

临床细胞生物学

长链非编码RNA 1500026H17Rik对高糖培养的肾小球系膜细胞增殖的影响

张亚娟¹ 孙 艳¹ 彭 睿² 彭惠民² 张 政^{1*}¹重庆医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室, 重庆 400016;²重庆医科大学基础医学院分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

摘要 为了探讨长链非编码RNA 1500026H17Rik对小鼠肾小球系膜细胞增殖的影响, 采用qRT-PCR(quantitative Real-time PCR)检测1500026H17Rik在糖尿病肾病小鼠肾脏组织及在高糖和低糖条件下培养的肾小球系膜细胞中的表达水平; 扩增小鼠1500026H17Rik的全长序列, 将其克隆到pcDNA3.1(+)载体上, 构建pcDNA3.1(+)-1500026H17Rik过表达质粒, 并设计合成siRNA; 将1500026H17Rik-siRNA和pcDNA(+)-1500026H17Rik过表达质粒分别转染至高糖或低糖培养的肾小球系膜细胞中, 通过5-乙基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-doxyuridine, EdU)检测肾小球系膜细胞的增殖能力。结果表明, 在糖尿病肾病小鼠肾脏组织和高糖培养的系膜细胞中1500026H17Rik表达水平显著提高。在低糖培养的系膜细胞中转染pcDNA3.1(+)-1500026H17Rik过表达质粒后与低糖培养的系膜细胞或空质粒转染对照组相比, 低糖1500026H17Rik过表达的肾小球系膜细胞的增殖能力明显提高。同时, 将通过qRT-PCR筛选出的一条敲低效率最佳的1500026H17Rik-siRNA转染至高糖培养的系膜细胞后, 与高糖培养的系膜细胞或siRNA转染对照组相比, 1500026H17Rik敲低的肾小球系膜细胞的增殖能力明显减弱。lncRNA-1500026H17Rik在糖尿病肾病小鼠肾脏组织中呈高表达, 且影响高低糖培养的肾小球系膜增殖, 提示1500026H17Rik可能参与了糖尿病肾病的发生。

关键词 糖尿病肾病; 长链非编码RNA; 1500026H17Rik; 肾小球系膜细胞; 增殖

The Effect of Long Non-Coding RNA 1500026H17Rik on Proliferation of Mesangial Cells under High Glucose Condition

Zhang Yajuan¹, Sun Yan¹, Peng Rui², Peng Huimin², Zhang Zheng^{1*}

¹Department of Cell Biology and Genetics, Department of College of Basic Medical Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ²Molecular Medicine and Cancer Research Center, Department of College of Basic Medical Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To explore the effect of long non-coding RNA 1500026H17Rik on proliferation of mesangial cells under high glucose condition, the level of 1500026H17Rik in tissues of diabetic nephropathy (DN) and mesangial cells under high and low glucose conditions was detected by quantitative Real-time PCR (qRT-PCR). The full-length sequence of mouse 1500026H17Rik was amplified. Then the amplified 1500026H17Rik

收稿日期: 2017-10-11 接受日期: 2018-01-15

国家自然科学基金(批准号: 81570747)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485868, E-mail: zhangzheng92@163.com

Received: October 11, 2017 Accepted: January 15, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81570747)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485868, E-mail: zhangzheng92@163.com

网络出版时间: 2018-04-16 17:04:59

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180416.1704.022.html>

was cloned into pcDNA3.1(+) vector and constructed pcDNA3.1(+)-1500026H17Rik over-expression plasmid. The 1500026H17Rik siRNA and pcDNA3.1(+)-1500026H17Rik over-expression plasmid were transfected into mesangial cells under high or low glucose condition. 5-ethynyl-2'-doxyuridine (EdU) assay was used to examine the cell proliferation ability. The results demonstrated that the level of 1500026H17Rik was significantly increased in kidney tissues of DN mice than that in control group, as well as, the level of 1500026H17Rik was increased in cells of high glucose group compared with that in low glucose group. Additionally, the over-expression plasmid pcDNA3.1(+)-1500026H17Rik was proved to be successful by enzyme digestion and DNA sequencing. And the proliferation ability was enhanced in pcDNA3.1(+)-1500026H17Rik group compared with that in low glucose mock group or control group. Moreover, the best efficiency of si1500026H17Rik was detected by qRT-PCR. And the proliferation ability was decreased in si1500026H17Rik group compared with that in high glucose mock group or control group. LncRNA-1500026H17Rik could regulate cell proliferation in mesangial cells. These results indicated that 1500026H17Rik significantly over-expresses in DN and might be associated with the mesangial cells proliferation in DN.

