【基础研究】

沙格列汀调控 miR-23b-3p/EGR1 轴对高糖诱导足细胞损伤的影响及机制研究

杨宇翔[1]，赵学慧[2]，李维维[3]，许玉兰[1]，李迎婕[2]，贾军利[2]
（1. 张家口市第二医院药剂科，河北张家口 075031；2. 河北北方学院附属第二医院肾内科，河北张家口 075100；
3. 张家口市第二医院肾内科，河北张家口 075031）

摘要：目的 探讨沙格列汀通过调控微小 RNA（micro RNA，miR）-23b-3p/ 早期生长反应因子（early growth response factor，EGR）1 轴对高糖诱导足细胞损伤的影响。**方法** 将人足细胞分为对照组、高糖组、高糖＋沙格列汀组、高糖＋沙格列汀＋anti-miR- 对照组以及高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-23b-3p 组。分别检测细胞 miR-23b-3p、EGR1 信使 RNA（messenger RNA，mRNA）表达、增殖、凋亡、活性氧（reactive oxygen species，ROS）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、白介素（interleukin，IL）-1β、IL-6、肌间线蛋白、裂孔隔膜蛋白（Podocin、Nephrin）、B 细胞淋巴瘤 -2 相关 X 蛋白（B cell lymphoma-2 related X protein，Bax）、半胱氨酸蛋白酶（Caspase）-3 以及 EGR1 表达，并验证 miR-23b-3p 与 EGR1 的靶向关系。**结果** 与对照组相比，高糖组的 miR-23b-3p 表达水平、增殖率、SOD、Podocin 以及 Nephrin 均降低，EGR1 表达、凋亡率、IL-1β、IL-6、MDA、ROS、Caspase-3、Bax 以及肌间线蛋白均升高（$P < 0.05$）；与高糖组相比，高糖＋沙格列汀组 miR-23b-3p 表达、增殖率、SOD、Podocin 以及 Nephrin 均升高，EGR1 表达、凋亡率、IL-1β、IL-6、MDA、ROS、caspase-3、Bax 以及肌间线蛋白均降低（$P < 0.05$）；下调 miR-23b-3p 可减弱沙格列汀对足细胞损伤的改善（$P < 0.05$）；miR-23b-3p 靶向负调控 EGR1 表达。**结论** 沙格列汀可能通过上调 miR-23b-3p 负调控 EGR1，减轻高糖诱导的足细胞凋亡和损伤。

关键词：沙格列汀；高糖；足细胞；微 RNA-23b-3p；早期生长反应因子 1
中图分类号：R544.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188（2023）12-1270-09
DOI：10.13683/j.wph.2023.12.005

Study on effect and mechanism of saxagliptin regulating miR-23b-3p/EGR1 axis on podocyte injury induced by high glucose

YANG Yuxiang[1], ZHAO Xuehui[2], LI Weiwei[3], XU Yulan[1], LI Yingjie[2], JIA Junli[2]
(*1. Department of Pharmacy, Zhangjiakou NO.2 Hospital, Zhangjiakou 075031, Hebei Province, China;*
2. Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075100, Hebei Province, China;
3. Department of Nephrology, Zhangjiakou NO.2 Hospital, Zhangjiakou 075031, Hebei Province, China)

Abstract: ***Objective*** To investigate the effect of saxagliptin on podocyte injury induced by high glucose by regulating the microRNA（miR）-23b-3p/early growth response factor（EGR）1 axis. ***Methods*** Human podocytes were divided into control group, high glucose group, high glucose＋saxagliptin group, high glucose＋saxagliptin＋anti-miR-control group and high glucose＋saxagliptin＋anti-miR-23b-3p group. The expression of miR-23b-3p, EGR1 messenger RNA（mRNA）, proliferation, apoptosis, reactive oxygen species（ROS）, malondialdehyde（MDA）, superoxide dismutase（SOD）, interleukin（IL）-1β, IL-6, desmin, split pore membrane proteins（Podocin, Nephrin）, B cell lymphoma-2 related X

收稿日期：2023-04-20
作者简介：杨宇翔，主管药师，研究方向：基础用药研究。
基金项目：河北省卫生健康委员会2021年度医学科学研究课题计划（20210125）

protein（Bax），Caspase-3 and EGR1 protein were detected, the targeting relationship between miR-23b-3p and EGR1 was verified. ***Results*** Compared with control group, the expression level of miR-23b-3p, proliferation rate, SOD, Podocin and Nephrin in high glucose group were obviously decreased, while the expression of EGR1 mRNA and protein, apoptosis rate, IL-1β, IL-6, MDA, ROS, Caspase-3, Bax and desmin were increased（$P<0.05$）. Compared with high glucose group, the expression level of miR-23b-3p, proliferation rate, SOD, Podocin and Nephrin in high glucose＋saxagliptin group were obviously increased, while the expression of EGR1 mRNA and protein, apoptosis rate, IL-1β, IL-6, MDA, ROS, Caspase-3, Bax and desmin were decreased（$P<0.05$）. Down-regulation of miR-23b-3p could attenuate the improvement of saxagliptin on podocyte injury（$P<0.05$）. MiR-23b-3p negatively regulated the expression of EGR1. ***Conclusion*** Saxagliptin may reduce high glucose-induced apoptosis and injury of podocytes by up-regulating miR-23b-3p and negatively regulating EGR1.

