

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.24.016

右美托咪定上调 miR-126 对高糖诱导的足细胞增殖、凋亡及迁移的影响*

王 飞¹, 杨欣宇^{1△}, 李 鑫²

1. 河北省保定市第二医院麻醉科, 河北保定 071000; 2. 河北省保定市清苑区

妇幼保健院医疗美容科, 河北保定 071100

摘要:目的 分析右美托咪定(Dex)上调微小核糖核酸(miR)-126 对高糖(HG)诱导的足细胞增殖、凋亡及迁移的影响。方法 体外培养人肾小球足细胞(HGPC), 首先通过含 30 mmol/L D-葡萄糖的培养基刺激 HGPC 建立 HG 损伤模型, 并分为 HG 组、25 nmol/L Dex 组、50 nmol/L Dex 组、100 nmol/L Dex 组、200 nmol/L Dex 组, 后 4 组以 25、50、100、200 nmol/L Dex 分别进行干预, 以 5 mmol/L D-葡萄糖干预作为对照(Con)组, 24 h 后, 筛选出干预细胞活力最佳 Dex 浓度; 再将 HGPC 分为 Con 组、HG 组、mimic NC 组、miR-126 mimic 组、inhibitor NC 组及 miR-126 inhibitor 组, Con 组用 5 mmol/L D-葡萄糖进行干预, HG 组用 30 mmol/L D-葡萄糖进行干预, mimic NC 组、miR-126 mimic 组、inhibitor NC 组及 miR-126 inhibitor 组分别转染 mimic NC、miR-126 mimic、inhibitor NC 及 miR-126 inhibitor 片段至细胞后加入 30 mmol/L D-葡萄糖进行干预, 24 h 后, 测定细胞 miR-126 相对表达水平及细胞活力; 随后将 HGPC 分为 Con 组、HG 组、Dex 组、Dex + miR-126 mimic 组、Dex + miR-126 inhibitor 组, Con 组用 5 mmol/L D-葡萄糖进行干预, HG 组用 30 mmol/L D-葡萄糖进行干预, Dex 组同时加入 30 mmol/L D-葡萄糖、最佳干预浓度的 Dex 进行干预, Dex + miR-126 mimic 组、Dex + miR-126 inhibitor 组分别转染 miR-126 mimic、miR-126 inhibitor 片段至细胞后同时加入 30 mmol/L D-葡萄糖、最佳干预浓度的 Dex 进行干预, 24 h 后, 检测细胞活力、凋亡、迁移及磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/丝氨酸-苏氨酸激酶(AKT)通路蛋白水平。结果 200 nmol/L 为 Dex 干预细胞活力的最佳浓度。与 Con 组比较, HG 组 HGPC 中 miR-126 相对表达水平及细胞活力降低($P < 0.05$); 与 mimic NC 组比较, miR-126 mimic 组 HGPC 中 miR-126 相对表达水平及细胞活力升高($P < 0.05$); 与 inhibitor NC 组比较, miR-126 inhibitor 组 HGPC 中 miR-126 相对表达水平及细胞活力降低($P < 0.05$)。与 Con 组比较, HG 组细胞凋亡率、迁移率升高, p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达水平降低($P < 0.05$); 与 HG 组比较, Dex 组细胞凋亡率、细胞迁移率降低, miR-126 相对表达水平、细胞活力及 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达水平升高($P < 0.05$); 与 Dex 组比较, Dex + miR-126 mimic 组细胞凋亡率、细胞迁移率降低, 细胞活力、p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达水平升高($P < 0.05$), Dex + miR-126 inhibitor 组则相反($P < 0.05$)。结论 Dex 可能通过上调 miR-126 促进 HG 诱导的足细胞增殖及 PI3K/AKT 通路活化, 抑制细胞凋亡及迁移能力。

关键词: 糖尿病肾病; 右美托咪定; 微小核糖核酸-126; 增殖; 凋亡; 磷脂酰肌醇 3-激酶; 丝氨酸-苏氨酸激酶

中图法分类号: R364.2; R578.2; R971.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2024)24-3663-06

Effects of dexmedetomidine up-regulation of miR-126 on cell proliferation, apoptosis and migration of podocyte induced by high glucose*

