

## circLRP6调节miR-31-5p/HMGA1轴对高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤的影响

许峥嵘,任卫东,谷君,张志英,邓文娟,左丽娟  
(河北北方学院附属第一医院内分泌科,河北 张家口 075000)

**摘要** 目的 分析circLRP6调节miR-31-5p/高迁移率族蛋白A1 (HMGA1) 轴对高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤的影响。方法 体外培养人肾小管上皮HK-2细胞,分为对照组、高糖组、高糖+si-NC组、高糖+si-circLRP6组、高糖+si-circLRP6+miR-NC组、高糖+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor组、高糖+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor+si-NC组、高糖+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor+si-HMGA1组,对照组置于含5.5 mmol/L葡萄糖的DMEM培养基内培养,其余各组置于含25 mmol/L葡萄糖的DMEM培养基内培养,并通过Lipofectamine 2000将相应质粒转染至HK-2细胞内,实时定量PCR测定细胞circLRP6、miR-31-5p、HMGA1 mRNA水平,试剂盒测定细胞上清液白细胞介素-6 (IL-6) 水平、肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平、乳酸脱氢酶 (LDH) 活性以及丙二醛 (MDA) 含量;流式细胞仪观察细胞凋亡;Western blotting测定细胞HMGA1、Bax、Bcl-2蛋白表达;双荧光素酶报告基因实验分析miR-31-5p与circLRP6、HMGA1的靶向关系。**结果** 与对照组相比,高糖组HK-2细胞circLRP6水平升高,细胞增殖抑制率、IL-6、TNF- $\alpha$ 、LDH、MDA、细胞凋亡率、Bax蛋白表达升高,Bcl-2蛋白表达降低(均 $P < 0.05$ );与高糖组相比,高糖+si-circLRP6组HK-2细胞增殖抑制率、IL-6、TNF- $\alpha$ 、LDH、MDA、细胞凋亡率、Bax蛋白表达降低,Bcl-2蛋白表达升高(均 $P < 0.05$ );与高糖+si-circLRP6组相比,高糖+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor组HK-2细胞增殖抑制率、IL-6、TNF- $\alpha$ 、LDH、MDA、细胞凋亡率、Bax蛋白表达升高,Bcl-2蛋白表达降低(均 $P < 0.05$ );与高糖+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor组相比,高糖+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor+si-HMGA1组HK-2细胞增殖抑制率、IL-6、TNF- $\alpha$ 、LDH、MDA、细胞凋亡率、Bax蛋白表达降低,Bcl-2蛋白表达升高(均 $P < 0.05$ )。miR-31-5p与circLRP6、HMGA1均具有靶向关系。**结论** 沉默circLRP6可能通过上调miR-31-5p,抑制HMGA1表达,对高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤发挥保护作用。

**关键词** 高糖; 肾小管; circLRP6; miR-31-5p; 高迁移率族蛋白A1

中图分类号 R587.2 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2024)03-0246-06

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20240229.1656.032>

DOI:10.12007/j.issn.0258-4646.2024.03.010

### Effect of circLRP6 on high glucose-induced renal tubular epithelial cell injury via miR-31-5p/HMGA1 axis regulation

XU Zhengrong, REN Weidong, GU Jun, ZHANG Zhiying, DENG Wenjuan, ZUO Lijuan  
(Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

