

LncRNA H2k2促进高糖培养的肾小球系膜细胞增殖的研究

廖雨滋¹ 陈雯韵¹ 孙艳¹ 彭睿² 张政^{1*}

¹重庆医科大学基础医学院, 细胞生物学及遗传学教研室, 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 该研究主要探讨lncRNA H2k2对高糖培养的肾小球系膜细胞增殖的影响, 采用qRT-PCR检测lncH2k2在正常及糖尿病肾病小鼠肾脏组织中的表达, 以及高低糖培养的系膜细胞中的表达; FISH与qRT-PCR检测lncH2k2的亚细胞定位; qRT-PCR检测lncH2k2过表达质粒及siRNA的转染效率; EdU检测转染lncH2k2过表达质粒或siRNA后系膜细胞增殖的变化。结果表明, lncH2k2在糖尿病肾病小鼠肾脏组织及高糖培养的系膜细胞中的表达升高, 且lncH2k2主要分布于系膜细胞的细胞质中。在低糖培养的系膜细胞中转染lncH2k2过表达质粒后, 与低糖培养的系膜细胞相比, 过表达lncH2k2的低糖培养的系膜细胞增殖能力显著提高, 并且将qRT-PCR检测筛选出的一条lncH2k2 siRNA转染到高糖培养的系膜细胞内, 与高糖培养的系膜细胞相比, 敲低lncH2k2后系膜细胞增殖能力显著降低。研究结果揭示, lncRNA H2k2在糖尿病肾病小鼠肾脏组织及系膜细胞中表达显著, lncRNA H2k2促进了系膜细胞增殖, 这些结果表明, lncRNA H2k2可能参与了糖尿病肾病的发生发展。

关键词 糖尿病肾病; 长链非编码RNA; 肾小球系膜细胞; 增殖

LncRNA H2k2 Promotes Proliferation of Mesangial Cells Cultured in High Glucose

LIAO Yuzi¹, CHEN Wenyun¹, SUN Yan¹, PENG Rui², 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 The aim of this study was to investigate the effect of lncRNA H2k2 on proliferation of glomerular mesangial cells in high glucose culture. qRT-PCR was used to detect the expressions of lncH2k2 in kidney tissues of diabetic nephropathy mice and normal tissues, and mesangial cells in high and low glucose. The subcellular localization of lncH2k2 was detected by FISH and nuclear isolation qRT-PCR. qRT-PCR detected the efficiency of lncH2k2 overexpression plasmid and siRNA. The proliferation of mesangial cells transfected with lncH2k2 overexpressed plasmids or siRNA was detected by EdU. The results showed that the expression of lncH2k2 was increased in renal tissues of diabetic nephropathy mice and in mesangial cells cultured with high glucose, and lncH2k2 was mainly distributed in the cytoplasm of mesangial cells. The mesangial cells proliferation ability was increased significantly after transfected lncH2K2 over expression plasmid, compared with that in low glucose mock group. Ad-

收稿日期: 2019-04-02

接受日期: 2019-12-02

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81970702)资助的课题

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

Received: April 2, 2019

Accepted: December 2, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81970702)

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

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5173>

ditionally, the best efficiency of siRNA lncH2k2 was detected by qRT-PCR, and the mesangial cells proliferation ability was decreased in siH2K2 group compared with that in high glucose mock group. The results revealed that lncRNA H2k2 was significantly expressed in mice renal tissue of diabetic nephropathy and mesangial cells, and also promoted the proliferation of mesangial cells. These results suggested that lncRNA H2k2 might be involved in the occurrence and development of diabetic nephropathy.

Keywords diabetic nephropathy; lncRNA; mesangial cells; cell proliferation

中国约有1亿多糖尿病患者,患病率达11.6%,糖尿病已经成为我国重大的公共卫生问题^[1]。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病患者的严重微血管并发症,约占糖尿病发病人数的1/3,它是我国终末期肾脏病(end-stage renal disease, ESRD)的主要原因^[2]。有报道称约30%的I型糖尿病和20%的II型糖尿病发展为DN,在慢性肾脏疾病的主要死因中,ESRD约占50%^[3]。肾小球系膜病变是DN最突出的病理改变之一,在其病程的早期就存在系膜细胞增殖、细胞外基质合成增多,但这种高增殖状态的具体形成机制目前尚无定论^[4]。目前认为, DN系膜增生是在一定的遗传因素和高血糖、高血压等多种危险因素的共同作用下发生发展的,但具体机制仍不清楚。

