

本文引用: 李 琰, 刘佑晖, 蔡虎志, 林湘东, 陈新宇. 温阳振衰颗粒通过调节 lncRNA LOC103694972/miR-29c-3p 减轻 TGF- β 1 诱导 NRK-49F 细胞的纤维化[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(9): 1553-1560.

温阳振衰颗粒通过调节 lncRNA LOC103694972/miR-29c-3p 减轻 TGF- β 1 诱导 NRK-49F 细胞的纤维化

李 琰, 刘佑晖, 蔡虎志, 林湘东, 陈新宇*
湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

[摘要] **目的** 探讨温阳振衰颗粒通过 lncRNA LOC103694972/miR-29c-3p 对 TGF- β 1 诱导的大鼠肾间质成纤维细胞(NRK-49F)的纤维化的影响。**方法** 采用 TGF- β 1(10 ng·mL⁻¹)处理 NRK-49F 细胞 24 h, 构建纤维化细胞模型。造模结束后给予空白血清、温阳振衰颗粒含药血清和缬沙坦胶囊含药血清干预。CCK-8 法检测温阳振衰颗粒对 NRK-49F 增殖的影响。实时荧光定量 PCR 检测 LOC103694972 和 miR-29c-3p 表达。Western blot 法检测纤维化相关因子 I 型胶原(Collagen I)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达。同时研究过表达或沉默 LOC103694972, 温阳振衰颗粒含药血清对 TGF- β 1 干预的 NRK-49F 细胞的影响。双荧光素酶报告实验检测 LOC103694972 与 miR-29c-3p 之间的调控作用。**结果** 温阳振衰颗粒明显减弱 TGF- β 1 诱导的细胞增殖和 LOC103694972 的表达($P<0.05$), 促进 miR-29c-3p 的表达($P<0.05$), 其干预效果与缬沙坦胶囊含药血清效果一致。双荧光素酶实验证实 LOC103694972 靶向调控 miR-29c-3p。过表达 LOC103694972 促进温阳振衰颗粒含药血清干预下 TGF- β 1 诱导 NRK-49F 细胞的活力, 以及 α -SMA 蛋白、Collagen I 蛋白的表达($P<0.05$)。而沉默 LOC103694972 具有相反的效果($P<0.05$)。**结论** 温阳振衰颗粒通过下调 LOC103694972 促进 miR-29c-3p 的表达, 进而抑制 TGF- β 1 诱导的 NRK-49F 细胞纤维化。

[关键词] 温阳振衰颗粒; 转化生长因子 β 1; LOC103694972; miR-29c-3p; 纤维化; NRK-49F 细胞

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.09.002

Wenyang Zhenshuai Granules alleviated TGF- β 1-induced fibrosis of NRK-49F cells by regulating lncRNA LOC103694972/miR-29c-3p

LI Yan, LIU Youhui, CAI Huzhi, LIN Xiangdong, CHEN Xinyu*

The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To explore the effects of Wenyang Zhenshuai Granules on the fibrosis of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-induced rat renal interstitial fibroblasts (NRK-49F) through lncRNA LOC103694972/miR-29c-3p. **Methods** NRK-49F cells were cultured and induced by TGF- β 1 (10 ng·mL⁻¹, 24 h) to construct a renal fibrosis cell model. After the modeling, cells were given blank serum, Wenyang Zhenshuai Granules-containing serum and valsartan capsules-containing serum as interventions. CCK-8 assay was used to check the effects of Wenyang Zhenshuai Granules on the proliferation of NRK-49F cells. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to check the expressions of LOC103694972 and miR-29c-3p. Western blot was used to examine the expression of fibrosis-related factors Type I collagen (Collagen I) and α -smooth muscle actin (α -SMA). The effects of Wenyang Zhenshuai Granules-containing serum on NRK-49F cells with overexpression or silencing of TGF or LOC103694972 was also studied. Dual luciferase reporting assay was used to test the regulation of LOC103694972 on

[收稿日期] 2023-01-03

[基金项目] 湖南省教育厅一般项目(20C1412); 湖南省研究生科研创新项目(CX2018B474); 全国名中医药专家陈新宇寒舍传承工作室建设项目(国家中医药人教函[2022]75号)。

[第一作者] 李 琰, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 中医内科学心肾疾病的中医药防治。

[通信作者] * 陈新宇, 男, 博士, 教授, E-mail: cxychen2021@126.com。

miR-29c-3p. **Results** Wenyang Zhenshuai Granules significantly reduced cell proliferation and LOC103694972 expression induced by TGF- β 1 ($P<0.05$), and promoted miR-29c-3p expression in TGF- β 1-induced NRK-49F cell ($P<0.05$). The intervention effect was consistent with that of valsartan capsule-containing serum. Dual luciferase reporting assay confirmed the targeted regulation of LOC103694972 on miR-29c-3p. Overexpression of LOC103694972 promoted the vitality of NRK-49F cells induced by TGF- β 1 and the expression of Collagen I and α -SMA proteins under the intervention of Wenyang Zhenshuai Granules-containing serum ($P<0.05$). While silencing LOC103694972 had the opposite effect ($P<0.05$). **Conclusion** Wenyang Zhenshuai Granules can promote the expression of miR-29c-3p by down-regulating LOC103694972, thereby inhibiting TGF- β 1-induced NRK-49F cell fibrosis.