**Abstract Objective** To analyze the effect of circLRP6 on high glucose-induced renal tubular epithelial cell injury via miR-31-5p/high mobility group protein A1 (HMGA1) axis regulation. **Methods** Human renal tubular epithelial HK-2 cells were cultured in vitro and divided into eight groups: control, high glucose, high glucose+si-NC, high glucose+si-circLRP6, high glucose+si-circLRP6+miR-NC, high glucose+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor, high glucose+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor+si-NC, and high glucose+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor+si-HMGA1. The circLRP6, miR-31-5p, and HMGA1 mRNA levels were determined using real-time quantitative PCR. Cell supernatant IL-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels, lactate dehydrogenase (LDH) activity, and malondialdehyde (MDA) content were also determined. Furthermore, flow cytometry was used to observe cell apoptosis. HMGA1, Bax, and Bcl-2 protein expression was detected by Western blotting. Finally, dual luciferase assay was used to report the targeting relationship of miR-31-5p with circLRP6 and HMGA1. **Results** Compared with the high glucose group, the HK-2 cell proliferation inhibition rate; cell supernatant IL-6, TNF- $\alpha$ , LDH, and MDA levels; apoptosis rate; and Bax protein expression in the high glucose+si-circLRP6 group decreased significantly, whereas Bcl-2 protein expression increased significantly (all  $P < 0.05$ ). Consequently, miR-31-5p downregulation possibly weakened the protective effect of si-circLRP6 on high glucose-induced renal tubular epithelial cell injury. HMGA1 expression inhibition reversed the effect of the

基金项目:河北省医学科学研究课题计划(20190879);张家口市科技计划自筹经费项目(2322045D)

作者简介:许峥嵘(1981-),女,副主任医师,硕士。

通信作者:许峥嵘, E-mail: xuzhengrong3@126.com

收稿日期:2023-05-26

网络出版时间:2024-03-04 18:04:29

si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor on high glucose-induced renal tubular epithelial cell injury. Finally, miR-31-5p exhibited a targeting relationship with circLRP6 and HMGA1. **Conclusion** Si-circLRP6 protects high glucose-induced renal tubular epithelial cell injury via miR-31-5p upregulation and HMGA1 expression inhibition.

**Keywords** high glucose; renal tubule; circLRP6; miR-31-5p; high mobility group protein A1

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病控制不佳导致蛋白尿与肾小球滤过率进行性降低,是糖尿病的严重并发症<sup>[1]</sup>。随着社会的进步、饮食结构的改变, DN已成为我国终末期肾病的第2位原因。DN的发病机制是DN的研究重点,有助于临床控制DN肾脏损伤。微RNA(microRNA, miRNA)可能通过影响肾小管上皮细胞的凋亡参与DN的发展<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>报道, miR-31-5p升高可抑制高糖诱导的人系膜细胞生长、炎症、细胞外积累以及氧化应激。高迁移率族蛋白A1(high mobility group protein A1, HMGA1)在DN中发挥重要作用,可调节DN小鼠肾小管上皮-间充质转化<sup>[4]</sup>。生物信息学分析显示, miR-31-5p与HMGA1存在结合位点, miR-31-5p/HMGA1可能是调控DN的一个方向。环状RNA(circular RNA, circRNA)主要通过和miRNA竞争性结合调控靶基因发挥作用,并参与DN的进展。circLRP6在DN中表达异常,且生物信息学分析显示circLRP6与miR-31-5p存在结合位点。因此,本研究以高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤模拟体内DN损伤,分析circLRP6对高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤的影响,并分析其潜在机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞与主要试剂

人肾小管上皮细胞HK-2, 购自美国ATCC细胞库; 白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )试剂盒, 购自上海酶联生物科技有限公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒, 购自上海碧云天生物技术有限公司; HMGA1、Bax、Bcl-2、GAPDH兔抗、羊抗兔IgG二抗, 购自英国Abcam公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 分组: 体外培养HK-2细胞, 常规传代, 取对数生长期HK-2细胞, 分为对照组、高糖组、高糖+si-NC组、高糖+si-circLRP6组、高糖+si-circLRP6+miR-NC

组、高糖+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor组、高糖+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor+si-NC组、高糖+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor+si-HMGA1组。对照组置于含5.5 mmol/L葡萄糖的DMEM培养基内培养, 其余各组置于含25 mmol/L葡萄糖的DMEM培养基内培养, 并通过Lipofectamine 2000将相应质粒转染至HK-2细胞内, 培养基内培养。

