血浆外泌体 lncRNA 在庆大霉素致大鼠肾损伤中的作用

郑敏慧[1,2]，杨紫轩[1,2]，顾梦芸[1,2]，孙智敏[3,4]，汤纳平[1,2]*

（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海益诺思生物技术有限公司，上海 201203；3. 安徽中医药大学药学院，安徽合肥 230013；4. 长三角药物高等研究院，长三角药学高等工程学院，江苏南通 226133）

摘要：药物诱导的肾毒性（DIN）是药物开发阶段常见的不良反应。传统的肾损伤血清生物标志物，如血尿素氮和血清肌酐，缺乏敏感性和特异性，需要找到更优秀的新型生物标志物。该研究通过对 SD 大鼠肌内注射 80 mg/kg 硫酸庆大霉素（GEN）构建药物性肾损伤模型并对其进行全转录组测序，整合 DIN 血浆外泌体长链非编码 RNA（lncRNA）和 mRNA 的表达谱。随后，通过实时荧光定量逆转录 PCR（RT-qPCR）测定鉴定并验证差异表达（differentially expressed，DE）的 lncRNA，利用基因本体（GO）和京都基因组百科全书（KEGG）富集分析 DE mRNA 的功能作用，并构建竞争性内源性 RNAs（ceRNAs）共表达和调控网络。测序得到了 500 个 DE lncRNA 和 1 027 个 DE mRNA。经 GO、KEGG 分析，后者主要与信号转导和免疫系统有关。所构建的 ceRNA 网络包括 32 个上调的 lncRNAs、151 个下调的 miRNAs 和 42 个上调的 mRNAs。RT-qPCR 结果显示 NONRATT021116.2 和 NONRATT004088.2 在大鼠血液中确实呈显著上调趋势。针对以上 2 个 lncRNA 构建的 lncRNA/miRNA/mRNA ceRNA 网络中，let-7b-5p 表现出与 NONRATT021116.2 的高度关联，表明它可能参与了 GEN 致药物性肾损伤中炎症反应的调节。该研究利用测序技术揭示了 GEN 诱发肾毒性大鼠中的 DE lncRNA 和 DE mRNA，并对这些 lncRNAs 进行了进一步研究，有助于深入了解 DIN 的发病机制，有可能找到 DIN 诊断标志物和治疗靶点。

关键词：药物诱导的肾毒性；长链非编码 RNA；急性肾损伤；外泌体；竞争性内源性 RNA 网络

中图分类号：R692；R96　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2024）07-0973-14

引用：郑敏慧，杨紫轩，顾梦芸，等．血浆外泌体 lncRNA 在庆大霉素致大鼠肾损伤中的作用［J］．中国医药工业杂志，2024, 55（7）: 973-986．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.07.011

The Role of Plasma Exosomal lncRNA in Gentamicin-induced Kidney Injury in Rats

ZHENG Minhui[1,2], YANG Zixuan[1,2], GU Mengyun[1,2], SUN Zhimin[3,4], TANG Naping[1,2]*

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Shanghai Innostar Bio-Technology Co., Ltd., Shanghai 201203; 3. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230013; 4 Yangtze Delta Drug Advanced Research Institute, Yangtze Delta Pharmaceutical College, Nantong 226133*)

ABSTRACT: Drug-induced nephrotoxicity (DIN) is a common adverse effect during drug development phase. However, conventional serum biomarkers of renal injury, such as blood urea nitrogen and serum creatinine, lack sensitivity and specificity. It is crucial to discover superior novel biomarkers of DIN. In this study, a DIN model was constructed by intramuscular injection of 80 mg/kg of gentamicin sulphate (GEN) in SD rats, and plasma exosomal lncRNA and mRNA expression profiles were evaluated by RNA sequencing. Differentially expressed (DE) lncRNAs were identified and validated through real-time reverse transcription quntitative PCR (RT-qPCR) assays. The functional roles of DE mRNAs were elucidated using Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses. Additionally, coding/non-coding co-expression and competing endogenous RNAs (ceRNAs) network to unveil potential relationships in DIN were established. The results showed that 500 differentially expressed (DE) lncRNAs and 1 027 DE mRNAs were identified, the latter primarily associated with signal transduction and the immune system. The established ceRNAs co-expression and regulation networks comprised 32 upregulated lncRNAs, 151 downregulated miRNAs, and 42 upregulated mRNAs. Through RT-qPCR, NONRATT021116.2 and NONRATT004088.2 were found notably upregulated in rat blood. Then, NONRATT021116.2/miRNA/mRNA and NONRATT004088.2/miRNA/mRNA ceRNA networks were

constructed. Notably, let-7b-5p exhibited a high association with NONRATT021116.2, suggesting potential involvement in modulating inflammatory responses. This study reveals DE lncRNAs and mRNAs in DIN rats using sequencing techniques. Further exploration of these lncRNAs promises insights into the genetic mechanisms underlying DIN and may lead to the identification of diagnostic markers and therapeutic targets.

Key Words: drug-induced nephrotoxicity; long non-coding RNA; acute kidney injury; exosome; competing endogenous RNA network

药物诱导的肾毒性（drug-induced nephrotoxicity，DIN）是药物开发阶段常见的不良反应。严重肾损伤可能导致非常危险的后果，且可能是永久性的。因此，早期肾损伤的诊断尤为迫切。然而，传统的肾损伤血清生物标志物，如血尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）和血清肌酐（serum creatinine，sCr），缺乏敏感性和特异性，且易受到其他因素的干扰[1]。因此，探索具有更高灵敏度和特异性的新型生物标志物对早期诊断肾损伤至关重要。

长链非编码RNA（lncRNA）是一类长度超过200个核苷酸的非编码RNA。其亚细胞定位决定了其生物学功能：保留在细胞核中的lncRNA可调节mRNA稳定性、基因转录、翻译和染色质结构；在细胞质中的lncRNA可充当微RNA（microRNA，miRNA）“海绵”，调控mRNA降解[2]。LncRNA表达水平的异常可导致疾病发生，因此可作为多种疾病的生物标志物。近年来，关于各类型肾损伤中lncRNA的研究逐渐增多。例如，在脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的急性肾损伤（acute kidney injury，AKI）模型中，lncRNA-MALAT1表达显著升高，并导致miR-135b-5p表达下调[3]；肝脏源性的外泌体lncRNA-MT1DP可加重镉诱导的肾损伤[4]。

通过全转录组测序与生物信息学分析来筛选下游靶点与作用通路，可获得核心基因，为后续的疾病机制研究提供切入点；亦可筛选出差异表达（differentially expressed，DE）倍数较大的RNA，经验证后作为有潜力的诊断、预后生物标志物。目前，已有一些在不同类型AKI领域中的lncRNA测序与生物信息学分析研究。在糖尿病肾病（diabetic kidney disease，DKD）测序分析[5]中，lnc-HIST2H2AA4-1、VCAN-AS1和MAGI2-AS1被鉴定为3个关键的lncRNA，是DKD的潜在生物标志物；且*Vcan*、*Fn1*、*Ccl2*和*Kng1*被鉴定为该lncRNA相关的竞争性内源性RNA（competing endogenous RNA，ceRNA）网络中的核心基因，参与DKD的免疫和炎症过程。这些特定的lncRNA相关ceRNA调控网络可能参与DKD的发生、发展，有望成为DKD诊断、治疗的新靶点。在大鼠造影剂致急性肾损伤模型（post-contrast acute kidney injury，PC-AKI）中，筛选出的lnc-HILPDA和lnc-PRND可作为早期检测的新型生物标志物，对PC-AKI的临床分型和策略指导产生深刻影响[6]。然而，血浆外泌体lncRNA在DIN中的研究较为缺乏。

庆大霉素（gentamicin，GEN）可通过多种途径引起急性肾损伤，如氧化应激、炎症反应、细胞凋亡、NO产生增多等[7]，是临床常见的致肾毒性的氨基糖苷类抗菌药。本研究基于全转录组测序和生物信息学，分析了GEN诱发大鼠肾毒性模型中血浆外泌体lncRNA的表达谱及其在DIN中的作用通路，并构建外泌体lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA网络，以阐明DIN的分子基础并确定潜在的新型治疗策略。

1　仪器与试药

Mini-PROTEAN® Tetra型立式电泳槽（美国Bio-Rad公司）；Tanon 5200型自动化学发光图像分析系统（上海天能生命科学有限公司）；ZetaView S/N 17-310型纳米粒子跟踪分析（Nanoparticle tracking analysis，NTA）仪（德国Particle Metrix公司）；7060型全自动生化分析仪、透射电子显微镜（TEM）均购自日本Hitachi公司；MD3000型正荧光显微镜（德

