

LncRNA GAS5 通过 miR-1228-3p/PKC/MMP2 轴抑制糖尿病肾病系膜细胞的增殖和纤维化^{*}

何建雄 杨文凡 余皓 施森

(西南医科大学附属医院血管外科, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA GAS5 在糖尿病肾病(CDKD)进展中的生物学作用及其潜在的分子机制。**方法** 收集 2023 年于本院接受标准肾活检的 10 例肾脏组织, 针对受试者肾脏组织进行 Masson 染色以及 PAS 染色; 使用高糖(30 mM)诱导人系膜细胞 48 h 后通过 RT-qPCR 检测 LncRNA GAS5 的表达水平; 过表达或敲除 LncRNA GAS5 和 miR-1228-3p 后通过 RT-qPCR、细胞增殖实验、EdU 实验和 Western Blot 实验检测系膜细胞增殖活性和纤维化相关蛋白包括纤维连接蛋白(FN)、IV 型胶原(Col-4)和转化生长因子 beta1(TGF- β 1)的表达及 PKC/MMP2 信号通路的激活情况。**结果** Masson 染色和 PAS 染色显示 DKD 患者肾组织系膜明显增生, 基底膜糖原增加, 纤维化明显增加。DKD 患者和高糖诱导的系膜细胞中 LncRNA GAS5 表达下调, 纤维化相关蛋白上调。LncRNA GAS5 协同 miR-1228-3p 表达上调 PKC/MMP-2 信号通路抑制系膜细胞的增殖和纤维化标志蛋白的表达。**结论** LncRNA GAS5 通过靶向 miR-1228-3p/PKC/MMP2 轴来抑制系膜细胞增殖以及纤维化相关蛋白和表达。LncRNA GAS5/miR-1228-3p/PKC/MMP2 轴阐明了糖尿病肾病的病理机制, 为 DKD 的治疗提供了潜在的治疗靶点。

【关键词】 LncRNA GAS5; 糖尿病肾病; miR-1228-3p; PKC/MMP2; 增殖和纤维化

【中图分类号】 R587.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2025. 05. 007

LncRNA GAS5 inhibits the proliferation and fibrosis of mesangial cells in diabetic kidney disease through the miR-1228-3p/PKC/MMP2 axis

HE Jianxiong, YANG Wenfan, YU Hao, SHI Sen

(Department of Vascular Surgery, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China)

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to explore the biological role of long noncoding RNA GAS5 in the progression of diabetic kidney disease and its potential molecular mechanism. **Methods** Ten renal biopsies from the Affiliated Hospital of Southwest Medical University in 2023 were collected and stained with Masson and PAS, and the expression of LncRNA GAS5 in human Mesangial cells induced by high glucose (30mM) for 48 hours was detected by RT-qPCR. After overexpression or knockout of LncRNA GAS5 and miR-1228-3p, the proliferative activity of Mesangial cells, the expression of fibrosis-related proteins including fibronectin (FN), type IV collagen (Col-4) and transforming growth factor beta1 (TGF- β 1) and the activation of PKC/MMP2 signal pathway were detected by RT-qPCR, cell proliferation assay, EdU assay and Western Blot. **Results** Masson's and PAS staining showed obvious mesangial hyperplasia, basement membrane glycogen increased, and fibrosis was obvious increased in the kidney tissue of patients with DKD; In DKD and Mesangial cells induced by high glucose, the expression of LncRNAGAS5 was down-regulated and fibrosis-related proteins were up-regulated. LncRNAGAS5 up-regulated PKC/MMP-2 signal pathway to inhibit Mesangial cells proliferation and fibrosis marker protein expression through synergistic up-regulation of miR-1228-3p expression. **Conclusion** LncRNA GAS5 inhibites Mesangial cells proliferation and fibrosis-related protein and expression by targeting miR-1228-3p/PKC/MMP2 axis. LncRNA GAS5/miR-1228-3p/PKC/MMP2 axis elucidates the pathological mechanism of diabetic kidney disease and provided a potential therapeutic target for the treatment of diabetic kidney disease.

【Key words】 LncRNA GAS5; Diabetic kidney disease; miR-1228-3p; PKC/MMP2; Proliferation and fibrosis

基金项目: 四川省科技计划联合创新专项资助项目(2022YFS0612-C4)

通信作者: 施森, 主任医师, E-mail: 50242042@qq.com

引用本文: 何建雄, 杨文凡, 余皓, 等. LncRNA GAS5 通过 miR-1228-3p/PKC/MMP2 轴抑制糖尿病肾病系膜细胞的增殖和纤维化[J]. 西部医学, 2025, 37(5): 664-671, 679. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2025. 05. 007

糖尿病肾病(Diabetic kidney disease, DKD)是目前最主要的糖尿病并发症之一,也是导致慢性肾脏疾病(Chronic kidney disease, CKD)的主要原因^[1]。据报道,多达 20%~50% 的活动性糖尿病最终会发展为 DKD^[2],这导致了 DKD 患者的高死亡率^[3]。且随着全球糖尿病患病率的持续上升,DKD 患者的数量将达到前所未有的水平^[4]。目前 DKD 的治疗选择集中在血压控制、血糖和血脂控制及生活方式的改变^[5]。肾素-血管紧张素系统阻断被广泛应用于 DKD 治疗,然而这种方法不足以预防大量患者的终末期肾病^[6],因此需要更多研究去发现 DKD 新的治疗靶点的病理机制。DKD 主要的病理组织学变化包括肾小球基底膜(Glomerular basement membrane, GBM)增厚、肾小球毛细血管高血压、系膜扩张、结节性硬化、肾小球硬化、间质纤维化、炎症和肾小管萎缩^[7]。近年来,对微小 RNA(microRNAs, miRNAs)和长链非编码 RNA(long noncoding RNAs, LncRNAs)的研究已被证明有助于 DKD 的病理过程和肾纤维化的发展^[8-9]。据报道,尿 miR-1228-3p 随着 DKD 患者肾纤维化的进展而减少^[10-11]。miR-1228-3p 还可调节乳腺癌、宫颈癌和银屑病的进展,并抑制银屑病的细胞增殖^[12-14]。近年来的研究表明,LncRNA 生长阻滞特异性转录因子-5(long noncoding RNAs growth arrest-specific transcript 5, LncRNA GAS5)在肝和心脏纤维化的病理过程中起着重要作用^[15],并且 LncRNA GAS5 可以调节 miRNA 的表达^[16-18]。相关研究证明 LncRNA GAS5 缺失可能加重单侧输尿管梗阻小鼠模型的肾纤维化^[19],并且下调 LncRNA GAS5 可促进肾细胞癌的增殖、迁移和侵袭^[20]。然而 LncRNA GAS5 在 DKD 中的潜在功能及其相关机制尚不清楚。此外,高血糖诱导的细胞内第二信使蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)的激活也在 DKD 的病理生理过程中发挥了作用。已知 PKC 的激活通过调节内皮细胞的通透性、血管收缩、细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)的维持、细胞生长、血管生成、细胞因子的激活和白细胞粘附来影响血管功能。PKC 的激活也能促进基质金属蛋白酶 2(Matrix metalloproteinase 2, MMP2)的表达,导致 ECM 的积累和随后的间质纤维化^[21-22]。因此本研究的目的是探讨 LncRNA GAS5 与 miR-1228-3p 在高糖刺激的肾系膜细胞模型中的关系,并探讨 PKC/MMP2 是否为 miR-1228-3p 的下游信号通路。此外,本研究还通过过表达和下调 LncRNA GAS5 和 miR-1228-3p,以进一步研究它们在高糖刺激的系膜细胞增殖和纤维化中的作用。

