的代谢评估 [J]. 天津医药, 2019, 47(10): 1072-5.

[11] Li R, Ruan Q, Yin F, et al. MiR-23b-3p promotes postmenopausal osteoporosis by targeting MRC2 and regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. J Pharmacol Sci, 2021, 145(1): 69-78.

- [12] Yu H, Li Y, Tang J, et al. Long non-coding RNA RP11-84C13.1 promotes osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells and alleviates osteoporosis progression via the miR-23b-3p/RUNX2 axis[J]. Exp Ther Med, 2021, 22(5): 1340.
- [13] Zhu Z, Huang F, Jiang Y, et al. OLMALINC/OCT4/BMP2 axis enhances osteogenic-like phenotype of renal interstitial fibroblasts to participate in Randall's plaque formation[J]. Mol Med, 2022, 28(1): 162.
- [14] 何洋洋, 赵玉驰, 王力刚. 肌细胞增强因子 2C 与骨质疏松的研究进展[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2020, 13(4): 336 - 40.
- [15] Jiang K, Teng G D, Chen Y Q. MicroRNA-23 suppresses osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells by targeting the MEF2C-mediated MAPK signaling pathway[J]. J Gene Med, 2020, 22(10): e3216.

Study on the mechanism of miR-23b-3p regulating osteogenic differentiation of renal interstitial fibroblasts and participating in Randall's plaque formation

Lei Bo¹, Qiu Mingxing¹, Liu Jiannan²

(¹Clinical College of Southwest Medical University, Luzhou 646099;

²Dept of Urology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072)

Abstract Objective To explore the effect of miR-23b-3p regulation on osteogenic differentiation of renal interstitial fibroblasts (hRIFs) on the formation of Randall plaque and its possible mechanism. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression levels of miR-23b-3p and osteogenic marker: myocyte enhancer factor 2C (MEF2C), osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN), runt-related transcription factor 2 (Runx2) mRNA in Randall plaque tissue of CaOx stone patients (RP) and normal papillary tissue of kidney tumor patients undergoing nephrectomy (nRP). Isolation and culture of human normal hRIFs were isolated and cultured in vitro. The miR-23b-3p overexpression plasmid pSi-miR-23b-3p and its negative no-load plasmid pSi-NC, the MEF2C lentivirus overexpression plasmid Lv-MEF2C and the no-load plasmid Lv-NC were transfected into hRIFs cells, and the cells were induced to osteogenic differentiation for 14 days. The activity of alkaline phosphatase (ALP) was determined by ELISA. Alizarin red staining was used to observe the formation of mineralized nodules. The expression levels of miR-23b-3p and MEF2C, OCN, OPN, Runx2 mRNA were detected by qRT-PCR. The expression level of MEF2C protein was detected by Western blot. Dual luciferase reporter gene assay verified the targeting relationship between miR-23b-3p and MEF2C. **Results** ① Compared with the nRP group, miR-23b-3p was low expressed and MEF2C, OCN, OPN, and Runx2 were highly expressed in the RP group. ② 14 days after osteogenic induction of hRIFs cells, the activity of ALP in cells significantly increased, the ability of cells to form mineralized nodules was enhanced, the expression level of miR-23b-3p significantly decreased, the mRNA expression levels of MEF2C, OCN, OPN, and Runx2 significantly increased, and the expression level of MEF2C protein significantly increased. ③ Overexpression of miR-23b-3p decreased the activity of ALP in hRIFs cells after osteogenic induction, inhibited the formation of mineralized nodules in cells, and down-regulated the mRNA expression levels of OCN, OPN, and Runx2 in cells. ④ Overexpression of MEF2C reversed the inhibitory effect of miR-23b-3p overexpression on osteoblast differentiation of hRIFs cells. ⑤ MEF2C was the downstream target gene of miR-23b-3p. **Conclusion** miR-23b-3p is underexpressed in RP tissues and during osteoblastic differentiation of hRIFs cells. Up-regulation of miR-23b-3p inhibits osteogenic differentiation of hRIFs cells, and its mechanism may be related to targeted silencing MEF2C.

Key words miR-23b-3p; human renal interstitial fibroblasts; myocyte enhancer factor 2C; osteogenic differentiation; Randall plaque; CaOx kidney stone