

草酸钠结晶肾损伤肾小管上皮细胞中骨桥蛋白相关长链非编码 RNA 的差异表达

张杰¹, 谌卫¹, 袁继行², 王欢¹, 马金召², 王田田², 郭志勇^{1*}

1. 第二军医大学长海医院肾内科, 上海 200433
2. 第二军医大学基础部医学遗传学研究所, 上海 200433

[摘要] **目的** 检测草酸钠诱导的人肾小管上皮细胞结晶肾损伤模型中与骨桥蛋白(OPN)相关的长链非编码RNA(lncRNA)的差异表达,并探讨OPN相关lncRNA在结晶肾损伤发病中的作用。**方法** 利用草酸钠(20 mmol/L)刺激人肾近曲小管上皮细胞 HK-2 建立草酸钠诱导的结晶肾损伤肾小管上皮细胞模型。运用 RNA 干扰技术对其转染 OPN 小干扰 RNA 构建 OPN 敲低细胞模型(OPN-siRNA 组),对照组细胞转染阴性随机对照序列(NC-siRNA 组)。采用 Arraystar 公司提供的人类全基因组 lncRNA 芯片(V4.0)检测两组结晶肾损伤肾小管上皮细胞模型中与 OPN 相关的 lncRNA 和 mRNA 的差异表达水平,并采用生物信息学方法分析 lncRNA 芯片结果。**结果** 全基因组 lncRNA 芯片结果显示草酸钠诱导的结晶肾损伤肾小管上皮细胞模型中与 OPN 相关的差异表达 lncRNA 共 583 个,其中 OPN-siRNA 组表达上调 354 个、下调 229 个;差异表达 mRNA 共 235 个,上调 139 个,下调 96 个。生物信息学分析结果显示差异表达 lncRNA 参与结晶肾损伤中细胞生长、酶活性调节等多种生物学过程。**结论** 草酸钠体外诱导的结晶肾损伤肾小管上皮细胞模型中存在 OPN 相关的差异表达的 lncRNA。

[关键词] 肾结石;结晶肾损伤;肾小管上皮细胞;草酸钠;骨桥蛋白;长链非编码 RNA

[中图分类号] R 692.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)05-0616-06

Differential expression of osteopontin-related long non-coding RNAs in sodium oxalate crystallization-induced renal tubular epithelial cell injury

ZHANG Jie¹, CHEN Wei¹, YUAN Ji-hang², WANG Huan¹, MA Jin-zhao², WANG Tian-tian², GUO Zhi-yong^{1*}
1. Department of Nephrology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Institute of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To detect the differential expression of osteopontin (OPN)-related long non-coding RNAs (lncRNAs) in sodium oxalate crystallization-induced renal tubular epithelial cell injury and to explore the role of OPN-related lncRNAs in the pathogenesis of renal injury by crystallization. **Methods** The renal tubular epithelial cells (HK-2 cells) were cultured and stimulated with 20 mmol/L sodium oxalate to establish the renal injury cells model. The OPN knockdown in HK-2 cell injury was carried out by transfecting OPN small interfere RNA (siRNA) into the cells, which was set up as the OPN-siRNA group; the cells in control group (NC-siRNA group) were transfected with negative random control sequences. The lncRNAs and mRNAs differential expressions were screened and identified by Arraystar Human lncRNA V4.0 Microarray in two groups, and the microarray results were analyzed by bioinformatics methods. **Results** Human genome lncRNA microarray results showed there were a total of 583 differentially expressed OPN-related lncRNAs in renal injury cell model of renal tubular epithelial cell induced by sodium oxalate crystallization, including 354 up-regulated lncRNAs and 229 down-regulated lncRNAs in OPN-siRNA group; there were a total of 235 mRNAs with differential expression, including 139 up-regulated mRNAs and 96 down-regulated mRNAs. Bioinformatics

[收稿日期] 2017-03-29 **[接受日期]** 2017-04-10
[基金项目] 国家自然科学基金(81270773,81573759),上海市科委中药支撑计划(13401900105),上海市教委科研创新重点项目(14ZZ080). Supported by National Natural Science Foundation of China (81270773, 81573759), Supporting Project of Traditional Chinese Medicine of Shanghai Science and Technology Commission (13401900105) and Key Program of Technology and Innovation of Shanghai Municipal Education Commission (14ZZ080).
[作者简介] 张杰,硕士生. E-mail: zhangjie9003@163.com
* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31161418, E-mail: zhiyong_guo@126.com

analysis results showed the differentially expressed lncRNAs were correlated with cell growth, enzyme activity regulation and other biological processes. **Conclusion** OPN-related differentially expressed lncRNAs are involved in the mechanism of the sodium oxalate crystallization-induced HK-2 cell injury.