1.2.2 HK-2细胞circLRP6、miR-31-5p、HMGA1 mRNA水平检测: 采用TRIzol法提取各组细胞中总RNA, 反转录后进行cDNA扩增, 程序设定为95 °C, 30 s(预变性); 95 °C, 5 s(变性), 55 °C, 10 s(退火), 72 °C, 15 s(延伸), 共40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析circLRP6、miR-31-5p、HMGA1 mRNA表达情况, 以GAPDH作为circLRP6、HMGA1 mRNA的内参, 以U6作为miR-31-5p的内参。引物序列: circLRP6, 正向5'-CAAGATTGAGGCAGGCAGTG-3', 反向5'-GCTCCAGTCAGTCCAGTACA-3'; HMGA1, 正向5'-ATGAACTCCGAAGCCAGCC-3', 反向5'-CCTTCCTAGGTCTGCCTCTTG-3'; GAPDH, 正向5'-TGTTCGTCATGGCTGTGAA-3', 反向5'-ATGGCATGGACTGTGGTCAT-3'; miR-31-5p, 正向5'-CCCTCGAGACATTTGAAAGCCATTA-3', 反向5'-GCCGTCGACAGGTTGAGCGAGCGAAG-3'; U6, 正向5'-TGCGGGTGCTCGCTTCGGCAG-3', 反向5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'。

1.2.3 细胞上清液IL-6水平、TNF- $\alpha$ 水平、LDH活性、MDA含量测定: 收集各组细胞培养上清液, 按照ELISA试剂盒说明书检测IL-6、TNF- $\alpha$ 水平; 硫代巴比妥酸法检测MDA含量; LDH试剂盒检测LDH活性。

1.2.4 细胞凋亡率的测定: 收集各组细胞, 胰酶消化后, 以 $5 \times 10^5$ /mL的浓度重悬于500  $\mu$ L 1 $\times$ 膜联蛋白结合缓冲液中, 加入Annexin V-FITC (5  $\mu$ L) 和碘化丙啶(10  $\mu$ L) 避光孵育15 min, 流式细胞仪观察细胞凋亡情况。

1.2.5 Western blotting检测蛋白水平: 用RIPA裂解液裂解各组HK-2细胞后, BCA法测定总蛋白浓度, SDS-PAGE分离并转膜, 脱脂牛奶封闭1 h后, 加入

兔抗GAPDH (1 : 5 000)、HMGA1 (1 : 1 000)、Bax (1 : 1 000)、Bcl-2 (1 : 1 000) —抗孵育 (4 °C) 过夜, 隔日加入羊抗兔二抗 (1 : 4 000) 孵育2 h, 用蛋白凝胶成像仪定量分析蛋白含量。

1.2.6 双荧光素酶报告基因实验: Starbase网站 (<https://rnasysu.com/encori/>) 预测miR-31-5p与circLRP6、HMGA1的结合位点。构建circLRP6野生型 (circLRP6 WT) 和突变型质粒 (circLRP6 MUT) 以及HMGA1野生型 (HMGA1 WT) 和突变型质粒 (HMGA1 MUT), 分别与mimic NC、miR-31-5p mimic共转染至HK-2细胞, 分为mimic NC+circLRP6 WT组 (circLRP6 WT与mimic NC共转染)、miR-31-5p mimic+circLRP6 WT组 (circLRP6 WT与miR-31-5p mimic共转染)、mimic NC+circLRP6 MUT组 (circLRP6 MUT与mimic NC共转染)、miR-31-5p mimic+circLRP6 MUT组 (circLRP6 MUT与miR-31-5p mimic共转染)、mimic NC+HMGA1 WT组 (HMGA1 WT与mimic NC共转染)、miR-31-5p mimic+HMGA1 WT组 (HMGA1 WT与miR-31-5p mimic共转染)、mimic NC+HMGA1 MUT组 (HMGA1 MUT与mimic NC共转染)、miR-31-5p mimic+HMGA1 MUT组 (HMGA1 MUT与miR-31-5p mimic共转染), 48 h后测定荧光素酶活性。实时定量PCR测定沉默si-circLRP6后circLRP6与miR-31-5p水平 (si-NC组、si-circLRP6组), 实时定量PCR和Western blotting测定miR-31-5p过表达对HMGA1 mRNA和蛋白表达的影响 (mimic NC组、miR-31-5p mimic组)。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 21.0软件进行统计分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 2组间比较采用t检验, 多组间比较采用单因素方差分析和SNK-q检验。P < 0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 circLRP6在高糖诱导的HK-2细胞中的表达

