

miR-146b-5p 靶向 E3 泛素蛋白连接酶 促进高糖诱导的小鼠腹膜间皮细胞上皮间质转化

吴 锦^{1,2}, 李嘉嘉², 王笑薇², 王 娟²

摘要 目的 探讨 miR-146b-5p 与 E3 泛素蛋白连接酶(ZNRF3)对高糖诱导的小鼠腹膜间皮细胞上皮间质转化(EMT)进程的影响及作用机制。方法 正常培养的小鼠为对照组,采用 4.25% 葡萄糖透析液和 0.1 mg/kg 的脂多糖诱导腹膜纤维化小鼠模型,收集小鼠腹膜组织,Masson 染色观察腹膜组织胶原纤维变化,免疫组化法检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和 I 型胶原(COL I)表达。Western blot 检测腹膜组织上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、 α -SMA 和 COL I 表达。qRT-PCR 检测腹膜组织中 miR-146b-5p 和 ZNRF3 表达。双荧光素酶报告基因检测验证 miR-146b-5p 和 ZNRF3 靶向关系。分离对照组小鼠腹膜间皮细胞,高糖诱导构建小鼠腹膜间皮细胞纤维化模型,将细胞分为对照组、模型组、mimic-NC 组、miR-146b-5p-mimic 组和 miR-146b-5p-inhibitor 组。Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭能力。Western blot 检测 EMT 相关蛋白表达。结果 与对照组小鼠比较,模型组小鼠腹膜组织增厚,胶原纤维增多, α -SMA 和 COL I 表达增加($P < 0.05$),miR-146b-5p 表达升高($P < 0.05$),E-cadherin 和 ZNRF3 表达降低($P < 0.05$)。miR-146b-5p 靶向负调控 ZNRF3 表达。细胞水平检测结果显示,与对照组比较,模型组和 mimic-NC 组小鼠腹膜间皮细胞迁移和侵袭细胞数增多($P < 0.05$),E-cadherin 表达降低($P < 0.05$),波形蛋白(Vimentin)和 N-钙黏蛋白(N-cadherin)表达升高($P < 0.05$)。与模型组比较,miR-146b-5p-mimic 组小鼠腹膜间皮细胞变化趋势更为显著,miR-146b-5p-inhibitor 组细胞 EMT 进程受到抑制。结论 miR-146b-5p 可靶向 ZNRF3 基因促进高糖诱导的小鼠腹膜间皮细胞 EMT 进程。

关键词 miR-146b-5p; E3 泛素蛋白连接酶;腹膜透析;上皮间质转化;侵袭;迁移

中图分类号 R 692.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)07-1087-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.005

2023-06-02 接收

基金项目:泌尿生殖系统疾病安徽省重点实验室开放课题资助项目
(编号:2020APKLGUD01)

作者单位:¹泌尿生殖系统疾病安徽省重点实验室,合肥 230022

²安徽医科大学第一附属医院科研实验中心,合肥 230022

作者简介:吴 锦,女,硕士,助理研究员,责任作者,E-mail:jinw_2022e@126.com

腹膜透析是临床治疗终末期肾脏疾病的常用方法,但长期透析会引起腹膜纤维化,致使患者退出治疗^[1]。高糖刺激导致的腹膜间皮细胞外基质沉积,是腹膜纤维化的病理变化之一^[2]。腹膜间皮细胞上皮间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)是腹膜纤维化的早期机制,有效抑制腹膜间皮细胞 EMT 对维持腹膜透析极为重要^[3]。研究^[4]表明,E3 泛素蛋白连接酶(E3 ubiquitin-protein ligase, ZNRF3)能够抑制鼻咽癌细胞 EMT 过程,调控相关蛋白的表达,在其迁移和侵袭中发挥重要作用。

miRNA 是长度约为 22 个核苷酸的非编码 RNA,能靶向 mRNA 调控基因表达,参与多种病理生理过程。Pellegrini et al^[5]证明 miR-146b-5p 在肾损伤和纤维化进展的不同阶段呈差异表达。同时,miR-146b-5p 能靶向 ZNRF3 促进骨肉瘤细胞浸润和转移,并增强其耐药性^[6]。但 miR-146b-5p 与 ZNRF3 在腹膜纤维化中的作用和机制尚不清楚。因此,该研究通过高糖诱导构建小鼠腹膜纤维化动物和细胞模型,探讨 miR-146b-5p 对其 EMT 进程的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 6 周龄 C57BL/6J 小鼠 12 只,体质量约 20 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,在 22~26℃、50%~60% 的相对湿度,人工光照明暗各 12 h 环境下饲养。实验动物使用许可证号:SYXK(鄂)2018-0104。

1.1.2 主要试剂和仪器 戊巴比妥钠盐、葡萄糖购自 Sigma 公司;4.25% 腹膜透析液购自成都青山利康公司;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)购自阿拉丁公司;胎牛血清购自 Gibco 公司;青链霉素混合液、CCK-8、RIPA(强)组织细胞快速裂解液和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒、DAB 浓缩型试剂盒、封闭山羊血清购自 Solarbio 公司;PVDF 转移膜和化学发光试剂购自 Millipore 公司;苏木精购自雷根生物公司;兔抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)