1 材料与方法

1.1 临床样本采集

收集 2023 年于本院接受标准

肾活检的 10 例肾脏组织,其中 5 例患者为 DKD 确诊患者,其余 5 例患者为非 DKD 患者。所有患者提供书面知情同意和人体组织试验的方案得到了本院伦理委员会的批准并遵守《赫尔辛基宣言》(编号: KY2023142)。

1.2 Masson 染色 石蜡切片使用苏木精染色进行细胞核染色 5~10 min,然后用 Masson 染色液染色 5~10 min。用苯胺蓝或浅绿色染色 5 min 后,切片浸泡在 0.2%冰醋酸溶液中,然后使用乙醇脱水、二甲苯澄清、中性树脂密封。最后通过数字显微镜采集图像。

1.3 PAS 染色 石蜡切片脱水后使用周期性酸溶液染色 15 min,然后与 PAS 染料溶液在 37℃ 下孵育 1 h,用苏木精染色 5 min 后使用数字显微镜采集图像。

1.4 细胞培养 人系膜细胞(Human mesangial cells, MCs)在添加 10% 胎牛血清(FBS, Gibco)的 EGM 中培养,并在含有 5% CO₂ 的 37℃ 加湿培养箱中培养。当细胞生长到 70% 的浓度时,用高浓度葡萄糖(30 mM)和正常浓度葡萄糖(5.5 mM)孵育 48 h。

1.5 细胞转染 LncRNA GAS5 特异性双链小干扰 RNA(siRNA)和过表达 LncRNA GAS5 质粒购自 Vigene 生物科学公司,miR-1228-3p mimic,miR-1228-3p inhibitor 均购自北京青科生物有限公司。体外转染时,将人系膜细胞接种于含有非增殖培养基的 6 孔培养板中,使用转染试剂盒进行细胞转染。转染后用 30 mM 葡萄糖处理细胞 48 h 以诱导纤维化。

1.6 RNA 的分离和实时荧光定量 PCR 采用 Trizol 试剂(成都福际生物有限公司)从糖尿病肾病患者的系膜细胞和血清中提取总 RNA 并使用 Premix RT EasyTM II 进行逆转录。采用 SYBR Green real time qPCR Master Mix 进行定量 PCR。采用比较 CT 法检测样本中相对于对照样本的靶基因表达情况。所有引物均由北京青科生物有限公司合成。以 18s RNA 水平作为参考。本研究中使用的引物序列如下:β-actin (F: GTGGCCGAGGACTTTGATTG; R: CCTGTAA CAACGCATCTCATATT), LncRNAGAS5 (F: CCG TGTAAGATCCGGTACCGTCTTTTCGAGGTAG GAGTC; R: TCCTCGAGGATATCGGATCCTCAA AGGCCACTGCACTCTA), miR-1228-3p (F: UCA CACCUGCCUCGCCCCC; R: AGTGTGGACGGA GCGGGGGG)。

1.7 Western Blot 分析蛋白表达 采用蛋白裂解缓冲液(上海生物技术有限公司)从系膜细胞中提取总蛋白。蛋白裂解物通过 SDS-PAGE 分离并转移到

PVDF 膜上。用 5% 牛血清白蛋白(BSA)在含吐温 20 的 TBST 缓冲液中阻断后将膜与一抗(1:1 000 稀释)在 4℃ 下孵育过夜。用 TBST 洗涤 3 次后与二抗(1:10 000 稀释)在室温下孵育 1 h。使用荧光成像系统仪显影,保存图像后使用 imageJ 测量条带灰度值并记录分析。

1.8 细胞增殖试验 根据制造商的说明使用细胞计数试剂盒-8(碧云天生物技术公司)分析细胞增殖活性。转染 48 h 后收集细胞用 CCK-8 溶液孵育,使用酶标仪测定了 450 nm 处的吸光度。

1.9 Edu 染色 采用 Edu 染色试剂盒(碧云天生物技术公司)分析细胞 DNA 复制活性。转染后的 MCs 在 6 孔板中培养后在 Edu 缓冲液中在 37℃ 条件下孵育 3 h 使用 3.7% 多聚甲醛固定 30 min,固定完成后用 PBST 缓冲液在室温下渗透 20 min。最后用 Edu 细胞增殖试剂盒在室温下染色 30 min 后使用显微镜采集图像。

1.10 生物信息学分析以及双荧光素酶报告基因检测 利用 LncBase 数据库预测 LncRNA GAS5 和 miR-1228-3p 的结合位点。将过表达 miR-1228-3p 的质粒及其对照分别与野生型、突变型(pmiRKLF5-WT、pmiRKLF5-MuT)进行共转染 24 h,然后裂解细胞离心 3~5 min。上清液用荧光素酶检测试剂盒评价相对发光单位,从而计算相对荧光素酶活性。

1.11 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。数据以($\bar{x} \pm s$)表示。两组间服从正态分布的数据比较采用 *t* 检验,多组间数据采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在 DKD 患者和高糖诱导的系膜细胞中, LncRNA GAS5 表达下调,纤维化相关蛋白上调 为确定 LncRNA GAS5 在 DKD 中的病理意义,本研究采用 RT-qPCR 方法检测了 DKD 患者肾组织中 LncRNA GAS5 的表达情况。DKD 患者中 LncRNA GAS5 的表达明显低于对照组,见图 1A。Masson 染色和 PAS 染色显示 DKD 患者肾组织系膜明显增生,基底膜胶原增加,纤维化明显增加(图 1B-1C)。采用高糖诱导的人系膜细胞模型作为体外模型来模拟 DKD 的病理变化,用不同浓度的葡萄糖处理人系膜细胞 48 h 后,采用 RT-qPCR 检测 LncRNA GAS5 的表达水平。高糖干预后 48 h 后 LncRNA GAS5 表达显著降低,见图 1D。进一步采用 Western Blot 实验检测纤维化标志物的蛋白表达,包括纤维连接蛋白(FN)、Ⅳ型胶原(Col-4)和转化生长因子 beta1(TGF- β 1)。高糖处理 48 h 后系膜细胞中 FN、Col-4 和 TGF-

β 1 的表达显著增加($P < 0.05$),见图 1E。Edu 染色显示,高糖诱导组的增殖活性明显高于对照组,见图 1F。这些结果表明,LncRNA GAS5 在 DKD 中表达下调,可能与系膜细胞增殖以及纤维化有关。

