doi:10.11659/jjssx.11E022103

·基础研究·

RNA结合蛋白LIN28对糖尿病肾病的保护机制研究

王艳丽,李 雁,叶 芳,孙 燕,侯俊霞,程洁萍,艾比班,李金峰,张新菊 (新疆生产建设兵团医院内分泌科,新疆乌鲁木齐 830002)

[摘 要] **目的** 探索RNA结合蛋白LIN28对糖尿病肾病(DN)的保护机制。**方法** 在HEK 293T细胞中通过腺病毒介导过表达或敲低LIN28。通过RNA-Seq转录组测序和生物信息学分析获得过表达LIN28后显著改变的基因和功能信号通路。体外过表达LIN28实验分组为Control组、Treatment组、Adv-LIN28-OE+D-核糖组和Adv-LIN28-NC+D-核糖组;敲低LIN28实验分组为Control组、Treatment组、Adv-shRNA LIN28+D-核糖组和Adv-shRNA NT+D-核糖组。通过ELISA法测定上述各组细胞上清液人晚期糖基化终产物(AGEs)的水平。通过Western blot法测定上述各组细胞内RAGE、NF-κB和MMP-2的表达水平。**结果** RNA-Seq转录组测序和GO分析及KEGG分析结果显示,过表达LIN28导致HEK 293T细胞内AGE-RAGE信号通路显著下调($P<0.05$)。ELISA结果显示,与Control组相比,Treatment组细胞产生大量AGEs($P<0.05$);与Treatment组相比,Adv-LIN28-OE+D-核糖组细胞AGEs水平明显降低($P<0.05$),Adv-shRNA LIN28+D-核糖组细胞AGEs水平显著升高($P<0.05$)。Western blot结果显示,与Control组相比,Treatment组细胞内RAGE、NF-κB和MMP-2的表达水平显著升高($P<0.05$);与Treatment组相比,Adv-LIN28-OE+D-核糖组细胞内RAGE、NF-κB和MMP-2的表达水平显著降低($P<0.05$),Adv-shRNA LIN28+D-核糖组细胞内RAGE、NF-κB和MMP-2的表达水平则显著升高($P<0.05$)。**结论** 在体外细胞水平上通过腺病毒过表达LIN28,能够导致数千种基因发生显著性差异表达,特别是能够抑制在DN疾病进展中十分关键的糖尿病-并发症相关AGE-RAGE信号通路,发挥保护DN的作用。

[关键词] 糖尿病肾病;LIN28;腺病毒;AGE-RAGE信号通路;NF-κB;MMP-2

[中图分类号] R692.9 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-11-18

Protective mechanism of RNA binding protein LIN28 on diabetic nephropathy

WANG Yan-li, LI Yan, YE Fang, SUN Yan, HOU Jun-xia, CHENG Jie-ping, AI Bi-ban, LI Jin-feng, ZHANG Xin-ju
(Department of Endocrinology, Xinjiang Production and Construction Corps Hospital, Urumqi Xinjiang 830002, China)

Abstract: Objective To explore the protective mechanism of RNA binding protein LIN28 on diabetic nephropathy (DN). **Methods** LIN28 was overexpressed or knocked down by adenovirus in HEK 293T cells. The gene and functional signaling pathway significantly changed after overexpression of LIN28 were obtained through RNA Seq transcriptome sequencing and bioinformatics analysis. HEK 293T cells were divided into the Control group, the Treatment group, the Adv-LIN28-OE+D-ribose group and the Adv-LIN28-NC+D-ribose group in in vitro LIN28 overexpression studies. And HEK 293T cells were divided into the Control group, the Treatment group, the Adv-shRNA LIN28+D-ribose group and the Adv-shRNA NT+D-ribose group in in vitro LIN28 knockdown studies. ELISA was used to detect the levels of human advanced glycation end products (AGEs) of cells supernatants in the above groups. Western blot was used to detect the expression levels of RAGE, NF-κB and MMP-2 of cells in the above groups. **Results** The results of RNA-Seq transcriptome sequencing, GO analysis and KEGG analysis showed that overexpression of LIN28 resulted in a significant down-regulation of AGE-RAGE signaling pathway in HEK 293T cells ($P<0.05$). The results of ELISA showed that compared with the Control group, the cell in the Treatment group produced a large amount of AGEs ($P<0.05$); compared with the Treatment group, the AGEs level of cells in the Adv-LIN28-OE+D-ribose group was significantly decreased ($P<0.05$), while the AGEs level of cells in the Adv-shRNA LIN28+D-ribose group was increased ($P>0.05$). The results of Western blot showed that compared with the Control group, the expression levels of RAGE, NF-κB and MMP-2 of cells in the Treatment group were significantly increased ($P<0.05$); compared with the Treatment group, the expression levels of RAGE, NF-κB and MMP-2 of cells in the Adv-LIN28-OE+D-ribose group were significantly decreased ($P<0.05$), while the expression levels of RAGE, NF-κB and MMP-2 of cells in the Adv-shRNA LIN28+D-ribose group were significantly increased ($P>0.05$). **Conclusion** Overexpression of LIN28 by adenovirus at the cellular level in vitro can lead to significant differential expression of thousands of genes. In particular, it can inhibit the diabetes and complications-related AGE-RAGE signaling pathway, which is critical in the progression of DN disease, and play a role in protecting DN.

