

抑制微RNA-30d-5p促进线粒体自噬缓解高糖作用下的足细胞损伤

蔡莹, 陈生, 蒋晓立, 邬启元, 郭蓓, 王芳

宁波市医疗中心李惠利医院肾内科, 浙江宁波 315000

[摘要] 目的: 探讨微RNA(miR)-30d-5p在高糖诱导下足细胞损伤中的作用。方法: 采用30 mmol/L葡萄糖诱导足细胞高糖化, 使用miR-30d-5p抑制剂和模拟物转染, 再经1 mg/mL 3-甲基腺嘌呤(3-MA)处理。定量逆转录聚合酶链反应检测miR-30d-5p的转染效率; 流式细胞术检测细胞凋亡; 蛋白质印迹法检测肾病蛋白、微管相关蛋白轻链(LC)3 II/LC3 I、P62、自噬相关基因(ATG)5蛋白、PTEN诱导假定激酶(PINK)1和Parkin基因(PARK2)蛋白表达。JC-1作为荧光探针检测线粒体膜电位, 通过相关试剂盒检测细胞中的三磷酸腺苷(ATP)含量。结果: 在高糖诱导下, 足细胞凋亡增加, miR-30d-5p和P62表达上调, 肾病蛋白、ATG5、PINK1、PARK2和LC3 II/LC3 I表达水平降低(均 $P<0.01$)。miR-30d-5p抑制剂部分逆转了高糖对足细胞凋亡以及ATG5、PINK1、PARK2、肾病蛋白、LC3 II/LC3 I和P62表达的影响(均 $P<0.01$)。高糖诱导足细胞线粒体膜电位流失、ATP含量减少, 抑制miR-30d-5p后能增加膜电位和ATP含量(均 $P<0.05$)。自噬抑制剂3-MA和miR-30d-5p模拟物可逆转miR-30d-5p抑制对高糖诱导的足细胞凋亡、自噬和线粒体功能的影响(均 $P<0.05$)。结论: 抑制miR-30d-5p可能通过促进ATG5、PINK1、PARK2的表达促进线粒体自噬, 进而缓解高糖诱导的足细胞损伤。



[关键词] 糖尿病肾病; miR-30d-5p; 高糖; 足细胞; 细胞凋亡; 自噬; 线粒体功能

[中图分类号] R587.2 [文献标志码] A

Inhibition of miR-30d-5p promotes mitochondrial autophagy and alleviates high glucose-induced injury in podocytes

CAI Ying, CHEN Sheng, JIANG Xiaoli, WU Qiyuan, GUO Bei, WANG Fang (Department of Nephrology, Ningbo Medical Center Lihuli Hospital, Ningbo 315000, Zhejiang Province, China)

Corresponding author: WANG Fang, E-mail: wangffff222@163.com, <https://orcid.org/0009-0009-0005-1642-1082>

收稿日期(Received): 2024-09-11 接受日期(Accepted): 2024-11-11 网络预发表日期(Online): 2024-12-06

基金项目(Funding): 宁波市自然科学基金(2021J282)

第一作者(First author): 蔡莹, 副主任医师, 主要从事肾脏病学研究; E-mail: caiying_cy1@163.com; <https://orcid.org/0009-0005-1642-1082>

通信作者(Corresponding author): 王芳, 副主任医师, 主要从事慢性肾脏病研究; E-mail: wangffff222@163.com; <https://orcid.org/0009-0002-7569-445X>

0002-7569-445X

[**Abstract**] **Objective:** To study the role of microRNA (miR)-30d-5p in high glucose-induced podocyte injury. **Methods:** Podocytes were hyperglycated with 30 mmol/L glucose, transfected with miR-30d-5p inhibitor and mimic, and then treated with 1 mg/mL 3-methyladenine (3-MA). The transfection efficiency of miR-30d-5p was quantified by reverse transcription PCR. Apoptosis was detected by flow cytometry. The expressions of nephrin, microtubule-associated protein light chain (LC) 3Ⅱ/LC3I, P62, autophagy-related gene (ATG) 5, PTEN induced putative kinase (PINK) 1 and Parkin gene (PARK2) were detected by Western blotting. The mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 fluorescent probe, and adenosine triphosphate (ATP) content in cells was detected by relevant kits. **Results:** Under high glucose induction, podocyte apoptosis increased, miR-30d-5p and P62 expressions were upregulated, while nephrin, ATG5, PINK1, PARK2 and LC3Ⅱ/LC3Ⅰ expressions decreased (all $P<0.01$). MiR-30d-5p inhibitor reversed the effect of high glucose on apoptosis, and the expression of ATG5, PINK1, PARK2, nephrin, LC3Ⅱ/LC3Ⅰ and P62 (all $P<0.01$). High glucose induced loss of mitochondrial membrane potential and ATP content in podocytes, while inhibition of miR-30d-5p increased them. Autophagy inhibitors 3-MA and miR-30d-5p mimics reversed the effects of miR-30d-5p inhibition on apoptosis, autophagy and mitochondrial function of podocytes induced by high glucose (all $P<0.05$). **Conclusions:** Inhibition of miR-30d-5p may promote mitochondrial autophagy (mitophagy) by promoting the expression of ATG5, PINK1, PARK2 and alleviating high glucose-induced podocyte damage.

[**Key words**] Diabetic nephropathy; MicroRNA-30d-5p; High glucose; Podocytes; Apoptosis; Autophagy; Mitochondrial function

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2024, 53(6): 756-764.]