WANG Fei¹, YANG Xinyu^{1△}, LI Xin²

1. Department of Anesthesiology, Baoding Second Hospital, Baoding, Hebei 071000, China;

2. Department of Medical Beauty, Baoding Qingyuan Maternal and Child

Health Hospital, Baoding, Hebei 071100, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of micro ribonucleic acid (miR)-126 up-regulated by dexmedetomidine (Dex) on proliferation, apoptosis and migration of podocyte induced by high glucose (HG). **Methods** Human glomerular podocyte (HGPC) was cultured in vitro and stimulated by medium containing 30 mmol/L D-glucose to establish HG injury model as HG group 25 nmol/L Dex group, 50 nmol/L Dex group, 100 nmol/L Dex group, 200 nmol/L Dex group, and then 25, 50, 100, 200 nmol/L Dex was used for in-

* 基金项目: 河北省卫生和计划生育委员会科研基金项目(20242031)。

作者简介: 王飞, 男, 主治医师, 主要从事临床麻醉等相关研究。△ 通信作者, E-mail: 17330273732@163.com。

intervention respectively in the later 4 groups, and 5 mmol/L D-glucose intervention as control (Con) group, the optimal Dex concentration was selected after 24 h. HGPC cells were divided into Con group, HG group, mimic NC group, miR-126 mimic group, inhibitor NC group and miR-126 inhibitor group, the Con group was intervened with 5 mmol/L D-glucose, HG group was intervened with 30 mmol/L D-glucose, the cells in the mimic NC group, miR-126 mimic group, inhibitor NC group and miR-126 inhibitor group were transfected with mimic NC, miR-126 mimic, inhibitor NC and miR-126 inhibitor respectively, 30 mmol/L D-glucose was added for intervention, after 24 h, the level of miR-126 and cell viability were measured. HGPC cells were then divided into Con group, HG group, Dex group, Dex+miR-126 mimic group and Dex+miR-126 inhibitor group, the Con group was intervened with 5 mmol/L D-glucose, the HG group was intervened with 30 mmol/L D-glucose, and the Dex group was intervened with 30 mmol/L D-glucose and the ptimal concentration Dex, the cells in Dex+miR-126 mimic group and Dex+miR-126 inhibitor group were transfected with miR-126 mimic and miR-126 inhibitor respectively, and then 30 mmol/L D-glucose and the ptimal concentration Dex were added intervention, after 24 h, cell viability, apoptosis, migration and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/serine-threonine kinase (AKT) pathway protein levels were measured. **Results** 200 nmol/L Dex was the optimal concentration to interfere with cell viability. Compared with those in the Con group, the level of miR-126 and cell viability of HGPC in HG group decreased ($P<0.05$). Compared with those in the mimic NC group, the miR-126 level and cell viability increased in the miR-126 mimic group ($P<0.05$), and compared with those in the inhibitor NC group, the miR-126 level and cell viability of HGPC decreased in the miR-126 inhibitor group ($P<0.05$). Compared with those in the Con group, the apoptosis rate and mobility of HGPC in HG group increased, while the levels of p-PI3K and p-AKT decreased ($P<0.05$). Compared with those in the HG group, the apoptosis rate and migration rate decreased significantly, and the level of miR-126, cell viability, p-PI3K and p-AKT levels increased in Dex group ($P<0.05$). Compared with those in the Dex group, apoptosis rate and mobility of cells decreased in Dex+miR-126 mimic group, while cell viability, p-PI3K and p-AKT levels increased ($P<0.05$), and the reverse was observed in Dex+miR-126 inhibitor group ($P<0.05$). **Conclusion** Dex may up-regulate miR-126 to promote HG-induced podocyte proliferation and activation of PI3K/AKT pathway, and inhibit cell apoptosis and migration.

Key words: diabetic nephropathy; dexmedetomidine; micro ribonucleic acid-126; proliferation; apoptosis; phosphatidylinositol 3-kinase; serine-threonine kinase

糖尿病肾病是进行性肾脏疾病,是糖尿病常见并发症,整个治疗过程中,需进行透析或肾脏替代,患者痛苦大,家庭经济负担重^[1]。糖尿病肾病致病机制复杂,主要发病原因之一为足细胞损伤,其病理改变是糖尿病肾病发生、发展的关键因素,也是药物治疗的重要靶点^[2-3]。微小核糖核酸(miRNA/miR)是一类由 18~25 个核苷酸构成的内源性非编码单链核糖核酸(RNA)分子,其异常表达是一种表观遗传机制,可独立或联合遗传学在各种生理、病理环境下调控细胞的增殖、分化、转移和凋亡等生命过程,对糖尿病肾病的发生、发展起关键作用^[4],其中 miR-126 与许多疾病关系密切,但 miR-126 对人肾小球足细胞(HGPC)恶性表型的作用机制尚未全面揭秘。LIU 等^[5]的研究表明,右美托咪定(Dex)可以抑制细胞炎症和细胞凋亡,对糖尿病肾病大鼠肾损伤具有保护作用,但机制尚不明确。磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/丝氨酸-苏氨酸激酶(AKT)是一种转导来自各种受体信号通路,通过招募和激活先天免疫细胞来改变炎症反应^[6]。JIANG 等^[7]发现 PI3K/AKT 信号通路是 miR-126 的下游靶点,在高糖(HG)诱导肾小管上皮