长链非编码RNA(lncRNAs)是一类长度超过200核苷酸(nucleotide, nt)的RNA分子,自身可能不具备编码蛋白质的能力,但在转录水平及转录后水平等多种层面上广泛参与基因的表达,与临床上多种疾病关系密切。据报道, lncRNA在一些复杂疾病,如糖尿病肾病的发生过程中异常表达,具有促使或抑制疾病发生的作用^[5]; lncRNA PANDAR通过与p53蛋白的竞争性相互作用阻断CDKN1A转录从而促进胃癌发生发展^[6]; lncRNA SNHG15与转录因子Slug相互作用促进结肠癌进展^[7]; lncRNA Pvt1通过单核苷酸多态性的全基因组分析有助于对DN的易感性^[8]; lncRNA TUG1通过调控miR-377和靶基因PPAR γ 减弱DN小鼠中的肾细胞外基质沉积^[9]; lncRNA MALAT1可通过调控miR-23c和靶基因ELAVL1调节DN大鼠肾小管上皮细胞的细胞凋亡^[10]。虽然目前被发现的lncRNAs逐渐增多,但其对疾病的功能影响仍不清楚。我们之前的研究发现, lncRNA 1700020I14Rik通过miR-34a-5p和靶基因Sirt1介导HIF-1 α 信号通路,从而改善DN中系膜细胞的纤维化和增殖^[11]。值得关注的是,本课题组在对DN小鼠与正常小鼠肾脏组织的二代测序中发现, lncRNA H2k2在DN小鼠肾脏组织中表达升高。本研究运用qRT-PCR检测

lncH2k2在DN小鼠肾脏组织与高低糖培养的系膜细胞中的表达,发现与二代测序结果一致。FISH与qRT-PCR检测lncH2k2的亚细胞定位。设计并验证了lncH2k2的过表达质粒和siRNA效率。EdU检测转染过表达质粒及siRNA后对高低糖培养的系膜细胞增殖的影响。结果提示, lncH2k2可以促进DN系膜细胞增殖,参与糖尿病肾病的发展,深入研究lncH2k2参与DN系膜细胞增殖的机制,可能为DN提供一种新的治疗方向。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠系膜细胞系(SV40-MES14)由本实验室保存。高糖和低糖DMEM培养基购自Gibco公司。冰冻胎牛血清购自上海生工生物工程有限公司。FISH试剂盒及lncH2k2探针购自上海吉玛制药技术有限公司。转染试剂lipofectamine 2000以及lipofectamine 3000购自Invitrogen公司。Trizol试剂、RNA逆转录试剂盒及SYBR Green购自TakaRa公司。EdU试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 系膜细胞在含有15%胎牛血清的DMEM培养基及5% CO₂的37 °C的环境中培养。将细胞分为两组:用含有25 mmol/L葡萄糖的DMEM培养基培养的系膜细胞,模拟糖尿病环境,为H-MC组;用含有5.5 mmol/L葡萄糖和19.5 mmol/L甘露醇的DMEM培养基培养的系细胞,模拟正常生长状态,为L-MC组^[11-12]。

1.2.2 构建过表达质粒 根据GeneBank数据库中小鼠lncH2k2的序列(NR_004446.1),设计lncH2k2引物,根据载体pcDNA3.1(+)上的多克隆位点,在上下游加入BamH I、EcoR V位点后,检测引物特异性。将小鼠肾脏组织的总RNA逆转录为cDNA,PCR扩增获得lncH2k2全长序列,取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,目的条带大小与序列一致。37 °C下BamH I、EcoR V

双酶切1 h, 16 °C过夜用T4连接酶将目的片段连在载体上, 按步骤转化感受态细胞DH5 α , LB固体培养基筛选具有氨苄青霉素抗性的菌落, 37 °C、250 r/min, 摇床培养12~14 h, 按步骤提取质粒并检测浓度。

1.2.3 设计合成siRNA 根据小鼠H2k2的序列, 利用oligo软件设计3条H2k2的siRNA, 序列如下: siH2k2.1: 5'-GAG AGT AAG AAT CTG AAT G-3'; siH2k2.2: 5'-GTG GAC TAA GTG ACA GAC A-3'; siH2k2.3: 5'-GGG ATC TGA AGA TGA TGT C-3'。由广州锐博生物科技公司合成。