Key words: saxagliptin; high glucose; podocyte; micro RNA-23b-3p; early growth response factor-1

糖尿病（diabetes mellitus，DM）肾病（diabetic nephropathy，DN）是慢性肾脏病和终末期肾病的主要病因，其表现为蛋白尿增加，肾功能下降[1]。高血糖是 DM 足细胞损伤发病的关键因素，足细胞的损伤和丢失又与蛋白尿密切相关，因此足细胞损伤和功能障碍会导致 DN 的发展[2]。故而减少或抑制足细胞损伤在 DN 的治疗中具有重要意义。沙格列汀具有抗氧化、抗炎和抗纤维化等作用，广泛用于 2 型 DM 的治疗[3]。已有研究表明，沙格列汀可通过提高裂孔膜蛋白 Nephrin、Podocin 表达，减轻高糖诱导的足细胞损伤[4]。微 RNA（micro RNA，miR）与 DM 及其多种并发症关系密切，在高糖诱导的足细胞损伤中，miR-23b-3p 表达下调[5]。早期生长反应因子（early growth response factor，EGR）1 是一种重要的转录因子，其高表达可促进高糖诱导的足细胞凋亡[6]。EGR1 与 miR-23b-3p 存在互补核苷酸序列，且通过调控 miR-23b-3p/EGR1 轴可参与 DN 的进展[7]。本研究将探讨沙格列汀能否通过调控 miR-23b-3p/EGR1 影响高糖诱导的足细胞损伤，报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人肾小球足细胞（human glomerular podocytes，HGPC）购自河南省工业微生物菌种工程技术研究中心。沙格列汀（abs816309）购自美国 R&D 公司；miR-23b-3p 模拟物（20220620）及 miR 阴性对照（miR-negative control，miR-NC，20220615）、miR-23b-3p 抑制物（anti-miR-23b-3p，20220609）及其阴性对照（anti-miR-NC，20220613）购自上海艾博思生物公司；胎牛血清（fetal bovine serum，FBS，S9030）、杜尔贝科改良 eagle 培养基（Dulbecco modified eagle medium，DMEM，31600）、胰蛋白酶（T1300）以及牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA，PC0001）均购自北京索莱宝公司；脂质体 2000（11668019）购自美国赛默飞公司；白介素（interleukin，IL）-1β（ml058059），IL-6（ml058097）酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunoadsorbent assay，ELISA）试剂盒、丙二醛（malondialdehyde，MDA，ml028583）以及超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）试剂盒（ml950271）均购自上海酶联生物；活性氧（reactive oxygen species，ROS，C1035）、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷（5-ethynyl-2'-deoxyuridine，EdU，C0071S）、Hoechst 33258（C0003）以及 Annexin V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶（fluorescein isothiocyanate/propidium iodide，FITC/PI）检测试剂盒（C1062L）均购自上海碧云天公司；双荧光素酶检测试剂盒（E1910）购自美国 Promega 公司；增强型化学发光试剂（enhanced chemiluminescence，ECL，WLA006a）、TRIzol 试剂盒（WLA088）购自沈阳万类生物公司；实时定量聚合酶链式反应（quantitative real time-polymerase

chain reaction，qRT-PCR）试剂盒（638315）购自日本 Takara 公司；一抗肌间线蛋白（ab32362）、裂孔隔膜蛋白 Podocin（ab32362）、Nephrin（ab181143）、B 细胞淋巴瘤 -2 相关 X 蛋白（B cell lymphoma-2 related X protein，Bax，ab216341）、半胱氨酸蛋白酶（Caspase）-3（ab184787）、EGR1（ab300449）和甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH，ab181602）均购自美国 Abcam 公司；FACSCanto Ⅱ流式细胞（flow cytometry，FCM）仪购自美国 Becton Dickinson 公司；Mini-PROTEAN Tetra Cell 1658001 蛋白电泳仪、CFX Connect 荧光定量 PCR 仪均购自美国 Bio-rad 公司；RT-6000 酶标仪购自上海巴玖公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

将 HGPC 置于含 10% 磷酸盐缓冲液（phosphate buffer solution，PBS）的 DMEM 培养基中，在 37 ℃、5% 二氧化碳培养箱中培养，定期观察，当细胞融合度到 85% 以上时，胰蛋白酶消化传代，2 ～ 3 d 传代 1 次。