收稿日期：2024-03-28

作者简介：郑敏慧（1999—），女，硕士研究生，专业方向：药理学。

通信作者：汤纳平（1981—），男，研究员，从事药物分子毒理学和毒性生物标志物研究。

E-mail：napingtang@innostar.cn

国 Leica 公司）；Rotor-Gene Q 型荧光定量 PCR 仪（德国 QIAGEN 公司）；NovaSeq 6000 型测序仪（美国 Illumina 公司）；Applied Biosystems VeritiPro 型 PCR 仪（美国 Thermo Fisher 公司）。

exoRNeasy Midi 试剂盒、exoEasy Maxi 试剂盒均购自德国 QIAGEN 公司；放射免疫沉淀检测（radio immunoprecipitation assay，RIPA）缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自上海碧云天生物技术股份有限公司；GEN（美国 Sigma-Aldrich 公司，粉末，批号 WXBD5416V）；氯胺酮注射液（江苏中牧倍康药业有限公司，规格 2 mL ∶ 0.1 g，批号 20211022）；赛拉嗪注射液（吉林省华牧动物保健品有限公司，规格 2 mL ∶ 0.1 g，批号 20230413）；TRIzol 试剂（总 RNA 抽提试剂，美国 Invitrogen 公司）；氯仿（国药集团化学试剂有限公司）；伊红染料溶液（醇溶性）、苏木精染料溶液均购自珠海贝索生物技术有限公司；皮克级总 RNA 构建 RNA-seq 文库试剂盒（SMARTer® Stranded Total RNA-seq Kit v2-Pico Input Mammalian，日本 TaKaRa 公司）；SYBR Green PCR 试剂盒（美国 Applied Biosystems 公司）；无 DNase/RNase 蒸馏水（美国 Thermo Fisher 公司）；ReverTra Ace® qPCR RT 试剂盒（日本 TOYOBO 公司）；CD63 抗体、TSG101 抗体、辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的羊抗兔二抗均购自美国 System Biosciences 公司；Calnexi 抗体（美国 Immunoway 公司）；ELISA 试剂盒（Rat TIM-1/KIM-1/HAVCR Quantikine ELISA Kit，美国 R&D Systems 公司）；0.9% 氯化钠溶液（安徽双鹤药业有限责任公司，批号 21111304B）。

20 只 6 ～ 8 周龄的 SD 大鼠（雌雄各半）由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供，动物生产许可证编号为 SCXK（浙）2019-0001。雌雄大鼠体质量分别为 200 ～ 290 和 390 ～ 450 g。所有试验均符合中国有关实验动物使用和护理的规定，由上海益诺思生物技术有限公司动物管理和使用委员会批准，动物使用许可证号为 SYXK（沪）2019-0009。本试验的伦理审查号 IACUC-2022-r-075。

2 方法与结果

2.1 动物试验与血样处理方法

大鼠饲养在 SPF 动物房中，温度为 20 ～ 26 ℃，相对湿度为 40%～ 70%。每小时换气次数≥ 15 次，使用 100%的全新风（无空气循环）。自动光照，每 12 h 明暗交替。试验开始前，大鼠要经过至少 3 d 的检疫期和适应期喂养，试验期间可自由摄食和饮水。20 只大鼠被随机分为 2 组，试验组（n=10）和对照组（n=10），雌雄各半。

GEN 诱导的肾毒性损伤模型构建：试验组大鼠每天肌内注射 80 mg/kg GEN（40 mg/mL，2 mL/kg），对照组大鼠注射等量的 0.9%氯化钠溶液，连续注射 14 d。给药 14 d 后，通过腹腔注射含 40 mg/mL 氯胺酮和 5 mg/mL 赛拉嗪的混合液（1 mL/kg）对其进行麻醉，从腹主动脉收集血液。

血清生化样本处理及检测：血样离心（4 ℃，2 000×g）15 min，取血清，于 2 ～ 8 ℃保存备用。

外泌体 lncRNA 提取样本处理：血样离心（4 ℃，800×g）15 min 取上清液，再离心（4 ℃，16 000×g）10 min，取上清液，于 －70 ～ －90 ℃保存备用。

2.2 动物模型构建和评估

取血清生化样本，用自动生化分析仪，以速率法测定 BUN 和 sCr 水平；另用 ELISA 法，按试剂盒说明书检测肾损伤分子 -1（kidney injury molecule 1，KIM-1）的浓度。解剖摘取肾脏制作病理切片，经苏木精和伊红（hematoxylin and eosin，HE）染色后，在显微镜下观察。

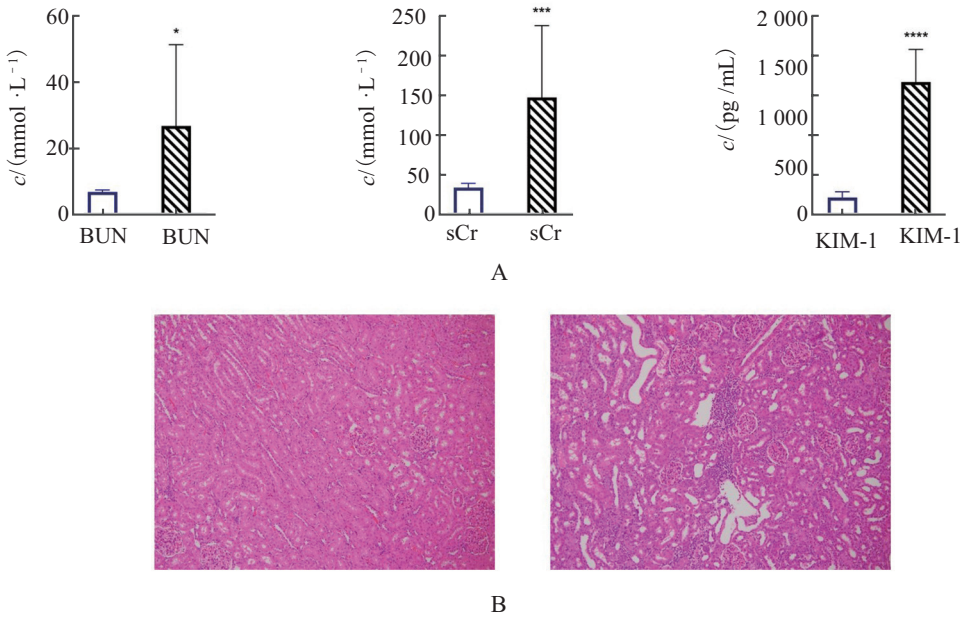
结果显示，注射 GEN（80 mg/kg）14 d 后，大鼠血清中 sCr、BUN 和 KIM-1 水平显著升高（图 1A）。HE 染色结果显示，对照组的肾组织基本正常，而试验组的肾组织则表现出 AKI 的典型特征，包括严重的肾小管变性坏死、中度肾小管扩张和中度炎症细胞浸润（图 1B）。

2.3 血浆外泌体提取与鉴定

取解冻的血浆，离心（4 ℃，13 000×g）10 min，使用 exoEasy Maxi 试剂盒，按说明书分离血浆外泌体，于 －80 ℃保存。

采用 NTA 仪分析外泌体的粒度分布。取冻存的外泌体样本，置 25 ℃水浴中解冻后用 1×PBS（pH 7.2 ～ 7.4）稀释，直接用于 NTA 检测。数据采用 ZetaView 8.04.02 软件进行分析。

采用 TEM 观察外泌体的形态特征。取外泌体 10 μL，滴于铜网上沉淀 1 min，用滤纸吸去浮液。



A— 试验组的 BUN、sCr 和 KIM-1 指标与对照组比较（□—对照组；▨—试验组；与对照组相比，*P<0.05；***P<0.001；****P<0.000 1；n=10）；B— 肾脏组织病理学切片（左为对照组，右为试验组；放大倍数：×200）。