2.2 LncRNA GAS5 可抑制系膜细胞的增殖和纤维化 为了进一步证实 LncRNA GAS5 对细胞增殖和纤维化的影响,本研究在高糖处理的系膜细胞中过表达或敲低 LncRNA GAS5。过表达 LncRNA GAS5 后通过 RT-qPCR 检测 LncRNA GAS5 的表达水平显著升高,见图 2A。然后采用 CCK-8 和 Edu 染色法检测细胞增殖活性。过表达 LncRNA GAS5 显著抑制了细胞增殖活性,见图 2B、2C。Western blot 实验结果进一步显示过表达 LncRNA GAS5 显著降低了纤维化相关蛋白的表达,包括 FN、Col-4 和 TGF- β 1 的表达,见图 2D。然后在 LncRNA GAS5 基因敲低的细胞中进一步证实了 LncRNA GAS5 在细胞增殖和纤维化中的作用,见图 2E-2H。当转染 si-GAS5 后, LncRNA GAS5 的表达量下降,见图 2E,其增殖活性显著增加,见图 2F-2G。与预期的一样,在 si-GAS5 转染的细胞中 FN、Col-4 和 TGF- β 1 的表达显著增加,见图 2H。这些结果表明,LncRNA GAS5 可抑制系膜细胞的增殖和纤维化。

2.3 miR-1228-3p 是 LncRNA GAS5 的下游靶点 本研究进一步进行生物信息学分析以确定 LncRNA GAS5 的下游靶点。在 LncRNA GAS5 上存在一个推测的 miR-1228-3p 结合位点,双荧光素酶报告基因检测结果显示,LncRNA GAS5 和 miR-1228-3p 之间存在一个直接的结合位点,见图 3A。通过对 miR-1228-3p 的过表达和敲低来证实 miR-1228-3p 与 LncRNA GAS5 之间的关系。转染 miR-1228-3p mimic 显著提高了 miR-1228-3p 的表达水平,见图 3B。CCK-8 和 Edu 染色结果显示,转染 miR-1228-3p mimic 后系膜细胞的增殖活性明显降低,见图 3C-3D;当加入 miR-1228-3p mimic 时,纤维化相关蛋白的表达降低,见图 3E。加入 miR-1228-3p 抑制剂显著降低了 miR-1228-3p 的表达,见图 3F,并且显著提高了细胞增殖活性,见图 3G-3H。加入 miR-1228-3p 抑制剂后纤维化相关蛋白的表达增加,见图 3I。综上所述,miR-1228-3p 是 LncRNA GAS5 的下游靶点,可抑制系膜细胞的增殖和纤维化相关蛋白的表达。

2.4 LncRNA GAS5 通过上调 miR-1228-3p,抑制纤维化相关蛋白的增殖和表达,抑制 PKC/MMP2 信号通路的激活 接下来进一步探索 LncRNA GAS5 调控系膜细胞细胞增殖和纤维化相关蛋白表达的分子机制。在分别转染了 miR-1228-3p mimic 和 miR-

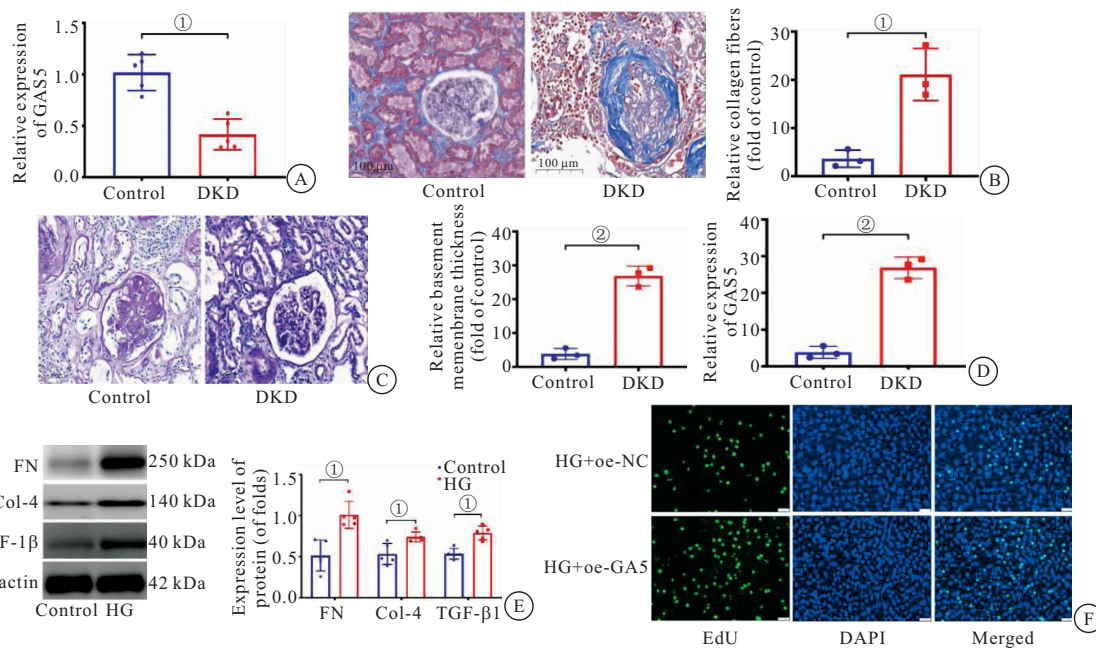


图 1 在 DKD 患者和高糖诱导的系膜细胞中, LncRNA GAS5 下调, 细胞增殖活性增强、纤维化蛋白表达升高

Figure 1 The LncRNAGAS5 was down-regulated, cell proliferation activity was enhanced, and the expression of fibrosis protein was increased in DKD patients and MCs induced by high glucose

注: A. RT-qPCR 检测 DKD 和对照组肾组织中 LncRNA GAS5 的水平 ($n=5$); B-C. 对照组和 DKD 患者的 Masson 染色以及 PAS 染色 ($n=3$); D. 采用 RT-qPCR 检测高糖干预 48 h 后人系膜细胞中 LncRNA GAS5 的表达 ($n=3$); E. 采用 Western blot 检测 FN、Col-4 和 TGF- β 1 的蛋白水平 ($n=5$); F. 采用 EdU 染色法检测细胞增殖活性。Control. 非糖尿病肾病或正常葡萄糖干预的 MCs (5.5 mM); DKD. 糖尿病肾病; HG. 高糖干预的 MCs (30mM); FN. 纤维连接蛋白; Col-4. IV 型胶原蛋白; TGF- β 1. 转化生长因子 β 1; 两组比较, ① $P<0.05$, ② $P<0.01$ 。

