

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.03.001
文章编号: 1005-8982 (2022) 03-0001-09

继发性肾病专题·论著

lncRNA TUG1吸附microRNA-144对狼疮肾炎小鼠肾小球系膜细胞炎症因子分泌与凋亡的影响及其机制研究

马洪波, 董燕娇, 孙琨, 王硕, 王洪云
(淄博市中心医院 肾内科, 山东 淄博 255036)

摘要: **目的** 探讨长链非编码RNA牛磺酸上调基因1(lncRNA TUG1)吸附microRNA-144(miR-144)对狼疮肾炎小鼠肾小球系膜细胞炎症因子分泌与凋亡的影响机制。**方法** B6.MRL-Fas^{hr}Nju系统性红斑狼疮模型小鼠20只和C57BL/6健康小鼠5只在适应性条件下喂养5 d。每天收集B6.MRL-Fas^{hr}Nju系统性红斑狼疮模型小鼠24 h尿量,尿蛋白浓度>1 mg/L表明狼疮肾炎发病,为狼疮肾炎组。C57BL/6小鼠为正常组。分离纯化两组小鼠肾小球系膜细胞。对lncRNA TUG1实施亚细胞定位,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测狼疮肾炎组和正常组小鼠肾组织中lncRNA TUG1和miR-144 mRNA相对表达量。狼疮肾炎组小鼠肾小球系膜细胞转染并分为NC组(肾小球系膜细胞转染阴性对照序列)、TUG1过表达组(肾小球系膜细胞转染TUG1)、sh-TUG1组(肾小球系膜细胞转染sh-TUG1)、miR-144 mimic组(肾小球系膜细胞转染miR-144 mimic)、TUG1过表达+miR-144 mimic组(肾小球系膜细胞转染TUG1和miR-144 mimic)。双荧光素酶报告实验验证lncRNA TUG1和miR-144的靶向关系,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组细胞中炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的水平。Western blotting法检测纤维化标记因子IV型胶原(Col IV)、纤连蛋白(FN)的蛋白相对表达量。MTT法检测各组细胞增殖活力,Transwell实验检测各组细胞侵袭数,流式细胞术检测各组细胞凋亡率。**结果** 与正常组小鼠比较,狼疮肾炎组小鼠肾组织中的miR-144 mRNA相对表达量升高,lncRNA TUG1 mRNA相对表达量降低($P < 0.05$)。lncRNA TUG1与miR-144存在靶向结合关系。NC组、TUG1过表达组、sh-TUG1组、miR-144 mimic组、TUG1过表达+miR-144 mimic组细胞TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);与NC组比较,TUG1过表达组TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平降低,miR-144 mimic组TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平升高($P < 0.05$)。各组的Col IV、FN蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);与NC组比较,TUG1过表达组Col IV和FN蛋白相对表达量降低,miR-144 mimic组Col IV、FN蛋白相对表达量升高($P < 0.05$)。各组不同时间点的肾小球系膜细胞增殖活力比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的肾小球系膜细胞活力有差异($P < 0.05$);②各组肾小球系膜细胞活力有差异($P < 0.05$);③各组的细胞活力变化趋势有差异($P < 0.05$);与NC组48 h和72 h比较,TUG1过表达组48 h和72 h细胞增殖活力降低($P < 0.05$),sh-TUG1组48 h和72 h细胞增殖活力增强($P < 0.05$),miR-144 mimic组48 h和72 h细胞增殖活力增强($P < 0.05$)。各组肾小球系膜细胞侵袭数和细胞凋亡率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);与NC组比较,TUG1过表达组的细胞侵袭数减少($P < 0.05$),细胞凋亡率升高($P < 0.05$);sh-TUG1组细胞侵袭数增多($P < 0.05$),细胞凋亡率降低($P < 0.05$);miR-144 mimic组细胞侵袭数增多($P < 0.05$)、细胞凋亡率降低($P < 0.05$)。**结论** lncRNA TUG1吸附miR-144进而抑制狼疮肾炎小鼠肾小球系膜细胞炎症因子分泌,减少细胞增殖并促进凋亡。

关键词: 狼疮肾炎;肾小球系膜细胞;长链非编码RNA;牛磺酸上调基因1;炎症因子;凋亡

中图分类号: R593.24+2

文献标识码: A

收稿日期: 2021-09-08

Effect of lncRNA TUG1 adsorbed microRNA-144 on inflammatory factor secretion and apoptosis of glomerular mesangial cells in lupus nephritis mice and its mechanism

Hong-bo Ma, Yan-jiao Dong, Kun Sun, Shuo Wang, Hong-yun Wang

(Department of Nephrology, Zibo Central Hospital, Zibo, Shandong 255036, China)

Abstract: Objective To explore the underlying mechanism of lncRNA TUG1 in the inflammatory factors secretion and apoptosis of mesangial cells in lupus nephritis (LN) mice through adsorbing microRNA-144 (miR-144).