与对照组相比, 高糖组HK-2细胞中circLRP6表达水平升高 ( $1.01 \pm 0.09$ 和 $1.97 \pm 0.21$ ,  $P < 0.05$ )。

### 2.2 各组HK-2细胞增殖抑制率、炎性细胞因子水平、LDH活性和MDA含量的比较

与对照组相比, 高糖组HK-2细胞增殖抑制率、细胞上清液IL-6水平、TNF- $\alpha$ 水平、LDH活性、MDA含量均升高 ( $P < 0.05$ ); 与高糖组相比, 高糖+si-circLRP6组HK-2细胞增殖抑制率、细胞上清液IL-6水平、TNF- $\alpha$ 水平、LDH活性、MDA含量均降低 ( $P < 0.05$ ); 与高糖+si-circLRP6组相比, 高糖+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor组HK-2细胞增殖抑制率、细胞上清液IL-6水平、TNF- $\alpha$ 水平、LDH活性、MDA含量均升高 ( $P < 0.05$ ); 与高糖+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor组相比, 高糖+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor+si-HMGA1组HK-2细胞增殖抑制率、细胞上清液IL-6水平、TNF- $\alpha$ 水平、LDH活性、MDA含量均降低 ( $P < 0.05$ ), 见表1。

### 2.3 各组HK-2细胞凋亡情况

与对照组相比, 高糖组HK-2细胞凋亡率、Bax蛋白表达升高, Bcl-2蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ); 与高

表1 各组HK-2细胞增殖抑制率、LDH活性、IL-6和TNF- $\alpha$ 水平以及MDA含量的比较

Tab.1 Inhibition rate of HK-2 cell proliferation; lactate dehydrogenase (LDH) activity; interleukin (IL) -6 and tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  levels; and malondialdehyde (MDA) content in each group

Group	Proliferation inhibition rate (%)	IL-6 (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	LDH ( $\times 10^3$ U/L)	MDA ( $\mu$ mol/L)
Control	0.00	71.33 $\pm$ 8.84	13.25 $\pm$ 1.65	22.06 $\pm$ 2.75	1.14 $\pm$ 0.14
High glucose	46.52 $\pm$ 5.81 <sup>1)</sup>	222.69 $\pm$ 27.82 <sup>1)</sup>	54.37 $\pm$ 6.79 <sup>1)</sup>	43.52 $\pm$ 5.44 <sup>1)</sup>	2.97 $\pm$ 0.37 <sup>1)</sup>
High glucose+si-NC	44.58 $\pm$ 5.97	220.58 $\pm$ 27.57	54.92 $\pm$ 6.86	43.74 $\pm$ 5.46	3.02 $\pm$ 0.37
High glucose+si-circLRP6	25.97 $\pm$ 2.74 <sup>2)</sup>	144.61 $\pm$ 18.07 <sup>2)</sup>	21.69 $\pm$ 2.71 <sup>2)</sup>	28.72 $\pm$ 3.59 <sup>2)</sup>	1.75 $\pm$ 0.21 <sup>2)</sup>
High glucose+si-circLRP6+miR-NC	25.81 $\pm$ 2.69	145.05 $\pm$ 18.13	21.84 $\pm$ 2.73	28.93 $\pm$ 3.61	1.77 $\pm$ 0.22
High glucose+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor	35.29 $\pm$ 3.77 <sup>3)</sup>	192.97 $\pm$ 24.12 <sup>3)</sup>	40.58 $\pm$ 5.07 <sup>3)</sup>	39.65 $\pm$ 4.95 <sup>3)</sup>	2.64 $\pm$ 0.33 <sup>3)</sup>
High glucose+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor+si-NC	34.68 $\pm$ 3.01	193.05 $\pm$ 24.13	40.60 $\pm$ 5.07	39.71 $\pm$ 4.96	2.65 $\pm$ 0.33
High glucose+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor+si-HMGA1	28.22 $\pm$ 2.89 <sup>4)</sup>	153.24 $\pm$ 19.15 <sup>4)</sup>	29.76 $\pm$ 3.72 <sup>4)</sup>	31.38 $\pm$ 3.92 <sup>4)</sup>	1.94 $\pm$ 0.24 <sup>4)</sup>