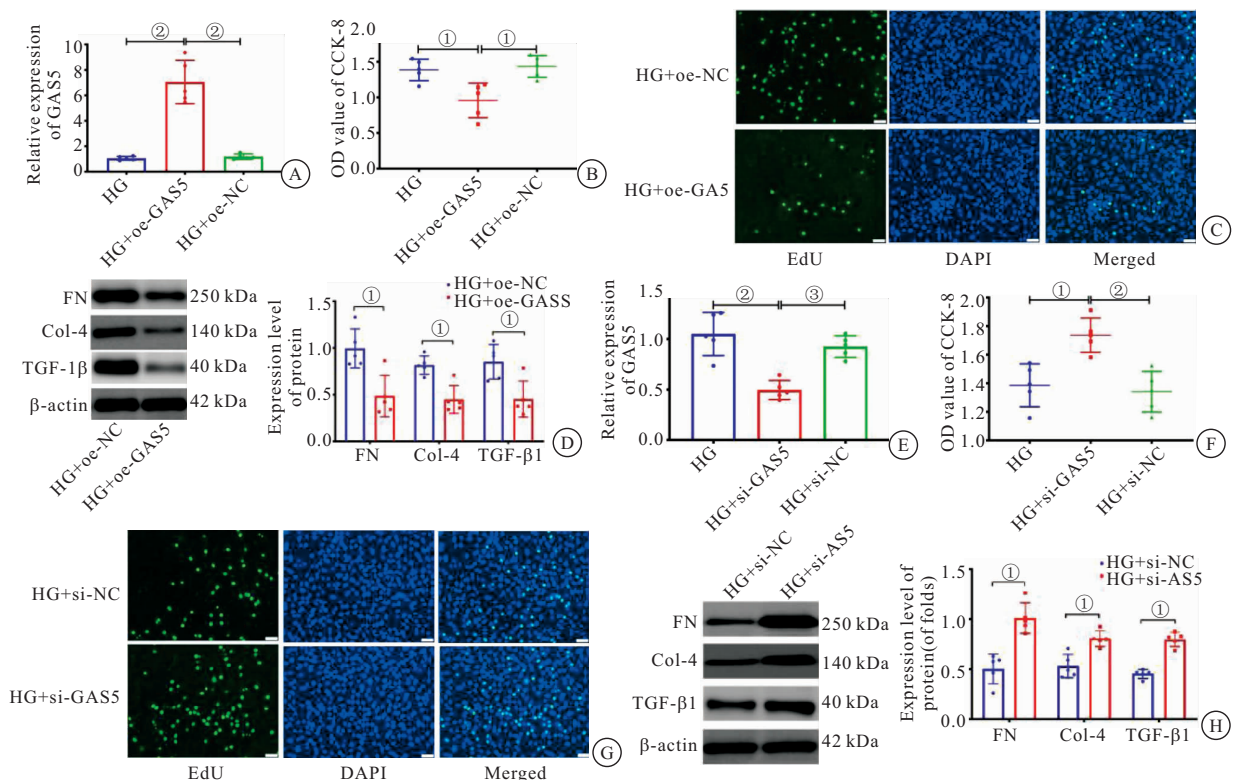


图 2 LncRNA GAS5 抑制系膜细胞增殖和纤维化相关蛋白的表达

Figure 2 LncRNA GAS5 inhibited mesangial cells proliferation and the expression of fibrosis-related proteins

注: A, E. 采用 RT-qPCR 检测并定量 LncRNA GAS5 过表达和下调的效率; B, F. 采用 CCK-8 法检测 LncRNA GAS5 过表达或基因敲低后的系膜细胞的增殖情况; C, G. EdU 染色显示 LncRNA GAS5 过表达或下调后的系膜细胞增殖活性; D, H. Western blot 实验验证 GAS5 过表达或下调的系膜细胞中 FN、Col-4 和 TGF- β 1 蛋白水平。每组 ($n=5$), 两组比较, ① $P<0.05$, ② $P<0.01$, ③ $P<0.001$ 。

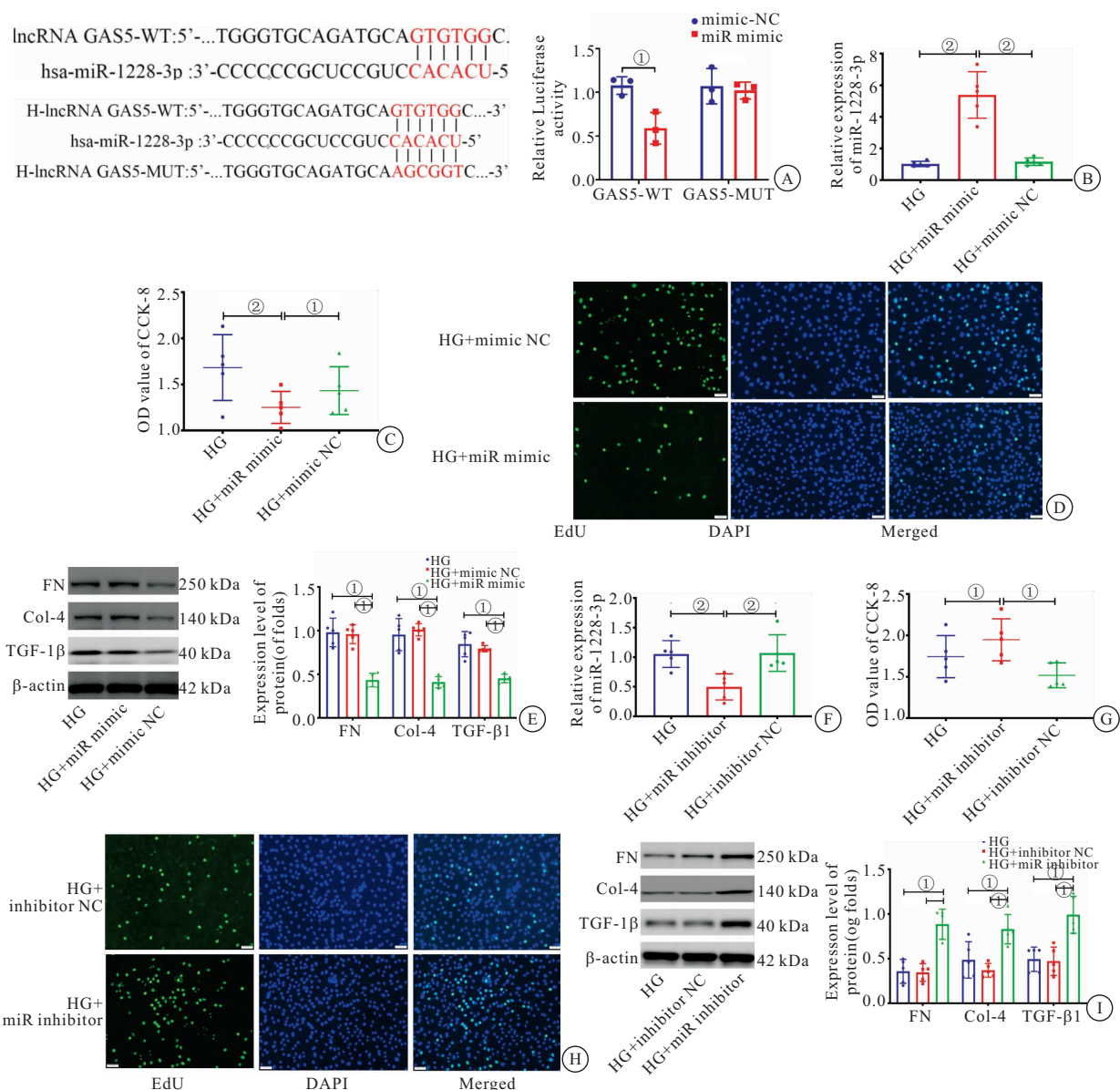


图 3 miR-1228-3p 是 LncRNA GAS5 的下游靶点, 调节细胞增殖和纤维化

Figure 3 miR-1228-3p was the downstream target of LncRNA GAS5 and regulated cell proliferation and renal fibrosis