[**缩略语**] 微RNA (microRNA, miRNA, miR); 杜尔贝科氏改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM); 微管相关蛋白轻链 (microtubule-associated protein light chain, LC); 自噬相关基因 (autophagy-related gene, ATG); PTEN 诱导假定激酶 (PTEN induced putative kinase, PINK); Parkin 基因 (Parkin gene, PARK); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH); 免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG); 三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP); 放射免疫沉淀法 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA); 增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL); 甲基腺嘌呤 (methyladenine, MA); 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR); 定量逆转录 PCR (quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR); 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC); SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE); 聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF); 含吐温-20 的 Tris 缓冲液 (Tris buffered saline with Tween-20, TBST); 长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA); X 染色体失活特异转录因子 (X inactive specific transcript, XIST)

糖尿病肾病是糖尿病的主要微血管并发症之一,也是终末期肾病发展最常见的原因^[1]。足细胞是高度特化的终末分化肾小球上皮细胞,在维持肾小球滤过屏障中起重要作用^[2]。高血糖造成的足细胞损伤是糖尿病肾病发展的因素之一^[3],其中线粒体损伤引发的足细胞凋亡是糖尿病肾病的主要危险因素^[4]。预防足细胞损伤或促进足细胞修复是糖尿病肾病的潜在治疗方法^[5]。然而,线粒体自噬功能与高血糖引起的足细胞损伤之间的详细关系目前仍不清楚。研究显示,miR-30d-5p参与多种疾病的发生,通过与DLEU2靶向结合调节舌鳞癌细胞增殖和凋亡^[6],可影响转化生长因子诱导的肾小管上皮细胞生长和迁移^[7]。微阵列分析表明,miRNA在糖尿病肾病的发病过程中发挥多种作用,包括调节炎症、凋亡、自噬和细胞增殖等^[8-9]。尽管越来越多的证据表明miR-30d-5p能够抑制多种细胞自噬的发生^[10-13],但其在足细胞线粒体自噬中的作用尚不清楚。本研究旨在探究高糖作用下抑制miR-30d-5p的表达对线粒体自噬缓解足细胞损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂及仪器

肾小球足细胞MPC5购买于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,细胞培养于含有10%胎牛血清、1%双抗、 1×10^4 U/L的 γ 干扰素的DMEM中,置于37℃、5%二氧化碳的培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。

一抗LC3(ab192890, 14 000/16 000)、P62(ab240635, 62 000)、ATG5(ab227084, 32 000)、PINK1(ab23707, 66 000)、PARK2(ab77924, 55 000)、肾病蛋白(ab216341, 38 000)、GAPDH(ab8245, 37 000)以及二抗山羊抗小鼠IgG(ab205719)和山羊抗兔IgG(ab205718)为英国Abcam公司产品;线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1, C2003S)、ATP检测试剂盒(S0026)和RIPA裂解缓冲液(P0013B)为上海碧云天生物技术有限公司产品;脂质体2000(11668019)和逆转录试剂盒(4366597/K1691)为美国Invitrogen公司产品;QuantiTect SYBR Green PCR试剂盒(204145)、QIAwave RNA Mini试剂盒(74534)和miRCURY LNA SYBR[®] Green PCR试剂盒(339345)为美国Qiagen公司产品。ECL蛋白质印迹试剂盒(35055)为美国Thermo Fisher

Scientific公司产品。DMEM高糖完全培养基(PM150210B)为武汉普诺赛生命科技有限公司产品。自噬抑制剂3-MA(HY-19312)为中国MedChemExpress公司产品;LabWorks图像采集和分析软件(TM ver4.6)为美国UVP公司产品。

ABI Prism7500快速实时PCR系统为美国Applied Biosystems公司产品;GloMax Muti JR检测系统为美国Promega公司产品;流式细胞仪为安诺伦(北京)生物科技有限公司产品。

1.2 细胞分组及培养方法

足细胞MPC5被分为11组,分别为空白对照组(5.5 mmol/L葡萄糖处理)、等渗对照组(5.5 mmol/L葡萄糖和24.5 mmol/L甘露醇处理)、高糖组(30.0 mmol/L葡萄糖处理)、miR-30d-5p抑制剂对照组(转染miR-30d-5p抑制剂对照且用30 mmol/L葡萄糖处理)、miR-30d-5p抑制剂组(转染miR-30d-5p抑制剂且用30 mmol/L葡萄糖处理)、miR-30d-5p抑制剂+3-MA组(转染miR-30d-5p抑制剂且用30 mmol/L葡萄糖和3-MA处理)、miR-30d-5p抑制剂对照+模拟物对照组(转染miR-30d-5p抑制剂对照和模拟物对照且用30 mmol/L葡萄糖处理)、miR-30d-5p抑制剂+模拟物对照组(转染miR-30d-5p抑制剂和模拟物对照且用30 mmol/L葡萄糖处理)、miR-30d-5p抑制剂+模拟物组(转染miR-30d-5p抑制剂和模拟物且用30 mmol/L葡萄糖处理)、miR-30d-5p抑制剂+模拟物对照+3-MA组(转染miR-30d-5p抑制剂和模拟物对照且用30 mmol/L葡萄糖和3-MA处理)、miR-30d-5p抑制剂+模拟物+3-MA组(细胞转染miR-30d-5p抑制剂和模拟物且用30 mmol/L葡萄糖和3-MA处理)。

1.3 细胞转染

miR-30d-5p抑制剂、miR-30d-5p抑制剂对照、miR-30d-5p模拟物和miR-30d-5p模拟物对照由苏州吉玛基因股份有限公司合成。转染试验用脂质体2000孵育细胞,qRT-PCR检测转染效率。MPC5细胞接种于培养基中培养过夜,当细胞生长融合度达到80%时开始转染试验。转染4 h后再进行后续处理。

1.4 qRT-PCR检测miR-30d-5p表达

通过QIAwave RNA Mini试剂盒从MPC5细胞系中分离总RNA。使用逆转录试剂盒将RNA逆转录成互补DNA。采用QuantiTect SYBR Green

