

· 基础医学 ·

长链非编码 RNA ENSMUST00000127391 对小鼠肾小球系膜细胞增殖和纤维化的影响

李兰兰, 陈欣, 张恒璐, 王敏*, 陆卫平*

南京医科大学附属淮安第一医院内分泌科, 江苏 淮安 223300

[摘要] 目的:探究长链非编码 RNA ENSMUST00000127391(lncRNA 127391)在高糖培养的小鼠肾小球系膜细胞(mice mesangial cell, MMC)中的表达及功能。方法:在成功构建重组质粒 pCDH-lncRNA 127391 的基础上,将重组质粒 pCDH-lncRNA 127391 和对照质粒 pCDH 分别转染 MMC 细胞,通过 RT-qPCR 法检测 lncRNA 127391 表达水平。蛋白质免疫印迹法检测增殖和纤维化相关蛋白水平;CCK8 法检测 lncRNA 127391 对 MMC 细胞增殖的影响;流式细胞术检测对细胞凋亡的影响。结果:过表达 lncRNA 127391 的 MMC 细胞构建成功。CCK8 结果显示,lncRNA 127391 表达增加后,MMC 细胞增殖速度减慢;蛋白质免疫印迹结果表明过表达 lncRNA 127391 后,MMC 细胞中细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、纤维连接蛋白(FN)和 I 型胶原(Col-1)蛋白表达水平均下降;流式分析结果显示,过表达 lncRNA127391 后,MMC 细胞凋亡数增加。两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:lncRNA 127391 可以抑制高糖培养的 MMC 细胞增殖和纤维化。

[关键词] 长链非编码 RNA;糖尿病肾病;增殖;纤维化

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)12-1741-06

doi:10.7655/NYDXBNS20211205

The effects of long non-coding RNA ENSMUST00000127391 on proliferation and fibrosis of mice mesangial cells

LI Lanlan, CHEN Xin, ZHANG Henglu, WANG Min*, LU Weiping*

Department of Endocrinology and Metabolism, the Affiliated Huai'an NO.1 People's Hospital of Nanjing Medical University, Huai'an 223300, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the expression and function of long non-coding RNA ENSMUST00000127391 (lncRNA 127391) in mice mesangial cell (MMC) cultured with high glucose. **Methods:** The recombinant plasmid pCDH-lncRNA 127391 was successfully constructed in our group. In this study, the recombinant plasmid pCDH-lncRNA 127391 and control plasmid pCDH were transfected into MMC cells respectively, and the expression of lncRNA 127391 was detected by RT-qPCR. The fibrosis markers of fibronectin (FN) and type I collagen (Col-1) and proliferation markers of Cyclin D1 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were detected by Western blot. CCK8 assay was used to detect the proliferation of MMC. Flow cytometry was used to study the effect of lncRNA 127391 on the apoptosis of MMC. **Results:** Overexpression of lncRNA 127391 in MMC cells was successfully constructed. CCK8 showed that the overexpression of lncRNA 127391 decreased the proliferation rate of MMC cells. And the expression of Cyclin D1, proliferating cell nuclear antigen PCNA, FN and Col-1 in MMC cells decreased after overexpression of lncRNA 127391. Flow cytometry showed that the overexpression of lncRNA127391 increased the number of apoptotic MMC cells. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** lncRNA 127391 can inhibit the proliferation and fibrosis of MMC cells cultured with high glucose.

[Key words] long non-coding RNA; diabetic nephropathy; proliferation; fibrosis

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(12): 1741-1746]

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81800644);江苏省卫生健康委员会课题(H201458);淮安市 533 英才工程科研项目资助计划(HAA201744)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 736537823@qq.com; hayylwp@njmu.edu.cn

