

LncRNA XIST靶向调控miR-23a-3p对高糖诱导的足细胞损伤的影响

牟小庆^{1*} 梁晟齐¹ 井丽丽² 李庆岩²

(¹大庆龙南医院(齐齐哈尔医学院第五附属医院), 检验科, 大庆 163453;

²大庆龙南医院(齐齐哈尔医学院第五附属医院), 老年科, 大庆 163453)

摘要 该文旨在探究长链非编码RNA(lncRNA) X-非活性特异性转录物(XIST)靶向调控miR-23a-3p对高糖(HG)诱导的足细胞损伤的影响。选择小鼠肾脏足细胞系MPC5为研究对象, 将其随机分为: Control组(常规培养, 5 mmol/L葡萄糖处理)、HG组(HG诱导, 30 mmol/L葡萄糖处理)、sh-NC组(HG诱导+转染sh-NC)、sh-XIST组(HG诱导+转染sh-XIST)、sh-XIST+anti-miR-NC组(HG诱导+转染sh-XIST+anti-miR-NC)、sh-XIST+anti-miR-23a-3p组(HG诱导+转染sh-XIST+anti-miR-23a-3p)。qRT-PCR法检测细胞LncRNA XIST、miR-23a-3p表达情况; CCK8和克隆形成实验检测细胞的增殖情况; Transwell实验检测细胞的迁移情况; 流式细胞仪检测细胞凋亡率; ELISA法检测细胞中IL-6、IL-10、GSH、CAT的表达情况; Western blot检测细胞中PCNA、MMP-9、Bax、Bcl-2蛋白表达情况; 双荧光素酶实验检测LncRNA XIST与miR-23a-3p的靶向关系。结果显示, HG组细胞LncRNA XIST表达水平、细胞凋亡率、IL-6水平、Bax蛋白表达水平高于Control组($P<0.05$), miR-23a-3p表达水平, 细胞存活率, 克隆数, 迁移数, IL-10、GSH、CAT水平, PCNA、MMP-9、Bcl-2蛋白表达水平低于Control组($P<0.05$); sh-XIST组细胞LncRNA XIST表达水平、细胞凋亡率、IL-6水平、Bax蛋白表达水平低于HG组、sh-NC组($P<0.05$), miR-23a-3p表达水平, 细胞存活率, 克隆数, 迁移数, IL-10、GSH、CAT水平, PCNA、MMP-9、Bcl-2蛋白表达水平高于HG组、sh-NC组($P<0.05$); sh-XIST+anti-miR-23a-3p组细胞凋亡率、IL-6水平、Bax蛋白表达水平高于sh-XIST组、sh-XIST+anti-miR-NC组($P<0.05$), 细胞miR-23a-3p表达水平, 细胞存活率, 克隆数, 迁移数, IL-10、GSH、CAT水平, PCNA、MMP-9、Bcl-2蛋白表达水平低于sh-XIST组、sh-XIST+anti-miR-NC组($P<0.05$); 与XIST-WT+mimic-NC组相比, XIST-WT+miR-23a-3p mimic组细胞双荧光素酶活性明显降低($P<0.05$)。以上结果表明, 敲低LncRNA XIST可能促进miR-23a-3p表达, 进而抑制HG诱导的足细胞损伤进展。

关键词 足细胞; 高糖诱导; 长链非编码RNA; X-非活性特异性转录物; miR-23a-3p

Effect of LncRNA XIST on High Glucose Induced Podocyte Injury through Targeted Regulation of miR-23a-3p

MU Xiaoqing^{1*}, LIANG Shengqi¹, JING Lili², LI Qingyan²

(¹Department of Laboratory Medicine, Daqing Longnan Hospital (Fifth Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University), Daqing 163453, China; ²Department of Geriatrics, Daqing Longnan Hospital (Fifth Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University), daqing 163453, China)

收稿日期: 2025-03-21

接受日期: 2025-07-04

*通信作者。Tel: 13351752521, E-mail: qzldqi@163.com

Received: March 21, 2025

Accepted: July 4, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-13351752521, E-mail: qzldqi@163.com

Abstract This article aims to explore the effect of lncRNA (long non coding RNA) XIST (X-inactive specific transcript) on HG (high glucose)-induced podocyte injury through targeted regulation of miR-23a-3p. Mouse renal podocyte line MPC5 was selected as the study subjects and randomly assigned into Control group (conventional culture, 5 mmol/L glucose treatment), HG group (HG induction, 30 mmol/L glucose treatment), sh-NC group (HG induction+transfection of sh-NC), sh-XIST group (HG induction+transfection of sh-XIST), sh-XIST+anti-miR-NC group (HG induction+transfection of sh-XIST+anti-miR-NC), and sh-XIST+anti-miR-23a-3p group (HG induction+transfection of sh-XIST+anti-miR-23a-3p). qRT-PCR was used to detect the expression of LncRNA XIST and miR-23a-3p in cells. CCK8 and clone formation experiments were performed to detect cell proliferation. Transwell experiment was performed to detect cell migration. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis rate. ELISA method was performed to detect IL-6, IL-10, GSH, and CAT in cells. Western blot was performed to detect the expression of PCNA, MMP-9, Bax, and Bcl-2 proteins in cells. Dual luciferase assay was used to detect the targeting relationship between LncRNA XIST and miR-23a-3p. The results showed that the HG group had higher LncRNA XIST level, apoptosis rate, the level of IL-6, and the expression level of Bax protein than the Control group ($P<0.05$), and lower miR-23a-3p level, cell survival rate, clone number, migration number, the levels of IL-10, GSH, CAT, the expression level of PCNA, MMP-9, and Bcl-2 proteins than the Control group ($P<0.05$). The sh-XIST group had lower LncRNA XIST level, apoptosis rate, the level of IL-6, and the expression level of Bax protein ($P<0.05$), and higher miR-23a-3p level, cell survival rate, clone number, migration number, the levels of IL-10, GSH, CAT, the expression level of PCNA, MMP-9, and Bcl-2 proteins than the HG and sh-NC groups ($P<0.05$). The sh-XIST+anti-miR-23a-3p group had higher apoptosis rate, the level of IL-6, and the expression level of Bax protein ($P<0.05$), and lower miR-23a-3p level, cell survival rate, clone number, migration number, the levels of IL-10, GSH, CAT, the expression level of PCNA, MMP-9, and Bcl-2 proteins than the sh-XIST group and the sh-XIST+anti-miR-NC group ($P<0.05$). Compared with the XIST-WT+mimic-NC group, the XIST-WT+miR-23a-3p mimic group showed a conspicuous decrease in dual luciferase activity ($P<0.05$). The above results indicate that knocking down LncRNA XIST may promote miR-23a-3p, thereby inhibiting the progression of HG induced podocyte injury.