1) P < 0.05 vs. control group; 2) P < 0.05 vs. high glucose group; 3) P < 0.05 vs. high glucose+si-circLRP6 group; 4) P < 0.05 vs. high glucose+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor group.

糖组相比,高糖+si-circLRP6组HK-2细胞凋亡率、Bax蛋白表达降低,Bcl-2蛋白表达升高( $P < 0.05$ );与高糖+si-circLRP6组相比,高糖+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor组HK-2细胞凋亡率、Bax蛋白表达升高,Bcl-2蛋白表达降低( $P < 0.05$ );与高糖+si-circ-

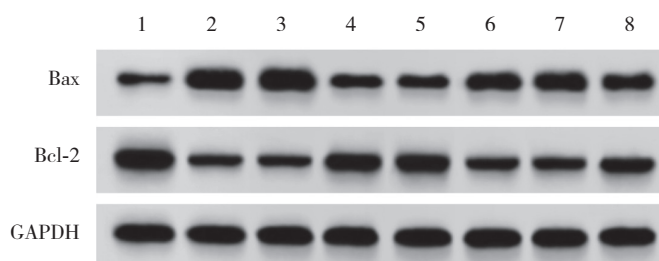
LRP6+miR-31-5p inhibitor组相比,高糖+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor+si-HMGA1组HK-2细胞凋亡率、Bax蛋白表达降低,Bcl-2蛋白表达升高( $P < 0.05$ ),见表2、图1。

#### 2.4 miR-31-5p与circLRP6的靶向关系

表2 各组HK-2细胞凋亡情况的比较  
Tab.2 Comparison of apoptosis of HK-2 cells in each group

Group	Apoptosis rate (%)	Bax	Bcl-2
Control	5.96 ± 0.74	0.28 ± 0.03	1.24 ± 0.15
High glucose	34.97 ± 4.37 <sup>1)</sup>	1.42 ± 0.17 <sup>1)</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>1)</sup>
High glucose+si-NC	34.81 ± 4.35	1.43 ± 0.17	0.26 ± 0.03
High glucose+si-circLRP6	12.64 ± 1.58 <sup>2)</sup>	0.44 ± 0.05 <sup>2)</sup>	0.94 ± 0.11 <sup>2)</sup>
High glucose+si-circLRP6+miR-NC	12.58 ± 1.57	0.45 ± 0.05	0.93 ± 0.11
High glucose+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor	24.91 ± 3.11 <sup>3)</sup>	0.97 ± 0.12 <sup>3)</sup>	0.37 ± 0.04 <sup>3)</sup>
High glucose+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor+si-NC	24.76 ± 3.09	0.96 ± 0.12	0.38 ± 0.04
High glucose+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor+si-HMGA1	15.63 ± 1.95 <sup>4)</sup>	0.75 ± 0.09 <sup>4)</sup>	0.64 ± 0.08 <sup>4)</sup>

1)  $P < 0.05$  vs. control group; 2)  $P < 0.05$  vs. high glucose group; 3)  $P < 0.05$  vs. high glucose+si-circLRP6 group; 4)  $P < 0.05$  vs. high glucose+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor group.