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的主要并发症之一,是终末期肾病的主要原因,增加了糖尿病患者的死亡率^[1]。DN的病理特征主要表现为肾小球肥大,基底膜增厚,足细胞凋亡,细胞外基质沉积等。研究表明,30%~40%的糖尿病患者并发DN。DN的发病因素多样,包括高血糖、晚期糖基化终末产物、血管紧张素Ⅱ、氧化应激和促炎细胞因子等^[2]。由于DN具体发病机制较为复杂,目前尚不明确,治疗方法有限,主要包括控制血糖、控制血压和控制血脂等,但众多DN患者仍然不可避免地发展为终末期肾病^[3],因此,探索DN的发病机制和寻找其治疗靶点至关重要。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是长度>200个核苷酸的非编码长链RNA^[4]。研究表明,lncRNA是多种生物过程的重要调节因子,广泛参与了增殖、纤维化、凋亡等生物学过程,在乳腺癌、骨肉瘤和胃癌等癌症疾病和糖尿病等代谢性疾病中发挥了重要作用^[5-9]。Yin等^[10]发现lncRNA TUG1可以调节胰岛β细胞功能,降低lncRNA TUG1的表达后β细胞凋亡率增加,胰岛素分泌减少,从而调节糖尿病的发生。目前,lncRNA在DN中的作用也逐渐显现^[6],它可从影响肾纤维化^[11]、介导肾脏炎症^[12]、调节肾小球系膜细胞的增殖和凋亡^[13]和足细胞损伤^[14]等多方面参与DN的发生发展。本课题组前期通过lncRNA芯片对DN小鼠和正常对照小鼠的肾组织进行差异lncRNA筛选,发现lncRNA 127391在DN小鼠中较正常小鼠表达显著降低,因此推测lncRNA127391可能在DN发生中发挥重要作用,并于前期成功构建重组质粒pCDH-lncRNA 127391^[15]。本研究将重组质粒pCDH-lncRNA 127391转染小鼠肾小球系膜细胞(mice mesangial cell, MMC)细胞,并观察MMC细胞的增殖和纤维化等指标的变化。

1 材料和方法

1.1 材料

MMC(中国科学院上海细胞库);DMEM培养基、胎牛血清(Gibco公司,美国);Lipofectamine™ 2000脂质体(Invitrogen公司,美国);抗FN抗体、抗α-Tubulin抗体(Abcam公司,美国);抗Col-1、抗CyclinD1抗体、抗PCNA抗体(Proteintech公司,美国);CCK8试剂盒(Dojindo公司,日本);Annexin V FITC Apoptosis Kit凋亡检测试剂盒(BD公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物实验

8周龄雄性C57BL/KSJ小鼠购自南京大学动物模式研究所,分为db/db组和db/m对照组,适应性喂养1周后,测量体重血糖并用ELISA法检测24h尿白蛋白定量(UAE),待db/db小鼠UAE显著升高时,取小鼠肾组织,并行HE及PAS染色,确定DN诊断^[16]。本研究经南京医科大学动物护理与伦理委员会批准实施。

1.2.2 细胞培养

为了模拟正常与糖尿病生理环境,将MMC细胞分别培养在葡萄糖浓度为5、15、25 mmol/L并含有10%胎牛血清的完全培养基中,置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养,每2~3d换新鲜培养基。取生长良好的3~8代细胞行功能试验。

1.2.3 质粒转染

将MMC细胞分成对照组(pCDH)和过表达lncRNA127391组(lncRNA127391)。将MMC细胞按每孔1×10⁵个细胞的密度接种于6孔板中,每孔加入2 mL DMEM培养基。置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中静置过夜培养。按照Lipofectamine™ 2000说明书,将pCDH和pCDH-lncRNA127391分别转入MMC细胞中,置于细胞培养箱中静置培养6h后,更换为完全培养基,置于培养箱中继续培养48h后,在荧光显微镜下观察,并收取细胞进行后续试验。

1.2.4 RT-qPCR 试验

TRIzol试剂提取细胞和组织的总RNA。按照HiScript II Q RT SuperMix(南京诺唯赞)试剂盒说明书行逆转录反应生成cDNA,参照ChamQ SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞)试剂盒说明书行PCR扩增,扩增条件:预变性95℃ 30s;循环反应95℃ 10s、60℃ 30s共40个循环;熔解曲线95℃ 15s、60℃ 60s、95℃ 15s。lncRNA 127391上游引物:5'-GCTCTAGAGCTATGATTTTTTTCATTGTAG-GTGAGCTCC-3',下游引物:5'-CGGGATCCCGGATATTCATGTTGCTT-3';β-actin上游引物:5'-GTGACGTTGACATCCGTAAGA-3',下游引物:5'-GCCGGACTCATCGTACTCC-3'