Keywords: diabetic nephropathy; LIN28; adenovirus; AGE-RAGE signaling pathway; NF-κB; MMP-2

[基金项目] 新疆生产建设兵团科技局社会发展领域(2018AB024)

[通信作者] 张新菊,E-mail:x152729@163.com

糖尿病的特征是胰岛素分泌缺陷、胰岛素作用缺陷或两者兼有导致的慢性高血糖症[1-2]。全球范围内每年约有160万人死于糖尿病,有超过4.22亿人患有2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)[3-5]。T2DM的不利健康风险因素包括脑卒中、心脏病、听力损失、失明、高血压、肾病和神经损伤[4-5]。糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)是慢性肾病的主要原因,高血糖与慢性肾病的发生、发展密切相关[6-8]。

RNA结合蛋白(RNA binding proteins,RBPs)对基因表达和转录后调控至关重要[9]。RNA必须与不同的RBPs相结合才能够完成RNA的转录后表达调控,最终完成蛋白质的表达[9]。LIN28是一种RBP,其主要功能是通过改变microRNA(miRNA)let7的表达从而调节下游靶基因的表达[10]。LIN28通过多种途径密切参与胰岛素抵抗和T2DM[11-12]。本研究拟探讨LIN28在DN发病进程中的作用,以期为制定以LIN28为靶点的DN治疗策略奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DNA酶Ⅰ(批号:10553214)、D-核糖(批号:V37891235)购自美国Sigma-Aldrich公司。pADV-mCMV-EGFP-3xFLAG购自上海和元生物有限公司。KCTM Stranded mRNA Library Prep Kit for Illumina(批号:203341256)购自美国ABclonal公司。人晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products,AGEs)ELISA测定试剂盒(批号:J-3154398730)购自上海江莱生物有限公司。兔抗人晚期糖基化终末产物受体(receptor of advanced glycation endproducts,RAGE)单抗(批号:E352117109)、核因子κB(nuclear factor kappa-B,NF-κB)单抗(批号:E3814238961)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase,MMP)-2单抗(批号:E2811841146)及兔抗人GAPDH多抗(批号:E5643526761)均购自美国Abcam公司,工作浓度分别为1∶1 500、1∶2 000、1∶2 000、1∶2 000;山羊抗兔IgG(H+L) HRP二抗(批号:7-G354623)购自杭州联科生物有限公司,工作浓度为1∶10 000。RNA-Seq转录组测序和生物信息学分析委托武汉生命之美科技有限公司代为完成。

测序仪(Novaseq 6000)购自美国Illumina公司,全功能酶标仪(Synergy H4)购自美国BioTek公司,凝胶成像系统(SH-520)购自杭州申花有限公司。

1.2 细胞培养

人胚肾细胞HEK 293T培养于含10%FBS、100 U/mL青霉素-链霉素混合液的高糖DMEM培养液中,置于5%CO_2、37 ℃恒温、湿润的孵育箱中维持培养。

1.3 腺病毒感染

过表达LIN28:扩增LIN28的开放阅读框(open reading frame,ORF),上游引物为5′-ATGACCGCCCGCGCCGGGGT-3′,下游引物为5′-CTACCCTCCCGCCCCATAA-3′;然后克隆至腺病毒载体pADV-mCMV-EGFP-3xFLAG中,制备Adv-LIN28-OE腺病毒,或空载体对照组Adv-LIN28-NC腺病毒。

敲低LIN28:将shRNA LIN28 5′-TTAAGTATAAGACCAGATTCA-3′,或shRNA NT 5′-AGTACGATACTACCGTGAGACG-3′克隆至腺病毒载体pADV-U6-shRNA-CMV-EGFP中,制备Adv-shRNA LIN28腺病毒,或对照组Adv-shRNA NT腺病毒。