Methods LN model mice and normal mice were purchased. The mesangial cells of model mice were isolated and purified for cell culture and treatment. Subcellular localization of lncRNA TUG1 was performed, and the fluorescence quantitative PCR was adopted to detect the expression of lncRNA TUG1 and miR-144 in LN mice and normal mice. The cells were transfected and then divided into different groups. Luciferase reporter assay was used to verify the targeting relationship between lncRNA TUG1 and miR-144. The expression of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blotting was performed to measure the protein expression of fibrosis markers. The cells proliferation, invasion, and apoptosis were respectively detected by MTT assay, Transwell assay, and flow cytometry assay. **Results** Compared to normal mice, the expression of miR-144 in renal tissue of LN mice was increased ($P < 0.05$), while the expression of lncRNA TUG1 was decreased ($P < 0.05$). There is a targeting relationship between lncRNA TUG1 and miR-144. Cell experiment showed that compared with NC group, overexpression of TUG1 decreased the secretion of TNF- α ($P < 0.05$), IL-1 β ($P < 0.05$), and IL-6 ($P < 0.05$), significantly down-regulated the protein expression of fibrosis marker Col. IV ($P < 0.05$) and FN ($P < 0.05$), reduced the activity of mesangial cells at 48 h ($P < 0.05$) and 72 h ($P < 0.05$), declined invasion number ($P < 0.05$), and enhanced apoptosis ($P < 0.05$). Compared with NC group, the secretion of inflammatory factors [TNF- α ($P < 0.05$), IL-1 β ($P < 0.05$), and IL-6 ($P < 0.05$)] and the protein expression of fibrosis marker [Col. IV ($P < 0.05$) and FN ($P < 0.05$)] in miR-144 mimic group were risen, the activity of mesangial cells was enhanced at 48 h ($P < 0.05$) and 72 h ($P < 0.05$), the invasion was increased ($P < 0.05$), and the apoptosis was reduced ($P < 0.05$). The effect of lncRNA TUG1 on mesangial cells of LN mice could be saved by miR-144. **Conclusion** Based on the results observed during this study, it quickly became apparent that lncRNA TUG1 can sponge miR-144, and inhibit the secretion of inflammatory factors in mesangial cells of LN mice, reduce cell proliferation, and promote apoptosis.

Keywords: lupus nephritis; mesangial cells; RNA, long noncoding; taurine upregulated gene 1; inflammatory factor; apoptosis

狼疮肾炎是系统性红斑狼疮最常见的并发症，临床主要表现为血尿、蛋白尿、肾功能不全等，是由肾内自身抗体与抗原结合形成的免疫复合物沉积在肾小球等不同部位造成的免疫损伤所致。现阶段狼疮肾炎的病因尚未完全明确，也缺乏根治性的治疗措施，新的靶向治疗或免疫抑制剂的开发为狼疮肾炎的治疗提供了更多选择^[1-3]。

长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) 指的是长度 > 200 个核苷酸、缺乏蛋白编码能力的 RNA，分子内部二级空间结构特定且复杂，有多个位点可与蛋白质结合，还能够通过碱基互补配对的原则与 DNA、RNA 发生特异性的相互作用，使其适当的失活或激活，参与各类生物学进程^[4]。竞

争内源性 RNA (ceRNA) 可以通过竞争性地结合 microRNA 来调节基因表达。有研究^[5]发现，lncRNA 就是作为 ceRNA 竞争性结合细胞内大量 microRNA，调控其表达，进而调控下游基因并参与到多种生物学行为中。

lncRNA 牛磺酸上调基因 1 (taurine upregulated gene 1, TUG1) 位于染色体 22q12，被证明与癌症有关^[6-8]。研究发现，TUG1 在系统性红斑狼疮患者中表达降低^[9]。MicroRNA-144 (miR-144) 与血红素和自身限制性炎症有关，血红素通过上调 miR-144-3p 的表达延缓自身限制性炎症的消退^[10]。此外，一项关于 IgA 肾病的研究^[11]发现，来源于尿红细胞的 miR-144-3p 在 IgA 肾病患者尿沉渣中表达升高，其

可作为 IgA 肾病的诊断标志物。但目前尚未明确 miR-144 与狼疮肾炎的进展是否有关。本研究从 ceRNA 理论角度出发,通过生物信息学网站预测 lncRNA TUG1 的下游靶点,并通过动物实验探讨其调控网络及在狼疮肾炎中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂与仪器

10 周龄雄性 B6.MRL-*Fas*^{lpr}Nju 系统性红斑狼疮模型小鼠 20 只,体重(26.5±1.5)g; 10 周龄 C57BL/6 健康雄性小鼠 5 只,体重(26.5±1.6)g; 均购自南京大学模式动物研究所[动物实验许可证号:SYXK(苏)2019-0056]。基础培养液、Annexin-V-FITC/PI 双标染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, Trizol 试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)试剂盒、逆转录试剂盒、裂解液均购自武汉默沙克生物科技有限公司, Ambion PARIS™ 试剂盒(AM1921)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司, HEK-293T 细胞、TUG1-3'-UTR-WT 和 TUG1-3'-UTR-MUT 质粒购自湖南丰晖生物科技有限公司, 双荧光素酶检测试剂盒购自上海汉恒生物科技有限公司, 兔抗 IV 型胶原(Collagen IV, Col IV)抗体、纤连蛋白(Fibronectin, FN)抗体和 GAPDH 抗体购自北京义翘神州科技有限公司, TBST 缓冲液购自大连美仑生物技术有限公司, 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司, 噻唑蓝(MTT)购自广州锐博生物科技有限公司, Transwell 试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司, 酶联免疫检测仪、共聚焦显微镜均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 倒置显微镜(Axio Vert. A1)购自德国卡尔蔡司公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 B6.MRL-*Fas*^{lpr}Nju 系统性红斑狼疮模型小鼠和 C57BL/6 小鼠在适应性条件下喂养 5 d。每天收集 B6.MRL-*Fas*^{lpr}Nju 系统性红斑狼疮模型小鼠 24 h 尿量, 试纸测定尿蛋白浓度 > 1 mg/L 表明狼疮肾炎发病, 为狼疮肾炎组 ($n = 20$)。C57BL/6 小鼠为正常组 ($n = 5$)。