Keywords podocytes; high glucose induction; long non coding RNA; X-inactive specific transcript; miR-23a-3p

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)具有较高的发病率,近年来,随着糖尿病发生率的增加,DKD的发病率呈上升的趋势,同时糖尿病是引发慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)和终末期肾病的重要诱因^[1]。研究表明,足细胞是终末分化的肾小球上皮细胞,被认为是维持肾小球滤过屏障完整性的关键成分,足细胞损伤被证实与蛋白尿和肾功能恶化密切相关,被认为是DKD进展的关键因素,但其病理机制尚未被阐明^[2-3]。因此,探究足细胞损伤的分子调控机制,可为临床治疗提供潜在的治疗靶点。近期研究发现,长链非编码RNA(long non coding RNA, lncRNA)可调控DKD肾足细胞的凋亡、自噬等多种生物学活动^[4], lncRNA中的X-非活性特异性转录物(X-inactive specific transcript, XIST)被证实

在脂多糖诱导的急性肺损伤中表达水平升高,可影响肺组织细胞的增殖、凋亡及炎症反应等生理病理学过程^[5]。据报道, LncRNA XIST在DKD患者肾组织中表达上调^[6]。此外,微小RNA(microRNA, miRNA)与DKD的发生发展密切相关,多种miRNA在足细胞损伤中发挥重要作用^[7],其中, miR-23a-3p在DKD中表达下调,并且对病情的发展起到调控作用,可作为DKD诊断和治疗的重要标志物^[8]。生物信息学预测显示LncRNA XIST与miR-23a-3p存在靶向结合位点,且LncRNA XIST通过靶向下调miR-23a-3p促进黑色素瘤细胞进展^[9]。但是LncRNA XIST是否通过调控miR-23a-3p影响DKD的发生发展尚不清楚。因此,本研究通过构建HG诱导的细胞模型,分析LncRNA XIST对足细胞损伤的影响及分子机制,

为临床治疗策略的制定提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠肾脏足细胞系 MPC5(货号: CXM00272)购自武汉恩玖生命科技有限公司; sh-XIST、sh-NC、anti-miR-23a-3p、anti-miR-NC购自美国 MedChem-Express LLC公司; DMEM培养基(货号: MED-1001)购自武汉赛奥斯生物科技有限公司; Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号: KMR0212222)购自温州科森生物科技有限公司; IL-6 ELISA试剂盒(货号: EMC004)、IL-10 ELISA试剂盒(货号: 3431-2AW-Plus)购自深圳欣博盛生物科技有限公司; GSH ELISA试剂盒(货号: JCSW1641)、CAT ELISA试剂盒(货号: JC-E1372)购自上海机纯实业有限公司; RIPA裂解液(货号: AC0201)购自中科腾宇(广州)科技技术有限公司; BCA蛋白定量试剂盒(货号: PMK0442)、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(货号: PMK1016B)购自湖北普美生物科技有限公司; 抗体PCNA(货号: A12427)、MMP-9(货号: A26079)、Bax(货号: A12009)、Bcl-2(货号: A182858)及羊抗兔二抗(货号: AS014)、GAPDH(货号: A19056)购自英国Abcam公司; 流式细胞仪(型号: Cytex-Northern Lights)购自上海仁科生物科技有限公司; 倒置显微镜(型号: 8KY)购自上海玉研科学仪器有限公司; 多功能酶标仪(型号: SpectraMax i3x)购自上海实维实验仪器技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 在DMEM培养基(10%胎牛血清、100 mg/mL青/链霉素)中培养MPC5细胞。将细胞随机分为Control组、HG组、sh-NC组(转染sh-NC)、sh-XIST组(转染sh-XIST)、sh-XIST+anti-miR-NC组(转染sh-XIST+anti-miR-NC)、sh-XIST+anti-miR-23a-3p组(转染sh-XIST+anti-miR-23a-3p)、Control

组细胞经5 mmol/L葡萄糖处理24 h; 其余各组在转染成功后均采用30 mmol/L葡萄糖处理24 h^[10]。采用Lipofectamine 3000转染试剂将sh-XIST、anti-miR-23a-3p及相应对照sh-NC、anti-miR-NC转染至MPC5细胞, 具体操作为: 使用无血清Opti-MEM培养基分别稀释Lipofectamine 3000转染试剂和质粒/寡核苷酸, 取5 μ L Lipofectamine 3000试剂与125 μ L Opti-MEM培养基混合, 制备转染试剂稀释液; 另取10 pmol sh-XIST/sh-NC或anti-miR-23a-3p/anti-miR-NC与125 μ L Opti-MEM培养基混合, 制备核酸稀释液。将两种稀释液混合, 室温孵育15 min, 形成转染复合物。随后, 将转染复合物逐滴加入接种MPC5细胞的6孔板中, 轻轻晃动培养板使转染复合物均匀分布。转染6 h后, 更换为含10%胎牛血清的DMEM完全培养基, 继续培养24 h。

1.2.2 qRT-PCR法检测MPC5细胞中LncRNA XIST、miR-23a-3p表达情况 使用Trizol试剂盒提取细胞总RNA, 随后将总RNA通过PrimeScript试剂盒逆转录成为cDNA, 在ABI 7500热循环仪上进行定量聚合酶链反应, 并检测目的基因相对表达水平, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, 分别以GAPDH、U6为内源性对照, 反应条件95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 95 $^{\circ}$ C变性35 s, 60 $^{\circ}$ C退火/延伸35 s, 为35个循环。引物序列见表1。