然后经腺病毒包装,制备对应的腺病毒颗粒并感染HEK 293T细胞。

1.4 实验分组和细胞处理

RNA-Seq转录组测序实验将HEK 293T细胞分为Adv-LIN28-NC组(腺病毒过表达对照)和Adv-LIN28-OE组(腺病毒LIN28过表达)。

生化指标测定实验分组为Control组(HEK 293T细胞+10 μL PBS),Treatment组(HEK 293T细胞+20 mmol/L D-核糖溶解于10 μL PBS),Adv-LIN28-OE+D-核糖组(腺病毒LIN28过表达+20 mmol/L D-核糖溶解于10 μL PBS),Adv-LIN28-NC+D-核糖组(腺病毒过表达+20 mmol/L D-核糖溶解于10 μL PBS),Adv-shRNA LIN28+D-核糖组(Adv-shRNA LIN28腺病毒+20 mmol/L D-核糖溶解于10 μL PBS),Adv-shRNA NT+D-核糖组(Adv-shRNA NT腺病毒+20 mmol/L D-核糖溶解于10 μL PBS)[13]。

1.5 RNA-Seq转录组测序

使用TRIzol裂解和提取缓冲液提取总RNA。然后向总RNA中加入DNA酶Ⅰ裂解残存的DNA。取2 μg总RNA,使用KCTM Stranded mRNA Library Prep Kit for Illumina制备单链RNA测序文库。操作方法按照试剂盒中的说明书进行。随后富集200~500 bp的PCR产物。然后上机Novaseq 6000测序仪,使用PE150模块进行测序。

1.6 生物信息学分析RNA-Seq测序原始数据的清洁和比对

使用FASTX-Toolkit(v0.0.13)工具包去除原始测序读数中的接头序列和低质量碱基读数。之后,设置允许4个碱基错配的条件,通过HISAT2法将清洁的读数比对至人GRCh38基因组[14]。使用具有唯一映射的读数用于基因读数计数和FPKM计算[15]。

1.7 差异表达基因(differentially expressed genes,DEGs)分析

使用R Bioconductor包DESeq2法筛选DEGs[16]。

校正P<0.05,倍数变化>2或<0.5则识别为DEGs。

1.8 基因本体(gene ontology,GO)分析与京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)分析

使用KOBAS 2.0服务器识别GO术语和KEGG通路。使用超几何测试和Benjamini-Hochberg FDR控制程序定义每个术语的富集程度。

1.9 AGEs测定

使用ELISA测定试剂盒对细胞上清液中的AGEs进行测定。具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。使用全功能酶标仪在激发波长为355 nm、发射波长为460 nm条件下测定吸光值。

1.10 Western blot

使用RIPA裂解和提取缓冲液对HEK 293T细胞进行裂解并提取总蛋白。使用10%脱脂奶粉对PVDF膜进行封闭。然后向PVDF膜上滴加一抗工作液,于4 ℃孵育过夜;次日向PVDF膜上滴加二抗工作液,于室温孵育1 h。使用ECL超敏化学发光底物对目的条带进行显影。使用凝胶成像系统对条带进行扫描并拍照。使用Image J(v 1.8.0)对图像进行灰度测定和分析。