注: A. 生物信息学分析预测 miR-1228-3p 在 LncRNA GAS5 上的结合位点以及双荧光素酶报告基因检测结果; B, F. 通过 RT-qPCR 检测转染 miR-1228-3p 模拟物或 miR-miR-3p 抑制剂的系膜细胞中 miR-1228-3p 的表达水平; C, G. 采用 CCK-8 法检测高糖诱导后 miR-1228-3p mimic 组或 miR-1228-3p 抑制剂组的系膜细胞的细胞增殖能力; D, H. 使用 EdU 检测 miR-1228-3p mimic 组或 miR-1228-3p 抑制剂组系膜细胞的增殖活性; E-I. 使用 Western blot 实验检测 miR-1228-3p mimic 组或 miR-1228-3p 抑制剂组纤维化相关蛋白的表达情况。每组 ($n=5$), 两组比较, ① $P<0.05$, ② $P<0.01$ 。

1228-3p inhibitor 的细胞中过表达 LncRNA GAS5, LncRNA GAS5 的表达进一步增加和降低, 见图 4A。结果表明, miR-1228-3p mimic 增加了 LncRNA GAS5 的表达。同样在过表达 LncRNA GAS5 和转染 miR-1228-3p mimic 的细胞中, miR-1228-3p 的表达显著增加, 见图 4B。CCK-8 检测和 EdU 染色结果显示, HG+oe-GAS5+miR mimic 组的细胞增殖活性明显降低, HG+oe-GAS5+miR inhibitor 组的细胞增殖活性明显上升, 见图 4C-4D。这些结果表明同时过表达 LncRNA GAS5 和 miR-1228-3p 可协同抑制细胞增殖。此外本研究还通过 western blot 实验检测了纤维

化相关蛋白的表达, 见图 4E。结果进一步证实了同时过表达 LncRNA GAS5 和 miR-1228-3p 可进一步抑制系膜细胞的纤维化。综上所述, 上调 LncRNA GAS5 和 miR-1228-3p 可显著抑制细胞增殖和纤维化。一些研究表明, miR-1228-3p 可以通过抑制 PKC/MMP2 信号通路来减少纤维化。因此, 本文进一步研究了 LncRNA GAS5/miR-1228-3p 是否通过调控 PKC/MMP2 信号通路抑制细胞增殖和纤维化。采用 western blot 实验检测 PKC 和 MMP2 的表达, 与 HG+oe-GAS5 组相比, miR-1228-3p mimic 干预后, 细胞中 MMP2 和 p-PKC 的表达明显降低, 而 p-PKA 的表

达没有明显变化,见图 4F。进一步转染 miR-1228-3p inhibitor 后,与 HG+oe-GAS5 组相比磷酸化的 PKC 和 MMP2 蛋白表达显著增加;提示 miR-1228-3p 表达

受到抑制时 PKC/MMP2 通路被激活。LncRNA GAS5 通过 miR-1228-3p /PKC/MMP2 轴调控系膜细胞增殖和纤维化。

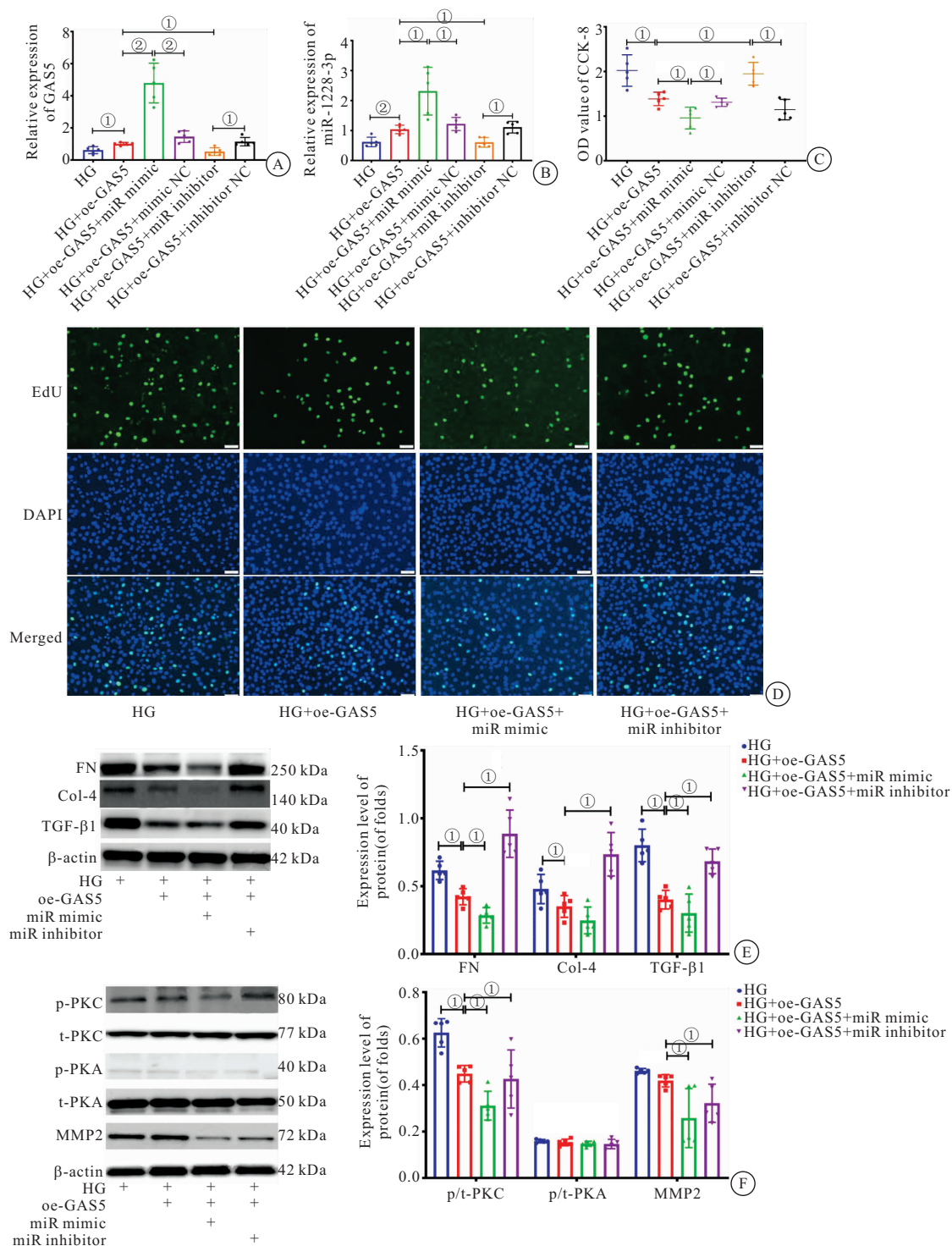


图 4 LncRNA GAS5 通过 miR-1228-3p/PKC/MMP2 轴调控系膜细胞的增殖和纤维化

Figure 4 LncRNA GAS5 regulates cell proliferation and fibrosis of mesangial cells via miR-1228-3p/PKC/MMP2 axis