1.2.3 CCK8和克隆形成实验检测MPC5细胞增殖情况 将各组细胞分别接种在96孔板(5 000/孔)上, 加入10 μ L CCK-8试剂, 37 $^{\circ}$ C孵育2 h, 酶标仪检测 D_{450} 值, 并计算细胞存活率。随后将细胞接种在6孔板(500/孔)上进行常规培养, 经观察可见克隆后, 用PBS浸洗, 4%多聚甲醛室温固定15 min, 结晶紫染色, 统计克隆细胞数。

1.2.4 Transwell实验检测MPC5细胞的迁移 各组MPC5细胞以每小室 5×10^4 个细胞的密度接种于不含有Matrigel基质胶的Transwell小室上室, 随后下室加入500 μ L的DMEM培养基(含10%胎牛血清)培育24 h,

表1 引物序列
Table 1 Primer Sequences

基因 Gene	上游引物(5'→3') Upstream primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Downstream primer (5'→3')
LncRNA XIST	AGG GAG CAG TTT GCC CTA CT	CAC ATG CAG CGT GGT ATC TT
miR-23a-3p	GGAA AAT CCC TGG CAA TGT	TAA TCC CTG GCA ATG TGA
GAPDH	GTT GTC TCC TGC GAC TTC	GGT GGT CCA GGG TTT CTT A
U6	CTC GCT TCG GCA GCA CA	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT

于室温下用4%多聚甲醛固定15 min后用0.1%结晶紫染色,于显微镜下统计侵袭数。

1.2.5 流式细胞仪检测MPC5细胞的凋亡 收集各组MPC5细胞,用0.25%胰蛋白酶消化(37 °C、3 min)细胞以生成单细胞悬液,并在室温下以1 500 r/min离心5 min,除去上清液,收集细胞。然后,用PBS溶液洗涤2次,并再次在室温下以1 500 r/min离心5 min。最后冲洗步骤后,将细胞重悬于100 μ L结合缓冲液中,然后与5 μ L膜联蛋白V-PE和10 μ L 7-AAD试剂在室温下避光孵育30 min。用结合缓冲液稀释混合物,并在2 h内使用流式细胞术进行分析。按照制造商的说明使用Annexin V-PE/7-AAD细胞凋亡检测试剂盒进行测定。

1.2.6 ELISA法检测MPC5细胞中IL-6、IL-10、GSH、CAT的表达 采用ELISA试剂盒检测MPC5细胞中IL-6、IL-10、GSH、CAT的表达。将100 μ L样品放入96孔微孔板中后,在室温下,用洗涤缓冲液洗涤样品4次,每孔加入200 μ L结合物,37 °C反应2 h。用洗涤缓冲液洗涤4次后,加入200 μ L底物溶液,37 °C避光反应20 min。每孔加入50 μ L终止液后,使用酶标仪测定450 nm波长处的吸光度(D)值。

1.2.7 Western blot检测蛋白表达情况 用预冷的PBS洗涤细胞2次,并加入含有蛋白酶抑制剂混合物和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液提取MPC5细胞总蛋白,BCA试剂盒定量上清液的蛋白质浓度,并通过SDS-PAGE凝胶电泳分离,转移至PVDF膜上,封闭1 h(5%脱脂奶粉,室温),并与稀释后的一抗PCNA(1:5 000)、MMP-9(1:1 000)、Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000) 4 °C孵育过夜。室温下二抗(1:2 000)

孵育1 h,使用ECL试剂盒检查反应条带,以GAPDH(1:1 000)为内参,采用ImageJ软件计算蛋白质相对表达量。

1.2.8 双荧光素酶报告基因实验 将LncRNA XIST的野生型(WT)和突变型(MUT)片段克隆到报告载体,分别为XIST-WT和XIST-MUT,随后将报告载体分别与模拟物miR-23a-3p mimic和mimic NC共转染到MPC5细胞中,37 °C孵育48 h后,按照说明书测定荧光素酶活性。

1.3 统计学分析

通过软件SPSS25.0分析数据,计量数据均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 描述,多组比较采用单因素方差分析,进一步两两比较用SNK-*q*检验(两两之间均进行比较)。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 敲低LncRNA XIST对MPC5细胞中LncRNA XIST、miR-23a-3p表达的影响

HG组细胞LncRNA XIST表达水平高于Control组($P<0.05$),miR-23a-3p表达水平低于Control组($P<0.05$);sh-XIST组细胞LncRNA XIST表达水平低于HG组、sh-NC组($P<0.05$),miR-23a-3p表达水平高于HG组、sh-NC组($P<0.05$);sh-XIST+anti-miR-23a-3p组细胞miR-23a-3p表达水平低于sh-XIST组、sh-XIST+anti-miR-NC组($P<0.05$)。见表2。

2.2 敲低LncRNA XIST对MPC5细胞增殖的影响

HG组细胞存活率、克隆数低于Control组($P<0.05$);sh-XIST组细胞存活率、克隆数高于HG组、sh-NC组($P<0.05$);sh-XIST+anti-miR-23a-3p组细

表2 敲低LncRNA XIST对MPC5细胞中LncRNA XIST、miR-23a-3p表达的影响

Table 2 The effect of down-regulating LncRNA XIST on the expression of LncRNA XIST and miR-23a-3p in MPC5 cells

组别 Group	LncRNA XIST	miR-23a-3p
Control	1.00 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.05
HG	1.76 $\pm$ 0.22*	0.37 $\pm$ 0.06*
sh-NC	1.68 $\pm$ 0.19	0.39 $\pm$ 0.07
sh-XIST	0.38 $\pm$ 0.04 [#] &	0.87 $\pm$ 0.15 [#] &
sh-XIST+anti-miR-NC	0.41 $\pm$ 0.05	0.84 $\pm$ 0.13
sh-XIST+anti-miR-23a-3p	0.43 $\pm$ 0.06	0.42 $\pm$ 0.09 [@] Δ

$\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$,与Control组比较;[#] $P<0.05$,与HG组比较;[&] $P<0.05$,与sh-NC组比较;[@] $P<0.05$,与sh-XIST组比较; Δ $P<0.05$,与sh-XIST+anti-miR-NC组比较。

$\bar{x}\pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the HG group; [&] $P<0.05$ compared with the sh-NC group; [@] $P<0.05$ compared with the sh-XIST group; Δ $P<0.05$ compared with the sh-XIST+anti-miR-NC group.