PCR试剂盒或 miRCURY LNA SYBR[®] Green PCR 试剂盒进行 qRT-PCR 实验, qRT-PCR 在 ABI Prism7500 快速实时 PCR 系统中进行。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对 RNA 表达,以 U6 为 miR-30d-5p 的内参。涉及的引物序列如下:miR-30d-5p 正向引物为 5'-GCGTGTAACATCCCCGAC-3'; miR-30d-5p 反向引物为 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'; U6 正向引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3'; U6 反向引物为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

将细胞消化、离心并重悬于 1× 结合缓冲液中。然后,在细胞悬液 (2×10^6 /mL) 中加入 Annexin V-FITC 5 μ L, 室温避光孵育 10 min。然后加入 1× 结合缓冲液 2 mL, 在室温下 ($400 \sim 600$) $\times g$ 离心 5 min。弃上清液,加入 5 μ L 碘化丙啶,室温孵育 10 min。通过流式细胞仪检测细胞凋亡水平。细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.6 蛋白质印迹法检测凋亡和自噬相关蛋白表达

用 RIPA 裂解缓冲液制备总细胞裂解物。蛋白质通过 10% SDS-PAGE 凝胶分离,然后转移到 PVDF 膜。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 PVDF 膜。然后,将印迹与不同的一抗在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。与二抗共同孵育后,通过 ECL 蛋白质印迹试剂盒检测条带,并通过 Labworks 4.6 图像采集和分析软件分析,以 GAPDH 为对照。

1.7 JC-1 线粒体膜电位检测

取对数生长期的细胞接种于六孔板 (1.5×10^5 个/孔),经转染换液,继续培养 24 h,吸除培养液,磷酸盐缓冲液洗涤细胞两次,按照 JC-1 检测试剂盒进行操作。30 min 内用荧光显微镜观察拍照。

1.8 萤火虫荧光素酶法检测细胞 ATP 含量

按照萤火虫荧光素酶 ATP 检测试剂盒说明测量细胞 ATP 水平。将细胞与磷酸盐缓冲液共同孵育,置于 1.5 mL EP 管中,并置于冰上防止酶降解。然后,将细胞在 4 $^{\circ}$ C 下 $1000 \times g$ 离心 5 min。接着,将 100 μ L 上清液与 100 μ L ATP 检测工作稀释液在 1.5 mL EP 管中混合。最后,使用 GloMax Muti JR 检测系统测量荧光强度,ATP 含量与荧光强度呈线性关系。根据荧光强度的变化计算 ATP 水平。

1.9 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-30d-5p 的靶基因

使用 Starbase (<https://starbase.sysu.edu.cn/index.php>) 网站预测 miR-30d-5p 的靶基因,且通过双

荧光素酶报告基因实验验证 miR-30d-5p 与靶基因的靶向关系。将含有与 miR-30d-5p 存在结合位点的 ATG5 野生型序列或含有 miR-30d-5p 结合位点的突变型序列克隆到 pGL3 荧光素酶报告载体,构建 ATG5 野生型或 ATG5 突变型荧光素酶报告质粒。然后,使用脂质体 2000 转染试剂将 ATG5 野生型、ATG5 突变型分别与 miR-30d-5p 模拟物、模拟物对照共转染足细胞,在转染 48 h 后测定各组细胞荧光素酶活性。

1.10 统计学方法

采用 Graphpad 8.0 软件进行统计分析。计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述,多组间比较采用单因素方差分析,两组比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-30d-5p 抑制剂转染成功

与空白对照组 (1.00 ± 0.06) 和 miR-30d-5p 抑制剂对照组 (1.02 ± 0.09) 比较,miR-30d-5p 抑制剂组 miR-30d-5p 表达水平降低 (0.52 ± 0.05 , 均 $P < 0.01$),提示 miR-30d-5p 抑制剂转染成功。

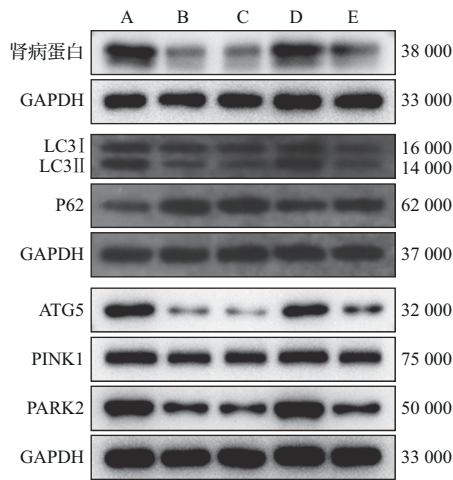
2.2 高糖促进足细胞 miR-30d-5p 表达

与空白对照组 (1.00 ± 0.08) 比较,等渗对照组 miR-30d-5p 表达量 (1.04 ± 0.09) 无差异 ($P > 0.05$),而高糖组 miR-30d-5p 表达量上调 (3.11 ± 0.31 , $P < 0.01$),提示高糖可以上调 miR-30d-5p 表达水平。

2.3 抑制 miR-30d-5p 表达可缓解高糖诱导的足细胞损伤和线粒体功能损伤

与空白对照组比较,高糖诱导下足细胞凋亡增加,凋亡相关蛋白肾病蛋白和自噬相关蛋白 LC3II/LC3I 表达减少, P62 表达增加 (均 $P < 0.01$); 抑制 miR-30d-5p 表达后足细胞凋亡减少,肾病蛋白、LC3II/LC3I 表达增加, P62 表达减少 (均 $P < 0.01$); 而 3-MA 可逆转 miR-30d-5p 抑制剂对细胞凋亡及自噬相关蛋白表达水平的影响 (均 $P < 0.01$), 见图 1、附图 1 和表 1。结果提示,抑制 miR-30d-5p 表达可促进细胞自噬,抑制足细胞凋亡,但这种作用可被自噬抑制剂逆转。