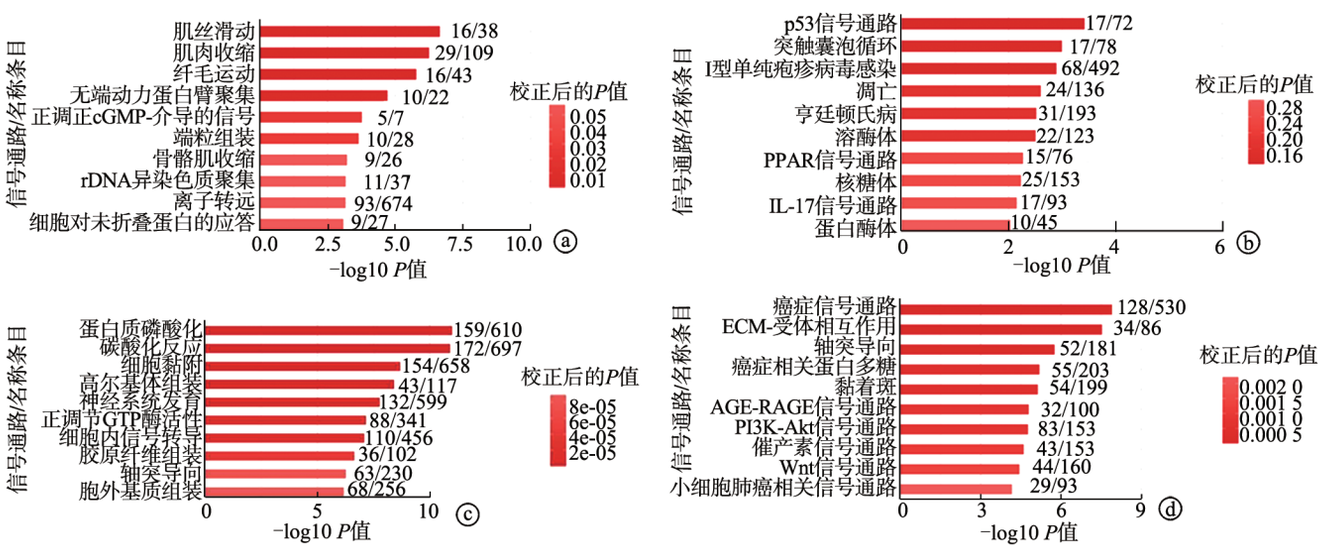
1.11 统计学处理

使用GraphPad Prism v8软件对计量数据进行统计学处理和分析。计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析。以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LIN28过表达处理导致数千种基因发生显著性差异表达

Adv-LIN28-OE组显著上调表达的基因共4 255个。对这4 255个基因进行GO分析,显著上调表达的基因主要富集到肌丝滑动、肌肉收缩、纤毛运动等信号通路,见图1a。KEGG分析结果显示,显著上调表达的基因主要富集到p53信号通路、突触囊泡循环、Ⅰ型单纯疱疹病毒感染等信号通路,见图1b。Adv-LIN28-OE组显著下调表达的基因共3 437个。对这3 437个基因进行GO分析,显著下调表达的基因主要富集到蛋白质磷酸化、磷酸化反应、细胞黏附等信号通路,见图1c。KEGG分析结果显示,显著下调表达的基因主要富集到癌症信号通路、ECM-受体相互作用、轴突导向等信号通路,其中AGE-RAGE信号通路为第6位显著下调的KEGG通路,见图1d。



a:Adv-LIN28-OE组显著上调基因富集的前10个GO通路;b:显著上调基因富集的前10个KEGG通路;c:Adv-LIN28-OE组显著下调基因富集的前10个GO通路;d:显著下调基因富集的前10个KEGG通路

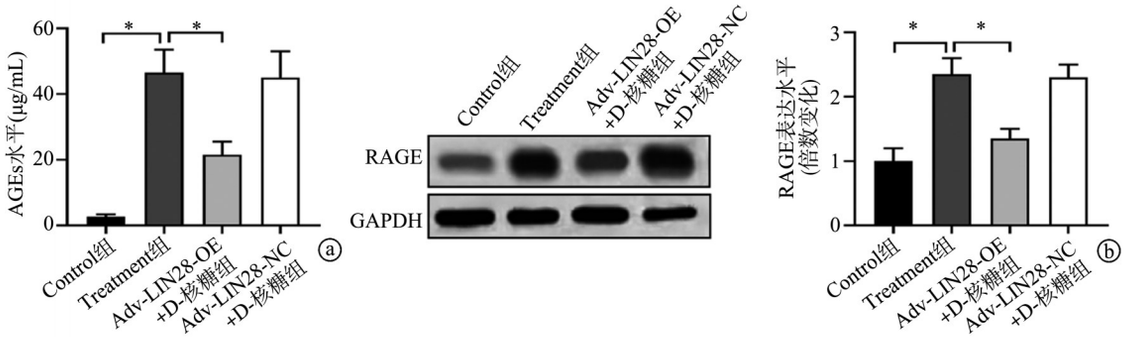
图1 对LIN28过表达的HEK 293T细胞进行RNA-Seq转录组测序和生物信息学分析的结果图

2.2 过表达LIN28能够抑制HEK 293T细胞产生AGEs并下调RAGE的表达

与Control组比较,Treatment组细胞上清液中AGEs的水平显著升高(P<0.05);而与Treatment组相比,Adv-LIN28-OE+D-核糖组细胞上清液中AGEs的水平显著降低(P<0.05),Adv-LIN28-NC+D-核糖组则无显著差异(P>0.05),见图2a。与Control组相比,Treatment组细胞内RAGE的表达水平显著升高(P<0.05);而与Treatment组相比,Adv-LIN28-OE+D-核糖组细胞内RAGE的表达水平显著降低(P<0.05),Adv-LIN28-NC+D-核糖组则无显著差异(P>0.05),见图2b。