抗体(PAB46194)、兔抗上皮钙黏蛋白(epithelial cadherin, E-cadherin)抗体(PAB33542)、兔抗波形蛋白(Vimentin)抗体(PAB40605)和兔抗N-钙黏蛋白(N-cadherin)抗体(PAB33543)购自Bioswamp公司;兔抗ZNR3抗体(NBP3-03924)购自Novus公司;兔抗I型胶原(type I collagen, COL I)抗体(ab87913)购自Abcam公司;MaxVision二抗(KIT-5020)购自迈新公司;TRIzol购自Ambion公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自碧云天公司;Transwell小室购自Corning公司;Matrigel胶购自BD公司。全自动化学发光分析仪(型号:Tanon-5200)购自上海天能公司;酶标仪(型号:MK3)购自芬兰雷勃公司;PCR仪(型号:GE48527)购自杭州柏恒公司。

1.2 实验方法

1.2.1 模型构建及分组处理 12只C57BL/6小鼠随机分为对照组和模型组,每组6只。参考文献^[7]方法构建腹膜纤维化小鼠模型,模型组小鼠腹腔注射4.25%葡萄糖透析液,每天100 ml/kg,持续4周,腹腔注射LPS,每天0.1 mg/kg,持续1周。对照组小鼠腹腔注射等量生理盐水。造模结束后采用1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,取腹膜组织保存备用。Masson染色观察腹膜组织胶原纤维变化,免疫组化检测 α -SMA和COL I表达,Western blot检测腹膜组织E-cadherin、 α -SMA和COL I蛋白表达验证模型是否构建成功。

1.2.2 免疫组化检测 取对照组和模型组小鼠腹膜组织按常规步骤脱水浸蜡包埋,冷冻后切片,贴附于载玻片上烤片1 h。二甲苯浸泡,梯度乙醇溶液浸泡,1 mmol/L的Tris-EDTA缓冲溶液中高压修复18 min,置于3% H₂O₂中湿盒孵育10 min,10%山羊血清湿盒孵育30 min,滴加 α -SMA和COL I一抗(1:50),湿盒孵育,4℃过夜,滴加maxvision二抗,37℃孵育60 min。DAB和苏木精染色,乙醇溶液浸泡脱水,二甲苯中透明,中性树胶封片,显微镜拍照。

1.2.3 qRT-PCR检测 TRIzol提取腹膜组织样本总RNA,反转录合成cDNA后进行PCR扩增。扩增体系:SYBR FAST qPCR Master Mix 10 μ l,上游引物0.5 μ l,下游引物0.5 μ l,cDNA模板1 μ l,ddH₂O 8 μ l。反应程序为:95℃ 3 min;95℃ 5 s;56℃ 10 s;72℃ 25 s;共40个循环。引物序列见表1,由武汉天一华煜基因科技有限公司合成。反应结束后获取CT值,采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法进行统计分析。

1.2.4 小鼠腹膜间皮细胞原代分离 参考文献^[8]方法,无菌环境下取上述对照组小鼠大网膜,PBS漂

表1 PCR引物序列

基因名	序列(5'-3')
miR-146b-5p	F:CTGGTGTCTGGAGTCGG R:GGGTGAGAACTGAATTCAT
ZNR3	F:AACATCGTCAACAAGCAGAA R:GAAAGCCAGGAAATCCC
GAPDH	F:GGGAACTGTGGCGTGAT R:GAGTGGGTGTCGCTGTTGA
U6	F:CTCGCTTCGGCAGCACATATACT R:ACGCTTCACGAATTTGCGTGC

洗3次,用含0.25%胰蛋白酶的PBS消化25 min后弃去消化液,加入含100 U/ml的青链霉素及15%胎牛血清的完全培养基终止消化,15 min后移入离心管,4℃下800 r/min离心5 min。弃上清液,用完全培养液重悬细胞,置于37℃、5% CO₂培养箱培养,72 h后换液,然后每2~3 d换液1次。

1.2.5 CCK-8检测 收集上述小鼠腹膜间皮细胞于96孔板,调整细胞悬液浓度为3×10³个/孔,每孔100 μ l,培养使细胞贴壁。将细胞分为对照组和不同浓度葡萄糖处理组(分别用含1%、2%、4%、6%、8%、10%葡萄糖的培养基培养细胞),培养24 h。取出细胞培养板,每孔加10 μ l CCK-8溶液,培养4 h。450 nm处酶标仪检测各孔吸光度值,选择与对照组相比,增殖率下降最显著的最低葡萄糖浓度用于后续的造模实验。