1.2.2 分组与转染

HGPC 细胞培养至对数生长期后，分为对照组：正常培养；高糖组：用含 30 mmol/L 葡萄糖的培养基培养；高糖＋沙格列汀组：用含 30 mmol/L 葡萄糖和 100 nmol/L 沙格列汀[8]的培养基共同培养；高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组：将 HGPC 细胞用脂质体 2000 转染 anti-miR-NC 24 h 后，用含 30 mmol/L 葡萄糖和 100 nmol/L 沙格列汀的培养基共同培养；高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-23b-3p 组：将 HGPC 细胞用脂质体 2000 转染 anti-miR-23b-3p 24 h 后，用含 30 mmol/L 葡萄糖和 100 nmol/L 沙格列汀的培养基中共同培养，以上各组细胞均培养 48 h 用于后续实验。

1.2.3 QRT-PCR 检测

细胞培养 48 h 后，使用 TRIzol 试剂盒提取各组细胞中的总 RNA，并用逆转录试剂盒得到互补 DNA（complementary DNA，cDNA），以 cDNA 配制 20 μl 反应体系进行 qRT-PCR，反应条件为：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 35 s，60 ℃退火 35 s，72 ℃延伸 35 s，设置 40 次循环。以 *U6* 和 *GAPDH* 为内参基因，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 miR-23b-3p 和 EGR1 信使 RNA（messenger RNA，mRNA）相对表达水平。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of qRT-PCR

基因	序列（5'-3'）
miR-23b-3p	上游引物：5'-GGAAATCCCTGGCAATGT-3'
	下游引物：5'-TAATCCCTGGCAATGTGA-3'
EGR1	上游引物：5'-ATTGGAGGAGATGATGCT-3'
	下游引物：5'-AATTAGGAAATGTTGGTGC-3'
U6	上游引物：5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
	下游引物：5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
GAPDH	上游引物：5'-CCCCATACACAGTGTTAGCC-3'
	下游引物：5'-GAGTGATTTTCCCGTCC-3'

1.2.4 EdU 检测细胞增殖

将各组细胞加入 96 孔板中，每孔 1×10^4 个细胞，培养 24 h 后以 EdU 染色试剂盒进行操作，去除培养液，分别用 4% 多聚甲醛固定 15 min，均用 BSA 洗涤，并用 Hoechst 33258 试剂盒于黑暗中染色 10 min，BSA 洗涤后封片观察。其中 EdU 阳性染色细胞（红色）占总细胞（蓝色）的百分比表示细胞增殖率。

1.2.5 FCM 检测细胞凋亡

将各组细胞加入 6 孔板中，每孔 1×10^7 个细胞，培养 12 h，用 PBS 洗涤细胞 2 次，制成细胞悬浮液，吸取 1×10^5 个 /ml 细胞悬浮液后，离心弃上清，分别加入 5 μl AnnexinV-FITC 和 PI，孵育 15 min 后，在试管中加入 400 μl PBS 在 FCM 仪中检测细胞凋亡。

1.2.6 炎症因子和氧化应激指标水平检测

收集各组细胞，用 PBS 洗涤细胞 2 次，离心取上清，ELISA 检测 IL-1β、IL-6 水平；MDA、SOD 水平检测步骤与上述相同，采用 MDA、SOD 相对应试剂盒检测。ROS 水平采用 2′,7′- 二氯荧光素二乙酸酯（2,7-dichlorodi-hydrofluorescein diacetate，DCFH-DA）法检测，将细胞与荧光探针 DCFH-DA 孵育

20 min，然后用 PBS 洗涤 3 次以除去未结合的 DCFH-DA，使用荧光分光光度计 DCF 荧光，以相对荧光强度表示，对照组荧光强度设为 1。

1.2.7 免疫印迹法（western blot，WB）检测蛋白

将各组细胞破碎后提取总蛋白，用二喹啉甲酸试剂盒进行浓度定量，按步骤将蛋白十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜，5% 脱脂奶粉封闭 2 h，在 4 ℃下加入一抗 EGR1、Bax、Caspase-3、肌间线蛋白、Podocin、Nephrin（1 ∶ 1 000）和 GAPDH 过夜孵育，清洗，在 4 ℃下加入二抗山羊抗兔免疫球蛋白 G（1 ∶ 1 000），孵育 2 h。用 ECL 发光显影，观察拍照，各条带灰度值用 Image J 软件处理分析。

1.2.8 双荧光素酶报告实验

生物信息学软件预测显示 EGR1 的 3'UTR 中含有与 miR-23b-3p 互补的核苷酸序列，具有互补结合位点。构建 EGR1 的野生型（wild type，WT）和突变型（mutant type，MUT）序列荧光素酶报告载体，分别命名为 WT-EGR1 和 MUT-EGR1。将 WT-EGR1 和 MUT-EGR1 重组报告质粒分别与 miR-23b-3p 模拟物或 miR-NC 使用脂质体 2000 共转染至 HGPC 细胞中，转染 48 h 后，用荧光素酶试剂盒检测荧光素酶活性。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析，数据经检验均符合正态分布，采用（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较用单因素方差分析，两两比较采用 Bofferonic 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞 miR-23b-3p、EGR1 mRNA 及蛋白表达水平