注:A-B. RT-qPCR 显示转染 miR-1228-3p mimic 或 miR-1228-3p inhibitor 的系膜细胞上调表达 LncRNA GAS5 后,LncRNA GAS5 和 miR-1228-3p 在系膜细胞中的表达情况;C-D. 用 CCK-8 法和 EdU 法检测细胞增殖活性;E-F. western blot 实验检测转染 miR-1228-3p mimic 或 miR-1228-3p inhibitor 的系膜细胞上调表达 LncRNA GAS5 后 FN、Col-4、TGF-β1、p-PKC、t-PKC、p-PKA、t-PKA 和 MMP2 的表达水平。每组($n=5$),两组比较,① $P<0.05$,② $P<0.01$ 。p-PKC:磷酸化蛋白激酶 C;t-PKC:总蛋白激酶 C;p-PKA:磷酸化蛋白激酶 A;t-PKA:总蛋白激酶 A;MMP2:基质金属蛋白酶 2。

3 讨论

本研究发现,LncRNA GAS5 在 DKD 中的表达

下调与糖尿病肾病患者肾损害的严重程度呈负相关。

在体外 DKD 模型中,发现在高糖处理的人肾小球系

膜细胞中 LncRNA GAS5 的表达降低。此外,过表达 LncRNA GAS5 可抑制系膜细胞的增殖和纤维化相关标志物的表达,而下调 LncRNA GAS5 可促进细胞的增殖和表达。越来越多的研究集中在 LncRNAs 和 miRNAs 的网络调控功能上,探索其在多种疾病中的潜在生物学功能。LncRNA GAS5 亦是如此,LncRNA GAS5 还通过靶向 miR-378a-5p/SUFU 信号通路促进三阴性乳腺癌细胞的凋亡^[23]。LncRNA GAS5 通过 miR-223/NAMPT/PI3K/AKT 信号通路调控内皮祖细胞的增殖和衰老^[24],通过 miR-1825p/FOXO3a 轴抑制结直肠癌细胞的增殖^[25]。此外,LncRNA GAS5 通过竞争性结合 miR-96-5p,抑制纤维连接蛋白-1 的表达,减轻近端肾小管细胞的纤维化^[26]。本研究进一步发现 LncRNA GAS5 在 DKD 中显著抑制系膜细胞的增殖和纤维化。miR-1228-3p 被预测为 LncRNA GAS5 的一个靶点,本研究证实了 miR-1228-3p 与 LncRNA GAS5 之间的相互作用。然后 PKC 被预测为 miR-1228-3p 的下游靶点。LncRNA GAS5 可通过调节 miR-1228-3p 和 PKC/MMP2 轴来促进 MCs 的增殖。

既往研究表明,miRNAs 在糖尿病和肾脏疾病的发病机制中起着重要的调控作用。据报道,一系列 miRNAs 在功能上参与了 DKD 肾纤维化的进展,如 miR-16-5p、miR-21、miR-27a、miR-25、miR-29a、miR-130b^[27-31]。此外,miRNA-23a/27a 通过肌肉-肾脏的对话减少肌肉萎缩和肾纤维化^[32]。一些 miRNAs 被鉴定为通过不同的下游靶点参与肾纤维化。miR-133b 和 miR-199b 通过靶向 SIRT1 抑制 TGF- β 1 诱导的上皮间充质转化和肾纤维化^[33]。尿液中的 miR-27b-3p 和 miR-1228-3p 也被发现与 DKD 患者肾纤维化的进展相关^[11]。本研究采用生物信息学方法预测 miR-1228-3p 与 LncRNA GAS5 之间的潜在结合位点并使用双荧光素酶报告证实了结合位点的存在。miR-1228-3p 与许多疾病有关。miR-1228-3p 可作为结肠直肠癌的生物标志物^[34]。miR-1228-3p 在肾移植受者中起着重要作用^[35]。在宫颈癌患者中,miR-1228-3p 调控 IRF4,并影响患者的总生存率^[13]。miR-1228-3p 通过 PTEN 抑制 IL-22 诱导的角质形成细胞增殖、运动和细胞周期进程,促进细胞凋亡^[14]。miR-1228-3p 可抑制 MCs 的增殖和纤维化,并由 LncRNA GAS5 调控。

蛋白激酶 C 是一种磷脂依赖的丝氨酸/苏氨酸激酶,似乎参与了对多种激素和生长因子的信号转导反应^[36]。它们参与了多种细胞过程,包括细胞增殖、迁移和代谢^[37]。机械拉伸可通过 PKC 促进膀胱平滑肌

细胞的增殖^[38]。调控节点 PKC 被预测为 miR-1228-3p 的下游信号。本研究发现 LncRNA GAS5 和 miR-1228-3p 通过调节 PKC 的磷酸化水平来抑制糖尿病肾病的进展。

MCs 上调 IV 型胶原合成或下调降解可导致 ECM(细胞外基质)积累,从而导致系膜病理的扩张。MMP2 是一种 IV 型胶原蛋白酶,能有效地裂解 IV 型胶原蛋白。据报道,MMP2 已在实验 DKD 和人类 DKD 中被发现^[39]。此外,MMP2 与肾小球肾炎密切相关^[40]。本研究发现 MMP2 的磷酸化受到 miR-1228-3p 的调控。

PKC 和 MMP2 参与了糖尿病肾病的肾纤维化,被确定为 miR-1228-3p 的下游通路。本研究结果表明,miR-1228-3p 通过靶向 PKC/MMP2 通路抑制细胞增殖和纤维化相关蛋白的表达。本研究通过 RT-qPCR 和 Western blot 实验进一步探讨了 LncRNA GAS5 与 PKC 之间的关系,发现系膜细胞中 LncRNA GAS5 的表达水平与 PKC/MMP2 通路呈负相关。此外,在过表达 LncRNA GAS5 的系膜细胞中,细胞增殖活性和纤维化相关蛋白 FN、Col-4 和 TGF- β 1 的活性均被下调。本研究显示,LncRNA GAS5 与糖尿病肾病的严重程度呈负相关。LncRNA GAS5 与 miR-1228-3p 协同调控靶向 PKC/MMP2 轴抑制纤维化相关蛋白的增殖和表达。新发现的 LncRNA GAS5/miR-1228-3p/PKC/MMP2 轴不仅可以阐明 DKD 的发展,而且为 DKD 的治疗提供了潜在的治疗靶点。综上所述,LncRNA GAS5 通过 miR-1228-3p /PKC/MMP2 轴调节系膜细胞的增殖和纤维化。

4 结论

LncRNA GAS5 通过靶向 miR-1228-3p/PKC/MMP2 轴来抑制系膜细胞增殖以及纤维化相关蛋白和表达。LncRNA GAS5/miR-1228-3p/PKC/MMP2 轴阐明了糖尿病肾病的病理机制,为糖尿病肾病的治疗提供了潜在的治疗靶点。

【参考文献】

- [1] GU Y Y, LU F H, HUANG X R, *et al.* Non-Coding RNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets for Diabetic Kidney Disease[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 583528.
- [2] SELBY N M, TAAL M W. An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2020, 22: 3-15.
- [3] BRAUNWALD E. Diabetes, heart failure, and renal dysfunction: The vicious circles[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2019, 62(4): 298-302.
- [4] ALICIC R Z, COX E J, NEUMILLER J J, *et al.* Incretin drugs in diabetic kidney disease: biological mechanisms and clinical evidence[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(4): 227-244.