细胞损伤中具有抑制细胞凋亡和细胞活力的作用。因此,本研究旨在分析 Dex 及 miR-126 过表达对 HGPC 活力、凋亡、迁移能力的影响,并探讨 PI3K/AKT 信号通路在该过程中的角色。

1 材料与方法

1.1 细胞株来源 HGPC 购自青旗(上海)生物技术有限公司。

1.2 仪器、药品与试剂 Molecular Devices 型酶标仪购自上海道鹏生物科技有限公司, TGL-16 型离心机购自四川蜀科仪器有限公司, ABI 9700 型 PCR 仪购自美国 ABI 公司, Invitrogen iBright 凝胶成像系统购自广州赛默飞世尔科技有限公司。mimic NC、miR-126 mimic、inhibitor NC 及 miR-126 inhibitor 片段由北京华大基因检测中心设计合成, Dex、D-葡萄糖购自上海源叶生物科技有限公司(纯度 $\geq 98\%$), 脂质体 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司, 细胞计数试剂(CCK-8)、Hoechst 33258 染色液均来自生工生物工程(上海)股份有限公司, 鼠抗人 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、 β -actin 一抗及二抗, 以及碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗鼠 IgG(H+G)均购自武汉三鹰生物

技术有限公司。完全培养基[10%胎牛血清(FBS)+100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM]购自美国 Hyclone 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将 HGPC(≥80%密度)接种于完全培养基上,并将培养板或培养皿置于 37 ℃、5% CO₂、70%~80%湿度培养箱中培养。

1.3.2 分组与干预 首先以 5 mmol/L D-葡萄糖干预细胞为对照(Con)组,30 mmol/L D-葡萄糖刺激 24 h 构建 HG 损伤模型,并分为 HG 组、25 nmol/L Dex 组、50 nmol/L Dex 组、100 nmol/L Dex 组、200 nmol/L Dex 组,后 4 组分别加入 25、50、100、200 nmol/L Dex,每组重复 3 次后求平均值,24 h 后,采用 CCK-8 筛选出细胞活力最佳的 Dex 干预浓度用于后续实验。将 HGPC 分为 Con 组、HG 组、mimic NC 组、miR-126 mimic 组、inhibitor NC 组及 miR-126 inhibitor 组,Con 组用 5 mmol/L D-葡萄糖进行干预,HG 组用 30 mmol/L D-葡萄糖进行干预,mimic NC 组、miR-126 mimic 组、inhibitor NC 组及 miR-126 inhibitor 组是分别转染 mimic NC、miR-126 mimic、inhibitor NC 及 miR-126 inhibitor 片段至细胞后加入 30 mmol/L D-葡萄糖进行干预,每组重复 3 次后求平均值,24 h 后,检测细胞中 miR-126 表达水平、细胞活力,旨在验证 miR-126 的表达对 HG 损伤模型细胞活力的影响。再将 HGPC 分为 Con 组、HG 组、Dex 组、Dex+miR-126 mimic 组、Dex+miR-126 inhibitor 组,Con 组用 5 mmol/L D-葡萄糖进行干预,HG 组用 30 mmol/L D-葡萄糖进行干预,Dex 组同时加入 30 mmol/L D-葡萄糖、最佳干预浓度的 Dex 进行干预,Dex+miR-126 mimic 组、Dex+miR-126 inhibitor 组是分别转染 miR-126 mimic、miR-126 inhibitor 片段至细胞后同时加入 30 mmol/L D-葡萄糖、最佳干预浓度的 Dex 进行干预,每组重复 3 次后求平均值,24 h 后,对细胞中 miR-126 表达、细胞活力、凋亡、迁移及 p-PI3K、p-AKT、PI3K、AKT 表达情况进行检测,旨在验证 Dex 调控 miR-126 对 HG 损伤模型细胞活力、凋亡、迁移能力及 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达的影响。