胞存活率、克隆数低于 sh-XIST 组、sh-XIST+anti-miR-NC 组 ($P<0.05$)。见图1和表3。

2.3 敲低LncRNA XIST对MPC5细胞迁移的影响

HG 组细胞迁移数低于 Control 组 ($P<0.05$); sh-XIST 组细胞迁移数高于 HG 组、sh-NC 组 ($P<0.05$); sh-XIST+anti-miR-23a-3p 组细胞迁移数低于 sh-XIST 组、sh-XIST+anti-miR-NC 组 ($P<0.05$)。见图2和表3。

2.4 敲低LncRNA XIST对MPC5细胞凋亡的影响

HG 组细胞凋亡率高于 Control 组 ($P<0.05$); sh-XIST 组细胞凋亡率低于 HG 组、sh-NC 组 ($P<0.05$); sh-XIST+anti-miR-23a-3p 组细胞凋亡率高于 sh-XIST 组、sh-XIST+anti-miR-NC 组 ($P<0.05$)。见图3和表3。

2.5 敲低LncRNA XIST对MPC5细胞炎症及氧化应激因子IL-6、IL-10、GSH、CAT表达的影响

HG 组 MPC5 细胞 IL-6 水平高于 Control 组 ($P<0.05$), IL-10、GSH、CAT 水平低于 Control 组 ($P<0.05$); sh-XIST 组 MPC5 细胞 IL-6 水平低于 HG 组、sh-NC 组 ($P<0.05$), IL-10、GSH、CAT 水平高于 HG 组、sh-NC 组 ($P<0.05$); sh-XIST+anti-miR-23a-3p 组 MPC5 细胞 IL-6 水平高于 sh-XIST 组、sh-XIST+anti-miR-NC 组 ($P<0.05$), IL-10、GSH、CAT 水平低于 sh-XIST 组、sh-XIST+anti-miR-NC 组 ($P<0.05$)。见表4。

2.6 敲低LncRNA XIST对MPC5细胞PCNA、MMP-9、Bax、Bcl-2蛋白表达的影响

HG 组 MPC5 细胞 Bax 蛋白表达水平高于 Control

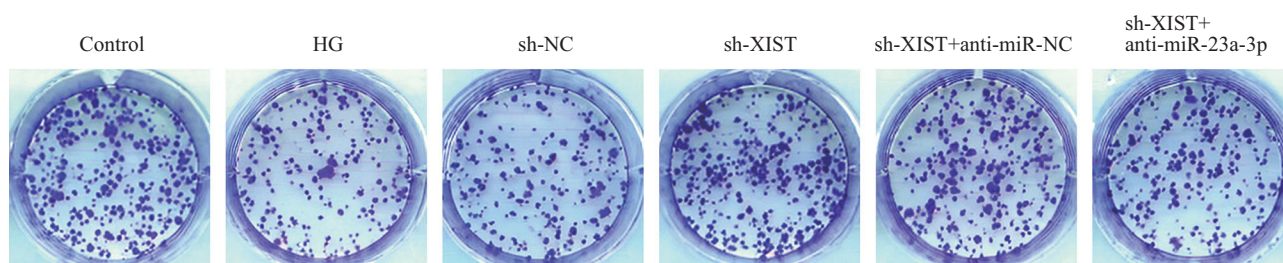


图1 克隆形成实验检测MPC5细胞的增殖

Fig.1 The proliferation of MPC5 cells was detected by clone formation assay

表3 敲低LncRNA XIST对MPC5细胞增殖、迁移、凋亡的影响

Table 3 Effects of down-regulation of LncRNA XIST on the proliferation, migration and apoptosis of MPC5 cells

组别 Group	存活率/% Survival rate /%	克隆数 Number of clones	迁移数 Number of migrations	凋亡率/% Apoptosis rate /%
Control	96.84±0.54	145.63±15.26	134.63±14.25	1.49±0.21
HG	52.36±6.43*	89.76±9.42*	76.89±8.24*	26.28±3.25*
sh-NC	51.46±6.24	92.74±9.69	79.34±8.62	24.67±2.94
sh-XIST	85.82±9.21 [#] &	137.92±14.38 [#] &	125.29±13.54 [#] &	6.12±0.74 [#] &
sh-XIST+anti-miR-NC	87.56±9.35	138.34±14.84	124.83±13.17	6.27±0.69
sh-XIST+anti-miR-23a-3p	60.83±7.16 [@] [△]	99.26±10.72 [@] [△]	84.95±9.15 [@] [△]	22.68±2.74 [@] [△]

$\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$, 与Control组比较; [#] $P<0.05$, 与HG组比较; [&] $P<0.05$, 与sh-NC组比较; [@] $P<0.05$, 与sh-XIST组比较; [△] $P<0.05$, 与sh-XIST+anti-miR-NC组比较。

$\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the HG group; [&] $P<0.05$ compared with the sh-NC group; [@] $P<0.05$ compared with the sh-XIST group; [△] $P<0.05$ compared with the sh-XIST+anti-miR-NC group.