[**Keywords**] Wenyang Zhenshuai Granules; transforming growth factor β 1; LOC103694972; miR-29c-3p; fibrosis; NRK-49F cell

肾纤维化(renal fibrosis, RF)临床特征表现为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)大量累积与纤维细胞发生异常增生,从而引起肾间质纤维化与肾小球硬化^[1-2]。肾纤维化是各种慢性肾脏病进展到慢性肾衰竭的必经阶段^[3],也是慢性肾衰竭进展的病理基础^[4]。近年来,以肾纤维化为临床病理特征的慢性肾脏病,呈现出高发病率、高死亡率及逐年上升特点,已然成为危害人类健康的重大慢性疾病之一^[5-6]。因此,有效抑制或逆转肾纤维化,对防治肾脏疾病的发生与延缓其病态的发展具有重要意义。然而,至今还未发现抑制或治疗肾纤维化的有效方法^[7-8]。

长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)是一类长链非编码 RNA,在肾纤维化中表达失调^[9-10]。微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是内源性非编码 RNA,参与慢性肾脏疾病的发生和发展^[11]。已有研究证实 lncRNA/miRNA 参与肾纤维化的疾病过程^[12-13]。据报道,lncRNA 可以调节糖尿病,并影响肾纤维化进展^[14]。比如,lncRNA OIP5-AS1 可以诱导上皮间质转化和肾纤维化^[15]。沉默 lncRNA TCONS_00088786 可以减少肾纤维化^[16]。lncRNA Blnc1 可以通过 Nrf2/HO-1 和 NF- κ B 通路影响肾纤维化^[17]。已有很多文献报道,miR-29c 家族在肾纤维化过程中扮演者重要角色^[18-20],其中 miR-29c-3p 可以抑制纤维化,已然成了新热点^[7]。前期实验通过挖掘多个 lncRNA,从中选择 lncRNA LOC103694972,且通过生物信息学预测分析发现 lncRNA LOC103694972 与 miR-29c-3p 具有潜在的结合位点,但二者在肾纤维化及其治疗中的作用尚未可知。

温阳振衰颗粒,由附子、干姜、甘草、红参等组成,附子与干姜可以温肾养阳,甘草调虚补气,红参补火助阳^[21-22]。研究表明,温阳振衰颗粒可以通过 lncRNA MiR143HG/miR-143 治疗慢性心力衰竭^[23-24]。临床上,温阳振衰颗粒常被用于治疗阳虚证慢性肾衰竭^[25],但目前关于温阳振衰颗粒在肾纤维化中的作用机制研究暂无报道。因此,温阳振衰颗粒是否通过

调节 lncRNA LOC103694972/miR-29c-3p 影响 NRK-49F 细胞的纤维化有待探讨。本研究旨在探究温阳振衰颗粒对转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)诱导的大鼠肾细胞(NRK-49F 细胞)纤维化的作用及其潜在机制,以期为肾纤维化的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

NRK-49F 细胞(货号 iCell-r035)购自上海赛百慷生物技术公司。温阳振衰颗粒(规格:8 g/袋,批号 20210322)由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供。缬沙坦胶囊(国药准字 H20030153)购自北京诺华制药有限公司。TGF β 1(货号 ab50036)购自英国 Abcam 公司。293A 细胞(货号 HG-NC071),LOC103694972 过表达或沉默质粒(货号 HG-L23651)购自长沙 Honorgene 公司。Collagen I 抗体(货号 14695-1-AP,1:2000), α -SMA 抗体(货号 14395-1-AP,1:6 000), β -actin (货号 66009-1-Ig,1:5 000),HRP goat anti-Rabbit IgG(货号 SA00001-2,1:6 000)购自美国 Proteintech 公司。

胎牛血清(货号 10099141)和 DMEM 高糖培养基(货号 11995065)购自美国 Gibco 公司。ECL 超敏化学发光显色液试剂盒(货号 AWB0005a)和 BCA 蛋白定量试剂盒(货号 AWB0104c)购自长沙艾碧维生物有限公司。双荧光素酶检测试剂盒(货号 E1910)购自美国 Promega 公司。

1.2 主要仪器

直热式二氧化碳培养箱(上海三腾仪器有限公司,DH-160I),超净工作台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司,YT-CJ-2NB),倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器仪表有限公司,DSZ2000X),多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司,MB-530),荧光定量 RCP 仪(赛默飞世尔科技公司,QuantStudio1),电泳仪(北京六一仪器厂,DYY-2C),化学发

光检测仪(美国 promega 公司, GloMax 20/20)。

1.3 大鼠含药血清的制备

本研究已获得湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会的批准(ZYFY20220722)。斯泼累格·多雷(Sprague Dawley)大鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。大鼠分别给予温阳振衰颗粒溶液($144 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 缬沙坦溶液($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)和生理盐水($10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃处理, 连续 7 日, 每日 1 次。7 d 后, 采用 7% 水合氯醛($5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉大鼠, 行腹主动脉取血。血液样本在 $2\ 500 \text{ r/min}$ 离心 10 min, 取上清进行灭活($56 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min)处理。采用 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌, 获得各处理组血清。血清置 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.4 细胞实验与分组处理