进一步检测发现,高糖诱导下线粒体自噬相关蛋白 ATG5、PINK1 和 PARK2 表达减少 (均 $P < 0.01$),线粒体膜电位流失 ($P < 0.05$),ATP 含量减少 ($P < 0.01$); 抑制 miR-30d-5p 表达后 ATG5、PINK1



A:空白对照组;B:高糖组;C:miR-30d-5p抑制剂对照组;D:miR-30d-5p抑制剂组;E:miR-30d-5p抑制剂+3-MA组。miR:微RNA;MA:甲基腺嘌呤;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;LC:微管相关蛋白轻链;ATG:自噬相关基因;PINK:PTEN诱导假定激酶;PARK:Parkin基因。

图1 抑制miR-30d-5p表达后足细胞凋亡和自噬相关蛋白电泳图

Figure 1 Electrophoretogram of apoptosis and autophagy-related proteins in podocytes after down-regulating miR-30d-5p expression

和PARK2表达增加(均 $P<0.01$),膜电位聚合增加($P<0.05$),ATP含量增加($P<0.01$);而3-MA可逆转miR-30d-5p抑制剂对线粒体自噬相关蛋白表达、膜电位和ATP含量的影响(均 $P<0.01$),见图1、2和表1。结果提示,抑制miR-30d-5p表达可缓解高糖诱导的线粒体功能损伤,但这种作用可被自噬抑制剂逆转。

2.4 上调miR-30d-5p减弱其抑制剂对高糖诱导的足细胞损伤和线粒体功能损伤的影响

与miR-30d-5p抑制剂+模拟物对照比较,miR-30d-5p抑制剂+模拟物诱导足细胞凋亡增加,凋亡相关蛋白肾蛋白和自噬相关蛋白LC3II/LC3I表达减少,P62表达增加

(均 $P<0.01$);3-MA协同促进miR-30d-5p模拟物对细胞凋亡及自噬相关蛋白表达水平的影响($P<0.05$),见附图2、图3和表2。结果提示,miR-30d-5p模拟物协同自噬抑制剂可减弱miR-30d-5p抑制剂对足细胞凋亡和细胞自噬的影响。

进一步检测发现,miR-30d-5p模拟物诱导线粒体自噬相关蛋白ATG5、PINK1和PARK2表达减少(均 $P<0.01$),线粒体膜电位流失($P<0.05$),ATP含量减少($P<0.01$);3-MA协同促进miR-30d-5p模拟物对线粒体自噬相关蛋白表达、膜电位和ATP含量的影响($P<0.01$),见图3、4和表2。结果提示,miR-30d-5p模拟物协同自噬抑制剂可减弱miR-30d-5p抑制剂对线粒体功能损伤的影响。

2.5 miR-30d-5p能靶向ATG5

Starbase网站预测结果显示,ATG5可以与miR-30d-5p结合,两者结合位点见图5。双荧光素酶报告基因实验结果显示,与模拟物对照比较,miR-30d-5p模拟物和ATG5野生型共转染显著降低了荧光素酶活性(分别为 1.00 ± 0.10 和 0.50 ± 0.04 , $P<0.01$);但与模拟物对照比较,miR-30d-5p模拟物和ATG5突变型共转染未对荧光素酶活性产生显著影响(分别为 1.02 ± 0.11 和 0.98 ± 0.09 , $P>0.05$),进一步验证了ATG5可以与miR-30d-5p相互结合。

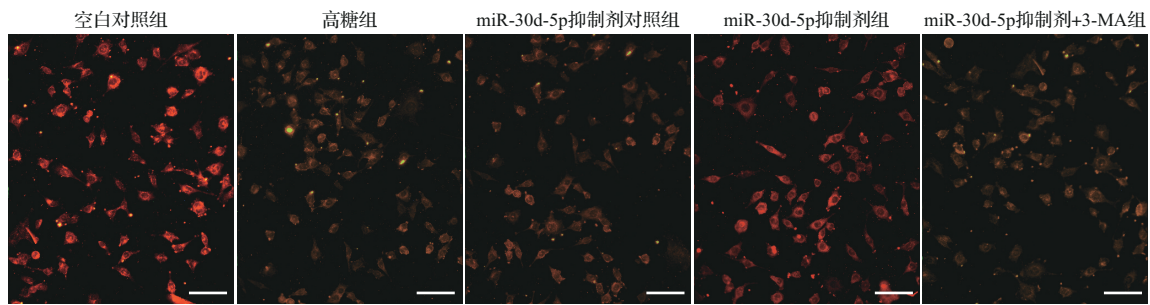
表1 抑制miR-30d-5p表达后足细胞损伤和线粒体功能损伤相关指标比较

Table 1 Comparison of podocyte injury and mitochondrial function injury related indicators after down-regulating miR-30d-5p expression

组别	n	凋亡率(%)	肾蛋白	LC3II/LC3I	P62	ATG5
空白对照组	3	3.83±0.25	1.00±0.09	1.06±0.07	1.00±0.08	1.00±0.08
高糖组	3	10.97±0.95**	0.29±0.02**	0.75±0.03**	2.34±0.14**	0.19±0.02**
miR-30d-5p抑制剂对照组	3	11.16±1.00	0.29±0.03	0.81±0.04	2.31±0.12	0.19±0.01
miR-30d-5p抑制剂组	3	6.02±0.21##	0.77±0.06##	1.00±0.06##	1.69±0.11##	0.84±0.07##
miR-30d-5p抑制剂+3-MA组	3	12.37±0.99 ^{△△}	0.46±0.04 ^{△△}	0.95±0.05	2.10±0.16 [△]	0.33±0.03 ^{△△}