图 1　GEN 诱导的 SD 大鼠肾损伤

Fig.1　GEN-induced Renal Injury in SD Rats

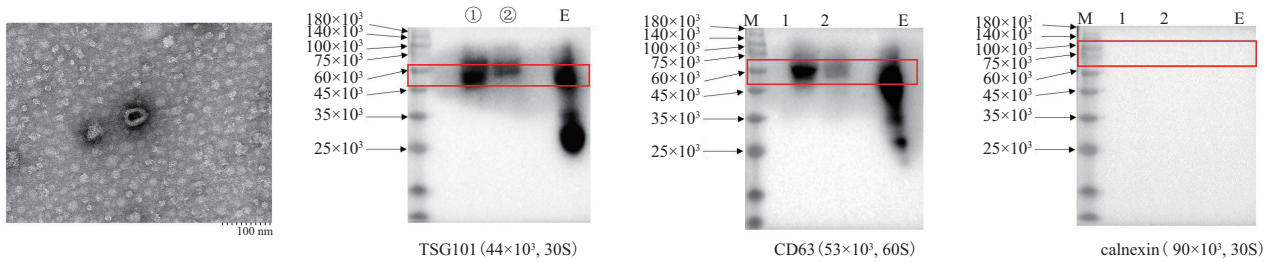
滴加 2%磷钨酸溶液 10 μL 于铜网上沉淀 1 min，用滤纸吸去浮液。常温干燥数分钟后在 100 kV 下进行电镜检测成像。

采用蛋白质印迹法测定外泌体标志蛋白 CD63、TSG101、钙连蛋白（calnexin）的表达[8]。取适量血浆外泌体，加入 RIPA 缓冲液裂解后，用 BCA 蛋白检测试剂盒，按说明书检测蛋白质水平，以等量蛋白上样，电泳分离，转膜后，使用增强的化学发光法观察条带并拍照。

由 TEM 照片可见，分离出的血浆外泌体显示出圆形或椭圆形结构，且为双层膜结构（图 2A）；NTA 结果表明其直径为（127.7±50.6）nm。此外，蛋白质印迹分析表明，外泌体阳性标志物 CD63 和 TSG101 高表达，而外泌体阴性标志物钙连蛋白几乎无表达，说明收集到的为外泌体（图 2B）。

2.4　RNA 提取文库构建和测序

使用 exoRNeasy Midi 试剂盒，按说明书从血浆样本中分离总 RNA；用皮克级总 RNA 构建 RNA-



A—血浆外泌体的 TEM 照片（×300 000）；B ～ D—蛋白质印迹分析结果（M—标准蛋白；1—对照组；2—试验组；E—细胞上清外泌体）。

图 2　血浆外泌体的表征

Fig.2　Characterization of Plasma Exosomes

seq 文库试剂盒，按说明书所述方法构建、扩增文库。取制备好的文库点样，采用测序仪测序，设置碱基的激发波长为 532 和 660 nm。测序基本原理为边合成边测序（sequencing by synthesis，SBS），测序策略为 PE150[9]。将获得的 lncRNA 数据与 NONCODE 数据库、Ensembl 基因组数据库中的已知 lncRNA 进行对比确认，若测定出未收录的 lncRNA，则为新型 lncRNA。

2.5 统计学分析

统计检验采用 SPSS v9.5.0.0 软件进行。正态分布变量之间的差异采用独立样本 *t* 检验（$P \geqslant 0.05$），非正态分布变量之间的差异采用 Mann-Whitney U 检验。$P<0.05$ 为具有统计学意义。相关分析采用皮尔逊相关系数。诊断值使用 ROC 曲线（Medcalc v20.1.0 软件）确定。

2.6 DE lncRNA 和 DE mRNA 表达分析

首先用 edgeR 3.34.0 软件数据包中 *M* 值的加权截尾均值（trimmed mean of *M* values，TMM）算法对片段计数进行归一化处理，再根据假设检验模型计算 *P* 值。通过每 100 万个片段中每 1 000 个碱基的转录本片段数（fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped，FPKM）计算差异表达倍数（fold-change，FC）。

以 $|\log_2 FC|>1.0$ 且 $P<0.05$ 为指标，筛选出 1 027 个 DE mRNA，其中 845 个上调，182 个下调（图 3A、B，补充表于编辑部保存）。此外，鉴定出 500 个 DE lncRNA，包括 276 个上调的 lncRNA 和 224 个下调的 lncRNA（图 3C、D，补充表于编辑部保存）。表 1 列出了部分 lncRNA 的表达变化。DE lncRNA 和 DE mRNA 火山图如图 3B、D 所示。

2.7 DE lncRNA 和 mRNA 富集分析

采用基因本体（gene ontology，GO）GO 和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）数据库对 DE lncRNA 和 mRNA 进行分析。GO 是一个在生物信息学领域中广泛使用的本体，针对 3 个生物学层次（细胞组分、分子功能、生物过程）对应的差异基因数目进行统计。KEGG 是一个整合了基因组、化学和系统功能信息的数据库，对 KEGG 各个细胞通路大类上的差异表达基因数目进行统计。

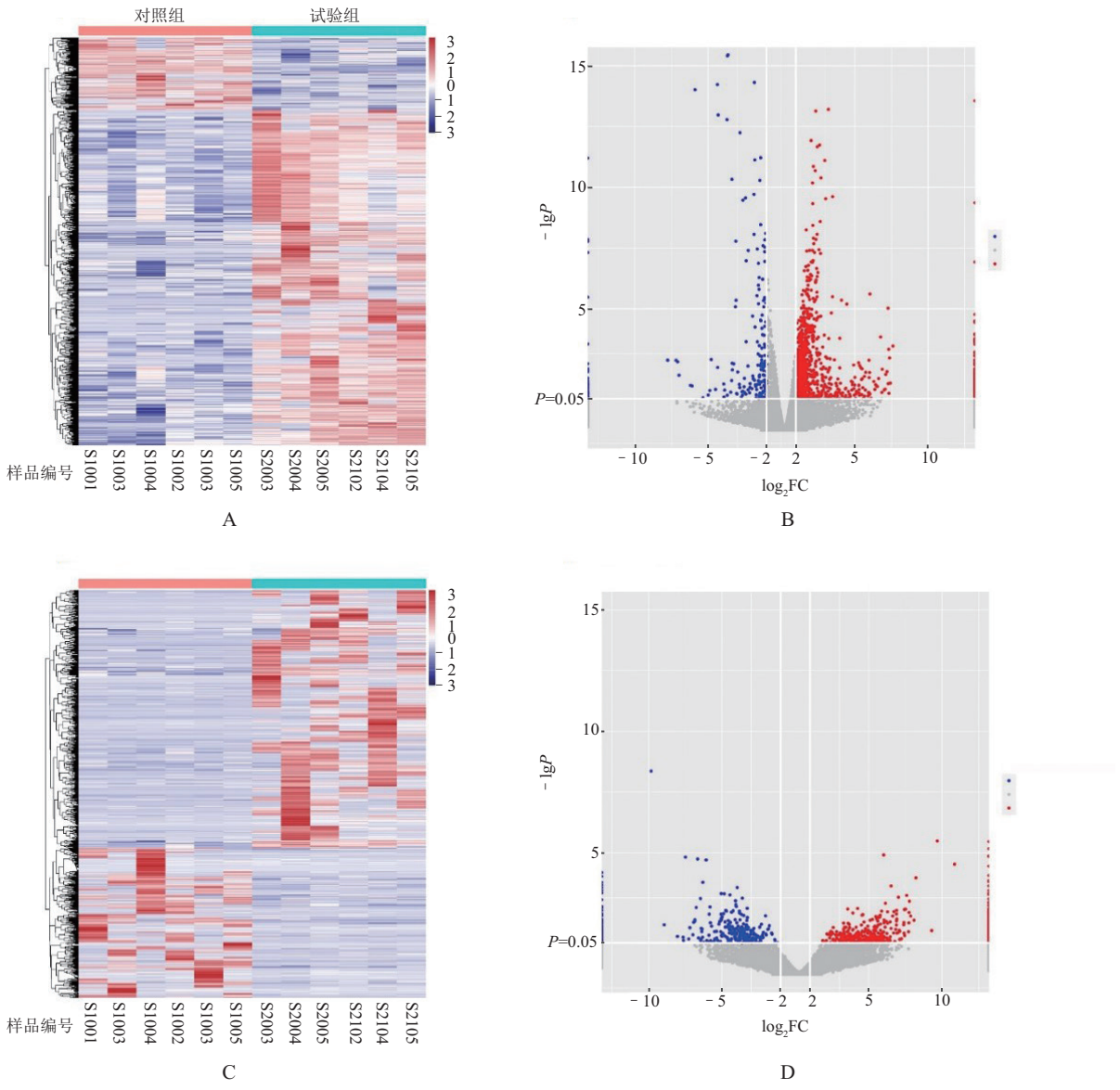
结果表明，DE mRNA 在多个生物学过程中具有明显的富集作用，包括细胞因子产生的正向调节（GO: 0001819）和适应性免疫反应（GO: 0002250）。此外，分子在整合素结合（GO: 0005178）方面也有功能富集（图 4、图 5，补充表于编辑部保存）。KEGG 分析表明，下游 DE mRNA 可能通过细胞外基质（extracellular matrix，ECM）- 受体相互作用和磷脂酰肌醇 3- 激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/ 蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）通路参与并介导 DIN 的发生（图 6、图 7，补充表于编辑部