1.2.2 肾小球系膜细胞分离纯化 将正常组和狼疮肾炎组小鼠麻醉后快速断颈处死, 每只小鼠取 1 g

肾脏组织保存备用, 同时分离肾小球系膜细胞并纯化。细胞分离纯化步骤: 生理盐水清洗肾组织, 然后将肾皮质剪碎, 依次放入 400 目、200 目、100 目共 3 种不同孔径的筛网中轻轻碾压并用生理盐水冲洗, 在最底层的筛网吸出一部分组织镜下观察, 在组织中加入胶原酶消化 30 min, 当有完整的细胞散出时加入基础培养基使消化终止。将沉淀物分散均匀然后加入基础培养液置于 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养, 每 24 小时换新培养液, 5 d 左右细胞传 1 代, 4~6 代细胞为纯化后的肾小球系膜细胞。

1.2.3 qRT-PCR 检测正常组和狼疮肾炎组小鼠肾小球系膜细胞中 lncRNA TUG1 和 miR-144 mRNA 的相对表达量 Trizol 试剂盒提取正常组和狼疮肾炎组小鼠肾小球系膜细胞的总 RNA, 紫外线吸收法检测 RNA 纯度和浓度。将 RNA 逆转录为样品 cDNA。依据 qRT-PCR 试剂盒说明书扩增 cDNA, 将 PCR 管置于 DNA 扩增仪, 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 次循环, 之后 72℃ 延伸 10 min。lncRNA TUG1 内参为 *GAPDH*, miR-144 内参为 *U6*。引物的设计和合成由上海吉玛制药技术有限公司完成, 引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 lncRNA TUG1 和 miR-144 mRNA 的相对表达量。

表 1 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
<i>lncRNA</i>	正向: 5'-CTGAAGAAAGGCAATCCATC-3'	20
<i>TUG1</i>	反向: 5'-GTAGGCTACTACAGGTCATTTG-3'	22
<i>miR-144</i>	正向: 5'-GCGCGCTACAGTATAGATGATG-3'	22
	反向: 5'-GCTGTCAACGATACGCTACG-3'	20
<i>GAPDH</i>	正向: 5'-GTGGGACTCAACGGATTTG-3'	19
	反向: 5'-TGGGTGGAATCATATTGGAA-3'	20
	正向: 5'-	25
<i>U6</i>	CCATCGGAAGCTCGTATACGAAATT-3'	
	反向: 5'-GGCCTCTCGAAGCTGCGTGTGAG-3'	23

1.2.4 lncRNA TUG1 亚细胞定位和双荧光素酶报告基因实验 使用 PSORT 亚细胞定位网站 (<https://www.genscript.com/psort.html>) 预测 TUG1 在细胞中表达的位置。采用 Ambion PARIS™ (AM1921) 试剂盒分离狼疮肾炎组小鼠肾小球系膜细胞的细胞质和细胞核, 严格按照试剂盒说明书操作; 采用 qRT-

PCR 检测细胞质和细胞核中 lncRNA TUG1 mRNA 相对表达量, 具体过程同 1.2.3。通过 RNA22 网站 (<https://cm.jefferson.edu/rna22/>) 预测 lncRNA TUG1 和 miR-144 的结合位点, 之后通过双荧光素酶报告基因实验检测两者的关系。狼疮肾炎组小鼠肾小球系膜细胞的培养、转染及分组: 分离肾小球系膜细胞, 将其置于 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养 24 h 后进行转染并分为 NC 组 (肾小球系膜细胞转染阴性对照序列)、TUG1 过表达组 (肾小球系膜细胞转染 TUG1)、sh-TUG1 组 (肾小球系膜细胞转染 sh-TUG1)、miR-144 mimic 组 (肾小球系膜细胞转染 miR-144 mimic)、TUG1 过表达+miR-144 mimic 组 (肾小球系膜细胞转染 TUG1 和 miR-144 mimic)。

1.2.5 ELISA 法检测各组细胞培养液中炎症因子的表达 NC 组、TUG1 过表达组、sh-TUG1 组、miR-144 mimic 组、TUG1 过表达+miR-144 mimic 组细胞转染 48 h 后, 采用 ELISA 法检测培养液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 水平, 实验严格按照试剂盒说明书操作, 使用酶联免疫检测仪测定 450 nm 波长处的吸光度值。

1.2.6 Western blotting 法检测各组细胞 Col IV、FN 蛋白相对表达量 收集 NC 组、TUG1 过表达组、sh-TUG1 组、miR-144 mimic 组、TUG1 过表达+miR-144 mimic 组转染后的肾小球系膜细胞, 加入裂解液冰上裂解 30 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 收取上清液, 行 SDS-PAGE 电泳, 加热使蛋白变性。转膜加入兔抗 Col IV、FN 和 GAPDH 抗体, 常温摇床封闭过夜孵育后 TBST 洗膜, 再加入辣根酶标记山羊抗兔 IgG。以 GAPDH 抗体为内参。常温摇床孵育 2 h, 收集显色发光图像, 采用 Image J 软件计算 Col IV、FN 蛋白相对表达量。

1.2.7 MTT 实验检测各组细胞相对增殖活力 配置 NC 组、TUG1 过表达组、sh-TUG1 组、miR-144 mimic 组、TUG1 过表达+miR-144 mimic 组单个细胞悬液, 以每孔 2×10^5 个细胞接种到 96 孔板, 将培养基放置于培养箱中培养, 分别于 24 h、48 h、72 h 取出培养板, 每孔加入 15 μ L MTT 溶液, 继续在 37℃ 环境中培养 4 h。停止培养后, 2 000 r/min 离心 5 min, 抽吸弃孔内上清液。每个孔内加 150 μ L 二甲基亚砜 (DMSO), 震荡孵育 10 min。最后使用酶联免疫检测仪检测 570 nm 波长处的吸光度值。