NRK-49F 细胞培养在 DMEM 高糖培养基 + 15% 胎牛血清, 培养环境为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 , 饱和湿度。当细胞密度达到 80%~90% 进行传代培养。细胞随机分为正常组、TGF- β 1 处理组(TGF- β 1 组)、TGF- β 1 + 10% 空白组血清组(TGF- β 1 + B 组)、TGF- β 1 + 10% 温阳振衰含药血清组(TGF- β 1 + W 组)、TGF- β 1 + 10% 缬沙坦含药血清组(TGF- β 1 + X 组)、TGF- β 1 + 10% 温阳振衰含药血清 + si-NC 组(TGF- β 1 + W + si-NC 组)、TGF- β 1 + 10% 温阳振衰含药血清 + si-LOC 组(TGF- β 1 + W + si-LOC 组)、TGF- β 1 + 10% 温阳振衰含药血清 + oe-NC 组(TGF- β 1 + W + oe-NC 组)、TGF- β 1 + 10% 温阳振衰含药血清 + oe-LOC 组(TGF- β 1 + W + oe-LOC)。细胞在 TGF- β 1 组采用 $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TGF- β 1 处理 24 h。细胞在 TGF- β 1 + B 组, TGF- β 1 + W 组和 TGF- β 1 + X 组采用 TGF- β 1 与药物同时处理。细胞在 TGF- β 1 + W + si-NC 组, TGF- β 1 + W + si-LOC 组, TGF- β 1 + W + oe-NC 组和 TGF- β 1 + W + oe-LOC 组分别通过 lip2000 转染 $2.5 \text{ }\mu\text{g}$ 的 si-NC, si-LOC, oe-NC 和 oe-LOC 质粒 48 h, 然后进行 TGF- β 1 和药物干预。

1.5 CCK-8 实验

采用 CCK-8 试剂盒检测温阳振衰血清对 TGF- β 1 处理后细胞增殖的影响。取对数生长期的细胞, 用胰酶消化细胞。细胞离心后用完全培养基重悬, 以 5×10^3 个细胞/孔的密度种植于 96 孔板。培养 24 h 后, 去除旧的培养基, 按照实验分组分别加入 TGF- β 1 和含药血清, 作用 24 h。然后, 去除原培养基, 每孔加入新鲜完全培养基 $90 \text{ }\mu\text{L}$, 同时加入 $10 \text{ }\mu\text{L}$ CCK-8 溶液, 混匀。细胞在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续孵育 4 h。采用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度, 实验结果以光密度值表征细胞活性大小。

1.6 实时荧光定量 PCR

细胞消化、收集, 加入 RNA 保存液。按照 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA。使用逆转录试剂盒, 将 RNA 逆转录成 cDNA。再用实时荧光定量 PCR 法测定 lncRNA LOC103694972, miR-29c-3p 的表达。分别以 β -actin 及 5S 为内参对照基因。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。引物序列为: miR-29c-3p, 上游引物 $5'$ -GGCTGACCGATTCTCCTGG- $3'$, 下游引物 $5'$ -TCCCCCTACATCATAACCGATT- $3'$, 76 bp。LOC103694972, 上游引物 $5'$ -AAACGCCGAGATAGACCGAAC- $3'$, 下游引物 $5'$ -GTGCTCTACCGCTTCGCTCA- $3'$, 138 bp。 β -actin, 上游引物 $5'$ -ACATCCGTAAGACCTCTATGCC- $3'$, 下游引物 $5'$ -TACTCCTGCTTGCTGATCCAC- $3'$, 223 bp。5s, 上游引物 $5'$ -GCCTACAGCCATACCACCCGAA- $3'$, 下游引物 $5'$ -CCTACAGCACCCGGTATCCCA- $3'$, 116 bp。PCR 反应参数为: $30 \text{ }\mu\text{L}$ 体系, 预变性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min, 变性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, 退火延伸 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 设置 40 循环数。数据分析以 β -actin 作为内参, 采用参照基因 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因 LOC103694972 和 miR-29c-3p 的相对表达量。

1.7 双荧光素酶实验与分组

采用 TargetScan 数据库 (<http://www.Targetscan.org/>) 预测 LOC103694972 与 miR-29c-3p 的结合位点, 分别构建 LOC103694972 野生型(psiCHECK-2-LOC972-WT) 和突变型(psiCHECK-2-LOC972-Mut) 质粒。将 293A 细胞培养于 DMEM 培养基中。待细胞密度达到 80%~90%, 用 0.25% 胰酶消化传代。取对数生长期细胞进行干预, 随机分为: psiCHECK-2-LOC972-WT+NC mimics 组、psiCHECK-2-LOC972-WT+miR-29c-3p mimics 组、psiCHECK-2-LOC972-Mut+NC mimics 组、psiCHECK-2-LOC972-Mut+miR-29c-3p mimics 组。细胞共转染和培养 48 h 后, 收集细胞沉淀。采用双荧光素酶活性检测试剂盒, 根据说明书检测细胞荧光素酶活性, 并计算海肾荧光素酶与萤火虫荧光素酶的比值。

1.8 Western blot

细胞按照分组给予相应处理后, 收集细胞沉淀。各组加入适当的细胞裂解液裂解细胞, $12\ 000 \text{ r/min}$, 离心 10 min, 提取细胞总蛋白。采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。蛋白样品经过电泳分离(恒压 80 V , 约 0.5 h; 110 V , 约 1.5 h)后, 通过转膜电泳(恒流 300 mA , α -SMA 约 60 min, Collagen I 约 120 min) 转移到 NC 膜。膜加入一抗孵育, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。次日,

TBST洗膜3次,每次15 min。然后,膜加入二抗室温孵育2 h。采用TBST洗3次,每次15 min。将NC膜置于凝胶成像仪器中,滴加适量ECL工作液。通过凝胶成像仪采集图像,显影曝光。 β -actin为内参,使用Image J软件进行条带分析。

1.9 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行分析,符合正态分布的以“ $\bar{x}\pm s$ ”数据表示。两组之间比较采用非配对 T 检验。三组以上比较采用one-way ANOVA, Tukey's进行事后检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 温阳振衰颗粒含药血清影响 NRK-49F 细胞增殖