1.2.5 蛋白质免疫印迹

在细胞样本中加入适量配制好的含有PMSF的蛋白裂解液,置于冰上,每10min涡旋10s,涡旋3次后,4℃、13 000 r/min离心15min,吸取上清至新的1.5 mL EP管中。将蛋白样品用SDS-PAGE电泳分离后,转至PVDF膜,用5%脱脂奶粉溶液封闭1h

后,一抗孵育4℃过夜,次日回收一抗,用TBST漂洗PVDF膜后加入相应的二抗,室温下孵育1h后用TBST漂洗。随后曝光显影。

1.2.6 CCK8实验

将MMC细胞分别以2000个/孔的密度接种于96孔板中,每孔加入100μL完全培养基,每组设置6个重复孔,共铺种5块板。放入37℃、5%CO₂的培养箱中培养,分别于24、48、72、96h后取出,每孔各加入10μL CCK8试剂,放入培养箱中孵育1h,用酶标仪测定在450nm波长处的吸光度值。

1.2.7 凋亡实验

将MMC细胞以5×10⁵个/孔的密度接种于6孔板中,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养24h后,按照BD Annexin V FITC Apoptosis Kit凋亡试剂盒说明书操作,细胞消化后离心,用预冷的PBS洗2遍,重悬于100μL 1×Binding Buffer,随后分别加入5μL的Annexin V-FITC和5μL PI染色,轻轻混匀细胞,并

在室温避光处放置15min,加入400μL 1×Binding Buffer,混匀后在1h内使用BD流式细胞仪检测结果。

1.3 统计学方法

实验结果使用SPSS22.0软件进行统计学分析和作图,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,CCK-8实验中两组间比较采用双因素方差分析检验(two-way ANOVA),考虑处理条件及时间两个因素的影响,其余两组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA 127391在DN小鼠肾组织及高糖MMC细胞中低表达

db/db组小鼠血糖、体重、尿量、24h尿蛋白定量较db/m对照组小鼠均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$,表1)。

HE染色结果显示,与db/m小鼠相比,db/db小

表1 db/m组和db/db组小鼠的特征

Table 1 Characteristics of db/m and db/db mice

组别	n	性别	周龄	血糖(mmol/L)	体重(g)	尿量(mL)	24h尿蛋白定量(μg/24h)
db/m	3	雄性	9	11.80 ± 0.45	23.76 ± 0.21	0.67 ± 0.12	0.20 ± 0.03
db/db	3	雄性	9	≥33.30	36.03 ± 0.39	12.17 ± 1.55	2.86 ± 0.33
P值				<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

鼠表现出典型的DN病理改变,其系膜基质增生、基底膜增厚(图1A)。RT-qPCR检测lncRNA 127391相对表达量,结果显示,db/db小鼠肾组织中lncRNA 127391表达显著低于db/m小鼠肾组织(图1B)。且随着葡萄糖浓度的升高,MMC细胞中lncRNA 127391表达水平逐渐降低(图1C)。

2.2 重组质粒pCDH-lncRNA127391转染MMC细胞

将空载对照pCDH和pCDH-lncRNA 127391分别转入MMC细胞后培养48h,荧光显微镜观察到绿色荧光表达(图2A)。RT-qPCR结果显示,转染重组质粒pCDH-lncRNA127391后,MMC细胞中lncRNA 127391表达量显著高于对照组(图2B)。

2.3 过表达lncRNA 127391抑制MMC细胞增殖和纤维化

蛋白质免疫印迹结果显示过表达lncRNA 127391后,MMC细胞中纤维化标志物FN、Col-1的蛋白表达量和增殖标志物CyclinD1、PCNA的蛋白表达量显著降低(图3A)。CCK8实验结果显示,过表达lncRNA 127391组的MMC细胞增殖速度低于对照组(图3C)。结果表明lncRNA 127391可抑制