组别	n	PINK1	PARK2	膜电位	ATP含量
空白对照组	3	1.00±0.07	1.00±0.08	43.34±2.71	99.95±8.00
高糖组	3	0.62±0.05**	0.42±0.05**	35.07±2.53 [°]	58.47±4.01**
miR-30d-5p抑制剂对照组	3	0.61±0.07	0.42±0.04	32.67±3.50	59.69±5.00
miR-30d-5p抑制剂组	3	0.88±0.07##	1.00±0.09##	41.67±2.19 [#]	88.49±6.01##
miR-30d-5p抑制剂+3-MA组	3	0.63±0.06 ^{△△}	0.47±0.03 ^{△△}	34.08±2.23 [△]	60.08±4.99 ^{△△}

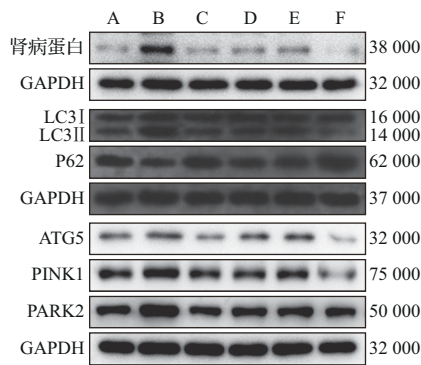
与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与miR-30d-5p抑制剂对照组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与miR-30d-5p抑制剂组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$ 。miR:微RNA;LC:微管相关蛋白轻链;ATG:自噬相关基因;MA:甲基腺嘌呤;PINK:PTEN诱导假定激酶;PARK:Parkin基因;ATP:三磷酸腺苷。



高糖诱导下线粒体膜电位流失,抑制 miR-30d-5p 表达后线粒体膜电位聚合增加,而 3-MA 可逆转 miR-30d-5p 抑制剂对线粒体膜电位聚合的影响. 标尺=100 μm. miR: 微 RNA; MA: 甲基腺嘌呤.

图2 抑制 miR-30d-5p 表达后足细胞线粒体 JC-1 荧光染色图

Figure 2 JC-1 fluorescence staining diagram of mitochondria in podocytes after down-regulating miR-30d-5p expression



A: miR-30d-5p 抑制剂对照+模拟物对照组; B: miR-30d-5p 抑制剂+模拟物对照组; C: miR-30d-5p 抑制剂+模拟物组; D: miR-30d-5p 抑制剂+3-MA 组; E: miR-30d-5p 抑制剂+模拟物对照+3-MA 组; F: miR-30d-5p 抑制剂+模拟物+3-MA 组. miR: 微 RNA; MA: 甲基腺嘌呤; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; LC: 微管相关蛋白轻链; ATG: 自噬相关基因; PINK: PTEN 诱导假定激酶; PARK: Parkin 基因.

图3 上调 miR-30d-5p 表达后足细胞凋亡和自噬相关蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoretogram of apoptosis and autophagy-related proteins in podocytes after up-regulating miR-30d-5p expression

3 讨论

目前研究显示,基因活性的增加可以预防糖尿病诱导的足细胞损伤,并有效缓解糖尿病肾病的进展^[14-15]。lncRNA XIST 通过 miR-30d-5p/SIRT1 轴诱导自噬来减轻糖尿病周围神经病变^[16]。本文资料显示,与空白对照组比较,高糖处理的足细胞中 miR-30d-5p 表达明显升高,说明 miR-30d-5p 与高糖诱导的足细胞损伤存在某种关联。但 Deng 等^[17]研究显示糖尿病小鼠中 miR-30d-5p 表达下调,可能是由所选择的实验模型不同导致,因此今后需要在动物模型中进一步验证。

自噬可以保护足细胞免于细胞凋亡^[18]。足细胞自噬主要负责蛋白质和细胞器的降解,继而调节细胞稳态,自噬障碍是足细胞损伤的重要诱导因素。越来越多的证据表明,足细胞自噬有助于肾小球疾病的控制^[19]。有研究报道,自噬增加对狼疮肾炎中抗体和 α 干扰素诱导的足细胞损伤具有细胞保护作用^[20-23]。lncRNA XIST 通过下调 miR-30d-5p 来促进足细胞自噬,从而阻碍足细胞凋亡^[24],且当自噬激活时,可以观察到 LC3 I 向 LC3 II 转化^[25-26]。此外,有研究发现熊果酸通过抑制糖尿病肾病自噬 P62 积累减轻足细胞有丝分裂突变^[27]。本文资料显示,抑制 miR-30d-5p 可促进受损细胞自噬,降低足细胞凋亡水平,而 3-MA 逆转了 miR-30d-5p 抑制剂的作用,由此进一步证明抑制 miR-30d-5p 表达可促进细胞自噬,抑制足细胞凋亡。

有研究表明,高糖处理的糖尿病小鼠和足细胞都表现出线粒体结构和功能异常,进一步损害足细胞^[28],提示线粒体功能障碍是糖尿病肾病和其他肾小球疾病发生和发展的原因之一。因此,解决线粒体功能障碍是治疗糖尿病肾病的重要工作。线粒体自噬是清除受损线粒体和维持细胞内稳定的重要形式^[29]。ATG5 是一种参与自噬起始的相关基因^[30]。PINK1/Parkin 信号通路作为调控线粒体自噬的重要分子机制,可能与肾小球足细胞损伤相关^[31]。有研究表明,沉默 ATG5 能抑制自噬,诱导足细胞凋亡;高糖通过调节 ROS/PINK1/Parkin 信号通路促进视网膜色素上皮细胞凋亡,抑制线粒体自噬^[32-33]。有研究表明, MitoTEMPO 通过 PINK1/Parkin 途径介导的线粒体自噬抑制 NLRP3,从而保护足细胞免受损伤^[34],而