- [5] GNUDI L, COWARD RJ M, LONG D A. Diabetic Nephropathy: Perspective on Novel Molecular Mechanisms[J]. Trends Endocrinol Metab, 2016,27(11):820-830.
- [6] FERNANDEZ-FERNANDEZ B, ORTIZ A, GOMEZ-GUERRERO C, *et al.* Therapeutic approaches to diabetic nephropathy—beyond the RAS[J]. Nat Rev Nephrol, 2014,10(6):325-346.
- [7] RAVAL N, KUMAWAT A, KALYANE D, *et al.* Understanding molecular upsets in diabetic nephropathy to identify novel targets and treatment opportunities[J]. Drug Discov Today, 2020,25(5):862-878.
- [8] KATO M, NATARAJAN R. Diabetic nephropathy—emerging epigenetic mechanisms[J]. Nat Rev Nephrol, 2014,10(9):517-530.
- [9] HE F, PENG F, XIA X, *et al.* MiR-135a promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by regulating TRPC1[J]. Diabetologia, 2014,57(8):1726-1736.
- [10] LU Z, LIU N, WANG F. Epigenetic Regulations in Diabetic Nephropathy[J]. J Diabetes Res, 2017,2017:7805058.
- [11] CONSERVA F, BAROZZINO M, PESCE F, *et al.* Urinary miRNA-27b-3p and miRNA-1228-3p correlate with the progression of KiDKDey Fibrosis in Diabetic Nephropathy[J]. Sci Rep, 2019,9(1):11357.
- [12] SUN J, LI X, YU E, *et al.* A novel tumor suppressor ASMTL-AS1 regulates the miR-1228-3p/SOX17/ β -catenin axis in triple-negative breast cancer[J]. Diagn Pathol, 2021,16(1):45.
- [13] DENG Z M, DAI F F, ZHOU Q, *et al.* Hsa_circ_0000301 facilitates the progression of cervical cancer by targeting miR-1228-3p/IRF4 Axis[J]. BMC Cancer, 2021,21(1):583.
- [14] LU J, XU X, LI Y, *et al.* CircRAB3B suppresses proliferation, motility, cell cycle progression and promotes the apoptosis of IL-22-induced keratinocytes depending on the regulation of miR-1228-3p/PTEN axis in psoriasis[J]. Autoimmunity, 2021,54(5):303-312.
- [15] WANG Y N, SHAN K, YAO M D, *et al.* Long Noncoding RNA-GAS5: A Novel Regulator of Hypertension-Induced Vascular Remodeling[J]. Hypertension, 2016,68(3):736-748.
- [16] TAO H, ZHANG J G, QIN R H, *et al.* LncRNA GAS5 controls cardiac fibroblast activation and fibrosis by targeting miR-21 via PTEN/MMP-2 signaling pathway[J]. Toxicology, 2017,386:11-18.
- [17] DONG Z, LI S, WANG X, *et al.* LncRNA GAS5 restrains CCl4-induced hepatic fibrosis by targeting miR-23a through the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019,316(4):G539-G550.
- [18] CHEN D, ZHANG M. GAS5 regulates diabetic cardiomyopathy via miR-221-3p/p27 axis-associated autophagy [J]. Mol Med Rep, 2021,23(2):135.
- [19] XU L, HU G, XING P, *et al.* Corrigendum to "Paclitaxel alleviates the sepsis-induced acute kiDKDey injury via lnc-MALAT1/miR-370-3p/HMGB1 axis"[J]. Life Sci, 2021,272:119159.
- [20] ZHANG L, WANG C, MA M. LncRNA POU3F3 Promotes cancer cell proliferation, migration, and invasion in renal cell carcinoma by downregulating LncRNA GAS5 [J]. KiDKDey Blood Press Res, 2021,46(5):613-619.
- [21] ABDULLAH Z, BAYRAKTUTAN U. Suppression of PKC- α attenuates TNF- α -evoked cerebral barrier breakdown via regulations of MMP-2 and plasminogen-plasmin system[J]. Biochim Biophys Acta, 2016,1862(7):1354-1366.
- [22] YANG S F, LIN C Y, YANG P Y, *et al.* Increased expression of gelatinase (MMP-2 and MMP-9) in pterygia and pterygium fibroblasts with disease progression and activation of protein kinase C[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009,50(10):4588-4596.
- [23] ZHENG S, LI M, MIAO K, *et al.* LncRNA GAS5-promoted apoptosis in triple-negative breast cancer by targeting miR-378a-5p/SU-FU signaling[J]. J Cell Biochem, 2020,121(3):2225-2235.
- [24] YAO J, SHI Z, MA X, *et al.* LncRNA GAS5/miR-223/NAMPT axis modulates the cell proliferation and senescence of endothelial progenitor cells through PI3K/AKT signaling[J]. J Cell Biochem, 2019,120(9):14518-14530.
- [25] CHENG K, ZHAO Z, WANG G, *et al.* LncRNA GAS5 inhibits colorectal cancer cell proliferation via the miR-182-5p/FOXO3a axis[J]. Oncol Rep, 2018,40(4):2371-2380.
- [26] WANG W, JIA Y J, YANG Y L, *et al.* LncRNA GAS5 exacerbates renal tubular epithelial fibrosis by acting as a competing endogenous RNA of miR-96-5p [J]. Biomed Pharmacother, 2020,121:109411.
- [27] DUAN Y R, CHEN B P, CHEN F, *et al.* Exosomal microRNA-16-5p from human urine-derived stem cells ameliorates diabetic nephropathy through protection of podocyte[J]. J Cell Mol Med, 2021,25(23):10798-10813.
- [28] MCCLELLAND A D, HERMAN-EDELSTEIN M, KOMERS R, *et al.* miR-21 promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by targeting PTEN and SMAD7[J]. Clin Sci (Lond), 2015,129(12):1237-1249.
- [29] ZHOU Z, WAN J, HOU X, *et al.* MicroRNA-27a promotes podocyte injury via PPAR γ -mediated β -catenin activation in diabetic nephropathy[J]. Cell Death Dis, 2017,8(3):e2658.
- [30] LIU Y, LI H, LIU J, *et al.* Variations in MicroRNA-25 Expression influence the severity of diabetic kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2017,28(12):3627-3638.
- [31] SHI S, SONG L, YU H, *et al.* Knockdown of LncRNA-H19 ameliorates kidney fibrosis in diabetic mice by suppressing miR-29a-Mediated EndMT[J]. Front Pharmacol, 2020,11:586895.
- [32] ZHANG A, LI M, WANG B, *et al.* miRNA-23a/27a attenuates muscle atrophy and renal fibrosis through muscle-kidney crosstalk [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2018,9(4):755-770.
- [33] SUN Z, MA Y, CHEN F, *et al.* miR-133b and miR-199b knockdown attenuate TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition and renal fibrosis by targeting SIRT1 in diabetic nephropathy[J]. Eur J Pharmacol, 2018,837:96-104.
- [34] DURAN-SANCHON S, VILA-NAVARRO E, MARCUELLO M, *et al.* Validation of miR-1228-3p as housekeeping for microRNA analysis in liquid biopsies from colorectal cancer patients [J]. Biomolecules, 2019,10(1):16.
- [35] FREITAS R C C, BORTOLIN R H, GENVIGIR F D V, *et al.* Differentially expressed urinary exo-miRs and clinical outcomes in kidney recipients on short-term tacrolimus therapy: a pilot study[J]. Epigenomics, 2020,12(22):2019-2034.
- [36] TUTTLE K R. Protein kinase C-beta inhibition for diabetic kidney disease[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2008,82:S70-S74.