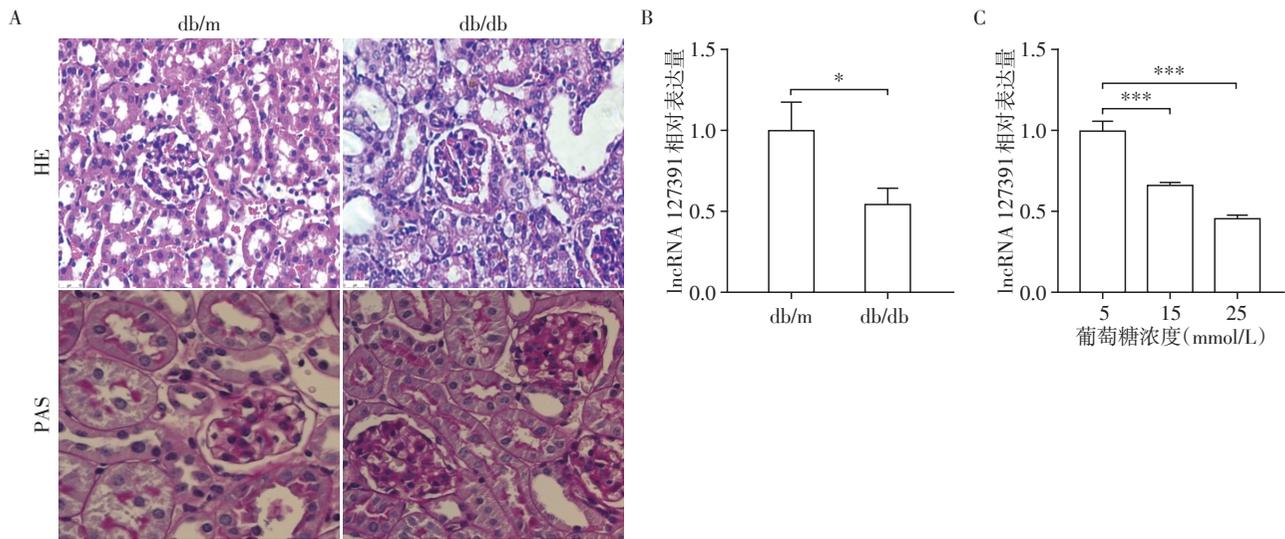
MMC细胞的增殖。

2.4 过表达lncRNA 127391促进MMC细胞凋亡

通过流式细胞术检测细胞凋亡水平,结果显示,过表达lncRNA 127391组的MMC细胞凋亡数显著高于对照组,表示lncRNA 127391可能促进MMC细胞凋亡(图4)。

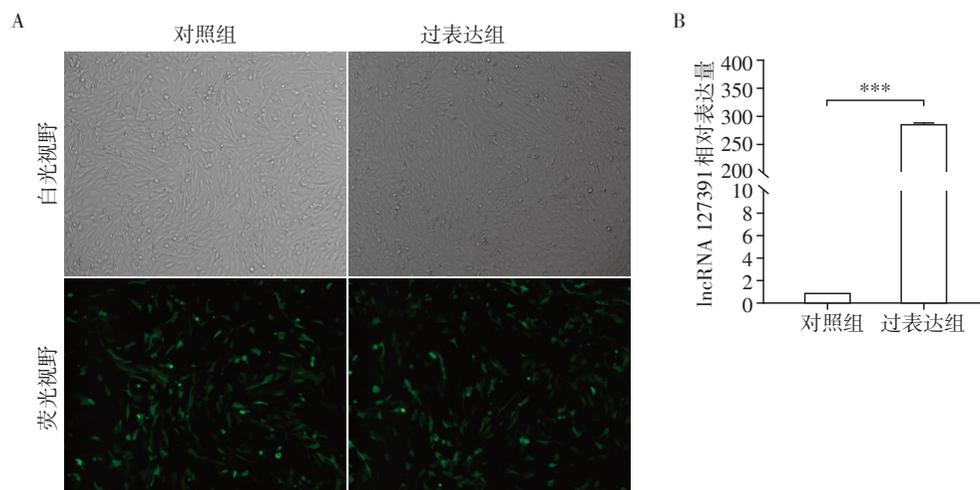
3 讨论

lncRNA是一类参与多种生物学进程和疾病发展的非编码RNA,其既可以定位于细胞核,也可以定位于细胞质。核lncRNA可通过多种方式介导表观遗传调控,包括表观转录和转录后修饰,调控方式包括染色体修饰、转录干扰或转录激活。细胞质中的lncRNA可以起到分子海绵的作用,与microRNA结合,间接增强蛋白质的表达^[17-18]。多项研究表明,lncRNA影响了多种癌症的发展。有学者发现,lncRNA PCAT19可以促进前列腺癌生长、侵袭和转移^[19]。在另一项研究中,研究人员发现,lncRNA REG1CP结直肠癌中表达显著上调,促进结直肠癌发生^[20]。lnc00491可促进食管鳞癌细胞增殖和抑制