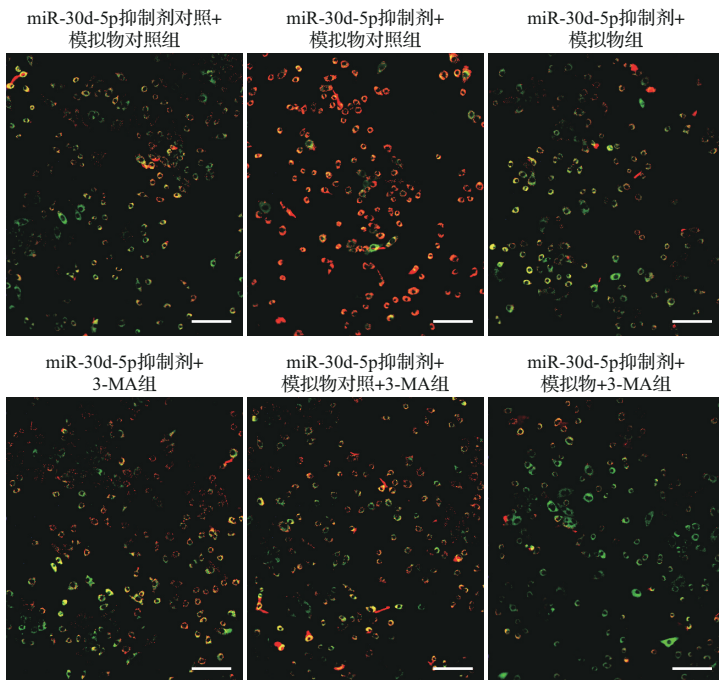
表2 上调 miR-30d-5p 的表达后足细胞损伤和线粒体功能损伤相关指标比较

Table 2 Comparison of podocyte injury and mitochondrial function injury related indicators after up-regulating miR-30d-5p expression

分组	n	凋亡率(%)	肾病蛋白	LC3II/LC3I	P62	ATG5
miR-30d-5p 抑制剂对照+模拟物对照组	3	11.08±1.02	1.00±0.08	0.82±0.07	1.00±0.08	1.00±0.08
miR-30d-5p 抑制剂+模拟物对照组	3	6.24±0.61**	3.16±0.25**	1.05±0.09*	0.57±0.03**	1.37±0.011**
miR-30d-5p 抑制剂+模拟物组	3	11.23±0.92##	1.25±0.10##	0.83±0.06#	1.03±0.09##	0.79±0.07##
miR-30d-5p 抑制剂+3-MA 组	3	12.15±1.17	1.48±0.12	0.84±0.07	0.68±0.07	1.00±0.08
miR-30d-5p 抑制剂+模拟物对照+3-MA 组	3	12.07±1.17##	1.49±0.10##	0.91±0.06	0.67±0.07	1.05±0.09##
miR-30d-5p 抑制剂+模拟物+3-MA 组	3	15.11±1.46 [△]	0.58±0.04 ^{△△}	0.63±0.05 ^{△△}	1.15±0.11 ^{△△}	0.30±0.03 ^{△△}

分组	n	PINK1	PARK2	膜电位	ATP 含量
miR-30d-5p 抑制剂对照+模拟物对照组	3	1.00±0.08	1.00±0.07	1.21±0.12	100.00±6.50
miR-30d-5p 抑制剂+模拟物对照组	3	1.54±0.10**	1.68±0.13**	1.67±0.15**	136.28±8.10**
miR-30d-5p 抑制剂+模拟物组	3	0.99±0.08##	0.87±0.08##	1.10±0.10##	109.25±7.10##
miR-30d-5p 抑制剂+3-MA 组	3	0.99±0.08	1.05±0.09	1.09±0.08	111.00±7.23
miR-30d-5p 抑制剂+模拟物对照+3-MA 组	3	0.98±0.06##	1.15±0.09##	1.24±0.14##	115.78±7.35#
miR-30d-5p 抑制剂+模拟物+3-MA 组	3	0.43±0.04 ^{△△}	0.89±0.06 [△]	0.80±0.07 ^{△△}	96.49±5.00 [△]

与 miR-30d-5p 抑制剂对照+模拟物对照组比较, *P<0.05, **P<0.01; 与 miR-30d-5p 抑制剂+模拟物对照组比较, #P<0.05, ##P<0.01; 与 miR-30d-5p 抑制剂+模拟物对照+3-MA 组比较, [△]P<0.05, ^{△△}P<0.01. miR: 微 RNA; LC: 微管相关蛋白轻链; ATG: 自噬相关基因; PINK: PTEN 诱导假定激酶; PARK: Parkin 基因; ATP: 三磷酸腺苷.



上调 miR-30d-5p 表达后线粒体膜电位聚合减少, 且 3-MA 协同促进 miR-30d-5p 模拟物对线粒体膜电位聚合的影响. 标尺=100 μm. miR: 微 RNA.