1.2.4 荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 按照试剂盒说明书操作。分别将对数期的H-MC与L-MC细胞铺于放置无菌爬片的24孔板中, 待爬片上的细胞融合达到60%后, 加入200 μ L 4%多聚甲醛, 固定10 min; 每孔加入1 mL预冷的通透液, 冰上通透细胞5 min; 加入200 μ L的预杂交液, 37 °C静置30 min; 预热至37 °C lncH2k2探针5 μ L与杂交液100 μ L混合后加入, 37 °C避光杂交12~14 h; 从高浓度到低浓度依次用不同的42 °C SSC摇床清洗细胞; 避光加入100 μ L DAPI工作液染色10 min后, PBS清洗3次, 吸干液体, 取出爬片, 抗荧光猝灭甘油封片剂固定于载玻片上, 激光共聚焦显微镜对其进行荧光检测及拍照。

1.2.5 总RNA提取和实时定量PCR 使用Trizol提取细胞总RNA, 使用逆转录试剂盒进行RNA的逆转录, 具体操作按说明书进行。lncH2k2引物序列如下, 上游: 5'-TCA CAC TCG CTG CGG TAT TTC-3',

下游: 5'-CCC TCC TGC TCC ATC CAT G-3'。使用SYBR Green进行qRT-PCR实验检测lncH2k2的表达。PCR程序如下: 95 °C预变性3 s; 95 °C 5 s, 58 °C 34 s, 72 °C 60 s, 40个循环。将lncH2k2的相对表达量归一化为 β -actin, 并使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。所有实验至少进行3次。

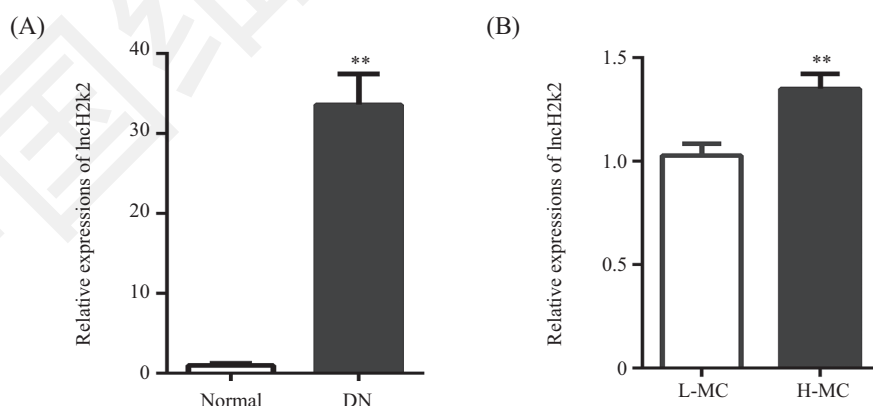
1.2.6 EdU细胞增殖试验 将转染H2k2过表达质粒的L-MC组或转染siH2k2的H-MC组换为50 μ mol/L EdU标记的培养基, 在37 °C、5% CO₂条件下培养2 h。4%多聚甲醛室温固定30 min, 0.5% Triton X-100渗透细胞20 min, PBS洗涤3次; 加入100 μ L DAPI工作液, 在室温下孵育30 min, 然后用PBS洗涤3次。甘油封片后用荧光显微镜采集图像。

1.2.7 统计分析 采用SPSS 22.0进行分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, *t*检验进行两组比较, 单边方差分析与多重比较检验来分析组间差异。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 lncH2k2在肾脏组织及系膜细胞中的表达情况

通过qRT-PCR检测lncH2k2在正常肾脏组织与DN肾脏组织及高低糖条件下培养的系膜细胞的表达情况。与正常肾脏组织比较, DN肾脏组织中lnc H2k2的相对表达量显著升高($P < 0.01$, 图1A), 在高糖培养的系膜细胞组(H-MC组)中, lncH2k2的相对表达量较较低糖培养的系膜细胞组(L-MC组)显著上调($P < 0.01$, 图1B)。



A: 正常小鼠与DN小鼠肾脏组织中lncH2k2的表达。 ** $P < 0.01$, 与正常组比较; B: 高低糖培养的系膜细胞中lncH2k2的表达。 ** $P < 0.01$, 与L-MC组比较。

A: qRT-PCR detected the expressions of lncH2k2 in normal or DN mice renal tissues. ** $P < 0.01$ compared with normal group; B: qRT-PCR detected the expressions of lncH2k2 in MCs cultured with high or low glucose. ** $P < 0.01$ compared with L-MC group.