A: HE、PAS染色检测 db/m 和 db/db 小鼠肾组织形态($\times 400$); B: RT-qPCR 检测小鼠肾组织中 lncRNA 127391 的表达; C: RT-qPCR 检测不同葡萄糖浓度(5、15、25 mmol/L)的 MMC 细胞中 lncRNA 127391 的表达。两组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图1 lncRNA 127391 在小鼠肾组织和 MMC 细胞中的表达水平
Figure 1 Expression level of lncRNA 127391 in mice kidney tissue and MMC



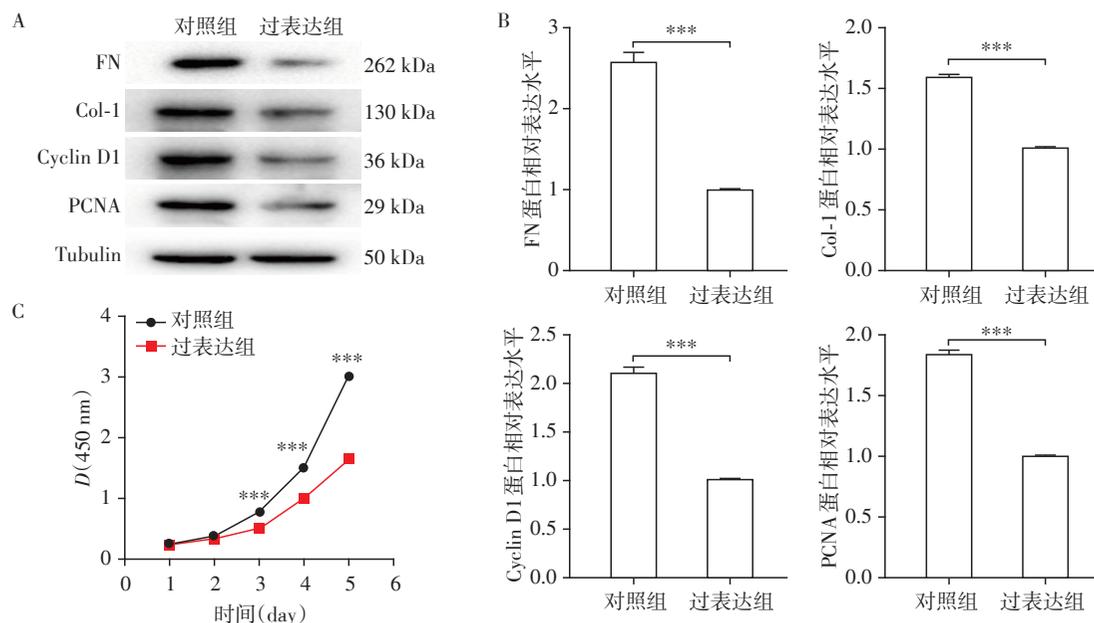
A: 荧光显微镜观察转染质粒后绿色荧光表达($\times 100$); B: RT-qPCR 检测转染过表达质粒后 lncRNA 127391 的相对表达量。两组比较, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图2 重组质粒转染后 lncRNA 127391 在 MMC 细胞中表达水平
Figure 2 Expression level of lncRNA 127391 in MMC after transfection

其凋亡,与食管癌预后不良相关^[21]。lncRNA 在糖尿病及其并发症中同样起着重要作用,研究表明,lncRNA 在调节 β 细胞功能,胰岛素分泌和胰岛素抵抗的发育中起重要作用^[22-24],影响糖尿病的发生。在糖尿病并发症中,lncRNA 的作用也不可忽视。lncRNA MALAT1 促进包括糖尿病视网膜病变,糖尿病心肌病变等糖尿病并发症的发生^[25]。DN,作为糖尿病的常见微血管并发症之一,是造成糖尿病患者死亡的重要原因之一,同时也是导致终末期肾病的主要原因。研究发现,lncRNA PVT1,RP23、MGC 和