图4 上调 miR-30d-5p 表达后足细胞线粒体 JC-1 荧光染色结果

Figure 4 JC-1 fluorescence staining diagram of mitochondria in podocytes after up-regulating miR-30d-5p expression

抑制 PINK1/Parkin 通路可以促进线粒体动力学以缓解糖尿病肾病^[35]。本文资料显示, 与空白对照

组比较, 高糖处理的足细胞中 ATG5、PINK1、PARK2 蛋白表达下调, 而抑制 miR-30d-5p 则会促进 ATG5、PINK1、PARK2 蛋白表达。研究显示, ATG5 和 PINK1 下调会抑制自噬小体的形成和线粒体自噬^[36-37], 表明在高糖诱导的足细胞线粒体中, 抑制 miR-30d-5p 可以诱导线粒体自噬。

线粒体膜电位和 ATP 的变化情况预示线粒体损伤程度^[33]。本文资料显示, 高糖诱导的足细胞中单体增加、膜电位流失、ATP 含量减少, 抑制 miR-30d-5p 能增加聚集体、上调 ATP, 3-MA 能逆转 miR-30d-5p 抑制剂的作用。研究显示, miR-30d-5p 通过靶向 ATG5 抑制 RCC 细胞的增殖和自噬, 并认为该通路可能为癌症治疗新方法的设计提供参考^[10]。本研究也证实 ATG5 可以与 miR-30d-5p 相互结合。

综上所述, 在高糖诱导的足细胞中, 抑制 miR-30d-5p 可能通过促进 ATG5 进而促进线粒体

ATG5野生型: **acgaaaauuuccuAUGUUUACa**

miR-30d-5p: **gaaggucagccccUACAAAUGu**

ATG5突变型: **acgaaaauuuccuUUGUAUACa**

miR: 微RNA; ATG: 自噬相关基因.

图5 Starbase 预测 miR-30d-5p 与 ATG5 的结合位点

Figure 5 Starbase predicted targeted binding sites between miR-30d-5p and ATG5

自噬,缓解足细胞损伤,提示 miR-30d-5p 可能是糖尿病肾病治疗的新靶点。但是,本研究仅在高糖诱导的足细胞中对 miR-30d-5p 的作用进行探讨,未来还须在动物实验中进行验证并进一步探讨其在糖尿病肾病中的作用及调控机制。

本文附图见电子版。



志谢 研究得到宁波市自然科学基金(2021J282)支持

Acknowledgements This work was supported by the Natural Science Foundation of Ningbo City (2021J282)

医学伦理 研究不涉及人体或动物实验

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2024. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献 (References)

- [1] XIONG Y, ZHOU L. The signaling of cellular senescence in diabetic nephropathy[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 7495629.
- [2] 罗强, 梁伟, 丁国华. mTOR 在糖尿病肾脏病足细胞损伤中的研究进展[J]. *中华肾脏病杂志*, 2022, 38(7): 639-643.
LUO Qiang, LIANG Wei, DING Guohua. Research progress of mTOR signaling in the podocyte injury of diabetic kidney disease[J]. *Chinese Journal of Nephrology*, 2022, 38(7): 639-643. (in Chinese)
- [3] KE G, CHEN X, LIAO R, et al. Receptor activator of NF- κ B mediates podocyte injury in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2021, 100(2): 377-390.
- [4] CHEN Z, AN X, LIU X, et al. Hyperoside alleviates adriamycin-induced podocyte injury via inhibiting mitochondrial fission[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(51): 88792-88803.
- [5] LIU Y R, YANG N J, ZHAO M L, et al. *Hypericum perforatum* L. regulates glutathione redox stress and normalizes Ggt1/Anpep signaling to alleviate OVX-induced kidney dysfunction[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 628651.
- [6] 付娟, 李娜, 袁清敏. DLEU2 靶向 miR-30d-5p 影响舌鳞癌细胞增殖和凋亡的分子机制[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(20): 6.
FU Juan, LI Na, YUAN Qingmin. Molecular mechanism of DLEU2 targeting miR-30d-5p affecting proliferation and apoptosis in tongue squamous carcinoma cells[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2021, 41(20): 6. (in Chinese)
- [7] 陈香文, 廖湘平, 李淑梅, 等. miR-30d-5p 对转化生长因子- β 1 诱导肾小管上皮细胞生长及迁移的影响[J]. *医学研究生学报*, 2020, 33(12): 1239-1245.
CHEN Xiangwen, LIAO Xiangping, LI Shumei, et al. Effects of miR-30d-5p on TGF- β 1-induced growth and migration of renal tubular epithelial cells[J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2020, 33(12): 1239-1245. (in Chinese)
- [8] MCCLELLAND A, HAGIWARA S, KANTHARIDIS P. Where are we in diabetic nephropathy: microRNAs and biomarkers?[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2014, 23(1): 80-86.
- [9] YARAHMADI A, SHAHROKHI S Z, MOSTAFAVIPOUR Z, et al. MicroRNAs in diabetic nephropathy: from molecular mechanisms to new therapeutic targets of treatment[J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 189: 114301.
- [10] LIANG L, YANG Z, DENG Q, et al. miR-30d-5p suppresses proliferation and autophagy by targeting ATG5 in renal cell carcinoma[J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(2): 529-540.
- [11] XU Q, GUOHUI M, LI D, et al. lncRNA C2dat2 facilitates autophagy and apoptosis via the miR-30d-5p/DDIT4/mTOR axis in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(8): 11315-11335.
- [12] ZHAO F, QU Y, ZHU J, et al. miR-30d-5p plays an important role in autophagy and apoptosis in developing rat brains after hypoxic-ischemic injury[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2017, 76(8): 709-719.
- [13] JIANG M, WANG H, JIN M, et al. Exosomes from miR-30d-5p-ADSCs reverse acute ischemic stroke-induced, autophagy-mediated brain injury by promoting M2 microglial/macrophage polarization[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(2): 864-878.
- [14] WU L, WANG Q, GUO F, et al. Involvement of miR-27a-3p in diabetic nephropathy via affecting renal fibrosis, mitochondrial dysfunction, and endoplasmic reticulum stress[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(2): 1454-