图1 qRT-PCR检测 lncH2k2在正常与DN小鼠肾脏组织与在高低糖培养的系膜细胞中的表达

Fig.1 qRT-PCR detected the expressions of lncH2k2 in normal and DN mice renal tissue and in mesangial cells cultured in high and low glucose

2.2 lncH2k2的亚细胞定位

为探索 lncH2k2 的对系膜细胞增殖的作用, FISH 与 qRT-PCR 检测 lncH2k2 的亚细胞定位。结果显示, lncH2k2 定位于在系膜细胞的细胞质与细胞核中, 以高糖培养系膜细胞的细胞质中分布较多 ($P < 0.01$, 图2)。

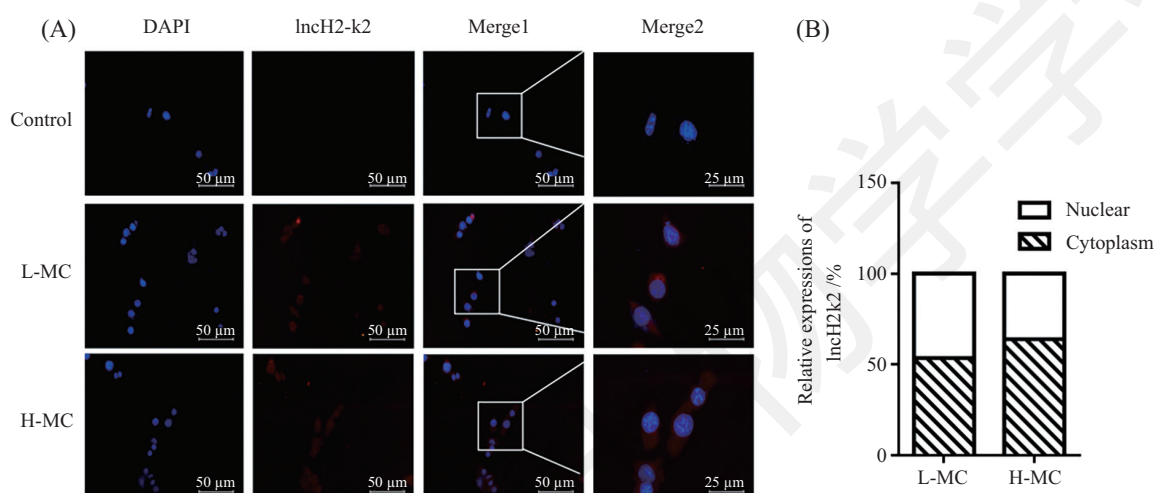
2.3 lncH2k2过表达质粒的构建及siRNA的效率检测

为探究 lncH2k2 对系膜细胞增殖的影响, 首先构建了它的过表达质粒, 并用 qRT-PCR 在 L-MC 组

中检测过表达的效果 ($P < 0.01$, 图3A)。接着设计了 lncH2k2 的3条 siRNA, 在 H-MC 中转染, qRT-PCR 筛选沉默效果最佳的1条, 如图3B所示, siH2k2.3 沉默 lncH2k2 的效率大于70%, 选取 siH2k2.3 用于进一步实验, 并命名为 siH2k2 ($P < 0.01$)。