ASncmtRNA2 等可通过靶向转化生长因子- $\beta 1$ 途径促进细胞外基质的积聚^[6],促进 DN 的发生。Huang 等^[26]发现,lncRNA NEAT1 可以激活 Akt/mTOR 信号通路而参与 DN 的发病。

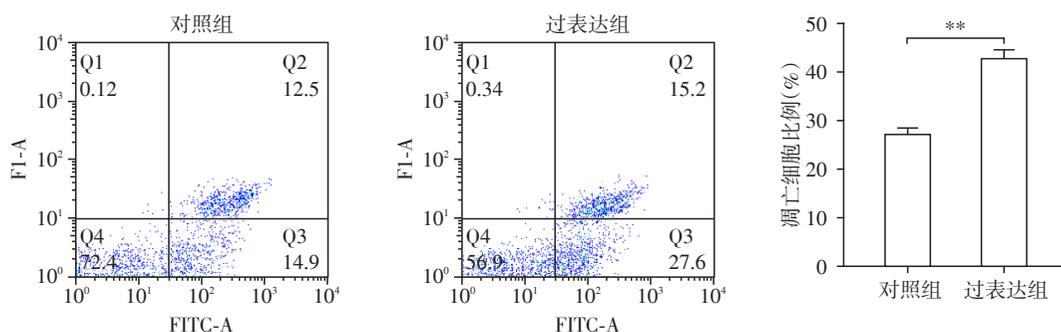
本课题组前期已成功构建 lncRNA 127391 过表达质粒。本研究将 lncRNA 127391 过表达质粒转染 MMC 细胞,通过免疫印迹实验发现,过表达 lncRNA 127391 后细胞增殖标志物和细胞纤维化标志物蛋白表达均下降,CCK8 实验表明过表达 lncRNA 127391 后,细胞增殖速度较对照组减慢。以上结果



A、B: 蛋白免疫印迹检测细胞纤维化标志物 FN、Col-1 和细胞增殖标志物 Cyclin D1 的蛋白表达水平。C: CCK8 法检测过表达 lncRNA127391 后对 MMC 细胞的影响。两组比较,*** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图3 过表达 lncRNA 127391 后抑制 MMC 细胞增殖和纤维化

Figure 3 Overexpression of lncRNA 127391 inhibits proliferation and fibrosis of MMC



流式分析法检测过表达 lncRNA 127391 后对 MMC 细胞凋亡的影响。两组比较,** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图4 过表达 lncRNA 127391 后促进 MMC 细胞凋亡

Figure 4 Overexpression of lncRNA 127391 promotes apoptosis of MMC cells

表明,lncRNA 127391 可抑制 MMC 细胞的增殖和纤维化。流式分析结果显示,过表达 lncRNA 127391 后,MMC 细胞凋亡数增加。

综上所述,本研究验证了 lncRNA 127391 在 DN 中低表达,并通过转染过表达 lncRNA 127391 重组质粒,进一步揭示了 lncRNA 127391 在 DN 中具有抑制肾小球系膜细胞增殖和纤维化的作用,但 lncRNA 127391 在 DN 中的发病机制有待深入探究。

[参考文献]

[1] LU L,ZHONG Z,GU J,et al. ets1 associates with KMT5A to participate in high glucose-mediated EndMT via upregulation of PFN2 expression in diabetic nephropathy [J]. Mol Med,2021,27(1):74

[2] LIANG G,SONG L,CHEN Z,et al. Fibroblast growth factor 1 ameliorates diabetic nephropathy by an anti-inflammatory mechanism[J]. Kidney Int,2018,93(1):95-109

[3] CHAN G C,TANG S C. Diabetic nephropathy: landmark clinical trials and tribulations [J]. Nephrol Dial Transplant,2016,31(3):359-368

[4] CHEN K,YU B,LIAO J. LncRNA SOX2OT alleviates mesangial cell proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy via Akt/mTOR - mediated autophagy [J]. Mol Med,2021,27(1):71