与正常组对比,模型组细胞呈现出长梭形,与周围细胞分离,出现纤维化,说明大鼠NRK-49F细胞纤维化模型构建成功(图1A)。经过TGF- β 1+W或TGF- β 1+X处理, NRK-49F细胞呈扁圆形,纤维化减弱,趋向正常组($P<0.05$)(图1A)。CCK-8实验结果显示,与正常组对比, TGF- β 1组吸光度升高($P<0.05$),表明细胞活力增加(图1B)。与TGF- β 1组对比, TGF- β 1+W及TGF- β 1+X组吸光度显著降低, ($P<0.05$)(图1B)。

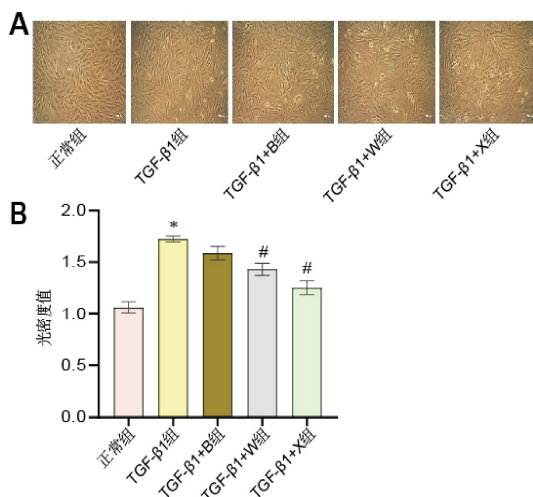


图1 温阳振衰颗粒含药血清对TGF- β 1诱导NRK-49F细胞增殖的影响

注:与对照组比较, $*P<0.05$;与TGF- β 1组比较, $\#P<0.05$ 。

2.2 温阳振衰含药血清影响 NRK-49F 细胞中 LOC103694972 和 miR-29c-3p 的表达

与正常组相比, TGF- β 1处理组中LOC103694972表达水平明显升高($P<0.01$), miR-29c-3p表达显著降低($P<0.01$)(图2A)。与TGF- β 1+B组相比, TGF- β 1+W组中LOC103694972表达水平降低($P<0.01$), miR-29c-3p表达水平升高($P<0.01$)(图2A)。TGF- β 1+W组干预效果与TGF- β 1+X组干预效果相近

(图2A)。且通过相关性分析,发现LOC103694972表达水平与miR-29c-3p表达水平呈负相关($P<0.001$)(图2B)。

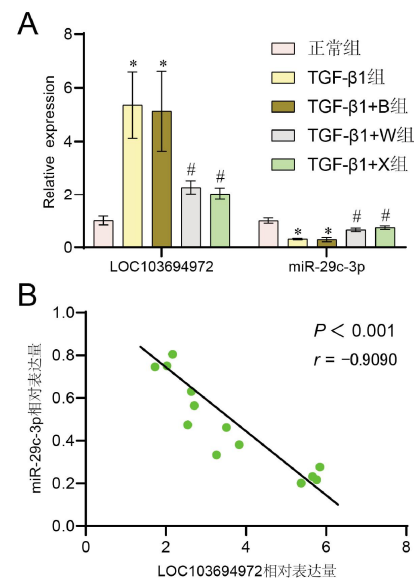


图2 温阳振衰颗粒含药血清对TGF- β 1诱导NRK-49F细胞中LOC103694972和miR-29c-3p表达的影响

注:与正常组比较, $*P<0.05$;与TGF- β 1组比较, $\#P<0.05$ 。比例尺=100 μ m。

2.3 LOC103694972 靶向调控 miR-29c-3p

采用TargetScan数据库预测miR-29c-3p与LOC103694972基因的结合位点(图3A)。荧光素酶实验结果进一步显示,与psiCHECK-2-LOC972-WT+NC mimics组相比, psiCHECK-2-LOC972-WT+miR-29c-3p mimics组293A细胞中荧光素酶活性明显降低($P<0.05$)(图3B)。与psiCHECK-2-LOC972-Mut+NC mimics组相比, psiCHECK-2-LOC972-Mut+miR-29c-3p mimics组293A细胞中荧光素酶活性无明显变化(图3B)。

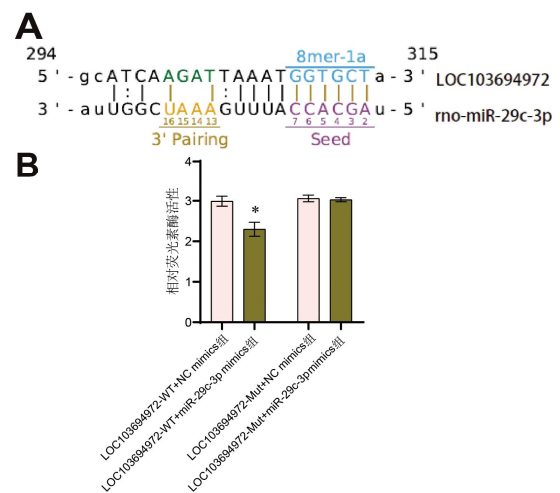


图3 双荧光素酶实验证实LOC103694972靶向调控miR-29c-3p

注:与psiCHECK-2-LOC972-WT+NC mimics组比较, $*P<0.05$ 。

2.4 过表达 LOC103694972 阻断温阳振衰颗粒含药血清对 TGF- β 1 诱导 NRK-49F 细胞增殖、纤维化的作用

与 TGF- β 1+W 组相比, TGF- β 1+W+oe-LOC 组中 LOC103694972 表达水平升高 ($P<0.01$), miR-29c-3p 表达水平降低 ($P<0.01$) (图 4A)。细胞形态学观察与 CCK-8 检测结果 oe-LOC 促进 TGF- β 1+W 组细胞的活力 (图 4B—C)。此外, 与 TGF- β 1+W 组相比, TGF- β 1+W+oe-LOC 组中 α -SMA 蛋白、Collagen I 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$) (图 4D—E)。