[**Key words**] kidney calculi; kidney injury by crystallization; renal tubular epithelial cells; sodium oxalate; osteopontin; long non-coding RNAs

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(5): 616-621]

尿石症(urolithiasis)的发病率呈逐年上升趋势,正逐渐成为全球性的公共卫生问题^[1]。结晶是肾结石的早期表现形式,其在肾脏沉积引起肾结石是尿石症的主要发病机制。尽管目前对于肾结晶形成的具体发病机制尚未完全阐明,但已有相当多的证据表明结晶在肾脏的沉积与氧化应激、炎症反应等密切相关^[2-3]。其中,肾小管上皮受到结晶刺激后分泌骨桥蛋白(osteopontin, OPN),再协同其他炎症介质一起募集巨噬细胞至病变部位,这是贯穿结晶肾损伤的核心环节^[3]。

近年来长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)调控多种疾病的发病正逐渐成为各领域的研究热点,目前最新 lncRNA 的鉴定及功能研究主要集中在肿瘤转移、神经退行性疾病以及自身免疫性疾病等方面^[4-6],而在肾脏病领域,相关研究目前尚处于起步阶段,仅有少数 lncRNA 差异表达在肾脏疾病中有相关性研究报道^[7-8]。本研究通过构建草酸钠诱导的肾小管上皮细胞结晶肾损伤细胞模型,初步探讨 OPN 相关 lncRNA 在结晶肾损伤中的调控作用,进一步拓展对肾结晶发生、发展的认识。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 人肾近曲小管上皮细胞 HK-2(货号 SCSP-511)购自中国科学院上海细胞培养中心。细胞贴壁生长于含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素的 DMEM F/12 培养液,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。第 7~9 代细胞用于实验。

1.2 小干扰 RNA(siRNA)转染与草酸钠结晶肾损伤细胞模型构建 将细胞随机分为 2 组:对照组(NC-siRNA 组)和干扰组(OPN-siRNA 组),NC-siRNA 组细胞转染阴性随机对照序列,OPN-siRNA 组细胞转染 OPN siRNA,两组细胞转染后均给予草酸钠(20 mmol/L^[9];上海将来实业有限公司)处理细胞 12 h 构建草酸钠结晶肾损伤细胞模型。每组实验重复 3 次。本研究采用的 siRNA 由美国 Invitrogen 公司合成,转染试剂为美国 Invitrogen 公

司研发的 Lipofectamine™ 3000 细胞脂质体转染试剂盒,将该脂质体、siRNA、OPTI-MEM 培养液(美国 Gibco 公司)充分混匀,混合物室温静置 5 min 后加入含细胞的培养皿中,转染 48 h 后收取细胞。

1.3 lncRNA 芯片检测 按照 TRIzol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)操作说明提取细胞总 RNA;用超微量紫外分光光度计(NanoDrop 2000)检测波长 260 nm 和 280 nm 处的光密度(D)值并定量;用 RNA 甲醛变性凝胶电泳分析 RNA 质量。采用美国 Arraystar 公司提供的人类 lncRNA 芯片(V4.0)、根据美国 Agilent Technologies 公司的彩色微阵列的基因表达分析(One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis)实验方案检测 40 173 个 lncRNA 和 20 730 个 mRNA 的表达。

1.4 差异 lncRNA 与 mRNA 的生物信息学分析 对 lncRNA 芯片数据进行标准化处理和组间比较后筛选差异表达的 lncRNA 和 mRNA,筛选标准:差异倍数(fold change)>1.5 且 P<0.05。采用 limma 算法对两组差异表达的 lncRNA 与 mRNA 进行分析和计算。使用 GeneCodis 软件编写脚本程序,对 lncRNA 芯片数据进行关联分析和层次聚类分析;运用基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)对两组差异表达的 lncRNA 与 mRNA 进行功能和生物学行为分析。