1.2.6 双荧光素酶报告基因检测 根据ZNR3-3' UTR野生型基因序列(5'-3')为:GCTAGCGTGTGCT-TGGGGTTCCGAGGTGTGGGATTGAGTTCTCTGCTTT-GTTTTTTTTTAAGATATTGTATGTCTAGA, ZNR3-3' UTR突变型对其进行定点突变,将ZNR3-3' UTR中碱基AGTTCTC突变为GACCAGA。构建含有miR-146b-5p结合位点的ZNR3-3' UTR野生型及突变型报告基因载体,进行酶切回收,连接目的基因片段与线性化载体,提取质粒DNA,测序。在小鼠腹膜间皮细胞中转染miR-146b-5p mimic,然后分别转染野生型及突变型报告基因载体;另一组细胞转染mimic-NC质粒,再分别转染ZNR3-3' UTR野生型及突变型载体,24 h按双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书进行实验操作。

1.2.7 细胞分组与处理 将小鼠腹膜间皮细胞分为5组:对照组、模型组、mimic-NC组、miR-146b-5p-mimic组和miR-146b-5p-inhibitor组。将正常培养的小鼠腹膜间皮细胞作为对照组,模型组用含6%葡萄糖的培养基培养24 h。构建miR-146b-5p-mimic NC质粒、mimic质粒、inhibitor质粒,分别转染小

鼠腹膜间皮细胞纤维化模型,24 h 后收集各组细胞,进行后续实验。

1.2.8 Western blot 检测 收集各组约 1×10^6 个细胞,加裂解液裂解细胞,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液。BCA 法进行蛋白定量。通过 SDS-PSGE 电泳分离,将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭过夜,加一抗(E-cadherin、ZNR3、Vimentin、N-cadherin,1:1 000)室温孵育 1 h,洗膜,加 HRP 标记的二抗(1:20 000)室温孵育 1 h,洗膜,ECL 发光液显影,TANON GIS 软件读取相关条带灰度值。

1.2.9 Transwell 小室检测 细胞迁移实验:调整细胞悬液浓度为 1×10^2 /L,取 0.5 ml 接种至 Transwell 小室内。下层 24 孔板加 0.75 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,培养 24 h,弃去培养基,PBS 清洗,每孔加 4% 甲醛室温固定 20 min。PBS 洗涤,加 0.5% 结晶紫溶液染色 30 min,用棉签擦去 Transwell 小室内未迁移的细胞,置于 200× 显微镜下观察,计数每个视野中的细胞数。

细胞侵袭实验:接种前在小室中铺 80 μ l Matrigel 胶,37℃ 培养箱放置 30 min。其余实验步骤同细胞迁移实验操作。

1.3 统计学处理 用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型鉴定 如图 1A 所示,对照组小鼠腹膜组织薄,呈连续分布;模型组小鼠腹膜组织明显增厚,

胶原纤维明显增多。如图 1B 所示,模型组中,主要集中于腹膜组织中血管的管壁的 α -SMA 和间皮基质中的 COL I 阳性表达明显增多。

2.2 腹膜纤维化小鼠模型中 miR-146b-5p、ZNR3、COL I 及 α -SMA 表达 如图 2A 所示,与对照组相比,模型组小鼠腹膜组织中 E-cadherin 表达降低($F = 286.63$),COL I ($F = 390.47$) 及 α -SMA ($F = 663.10$) 表达升高($P < 0.05$)。如图 2B 所示,与对照组相比,模型组小鼠腹膜组织中 miR-146b-5p 表达升高($F = 405.66, P < 0.05$),ZNR3 表达降低($F = 625.33, P < 0.05$)。

2.3 miR-146b-5p 靶向负调控 ZNR3 表达 如图 3A 所示,miR-146b-5p 与 ZNR3 存在结合位点。如图 3B 所示,与 mimic-NC 组相比,miR-146b-5p mimic 可降低 ZNR3 野生型 3'-UTR 荧光素酶活性($F = 279.53, P < 0.05$),而 ZNR3 突变型 3'-UTR 荧光素酶活性无变化($P > 0.05$)。如图 3C 所示,与对照组相比,模型组和 mimic-NC 组 ZNR3 表达降低。与 mimic-NC 组相比,转染 miR-146b-5p mimic 的小鼠腹膜间皮细胞中 ZNR3 表达降低,转染 miR-146b-5p inhibitor 的小鼠腹膜间皮细胞中 ZNR3 表达升高。

2.4 高糖诱导小鼠腹膜间皮细胞纤维化并抑制 ZNR3 表达 如图 4A 所示,与对照组相比,不同浓度(1%、2%、4%、6%、8%、10%)葡萄糖处理的小鼠腹膜间皮细胞增殖活性降低($F = 446.47, P < 0.05$),且呈剂量依赖性,其中含 6% 的葡萄糖培养液处理后,细胞增殖活力下降 17.17%,因此,选择 6% 的葡萄糖进行后续实验。如图 4B、4C 所示,