2.4 lncH2k2调控系膜细胞增殖能力

为探索 lncH2k2 对系膜细胞增殖的作用, 在 L-MC 组中转染过表达质粒促进 lncH2k2 后, EdU 检测系膜细胞增殖效率。结果显示, 与空白对照

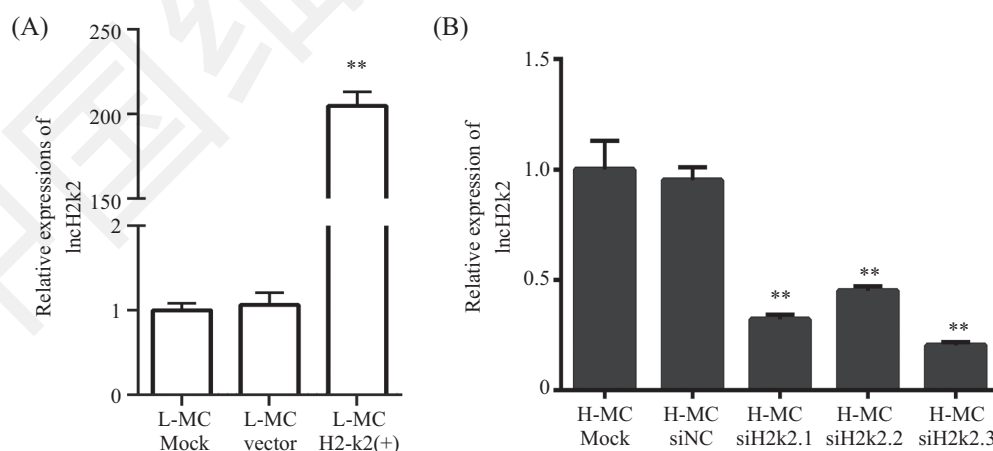


A: FISH检测 lncH2k2 系膜细胞亚细胞定位在细胞质, Merge1 中白框部分放大即为 Merge2; B: qRT-PCR 检测 lncH2k2 在系膜细胞中主要分布在细胞质。

A: FISH detection of lncH2k2 mesangial cells subcellular localization in the cytoplasm, the white box part of Merge1 is enlarged to be Merge2; B: qRT-PCR detection of lncH2k2 distribution in mesangial cells in cytoplasm.

图2 lncH2k2的亚细胞定位

Fig.2 Subcellular localization of lncH2k2

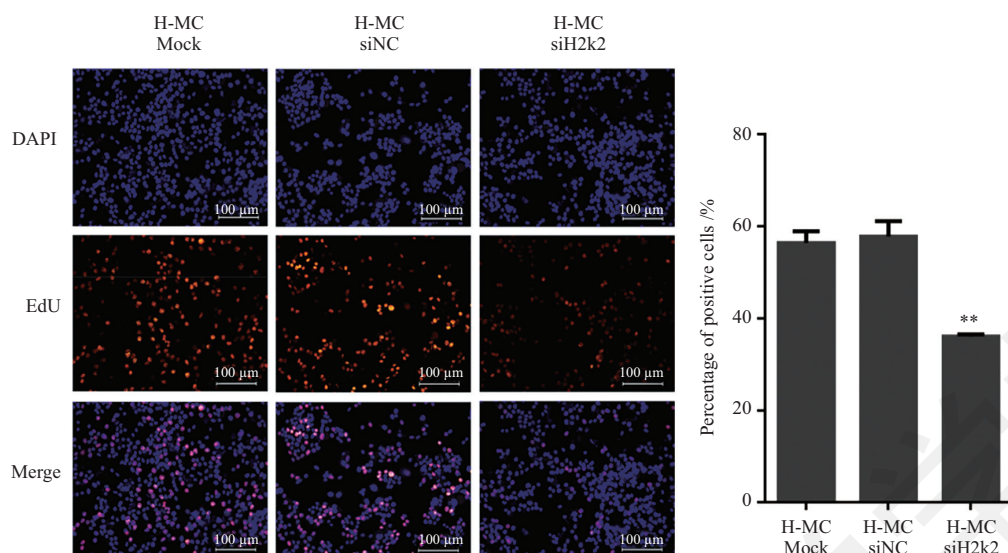


A: qRT-PCR 在 L-MC 组中检测 lncH2k2 过表达质粒的过表达效率, ** $P < 0.01$, 与 L-MC Mock 组相比; B: qRT-PCR 在 H-MC 组中检测 lncH2k2 的3条 siRNA 的沉默效率. ** $P < 0.01$, 与 H-MC Mock 组相比。

A: qRT-PCR detected the efficiency of lncH2k2 overexpression plasmid in overexpressing lncH2k2 in L-MC group, ** $P < 0.01$ compared with L-MC Mock group; B: qRT-PCR detected the efficiency of three siRNAs in silencing lncH2k2 in H-MC group. ** $P < 0.01$ compared with H-MC Mock group.