与对照组相比，高糖组细胞 miR-23b-3p 表达水平显著降低，EGR1 mRNA 及其蛋白表达水平升高（$P<0.05$）；与高糖组相比，高糖＋沙格列汀组、高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组细胞 miR-23b-3p 表达水平显著升高，EGR1 mRNA 及其蛋白表达水平降低（$P<0.05$）；与高糖＋沙格列汀组、高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组相比，高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-23b-3p 组 miR-23b-3p 表达水平显著降低，EGR1 mRNA 及其蛋白表达水平升高（$P<0.05$），见图 1、表 2。

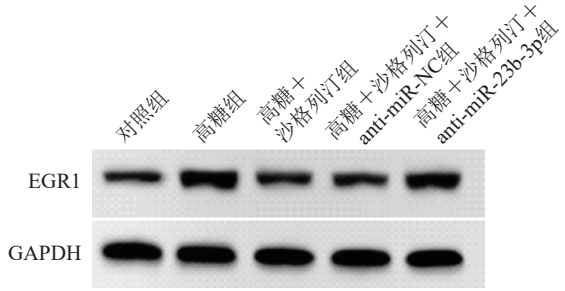


图 1 各组 EGR1 蛋白表达水平变化

Figure 1 Changes of EGR1 protein expression in each group

表 2 各组细胞 miR-23b-3p、EGR1 mRNA 及 EGR1 蛋白表达水平（$\bar{x}\pm s$）

Table 2 The expression levels of miR-23b-3p, EGR1 mRNA and EGR1 protein in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	miR-23b-3p	EGR1 mRNA	EGR1
对照组	1.03±0.10	1.00±0.09	0.52±0.08
高糖组	0.41±0.04*	1.59±0.16*	0.98±0.11*
高糖＋沙格列汀组	0.85±0.13#	1.11±0.14#	0.56±0.08#
高糖＋沙格列汀＋anti-miR-NC组	0.88±0.10#	1.18±0.13#	0.58±0.06#
高糖＋沙格列汀＋anti-miR-23b-3p组	0.51±0.05▲△	1.43±0.12▲△	0.82±0.09▲△
*F*值	50.756	20.770	32.557
*P*值	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：与对照组相比，*$P<0.05$；与高糖组相比，#$P<0.05$；与高糖＋沙格列汀组相比，▲$P<0.05$；与高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组相比，△$P<0.05$。

Note: *vs* control group, *$P<0.05$; *vs* high glucose group, #$P<0.05$; *vs* high glucose ＋ saxagliptin group, ▲$P<0.05$; *vs* high glucose ＋ saxagliptin ＋ anti-miR-NC group, △$P<0.05$.

2.2 各组细胞增殖情况

与对照组相比，高糖组红色的 EdU 阳性细胞减少，增殖率显著降低（$P < 0.05$）；与高糖组相比，高糖＋沙格列汀组、高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组红色的 EdU 阳性细胞增加，细胞增殖率显著升高（$P < 0.05$）；与高糖＋沙格列汀组、高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组相比，高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-23b-3p 组红色的 EdU 阳性细胞减少，增殖率显著降低（$P < 0.05$），见图 2、表 3。

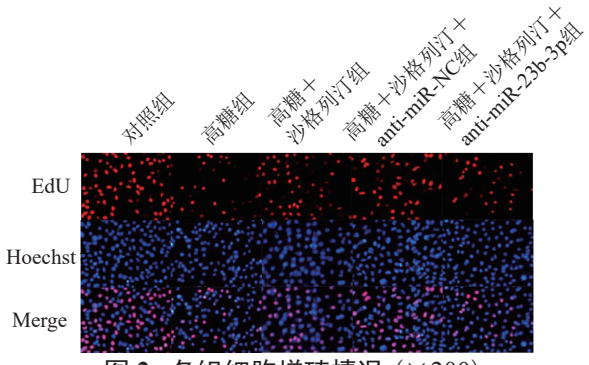


图 2 各组细胞增殖情况（×200）

Figure 2 Cell proliferation in each group（×200）

2.3 各组细胞凋亡情况

与对照组相比，高糖组细胞凋亡率显著升高（$P < 0.05$）；与高糖组相比，高糖＋沙格列汀组、高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组细胞凋亡率显著降低（$P < 0.05$）；与高糖＋沙格列汀组、高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组相比，高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-23b-3p 组凋亡率显著升高（$P < 0.05$），见图 3、表 4。

表 3 各组细胞增殖情况比较（$\bar{x} \pm s$）

Table 3 Comparison of cell proliferation in each group（$\bar{x} \pm s$）

组别	增殖率/%
对照组	61.03±6.10
高糖组	30.41±4.04*
高糖+沙格列汀组	57.85±5.73#
高糖＋沙格列汀＋anti-miR-NC组	56.88±5.18#
高糖＋沙格列汀＋anti-miR-23b-3p组	35.51±4.25▲△
*F*值	46.311
*P*值	＜0.001

注：与对照组相比，*$P < 0.05$；与高糖组相比，#$P < 0.05$；与高糖＋沙格列汀组相比，▲$P < 0.05$；与高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组相比，△$P < 0.05$。

Note: *vs* control group, *$P < 0.05$; *vs* high glucose group, #$P < 0.05$; *vs* high glucose ＋ saxagliptin group, ▲$P < 0.05$; *vs* high glucose ＋ saxagliptin ＋ anti-miR-NC group, △$P < 0.05$.