2.5 沉默 LOC103694972 促进温阳振衰颗粒含药血清对 TGF- β 1 诱导 NRK-49F 细胞增殖、纤维化的干预效果

与 TGF- β 1+W 组相比, TGF- β 1+W+si-LOC 组中 LOC103694972 表达水平降低 ($P<0.01$), miR-29c-3p 表达水平升高 ($P<0.01$) (图 5A)。细胞形态学观察与 CCK-8 检测结果证明 si-LOC 抑制 TGF- β 1+W 组细胞的活力 (图 5B—C)。此外, 与 TGF- β 1+W 组相比, TGF- β 1+W+si-LOC 组中 α -SMA 蛋白、Collagen I 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$) (图 5D—E)。

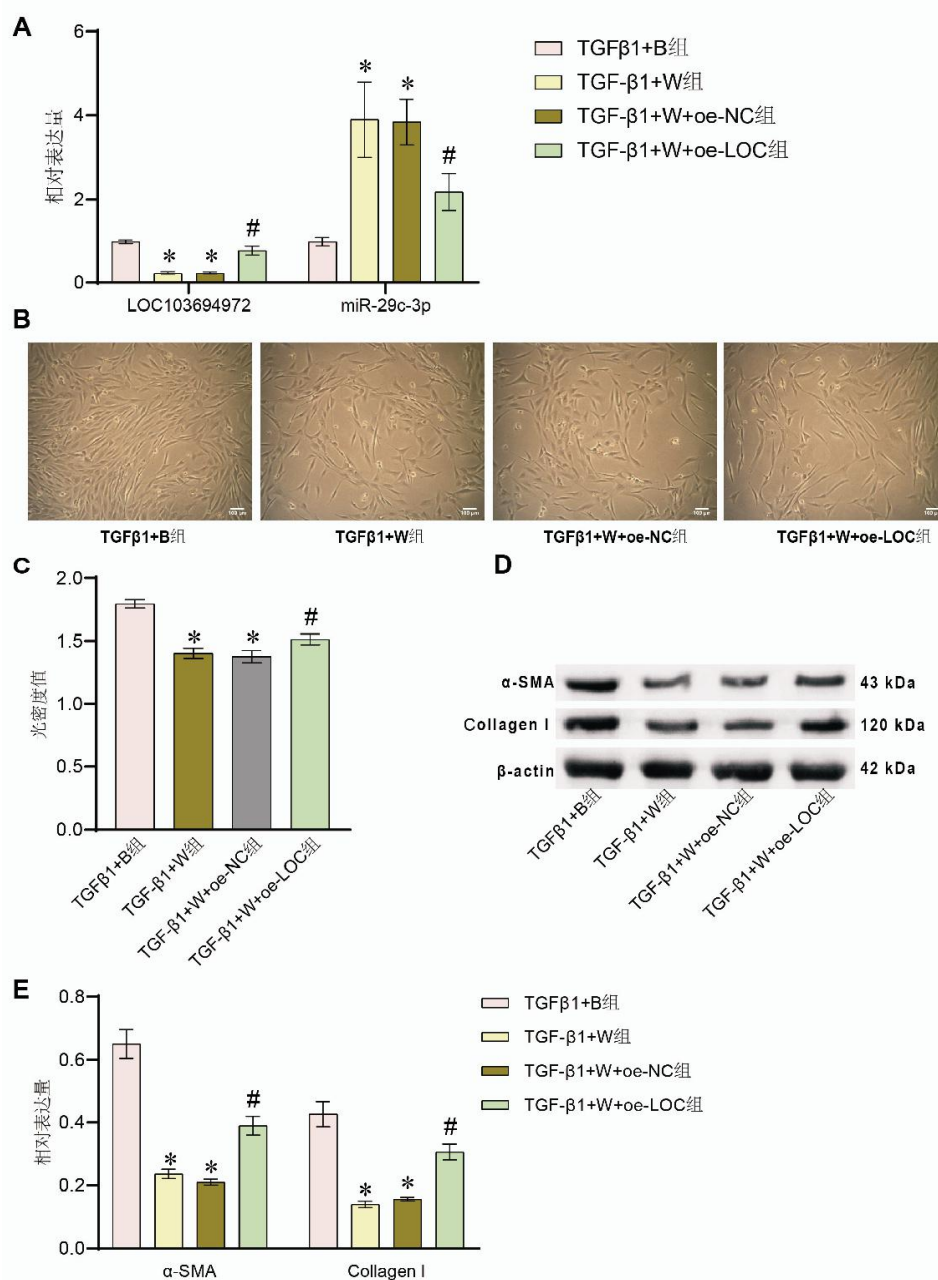


图 4 过表达 LOC103694972 抑制了温阳振衰颗粒含药血清对 TGF- β 1 诱导 NRK-49F 细胞的干预效果

注:与 TGF- β 1+B 组比较,* $P<0.05$;与 TGF- β 1+W 组比较,# $P<0.05$ 。比例尺=100 μ m。

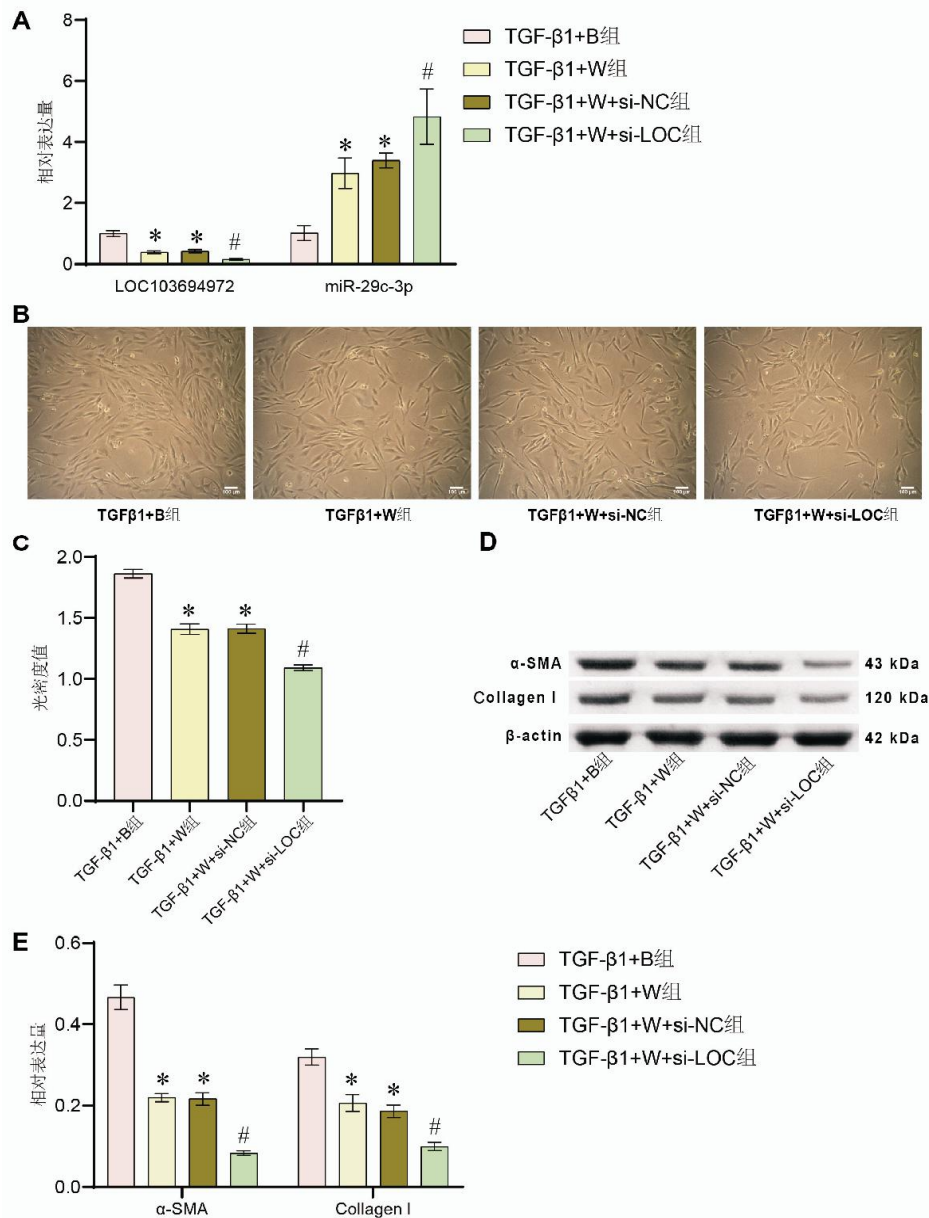


图5 沉默 LOC103694972 促进了温阳振衰颗粒含药血清对 TGF-β1 诱导 NRK-49F 细胞的干预效果