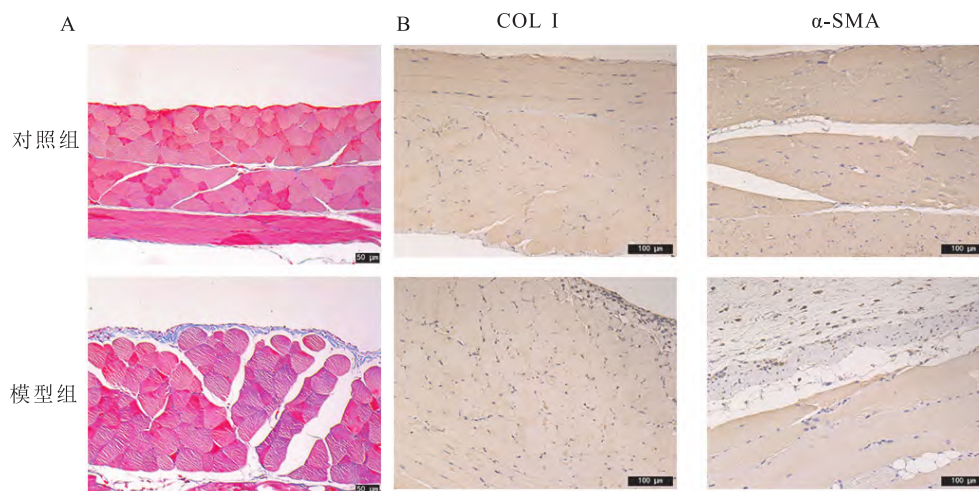


图 1 腹膜纤维化小鼠模型鉴定

A:腹膜组织 Masson 染色 $\times 200$;B:腹膜组织 COL I 和 α -SMA 免疫组化染色 $\times 200$

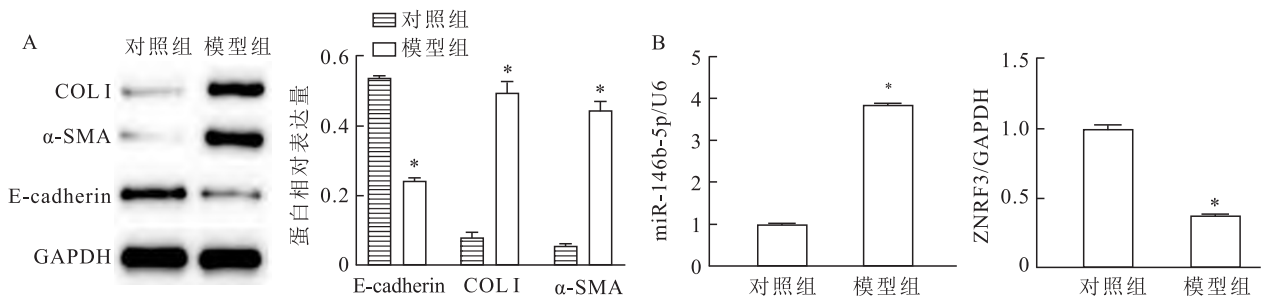


图2 miR-146b-5p 和 ZNRF3 在腹膜纤维化小鼠模型中的表达

A: Western blot 检测腹膜组织中 COL I、α-SMA 及 E-cadherin 表达; B: qRT-PCR 检测腹膜组织中 miR-146b-5p 和 ZNRF3 表达; 与对照组比较: * $P < 0.05$

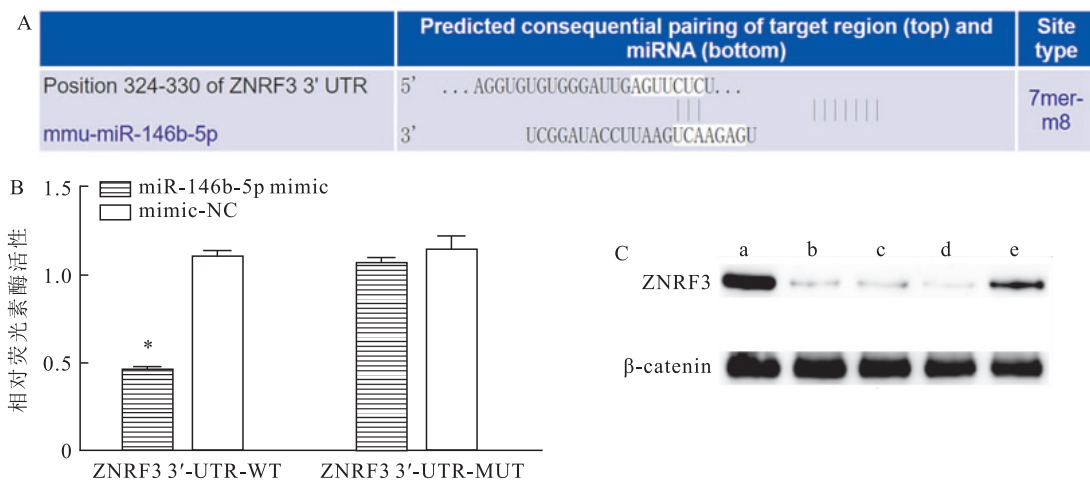


图3 miR-146b-5p 靶向负调控 ZNRF3 表达

A: TargetScan 预测 miR-146b-5p 与 ZNRF3 结合位点; B: 双荧光素酶报告基因检测验证 miR-146b-5p 与 ZNRF3 靶向关系; C: Western blot 检测小鼠腹膜间皮细胞中 ZNRF3 表达; a: 对照组; b: 模型组; c: mimic-NC 组; d: miR-146b-5p mimic 组; e: miR-146b-5p inhibitor 组; 与 mimic-NC 组比较: * $P < 0.05$