表 4 各组细胞凋亡情况比较（$\bar{x} \pm s$）

Table 4 Comparison of apoptosis in each group（$\bar{x} \pm s$）

组别	凋亡率/%
对照组	11.01±1.06
高糖组	35.36±4.15*
高糖＋沙格列汀组	18.43±2.56#
高糖＋沙格列汀＋anti-miR-NC组	17.59±2.38#
高糖＋沙格列汀＋anti-miR-23b-3p组	28.68±2.73▲△
*F*值	74.149
*P*值	＜0.001

注：与对照组相比，*$P < 0.05$；与高糖组相比，#$P < 0.05$；与高糖＋沙格列汀组相比，▲$P < 0.05$；与高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组相比，△$P < 0.05$。

Note: *vs* control group, *$P < 0.05$; *vs* high glucose group, #$P < 0.05$; *vs* high glucose ＋ saxagliptin group, ▲$P < 0.05$; *vs* high glucose ＋ saxagliptin ＋ anti-miR-NC group, △$P < 0.05$.

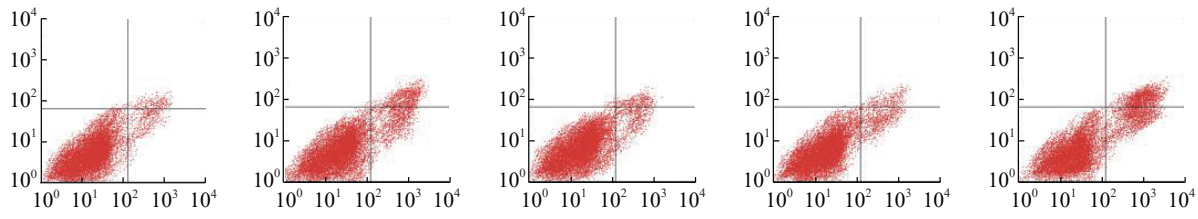


图 3 FCM 检测各组细胞凋亡情况

Figure 3 Detection of apoptosis in each group by FCM

2.4 各组细胞炎症因子和氧化应激指标水平

与对照组相比，高糖组细胞 IL-1β、IL-6、ROS 水平显著升高，MDA 含量和 SOD 活力显著降低（$P < 0.05$）；与高糖组相比，高糖＋沙格列汀组、高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组细胞 IL-1β、IL-6、ROS 水平显著降低，MDA 含量和 SOD 活力显著升高（$P < 0.05$）；与高糖＋沙格列汀组、高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组相比，高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-23b-3p 组 IL-1β、IL-6、ROS 水平显著升高，MDA 含量 SOD 活力显著降低（$P < 0.05$），见表 5。

2.5 各组细胞蛋白水平

与对照组相比，高糖组细胞 Caspase-3、Bax、肌间线蛋白水平显著升高，Podocin、Nephrin 显著降低（$P < 0.05$）；与高糖组相比，高糖＋沙格列汀组、高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组细胞 Caspase-3、Bax、肌间线蛋白水平显著降低，Podocin、Nephrin 显著升高（$P < 0.05$）；与高糖＋沙格列汀组、高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组相比，高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-23b-3p 组 Caspase-3、Bax、肌间线蛋白水平显著升高，Podocin、Nephrin 显著降低（$P < 0.05$），见图 4、表 6。

2.6 MiR-23b-3p 靶向调控 EGR1 的表达

MiR-23b-3p 与 EGR1 存在靶向结合位点，见图 5。与 miR-NC 和 WT-EGR1 共转染组相比，miR-23b-3p 模拟物和 WT-EGR1 共转染组荧光素酶活性显著降低（$P < 0.05$），见表 7。