表 1 部分 lncRNA 的变化倍数

Tab.1 Fold Change of Partial lncRNA

NONCODE ID	$\log_2 FC$[2)]	*P*	表达情况	所在位置
NONRATT023574.2	9.29	0.015 6	上调	5:140559206-140559957
MSTRG.97242.1[1)]	6.52	0.000 2	上调	7:116364082-116483712
NONRATT000311.2	6.14	0.001 2	上调	1:63763816-63766461
NONRATT021116.2	6.02	1.21×10^{-5}	上调	4:7818646-7820055
NONRATT015726.2	5.61	0.006 3	上调	2:219627994-219628863
NONRATT024630.2	5.10	0.005 9	上调	6:133667602-133668224
NONRATT004088.2	3.68	0.008 7	上调	10:14088182-14089332
NONRATT003019.2	−9.83	4.28×10^{-9}	下调	1:168971269-168971702
NONRATT008218.2	−8.94	0.009 0	下调	13:50252710-50258947
NONRATT024765.2	−8.04	0.027 4	下调	6:2881590-2885133
NONRATT023895.2	−7.65	0.029 3	下调	5:168153225-168154491
NONRATT004044.2	−7.63	0.039 6	下调	10:852982-859183
NONRATT007183.2	−7.49	1.48×10^{-5}	下调	11:87557983-87577305

注：[1)] 表示 NONCODE 数据库、Ensembl 数据库未收录的 lncRNA；[2)] 表示 2 个样品（组）间表达量的比值，对其取以 2 为底的对数。



DE mRNAs(A) 和 DE lncRNA(C) 的聚类分析热图（红色—表达水平高，蓝色—表达水平低）；mRNA(B) 和 lncRNA(D) 表达变化的火山图（上调和下调基因分别用红色和蓝色表示，灰色表示无显著性）。

图 3　DE mRNA 和 lncRNA 的表达谱分析

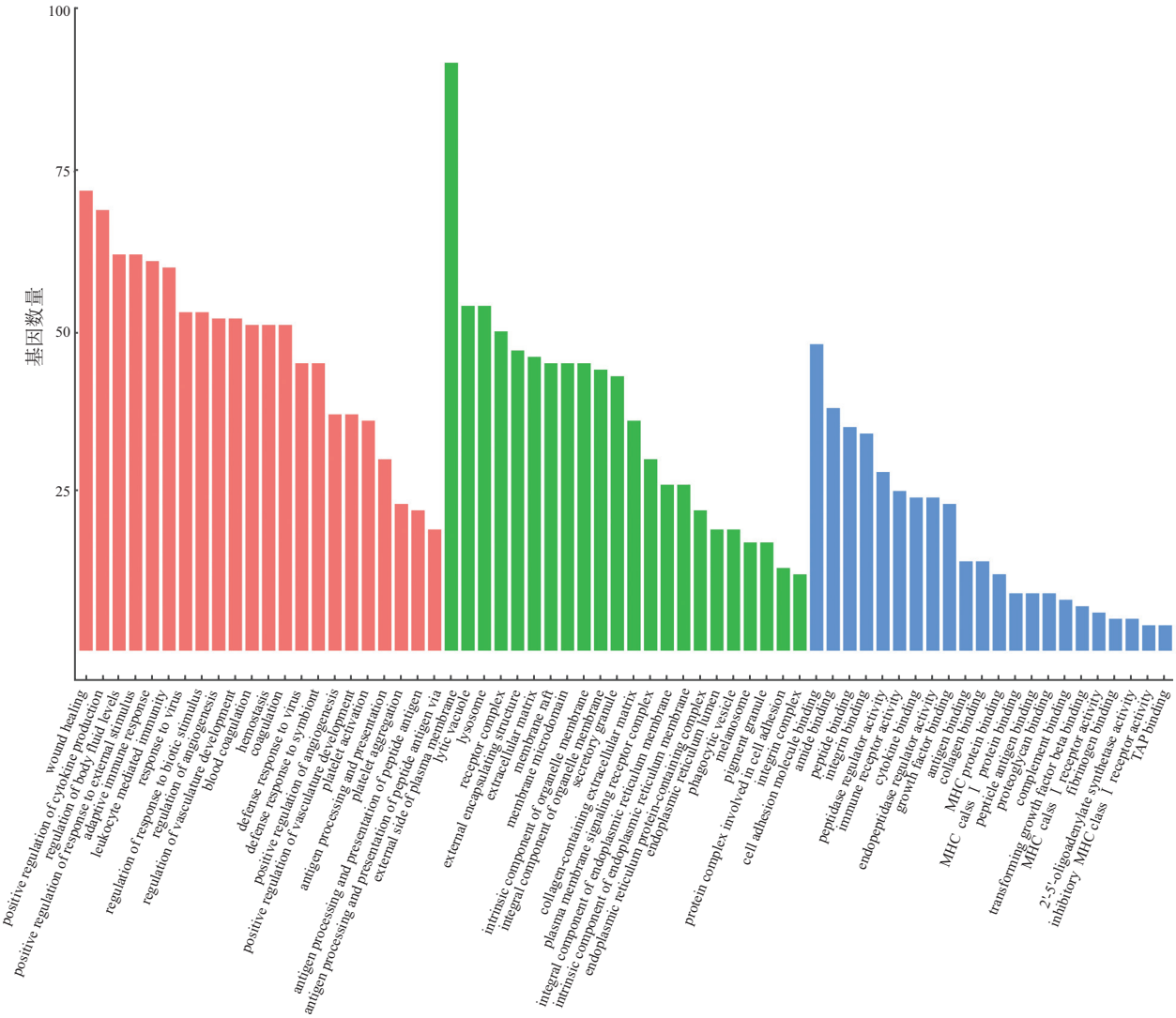
Fig.3　Expression Profiling Analyses of DE mRNAs and lncRNAs

保存）。这些结果表明 DE mRNA 可能通过这些途径参与 GEN 诱导的肾毒性。

2.8　ceRNA 网络分析

对试验组和对照组之间 lncRNA 和 mRNA 的显著性水平进行了研究，分析了其序列，以确定 miRNA 响应元件。采用 MiRanda(http://www.microrna.org/microrna/home.do) 预测 miRNA 识别基序和 miRNA 响应基因。先通过 miRNA 预测下游 mRNA，再通过 miRNA 预测相关 lncRNA，选择 2 种预测结果之间的交集，通过皮尔森相关性分析评估 lncRNA-mRNA 相互作用，然后建立 lncRNA-miRNA-mRNA 网络。使用 Cytoscape v3.10.1 对所有网络进行可视化。

该 ceRNA 网络包括 32 个上调的 lncRNA、151 个下调的 miRNA 和 42 个上调的 mRNA（图 8，补充表存于编辑部）。值得注意的是，NONRATT005450.2/