Keywords diabetic nephropathy; long non-coding RNA; 1500026H17Rik; mesangial cells; proliferation

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病主要的微血管并发症之一,也是终末期肾病的主要原因。由于DN存在复杂的代谢紊乱,如果发展为终末期肾病,治疗难度往往比其他肾病为大,因此,及时治疗和预防对于延缓DN进程具有重大意义^[1-4]。DN的发病机制与多种因素密切相关,肾小球系膜病变是DN早期的重要改变之一,包括系膜细胞增殖和细胞外基质合成增多^[5]。但DN具体发生发展机制尚无定论。

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类不编码蛋白质、也不直接参与蛋白质的合成,位于细胞核或胞质内长度大于200个核苷酸的基因转录产物。近年来研究发现, lncRNA普遍存在于生物体内,并且在生命活动中起重要作用,参与了多种疾病的发生与发展,包括DN^[6-7]。有报道指出, lncRNA-ASncmtRNA-2通过调控DN纤维化因子的表达从而促进了DN的纤维化^[8]; lncRNA-TUG1通过调控miR-377的靶基因PPAR γ 调控着系膜细胞外基质的合成,当下调lncRNA-TUG1后可减缓细胞外基质合成积累^[9]; Chen等^[10]通过GO富集和KEGG分析发现,多种lncRNAs通过调节不同的分子途径参与了DN的发病机制。由此提示, lncRNAs可能在DN的发生发展中扮演重要角色。有趣的是,本课题前期实验中应用二代测序检测糖尿病肾病小鼠肾脏组织差异表达的lncRNAs时发现, 1500026H17Rik呈显著高表达。但至今国内外均未见1500026H17Rik的相关报道。因此,本文研究1500026H17Rik在DN系膜增生中的具体潜在作用。本研究通过qRT-PCR

(quantitative Real-time PCR)验证 1500026H17Rik在高糖或低糖培养的肾小球系膜细胞中的表达趋势与糖尿病肾病小鼠肾脏组织是否一致,并应用FISH和qRT-PCR观察其在系膜细胞的亚细胞分布情况。进一步构建pcDNA3.1(+)-1500026H17Rik过表达质粒和合成1500026H17Rik-siRNA分别转染至高糖和低糖培养肾小球系膜细胞中,并通过EdU细胞增殖实验检测1500026H17Rik对肾小球系膜细胞增殖情况的影响。本研究结果提示, 1500026H17Rik可能是一个新型DN相关因子,在DN系膜细胞增殖中发挥重要作用。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

小鼠肾小球系膜细胞株SV40-MES14细胞由本实验室保存。糖尿病肾病小鼠模型购自南京大学南京生物医药研究院。PCR扩增仪、CFX96 PCR仪、流式细胞仪和酶标仪购自Bio-Rad公司; pcDNA3.1(+)表达载体、宿主菌*E. coli DH5i*和脂质体Lipofectamine 3000购自Invitrogen公司; 总RNA提取试剂Trizol、逆转录试剂盒、DNA Marker和SYBR[®] Premix Ex Taq Premix购自大连宝生物公司; DMEM培养基购自Hyclone公司; 澳洲特级胎牛血清购自生工生物工程(上海)股份有限公司; lncRNA原位荧光杂交(fluorescent *in situ* hybridization, FISH)试剂盒和EdU试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司; PARIS[™]购自Life Technologies公司; DNA试剂盒和去内毒素质粒试剂盒购自Omega公司。

1.2 细胞培养及转染

肾小球系膜细胞分别用含有25 mmol/L葡萄糖的20%胎牛血清DMEM培养基(高糖组)和含5 mmol/L葡萄糖的20%胎牛血清DMEM培养基(低糖组)培养,将细胞株分别接种于50 mL细胞培养瓶中,在5% CO₂、37 °C恒温条件下培养,每24 h换液。本实验将细胞分为以下6个组: H-MC(高糖条件培养的系膜细胞)、H-MC siNC(转染1500026H17Rik-siRNA阴性对照的高糖系膜细胞)、H-MC si1500026H17Rik(转染1500026H17Rik-siRNA的高糖系膜细胞组)、L-MC(低糖条件下培养的系膜细胞)、L-MC pcDNA3.1[转染pcDNA3.1(+)空质粒的低糖系膜细胞]、L-MC 1500026H17Rik(转染1500026H17Rik过表达质粒的低糖系膜细胞)。取对数生长期的系膜细胞接种于培养皿中培养,待细胞生长到约80%汇合时,进行转染操作,6 h后更换含有20%胎牛血清的新鲜DMEM培养基,24~48 h后收集细胞。