1, control group; 2, high glucose group; 3, high glucose+si-NC group; 4, high glucose+si-circLRP6 group; 5, high glucose+si-circLRP6+miR-NC group; 6, high glucose+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor group; 7, high glucose+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor+si-NC group; 8, high glucose+si-circLRP6+miR-31-5p inhibitor+si-HMGA1 group.

图1 各组HK-2细胞中Bax和Bcl-2蛋白的表达情况

Fig.1 Bax and Bcl-2 protein expression in HK-2 cells of each group

Starbase网站预测显示,miR-31-5p与circLRP6存在结合位点(图2)。miR-31-5p mimic+circLRP6 WT组荧光素酶活性较mimic NC+circLRP6 WT组低( $0.35 \pm 0.02$ 和 $1.02 \pm 0.09$ ,  $P < 0.05$ ),mimic NC+circLRP6 MUT组与miR-31-5p mimic+circLRP6 MUT组比较,荧光素酶活性的差异无统计学意义( $1.02 \pm 0.10$ 和 $1.03 \pm 0.10$ ,  $P > 0.05$ )。与si-NC组相比,circLRP6组circLRP6表达降低( $0.33 \pm 0.04$ 和 $1.01 \pm 0.12$ ,  $P < 0.05$ ),miR-31-5p表达升高( $2.96 \pm 0.37$ 和 $1.02 \pm 0.12$ ,  $P < 0.05$ )。

#### 2.5 miR-31-5p与HMGA1的靶向关系

Starbase网站预测显示,miR-31-5p与HMGA1存在结合位点(图3)。miR-31-5p mimic+HMGA1 WT组荧光素酶活性较mimic NC+HMGA1 WT组低( $0.32 \pm 0.05$ 和 $1.13 \pm 0.21$ ,  $P < 0.05$ ),mimic NC+HMGA1 MUT组与miR-31-5p mimic+HMGA1 MUT组比较,荧光素酶活性的差异无统计学意义( $1.10 \pm 0.10$ 和 $1.08 \pm 0.19$ ,  $P > 0.05$ )。与mimic NC组相比,miR-31-5p mimic组HMGA1 mRNA水平( $0.40 \pm 0.05$ 和 $1.01 \pm 0.12$ ,  $P < 0.05$ )和蛋白表达水平( $0.37 \pm 0.04$ 和 $0.89 \pm 0.11$ ,  $P < 0.05$ )降低。见图4。

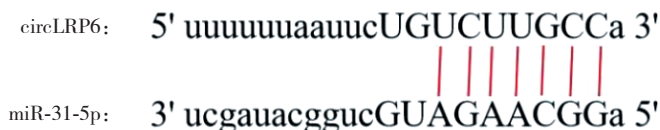


图2 Starbase网站预测miR-31-5p与circLRP6结合位点

Fig.2 miR-31-5p and circLRP6 binding sites predicted by the Starbase website

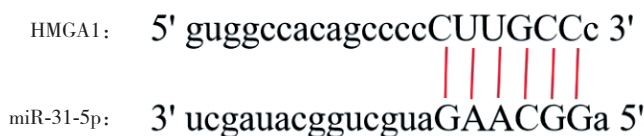
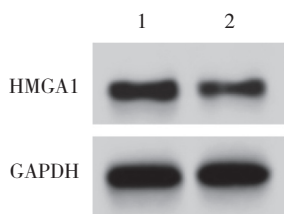


图3 Starbase网站预测miR-31-5p与HMGA1结合位点

Fig.3 miR-31-5p and HMGA1 binding sites predicted by the Starbase website



1, mimic NC group; 2, miR-31-5p mimic group.