注：不同的颜色代表不同的生物学过程（■—生物学过程；■—细胞组分；■—分子功能）；纵坐标为注释到某一 term（该 term 及其子 term）的基因数目。

图 4 DE mRNA 的 GO 分析结果一

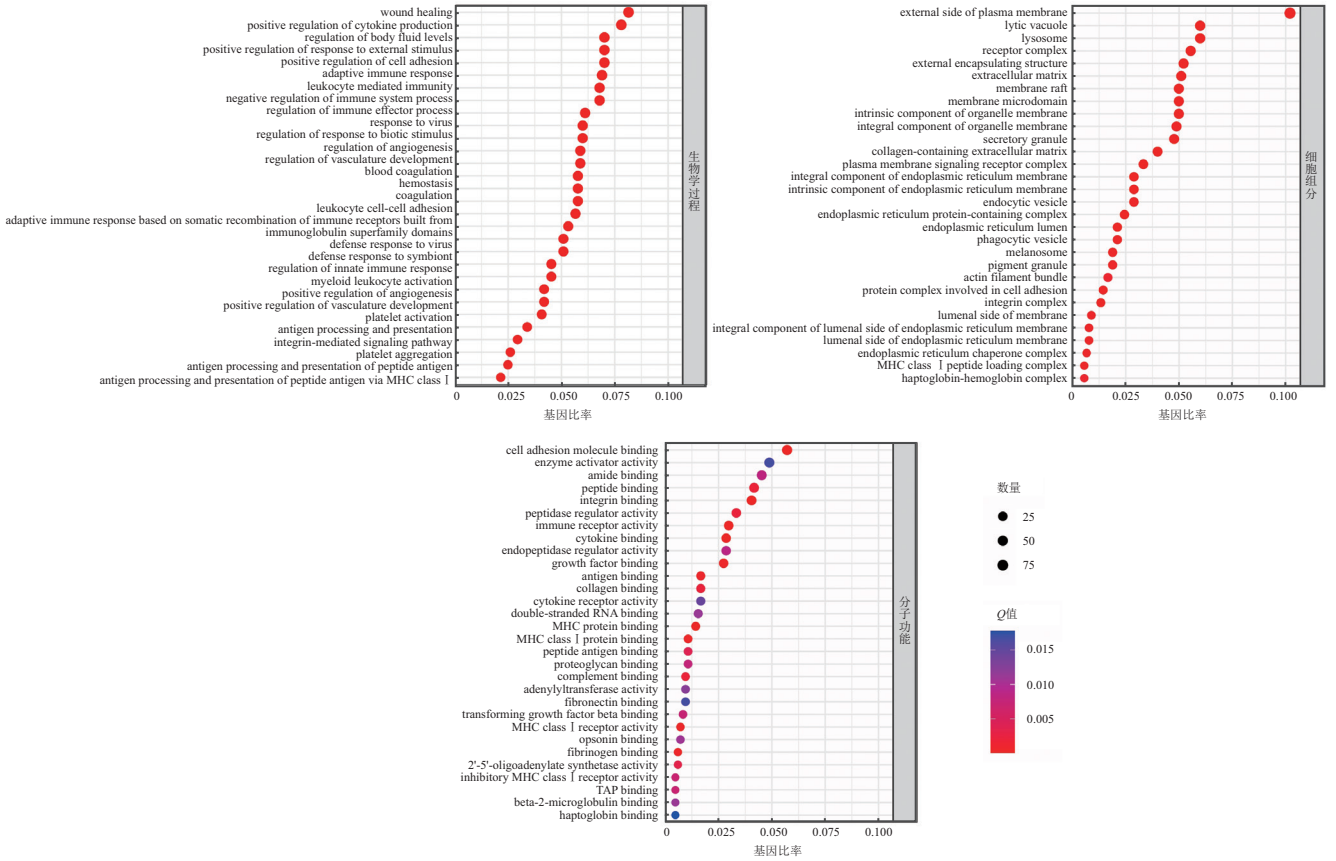
Fig.4 GO Analysis Result of DE mRNA (the First)

CMTM3/rno-miR-181b-5p 是涉及免疫反应调节的相关性最强的作用轴。此外，相关性较强的 mRNA 是能促进炎症反应的血清趋化因子样受体 1(chemokine-like receptor 1，CMKLR1)[10]。

2.9 实时荧光定量逆转录 PCR(RT-qPCR) 验证

为了证实测序和生物信息学分析的结果，对测序中表现出显著差异的 8 个 lncRNA 进行了 RT-qPCR。取总 RNA，用 ReverTra Ace® qPCR RT 试剂盒，按说明书合成 cDNA。以甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH) 为内参基因，用 SYBR Green PCR 试剂盒，按说明书在实时 PCR 系统中进行 RT-qPCR，每个目标基因的反应体系设 3 个复孔。热循环条件为：50 ℃孵育 2 min；95 ℃，10 min；40 个循环 (95 ℃，15 s，60 ℃，1 min)。试验使用的引物序列如表 2 所示。

结果 (图 9) 显示，与对照组相比，试验组中，2 个 lncRNA(NONRATT021116.2 和 NONRATT004088.2) 的表达显著上调，与测序数据展示出的上调趋势一致。



注：点的颜色代表 GO 的显著性（*Q* 值）；点的大小代表映射到某一 GO 条目的基因数量。

图 5　DE mRNA 的 GO 分析结果二

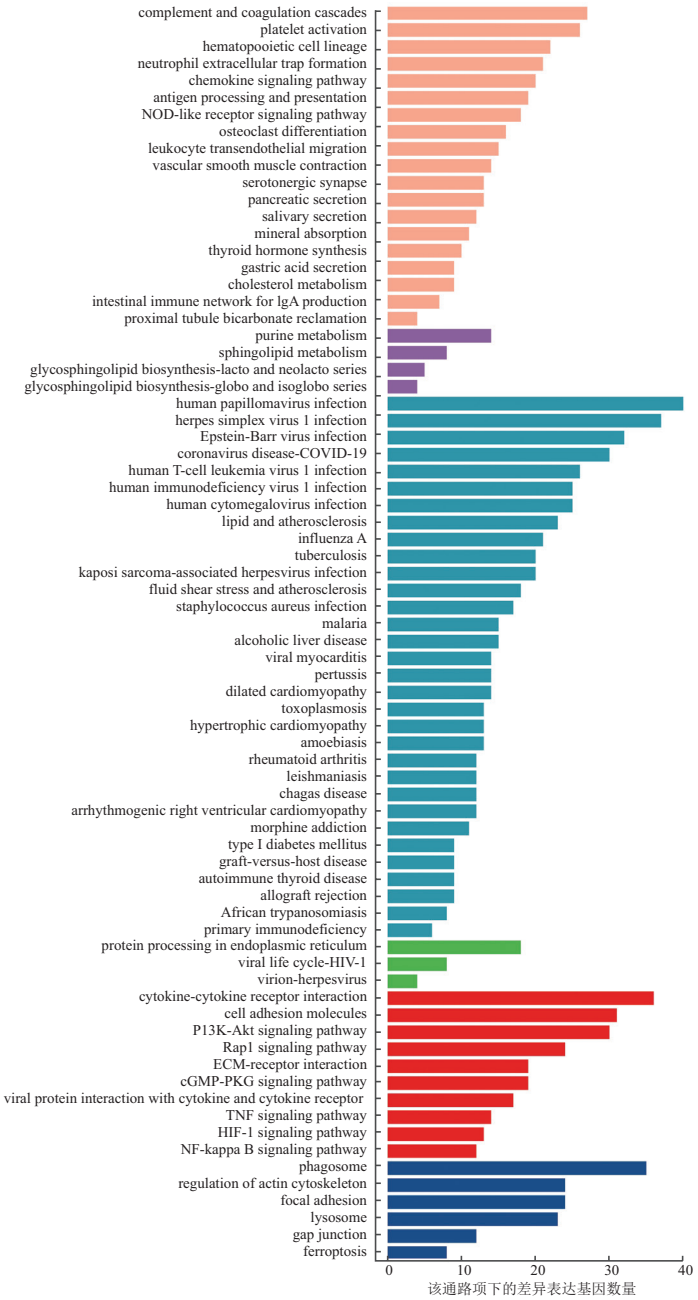
Fig.5　GO Analysis Result of DE mRNA (the Second)

2.10　候选 lncRNA 的诊断价值

本研究通过绘制受试者工作特征（receiver operating characteristic curve，ROC）曲线评估了 NONRATT021116.2 和 NONRATT004088.2 对 GEN 引起的肾损伤的诊断潜力。结果显示，NONRATT021116.2 的 AUC 为 0.722，灵敏度为 66.67 %，特异度为 83.33 %；NONRATT004088.2 的 AUC 为 0.500，灵敏度和特异度分别为 50%和 83.33%（图 10）。本研究结果提示 NONRATT021116.2 可能可以作为药物诱导肾损伤的候选诊断标志物，而 NONRATT004088.2 的 AUC 较低，不考虑将其作为损伤标志物，后续只做损伤相关机制的研究。

2.11　NONRATT021116.2 和 NONRATT004088.2 的通路预测

NONRATT021116.2 和 NONRATT004088.2 表现出作为 DIN 生物标志物潜力，可能在介导 GEN 诱导的肾损伤中发挥关键作用。为探究其在 GEN 诱导的肾损伤中的具体功能，本研究以这 2 个 lncRNA 为重点，探讨了它们之间的相互作用，并构建了 NONRATT021116.2/miRNA/mRNA 和 NONRATT004088.2/miRNA/mRNA ceRNA 网络（图 11A、B，补充表于编辑部保存）。结果显示，NONRATT021116.2 与 let-7b-5p 呈强相关性。文献[11]报道，let-7b-5p 可影响人肾皮质近曲小管上皮细胞（HK-2 细胞）的凋亡、炎症和生长，对顺铂所致的肾小管损伤也有保护作用。NONRATT004088.2 与 miR-34a-5p 高度相关；而 miR-34a-5p 可通过 Sirt1/HIF-1α 轴促进肾间质细胞增殖和纤维化，同时通过靶向 Jagged-1/Notch-1 通路抑制促纤维化的 TGF-β1 发挥诱导肾小管上皮细胞间充质转化的作用[12]。