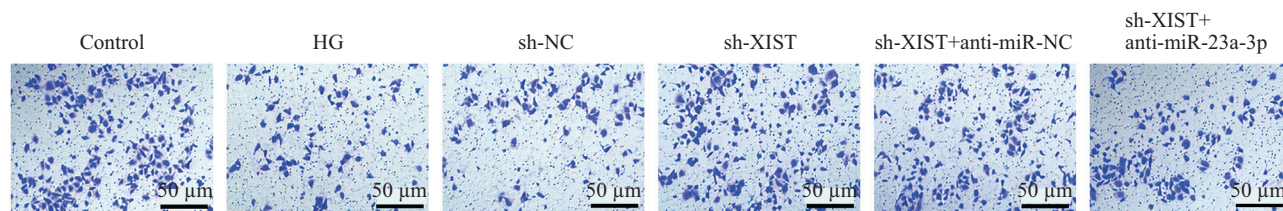


图2 Transwell实验检测MPC5细胞的迁移

Fig.2 The Transwell assay was used to detect the migration of MPC5 cells

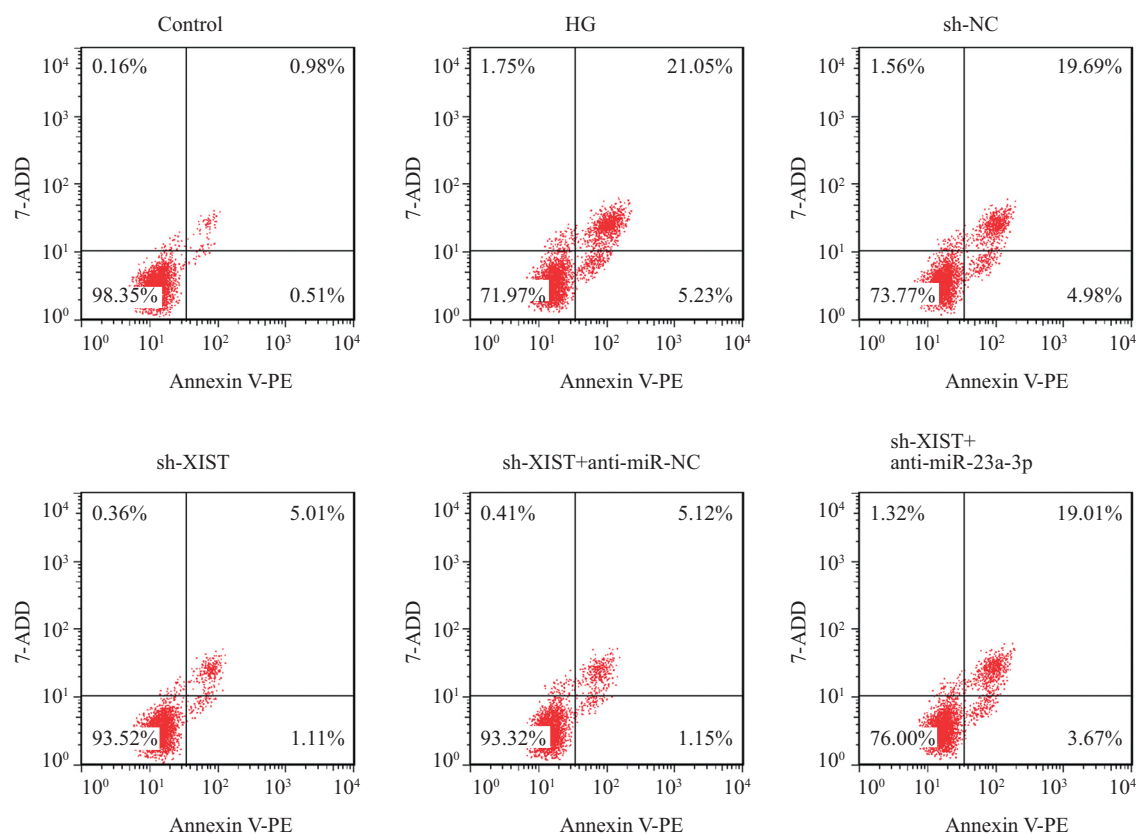


图3 流式细胞仪检测MPC5细胞凋亡

Fig.3 Apoptosis of MPC5 cells was detected by flow cytometry

组 ($P<0.05$), PCNA、MMP-9、Bcl-2蛋白表达水平低于Control组 ($P<0.05$); sh-XIST组MPC5细胞Bax蛋白表达水平低于HG组、sh-NC组 ($P<0.05$), PCNA、MMP-9、Bcl-2蛋白表达水平高于HG组、sh-NC组 ($P<0.05$); sh-XIST+anti-miR-23a-3p组MPC5细胞Bax蛋白表达水平高于sh-XIST组、sh-XIST+anti-miR-NC组 ($P<0.05$), PCNA、MMP-9、Bcl-2蛋白表达水平低于sh-XIST组、sh-XIST+anti-miR-NC组 ($P<0.05$)。见图4和表5。

2.7 LncRNA XIST和miR-23a-3p的靶向关系

LncRNA XIST和miR-23a-3p存在结合位点, 见图5。与XIST-WT+mimic-NC组相比, XIST-WT+miR-23a-3p mimic组细胞双荧光素酶活性明显降低 ($P<0.05$); 与XIST-MUT+mimic-NC组相比, XIST-MUT+miR-23a-3p mimic组细胞双荧光素酶活性无明显差异 ($P=0.989$)。见表6。

3 讨论

DKD属于糖尿病微血管并发症, 其中足细胞损伤是引发DKD的重要机制, 研究发现, 高血糖能够诱

发炎症、氧化应激反应, 进而促进足细胞损伤, 导致足细胞凋亡, 足细胞数量减少, 加重DKD病情^[11-12]。目前, 临床可采用免疫抑制剂等缓解病情发展, 但是疗效不甚理想, 并且具有较大的副作用^[13]。相关研究发现, 修复足细胞损伤可作为治疗DKD的一个重要方向, 但是目前仍缺乏针对足细胞损伤的有效药物^[14]。因此, 明确足细胞损伤的相关分子机制, 探究潜在治疗靶点, 为开发新型有效药物具有重要意义。

LncRNA在炎症性疾病发展中占据关键地位, 可通过调控多种通路影响炎症细胞的增殖及炎症因子的释放^[15]。研究发现, LncRNA XIST在DKD中表达上调, 敲低LncRNA XIST表达, 可抑制炎症因子的表达, 进而促进抗凋亡蛋白的表达, 起到缓解细胞损伤的作用^[16]。研究表明, 通过构建DKD大鼠模型, 尾静脉注射慢病毒sh-XIST, 可有效降低炎症及细胞焦亡相关指标的表达水平, 进一步分析发现, LncRNA XIST可能是通过调控miR-30d-5p/BECN-1通路, 进而介导细胞焦亡, 抑制炎症反应加剧的^[17-18]。IL-6是促炎细胞因子, IL-10为抗炎细胞因子, IL-6水平升高和IL-10水平下降提示DKD大鼠出现炎症反应^[19]。