1.3.3 细胞活力 HGPC 接种于 96 孔板中,接种密度为 1×10⁴ 个/孔。分别按照 Con 组、HG 组、25 nmol/L Dex 组、50 nmol/L Dex 组、100 nmol/L Dex 组、200 nmol/L Dex 组;Con 组、HG 组、mimic NC 组、miR-126 mimic 组、inhibitor NC 组及 miR-126 inhibitor 组;Con 组、HG 组、Dex 组、Dex+miR-126 mimic 组、Dex+miR-126 inhibitor 组进行干预。分别加药处理 24 h 后,各孔加入 10 μL CCK-8 溶液;细胞与 CCK-8 在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育培养 2 h 后,在酶标仪上检测各孔细胞在 450 nm 处的光密度(OD₄₅₀)值,计算细胞活力。细胞活力(%)=OD

值_{待测组}/OD 值_{Con组}×100%。

1.3.4 实时荧光定量聚合酶链反应 采用总 RNA 提取试剂盒提取各组干预后的细胞总 RNA,在 ABI 9700 型聚合酶链反应仪上反转录扩增 cDNA,并分析其溶解曲线和扩增曲线。三步聚合酶链反应程序如下:94 ℃ 5 min,94 ℃ 38 s,57 ℃ 35 s,72 ℃ 40 s,并设置上述程序为 40 个循环。以 U6 为内参,根据循环数(Ct)和 2^{-ΔΔCt} 法计算 miR-126 相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列		
基因	引物序列(5'-3')	引物长度 (bp)
miR-126	F:5'-GGCTTCGTACCGTGAGTAAT -3'	20
	R:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	16
U6	F:5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3'	17
	R:5'-AACGCTTCACGAATTGCGT-3'	20

注:F 表示正向引物,R 表示反向引物。

1.3.5 Hoechst 33258 染色 将 HGPC 接种于 24 孔板,当细胞密度达到 80%时,按照 Con 组、HG 组、Dex 组、Dex+miR-126 mimic 组、Dex+miR-126 inhibitor 组进行干预,24 h 后,HGPC 与 30 mmol/L Hoechst 33258 工作液避光孵育 10 min。Hoechst 33258 荧光信号在荧光显微镜下观察并拍照。高强蓝色信号为凋亡细胞,低弱蓝色信号为正常细胞。细胞凋亡率为凋亡细胞数占总细胞数的百分比。

1.3.6 划痕试验 按照 Con 组、HG 组、Dex 组、Dex+miR-126 mimic 组、Dex+miR-126 inhibitor 组干预 24 h 后,用 20 μL 无菌吸头在细胞表面力道均匀、垂直地画一道线,并用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗掉脱落的细胞;剩余的贴壁细胞在无血清的完全培养基中继续培养 24 h。显微镜下(4×)采集 0 h 和 24 h 的划痕图,并用 Image J1.8.0 软件分析划痕面积(S),间接反映细胞迁移性。迁移率(%)=[(S_{0h} - S_{24h})/S_{0h}]×100%。

1.3.7 蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测 PI3K/AKT 通路相关蛋白水平 细胞接种于 6 孔板,接种密度为 1×10⁵ 个/孔。按照 Con 组、HG 组、Dex 组、Dex+miR-126 mimic 组、Dex+miR-126 inhibitor 组干预 24 h 后,被 RIPA 裂解液重悬并裂解;在 4 ℃ 条件下,以 12 000 r/min 转速离心 10 min 后收集上清液,即总蛋白样品。蛋白样品先经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(80~120 V 恒压法)进行蛋白分离,再经过电泳法(300 mA 恒流法)进行蛋白转膜。载有蛋白的聚偏二氟乙烯(PVDF)膜在 50 g/L 脱脂牛奶中室温封闭 1 h 后,在 4 ℃ 环境下进行一抗(p-PI3K、p-AKT、PI3K、AKT)孵育过夜或室温一抗孵育 2 h;接下来,进行室温二抗孵育 2 h。封闭、一抗孵育、二抗孵育和显影之间分别用 Tris 洗膜缓冲液进行 3~5 次膜洗涤。使用凝胶成像系统拍照记录,并用

ImageJ1.8.0 软件进行蛋白灰度值分析,蛋白相对表达水平为目的蛋白灰度值与 β -actin 灰度值的比值。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8 软件作图。采用 SPSS25.0 软件进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间中的两两比较采用 Dunnett's *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Dex 对 HG 诱导的 HGPC 活力的影响 Con 组、HG 组、25 nmol/L Dex 组、50 nmol/L Dex 组、100 nmol/L Dex 组、200 nmol/L Dex 组的细胞活力分别为 $(100.00 \pm 5.05)\%$ 、 $(35.78 \pm 4.74)\%$ 、 $(45.31 \pm 6.23)\%$ 、 $(64.99 \pm 5.92)\%$ 、 $(75.93 \pm 6.55)\%$ 、 $(87.82 \pm 6.95)\%$ 。与 Con 组比较,HG 组细胞活力降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 HG 组比较,25 nmol/L Dex 组、50 nmol/L Dex 组、100 nmol/L Dex 组、200 nmol/L nmol/L Dex 组细胞活力上升,差异均有统计学意义($P < 0.05$);200 nmol/L Dex 组细胞活力最高,所以选择 200 nmol/L 为 Dex 最佳浓度。