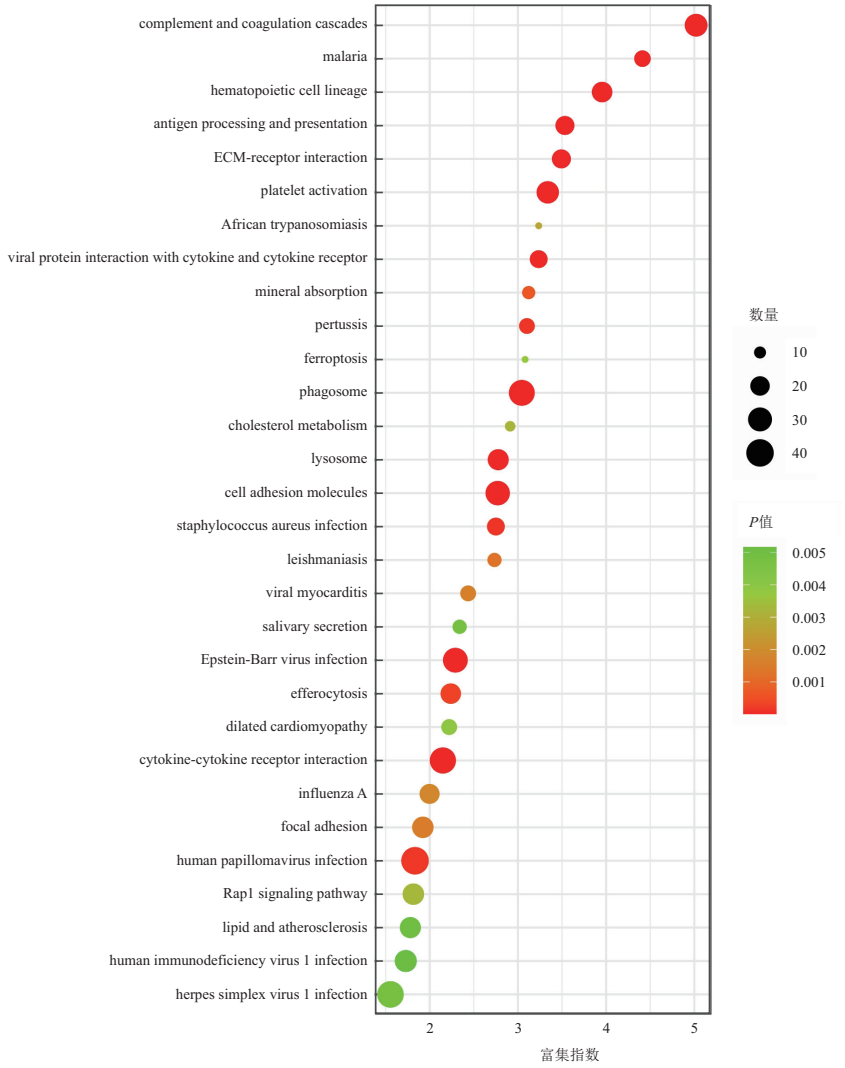
不同的通路类型：■—生物体系统；■—新陈代谢；■—人类疾病；■—遗传信息处理；■—环境信息处理；■—细胞过程。

图 6 DE mRNA 的 KEGG 分析结果一

Fig.6 KEGG Analysis Result of DE mRNA (the First)

3 讨论

LncRNAs 参与了肾脏病理生理学的基础生物学过程。然而，这些 lncRNAs 参与药物性肾损伤的分子机制仍不清楚。本研究对试验组和对照组进行了 RNA 测序分析，以明确 mRNA 和 lncRNA 表达的变化，从而确定减轻 DIN 的新靶点和生物标志物。通过分析血浆外泌体 RNA，发现了 1 027 个 DE mRNA(845 个上调，182 个下调）和 500 个 DE lncRNA(276 个上调，224 个下调）。随后采用 RT-qPCR 验证了 8 个 DE lncRNA。其中，



注：点的大小代表位于该通路项下的差异表达基因数量，颜色深浅代表 *P* 值大小；纵坐标为基因差异表达最显著的 30 个通路。

图 7　DE mRNA 的 KEGG 分析结果二

Fig.7　KEGG Analysis Result of DE mRNA (the Second)

NONRATT021116.2 和 NONRATT004088.2 此前未被报道，但表现出明显的上调趋势，显示出对肾脏损伤的高特异性。

本研究采用了 KEGG 通路富集和 GO 功能富集分析来深入了解这些 DE mRNA 的生物学功能。GO 研究结果表明，DE mRNA 与细胞因子的产生和适应性免疫反应过程有关。已有研究[13]显示在脓毒症急性肾损伤中，干扰素调节因子 5(IRF5)作为 Toll 样受体 9(TLR9) 信号通路的下游分子，能促进炎症反应，导致肿瘤坏死因子 -α(TNF-α)和白介素 -10(IL-10) 等细胞因子水平升高。此外，在脓毒症诱导的 AKI 患者中，血小板反应蛋白 -1(thrombospondin-1，THBS1) 的表达明显升高，使得表达明显升高，造成消皮素 D-N(Gasdermin D-N，GSDMD-N)、半胱天冬酶 -1(Caspase-1)、NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3，NLRP3)、IL-18 和 IL-1β 的表达明显降低。此外，THBS1 可激活 TGF-β/Smad3/NLRP3/Caspase-1 轴，引发细胞脓毒症，并加剧脓毒症诱导的 AKI 中的氧化应激反应[14]。这些研究结果与 GO 富集分析的结

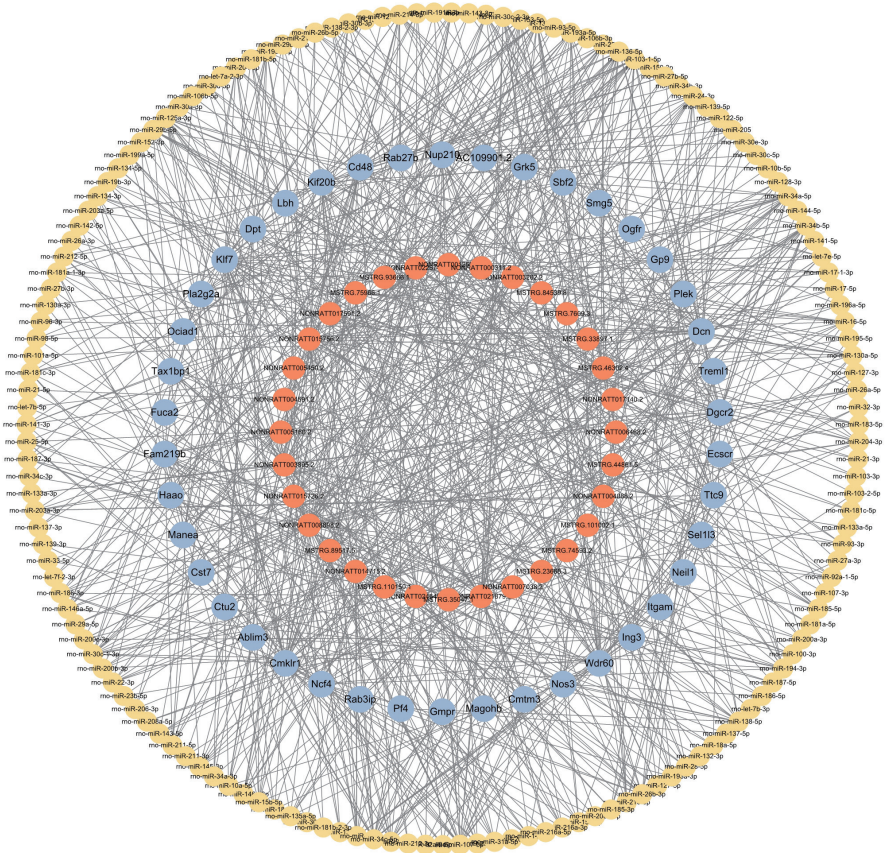


图 8 GEN 诱导的大鼠肾毒性损伤中的 lncRNA 相关 ceRNA 网络（最内侧的橙色代表 lncRNA，中间的蓝色代表 mRNA，最外侧的黄色圆圈代表 miRNA，线段表示关联）