1.2.8 Transwell 实验检测各组细胞侵袭数 将 Transwell 小室置于 24 孔板, PBS 冲洗, 胰酶消化后收集 NC 组、TUG1 过表达组、sh-TUG1 组、miR-144 mimic 组、TUG1 过表达+miR-144 mimic 组细胞, 3 000 r/min 离心 10 min。重悬细胞后取 200 μ L 细胞悬液, 铺板并培养。24 孔板下室加入 500 μ L 含趋化因子的培养基, 常规培养 24 h 后采用 5% 结晶紫染色液染色 2 min, 采用光学显微镜观察染色情况, 拍照后采用 Image J 软件统计细胞侵袭数。

1.2.9 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 采用 Annexin-V-FITC/PI 双标染色试剂盒, 转染后悬浮生长的细胞中加 Annexin-V-FITC 结合液, 避光孵育 15 min 后低温 2 000 r/min 离心 3 min, 弃去上清液, 再加入 Annexin-V-FITC 结合液和配置好的 PI 染色液, 暗室冰浴 5 min, 采用流式细胞仪检测 NC 组、TUG1 过表达组、sh-TUG1 组、miR-144 mimic 组、TUG1 过表达+miR-144 mimic 组细胞凋亡情况。液体配置和步骤按试剂盒说明书操作。细胞凋亡率=细胞早期凋亡率+细胞晚期凋亡率。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 或中位数 (上四分位数, 下四分位数) [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 两组间比较采用 t 检验或 Wilcoxon 符号秩检验或 Kruskal-Wallis 检验, 多组间比较采用方差分析或重复测量设计的方差分析, 进一步两两比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功分离纯化肾小球系膜细胞

使用倒置显微镜观察肾小球系膜细胞的形态发现, 细胞的体积大, 形态为成纤维细胞状, 胞体多为不规则的梭形、多角形; 胞质具有多个突起, 向四周延伸; 胞核则位于细胞的中央, 呈卵圆形或圆形。见图 1。

2.2 狼疮肾炎组小鼠肾小球系膜细胞中 lncRNA TUG1 表达被抑制而 miR-144 表达增强

正常组小鼠肾小球系膜细胞中 lncRNA TUG1 mRNA 相对表达量为 (1.00 ± 0.09) , miR-144 mRNA 相对表达量为 (1.00 ± 0.07) ; 狼疮肾炎组小鼠肾小球系膜细胞 lncRNA TUG1 mRNA 相对表达量为 $(0.56 \pm$

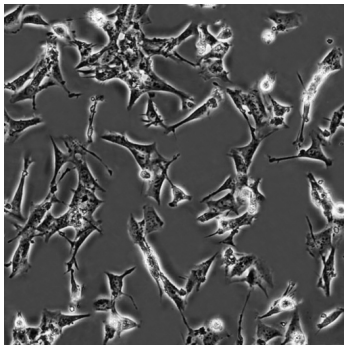


图1 肾小球系膜细胞 (倒置显微镜×400)

0.04), miR-144 mRNA 相对表达量为 (1.62 ± 0.20) 。正常组和狼疮肾炎组小鼠肾小球系膜细胞 lncRNA TUG1 和 miR-144 mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($t=9.526$ 和 4.896 , $P=0.011$ 和 0.008), 狼疮肾炎组小鼠肾小球系膜细胞 lncRNA TUG1 mRNA 相对表达量降低, miR-144 mRNA 相对表达量升高。见图2。

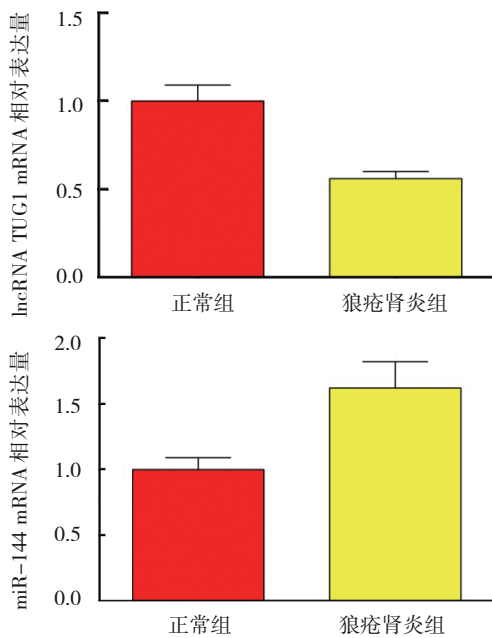
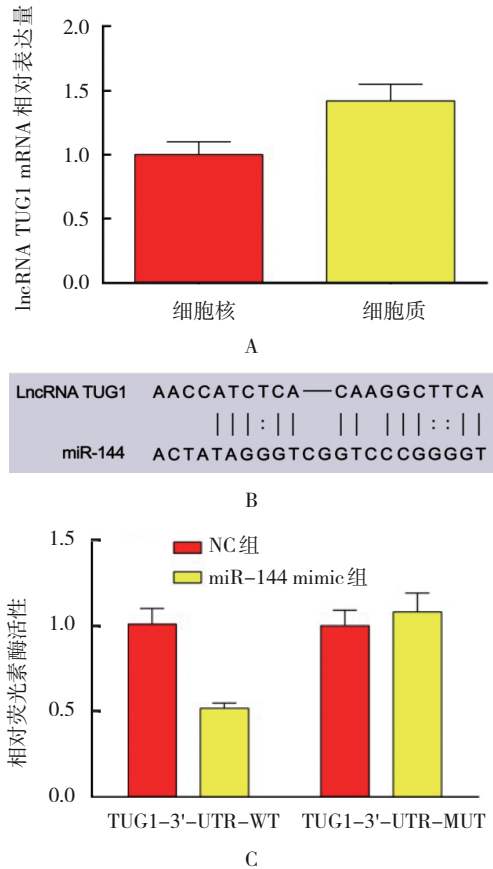