1.3 pcDNA3.1(+)-1500026H17Rik真核表达质粒

根据Ensembl数据库的小鼠1500026H17Rik基因序列,用Primer Premier 5.0设计引物,并根据pcDNA3.1(+)载体多克隆位点,在上下游引物分别加入BamH I和EcoR V位点,用BLAST软件分析引物的特异性,对1500026H17Rik的全长序列进行扩增。引物序列如下。上游引物: 5'-GGG CGG GAC CTC TCC AGA CAC ACT CTC CTG GCT TT-3',下游引物: 5'-AAG CAT AAT CAT TTT CCT TAC TTC CCA CCA ACC ACG-3'。提取小鼠RNA逆转录成cDNA,采用cDNA末端快速扩增法(rapid amplification of cDNA ends, RACE)扩增小鼠1500026H17Rik的全长序列。将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,然后纯化, BamH I和EcoR V 37 °C双酶切1 h, T4连接酶4 °C过夜连接入pcDNA3.1(+)真核表达载体,连接产物转化感受态细胞,将100 μL已转化的感受态细胞转移到AMP+固体LB琼脂糖培养基上,挑取阳性单克隆在恒温摇床中37 °C、250 r/min振荡过夜,通过质粒提取试剂盒提取质粒进行PCR、单双酶切鉴定并测序。同样的方法构建空载体作为对照组。

1.4 设计并合成1500026H17Rik-siRNA

在Oligo软件中根据小鼠1500026H17Rik基因序列设计出3条siRNA[由生工生物工程(上海)股份有限公司合成],序列如下。709: 5'-AAT CAT TTT CCT TAC TTC CCA CCA-3'; 916: 5'-GGA CGU UAA UUG

GCA AAG ATT-3'; 1081: 5'-GUA GCA GGG UAA UCG AAG UTT-3'。通过qRT-PCR检测3条siRNAs对1500026H17Rik的敲低效果,选出敲低效果最佳的一条进行后续实验。

1.5 qRT-PCR检测1500026H17Rik水平

用Trizol试剂提取各组细胞的总RNA,并检测总RNA的浓度和纯度。通过PrimerScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒将总RNA逆转录为cDNA。以cDNA为模板,使用SYBR® Premix Ex Taq™ II对1500026H17Rik基因进行扩增检测,扩增反应体系终体积为10 μL,每个检验指标设3个平行复孔。反应条件: 95 °C预变性3 min, 95 °C 5 s、60 °C 34 s,共40个循环,熔解曲线为每5 s升高0.5 °C,温度范围为65 °C~95 °C。最终数据以内参基因β-actin为参考,用2^{-ΔΔCt}公式对1500026H17Rik基因进行相对定量分析。

1.6 FISH检测1500026H17Rik亚细胞定位

按照1500026H17Rik荧光FISH探针试剂盒的方法进行实验操作,检测其在高糖和低糖条件下培养的小鼠系膜细胞中的亚细胞分布情况。细胞分为3组,分别为control组、H-MC组、L-MC组。先用4%多聚甲醛室温固定细胞10 min,将提前预冷的含0.5% Triton X-100的PBS冰上处理细胞5 min, PBS清洗2次,然后用预杂交液37 °C预处理细胞30 min。弃去预杂交液后,每孔加入20 μmol/L标记的lncRNA-1500026H17Rik FISH探针杂交液,37 °C避光杂交过夜。次日用含0.1% Tween-20的4×SSC于42 °C清洗细胞3次,每次5 min。随后用2×SSC和1×SSC于42 °C清洗细胞各5 min。最后,每孔加入10 μL DAPI工作液,室温静置10 min,采用激光共聚焦显微镜进行图像获取。

1.7 EdU检测细胞增殖能力

将系膜细胞接种于24孔板中。待细胞生长到80%汇合度时进行转染操作,转染24 h后按EdU细胞增殖检测试剂盒说明书进行EdU荧光标记、细胞固定、Apollo染色、DAPI染色的步骤进行实验。最后通过共聚焦显微镜进行图像获取,并用Image-Pro plus软件进行活性细胞计数分析。

1.8 统计学分析

用SPSS 19.0软件对实验数据进行数据处理,以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。3组数据之间比较运用单因素方差分析,两组数据比较运用t检验,以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 在糖尿病肾病小鼠肾脏组织和高糖系膜细胞中1500026H17Rik水平上调

本课题组前期二代测序结果发现, 在糖尿病肾病模型db/db小鼠肾脏组织中较正常对照小鼠肾脏组织中1500026H17Rik水平显著上调, 因此, 我们进一步通过qRT-PCR检测糖尿病肾病小鼠肾脏组织和正常小鼠肾脏组织以及在高糖条件下和低糖条件下培养的肾小球系膜细胞中1500026H17Rik的水平。如图1A和图1B所示, 在糖尿病肾病小鼠肾脏组织和高糖条件下培养的肾小球系膜细胞中, 1500026H17Rik水平较正常组小鼠肾脏组织和低糖条件下培养的系膜细胞显著增高($P<0.01$)。

2.2 1500026H17Rik主要定位于系膜细胞胞质部分

FISH实验结果表明, 1500026H17Rik在系膜细胞核质中均有分布, 但主要定位于细胞质。同时, 在高糖培养的系膜细胞中其水平较低糖组高, 再次验证了上述结果(图2A)。此外, qRT-PCR结果提示, 1500026H17Rik主要存在于系膜细胞的胞质部分, 与FISH实验结果一致(图2B)($P<0.01$)。