图3 qRT-PCR检测 lncH2k2 过表达质粒及 siRNA 的效率

Fig.3 qRT-PCR detected efficiency of lncH2k2 overexpression plasmid and siRNAs

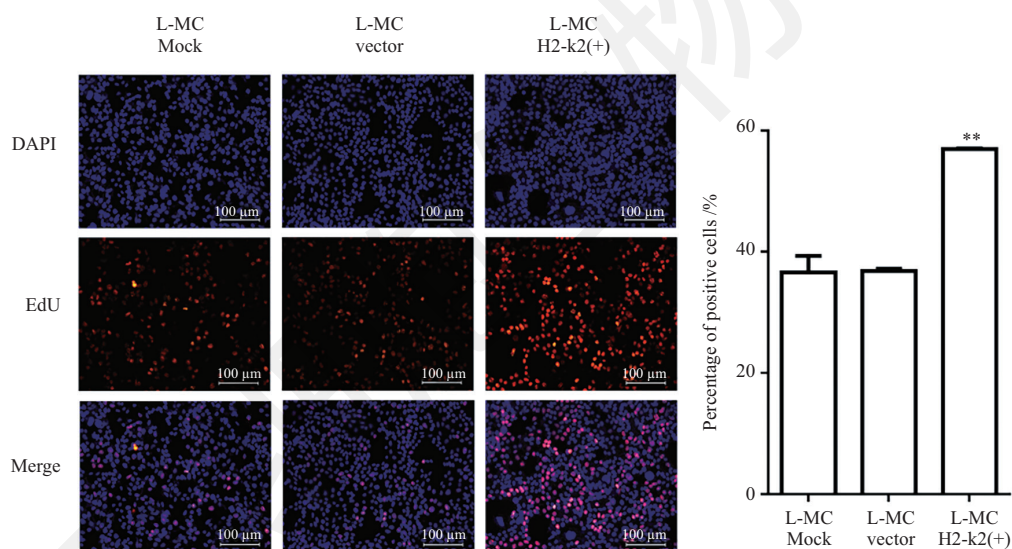


** $P < 0.01$, 与H-MC Mock组相比。

** $P < 0.01$ compared with H-MC Mock group.

图4 EdU检测沉默lncH2k2后抑制高糖培养的系膜细胞增殖

Fig.4 EdU detected cell proliferation of mesangial cells cultured in high glucose after silencing lncH2k2



** $P < 0.01$, 与L-MC Mock组相比。

** $P < 0.01$ compared with L-MC Mock group.

图5 EdU检测过表达lncH2k2后促进低糖培养的系膜细胞增殖

Fig.5 EdU detected cell proliferation of mesangial cells cultured in low glucose after overexpression lncH2k2

L-MC Mock组相比, 在过表达lncH2k2后, 低糖培养条件下的系膜细胞的增殖能力显著提高, 表明过表达lncH2k2对低糖培养的系膜细胞增殖有促进作用 ($P < 0.01$, 图4)。

同时, 在H-MC组中转染 siH2k2 沉默 lncH2k2 后, EdU检测系膜细胞增殖效率。结果显示, 与空白对照H-MC Mock组相比, 沉默lncH2k2后, 高糖培养条件下的系膜细胞的增殖能力显著降低, 表明沉

默lncH2k2对高糖培养的系膜细胞增殖有抑制作用 ($P < 0.01$, 图5)。

3 讨论

DN是一种多基因遗传异质性疾病, 遗传因素参与DN的多种病理改变, 包括肾小球系膜病变的存在, 系膜细胞的增殖和细胞外基质的增殖^[4,13]。遗传因素DN对系膜细胞增殖与多种因素密切相关, 然而

这些机制都未完全明确。伴随高通量测序技术的不断更新,相继有学者们发现,长期以来被认为是无功能的转录副产物的在系膜细胞增殖进展期间有着重要的调控作用。最近不断有新的研究报道, lncRNAs参与DN的病理过程,包括糖尿病肾病的系膜细胞增殖。例如, lncRNAs ENSMUST00000147869和CYP4B1-PS1-001的过表达抑制DN中小鼠系膜细胞的增殖和纤维化^[14-15]; lncRNAs MIAT和Pvt1调节DN中肾小管上皮损伤和细胞外基质积聚^[16-17]; 沉默 lncRNAs ENSRNOG00000037522和LINC01619可部分恢复DN中的足细胞损伤^[18-19]; lncRNA Erbb4-IR的沉默通过miR-29b预防肾脏损伤和DN纤维化^[20]; lncRNA Gm4419通过与NF- κ B的亚基P50结合而影响DN肾小球系膜增生^[21]; 1500026H17Rik的过表达抑制细胞增殖^[22]; lncRNA LINC00968通过募集EZH2抑制p21促进肾小球系膜细胞增殖和纤维化^[23]。因此,这些结果表明, lncRNAs在DN的发病机制中起重要作用。