3 讨论

足细胞作为高度分化的上皮细胞，是肾小球过

表 5 各组细胞炎症因子和氧化应激指标水平比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 5 Comparison of inflammatory factors and oxidative stress indexes in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	IL-1β/pg·ml^{-1}	IL-6/pg·ml^{-1}	ROS	MDA/mmol·L^{-1}	SOD/U·L^{-1}
对照组	41.93±6.28	13.05±2.09	1.00±0.04	10.05±1.69	21.05±3.52
高糖组	107.38±11.73*	26.59±4.13*	3.18±0.31*	27.59±3.16*	5.36±1.51*
高糖＋沙格列汀组	52.12±5.37$^{\#}$	15.16±2.03$^{\#}$	1.37±0.18$^{\#}$	13.68±1.76$^{\#}$	15.87±1.56$^{\#}$
高糖＋沙格列汀＋anti-miR-NC组	54.37±5.68$^{\#}$	15.48±3.38$^{\#}$	1.36±0.13$^{\#}$	12.96±1.93$^{\#}$	14.74±1.68$^{\#}$
高糖＋沙格列汀＋anti-miR-23b-3p组	82.16±7.19$^{\blacktriangle\triangle}$	21.12±4.14$^{\blacktriangle\triangle}$	2.92±0.24$^{\blacktriangle\triangle}$	20.58±2.27$^{\blacktriangle\triangle}$	8.31±2.07$^{\blacktriangle\triangle}$
*F*值	74.218	16.917	148.076	60.626	48.452
*P*值	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：与对照组相比，*$P < 0.05$；与高糖组相比，$^{\#}P < 0.05$；与高糖＋沙格列汀组相比，$^{\blacktriangle}P < 0.05$；与高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组相比，$^{\triangle}P < 0.05$。

Note: *vs* control group, *$P < 0.05$; *vs* high glucose group, $^{\#}P < 0.05$; *vs* high glucose ＋ saxagliptin group, $^{\blacktriangle}P < 0.05$; *vs* high glucose ＋ saxagliptin ＋ anti-miR-NC group, $^{\triangle}P < 0.05$.

表 6 各组细胞蛋白水平比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 6 Comparison of cell protein levels in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	Caspase-3	Bax	肌间线蛋白	Podocin	Nephrin
对照组	0.46±0.07	0.58±0.06	0.38±0.05	0.92±0.08	0.86±0.09
高糖组	0.84±0.09*	0.94±0.10*	0.87±0.08*	0.48±0.07*	0.39±0.09*
高糖＋沙格列汀组	0.45±0.06$^{\#}$	0.55±0.07$^{\#}$	0.45±0.06$^{\#}$	0.86±0.08$^{\#}$	0.77±0.06$^{\#}$
高糖＋沙格列汀＋anti-miR-NC组	0.42±0.06$^{\#}$	0.51±0.04$^{\#}$	0.42±0.09$^{\#}$	0.88±0.06$^{\#}$	0.75±0.08$^{\#}$
高糖＋沙格列汀＋anti-miR-23b-3p组	0.71±0.07$^{\blacktriangle\triangle}$	0.77±0.07$^{\blacktriangle\triangle}$	0.68±0.08$^{\blacktriangle\triangle}$	0.53±0.12$^{\blacktriangle\triangle}$	0.45±0.04$^{\blacktriangle\triangle}$
*F*值	42.227	39.300	48.500	37.378	47.460
*P*值	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：与对照组相比，*$P < 0.05$；与高糖组相比，$^{\#}P < 0.05$；与高糖＋沙格列汀组相比，$^{\blacktriangle}P < 0.05$；与高糖＋沙格列汀＋ anti-miR-NC 组相比，$^{\triangle}P < 0.05$。

Note: *vs* control group, *$P < 0.05$; *vs* high glucose group, $^{\#}P < 0.05$; *vs* high glucose ＋ saxagliptin group, $^{\blacktriangle}P < 0.05$; *vs* high glucose ＋ saxagliptin ＋ anti-miR-NC group, $^{\triangle}P < 0.05$.

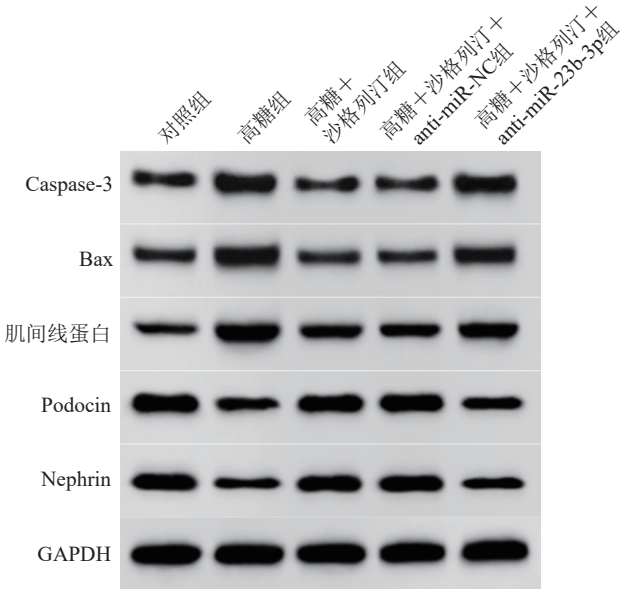


图 4 各组蛋白表达水平变化

Figure 4 Changes of protein expression levels in each group

EFR1 5'-UUGGGGUACUCUUGAUGUGAA-3'

miR-23b-3p 3'-CCAUUCGGGACCGUUACACUA-5'

图 5 MiR-23b-3p 与 EGR1 的结合位点

Figure 5 Binding sites of miR-23b-3p and EGR1

表 7 荧光素酶活性比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 7 Comparison of luciferase activity ($\bar{x}\pm s$)

组别	WT-EGR1	MUT-EGR1
miR-NC	1.02±0.12	1.05±0.12
miR-23b-3p模拟物	0.38±0.04*	1.16±0.11
*t*值	12.394	1.655
*P*值	<0.001	0.129

注：与 miR-NC 和 WT-EGR1 共转染组比较，*$P < 0.05$。

Note: *vs* miR-NC and WT-EGR1 co-transfection group, *$P < 0.05$.