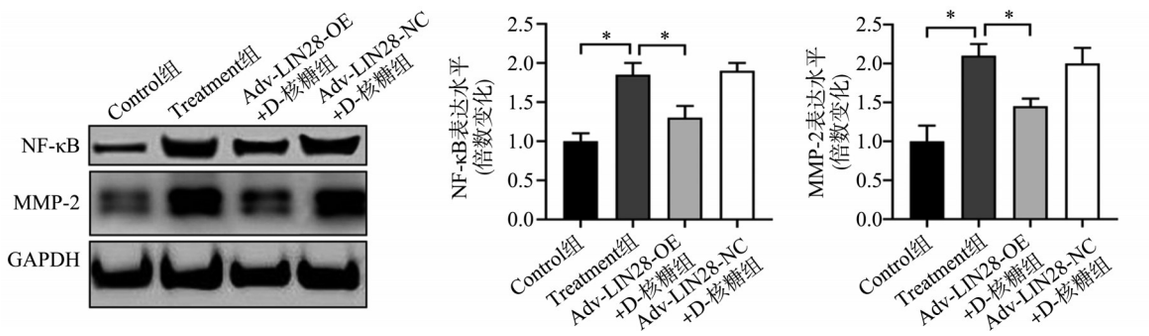
2.3 过表达LIN28能够下调NF-κB的活化和MMP-2的表达

与Control组相比，Treatment组细胞内NF-κB、MMP-2的表达水平显著升高（$P<0.05$）；而与Treatment组相比，Adv-LIN28-OE+D-核糖组细胞内NF-κB、MMP-2的表达水平显著降低（$P<0.05$），Adv-LIN28-NC+D-核糖组则无显著差异（$P>0.05$），见图3。



a:AGEs水平；b:Western blot测定各组RAGE表达水平 *:$P<0.05$

图2 过表达LIN28对HEK 293T细胞上清液AGEs水平和细胞内RAGE表达水平的影响

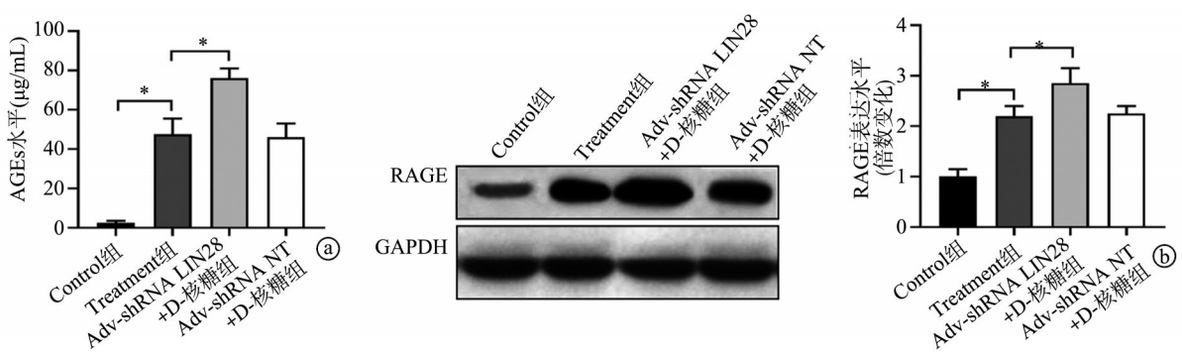


*:$P<0.05$

图3 过表达LIN28对HEK 293T细胞内NF-κB和MMP-2表达水平的影响

2.4 敲低LIN28能促进HEK 293T细胞产生AGEs并上调RAGE的表达

与Control组相比，Treatment组细胞上清液中AGEs的水平显著升高（$P<0.05$）；而与Treatment组相比，Adv-shRNA LIN28+D-核糖组细胞上清液中AGEs的水平进一步显著升高（$P<0.05$），Adv-shRNA NT+D-核糖组则无显著差异（$P>0.05$），见图4a。与Control组相比，Treatment组细胞内RAGE的表达水平显著升高（$P<0.05$）；而与Treatment组相比，Adv-shRNA LIN28+D-核糖组细胞内RAGE的表达水平进一步显著升高（$P<0.05$），Adv-shRNA NT+D-核糖组则无显著差异（$P>0.05$），见图4b。



a:AGEs水平；b:Western blot测定各组RAGE表达水平 *:$P<0.05$

图4 敲低LIN28对HEK 293T细胞上清液AGEs水平和细胞内RAGE表达水平的影响

2.5 敲低LIN28能够促进NF-κB的活化和MMP-2的表达

与Control组相比，Treatment组细胞内NF-κB的表达水平显著升高（$P<0.05$）；而与Treatment组相比，Adv-shRNA LIN28+D-核糖组细胞内NF-κB、MMR-2的表达水平进一步显著升高（$P<0.05$），Adv-shRNA NT+D-核糖组则无显著差异（$P>0.05$），见图5。