2.3 1500026H17Rik过表达质粒构建

将1500026H17Rik基因PCR产物经过1%琼脂糖凝胶电泳检测, 可以从条带中看见一条大小约3 280 bp的条带, 与1500026H17Rik基因扩增长度一致。经BamH I和EcoR V双切酶(图3)及测序证明1500026H17Rik过表达质粒构建成功。

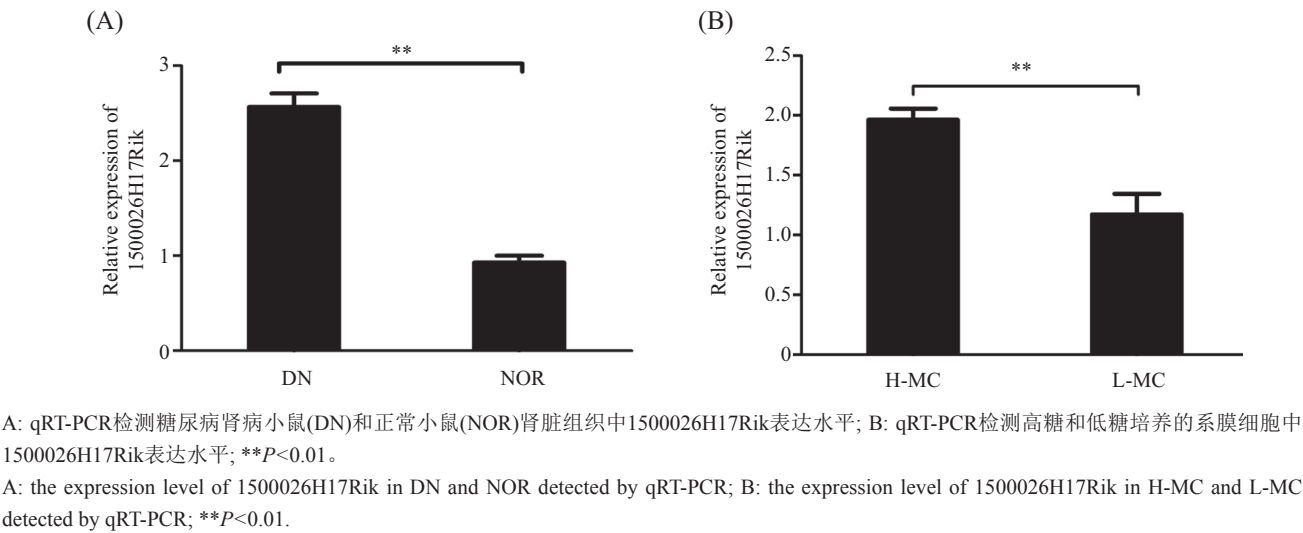


图1 在肾脏组织中和系膜细胞中1500026H17Rik表达水平
Fig.1 The expression level of 1500026H17Rik in renal tissues and mesangial cells

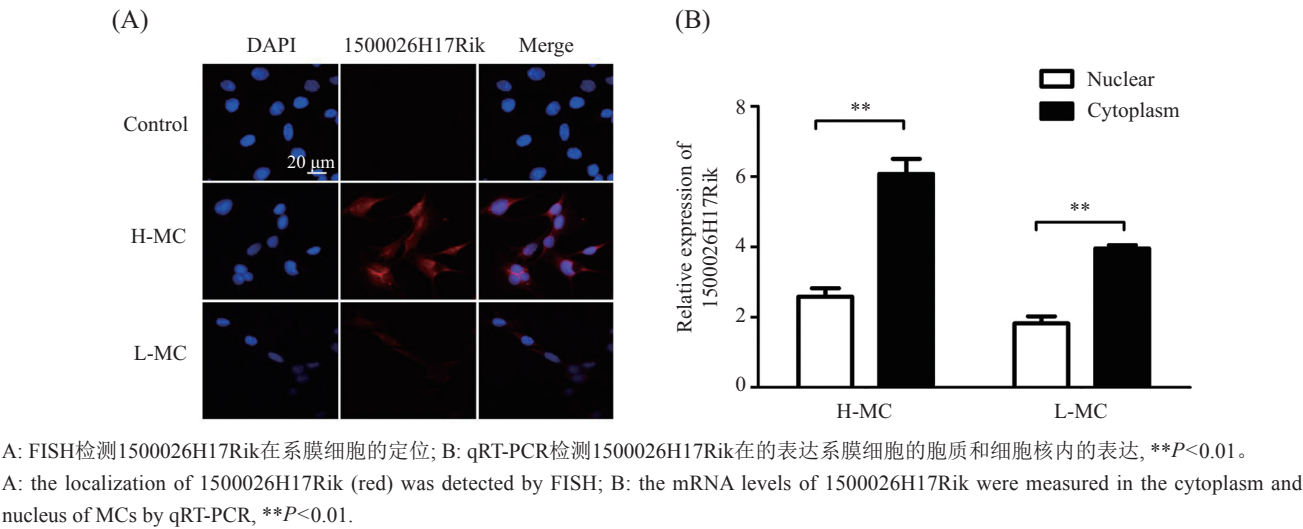
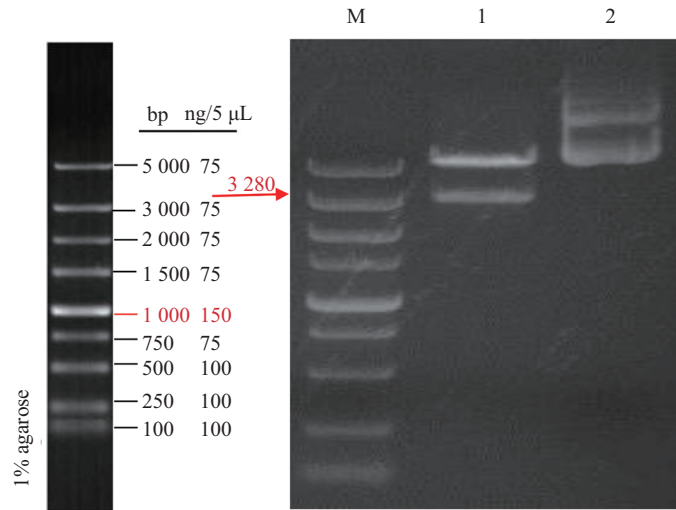