2.2 miR-126 对 HG 诱导的 HGPC miR-126 相对表达水平及细胞活力的影响 与 Con 组比较,HG 组 HGPC 中 miR-126 相对表达水平及细胞活力降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 mimic NC 组比较,miR-126 mimic 组 HGPC 中 miR-126 相对表达水平及细胞活力升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与 inhibitor NC 组比较,miR-126 inhibitor 组 HGPC 中 miR-126 相对表达水平及细胞活力降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 Dex 上调 miR-126 对 HG 诱导的 HGPC miR-126 相对表达水平及细胞活力的影响 与 Con 组比较,HG 组 HGPC 中 miR-126 相对表达水平及细胞活力降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 HG 组比较,Dex 组 HGPC 中 miR-126 相对表达水平及细胞活力升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 Dex 组比较,Dex + miR-126 mimic 组 HGPC 中 miR-126

相对表达水平及细胞活力升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),Dex + miR-126 inhibitor 组 HGPC 中 miR-126 相对表达水平及细胞活力降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 Dex 上调 miR-126 对 HG 诱导的 HGPC 凋亡率的影响 Con 组、HG 组、Dex 组、Dex + miR-126 mimic 组、Dex + miR-126 inhibitor 组的细胞凋亡率分别为 $(5.38 \pm 1.12)\%$ 、 $(38.85 \pm 6.13)\%$ 、 $(18.83 \pm 5.16)\%$ 、 $(9.18 \pm 1.85)\%$ 、 $(32.42 \pm 4.03)\%$ 。HG 组细胞凋亡率高于 Con 组,Dex 组细胞凋亡率低于 HG 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 Dex 组比较,Dex + miR-126 mimic 组细胞凋亡率降低,Dex + miR-126 inhibitor 组细胞凋亡率升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

表 2 miR-126 对 HG 诱导的 HGPC miR-126 相对表达水平及细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	miR-126	细胞活力(%)
Con 组	1.00 ± 0.06	100.00 ± 6.93
HG 组	0.46 ± 0.09 ^a	39.37 ± 5.18 ^a
mimic NC 组	0.44 ± 0.11	38.85 ± 5.24
miR-126 mimic 组	0.80 ± 0.07 ^d	61.62 ± 3.59 ^d
inhibitor NC 组	0.45 ± 0.07	40.23 ± 6.52
miR-126 inhibitor 组	0.23 ± 0.04 ^e	24.52 ± 2.66 ^e
<i>F</i>	40.555	78.941
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001

注:与 Con 组比较,^a $P < 0.05$;与 mimic NC 组比较,^d $P < 0.05$;与 inhibitor NC 组比较,^e $P < 0.05$ 。

表 3 Dex 上调 miR-126 对促进 HG 诱导的 HGPC miR-126 相对表达水平及细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	miR-126	细胞活力(%)
Con 组	1.00 ± 0.10	100.00 ± 7.01
HG 组	0.48 ± 0.11 ^a	41.05 ± 5.23 ^a
Dex 组	0.65 ± 0.13 ^b	65.34 ± 6.17 ^b
Dex + miR-126 mimic 组	0.83 ± 0.06 ^c	84.79 ± 8.31 ^c
Dex + miR-126 inhibitor 组	0.48 ± 0.10 ^c	43.53 ± 5.14 ^c
<i>F</i>	14.649	47.000
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001