为明确lncRNA在DN中的作用,本课题前期利用RNA-seq检测DN与正常小鼠的肾皮质组织中差异表达的lncRNA,发现lncH2k2在DN中显著上调。然而,迄今为止,还没有lncH2k2在其他疾病的相关报道。为了进一步探索lncH2k2是否参与DN的系膜细胞增殖,利用qRT-PCR检测DN与正常小鼠的肾皮质组织中lncH2k2的表达,发现lncH2k2在DN肾皮质组织中表达显著增高。同时在高低糖培养的系膜细胞中检测lncH2k2的表达,发现lncH2k2在H-MC组中表达也显著上调。lncH2k2在DN组织及体外模拟的DN状态的系膜细胞中表达上升,提示lncH2k2可能通过调控系膜细胞相关的病理过程,如系膜细胞增殖,参与细胞增殖。

为了明确lncH2k2通过何种方式调控DN系膜细胞增殖,利用FISH和qRT-PCR检测lncH2k2的亚细胞分布,发现lncH2k2的亚细胞定位以细胞质为主,并且与L-MC组相比,H-MC组中胞质中的分布更多。lncRNA的亚细胞定位的不同决定其参与细胞功能的方式的不同,如果lncRNA主要分布在细胞核中,它可通过顺式或者反式发挥作用,从而影响染色质转录调控等过程;如果lncRNA主要分布于细胞质中,它可通过竞争性内源性RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)竞争结合微小RNA(microRNA, miRNA),从而影响miRNA发挥作用,进一步抑制下

游靶基因的表达;或者与靶蛋白结合形成复合物,进而调控基因^[24-25]。结合本研究发现, lncH2k2主要分布于细胞质,它可竞争性结合miRNA,亦可与靶蛋白结合,从而调控下游基因的表达,为后续我们研究lncH2k2提供了方向。

为进一步探讨lncH2k2对系膜细胞增殖影响,我们成功构建了lncH2k2过表达质粒与它的siRNA,并在高低糖培养的系膜细胞中检测过表达与沉默的效率。qRT-PCR结果提示,过表达质粒成功L-MC组中H2k2表达上调,H2k2在H-MC组中升高的表达也被siH2k2抑制。为继续研究lncH2k2参与系膜细胞功能提供较好的基础。EdU细胞增殖实验发现,在系膜细胞中过表达lncH2k2后细胞增殖能力降低,而沉默lncH2k2后细胞增殖能力增强,这表明, lncH2k2可能参与调控DN系膜细胞增殖,可能在DN发生发展中扮演重要角色。然而, lncH2k2通过哪些具体作用和机制参与系膜细胞增殖的调控有待我们进一步研究。本研究利用qRT-PCR验证了lncH2k2在DN小鼠肾皮质及高糖培养的系膜细胞的高表达,设计合成了H2k2的过表达质粒及siRNA,并在H-MC组中转染siH2k2,在L-MC组中转染过表达质粒,qRT-PCR检测了过表达和沉默的效率,EdU细胞增殖实验发现,过表达lncH2k2促进系膜细胞增殖,沉默lncH2k2后系膜细胞增殖降低,证实lncH2k2调控DN的系膜细胞增殖,为DN的系膜细胞增殖机制研究提供新的实验依据,后续将进一步研究lncH2k2参与DN系膜细胞增殖的具体机制。

参考文献 (References)