图2 1500026H17Rik的亚细胞定位情况
Fig.2 Subcellular localization of 1500026H17Rik in MCs

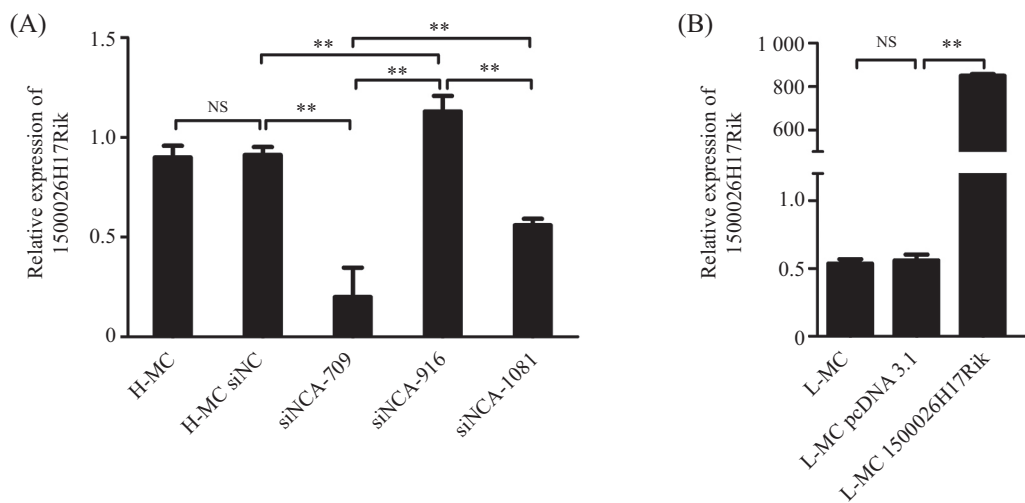


酶切电泳图。M: DNA marker; 1: *Bam*H I和*Eco*R V酶切质粒; 2: 质粒DNA。

Restriction digestion map. M: DNA marker; 1: plasmid digested by *Bam*H I and *Eco*R V; 2: plasmid DNA.

图3 1500026H17Rik过表达质粒构建

Fig.3 Constructed of pcDNA3.1(+)-1500026H17Rik over-expression plasmid



A: qRT-PCR检测敲低1500026H17Rik的高糖系膜细胞1500026H17Rik表达水平; B: qRT-PCR检测过表达1500026H17Rik的低糖系膜细胞1500026H17Rik表达水平。** $P < 0.01$; NS: 无显著性差异。

A: the expression level of knockdown 1500026H17Rik in H-MC detected by qRT-PCR; B: the expression level of over-expressed 1500026H17Rik in L-MC detected by qRT-PCR. ** $P < 0.01$; NS: no significant difference.