注:与 Con 组比较,^a $P < 0.05$;与 HG 组比较,^b $P < 0.05$;与 Dex 组比较,^c $P < 0.05$ 。

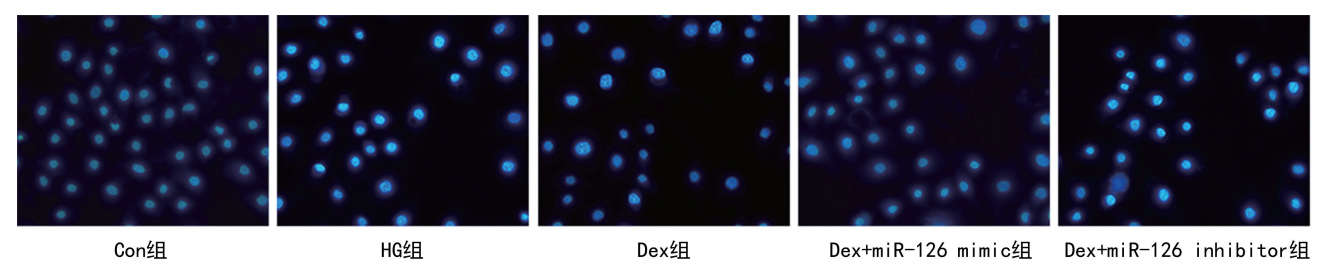


图 1 各组 HGPC 凋亡情况

2.5 Dex 上调 miR-126 对 HG 诱导的 HGPC 迁移的影响 Con 组、HG 组、Dex 组、Dex + miR-126

mimic 组、Dex + miR-126 inhibitor 组的细胞迁移率分别为 $(18.17 \pm 3.09)\%$ 、 $(43.87 \pm 5.74)\%$ 、

(21.84±3.37)%、(11.33±2.76)%、(34.68±3.58)%。与 Con 组比较,HG 组细胞迁移率升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 HG 组比较,Dex 组细胞迁移率降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 Dex

组比较,Dex+miR-126 mimic 组细胞迁移率降低,差异有统计学意义($P<0.05$),Dex+miR-126 inhibitor 组细胞迁移率升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

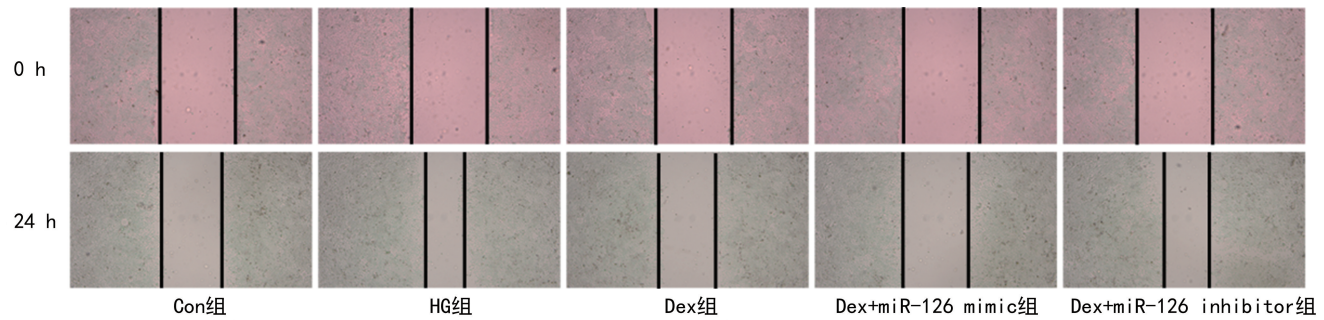


图 2 各组 HGPC 迁移情况

2.6 Dex 上调 miR-126 对 HG 诱导的 HGPC PI3K/AKT 通路活化的影响 与 Con 组比较,HG 组 HG-PC 中 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 HG 组比较,Dex 组 HGPC 中 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 Dex 组比较,Dex+miR-126 mimic 组 HGPC 中 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达水平升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),而 Dex+miR-126 inhibitor 组 HGPC 中 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达水平降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 4、图 3。

表 4 Dex 上调 miR-126 对 HG 诱导的 HGPC PI3K/AKT 通路相关蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	p-PI3K	p-AKT
Con 组	0.53±0.02	0.62±0.04
HG 组	0.25±0.07 ^a	0.24±0.04 ^a
Dex 组	0.42±0.04 ^b	0.52±0.09 ^b
Dex+miR-126 mimic 组	0.68±0.09 ^c	0.72±0.06 ^c
Dex+miR-126 inhibitor 组	0.16±0.05 ^c	0.34±0.04 ^c
F	37.603	35.382
P	<0.001	<0.001