注:A.实时荧光定量 PCR 检测 LOC103694972 和 miR-29c-3p 的表达;B.细胞形态学观察;C. CCK-8 检测细胞活力;D-E. Western blot 检测 α-SMA 蛋白和 Collagen I 蛋白的表达。与 TGF-β1+B 组比,* $P<0.05$;与 TGF-β1+W 组比,# $P<0.05$ 。比例尺=100 μm。

3 讨论

近年来研究表明,中药多靶点、多途径治疗特点在抑制肾脏疾病的进展、恢复患者肾功能等方面有着很多优势^[26-27]。因此,寻找治疗肾间质纤维化的中医药,并探讨其作用的具体机制,可能有助于慢性肾衰竭的临床防治。温阳振衰颗粒,由附子、干姜、甘草、红参等组成,可以治疗慢性心力衰竭^[23,28-29]。TGF-β 通过上调基质蛋白合成、抑制基质降解、改变细胞-细胞相互作用导致组织纤维化^[30]。在 3D 疾

病模型中,TGF-β1 处理后,单层培养的 HK-2 细胞中纤维化标志物 α-SMA 蛋白的表达增加^[31]。NRK-49F 细胞常用于研究肾纤维化^[32]。本研究通过 TGF-β1 干预 NRK-49F 细胞诱导纤维化模型^[33],经处理 24 h 后,细胞梭形变长,发生纤维化,说明细胞纤维化模型构建成功。随后,本研究使用 10%温阳振衰颗粒含药血清处理细胞后,发现细胞增殖受到抑制,呈扁圆形,趋向正常。这一结果与刘佑晖^[25]等人的研究结果类似,证明温阳振衰颗粒对肾纤维化有治疗作用。