表4 敲低LncRNA XIST对MPC5细胞炎症和氧化应激因子的影响

Table 4 Effects of down-regulation of LncRNA XIST on inflammatory and oxidative stress factors in MPC5 cells

组别 Group	IL-6 /pg·mL ⁻¹	IL-10 /pg·mL ⁻¹	GSH /U·L ⁻¹	CAT /U·L ⁻¹
Control	56.28±6.25	44.63±5.45	68.72±7.69	42.09±5.27
HG	110.37±12.43*	22.28±2.39*	33.45±4.24*	15.68±2.41*
sh-NC	109.42±11.59	23.57±2.66	34.57±4.29	17.97±2.76
sh-XIST	68.54±7.32 [#] &	38.76±4.13 [#] &	62.56±7.92 [#] &	32.63±3.58 [#] &
sh-XIST+anti-miR-NC	65.22±6.98	42.48±4.31	60.28±6.98	39.89±4.23
sh-XIST+anti-miR-23a-3p	105.36±11.34 [@] △	25.42±2.87 [@] △	36.79±4.35 [@] △	19.39±2.48 [@] △

$\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$, 与Control组比较; [#] $P<0.05$, 与HG组比较; & $P<0.05$, 与sh-NC组比较; @ $P<0.05$, 与sh-XIST组比较; △ $P<0.05$, 与sh-XIST+anti-miR-NC组比较。

$\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the HG group; & $P<0.05$ compared with the sh-NC group; @ $P<0.05$ compared with the sh-XIST group; △ $P<0.05$ compared with the sh-XIST+anti-miR-NC group.

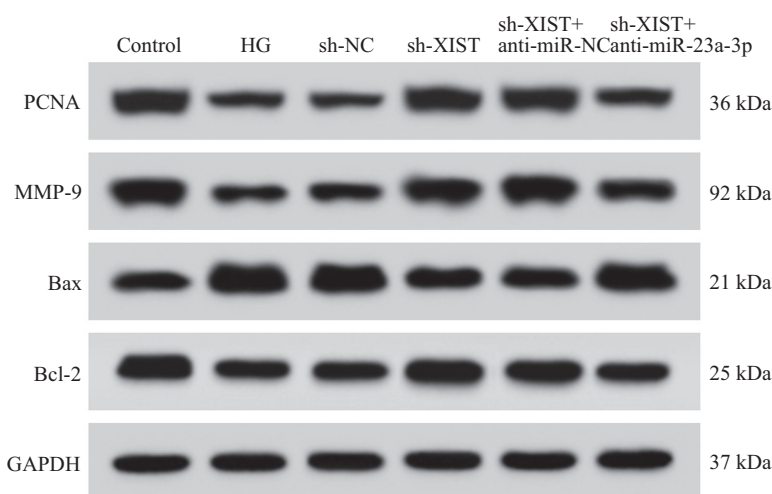


图4 Western blot检测MPC5细胞中PCNA、MMP-9、Bax、Bcl-2蛋白表达情况

Fig.4 Western blot was used to detect the protein expressions of PCNA, MMP-9, Bax and Bcl-2 in MPC5 cells

表5 敲低LncRNA XIST对PCNA、MMP-9、Bax、Bcl-2蛋白表达的影响

Table 5 The impact of down-regulating LncRNA XIST on the protein expressions of PCNA, MMP-9, Bax, Bcl-2

组别 Group	PCNA	MMP-9	Bax	Bcl-2
Control	1.63±0.19	1.75±0.23	1.09±0.13	1.78±0.25
HG	0.64±0.12*	0.79±0.14*	1.82±0.28*	1.05±0.11*
sh-NC	0.63±0.11	0.82±0.15	1.77±0.25	1.03±0.09
sh-XIST	1.59±0.18 [#] &	1.66±0.17 [#] &	1.16±0.15 [#] &	1.56±0.19 [#] &
sh-XIST+anti-miR-NC	1.58±0.16	1.68±0.19	1.13±0.14	1.53±0.15
sh-XIST+anti-miR-23a-3p	0.68±0.14 [@] △	0.85±0.16 [@] △	1.68±0.08 [@] △	1.09±0.11 [@] △

$\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$, 与Control组比较; [#] $P<0.05$, 与HG组比较; & $P<0.05$, 与sh-NC组比较; @ $P<0.05$, 与sh-XIST组比较; △ $P<0.05$, 与sh-XIST+anti-miR-NC组比较。

$\bar{x} \pm s$, $n=6$ 。* $P<0.05$ compared with the Control group; [#] $P<0.05$ compared with the HG group; & $P<0.05$ compared with the sh-NC group; @ $P<0.05$ compared with the sh-XIST group; △ $P<0.05$ compared with the sh-XIST+anti-miR-NC group.

GSH、CAT作为重要的内源性抗氧化物质,是评估氧化应激程度的关键标志物,GSH、CAT在DKD小鼠肾组织和HG诱导的MPC5细胞中下调表达,说

明DKD小鼠体内存在氧化应激损伤^[20]。PCNA是DNA合成的关键辅助蛋白,常用于评估细胞增殖活性;MMP-9主要负责细胞外基质(extracellular matrix,

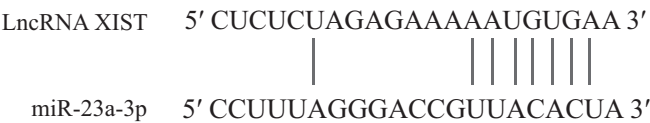


图5 LncRNA XIST与miR-23a-3p的结合位点
Fig.5 Binding sites of LncRNA XIST and miR-23a-3p

表6 双荧光素酶活性比较
Table 6 Comparison of dual luciferase activity

组别 Group	双荧光素酶活性 Dual-luciferase activity
XIST-WT+mimic-NC	1.00±0.25
XIST-WT+miR-23a-3p mimic	0.39±0.11*
XIST-MUT+mimic-NC	1.02±0.26
XIST-MUT+miR-23a-3p mimic	0.98±0.23

$\bar{x} \pm s, n=6$ 。* $P<0.05$, 与XIST-WT+mimic-NC组比较。
 $\bar{x} \pm s, n=6$ 。* $P<0.05$ compared with the XIST-WT+mimic-NC group.