注:与 Con 组比较,^a $P<0.05$;与 HG 组比较,^b $P<0.05$;与 Dex 组比较,^c $P<0.05$ 。

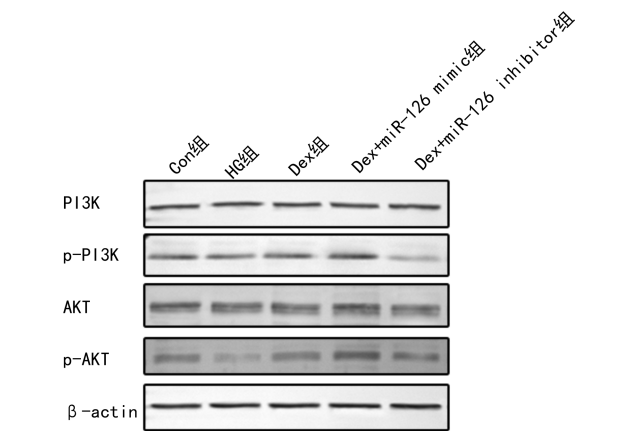


图 3 各组 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达情况

3 讨 论

糖尿病肾病是糖尿病的常见并发症,其特征是尿液中蛋白质排泄率增加和肾功能丧失^[8-9]。目前,糖尿病肾病主要通过饮食调节、控糖、控血压、控血脂等治疗以延缓早期疾病进展,晚期患者主要采用透析和肾移植治疗,但预后不佳、不良反应大,开发新的药物尤为迫切^[10]。足细胞损伤是原发性肾小球疾病的主要病理特点,可导致大量蛋白尿和肾功能衰竭^[11]。本研究在体外利用 HG 诱导肾小球足细胞进行造模,模拟糖尿病肾病^[12]。目前为止,尚无有效治疗糖尿病肾病的方法。Dex 是一种强效且高度选择性的跨膜 G 蛋白偶联 $\alpha 2$ 肾上腺素受体激动剂,临床上常用于缓解疼痛,同时还通过抑制炎症因子的释放而发挥抗炎的作用,Dex 具有减轻糖尿病小鼠肾损伤的作用^[13-14]。miRNA 主要是通过与靶基因信使 RNA 3' 端非编码区进行碱基配对,引起靶标 mRNA 降解或翻译抑制,从而参与真核生物的生理、病理过程^[15]。QIU 等^[16]研究发现,miR-126-5p 上调可降低 HG 处理的人系膜细胞中的炎症、氧化应激和细胞外基质积累。本研究结果显示,200 nmol/L Dex 是增强 HG 诱导的 HGPC 活力的最佳浓度。与 Con 组比较,HG 组 HGPC miR-126 相对表达水平及细胞活力降低($P<0.05$);与 mimic NC 组比较,miR-126 mimic 组 miR-126 水平及细胞活力升高,与 inhibitor NC 组比较,miR-126 inhibitor 组 miR-126 水平及细胞活力降低($P<0.05$),提示 miR-126 mimic 和 miR-126 inhibitor 转染成功,且 miR-126 mimic 可以增强 HG 诱导的 HGPC 细胞活力。与 Con 组比较,HG 组细胞凋亡率、细胞迁移率升高($P<0.05$)。Dex 组扭转了 HG 对 HGPC 的上述作用,说明 Dex 可促进 HG 诱导的 HGPC 增殖,抑制细胞凋亡及迁移能力。

PI3K/AKT 信号通路与多种细胞的生长与分化相关,可以调节细胞增殖、分化、代谢,与糖尿病肾病、恶性肿瘤等多种疾病的发生、发展有关^[17],且有研究

显示,PI3K/AKT 信号通路与糖尿病肾病足细胞损伤的保护机制息息相关^[18]。miR-126 是近几年研究较为广泛的 miRNA,被发现其在糖尿病肾病炎症细胞中可增强细胞活力,抑制细胞凋亡^[19]。现有研究表明,Dex 减轻糖尿病小鼠肾损伤的机制可能与下调 miR-34a 表达,进而降低氧化应激水平有关^[20]。但 Dex 对糖尿病肾病细胞损伤的作用机制及与 miR-126 表达的关系目前仍不清晰。本研究结果显示,与 Con 组比较,HG 组 HGPC 中 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达水平降低($P<0.05$),Dex 组扭转了 HG 对 HGPC 的上述作用;与 Dex 组比较,Dex+miR-126 mimic 组细胞凋亡率、细胞迁移率降低,细胞活力及 p-PI3K、p-AKT 蛋白相对表达水平升高($P<0.05$),Dex+miR-126 inhibitor 组则相反。提示 Dex 可能促进了 PI3K/AKT 通路的激活过程,Dex 和 miR-126 过表达联合后可促进 HG 诱导的 HGPC 活力,抑制细胞凋亡和迁移,与 LOU 等^[21]的研究中 miR-126 过表达可明显抑制体外糖尿病肾病细胞凋亡和抑制炎症,并诱导体外糖尿病肾病组织中 PI3K 和 p-AKT 蛋白表达这一结论相符合。

综上所述,Dex 可能通过上调 miR-126 促进 HG 诱导的足细胞增殖及 PI3K/AKT 通路活化,抑制细胞凋亡及迁移能力。本研究发现,Dex 具有抑制糖尿病肾病足细胞炎症损伤的作用,提示 Dex 在临床应用中具有良好的应用前景,下一步应研究 Dex 是否可调控其他 miRNA 影响糖尿病肾病疾病的进程,为药物干预/靶向 miRNA 在糖尿病肾病的基础研究提供参考。

参考文献

[1] 王莹,周静威,王珍,等. 糖尿病肾病中西医结合治疗进展[J]. 中国全科医学,2022,25(12):1411-1417.