Fig.8 LncRNA-associated CeRNA Networks in GEN-induced Nephrotoxicity Injury in Rats (The innermost circle in orange represents lncRNA, the middle circle in blue represents mRNA, the outermost circle in yellow indicates miRNA, and the line segments denote associations)

果非常吻合。KEGG 分析结果显示，DE mRNA 主要富集在 PI3K-Akt 轴和 ECM- 受体相互作用中。这 2 种作用在各种类型的 AKI 中都起关键作用。例如，右美托咪定通过 α_2- 肾上腺素受体和抑制 PI3K/AKT/ 雷帕霉素靶点（mammalian target of rapamycin，mTOR）轴，在脂多糖（LPS）诱导的 AKI 中增强自噬，从而消除受损线粒体，减少氧化应激和细胞凋亡[15]。

构建的 lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA 网络结果揭示了某些枢纽 lncRNA 通过各种机制调节 mRNA 的表达。lncRNA 调控下游 mRNA 表达的关键过程之一是作为“海绵”降低了 miRNA 水平。其中，相关性最高的轴是 NONRATT005450.2/CKLF 样的 MARVEL 跨膜结构域 3（CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3，CMTM3）/rno-miR-181b-5p。CMTM3 能通过抑制核转录因子 κB 基本调节蛋白（nuclear factor NF-κB essential modulator，NEMO）的泛素化总水平来促进 NEMO/NF-kB 通路，从而在幽门螺杆菌感染过程中提高 IL-8 的产生和胃上皮细胞的凋亡[16]。miR-181b-5p 与高迁移率族蛋白 B2（high mobility group proteins 2，HMGB2）结合后，可抑制 HMGB2 在糖尿病肾病中的表达，从而促进了 HK-2 细胞的炎症反应和凋亡[17]。此外，ceRNA 网络还涉及几个枢纽基因，如 *Cmklr1*、*Dgcr2*、*Dcn*、*Klf7* 等。CMKLR1 可促进缺血再灌注 AKI 中的炎症反应[10]。KLF7 是 lncRNA ENST00000453774.1（lnc453774.1）的下游靶标，参与自噬、氧化应激和细胞黏附，从而调控肾脏纤维化[18]。DCN 是一种由核心蛋白和糖胺聚糖链组成的小蛋白多糖，可能

表 2　qPCR 的引物序列

Tab.2　Primer Sequences for qPCR

基因	序列（5'–3'）
NONRATT000311.2	F: TGGTCCTCATAGTCCTTTCAATTCT R: CTGCATGGTGGGACTGTCTTT
NONRATT021116.2	F: CTAAAGCGCTCTGCCTCACA R: CTTCCAGCTACCCCAGAACCT
NONRATT015726.2	F: GAGCTCATCGTGGCTCCAA R: CATGGATTCTCCAGCCTTTACTTAA
NONRATT024630.2	F: CGGCTTCGTCGAACTCAAA R: CGGTGGTGGTAAGTGTGATAAACA
NONRATT020426.2	F: TGCCCCTTCCTCATAGAACAA R: GCTCACTGGACTCCTTCTCTCAA
MSTRG.46996.1	F: GCCCCATCCACTTCCTTTTC R: CCTTCACGTGGTGTATTTACCCTAT
MSTRG.89597.3	F: TCTTGTCATCAAGCCCTTCTTG R: CCATCCCATGTACAGACAACAAA
NONRATT004088.2	F: CTCACAGTGGCCTTTCTTGCTTA R: CCACCAGCACATCCCAAAC
GAPDH	F: TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAAC R: GGCCTCTCTCTTGCTCTCAGTATC

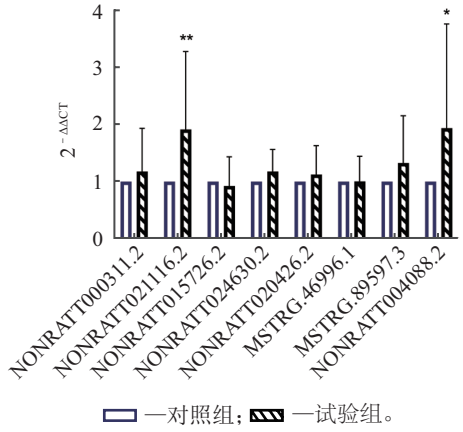


图 9　RT-qPCR 验证 GEN 导致的肾损伤中 lncRNA 的相对表达量（与对照组比 *P<0.05，**P<0.01；n=10）

Fig.9　RT-qPCR Confirmation of lncRNAs Expression of the Test and Control Groups (Compared with the control group, *P<0.05, **P<0.01; n=10)

会干扰转化生长因子（transforming growth factor-β，TGF-β）与其受体复合物的结合，在减少肾小球肾炎期间系膜中 ECM 沉积、抑制系膜细胞增殖和阻碍肾小球硬化发展方面起关键作用 [19]。由于 GEN 介导的药物性肾损伤会出现炎症反应、氧化应激、系膜细胞损伤等，上述 mRNA 可作为潜在下游靶基因进行后续的机制研究。

在验证试验中，2 个之前未在文献中报道过的 lncRNA（NONRATT021116.2 和 NONRATT004088.2）在 DIN 中表现出较高的表达水平，具有潜在的诊断价值。NONRATT021116.2 的上调可能起到了 let-7b-5p“海绵”的作用。生物信息学分析表明，*Cd34* 是 let-7b-5p 的靶标。研究表明，let-7b-5p 可诱导 LPS 诱导的 HK-2 细胞凋亡、炎症和生长 [20]。右泛醇能显著上调 CD34 和淋巴细胞瘤 -2 基因（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）蛋白，通过逆转顺铂诱导的肾损伤，从而减轻干细胞的损伤 [21]。miR-22-3p 可介导凋亡诱导因子线粒体相关 1 的下调，保护 HK-2 细胞免受 LPS 诱导的细胞凋亡的影响 [22]。这些研究表明，肾损伤与上述 RNA 之间存在密切联系。本课题组今后将根据验证试验和生物信息学分析的结果，对 NONRATT021116.2 和 NONRATT004088.2 进行下游通路调查和机制研究。

本研究也有一些局限性。首先，本研究没有区分 lncRNA 参与了肾小管损伤还是肾小球损伤。其次，候选 DE lncRNA 的靶 miRNA 和靶 mRNA 还需要进一步的生物学功能研究，在 GEN 诱导的肾损伤的发病机制中，失调的 RNA 还需要进一步的验证。