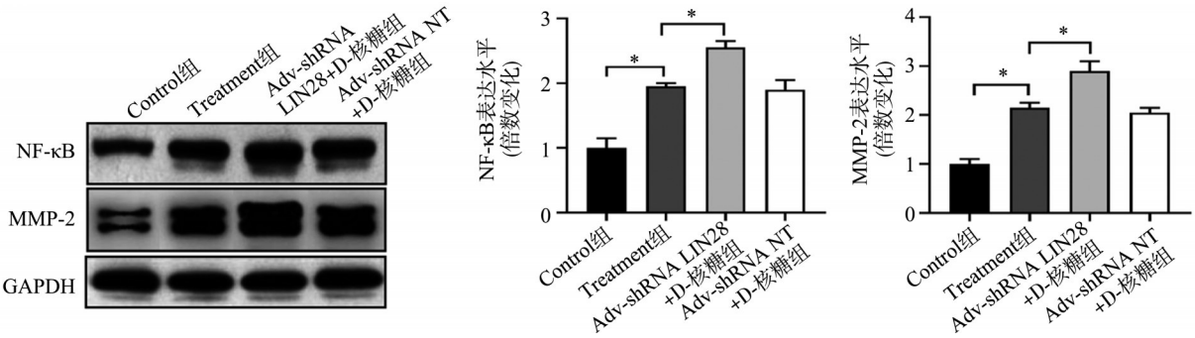


图5 敲低LIN28对HEK 293T细胞内NF-κB和MMP-2表达水平的影响

3 讨论

目前对LIN28的研究仍然主要集中在以秀丽隐杆线虫为模型的胚胎发育领域[17-18]。少数研究显示，LINC00355通过LIN28a增强鸟嘌呤核苷酸交换因子T（guanine nucleotide exchange factor T，GEFT）的表达[19]。GEFT在结直肠癌组织中高表达，可促进结直肠癌的发生和转移，并与结直肠癌患者预后较差密切相关[19]。另有体外实验显示，二甲双胍通过抑制AMPKα/LIN28通路上调8-氧鸟嘌呤DNA糖基化酶抑制高糖诱导的内皮细胞内的氧化自由基水平[20]。本研究通过在人胚肾细胞HEK 293T中过表达LIN28，并进行RNA-Seq转录组测序和生物信息学分析。经KEGG分析显示，过表达LIN28后的HEK 293T细胞内糖尿病-并发症相关AGE-RAGE信号通路被显著抑制。这是一项重要的新发现，因为AGE-RAGE信号通路在糖尿病及其各种并发症中扮演着重要的角色。

基于上述结果，我们进行了进一步的验证实验：对高糖培养条件下的HEK 293T细胞进行了腺病毒LIN28过表达或敲低处理。结果显示，与Treatment组相比，Adv-LIN28-OE+D-核糖组细胞培养上清液中AGEs的水平显著降低，细胞内RAGE的表达水平显著降低；Adv-shRNA LIN28+D-核糖组细胞培养上清液中AGEs的水平进一步显著升高，细胞内RAGE的表达水平也进一步显著升高，说明糖尿病-并发症相关AGE-RAGE信号通路受控于LIN28。

慢性高血糖会引起DN，但其具体的致病机制仍未十分明确[21]。病理学上，高血糖相关的AGEs大量形成和其介导的RAGE积累在DN的发病机制中起着核心作用。AGE-RAGE信号通路的上调会引发持续的氧化应激和炎症反应，这是AGEs在糖尿病患者肾和肠道微环境中产生的主要有害影响[22-24]。AGEs介导的RAGE激活和积累可引起烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶诱导的活性氧和活性氮的产生，随后在DN和衰老肾中引起氧化应激[25]。AGEs通过增加肾小球内皮细胞的通透性、改变内皮糖萼以最终诱导内皮细胞凋亡，显著诱导肾小球滤过屏障的改变[26-27]。AGEs还能促进血管内皮细胞钙化[28]。本研究结果显示，在肾细胞中过表达LIN28能够显著抑制AGE-RAGE信号通路，提示这种过表达LIN28的策略或许能够对DN起到保护作用。

我们进一步对高糖培养条件下的HEK 293T细胞进行LIN28过表达或敲低处理，并测定处理前后细胞内NF-κB和MMP-2的表达情况。结果显示，与Treatment组相比，Adv-LIN28-OE+D-核糖组细胞内NF-κB和MMP-2的表达均显著降低，Adv-shRNA LIN28+D-核糖组细胞内NF-κB和MMP-2的表达均进一步显著升高，说明过表达/敲低LIN28将通过抑制/增强细胞内NF-κB和MMP-2的表达抑制/促进DN疾病进展。