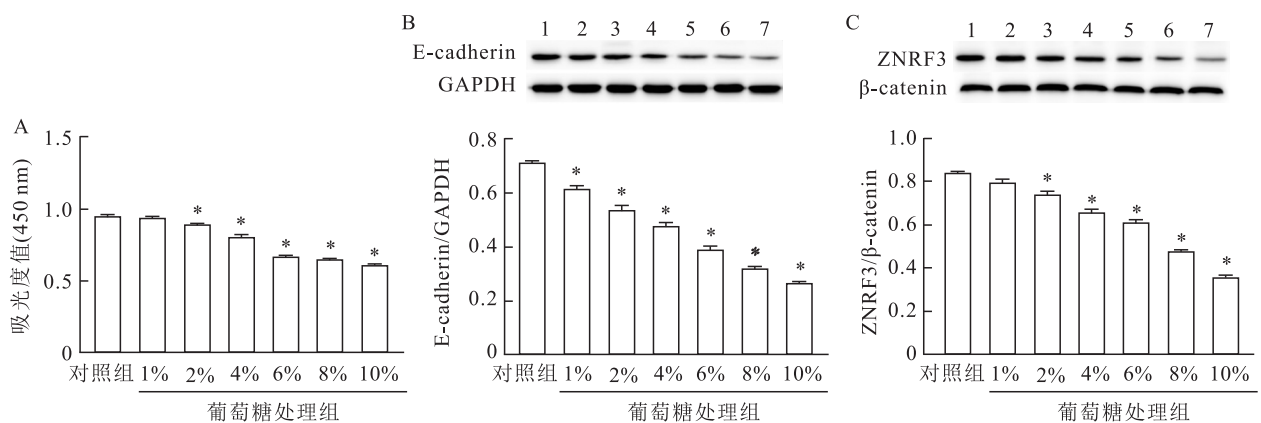


图4 高糖诱导小鼠腹膜间皮细胞纤维化并抑制 ZNRF3 表达

A: CCK-8 法检测小鼠腹膜间皮细胞增殖活性; B: Western blot 检测小鼠腹膜间皮细胞中 E-cadherin 表达; C: Western blot 检测小鼠腹膜间皮细胞中 ZNRF3 表达; 1: 对照组; 2~7: 1%、2%、4%、6%、8%、10% 葡萄糖处理组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

E-cadherin 和 ZNRF3 表达也降低 ($F = 220.72$ 、 246.33 , $P < 0.05$)。

2.5 过表达 miR-146b-5p 促进小鼠腹膜间皮细胞迁移和侵袭 如图 5 所示, 与对照组相比, 模型组与

mimic-NC 组小鼠腹膜间皮细胞迁移和侵袭能力增强 ($P < 0.05$)。与 mimic-NC 组相比, 转染 miR-146b-5p-mimic 的小鼠腹膜间皮细胞迁移和侵袭能力增强 ($P < 0.05$), 转染 miR-146b-5p-inhibitor 的小