综上所述，本研究筛选出了 GEN 诱导的肾损伤组和正常组之间关键的 DE lncRNA 和 DE mRNA。此外，本研究还通过生物信息学分析阐明了 DE

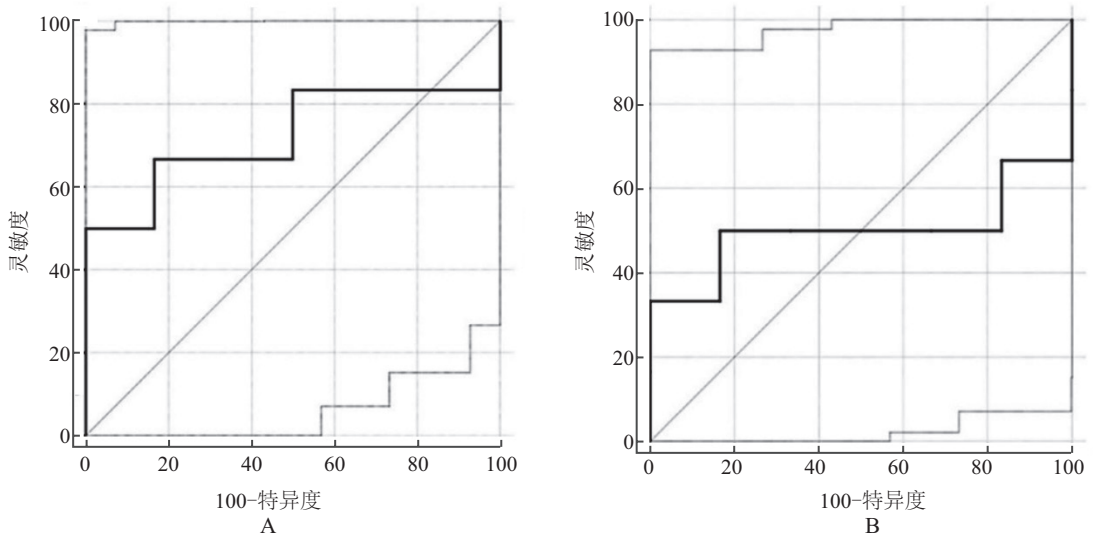
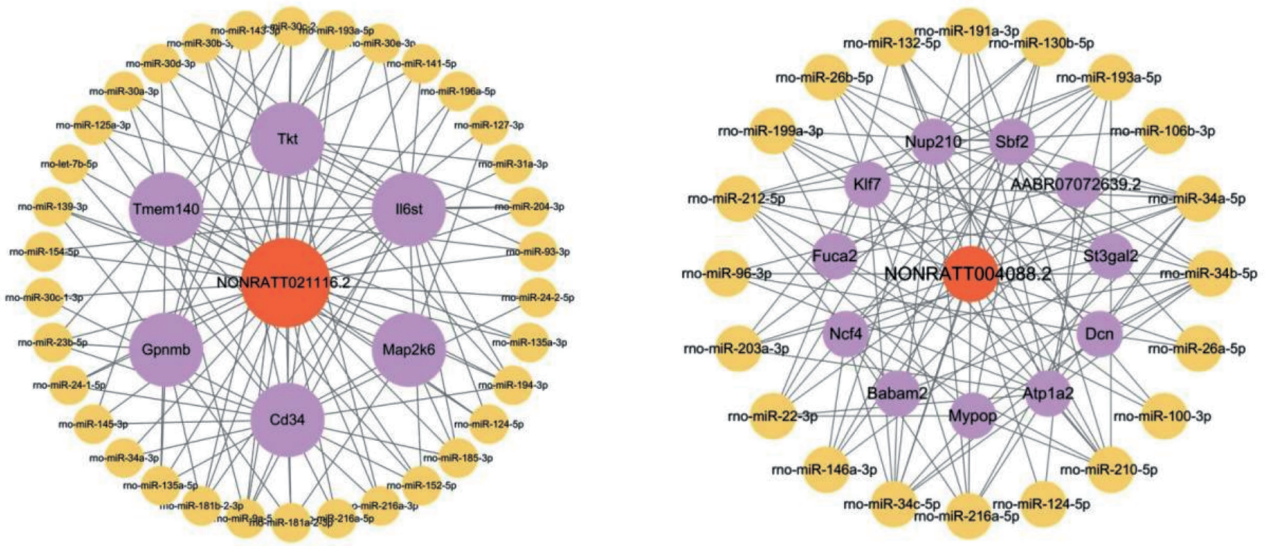


图 10 评估 NONRATT021116.2（A）**和 NONRATT004088.2**（B）**对 GEN 诱导的肾损伤的诊断价值的 ROC 曲线**

Fig.10 ROC Curves Assessing Prediction Performances of NONRATT021116.2（A）and NONRATT004088.2（B）for GEN-induced Kidney Injury



注：最内侧的橙色表示 lncRNA，中间的紫色表示 mRNA，最外侧的黄色圆圈表示 miRNA，线段表示关联。

图 11 NONRATT021116.2/miRNA/mRNA（A）**和 NONRATT004088.2 /miRNA/mRNA ceRNA**（B）**网络在 GEN 诱导的大鼠肾毒性损伤中的作用**

Fig.11 NONRATT021116.2/miRNA/mRNA（A）and NONRATT004088.2 /miRNA/mRNA ceRNA（B）Networks in GEN-induced Nephrotoxicity Injury in Rats

mRNA 的潜在功能，并建立了调控网络，展示了与 GEN 诱导的肾损伤病理机制相关的基因和通路。然而，本研究还需要进一步研究这些基因在 GEN 诱导的肾损伤中的作用机制。

参考文献：

[1] URIBE-RESTREPO P, MUNOZ-ZANZI C, AGUDELO-FLÓREZ P. Kidney injury biomarkers in leptospirosis [J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2023, **56**: e0260-2022.

[2] YUE L L, GU Y L, XU J T, *et al*. Roles of noncoding RNAs in septic acute kidney injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, **165**: 115269.

[3] HUANG J, XU C. LncRNA MALAT1-deficiency restrains lipopolysaccharide (LPS)-induced pyroptotic cell death and inflammation in HK-2 cells by releasing microRNA-135b-5p [J]. *Ren Fail*, 2021, **43**(1): 1288-1297.

[4] GAO M, DONG Z, SUN J, *et al*. Liver-derived exosome-laden lncRNA MT1DP aggravates cadmium-induced nephrotoxicity [J]. *Environ Pollut*, 2020, **258**: 113717.

[5] WANG Y, TAN J, XU C, *et al*. Identification and construction of lncRNA-associated ceRNA network in diabetic kidney disease [J]. *Medicine* (Baltimore), 2021, **100**(22): e26062.

[6] CHEN G Z, LIU B W, CHEN S Q, *et al*. Novel biomarkers for post-contrast acute kidney injury identified from long non-coding RNA expression profiles [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, **17**(3): 882-896.

[7] LOPEZ-NOVOA J M, QUIROS Y, VICENTE L, *et al*. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view [J]. *Kidney Int*, 2011, **79**(1): 33-45.

[8] ZHAO Z H, YAN Q Q, FANG L, *et al*. Identification of urinary extracellular vesicles differentially expressed RNAs in diabetic nephropathy via whole-transcriptome integrated analysis [J]. *Comput Biol Med*, 2023, **166**: 107480.

[9] DING Y, WAN S F, LIU W N, *et al*. Regulation networks of non-coding RNA-associated ceRNAs in cisplatin-induced acute kidney injury [J]. *Cells*, 2022, **11**(19): 2971.

[10] PENG X, WANG W J, WANG W H, *et al*. Alpha-NETA, as a CMKLR1 small molecule antagonist, protects against renal ischemia reperfusion injury in mice [J]. *Protein Pept Lett*, 2022, **29**(11): 962-970.

[11] WANG S Y, XU Y, HONG Q, *et al*. Mesenchymal stem cells ameliorate cisplatin-induced acute kidney injury via let-7b-5p [J]. *Cell Tissue Res*, 2023, **392**(2): 517-533.

[12] LI A L, PENG R, SUN Y, *et al*. LincRNA 1700020I14Rik alleviates cell proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy via miR-34a-5p/Sirt1/HIF-1α signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2018, **9**(5): 461.

[13] Li H Q, Sun H, Xu Y R, *et al*. Curcumin plays a protective role against septic acute kidney injury by regulating the TLR9 signaling pathway [J]. *Transl Androl Urol*, 2021, **10**(5): 2103-2112.

[14] SUN J, GE X L, WANG Y, *et al*. USF2 knockdown downregulates THBS1 to inhibit the TGF-β signaling pathway and reduce pyroptosis in sepsis-induced acute kidney injury [J]. *Pharmacol Res*, 2022, **176**: 105962.

[15] ZHAO Y, FENG X J, LI B, *et al*. Dexmedetomidine protects against lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by enhancing autophagy through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, **11**: 128.

[16] ZHANG J, NING J, FU W W, *et al*. CMTM3 protects the gastric epithelial cells from apoptosis and promotes IL-8 by stabilizing NEMO during Helicobacter pylori infection [J]. *Gut Pathog*, 2023, **15**(1): 6.

[17] XU W H, ZHANG H W, ZHANG Q F, *et al*. β-Amyrin ameliorates diabetic nephropathy in mice and regulates the miR-181b-5p/HMGB2 axis in high glucose-stimulated HK-2 cells [J]. *Environ Toxicol*, 2022, **37**(3): 637-649.

[18] YUAN X, TANG W B, PENG L, *et al*. Elevation of lncRNA ENST00000453774. 1 prevents renal fibrosis by upregulating FBN1, IGF1R, and KLF7 [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2021, **46**(5): 563-573.

[19] ZHANG Y, HU R M, WU H J, *et al*. OTUB1 overexpression in mesangial cells is a novel regulator in the pathogenesis of glomerulonephritis through the decrease of DCN level [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(1): e29654.

[20] GAO C, ZOU X Q, CHEN H, *et al*. Long non-coding RNA nuclear paraspeckle assembly transcript 1 (NEAT1) relieves sepsis-induced kidney injury and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in HK-2 cells [J]. *Med Sci Monit*, 2020, **26**: e921906.

[21] EL-DAWY K, BARAKAT N, ALI H, *et al*. Dexpanthenol improved stem cells against cisplatin-induced kidney injury by inhibition of TNF-α, TGFβ-1, β-catenin, and fibronectin pathways [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2023, **30**(9): 103773.

[22] ZHANG P, YI L, QU S Y, *et al*. The biomarker TCONS_00016233 drives septic AKI by targeting the miR-22-3p/AIFM1 signaling axis [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, **19**: 1027-1042.