肾纤维化是众多慢性肾脏病的主要病理学基础,其发展过程跟很多因素有关,深入探究其病理机制可以为治疗提供新的思路^[34]。肾纤维化中许多 miRNA 和 lncRNA 起重要作用,例如 miRNA-184 靶向 HIF1AN 来驱动肾纤维化^[35]。XU 等^[22]人发现,温阳振衰颗粒可通过调控 lncRNA MiR143HG/miR-143,促进 ERK5 蛋白的表达和磷酸化,从而改善慢性心力衰竭。此外,lncRNA OIP5-AS1 诱导上皮间质转化和肾纤维化^[15]。LIANG 等^[36]人的研究发现,miR-29c-3p 可通过靶向转化生长因子-2 和基质金属蛋白酶 2,抑制心肌成纤维细胞中 COL1A1、COL3A1 和 α -SMA 的表达。本研究发现 LOC103694972 与 miR-29c-3p 之间存在靶向调控作用。与此同时,经温阳振衰颗粒含药血清处理后,miR-29c-3p 表达水平升高,且 LOC103694972、 α -SMA、Collagen I 表达水平降低。这些均证实温阳振衰颗粒含药血清可能通过调节 LOC103694972/miR-29c-3p 改善 TGF- β 1 诱导的 NRK-49F 细胞纤维化。

锁定的核酸-anti-miR-150 通过调节细胞因子信号 1/Janus 激酶/信号转换器和转录激活因子通路的抑制因子,拮抗人肾小管细胞的促纤维化通路^[37]。lncRNA NR_038323 过表达可以改善高糖诱导的胶原 I、胶原 IV 和纤维连接蛋白的表达水平,而 lncRNA NR_038323 敲低则起到相反的作用^[38]。双氢青蒿素通过调节 lncRNA MALAT1/miR-145/FAK 通路影响 TGF- β 1 诱导的肾纤维化^[39]。本研究发现过表达 LOC103694972 促进温阳振衰颗粒含药血清干预下 TGF- β 1 诱导 NRK-49F 细胞的活力,以及 α -SMA 蛋白、Collagen I 蛋白。而沉默 LOC103694972 具有相反的效果。因此,温阳振衰颗粒含药血清通过调控 LOC103694972/miR-29c-3p 改善 TGF- β 1 诱导的 NRK-49F 细胞纤维化。但具体的体内效果仍需动物实验进一步验证,这也是本研究的不足之处。本研究为温阳振衰颗粒改善肾纤维化提供了基础的理论依据,值得进一步深入探究。

此外,目前有研究证实 Sp1(一个转录因子)通过直接结合 lncRNA Gm26669 启动子提高其表达水平,从而促进了 Collagen I 和纤维连接蛋白的表达水平^[40]。lncRNA Gas5 可以靶向调节转录因子 Creb5,从而调节细胞外纤维连接蛋白沉积^[41]。目前,本研究只关注了 LOC103694972/miR-29c-3p 在温阳振衰颗粒含药血清改善 TGF- β 1 诱导的 NRK-49F 细胞纤维化中的表达变化,并未进一步分析相关转录因子的表达调控。这是本研究的一个不足之处,有待

进一步探索。

综上所述,本研究表明,温阳振衰颗粒改善 TGF- β 1 诱导 NRK-49F 细胞的纤维化,其部分机制可以通过下调 LOC103694972 促进 miR-29c-3p 的表达。这将为肾纤维化的治疗研究的提供一个科学依据。

参考文献

- [1] KE B, ZHANG A F, WU X F, et al. The role of Krüppel-like factor 4 in renal fibrosis[J]. *Frontiers in Physiology*, 2015, 6: 327.
- [2] 曾锦江, 米 华. TGF- β /Smad 信号通路在肾纤维化中的研究进展[J]. *广东医学*, 2017, 38(15): 2412-2415.
- [3] DJUDJAJ S, BOOR P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2019, 65: 16-36.
- [4] 高 洁, 刘益涛, 董 华, 等. 三七总皂甙通过 Smads 信号通路减缓慢性肾衰竭大鼠肾间质纤维化进程的作用研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(6): 799-805.
- [5] SMYTH L J, DUFFY S, MAXWELL A P, et al. Genetic and epigenetic factors influencing chronic kidney disease[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2014, 307(7): F757-F776.
- [6] 尹 欣, 何泽云. Klotho 蛋白抗肾纤维化机制及中医药干预 Klotho 蛋白研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(4): 216-220.
- [7] SUN C M, ZHANG W Y, WANG S Y, et al. Erratum to: "Fer exacerbat renal fibrosis and can be targeted by miR-29c-3p"[J]. *Open Medicine*, 2023, 18(1): 20230755.
- [8] ZHANG Y Y, ZHU X Y, HUANG X, et al. Advances in understanding the effects of erythropoietin on renal fibrosis [J]. *Frontiers in Medicine*, 2020, 7: 47.
- [9] MERCER T R, DINGER M E, MATTICK J S. Long non-coding RNAs: Insights into functions[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(3): 155-159.
- [10] JIA H S, MA T T, HAO C S. Identification of candidate lncRNA biomarkers for renal fibrosis: A systematic review[J]. *Life Sciences*, 2020, 262: 118566.
- [11] MAHTAL N, LENOIR O, TINEL C, et al. microRNAs in kidney injury and disease[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2022, 18(10): 643-662.
- [12] DUAN Y R, CHEN B P, CHEN F, et al. LncRNA lnc-ISG20 promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by inducing AKT phosphorylation through miR-486-5p/NFAT5[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021, 25(11): 4922-4937.
- [13] WANG W, JIA Y J, YANG Y L, et al. LncRNA GAS5 exacerbates renal tubular epithelial fibrosis by acting as a competing endogenous RNA of miR-96-5p[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 121: 109411.
- [14] TAO H, SONG Z Y, DING X S, et al. LncRNAs and miRs as epigenetic signatures in diabetic cardiac fibrosis: New advances and perspectives[J]. *Endocrine*, 2018, 62(2): 281-291.