图4 miR-31-5p过表达对HMGA1蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of miR-31-5p overexpression on HMGA1 protein expression

### 3 讨论

DN与肾小管病变和肾功能损伤关系密切,肾小管上皮细胞丢失是肾小管病变的原因之一<sup>[5]</sup>。在糖尿病中,长期的高糖刺激会诱导肾小管上皮细胞损伤,导致肾功能障碍。用高糖处理肾小管上皮细胞能模拟体内高糖诱导的肾小管损伤环境<sup>[6]</sup>。本研究中,高糖处理后HK-2细胞的增殖抑制率、凋亡率升高,证明成功构建HK-2细胞损伤模型。

circRNA可作为miRNA海绵介导下游基因表达,参与DN的发生、发展。研究<sup>[7]</sup>报道,circLRP6在高糖诱导的系膜细胞中上调。本研究中,高糖诱导的HK-2细胞中circLRP6水平升高,下调circLRP6表达后,HK-2细胞的增殖抑制率、凋亡率降低,提示circLRP6可能为肾小管上皮细胞的有害因子,可能是DN治疗的靶点之一。DN患者中肾小管上皮细胞损伤与炎症和氧化应激有关。炎症在DN的肾小管上皮细胞损伤中占据重要地位,IL-6、TNF-α等炎性因子

的产生会进一步诱导细胞凋亡的发生。此外,细胞内氧自由基累积增加时会引发细胞膜脂质过氧化,细胞膜完整性被破坏,细胞内LDH等毒性物质流出,MDA作为脂质过氧化产物可反映细胞氧化应激损伤程度<sup>[8]</sup>。本研究中,circLRP6沉默可降低HK-2细胞上清液中IL-6、TNF-α、LDH、MDA水平,提示circ-LRP6沉默可能通过抑制氧化应激和炎症反应,减轻高糖诱导的HK-2细胞损伤。

研究<sup>[9]</sup>显示,miR-31-5p在DN患者体内表达降低。在高糖诱导的足细胞损伤模型中,miR-31-5p低表达<sup>[10]</sup>。此外,miR-31-5p在高糖诱导的系膜细胞损伤中低表达,上调miR-31-5p表达可抑制高糖诱导的系膜细胞增殖、炎症和氧化应激<sup>[5]</sup>。以上研究表明,miR-31-5p在DN中发挥保护作用。本研究中,miR-31-5p抑制剂可减弱circLRP6沉默对高糖诱导的HK-2细胞损伤的保护作用,且双荧光素酶报告基因实验证实circLRP6与miR-31-5p存在靶向调控关系,提示circLRP6沉默可能通过上调miR-31-5p表达发挥对HK-2的保护作用。

HMGA1是广泛分布于细胞核内的非组蛋白,广泛调节DNA复制、转录、基因表达调控等<sup>[11-12]</sup>。研究<sup>[13]</sup>报道,HMGA1是胰岛素受体基因的重要调节因子,也是2型糖尿病发展的危险因素,在链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠中,主动脉组织中HMGA1水平显著上调和积累,在体外,高糖会增加HMGA1的表达并促进血管平滑肌细胞增殖。WU等<sup>[14]</sup>的研究显示,HMGA1在糖尿病小鼠心脏和高糖刺激的心肌

细胞中上调,其过表达加速了高糖诱导的心肌细胞炎症和细胞凋亡,并加重了糖尿病小鼠心脏功能障碍,而HMGA1敲低可减轻心肌细胞对高糖诱导的炎症和细胞凋亡的反应。在本研究中,双荧光素酶报告基因实验证实miR-31-5p与HMGA1存在靶向结合,且miR-31-5p过表达可显著降低HMGA1 mRNA和蛋白表达,提示circLRP6沉默可能通过miR-31-5p/HMGA1发挥对HK-2的保护作用。下调HMGA1表达恢复了miR-31-5p抑制剂对circLRP6沉默在高糖诱导的HK-2细胞损伤中的逆转作用。