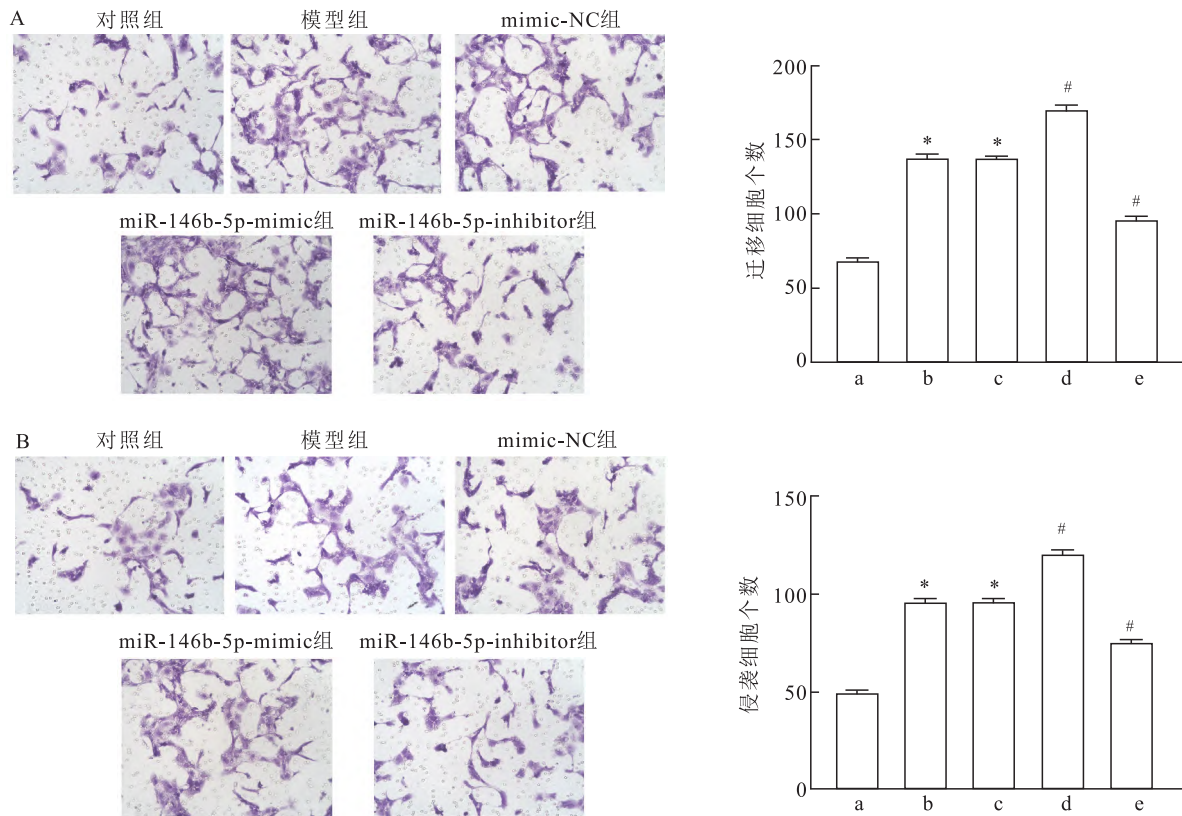


图5 过表达 miR-146b-5p 促进小鼠腹膜间皮细胞迁移和侵袭

A: Transwell 小室检测细胞迁移能力 $\times 200$; B: Transwell 小室检测细胞侵袭能力 $\times 200$; a: 对照组; b: 模型组; c: mimic-NC 组; d: miR-146b-5p mimic 组; e: miR-146b-5p inhibitor 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 mimic-NC 组比较: # $P < 0.05$

鼠腹膜间皮细胞迁移和侵袭能力下降 ($P < 0.05$)。

2.6 过表达 miR-146b-5p 对 EMT 相关蛋白表达的影响 如图 6 所示, 与对照组相比, 模型组与 mimic-NC 组 E-cadherin 表达降低 ($F = 714.62$, $P < 0.05$), Vimentin 和 N-cadherin 表达升高 ($F = 639.34, 572.69$, $P < 0.05$)。模型组与 mimic-NC 组 E-cadherin、Vimentin 和 N-cadherin 的表达无显著差异 ($P > 0.05$)。与 mimic-NC 组相比, miR-146b-5p-mimic 组小鼠腹膜间皮细胞 E-cadherin 表达降低 ($F = 714.62$, $P < 0.05$), Vimentin 和 N-cadherin 表达升高 ($F = 639.34, 572.69$, $P < 0.05$), miR-146b-5p-inhibitor 组小鼠腹膜间皮细胞 E-cadherin 表达升高 ($F = 714.62$, $P < 0.05$), Vimentin 和 N-cadherin 表达降低 ($F = 639.34, 572.69$, $P < 0.05$)。

3 讨论

腹膜透析作为终末期肾功能衰竭患者的替代疗法, 在世界范围内发展迅速, 然而, 进行性腹膜纤维化是长期腹膜透析患者无法避免的问题。miRNA

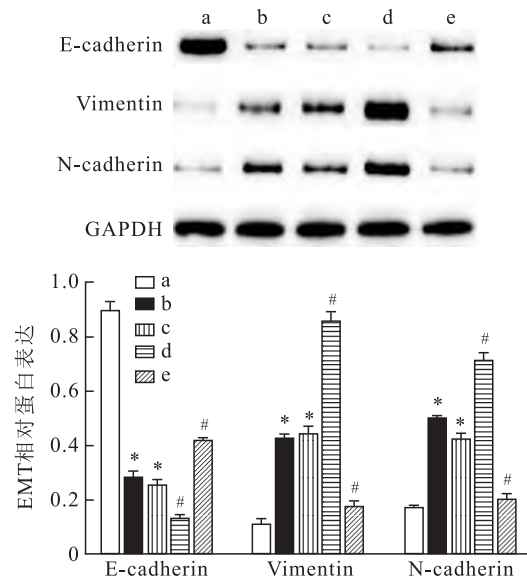


图6 过表达 miR-146b-5p 对 EMT 相关蛋白表达的影响

a: 对照组; b: 模型组; c: mimic-NC 组; d: miR-146b-5p mimic 组; e: miR-146b-5p inhibitor 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 mimic-NC 组比较: # $P < 0.05$