图2 正常组和狼疮肾炎组小鼠肾小球系膜细胞 lncRNA TUG1 和 miR-144 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.3 lncRNA TUG1 能够作为 ceRNA 吸附 miR-144

通过亚细胞定位网站发现, lncRNA TUG1 主要定位于细胞质中。细胞质中 lncRNA TUG1 mRNA 相对表达量为 (1.42 ± 0.13) , 细胞核为 (1.00 ± 0.09) , 两者比较, 差异有统计学意义 ($t=4.601$, $P=0.010$), 细胞质中 lncRNA TUG1 mRNA 相对表达量较高。通过 RNA22 网站发现 lncRNA TUG1 和 miR-144 存在结

合位点, 双荧光素酶报告基因实验发现, 两者有靶向关系: TUG1-3'-UTR-WT 中, 与 NC 组 (1.00 ± 0.11) 比较, miR-144 mimic 组 (0.52 ± 0.03) 的 HEK-293T 细胞荧光素酶活性显著降低 ($t=7.292$, $P=0.002$); 在 TUG1-3'-UTR-MUT 中, NC 组与 miR-144 mimic 组的 HEK-293T 细胞荧光素酶活性比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图3。



A: 细胞质和细胞核 lncRNA TUG1 mRNA 的相对表达量比较; B: RNA22 网站预测结果; C: 双荧光素酶报告基因实验结果。

图3 lncRNA TUG1 和 miR-144 的靶向关系

2.4 lncRNA TUG1 抑制狼疮肾炎组小鼠肾小球系膜细胞炎症因子的分泌且能被 miR-144 阻断

NC 组、TUG1 过表达组、sh-TUG1 组、miR-144 mimic 组、TUG1 过表达+miR-144 mimic 组细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。进一步两两比较, 结果: 与 NC 组比较, TUG1 过表达组的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低 ($q=4.087$ 、 4.380 和 5.583 , 均 $P=0.000$), sh-TUG1 组的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平升高 ($q=4.065$ 、 9.432 和 3.970 , 均 $P=0.000$), miR-144 mimic 组的 TNF- α 、IL-

1 β 、IL-6 水平升高 ($q=8.066$ 、 5.933 和 8.840 ，均 $P=0.000$)；TUG1 过表达+miR-144 mimic 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平与 NC 组比较，差异无统计学意义 ($q=0.670$ 、 0.276 和 0.310 ，均 $P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
NC 组	56.31 \pm 4.87	159.01 \pm 10.11	85.61 \pm 6.54
TUG1 过表达组	37.45 \pm 4.05	125.77 \pm 9.47	49.05 \pm 4.25
sh-TUG1 组	75.18 \pm 5.64	230.77 \pm 9.21	110.62 \pm 8.64
miR-144 mimic 组	93.65 \pm 7.87	204.15 \pm 8.91	142.05 \pm 10.28
TUG1 过表达+miR-144 mimic 组	53.22 \pm 5.41	161.15 \pm 8.94	83.41 \pm 8.62
F 值	43.241	58.694	56.927
P 值	0.000	0.000	0.000

2.5 lncRNA TUG1 抑制狼疮肾炎组小鼠肾小球系膜细胞 Col IV、FN 蛋白的表达且能被 miR-144 阻断

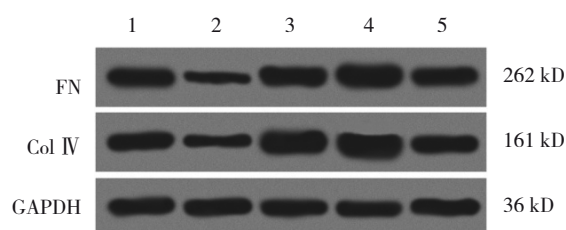
NC 组、TUG1 过表达组、sh-TUG1 组、miR-144 mimic 组、TUG1 过表达+miR-144 mimic 组的 Col IV、FN 蛋白相对表达量比较，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。进一步两两比较，结果：与 NC 组比较，TUG1 过表达组的 Col IV、FN 蛋白相对表达量降低 ($P<0.05$)，sh-TUG1 组和 miR-144 mimic 组 Col IV、FN 蛋白相对表达量升高 ($P<0.05$)；TUG1 过表达+miR-144 mimic 组 Col IV、FN 蛋白相对表达量与 NC 组比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3 和图 4。

表 3 各组 Col IV 与 FN 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Col IV 蛋白	FN 蛋白
NC 组	1.09 \pm 0.08	1.21 \pm 0.09
TUG1 过表达组	0.69 \pm 0.04	0.63 \pm 0.04
sh-TUG1 组	1.72 \pm 0.09	1.62 \pm 0.12
miR-144 mimic 组	1.86 \pm 0.11	1.76 \pm 0.11
TUG1 过表达+miR-144 mimic 组	1.25 \pm 0.09	1.05 \pm 0.08
F 值	94.033	72.443
P 值	0.000	0.000

2.6 lncRNA TUG1 抑制狼疮肾炎组小鼠肾小球系膜细胞增殖、侵袭，促进细胞凋亡且能被 miR-144 阻断

各组不同时间点的肾小球系膜细胞增殖活



1: NC 组; 2: TUG1 过表达组; 3: sh-TUG1 组; 4: miR-144 mimic 组; 5: TUG1 过表达+miR-144 mimic 组。