滤的最后一道屏障，高血糖和 DM 中的代谢物可能会导致足细胞功能障碍和肾小球滤过屏障损伤，引起蛋白尿和肾小球硬化，加重 DN 的进展[9]。炎症、氧化应激在 DM 进展中导致足细胞损伤和 DN 的发生，其中炎症因子积累诱发足细胞损伤，而受损的足细胞进一步促进炎症因子的分泌，导致肾小球炎症；高糖环境刺激下足细胞发生氧化应激，导致 ROS 积累，脂质过氧化致使 MDA 含量升高，抗氧化酶如 SOD 活力下降，最终使足细胞损伤甚至凋亡，进一步加剧 DN 的发展[10]。本研究结果显示，高糖处理后的足细胞炎症因子 IL-1β、IL-6 和氧化应激指标 ROS 水平显著升高，MDA 水平下降，表明高糖刺激足细胞发生炎症反应和氧化应激，导致细胞损伤。

高糖诱导的炎症反应和氧化应激会促进足细胞凋亡，导致 DN 发展，凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 的激活通过死亡受体和线粒体作为细胞凋亡的关键效应酶，是细胞凋亡的重要决定因素[11]。典型的足细胞损伤标志物有肌间线蛋白、Podocin、Nephrin 蛋白，其中足细胞损伤时肌间线蛋白表达上调，而 Podocin、Nephrin 蛋白是足细胞的裂空隔膜蛋白，可维持足细胞裂空隔膜结构和功能，足细胞损伤时其表达下调[12]。本研究提示，高糖处理后的细胞增殖活性下降，凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 及凋亡率上升，肌间线蛋白表达上调，Podocin、Nephrin 蛋白表达下降，表明高糖诱发足细胞损伤严重，降低细胞增殖，促进其凋亡。沙格列汀在 DN 中发挥抑制尿白蛋白排泄、防止系膜基质扩张、减少间质纤维化等作用，对肾小球足细胞损伤有保护作用。本研究结果显示，沙格列汀作用后足细胞炎症因子和氧化应激指标水平降低，且增殖率、Podocin、Nephrin 蛋白水平升高，凋亡率以及肌间线蛋白水平下降，表明沙格列汀可减少足细胞炎症反应和氧化应激，继而减少细胞损伤和凋亡。

MiR 与多种疾病的发病机制有关，在 DM、DN 的发病机制中占据关键地位。MiR-23b-3p 是 miR-23b 的 1 个亚型，具有类似于 miR-23b 的生物学功能，参与多种细胞的分化、增殖、发育和代谢[13]。研究显示，通过上调 miR-23b 可改善高糖诱导的小鼠足细胞损伤[14]。MiR-23b-3p 作为 DN 的潜在治疗靶点，在患者尿外泌体中表达下调[15]，且通过高水平表达，改善纤维化和蛋白尿，减轻高糖诱导的人系膜细胞增殖和纤维化[16]。本研究结果显示，高糖诱导的细

胞中 miR-23b-3p 表达下降，与 Fei 等[5]的研究结论一致。此外，Wang 等[17]研究显示，miR-23b-3p 抑制剂通过下调抗凋亡蛋白以及上调促凋亡蛋白水平以加重小鼠足细胞损伤。本研究结果显示，沙格列汀作用后 miR-23b-3p 表达上升，且下调 miR-23b-3p 表达降低沙格列汀对足细胞的保护作用。表明沙格列汀可能通过促进高糖诱导的足细胞中 miR-23b-3p 的表达，发挥对足细胞损伤的保护作用。

EGR1 通过促进系膜外基质合成和系膜细胞增殖在 DN 进展中起关键作用[18]。已有研究表明，EGR1 在高糖诱导的人肾小管上皮细胞中表达增加，通过靶向 EGR1 可延缓肾小管间质纤维化[19]。在高糖诱导的足细胞损伤中，Lu 等[20]研究显示，上调 EGR1 表达可促进 DN 中的足细胞损伤，抑制 EGR1 可缓解高糖诱导的足细胞损伤，包括细胞凋亡、纤维化及氧化应激[6]。本研究与前述结果一致。生物信息学软件显示，miR-23b-3p 与 EGR1 存在结合位点，两者共同在高糖诱导的人肾系膜细胞增殖和肾纤维化中发挥作用。因此，沙格列汀可能通过上调 miR-23b-3p 负调控 EGR1 在高糖诱导的足细胞中发挥作用。

4 结论

综上所述，沙格列汀可能通过上调 miR-23b-3p 负调控 EGR1 减轻高糖诱导的足细胞凋亡和损伤。MiR-23b-3p/EGR1 轴可能成为治疗 DN 足细胞损伤的新靶点。然而，本研究只是在细胞水平上验证了 miR-23b-3p/EGR1 轴对高糖诱导足细胞损伤的影响，后续将在体内水平进行探索。

参考文献：

[1] Liu S, Yuan Y, Xue Y, *et al*. Podocyte injury in diabetic kidney disease: a focus on mitochondrial dysfunction[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 832887.