[5] DISTEFANO J K. The emerging role of long noncoding RNAs in human disease [J]. Methods Mol Biol,2018,1706:91-110

[6] LI Y,XU K,XU K,et al. Roles of identified long noncod-

- ing RNA in diabetic nephropathy [J]. *J Diabetes Res*, 2019, 2019: 5383010
- [7] ZHANG T, HU H, YAN G, et al. Long non-coding RNA and breast cancer [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2019, 18: 1533033819843889
- [8] YANG Y, JUNJIE P, SANJUN C, et al. Long non-coding RNAs in Colorectal Cancer: Progression and Future Directions [J]. *J Cancer*, 2017, 8(16): 3212–3225
- [9] 渠辉恒, 王宁, 陈义钢, 等. 长链非编码RNA SNHG14可能通过促进胃癌细胞增殖和转移影响胃癌的进展 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(1): 50–55
- [10] YIN D D, ZHANG E B, YOU L H, et al. Downregulation of lncRNA TUG1 affects apoptosis and insulin secretion in mouse pancreatic β cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(5): 1892–1904
- [11] YANG J, SHEN Y, YANG X, et al. Silencing of long non-coding RNA XIST protects against renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy via microRNA-93-5p-mediated inhibition of CDKN1A [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 317(5): F1350–F1358
- [12] PENG W, HUANG S, SHEN L, et al. Long noncoding RNA NONHSAG053901 promotes diabetic nephropathy via stimulating Egr-1/TGF- β -mediated renal inflammation [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18492–18503
- [13] JI T T, WANG Y K, ZHU Y C, et al. Long noncoding RNA Gm6135 functions as a competitive endogenous RNA to regulate toll-like receptor 4 expression by sponging miR-203-3p in diabetic nephropathy [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 6633–6641
- [14] BAI X, GENG J, LI X, et al. Long noncoding RNA LINC01619 regulates microRNA - 27a/forkhead box protein O1 and endoplasmic reticulum stress-mediated podocyte injury in diabetic nephropathy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(4): 355–376
- [15] 王敏, 陆卫平, 姚迪, 等. 长链非编码RNA ENSMUST00000127391 重组慢病毒载体的构建与鉴定 [J]. *解放军预防医学杂志*, 2016, 0(S2): 12–12
- [16] WANG M, WANG S, YAO D, et al. A novel long non-coding RNA CYP4B1-PS1-001 regulates proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 426: 136–145
- [17] GUO J, LIU Z, GONG R. Long noncoding RNA: an emerging player in diabetes and diabetic kidney disease [J]. *Clin Sci(Lond)*, 2019, 133(12): 1321–1339
- [18] CHEN X, SUN Y, CAI R, et al. Long noncoding RNA: multiple players in gene expression [J]. *BMB Rep*, 2018, 51(6): 280–289
- [19] HUA J T, AHMED M, GUO H, et al. Risk SNP-mediated promoter - enhancer switching drives prostate cancer through lncRNA PCAT19 [J]. *Cell*, 2018, 174(3): 564–575.e18
- [20] YARI H, JIN L, TENG L, et al. LncRNA REG1CP promotes tumorigenesis through an enhancer complex to recruit FANCD1 helicase for REG3A transcription [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5334
- [21] YE H, MULMI SHRESTHA S, ZHU J, et al. Long non-coding RNA LINC00491 promotes proliferation and inhibits apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(4): 1
- [22] SZCZEŚNIAK M W, MAKALOWSKA I. lncRNA-RNA interactions across the human transcriptome [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150353
- [23] MUTSKOV V, FELSENFELD G. The human insulin gene is part of a large open chromatin domain specific for human islets [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(41): 17419–17424
- [24] ZHANG F, YANG Y, CHEN X, et al. The long non-coding RNA β Faar regulates islet β -cell function and survival during obesity in mice [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3997
- [25] ABDULLE L E, HAO J L, PANT O P, et al. MALAT1 as a diagnostic and therapeutic target in diabetes-related complications: a promising long - noncoding RNA [J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(4): 548–555
- [26] HUANG S, XU Y, GE X, et al. Long noncoding RNA NEAT1 accelerates the proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy through activating Akt/mTOR signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7): 11200–11207

[收稿日期] 2021-07-29