- short-chain fatty acids and Parkinson's disease: a review from pathology to clinic[J]. *Neurosci Bull*, 2024, 40(4): 500-516.
- [4] MI N, MA L L, LI X Y, *et al*. Metabolomic analysis of serum short-chain fatty acid concentrations in a mouse of MPTP-induced Parkinson's disease after dietary supplementation with branched-chain amino acids [J]. *Open Med*, 2023, 18(1): 20230849.
- [5] THEMISTOKLEOUS C, BAGNOLI E, PARULEKAR R, *et al*. Role of autophagy pathway in Parkinson's disease and related genetic neurological disorders[J]. *J Mol Biol*, 2023, 435(12): 168144.
- [6] CHEDID J. The role of autophagy in TLR2-mediated alpha-synuclein accumulation in neurons[D]. 2023.
- [7] CHEN M, MOR D E. Gut-to-brain α -synuclein transmission in Parkinson's disease: evidence for prion-like mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7205.
- [8] WANG L, CHEN Y, XU M M, *et al*. Electroacupuncture alleviates functional constipation in mice by activating enteric glial cell autophagy via PI3K/AKT/mTOR signaling[J]. *Chin J Integr Med*, 2023, 29(5): 459-469.
- [9] YAP K H, AZMIN S, MAKPOL S, *et al*. Profiling neuroprotective potential of trehalose in animal models of neurodegenerative diseases: a systematic review[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(6): 1179-1185.
- [10] NÁPOLES-MEDINA A Y, AGUILAR-USCANGA B R, SOLÍS-PACHECO J R, *et al*. Oral administration of *Lactobacillus* inhibits the permeability of blood-brain and gut barriers in a Parkinsonism model[J]. *Behav Neurol*, 2023, 2023: 6686037.
- [11] HIRAYAMA M, NISHIWAKI H, HAMAGUCHI T, *et al*. Gastrointestinal disorders in Parkinson's disease and other Lewy body diseases[J]. *NPJ Parkinsons Dis*, 2023, 9(1): 71.
- [12] WANG Y, CHEN W J, HAN Y Y, *et al*. Neuroprotective effect of engineered *Clostridium butyricum*-pMTL007-GLP-1 on Parkinson's disease mice models via promoting mitophagy[J]. *Bioeng Transl Med*, 2023, 8(3): e10505.
- [13] FREEMAN-STRIEGEL L, HAMILTON J, KANNAPPAN R, *et al*. Chronic Δ^9 -tetrahydrocannabinol treatment has dose-dependent effects on open field exploratory behavior and [3 H]SR141716A receptor binding in the rat brain[J]. *Life Sci*, 2023, 327: 121825.
- [14] ZHAO S S, WANG S Q, CAO L X, *et al*. Acupuncture promotes nerve repair through the benign regulation of mTOR-mediated neuronal autophagy in traumatic brain injury rats[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(1): 458-470.
- [15] BAI Y Y, ZHANG X Y, LI Y, *et al*. Protein kinase A is a master regulator of physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. *Circ Res*, 2024, 134(4): 393-410.
- [16] CHENG J, FAN Y Q, ZHANG W F, *et al*. Overexpressing SIRT6 can attenuate the injury of intracerebral hemorrhage by down-regulating NF- κ B[J]. *Neuromolecular Med*, 2023, 25(1): 53-63.
- [17] ELANGO VAN A, DAHIYA B, KIROLA L, *et al*. Does gut brain axis has an impact on Parkinson's disease (PD)? [J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 94: 102171.
- [18] 高青, 秦燕, 任晓亮, 等. 基于 Nrf2/RAGE/NF- κ B 信号通路探究丙泊酚对帕金森病大鼠认知障碍的影响[J]. *西部医学*, 2023, 35(12): 1745-1750.
- [19] JIALI J, SAINAN Z, XIAOLI D, *et al*. Anti-parkinsonism Effect of Laver Combined with Madopar and Its Effect on the Intestinal Flora [J]. 2023, 39(9). DOI: 10.13982/j. mfst. 1673-9078. 2023. 9. 1246.
- [20] FOCK E, PARNOVA R. Mechanisms of blood-brain barrier protection by microbiota-derived short-chain fatty acids [J]. *Cells*, 2023, 12(4): 657.
- [21] MAJUMDAR A, SIVA VENKATESH I P, BASU A. Short-chain fatty acids in the microbiota-gut-brain axis: role in neurodegenerative disorders and viral infections[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2023, 14(6): 1045-1062.
- [22] JI L L, HUANG T T, MAO L L, *et al*. The gut microbiota metabolite butyrate mitigates MPTP/MPP $^{+}$ -induced Parkinson's disease by inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2023, 39(10): 1002-1010.
- [23] GUO B B, ZHANG J Y, ZHANG W H, *et al*. Gut microbiota-derived short chain fatty acids act as mediators of the gut-brain axis targeting age-related neurodegenerative disorders: a narrative review[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2023: 1-22.
- [24] JU S, SHIN Y, HAN S, *et al*. The gut-brain axis in schizophrenia: the implications of the gut microbiome and SCFA production[J]. *Nutrients*, 2023, 15(20): 4391.
- [25] DE FILIPPO C, COSTA A, BECAGLI M V, *et al*. Gut microbiota and oleoylethanolamide in the regulation of intestinal homeostasis[J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1135157.
- [26] SALIM S, AHMAD F, BANU A, *et al*. Gut microbiome and Parkinson's disease: perspective on pathogenesis and treatment [J]. *J Adv Res*, 2023, 50: 83-105.
- [27] JIANG M J, WU W, XIONG Z J, *et al*. Targeting autophagy drug discovery: targets, indications and development trends[J]. *Eur J Med Chem*, 2024, 267: 116117.
- (收稿日期: 2024-02-20; 修回日期: 2025-04-02; 编辑: 张翰林)

(上接第 671 页)

- [37] CHICHGER H, VANG A, O'CONNELL K A, *et al*. PKC δ and β II regulate angiotensin II-mediated fibrosis through p38: a mechanism of RV fibrosis in pulmonary hypertension[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308(8): L827-L836.
- [38] WAZIR R, LUO D Y, DAI Y, *et al*. Expression and proliferation profiles of PKC, JNK and p38MAPK in physiologically stretched human bladder smooth muscle cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 438(3): 479-482.
- [39] KIM S S, SHIN N, BAE S S, *et al*. Enhanced expression of two discrete isoforms of matrix metalloproteinase-2 in experimental and human diabetic nephropathy[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171625.
- [40] PHILLIPS T M, FADIA M, LEA-HENRY T N, *et al*. MMP2 and MMP9 associate with crescentic glomerulonephritis[J]. *Clin Kidney J*, 2017, 10(2): 215-220.
- (收稿日期: 2024-06-30; 修回日期: 2024-12-01; 编辑: 张翰林)