综上所述,沉默circLRP6可能通过上调miR-31-5p、抑制HMGA1表达对高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤发挥保护作用。本研究为DN药物的研发及基因靶向治疗提供了一定参考。但是,在高糖诱导的HK-2细胞损伤中circLRP6上调的分子机制尚不明确,有待后续进行进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 路琪,李菲菲,孙虹燕. 薯蓣皂苷对糖尿病肾病大鼠TLR4/NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$ 通路及肾间质淋巴细胞浸润的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(7): 816-821. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2022.07.008.
- [2] PENG F, GONG W, LI S, et al. circRNA\_010383 acts as a sponge for miR-135a, and its downregulated expression contributes to renal fibrosis in diabetic nephropathy [J]. Diabetes, 2021, 70(2): 603-615. DOI: 10.2337/db20-0203.
- [3] SUN A, SUN N, LIANG X, et al. Circ-FBXW12 aggravates the development of diabetic nephropathy by binding to miR-31-5p to induce LIN28B [J]. Diabetol Metab Syndr, 2021, 13(1): 141. DOI: 10.1186/s13098-021-00757-x.
- [4] 吴静,高永棣,俞佳丽,等. HMG1在糖尿病肾病小鼠肾小管上皮-间充质转化中的作用[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2019, 35(8): 697-702. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2019.08.009.
- [5] 郭晓媛,张程斐,吴悠,等. 滋肾丸对糖尿病肾病小鼠肾小管上皮细胞焦亡及上皮-间充质转化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21): 27-36. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20212003.
- [6] 王殿云,卢聪聪,范国霞. 桃叶珊瑚苷通过调控miR-30a-5p表达对高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(4): 415-420. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2021.04.007.
- [7] CHEN B, LI Y, LIU Y, et al. circLRP6 regulates high glucose-induced proliferation, oxidative stress, ECM accumulation, and inflammation in mesangial cells [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11): 21249-21259. DOI: 10.1002/jcp.28730.
- [8] HUANG J, CHEN G, WANG J, et al. Platycodin D regulates high glucose-induced ferroptosis of HK-2 cells through glutathione peroxidase 4 (GPX4) [J]. Bioengineered, 2022, 13(3): 6627-6637. DOI: 10.1080/21655979.2022.2045834.
- [9] ROVIRA-LLOPIS S, ESCRIBANO-LOPEZ I, DIAZ-MORALES N, et al. Downregulation of miR-31 in diabetic nephropathy and its relationship with inflammation [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 50(3): 1005-1014. DOI: 10.1159/000494485.
- [10] FANG R, CAO X, ZHU Y, et al. Hsa\_circ\_0037128 aggravates high glucose-induced podocytes injury in diabetic nephropathy through mediating miR-31-5p/KLF9 [J]. Autoimmunity, 2022, 55(4): 254-263. DOI: 10.1080/08916934.2022.2037128.
- [11] HARADA Y, OHE K. High-mobility group A1 proteins may be involved in estrogen receptor status of breast cancer [J]. Transl Cancer Res, 2020, 9(6): 3784-3786. DOI: 10.21037/ter-20-1921.
- [12] PULLINGER CR, GOLDFINE ID, TANYOLAÇ S, et al. Evidence that an HMGA1 gene variant associates with type 2 diabetes, body mass index, and high-density lipoprotein cholesterol in a Hispanic-American population [J]. Metab Syndr Relat Disord, 2014, 12(1): 25-30. DOI: 10.1089/met.2013.0086.
- [13] ZHANG Q, CHEN L, ZHAO Z, et al. HMGA1 mediated high-glucose-induced vascular smooth muscle cell proliferation in diabetes mellitus: association between PI3K/Akt signaling and HMGA1 expression [J]. DNA Cell Biol, 2018, 37(4): 389-397. DOI: 10.1089/dna.2017.3957.
- [14] WU QQ, LIU C, CAI Z, et al. High-mobility group AT-hook 1 promotes cardiac dysfunction in diabetic cardiomyopathy via autophagy inhibition [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(3): 160. DOI: 10.1038/s41419-020-2316-4.

(编辑 陈 姜)