图4 1500026H17Rik过表达质粒转染效率和siRNAs的验证及筛选

Fig.4 Verified the efficiency of pcDNA3.1(+)-1500026H17Rik over-expression plasmid and 1500026H17Rik-siRNAs

2.4 1500026H17Rik过表达质粒转染效率和siRNA的验证及筛选

通过qRT-PCR检测3条1500026H17Rikd-siRNA的敲低效率, 结果显示, siRNA-709的敲低效率最佳, 所以选择siRNA-709进行后续实验(图4A)。同时, qRT-PCR验证转染了1500026H17Rik过表达质粒后, 其水平显著提高(图4B)。

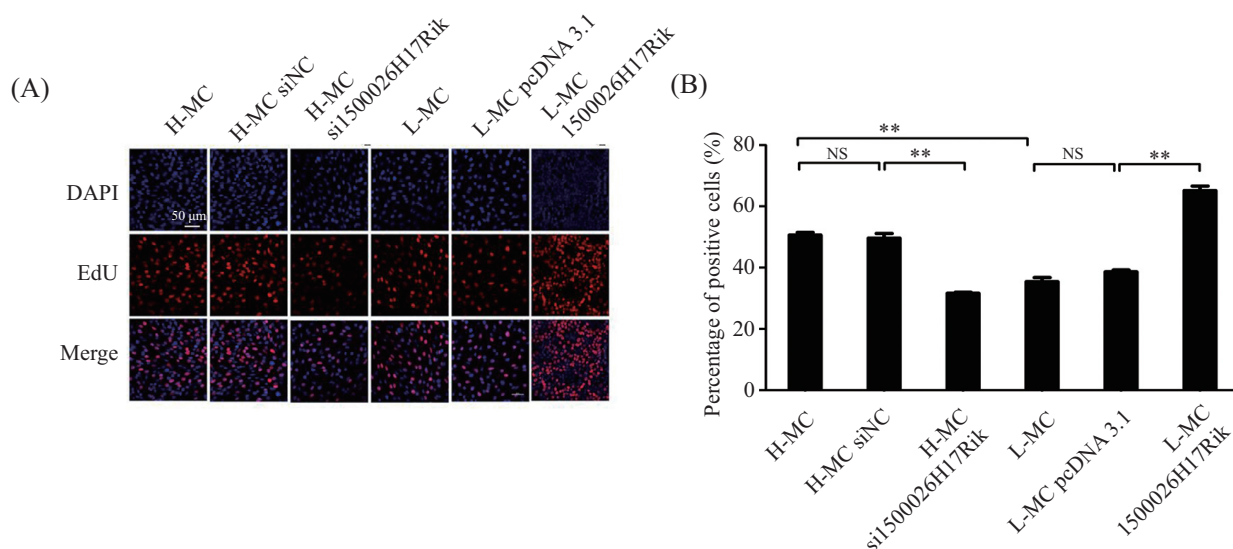
2.5 1500026H17Rik促进系膜细胞增殖

EdU细胞增殖实验结果显示, 敲低1500026-

H17Rik组与高糖、siRNA转染对照组相比较, 其细胞增殖能力明显抑制($P < 0.01$); 相反, 低糖1500026-H17Rik组与低糖、空载体转染对照组相比较, 其细胞增殖能力显著增高($P < 0.01$)。以上结果显示, 1500026H17Rik对系膜细胞增殖具有调节作用(图5A和图5B)。

3 讨论

人们曾经认为转录组主要由mRNA所组成,



A: EdU检测1500026H17Rik对系膜细胞的增殖能力; B: EdU实验的活性细胞计数; ** $P < 0.01$; NS: 无显著性差异。

A: proliferation of MCs were labeled with EdU; B: percentage of positive MCs; ** $P < 0.01$; NS: no significant difference.

图5 EdU检测1500026H17Rik调控系膜细胞增殖

Fig.5 Cell proliferation was tested by EdU

而高通量测序技术的发展和ENCODE项目为我们揭开了一个完全不同的世界,除了那些众所周知的RNA(如rRNA、tRNA),许多不同类型的调控RNA也进入了我们的视线。备受关注的就是目前成为遗传学研究热点的lncRNA,在疾病的研究中,学者们发现其主要通过组蛋白修饰、染色质重塑、DNA甲基化等生物过程,与转录因子、功能性RNA分子、染色质重塑修饰物作用,在转录水平、转录后水平以及表观遗传水平上进行调控^[11]。在糖尿病肾病的研究中,lncRNA才刚刚起步。Hu等^[12]发现,lncRNA MALAT1通过 β -catenin/SRSF1调控高糖诱导的足细胞受损。MALAT1还通过miR-23c靶向ELAVL1调控肾小管上皮细胞焦亡^[13]。lncRNATug1通过介导足细胞线粒体生物能学调控糖尿病肾病^[14]。lncRNA Gm4419参与调控糖尿病肾病炎症^[15]。在糖尿病肾病糖尿病系膜增生机制中,lncRNA也崭露头角,PVT1^[16]、ASncmtRNA-2^[17]、ENSMUST00000147869^[18]被发现参与系膜细胞增殖。因此,lncRNA可能在糖尿病肾病的诊断和治疗中均扮演着重要的角色,是DN潜在新型分子标志物和治疗靶点,然而其确切机制还不清楚。

为了更深入地了解lncRNA在糖尿病肾病中的作用机制,本研究在前期二代测序发现了lncRNA-1500026H17Rik在糖尿病肾病模型小鼠肾脏组织中呈高表达的基础上,探索1500026H17Rik在DN中的