NF-κB是DN疾病进展中的关键信号通路，可通过GSDMD激活肾小管上皮细胞焦亡，加重DN[29]。炎症和肾小球内皮功能障碍会促进DN进展。二甲双胍可抑制TLR4/NF-κB p65通路缓解DN的炎症和纤维化[30]。内皮糖萼是肾小球滤过屏障的关键组成部分。MMP-2、MMP-9和MMP-14在孤立的肾小球中表达上调并介导多配体蛋白聚糖-4脱落，是体外肾小球内皮糖萼损伤的机制，将导致白蛋白通透性增加。有研究使用MMP-2/9抑制剂治疗1型糖尿病小鼠21 d，恢复了内皮糖萼的深度和细胞表面覆盖率，减轻了糖尿病诱导的白蛋白尿和肾小球白蛋白通透性[31]。高血糖上调外泌体中环状RNA circ_DLGAP4的水平，circ_DLGAP4通过海绵化miR-143上调ERBB3/NF-κB/MMP-2轴，促进肾系膜细胞的增殖和纤维化[32]。因此，抑制NF-κB/MMP-2轴对于缓解DN的炎症水平、减轻肾小管损伤、抑制肾纤维化至关重要。而本研究结果证明，通过腺病毒过表达LIN28的治疗策略，在体外细胞水平上能够通过下调AGE-RAGE信号通路发挥抑制NF-κB/MMP-2轴的作用。

综上，通过体外腺病毒过表达LIN28，能够导致数千种基因发生显著性差异表达，特别是能够抑制在DN疾病进展中十分关键的糖尿病-并发症相关AGE-RAGE信号通路，发挥保护DN的作用。

[参考文献]

[1] American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2018 [J]. Diabetes Care,2018,41(Suppl 1):S13-S27. doi:10.2337/dc18-S002.

[2] Chatterjee S,Khunti K,Davies MJ. Type 2 diabetes [J]. Lancet,2017,389(10085):2239-2251. doi:10.1016/S0140-6736(17)30058-2.

[3] Ganasegeran K,Hor CP,Jamil MFA,et al. A systematic review of the economic burden of type 2 diabetes in malaysia [J]. Int J Environ Res Public Health,2020,17(16):5723. doi:10.3390/ijerph17165723.

[4] Zhang XX,Kong J,Yun K. Prevalence of diabetic nephropathy among patients with type 2 diabetes mellitus in China: a meta-analysis of observational studies [J]. J Diabetes Res,2020,2020:2315607. doi:10.1155/2020/2315607.

[5] Koye DN,Magliano DJ,Nelson RG,et al. The global epidemiology of diabetes and kidney disease [J]. Adv Chronic Kidney Dis,2018,25(2):121-132. doi:10.1053/j.ackd.2017.10.011.

[6] Bommer C,Sagalova V,Heesemann E,et al. Global economic burden of diabetes in adults: projections from 2015 to 2030 [J]. Diabetes Care,2018,41(5):963-970. doi:10.2337/dc17-1962.

[7] Anders HJ,Huber TB,Isermann B,et al. CKD in diabetes: diabetic kidney disease versus nondiabetic kidney disease [J]. Nat Rev Nephrol,2018,14(6):361-377. doi:10.1038/s41581-018-0001-y.

[8] Lin YC,Chang YH,Yang SY,et al. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease [J]. J Formos Med Assoc,2018,117(8):662-675. doi:10.1016/j.jfma.2018.02.007.

[9] Gerstberger S,Hafner M,Tuschl T. A census of human RNA-binding proteins [J]. Nat Rev Genet,2014,15(12):829-845. doi:10.1038/nrg3813.

[10] Wilbert ML,Huelga SC,Kapeli K,et al. LIN28 binds messenger RNAs at GGAGA motifs and regulates splicing factor abundance [J]. Mol Cell,2012,48(2):195-206. doi:10.1016/j.molcel.2012.08.004.

[11] Zhu H,Shyh-Chang N,Segrè AV,et al. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism [J]. Cell,2019,47(1):81-94. doi:10.1016/j.cell.2011.08.033.

[12] Sung Y,Jeong J,Kang RJ,et al. Lin28a expression protects against streptozotocin-induced β-cell destruction and prevents diabetes in mice [J]. Cell Biochem Funct,2019,37(3):139-147. doi:10.1002/cbf.3376.

[13] Tabrez S,Al-Shali KZ,Ahmad S,et al. Lycopene powers the inhibition of glycation-induced diabetic nephropathy: a novel approach to halt the AGE-RAGE axis menace [J]. Biofactors,2020,41(5):372-381. doi:10.1002/biof.1238.

[14] Kim D,Langmead B,Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements [J]. Nat Methods,2015,12(4):357-360. doi:10.1038/nmeth.3317.