图 4 各组肾小球系膜细胞 Col IV 与 FN 蛋白的表达

力比较，采用重复测量设计的方差分析，结果：①不同时间点的肾小球系膜细胞增殖活力有差异 ($F=1\ 389.000$ ， $P=0.000$)；②各组肾小球系膜细胞增殖活力有差异 ($F=148.300$ ， $P=0.000$)；③各组的细胞增殖活力变化趋势有差异 ($F=12.430$ ， $P=0.000$)；进一步两两比较，与 NC 组 48 h 和 72 h 比较，TUG1 过表达组 48 h 和 72 h 细胞增殖活力降低 ($q=4.687$ 和 7.169 ，均 $P=0.000$)，sh-TUG1 组 48 h 和 72 h 细胞增殖活力增强 ($q=4.685$ 和 8.823 ，均 $P=0.000$)，miR-144 mimic 组 48 h 和 72 h 细胞增殖活力增强 ($q=7.444$ 和 12.130 ，均 $P=0.000$) (见表 4)。各组肾小球系膜细胞侵袭数和细胞凋亡率比较，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；进一步两两比较，结果：与 NC 组比较，TUG1 过表达组的细胞侵袭数减少 ($q=2.828$ ， $P=0.047$)，细胞凋亡率升高 ($q=13.450$ ， $P=0.000$)；sh-TUG1 组细胞侵袭数增多 ($q=4.108$ ， $P=0.000$)，细胞凋亡率降低 ($q=2.781$ ， $P=0.000$)；miR-144 mimic 组细胞侵袭数增多 ($q=4.768$ ， $P=0.000$)、细胞凋亡率降低 ($q=3.252$ ， $P=0.006$)；TUG1 过表达+miR-144 mimic 组的细胞侵袭数和细胞凋亡率与 NC 组比较，差异无统计学意义 ($q=0.355$ 和 1.318 ， $P=0.682$ 和 0.189)。见表 5 和图 5、6。

表 4 各组不同时间点的肾小球系膜细胞增殖活力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
NC 组	0.43 \pm 0.03	0.72 \pm 0.04	1.21 \pm 0.04
TUG1 过表达组	0.36 \pm 0.02	0.55 \pm 0.02	0.95 \pm 0.02
sh-TUG1 组	0.53 \pm 0.04	0.89 \pm 0.05	1.53 \pm 0.07
miR-144 mimic 组	0.62 \pm 0.05	0.99 \pm 0.06	1.65 \pm 0.07
TUG1 过表达+miR-144 mimic 组	0.46 \pm 0.03	0.77 \pm 0.04	1.28 \pm 0.05

表5 各组肾小球系膜细胞侵袭数和细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞侵袭数/个	细胞凋亡率/%
NC组	204.23 ± 19.14	11.25 ± 0.91
TUG1 过表达组	162.35 ± 17.08	26.53 ± 2.44
sh-TUG1 组	285.11 ± 29.32	8.21 ± 0.96
miR-144 mimic 组	298.15 ± 32.07	7.53 ± 0.82
TUG1 过表达+miR-144 mimic 组	211.33 ± 20.26	12.71 ± 1.32
F 值	16.803	88.492
P 值	0.000	0.000

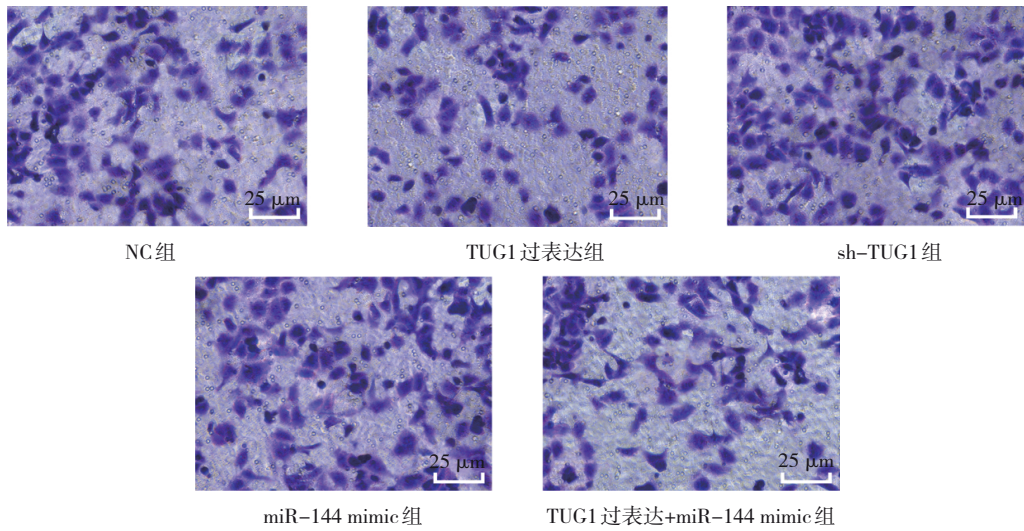


图5 各组肾小球系膜细胞侵袭结果 (共聚焦显微镜 × 400)