[2] Barutta F, Bellini S, Gruden G. Mechanisms of podocyte injury and implications for diabetic nephropathy[J]. Clin Sci (Lond), 2022, 136(7): 493-520.

[3] Orime K, Terauchi Y. Efficacy and safety of saxagliptin for the treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. Expert Opin Pharmacother, 2020, 21(17): 2101-2114.

[4] Hu Y, Ye S, Xing Y, *et al*. Saxagliptin attenuates glomerular podocyte injury by increasing the expression of renal nephrin and podocin in type 2 diabetic rats[J]. Acta Diabetol, 2020, 57(3): 279-286.

[5] Fei B, Zhou H, He Z, *et al*. KCNQ1OT1 inhibition alleviates high glucose-induced podocyte injury by adsorbing miR-23b-3p and regulating Sema3A[J]. Clin Exp Nephrol, 2022, 26(5): 385-397.

[6] Xia J, Sun W, Dun J. LncRNA 1500026H17Rik knockdown ameliorates high glucose-induced mouse podocyte injuries through the miR-205-5p/EGR1 pathway[J]. Int Urol Nephrol, 2023, 55(4): 1045-1057.

[7] Yu D, Yang X, Zhu Y, *et al*. Knockdown of plasmacytoma variant translocation 1 (PVT1) inhibits high glucose-induced proliferation and renal fibrosis in HRMCs by regulating miR-23b-3p/early growth response factor 1 (EGR1)[J]. Endocr J, 2021, 68(5): 519-529.

[8] Kubo A, Hidaka T, Nakayama M, *et al*. Protective effects of DPP-4 inhibitor on podocyte injury in glomerular diseases[J]. Bio Med Central Nephrol, 2020, 21(1): 402.

[9] Jiang A, Song A, Zhang C. Modes of podocyte death in diabetic kidney disease: an update[J]. J Nephrol, 2022, 35(6): 1571-1584.

[10] Gao J, Liang Z, Zhao F, *et al*. Triptolide inhibits oxidative stress and inflammation via the microRNA-155-5p/brain-derived neurotrophic factor to reduce podocyte injury in mice with diabetic nephropathy[J]. Bioengineered, 2022, 13(5): 12275-12288.

[11] Chen A, Feng Y, Lai H, *et al*. Soluble RARRES1 induces podocyte apoptosis to promote glomerular disease progression[J]. J Clin Invest, 2020, 130(10): 5523-5535.

[12] Zeng L, Szeto CC. Urinary podocyte markers in kidney diseases[J]. Clin Chim Acta, 2021, 523: 315-324.

[13] Chai J, Xu L, Liu N. MiR-23b-3p regulates differentiation of osteoclasts by targeting PTEN via the PI3k/AKT pathway[J]. Arch Med Sci, 2019, 18(6): 1542-1557.

[14] 渠风琴, 张彩香, 张俊亭. 微RNA-23b通过p38MAPK信号通路改善高糖诱导的小鼠足细胞损伤[J]. 中华生物医学工程杂志, 2019, 25(5): 536-541.

[15] Zang J, Maxwell AP, Simpson DA, *et al*. Differential expression of urinary exosomal microRNAs miR-21-5p and

miR-30b-5p in individuals with diabetic kidney disease[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 10900.

[16] Zhong W, Zeng J, Xue J, *et al*. Knockdown of lncRNA PVT1 alleviates high glucose-induced proliferation and fibrosis in human mesangial cells by miR-23b-3p/WT1 axis[J]. Diabetol Metab Syndr, 2020, 12: 33.

[17] Wang J, Luo J, Du L, *et al*. Nuclear paraspeckle assembly transcript 1 promotes the podocyte injury via targeting miR-23b-3p/B-cell lymphoma-2 interacting protein 3 like axis[J]. Ren Fail, 2022, 44(1): 1961-1975.

[18] Ye H, Yan J, Wang Q, *et al*. The protective effects of cabozantinib against high glucose-induced damages in in vitro renal glomerular endothelial cells model via inhibition of early growth response-1 (Egr-1)[J]. Bioengineered, 2022, 13(4): 10605-10616.

[19] Liu F, Zhang ZP, Xin GD, *et al*. MiR-192 prevents renal tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy by targeting Egr1[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(13): 4252-4260.

[20] Lu J, Chen PP, Zhang JX, *et al*. GPR43 activation-mediated lipotoxicity contributes to podocyte injury in diabetic nephropathy by modulating the ERK/EGR1 pathway[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(1): 96-111.

（编辑：沈佳婕）