[15] Trapnell C,Williams BA,Pertea G,et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation [J]. Nat Biotechnol,2010,28(5):511-515. doi:10.1038/nbt.1621.

[16] Love MI,Huber W,Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. Genome Biol,2014,15(12):550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.

[17] Ilbay O,Nelson C,Ambros V. C. elegans LIN-28 controls temporal cell fate progression byregulating LIN-46 expression via the 5′ UTR of lin-46 mRNA [J]. Cell Rep,2021,36(10):109670. doi:10.1016/j.celrep.2021.109670.

[18] Lawson H,Vuong E,Miller RM,et al. The Makorin lep-2 and the lncRNA lep-5 regulate lin-28 to schedule sexual maturation of the C. elegans nervous system [J]. Elife,2019,8:e43660. doi:10.7554/eLife.43660.

[19] Wang Y,Zhang B,Gao G,et al. Long non-coding RNA LINC00355 promotes the development and progression of colorectal cancer by elevating guanine nucleotide exchange factor T expression via RNA binding protein lin-28 homolog A [J]. Front Oncol,2020,10:582669. doi:10.3389/fonc.2020.582669.

[20] Tao L,Fan X,Sun J,et al. Metformin prevented high glucose-induced endothelial reactive oxygen species via OGG1 in an AMPKα-Lin-28 dependent pathway [J]. Life Sci,2021,268:119015. doi:10.1016/j.lfs.2020.119015.

[21] Anders HJ,Huber TB,Isermann B,et al. CKD in diabetes: diabetic kidney disease versus nondiabetic kidney disease [J]. Nat Rev Nephrol,2018,14(6):361-377. doi:10.1038/s41581-018-0001-y.

[22] Wu XQ,Zhang DD,Wang YN,et al. AGE/RAGE in diabetic kidney disease and ageing kidney [J]. Free Radic Biol Med,2021,171:260-271. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.025.

[23] de Vos WM,Tilg H,Van Hul M,et al. Gut microbiome and health: mechanistic insights [J]. Gut,2022,71(5):1020-1032. doi:10.1136/gutjnl-2021-326789.

[24] Chen Y,Guo TL. Dietary advanced glycation end-products elicit toxicological effects by disrupting gut microbiome and immune homeostasis [J]. J Immunotoxicol,2021,18(1):93-104. doi:10.1080/1547691X.2021.1959677.

[25] Qi W,Niu J,Qin Q,et al. Glycated albumin triggers fibrosis and apoptosis via an NADPH oxidase/Nox4-MAPK pathway-dependent mechanism in renal proximal tubular cells [J]. Mol Cell Endocrinol,2015,405:74-83. doi:10.1016/j.mce.2015.02.007.

[26] 马 壮,修光辉,熊 伟,等. 血管内皮糖萼的研究进展[J]. 广东医学,2019,40(14):2113-2116. doi:10.13820/j.cnki.gdyx.20183583.

[27] Dou L,Jourde-Chiche N. Endothelial toxicity of high glucose and its by-products in diabetic kidney disease [J]. Toxins (Basel),2019,11(10):578. doi:10.3390/toxins11100578.

[28] Guo B,Shan SK,Xu F,et al. Protective role of small extracellular vesicles derived from HUVECs treated with AGEs in diabetic vascular calcification [J]. J Nanobiotechnology,2022,20(1):334. doi:10.1186/s12951-022-01529-z.

[29] Wang Y,Zhu X,Yuan S,et al. TLR4/NF-κB signaling induces GSDMD-related pyroptosis in tubular cells in diabetic kidney disease [J]. Front Endocrinol (Lausanne),2019,10:603. doi:10.3389/fendo.2019.00603.

[30] Zhou Y,Ma XY,Han JY,et al. Metformin regulates inflammation and fibrosis in diabetic kidney disease through TNC/TLR4/NF-κB/miR-155-5p inflammatory loop[J]. World J Diabetes,2021,12(1):19-46. doi:10.4239/wjd.v12.i1.19.

[31] Ramnath RD,Butler MJ,Newman G,et al. Blocking matrix metalloproteinase-mediated syndecan-4 shedding restores the endothelial glycocalyx and glomerular filtration barrier function in early diabetic kidney disease [J]. Kidney Int,2020,97(5):951-965. doi:10.1016/j.kint.2019.09.035.

[32] Bai S,Xiong X,Tang B,et al. Exosomal circ_DLGAP4 promotes diabetic kidney disease progression by sponging miR-143 and targeting ERBB3/NF-κB/MMP-2 axis [J]. Cell Death Dis,2020,11(11):1008. doi:10.1038/s41419-020-03169-3

(编辑:刘 艺)