- [15] FU J X, SUN G Q, WANG H L, et al. LncRNA OIP5-AS1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and renal fibrosis in diabetic nephropathy via binding to miR-30c-5p[J]. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 2020, 34(3): 961-968.
- [16] ZHOU S G, ZHANG W, MA H J, et al. Silencing of LncRNA TCONS00088786 reduces renal fibrosis through miR-132[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2018, 22(1): 166-173.
- [17] FENG X Z, ZHAO J, DING J J, et al. LncRNA Blnc1 expression and its effect on renal fibrosis in diabetic nephropathy[J]. *American Journal of Translational Research*, 2019, 11(9): 5664-5672.
- [18] HUANG H Y, HUANG X Z, LUO S N, et al. The microRNA miR-29c alleviates renal fibrosis via TPM1-mediated suppression of the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 331.
- [19] MENG X M, TANG P M K, LI J, et al. TGF- β /smad signaling in renal fibrosis[J]. *Frontiers in Physiology*, 2015, 6: 82.
- [20] RAMDAS V, MCBRIDE M, DENBY L, et al. Canonical transforming growth factor- β signaling regulates disintegrin metalloprotease expression in experimental renal fibrosis via miR-29[J]. *The American Journal of Pathology*, 2013, 183(6): 1885-1896.
- [21] PASTORINO G, CORNARA L, SOARES S, et al. Licorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review[J]. *Phytotherapy Research*, 2018, 32(12): 2323-2339.
- [22] XU Z L, CHEN X Y, CHEN Q Y, et al. Effects of the Wenyang Zhenshuai Granule on the expression of LncRNA-MiR143HG/miR-143 regulating ERK5 in H9C2 cardiomyocytes[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2021, 2021: 6431007.
- [23] CHEN Q Y, CHEN J C, WANG C H, et al. microRNA-4660-3p mediates β -catenin-induced podocyte injury by targeting Wilms tumor 1[J]. *FASEB Journal*, 2020, 34(11): 14424-14439.
- [24] 蔡虎志, 王笑莹, 陈青扬, 等. 温阳振衰颗粒对阿霉素致心肌细胞损伤 MEF2 表达的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(18): 1939-1941, 1953.
- [25] 刘佑晖, 李 琰, 蔡虎志, 等. 温阳振衰颗粒治疗慢性肾功能衰竭(阳虚证)的临床研究[J]. *中国中医急症*, 2018, 27(2): 202-204, 211.
- [26] 米秀华, 王高强, 沈丽萍, 等. 实脾固肾化痰方对阿霉素肾纤维化大鼠肾功能保护作用的研究[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2015, 16(9): 774-777.
- [27] 吉 晶, 何立群. 中西医防治肾纤维化的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(19): 221-228.
- [28] 王 楠, 唐燕萍, 蔡虎志, 等. 温阳振衰颗粒对慢性心力衰竭大鼠的作用机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(18): 2456-2459.
- [29] 唐燕萍, 王 涛, 杜凤娇, 等. 温阳振衰颗粒对阿霉素所致慢性心力衰竭兔的影响及其机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(9): 1085-1087.
- [30] 杨萍芬, 牛艳芬. TGF- β 1/Smad 信号通路在组织纤维化中的研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2019, 46(10): 738-744.
- [31] HWANG S H, LEE Y M, CHOI Y, et al. Role of human primary renal fibroblast in TGF- β 1-mediated fibrosis-mimicking devices[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19): 10758.
- [32] LIU X, MIAO J H, WANG C, et al. Tubule-derived exosomes play a central role in fibroblast activation and kidney fibrosis[J]. *Kidney International*, 2020, 97(6): 1181-1195.
- [33] 邱黎明, 张 澜, 申萌萌, 等. 甘草酸对 TGF- β 1 诱导的 NRK-49F 细胞活化及分泌细胞外基质的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2021, 44(5): 421-427.
- [34] SCIASCIA S, COZZI M, BARINOTTI A, et al. Renal fibrosis in lupus nephritis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(22): 14317.
- [35] CHEN B. The miRNA-184 drives renal fibrosis by targeting HIF1AN in vitro and in vivo[J]. *International Urology and Nephrology*, 2019, 51(3): 543-550.
- [36] LIANG J N, ZOU X, FANG X H, et al. The Smad3-miR-29b/miR-29c axis mediates the protective effect of macrophage migration inhibitory factor against cardiac fibrosis[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*, 2019, 1865(9): 2441-2450.
- [37] HAO X N, LUAN J J, JIAO C C, et al. LNA-anti-miR-150 alleviates renal interstitial fibrosis by reducing pro-inflammatory M1/M2 macrophage polarization[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 913007.
- [38] GE Y N, WANG J, WU D K, et al. LncRNA NR_038323 suppresses renal fibrosis in diabetic nephropathy by targeting the miR-324-3p/DUSP1 axis[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2019, 17: 741-753.
- [39] LIU P H, ZHANG B, CHEN Z, et al. m6A-induced LncRNA MALAT1 aggravates renal fibrogenesis in obstructive nephropathy through the miR-145/FAK pathway[J]. *Aging*, 2020, 12(6): 5280-5299.
- [40] TIAN J, XIAO Z, WEI J, et al. NCTD prevents renal interstitial fibrosis via targeting Sp1/LncRNA Gm26669 axis[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2021, 17(12): 3118-3132.
- [41] SU H H, XIE J Z, WEN L J, et al. LncRNA Gas5 regulates Fn1 deposition via Creb5 in renal fibrosis[J]. *Epigenomics*, 2021, 13(9): 699-713.

(本文编辑 苏 维)