在抑制腹膜透析相关腹膜纤维化的进展中起关键作用。He et al^[9]研究认为,与正常对照组大鼠相比,腹膜透析组大鼠 miR-15a-5p 表达水平降低,血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)表达水平升高,miR-15a-5p 可通过靶向 VEGFR 参与腹膜透析相关腹膜纤维化的 EMT 过程。Li et al^[10]研究表明,腹膜透析患者 miR-302c 水平下调,且 miR-302c 的表达与 EMT 相关因子的表达呈负相关。接受慢性高糖腹膜透析液输注的小鼠具有腹膜纤维化的典型特征,并且 α -SMA 和 COL I 的表达更高^[11]。本研究构建的腹膜纤维化小鼠模型中小鼠腹膜组织明显增厚,胶原纤维明显增多, α -SMA 和 COL I 的表达较正常腹膜组织升高,miR-146b-5p 表达也升高。这提示腹膜纤维化小鼠模型成功构建,且其 miR-146b-5p 表达较正常小鼠发生变化。同时,通过采用不同浓度葡萄糖诱导小鼠腹膜间皮细胞,构建体外纤维化模型,进一步探讨 miR-146b-5p 在腹膜透析相关腹膜纤维化中的作用。

EMT 是导致腹膜纤维化的关键过程,其特点是破坏细胞极性和黏附能力以获得间充质特征,如迁移和侵袭能力,在 EMT 过程中,上皮钙黏附蛋白 E-cadherin 下调,而间充质标志物 N-cadherin 和 Vimentin 上调^[12]。本研究中,模型组小鼠腹膜组织和腹膜间皮细胞中 E-cadherin 表达均降低,上调 miR-146b-5p 表达后,高糖诱导的小鼠腹膜间皮细胞迁移和侵袭能力增强,增殖活性下降,E-cadherin 表达再次降低,Vimentin 和 N-cadherin 表达升高,而抑制 miR-146b-5p 表达后,细胞迁移和侵袭能力下降,E-cadherin 表达升高,Vimentin 和 N-cadherin 表达下降,这表明 miR-146b-5p 促进高糖诱导的小鼠腹膜间皮细胞 EMT 进程。

ZNRF3 是 E3 泛素连接酶家族成员,在多种癌细胞中下调,通过调控 Wnt/ β -catenin 通路抑制细胞生长、侵袭并诱导细胞凋亡^[13]。张钰欣等^[14]利用葛根素上调 miR-490 的表达,降低 ZNRF3 的表达,调控细胞中 EMT 相关蛋白表达,抑制非小细胞肺癌的生长、侵袭和迁移。本研究中通过 TargetScan 预测网站和双荧光素酶报告基因检测,发现 miR-146b-5p 与 ZNRF3 存在结合位点,ZNRF3 是 miR-146b-5p 的靶基因之一。在甲状腺癌相关研究中,miR-146b 被证明在癌组织中高表达,并能通过靶向作用于 ZNRF3 参与癌细胞 EMT 进程,促进其迁移和侵袭^[15]。本研究中,高糖诱导降低了小鼠腹膜间皮细

胞 ZNRF3 的表达,将 miR-146b-5p mimic 转染至小鼠腹膜间皮细胞后,ZNRF3 的表达下调,而 miR-146b-5p 表达受到抑制时,ZNRF3 的表达上调,这提示 miR-146b-5p 靶向负调控 ZNRF3 的表达,进而调控小鼠腹膜间皮细胞 EMT 过程。

综上所述,本研究显示 miR-146b-5p 可靶向 ZNRF3 基因促进高糖诱导的小鼠腹膜间皮细胞 EMT 进程。尽管其机制需要进一步的探索,但 miR-146b-5p 可作为预防腹膜透析相关腹膜纤维化的作用靶点。