作用。1500026H17Rik位于小鼠10号染色体(Chr10: 89686363-89700866),迄今未见1500026H17Rik在疾病中的报道。本研究结果显示,通过qRT-PCR不仅验证其在DN小鼠肾脏组织呈高表达,还发现在高糖和低糖培养的系膜细胞中表达趋势与DN及正常肾脏组织一致。由此提示,1500026H17Rik在DN中的作用可能与系膜细胞病理改变相关,但其具体作用如何,还需我们进一步研究。

为进一步探索1500026H17Rik在系膜细胞中的生物学特征,我们通过FISH和qRT-PCR检测了1500026H17Rik在系膜细胞的亚细胞分布情况。结果显示,1500026H17Rik在系膜细胞核质中均有分布,但主要定位于细胞质。lncRNA在细胞内的定位不同所发挥的功能也不同。定位在细胞核的lncRNA可通过顺式和反式两种方式起作用,直接作用与lncRNA结合的染色体或者通过与染色体结合从而作用于其他基因;定位于细胞质的lncRNA主要通过结合和调控蛋白的稳定性、结合mRNA、调控转录或结合miRNA等发挥作用^[19]。以上均提示,1500026H17Rik在系膜细胞中的作用模式可能与其主要分布在细胞质中有关,与重要蛋白质形成复合物或靶向miRNA发挥转录后调控等可能是其参与DN系膜细胞增殖的重要机制,为后期研究1500026H17Rik的分子机制提供了研究方向。

同时,我们应用高糖和低糖培养系膜细胞模拟

糖尿病状态^[20]。将成功构建的pcDNA3.1(+)-1500026-H17Rik过表达质粒和1500026H17Rik-siRNA分别转染至低糖和高糖条件培养的系膜细胞中,通过qRT-PCR证明pcDNA3.1(+)-1500026H17Rik过表达质粒和1500026H17Rik-siRNA可以高效地转染进入系膜细胞,且能够在系膜细胞中提高1500026H17Rik的表达丰度或者抑制1500026H17Rik的表达。该研究结果为本实验后续探讨1500026H17Rik在糖尿病肾病中的作用机制提供了具体工具和研究基础。

为研究1500026H17Rik与系膜细胞增殖的关系,我们应用EdU细胞增殖实验检测高低表达1500026-H17Rik后系膜细胞增殖能力的改变。结果显示,在低糖培养的系膜细胞中过表达1500026H17Rik后,细胞增殖能力增高($P<0.01$);同时,在高糖培养的系膜细胞中敲低1500026H17Rik后,细胞增殖能力明显下降($P<0.01$),提示1500026H17Rik可调控系膜细胞增殖。结合国内外学者报道, lncRNA CHCHD4P4可抑制草酸钙导致的肾脏损伤中的细胞增殖^[21]; lncRNA CPS1-IT1减缓结肠癌的细胞增殖^[22]; lncRNA-HOXA11-AS调控肝癌细胞增殖^[23]。以上均提示, lncRNA在疾病的细胞增殖中发挥重要作用,而1500026H17Rik参与调控系膜细胞增殖,可能是DN系膜增生的重要调节因子。