[2] LI X,LU L,HOU W,et al. Epigenetics in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),2022,54(2):163-172.

[3] 莫梓沂,刘畅,薛世圆,等. 糖尿病肾病发病机制及治疗的研究进展[J]. 局解手术学杂志,2021,30(12):1093-1098.

[4] MA J,WANG Y,XU H T,et al. MicroRNA:a novel biomarker and therapeutic target to combat autophagy in diabetic nephropathy[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2019,23(14):6257-6263.

[5] LIU Y T,LIU W,WAN Z H,et al. Protective effect of dexmedetomidine against renal injury in diabetic nephropathy rats through inhibiting NF-κB pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci,2020,24(22):11865-11870.

[6] TANG G,DU Y,GUAN H,et al. Butyrate ameliorates skeletal muscle atrophy in diabetic nephropathy by enhancing gut barrier function and FFA2-mediated PI3K/Akt/mTOR signals[J]. Br J Pharmacol,2022,179(1):159-178.

[7] JIANG Q,YANG T,ZOU Y,et al. LncRNA HOX transcript antisense RNA mediates hyperglycemic-induced injury in the renal tubular epithelial cell via the miR-126-5pAkt axis[J]. Aging Med (Milton),2023,6(4):427-434.

[8] KOCH E T,NAKHOUL R,NAKHOUL F,et al. Autophagy in diabetic nephropathy: a review[J]. Int Urol Nephrol,2020,52(9):1705-1712.

[9] BONNER R,ALBAJRAMI O,HUDSPETH J,et al. Diabetic kidney disease[J]. Prim Care,2020,47(4):645-659.

[10] 李佳颖,钟智威,蒋红双. 糖尿病肾病治疗进展[J]. 右江医学,2022,50(7):542-546.

[11] 吴其晶,杨倩倩. 足细胞衰老与肾小球疾病[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2023,32(5):472-476.

[12] 金山祥,马林,韩笑. 高糖刺激对人足细胞 miR-34a 和相关蛋白表达的影响[J]. 解剖科学进展,2019,25(5):570-574.

[13] GAERTNER J,FUSI-SCHMIDHAUSER T. Dexmedetomidine:a magic bullet on its way into palliative care-a narrative review and practice recommendations[J]. Ann Palliat Med,2022,11(4):1491-1504.

[14] 余佳潞,王圣钊,李元耀,等. SIRT1 及其相关 miRNAs 在右美托咪定减轻糖尿病小鼠肾损伤中的作用[J]. 中华麻醉学杂志,2022,42(7):872-877.

[15] VAGHF A,KHANSARINEJAD B,GHAZNAVI-RAD E,et al. The role of microRNAs in diseases and related signaling pathways[J]. Mol Biol Rep,2022,49(7):6789-6801.

[16] QIU B,QI X,WANG J. CircTLK1 downregulation attenuates high glucose-induced human mesangial cell injury by blocking the AKT/NF-κB pathway through sponging miR-126-5p/miR-204-5p[J]. Biochem Genet,2022,60(5):1471-1487.

[17] XU F,NA L,LI Y,et al. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours[J]. Cell Biosci,2020,10(1):54.

[18] 鲁庆红,李益明,王志芳,等. 香豆素苷通过 PI3K/AKT/mTOR 通路保护糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的机制研究[J]. 医学分子生物学杂志,2022,19(2):151-156.

[19] GONZÁLEZ-PALOMO A K,PÉREZ-VÁZQUEZ F J,MÉNDEZ-RODRÍGUEZ K B,et al. Profile of urinary exosomal microRNAs and their contribution to diabetic kidney disease through a predictive classification model[J]. Nephrology (Carlton),2022,27(6):484-493.

[20] 余佳潞,王圣钊,李元耀,等. SIRT1 及其相关 miRNAs 在右美托咪定减轻糖尿病小鼠肾损伤中的作用[J]. 中华麻醉学杂志,2022,42(7):872-877.

[21] LOU Z,LI Q,WANG C,et al. The effects of microRNA-126 reduced inflammation and apoptosis of diabetic nephropathy through PI3K/AKT signalling pathway by VEGF[J]. Arch Physiol Biochem,2022,128(5):1265-1274.