ECM)成分的降解,维持ECM的动态平衡;在DKD中,HG环境抑制PCNA、MMP-9蛋白表达,使得肾脏细胞增殖能力减退,并导致大量ECM在肾脏组织中过度沉积^[21-22]。Bax属于促凋亡蛋白,可促进线粒体膜通透性改变,释放细胞色素C,激活凋亡级联反应;Bcl-2则为抗凋亡蛋白,能抑制线粒体膜通透性转换,减少细胞色素C释放,从而抑制细胞凋亡。正常情况下,Bax和Bcl-2维持动态平衡以调控细胞凋亡。在DKD中,HG诱导的氧化应激和炎症反应打破了这种平衡,使Bax表达显著上调,Bcl-2表达下调,Bax/Bcl-2值升高,促使肾脏细胞(尤其是足细胞)凋亡增加,加速肾脏功能损伤^[18]。本研究发现,敲低LncRNA XIST,MPC5细胞存活率、克隆数、迁移数明显升高,细胞凋亡率明显降低,IL-6水平及Bax蛋白表达水平明显降低,IL-10、GSH、CAT水平及PCNA、MMP-9、Bcl-2蛋白表达水平升高,提示敲低LncRNA XIST可能通过降低促炎细胞因子水平、升高抗炎细胞因子及抗氧化标志物水平来抑制炎症、氧化应激反应,并通过调节PCNA、MMP-9、Bcl-2、Bax蛋白表达促进细胞增殖并抑制细胞凋亡,进而缓解足细胞损伤,对DKD起到一定治疗效能。

miRNA可通过调控下游靶基因的表达,进而调控细胞炎症反应,参与多种炎症相关疾病的发生发展^[23]。既往研究发现,miR-23a-3p在细胞增殖、凋亡等各种生物学过程中发挥重要作用,miR-23a-3p表达上调可抑制氧化应激反应及细胞凋亡,进而缓解细胞损伤^[24]。LI等^[25]发现,在DKD中,miR-23a-

3p表达水平明显下降,经分析可知,上调miR-23a-3p可缓解HG诱发的细胞损伤,具有保护肾脏的作用。SHENG等^[26]发现,miR-23a-3p具有治疗DKD的潜力,靶向miR-23a-3p可作为一种新型治疗方法,起到抑制炎症反应及组织纤维化的作用。本研究结果表明,LncRNA XIST和miR-23a-3p存在结合位点,说明LncRNA XIST可负调控miR-23a-3p的表达,通过抑制miR-23a-3p表达可部分逆转LncRNA XIST对足细胞增殖、迁移、凋亡及其相关蛋白表达的影响,并降低其对炎症、氧化应激反应的抑制作用,提示LncRNA XIST可能通过靶向抑制miR-23a-3p表达,进而促进炎症、氧化应激反应,加重足细胞损伤。既往研究表明,miR-23a-3p在HG诱导的HK-2细胞中靶向转录因子KLF3基因,进而调节STAT3的表达,缓解肾纤维化和炎症^[25];miR-23a-3p通过Egr1抑制DKD的发展^[26]。

综上所述,敲低LncRNA XIST可能促进miR-23a-3p表达,进而抑制HG诱导的足细胞损伤进展。本研究尚存在一些局限性,如对照设置不完整,指标检测时间点单一,未分析miR-23a-3p下游靶基因或通路,并且可能存在其他通路调控足细胞损伤,以及未进行动物水平分析该疾病的分子调控机制。后续将补充Control+sh-NC组、Control+sh-XIST组、HG+sh-NC+anti-miR-NC组、HG+sh-NC+anti-miR-23a-3p组,以更全面地评估LncRNA XIST在不同环境下的生物学功能;通过增设48 h、72 h等多个时间观测点,系统探究足细胞损伤相关指标(如凋亡率、

标志物蛋白表达等)及LncRNA XIST/miR-23a-3p轴活性的时序性变化,从而明确该调控机制是否呈现时间依赖性特征,为深入解析LncRNA XIST在足细胞损伤进程中的动态作用机制提供更全面的数据支撑;通过生物信息学预测、回复实验等探究miR-23a-3p下游靶基因或通路,并通过体内实验深入验证LncRNA XIST的调控机制。

参考文献 (References)