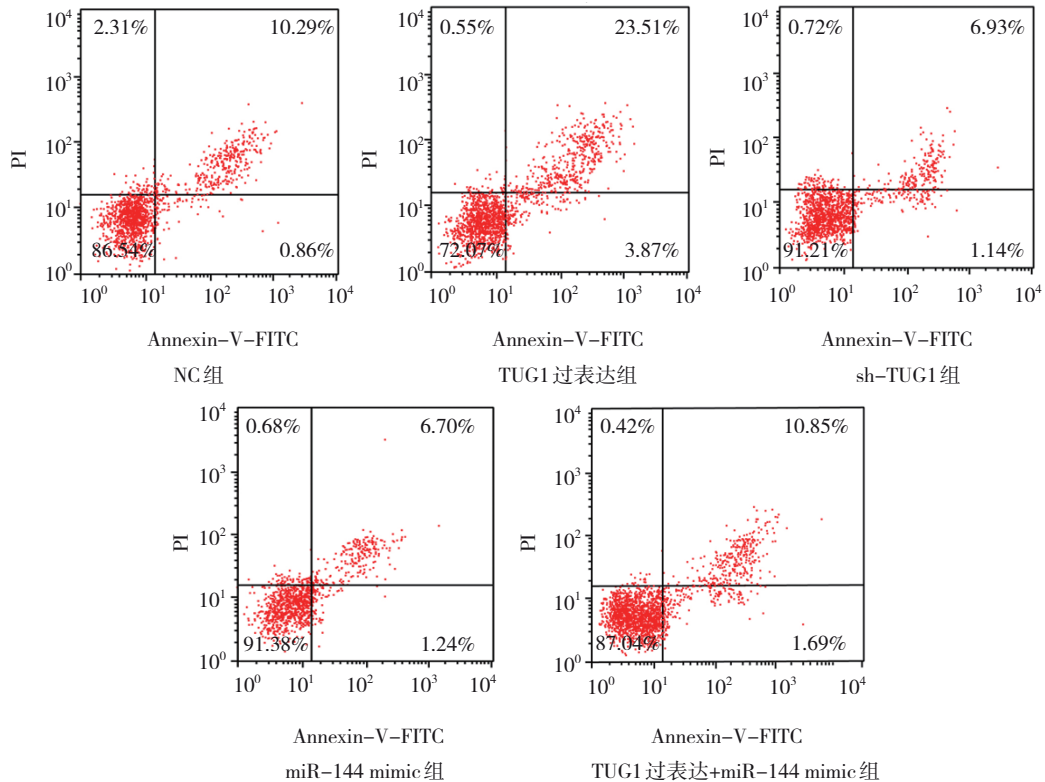


图6 各组细胞凋亡实验结果

3 讨论

肾损伤并发症仍被认为是继感染位居第二的死亡原因, 大约 40% ~ 70% 的系统性红斑狼疮患者都会并发狼疮肾炎, 是系统性红斑狼疮患者重要的死亡因素^[12]。狼疮肾炎主要病变特点为肾小球系膜细胞的过度增殖, 系膜细胞的过度增殖可以释放大量的炎症因子, 加剧炎症和引起肾小球硬化^[13]。

lncRNA 与人类疾病的发生、发展和防治都有着密切联系^[14]。TUG1 作为 lncRNA 的一员, GU 等^[15]的研究证实在慢性阻塞性肺疾病中上调 TUG1 可以调控细胞炎症分子分泌; 同样 CAO 等^[16]证明在系统性红斑狼疮小鼠肾组织中 TUG1 表达降低; XU 等^[17]也发现, 在狼疮肾炎中, TUG1 在抑制细胞损伤和诱发炎症等方面起重要的调节作用。因此本研究关注 TUG1 在狼疮肾炎中的作用和具体调控机制并探究其下游调控网络。MicroRNA 是一种编码长度约 22 nt 的 RNA, 广泛存在于真核细胞中, 在许多生理和病理过程中, 都发挥着重要的作用^[18]。miR-144 以往被发现在 IgA 肾病中表达增强并且可以在 IgA 肾病的分子诊断中发挥作用^[11]。而本研究进一步证实了 miR-144 在狼疮肾炎组小鼠肾组织中表达升高, 表明 miR-144 与狼疮肾炎发病有很大关系。

肾小球系膜细胞是肾脏的主要功能细胞, 肾小球系膜细胞炎症因子大量分泌是狼疮肾炎的重要病变表现, 狼疮肾炎发病时, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子分泌增强, 进一步使肾组织其他细胞损伤, 导致肾小球纤维化, 而肾小球纤维化是肾脏由健康到损伤、最后到功能丧失的早期标志^[19]。本研究通过 ELISA 法检测各组肾小球系膜细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平, 发现 TUG1 过表达或抑制 miR-144 表达都会使 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平降低。FN 为一种高分子血浆糖蛋白, 在肾脏中的主要功能是通过结合纤维蛋白、纤维蛋白原及胶原, 使其他胶原沉积在肾小管和间质。FN 在肾损伤早期显著增加, 随着疾病发展, 后期呈现显著升高趋势, 加剧肾脏纤维化病变, 是肾脏纤维化病变的主要标志物之一^[20]。Col IV 是细胞外基质的主要成分, 构成基膜并调控细胞黏附, 可以作为检测脏器纤维化的标志蛋白^[21]。本研究发现

纤维化因子标志蛋白 FN 与 Col IV 的表达可以被 TUG1 抑制且能被 miR-144 逆转。在健康状态下, 肾小球系膜细胞更新很缓慢, 但在病理状态下, 系膜细胞增殖活跃, 功能亢进, 系膜细胞凋亡减少, 过度增殖会导致肾小球纤维化, 进一步导致肾小球硬化, 影响肾脏功能^[22-24]。本研究通过 MTT、Transwell 法及流式细胞术对各组肾小球系膜细胞的增殖、侵袭及凋亡情况进行观察, 发现 TUG1 过表达能够抑制肾小球系膜细胞的增殖和侵袭, 促进凋亡。

综上所述, 相对于正常健康小鼠, 狼疮肾炎小鼠肾小球系膜细胞中 TUG1 表达低, miR-144 表达高, TUG1 能够靶向调控 miR-144 进而抑制肾小球系膜细胞炎症因子水平及细胞增殖活性。TUG1 和 miR-144 为狼疮肾炎的治疗提供了新的靶点和依据, 但需进一步研究证实更多的机制。

参考文献:

- [1] SCOBELL R, PRADHAN M. Management of lupus nephritis in children[J]. Indian Pediatr, 2020, 57(5): 401-406.
- [2] CASTER D J, POWELL D W. Utilization of biomarkers in lupus nephritis[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2019, 26(5): 351-359.
- [3] SELVARAJA M, ABDULLAH M, ARI P M, et al. Elevated interleukin-25 and its association to Th2 cytokines in systemic lupus erythematosus with lupus nephritis[J]. PLoS One, 2019, 14(11): e0224707.
- [4] DING Y, WANG X F, PAN J C, et al. Aberrant expression of long non-coding RNAs (lncRNAs) is involved in brain glioma development[J]. Arch Med Sci, 2020, 16(1): 177-188.
- [5] SHU X, DONG Z J, ZHANG M J, et al. Integrated analysis identifying long non-coding RNAs (lncRNAs) for competing endogenous RNAs (ceRNAs) network-regulated palatal shelf fusion in the development of mouse cleft palate[J]. Ann Transl Med, 2019, 7(23): 762.
- [6] LI G, YANG J, CHONG T, et al. TUG1 knockdown inhibits the tumorigenesis and progression of prostate cancer by regulating microRNA-496/Wnt/ β -catenin pathway[J]. Anticancer Drugs, 2020, 31(6): 592-600.
- [7] YANG G, YIN H B, LIN F, et al. Long noncoding RNA TUG1 regulates prostate cancer cell proliferation, invasion and migration via the Nrf2 signaling axis[J]. Pathol Res Pract, 2020, 216(4): 152851.
- [8] GUO C, QI Y Y, QU J Y, et al. Pathophysiological functions of the lncRNA TUG1[J]. Curr Pharm Des, 2020, 26(6): 688-700.
- [9] CAO H Y, LI D, WANG Y P, et al. Clinical significance of reduced expression of lncRNA TUG1 in the peripheral blood of systemic lupus erythematosus patients[J]. Int J Rheum Dis, 2020, 23(3): 428-434.

- [10] SUN G X, LU Y, ZHAO L, et al. Hemin impairs resolution of inflammation via microRNA-144-3p-dependent downregulation of ALX/FPR2[J]. *Transfusion*, 2019, 59(1): 196-206.
- [11] DUAN Z Y, CAI G Y, BU R, et al. Selection of urinary sediment miRNAs as specific biomarkers of IgA nephropathy[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23498.
- [12] DING H H, LIN C, CAI J Y, et al. Urinary activated leukocyte cell adhesion molecule as a novel biomarker of lupus nephritis histology[J]. *Arthritis Res Ther*, 2020, 22(1): 122.
- [13] KOSTOPOULOU M, ADAMICHOU C, BERTSIAS G, et al. An update on the diagnosis and management of lupus nephritis[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2020, 22(7): 30.
- [14] WANG S Y, YOU H Z, YU S. Long non-coding RNA HOXA-AS2 promotes the expression levels of hypoxia-inducible factor-1 α and programmed death-ligand 1, and regulates nasopharyngeal carcinoma progression via miR-519[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(5): 245.
- [15] GU W C, YUAN Y P, WANG L X, et al. Long non-coding RNA TUG1 promotes airway remodelling by suppressing the miR-145-5p/DUSP6 axis in cigarette smoke-induced COPD[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11): 7200-7209.
- [16] CAO H Y, LI D, WANG Y P, et al. The protection of NF- κ B inhibition on kidney injury of systemic lupus erythematosus mice may be correlated with lncRNA TUG1[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2020, 36(5): 354-362.
- [17] XU Y, DENG W Y, ZHANG W. Long non-coding RNA TUG1 protects renal tubular epithelial cells against injury induced by lipopolysaccharide via regulating microRNA-223[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 104: 509-519.
- [18] CAO M X, ZHANG W L, YU X H, et al. Interplay between cancer cells and M2 macrophages is necessary for miR-550a-3-5p down-regulation-mediated HPV-positive OSCC progression[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 102.
- [19] ZHENG C Z, YAN W W, LUO Y L, et al. Value of sTNF-R1 and linc0597 as indicators for disease activity and diagnosis of lupus nephritis[J]. *Eur Rev Med PharmacolSci*, 2020, 24(10): 5582-5591.
- [20] LUO S, GONG J Z, CAO X P, et al. Ligustilide modulates oxidative stress, apoptosis, and immunity to avoid pathological damages in bleomycin induced pulmonary fibrosis rats via inactivating TLR4/MyD88/NF-KB P65[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(15): 931.
- [21] YEMANYI F, VRANKA J, RAGHUNATHAN V K. Glucocorticoid-induced cell-derived matrix modulates transforming growth factor β 2 signaling in human trabecular meshwork cells[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 15641.
- [22] WEI J, WANG Y, QI X M, et al. Melatonin ameliorates hyperglycaemia-induced renal inflammation by inhibiting the activation of TLR4 and TGF- β /Smad3 signalling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(5): 1584-1599.
- [23] WANG S, WEN X, HAN X R, et al. Repression of microRNA-382 inhibits glomerular mesangial cell proliferation and extracellular matrix accumulation via FoxO1 in mice with diabetic nephropathy[J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(5): e12462.
- [24] BUHL E M, DJUDJAJ S, KLINKHAMMER B M, et al. Dysregulated mesenchymal PDGFR- β drives kidney fibrosis[J]. *EMBO Mol Med*, 2020, 12(3): e11021.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 马洪波,董燕娇,孙琨,等. lncRNA TUG1吸附microRNA-144对狼疮肾炎小鼠肾小球系膜细胞炎症因子分泌与凋亡的影响及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(3): 1-9.

Cite this article as: MA H B, DONG Y J, SUN K, et al. Effect of lncRNA TUG1 adsorbed microRNA-144 on inflammatory factor secretion and apoptosis of glomerular mesangial cells in lupus nephritis mice and its mechanism[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(3): 1-9.