参考文献

- [1] Terri M, Trionfetti F, Montaldo C, et al. Mechanisms of peritoneal fibrosis: focus on immune cells-peritoneal stroma interactions [J]. *Front Immunol*, 2021, 12:607204.
- [2] 刘晶,朱微,蒋春明,等. 低密度脂蛋白受体表达失调在高糖腹膜透析诱导腹膜纤维化中的作用[J]. *中华肾脏病杂志*, 2018, 34(6):432-8.
- [3] Liu F, Yu C, Qin H, et al. Nintedanib attenuates peritoneal fibrosis by inhibiting mesothelial-to-mesenchymal transition, inflammation and angiogenesis [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(13): 6103-14.
- [4] Wang Z, Wang Y, Ma X, et al. RSP02 silence inhibits tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma by ZNRF3/Hedgehog-Gli1 signal pathway [J]. *Life Sci*, 2021, 282: 119817.
- [5] Pellegrini K, Gerlach C, Craciun F, et al. Application of small RNA sequencing to identify microRNAs in acute kidney injury and fibrosis [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 312:42-52.
- [6] Xu E, Zhao J, Ma J, et al. MiR-146b-5p promotes invasion and metastasis contributing to chemoresistance in osteosarcoma by targeting zinc and ring finger 3 [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(1): 275-83.
- [7] Wei X, Bao Y, Zhan X, et al. MiR-200a ameliorates peritoneal fibrosis and functional deterioration in a rat model of peritoneal dialysis [J]. *Int Urol Nephrol*, 2019, 51(5):889-96.
- [8] 嵇水玉,沈泉泉,张家铭,等. C57BL/6 小鼠腹膜间皮细胞培养与鉴定 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2019, 20(5):424-5.
- [9] He Q, Wen L, Wang L, et al. MiR-15a-5p suppresses peritoneal fibrosis induced by peritoneal dialysis via targeting VEGF in rats [J]. *Ren Fail*, 2020, 42(1):932-43.
- [10] Li X, Liu H, Sun L, et al. MicroRNA-302c modulates peritoneal dialysis-associated fibrosis by targeting connective tissue growth factor [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(4):2372-83.
- [11] Liu J, Feng Y, Sun C, et al. Valsartan ameliorates high glucose-induced peritoneal fibrosis by blocking mTORC1 signaling [J]. *Exp Biol Med*, 2020, 245(11): 983-93.
- [12] Miyake T, Sakai N, Tamai A, et al. Trehalose ameliorates peritoneal fibrosis by promoting Snail degradation and inhibiting mesothelial-to-mesenchymal transition in mesothelial cells [J]. *Sci*

- Rep, 2020, 10(1):14292.
- [13] Cabana V, Lussier M. From drosophila to human: biological function of E3 ligase godzilla and its role in disease[J]. *Cells*, 2022, 11(3): 380.
- [14] 张钰欣, 张臻臻, 赵利刚, 等. 葛根素通过 miR-490/E3 泛素连接酶抑制非小细胞肺癌细胞生长、侵袭和迁移[J]. *中国医学科学院学报*, 2022, 44(1): 91 – 101.
- [15] Deng X, Wu B, Xiao K, et al. MiR-146b-5p promotes metastasis and induces epithelial-mesenchymal transition in thyroid cancer by targeting ZNRF3[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(1):71 – 82.

MiR-146b-5p targeting ZNRF3 promotes EMT in mouse peritoneal mesenchymal cells induced by high glucose

Wu Jin^{1,2}, Li Jiajia², Wang Xiaowei², Wang Juan²

(¹Anhui Provincial Key Laboratory of Urogenital Diseases, Hefei 230022;

²Research and Experiment Center, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To study the effects of miR-146b-5p and E3 ubiquitin protein ligase (ZNRF3) on the process of hyperglucose-induced epithelial mesenchymal transformation (EMT) and mechanism in mice peritoneal mesoepithelial cells. **Methods** The mice in normal culture were the control group, and the mice with peritoneal fibrosis were induced by 4.25% glucose dialysate and 0.1 mg/kg lipopolysaccharide. The peritoneal tissues of mice were collected and Masson staining was used to observe the changes of collagen fibers in the peritoneal tissues. The expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) and type I collagen (COL I) were determined by immunohistochemistry. Western blot was used to detect epithelial cadherin (E-cadherin), α -SMA and COL I expression in peritoneal tissues. qRT-PCR was used to detect miR-146b-5p and E3 ubiquitin-protein ligase (ZNRF3) expression in peritoneal tissues. Dual luciferase reporter gene assays were performed to verify the relationship between miR-146b-5p and ZNRF3 targeting. Control mouse peritoneal mesothelial cells were isolated, then high glucose was induced to construct a mouse peritoneal mesothelial cell fibrosis model. The cells were divided into control group, model group, mimic-NC group, miR-146b-5p-mimic group and miR-146b-5p-inhibitor. Transwell chambers were used to detect cell migration and invasion ability. Western blot was used to detect the expression of EMT-related proteins. **Results** Compared with control mice, model mice showed thickened peritoneal tissue, increased collagen fibers, increased expression of α -SMA and COL I ($P < 0.05$), increased expression of miR-146b-5p ($P < 0.05$), and decreased expression of E-cadherin and ZNRF3 ($P < 0.05$). miR-146b-5p targeted to negatively regulate ZNRF3 expression. Cellular level results showed that the number of migrating and invading cells in peritoneal mesothelial cells increased ($P < 0.05$), E-cadherin expression decreased ($P < 0.05$), and Vimentin and N-cadherin expression increased ($P < 0.05$) in model and mimic-NC groups of mice compared with the control group. Compared with model group, the trend of peritoneal mesothelial cell changes was more significant in the miR-146b-5p-mimic group of mice, and the cellular EMT process was inhibited in the miR-146b-5p-inhibitor group. **Conclusion** MiR-146b-5p can target ZNRF3 gene to promote high glucose-induced EMT process in mouse peritoneal mesothelial cells. **Key words** miR-146b-5p; ZNRF3; peritoneal dialysis; epithelial-to-mesenchymal transition; invasion; migration