- [1] VUČIĆ LOVRENČIĆ M, BOŽIČEVIĆ S, SMIRČIĆ DUVN-JAK L. Diagnostic challenges of diabetic kidney disease [J]. *Biochem Med*, 2023, 33(3): 030501.
- [2] LU J, CHEN G, SHEN G, et al. Ang-(1-7) attenuates podocyte injury induced by high glucose *in vitro* [J]. *Arch Endocrinol Metab*, 2023, 67(6): 643-64.
- [3] XU J, SHAN X, CHEN C, et al. Tangshenning attenuates high glucose-induced podocyte injury via restoring autophagy activity through inhibiting mTORC1 activation [J]. *J Diabetes Res*, 2022, 11(31): 1610-23.
- [4] LOU Y, LUAN Y T, RONG W Q, et al. Corilagin alleviates podocyte injury in diabetic nephropathy by regulating autophagy via the SIRT1-AMPK pathway [J]. *World J Diabetes*, 2024, 15(9): 1916-31.
- [5] LI J, XUE L, WU Y, et al. STAT3-activated lncRNA XIST accelerates the inflammatory response and apoptosis of LPS-induced acute lung injury [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(14): 6550-7.
- [6] 赵积海, 张喜俊, 董效珍, 等. 长链非编码RNA XIST调控miR-124/STAT3轴参与糖尿病肾病纤维化的机制[J]. *中国老年学杂志*(ZHAO J H, ZHANG X J, DONG X Z, et al. The mechanism by which long non-coding RNA XIST regulates the miR-124/STAT3 axis and participates in diabetic nephropathy fibrosis [J]. *Chinese Journal of Gerontology*), 2023, 43(24): 6101-8.
- [7] TSAI Y C, KUO M C, HUNG W W, et al. Proximal tubule-derived exosomes contribute to mesangial cell injury in diabetic nephropathy via miR-92a-1-5p transfer [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 1-10.
- [8] MENG X, YU X, LEI P. Clinical value of miR-23a-3p expression in early diagnosis of diabetic kidney disease [J]. *Endokrynol Pol*, 2023, 14(21): 1-14.
- [9] HAO Y Q, LIU K W, ZHANG X, et al. GINS2 was regulated by lncRNA XIST/miR-23a-3p to mediate proliferation and apoptosis in A375 cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(3): 1455-65.
- [10] 张亚兰, 马欣, 罗阳燕, 等. 利拉鲁肽通过磷酸肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路对高糖诱导的人足细胞自噬及凋亡影响的研究[J]. *中国糖尿病杂志*(ZHANG Y L, MA X, LUO Y Y, et al. Liraglutide influences human podocyte autophagy and apoptosis induced by high glucose through PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Chinese Journal of Diabetes*), 2024, 32(5): 380-8.
- [11] 徐震宇, 李恬, 盖云. 五桑饮含药血清通过抗沉默信息调节因子蛋白1/腺苷酸活化蛋白激酶通路和增强细胞自噬减轻高糖诱导足细胞损伤的研究[J]. *河北中医*(XU Z Y, LI T, GAI Y. Wusangyin medicated serum alleviates high-glucose-induced podocyte injury through the SIRT1/AMPK signaling pathway and enhancing autophagy [J]. *Hebei Journal of Traditional Chinese Medicine*), 2024, 46(7): 1120-6,31.
- [12] JIN Q, LIU T, QIAO Y, et al. Oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy: role of polyphenols [J]. *Front Immunol*, 2023, 14(11): 1185-97.
- [13] SAMSU N. Diabetic nephropathy: challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 1497449.
- [14] LI X, ZHANG Y, XING X, et al. Podocyte injury of diabetic nephropathy: novel mechanism discovery and therapeutic prospects [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168(21): 1156-67.
- [15] 董海芸, 郑君波, 张钰君, 等. lncRNA CASC9靶向miR-53a-5p调控高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤的机制研究[J]. *中国免疫学杂志*(DONG H Y, ZHENG J B, ZHANG Y J, et al. Mechanism of lncRNA CASC9 targeting miR-53a-5p to regulate renal tubular epithelial cell damage induced by high glucose [J]. *Chinese Journal of Immunology*), 2022, 38(22): 2706-11.
- [16] LONG B, WAN Y, ZHANG S, et al. LncRNA XIST protects podocyte from high glucose-induced cell injury in diabetic nephropathy by sponging miR-30 and regulating AVEN expression [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2023, 129(3): 610-7.
- [17] XU J, WANG Q, SONG Y F, et al. Long noncoding RNA X-inactive specific transcript regulates NLR family pyrin domain containing 3/caspase-1-mediated pyroptosis in diabetic nephropathy [J]. *World J Diabetes*, 2022, 13(4): 358-75.
- [18] CAI Y, CHEN S, JIANG X, et al. LncRNA X inactive specific transcript exerts a protective effect on high glucose-induced podocytes by promoting the podocyte autophagy via miR-30d-5p/BECN-1 axis [J]. *Int J Endocrinol*, 2023, 23(1): 31878-89.
- [19] HUANG G, LV J, LI T, et al. Notoginsenoside R1 ameliorates podocyte injury in rats with diabetic nephropathy by activating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(4): 1179-89.
- [20] 白建梅, 刘英喆, 田瑞雪, 等. Chlorfortunone A通过调节TGF-β/Smad2通路抑制糖尿病肾病小鼠肾纤维化[J]. *中华内分泌代谢杂志*(BAI J M, LIU Y Z, TIAN R X, et al. Chlorfortunone A alleviates kidney fibrosis in diabetic nephropathy mice via modulating the TGF-β/Smad2 pathway [J]. *Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism*), 2025, 41(2): 145-51.
- [21] JIANG X, RU Q, LI P, et al. LncRNA SNHG16 induces proliferation and fibrogenesis via modulating miR-141-3p and CCND1 in diabetic nephropathy [J]. *Gene Ther*, 2020, 27(12): 557-66.
- [22] 王晓伟, 余小柱, 郭二霞, 等. 蛇床子素通过PI3K/Akt/mTOR通路对糖尿病肾病大鼠纤维化及HSP90、SIRT1的影响[J]. *中国老年学杂志*(WANG X W, YU X Z, GUO E X, et al. Capsaicin affects fibrosis and HSP90, SIRT1 in diabetic nephropathy rats through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Chinese Journal of Gerontology*), 2023, 43(6): 1446-50.
- [23] 尚耀民, 邢宝春, 胡旭, 等. 阿尔泰金莲花总黄酮通过miR-23b-3p抑制RSV感染支气管上皮细胞凋亡和炎症反应的分子机制研究[J]. *中医药信息*(SHANG Y M, XING B C, HU X, et al. Molecular mechanism of trololus altaicus flavonoids inhibiting apoptosis and inflammation response of bronchial epithelial cells infected with RSV through miR-23b-3p [J]. *Information on Traditional Chinese Medicine*), 2022, 39(9): 33-8.
- [24] 黄春艳, 向汨, 费志医, 等. CircACTR2调节miR-23a-3p/TBL1X轴对高糖诱导的滋养层细胞损伤的影响[J]. *天津医药*(HUANG

- C Y, XIANG M, FEI Z Y, et al. Influence of circACTR2 on high glucose-induced trophoblast cell injury by regulating miR-23a-3p/TBL1X axis [J]. Tianjin Medical Journal, 2023, 51(10): 1048-54.
- [25] LI Q, LIU J, SU R, et al. Small extracellular vesicles-shuttled miR-23a-3p from mesenchymal stem cells alleviate renal fibrosis and inflammation by inhibiting KLF3/STAT3 axis in diabetic kidney disease [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 139(27): 11267-78.
- [26] SHENG S, ZOU M, YANG Y, et al. miR-23a-3p regulates the inflammatory response and fibrosis in diabetic kidney disease by targeting early growth response 1 [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2021, 57(8): 763-74.