- [1] YU X, LIMIN W, JIANG H, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults [J]. JAMA, 2013, 310(9): 948-58.
- [2] ZHANG L, LONG J, JIANG W, et al. Trends in chronic kidney disease in china [J]. N Engl J Med, 2016, 375(9): 905-6.
- [3] SARAN R, ROBINSON B, ABBOTT K C, et al. US renal data system 2017 annual data report: epidemiology of kidney disease in the united states [J]. Am J Kidney Dis, 2018, 71(4): A7.
- [4] FIORETTO P, MAUER M. Hisopathology of diabetic nephropathy [J]. Semin Nephrol, 2007, 27(2): 195-207.
- [5] GOYAL N, KESHARWANI D, DATTA M. Lnc-ing non-coding RNAs with metabolism and diabetes: roles of lncRNAs [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(10): 1827-37.
- [6] LIU J, BEN Q, LU E, et al. Long noncoding RNA PANDAR blocks CDKN1A gene transcription by competitive interaction with p53 protein in gastric cancer [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 168.
- [7] JIANG H, LI T, QU Y, et al. Long non-coding RNA SNHG15 interacts with and stabilizes transcription factor Slug and promotes

- colon cancer progression [J]. *Cancer Lett*, 2018, 425: 78-87.
- [8] HANSON R L, CRAIG D W, MILLIS M P, et al. Identification of PVT1 as a candidate gene for end-stage renal disease in type 2 diabetes using a pooling-based genome-wide single nucleotide polymorphism association study [J]. *Diabetes*, 2007, 56(4): 975-83.
- [9] DUAN L J, DING M, HOU L J, et al. Long noncoding RNA TUG1 alleviates extracellular matrix accumulation via mediating microRNA-377 targeting of PPAR γ in diabetic nephropathy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(3): 598-604.
- [10] LI X, ZENG L, CAO C, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates renal tubular epithelial pyroptosis by modulated miR-23c targeting of ELAVL1 in diabetic nephropathy [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 350(2): 327-35.
- [11] LI A, PENG R, SUN Y, et al. LincRNA 1700020114Rik alleviates cell proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy via miR-34a-5p/Sirt1/HIF-1 α signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 461.
- [12] MA Y, CHEN F, YANG S, et al. Protocatechuic acid ameliorates high glucose-induced extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 18-22.
- [13] QUINN M, ANGELICO M C, WARRAM J H, et al. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM [J]. *Diabetologia*, 1996, 39(8): 940-5.
- [14] WANG M, YAO D, WANG S, et al. Long non-coding RNA ENSMUST00000147869 protects mesangial cells from proliferation and fibrosis induced by diabetic nephropathy [J]. *Endocrine*, 2016, 54(1): 1-12.
- [15] 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: 136-45.
- [16] ZHOU L, XU D Y, SHA W G, et al. Long non-coding MIAT mediates high glucose-induced renal tubular epithelial injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(4): 726-32.
- [17] ALVAREZ M L, KHOSROHEIDARI M, EDDY E, et al. Role of microRNA 1207-5P and its host gene, the long non-coding RNA Pvt1, as mediators of extracellular matrix accumulation in the kidney: implications for diabetic nephropathy [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77468.
- [18] BAI X, GENG J, LI X, et al. Long non-coding RNA LINC01619 regulates miR-27a/FOXO1 and endoplasmic reticulum stress-mediated podocyte injury in diabetic nephropathy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(4): 355-76.
- [19] LING L, TAN Z, ZHANG C, et al. Long noncoding RNA ENSRNOG00000037522 is involved in the podocyte epithelial-mesenchymal transition in diabetic rats [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5): 2704-14.
- [20] SUN S F, TANG P M, FENG M, et al. Novel lncRNA erbb4-IR promotes diabetic kidney injury in db/db mice by targeting miR-29b [J]. *Diabetes*, 2017, 67(4): 731-44.
- [21] YI H, PENG R, ZHANG L, et al. LincRNA-Gm4419 knockdown ameliorates NF- κ B/NLRP3 inflammasome-mediated inflammation in diabetic nephropathy [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(2): e2583.
- [22] ZHANG Y J, SUN Y, PENG R, et al. The long noncoding RNA 150Rik promotes mesangial cell proliferation via miR-451/IGF1R/p38 MAPK signaling in diabetic nephropathy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(3): 1410-28.
- [23] LI Z J, YU Z Q, MENG X Y, et al. LncRNA LINC00968 accelerates the proliferation and fibrosis of diabetic nephropathy by epigenetically repressing p21 via recruiting EZH2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(2): 499-504.
- [24] SUN X, HAIDER A, MORAN M. The role of interactions of long non-coding RNAs and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in regulating cellular functions [J]. *Biochem J*, 2017, 474(17):2925-35.
- [25] CHEN L L. Linking long noncoding RNA localization and function [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(9): 761-72.