综上所述,本研究发现了lncRNA-1500026H17Rik在糖尿病肾病小鼠的肾脏组织和高糖培养的系膜细胞中表达异常上调;且过表达1500026-H17Rik后系膜细胞的增殖能力明显增高;敲低1500026H17Rik后系膜细胞的增殖能力明显降低。以上结果提示, lncRNA-1500026H17Rik可能参与了糖尿病肾病的发生与发展,其机制涉及肾小球系膜细胞增殖,为预防和治疗糖尿病肾病提供了一个新的方向,但lncRNA-1500026H17Rik参与糖尿病肾病增殖的具体机制有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Xu Y, Wang L, He J, Bi Y, Li M. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults. *JAMA* 2013; 310(9): 948-59.
- Carter G, Miladinoic B, Patel A, Deland L, Mastorides S, Patel NA. Circulating long noncoding RNA GAS5 levels are correlated to prevalence of type 2 diabetes mellitus. *BBA Clin* 2016; 11(4): 102-7.
- Liu S, Zou L, Xie J, Xie W, Wen S, Xie Q, *et al.* lncRNA NONRATT021972 siRNA regulates neuropathic pain behaviors in type 2 diabetic rats through the P2X7 receptor in dorsal root ganglia. *Mol Brain* 2016; 9: 44.
- Albercht T, Zhang S, Braun J, Xia L, Rodriguez A, Qiu J, *et al.* The CNDP1 (CTG)5 polymorphism is associated with biopsy-proven diabetic nephropathy, time on hemodialysis, and diabetes duration. *J Diabetes Res* 2017; 2017: 9506730.
- Mslik S, Suchal K, Khan S, Bhatia J, Kishore K, Dida K, *et al.* Apigenin ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via MAPK/NF- κ B/TNF- α and TGF- β 1/ MAPK/Fibronectin pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017; 313(2): F414-22.
- Kato M, Wang M, Chen Z, Bhatt K, Oh HJ, Langting L, *et al.* An endoplasmic reticulum stress-regulated lncRNA hosting a microRNA megacluster induces early features of diabetic nephropathy. *Nat Commun* 2016; 7: 12864.
- Zhang X, Xiong Y, Tang F, Bian Y, Chen Y, Zhang F. Long noncoding RNA HNF1A-AS1 indicates a poor prognosis of colorectal cancer and promotes carcinogenesis via activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biomed Pharmacother* 2017; 96: 877-83.
- Gao Y, Chen ZY, Wang Y, Liu Y, Ma JX, Li YK. Long non-coding RNA ASncmtRNA-2 is upregulated in diabetic kidneys and high glucose-treated mesangial cells. *Exp Ther Med* 2017; 13(2): 581-7.
- Duan LJ, Ding M, Hou LJ, Cui YT, Li CJ, Yu DM. Long noncoding RNA TUG1 alleviates extracellular matrix accumulation via mediating microRNA-377 targeting of PPAR γ in diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 484(3): 598-604.
- Chen S, Dong C, Qian X, Huang S, Feng Y, Ye X, *et al.* Microarray analysis of long noncoding RNA expression patterns in diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications* 2017; 13(3): 569-76.
- Lu Z, Liu N, Wang F. Epigenetic regulations in diabetic nephropathy. *J Diabetes Res* 2017; 2017: 7805058.
- Hu M, Wang R, Li X, Fan M, Lin J, Zhen J, *et al.* lncRNA MALAT1 is dysregulated in diabetic nephropathy and involved in high glucose-induced podocyte injury via its interplay with β -catenin. *J Cell Mol Med* 2017; 21(11): 2732-47.
- Li X, Zeng L, Cao C, Lu C, Lian W, Han J, *et al.* Long noncoding RNA MALAT1 regulates renal tubular epithelial pyroptosis by modulated miR-23c targeting of ELAVL1 in diabetic nephropathy. *Exp Cell Res* 2017; 350(2): 327-35.
- Long J, Badal SS, Ye Z, Wang Y, Ayanga BA, Galvan DL, *et al.* Long noncoding RNA Tug1 regulates mitochondrial bioenergetics in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 2016; 126(11): 4205-18.
- Yi H, Peng R, Zhang LY, Sun Y, Liu HD, Yu LJ, *et al.* LincRNA-Gm4419 knockdown ameliorates NF- κ B/NLRP3 inflammasome-mediated inflammation in diabetic nephropathy. *Cell Death Dis* 2017; 8(2): e2583.
- Zhang R, Li J, Huang T, Wang X. Danggui buxue tang suppresses high glucose-induced proliferation and extracellular matrix accumulation of mesangial cells via inhibiting lncRNA PVT1. *Am J Transl Res* 2017; 9(8): 3732-40.
- Gao Y, Chen ZY, Wang Y, Liu Y, Ma JX, Li YK. Long non-coding RNA ASncmtRNA-2 is upregulated in diabetic kidneys and high glucose-treated mesangial cells. *Exp Ther Med* 2017; 13(2): 581-7.
- Wang M, Yao D, Wang S, Yan Q, Lu W. Long non-coding RNA ENSMUST00000147869 protects mesangial cells from

- proliferation and fibrosis induced by diabetic nephropathy. *Endocrine* 2016; 54(1): 81-92.
- 19 Sun X, Haider Ali MSS, Moran M. The role of interactions of long non-coding RNAs and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in regulating cellular functions. *Biochem J* 2017; 474(17): 2925-35.
- 20 Qin T, Zhao H, Cui P, Albesher N, Xiong L. A nucleus-localized long non-coding RNA enhances drought and salt stress tolerance. *Plant Physiol* 2017; 175(3): 1321-36.
- 21 Li M, Xu L, Feng G, Zhang Y, Wang X, Wang Y. High glucose downregulates myocardin expression in rat glomerular mesangial cells via the ERK signaling pathway. *Oncotarget* 2017; 8(50): 87390-400.
- 22 Zhang C, Yuan J, Hu H, Chen W, Liu M, Zhang J, *et al.* Long non-coding RNA CHCHD4P4 promotes epithelial-mesenchymal transition and inhibits cell proliferation in calcium oxalate-induced kidney damage. *Braz J Med Biol Res* 2017; 51(1): e6536.
- 23 Zhang W, Yuan W, Song J, Wang S, Gu X. LncRna CPS1-IT1 suppresses cell proliferation, invasion and metastasis in colorectal cancer. *Cell Physiol Biochem* 2017; 44(2): 567-80.
- 24 Yu J, Hong JF, Kang J, Liao LH, Li CD. Promotion of LncRNA HOXA11-AS on the proliferation of hepatocellular carcinoma by regulating the expression of LATS1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21(15): 3402-11.