- 1468.
- [15] HONG Q, ZHANG L, DAS B, et al. Increased podocyte sirtuin-1 function attenuates diabetic kidney injury[J]. **Kidney Int**, 2018, 93(6): 1330-1343.
- [16] LIU B Y, LI L, BAI L W, et al. Long non-coding RNA XIST attenuates diabetic peripheral neuropathy by inducing autophagy through microRNA-30d-5p/sirtuin1 axis[J]. **Front Mol Biosci**, 2021, 8: 655157.
- [17] DENG W, HUANG D, XIE H, et al. Danhong injection represses diabetic retinopathy and nephropathy advancement in diabetic mice by upregulating microRNA-30d-5p and targeting JAK1[J]. **Bioengineered**, 2022, 13(4): 8187-8200.
- [18] SU Y, YAO S, ZHAO S, et al. LncRNA CCAT1 functions as apoptosis inhibitor in podocytes via autophagy inhibition[J]. **J Cell Biochem**, 2020, 121(1): 621-631.
- [19] FAN Y, YANG Q, YANG Y, et al. Sirt6 suppresses high glucose-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in podocytes through AMPK activation[J]. **Int J Biol Sci**, 2019, 15(3): 701-713.
- [20] QI Y Y, ZHOU X J, CHENG F J, et al. Increased autophagy is cytoprotective against podocyte injury induced by antibody and interferon- α in lupus nephritis [J]. **Ann Rheum Dis**, 2018, 77(12): 1799-1809.
- [21] LU Q, HOU Q, CAO K, et al. Complement factor B in high glucose-induced podocyte injury and diabetic kidney disease[J/OL]. **JCI Insight**, 2021, 6(19): e147716.
- [22] JIANG L, CUI H, DING J. Smad3 signalling affects high glucose-induced podocyte injury via regulation of the cytoskeletal protein transgelin[J]. **Nephrology (Carlton)**, 2020, 25(9): 659-666.
- [23] LUO J, JIANG J, HUANG H, et al. C-peptide ameliorates high glucose-induced podocyte dysfunction through the regulation of the Notch and TGF- β signaling pathways[J]. **Peptides**, 2021, 142: 170557.
- [24] 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, 2023: 3187846.
- [25] CAO Y, CHEN J, REN G, et al. Punicalagin prevents inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages by inhibiting FoxO3a/autophagy signaling pathway[J]. **Nutrients**, 2019, 11(11): 2794.
- [26] JI J, ZHAO Y, NA C, et al. Connexin 43-autophagy loop in the podocyte injury of diabetic nephropathy[J]. **Int J Mol Med**, 2019, 44(5): 1781-1788.
- [27] MEI H, JING T, LIU H, et al. Ursolic acid alleviates mitotic catastrophe in podocyte by inhibiting autophagic P62 accumulation in diabetic nephropathy[J]. **Int J Biol Sci**, 2024, 20(9): 3317-3333.
- [28] GUO Y, WANG M, LIU Y, et al. BaoShenTongLuo formula protects against podocyte injury by regulating AMPK-mediated mitochondrial biogenesis in diabetic kidney disease[J]. **Chin Med**, 2023, 18(1): 32.
- [29] AL-WAILI N, AL-WAILI H, AL-WAILI T, et al. Natural antioxidants in the treatment and prevention of diabetic nephropathy; a potential approach that warrants clinical trials[J]. **Redox Rep**, 2017, 22(3): 99-118.
- [30] CAO S, HUNG Y W, WANG Y C, et al. Glutamine is essential for overcoming the immunosuppressive micro-environment in malignant salivary gland tumors[J]. **Theranostics**, 2022, 12(13): 6038-6056.
- [31] 陆 玮, 于 力. 肾小球足细胞线粒体自噬与 PINK1/Parkin 信号通路的研究进展[J]. **中华肾脏病杂志**, 2017, 33(4): 309-312.
- LU Wei, YU Li. Progress of mitochondrial autophagy and PINK1/Parkin signaling pathway in glomerular podocytes[J]. **Chinese Journal of Nephrology**, 2017, 33(4): 309-312. (in Chinese)
- [32] SEONG S B, HA D S, MIN S Y, et al. Autophagy precedes apoptosis in angiotensin II-induced podocyte injury[J]. **Cell Physiol Biochem**, 2019, 53(5): 747-759.
- [33] ZHANG Y, XI X, MEI Y, et al. High-glucose induces retinal pigment epithelium mitochondrial pathways of apoptosis and inhibits mitophagy by regulating ROS/PINK1/Parkin signal pathway[J]. **Biomed Pharmacother**, 2019, 111: 1315-1325.
- [34] LIU B, WANG D, CAO Y, et al. MitoTEMPO protects against podocyte injury by inhibiting NLRP3 inflammasome via PINK1/Parkin pathway-mediated mitophagy [J]. **Eur J Pharmacol**, 2022, 929: 175136.
- [35] ZHU J Y, VAN DE LEEMPUT J, HAN Z. Promoting mitochondrial dynamics by inhibiting the PINK1-PRKN pathway to relieve diabetic nephropathy[J]. **Dis Model Mech**, 2024, 17(4): dmm050471.
- [36] MURPHY K R, BAGGETT B, COOPER L L, et al. Enhancing autophagy diminishes aberrant Ca²⁺ homeostasis and arrhythmogenesis in aging rabbit hearts[J]. **Front Physiol**, 2019, 10: 1277.
- [37] GAO Z, YI W, TANG J, et al. Urolithin A protects against acetaminophen-induced liver injury in mice via sustained activation of Nrf2[J]. **Int J Biol Sci**, 2022, 18(5): 2146-2162.

[本文编辑 余 方 沈 敏]