1.5 qPCR 验证细胞转染和差异表达 用 qPCR 验证 OPN-siRNA 转染后细胞 OPN mRNA 的表达以及对 lncRNA 芯片筛选出的差异倍数最高的 3 个 lncRNA(ENST00000448948、ENST00000415627 和 NR_046764)进行验证。提取细胞总 RNA 并定量后,用第 1 链 cDNA 合成试剂盒(货号 C28025-011,美国 Invitrogen 公司)按操作说明合成 cDNA。采用日本 TaKaRa 公司的 SYBR 预混酶,以 cDNA 为模板、β-actin 作为内参照基因,运用美国 Applied Biosystems 公司的实时定量 PCR 检测系统(StepOne™ Real-Time PCR System)进行 qPCR 反

应。用 Primer Premier 6.0 设计引物,引物序列见表 1。反应体系为 20 μ L,含 10 μ L SYBR Green、1 μ L 引物、1 μ L cDNA。循环条件:95 $^{\circ}$ C 10 min;

95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,40 个循环。实验重复 3 次,并根据实际情况设置复孔,并设置相应的无模板对照组。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequences

Gene	Sense	Anti-sense
<i>βactin</i>	5'-TGT GTT GGC GTA CAG GTC TTT G-3'	5'-GGG AAA TCG TGC GTG ACA TTA AG-3'
<i>Osteopontin</i>	5'-CGG TGA AAG TGG CTG AGT TT-3'	5'-GGC TAC AGC ATC TGA GTG TTT G-3'
ENST00000415627	5'-ACC TGT GCT TTA TTG GTT ATT-3'	5'-GTG GGC TTT GCT GTT TCT-3'
ENST00000448948	5'-ACA GTT CTC CCC ACT CTT C-3'	5'-CAC CAC TTG CCC TTC TTG-3'
NR_046764	5'-GTT CTC TTC CCC ACT CTC G-3'	5'-CCT TCC TTG GCT TTC ACA-3'

1.6 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,非正态分布资料采用非参数方法(Kruskal-Wallis)秩和检验,两组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 OPN-siRNA 细胞构建的验证 通过 qPCR 检测 OPN-siRNA 组和 NC-siRNA 组细胞中 OPN mRNA 的表达,结果(图 1)显示 OPN-siRNA 组 OPN mRNA 表达降低($P<0.01$),表明 OPN 干扰效果较好,OPN-siRNA 细胞成功构建。

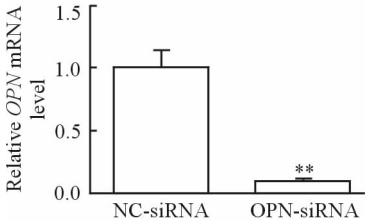


图 1 qPCR 验证 OPN-siRNA 细胞构建成功

Fig 1 Expression of OPN mRNA by qPCR

NC-siRNA group: The cells were transfected with negative random control sequence; OPN-siRNA group: The cells were transfected with OPN siRNA. OPN: Osteopontin. ** $P<0.01$ vs NC-siRNA group. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.2 OPN 相关 lncRNA 与 mRNA 的差异表达 运用 Arraystar 人类 lncRNA 芯片(V4.0)检测 40 173 个 lncRNA 和 20 730 个 mRNA,筛选得到差异表达的 lncRNA 和 mRNA。采用聚类分析热图(图 2A)发现差异表达 lncRNA 共 583 个,其中 OPN-siRNA 组表达上调 354 个、下调 229 个;差异表达 mRNA 共 235 个,其中 OPN-siRNA 组表达上

调 139 个、下调 96 个。火山图(图 2B)红色区域表示差异表达 lncRNA。对差异表达 lncRNA 进行数据筛选,筛选出 OPN-siRNA 组与 NC-siRNA 组相比差异表达上调和下调差异倍数分别位于前 5 位的 lncRNA(表 2)。

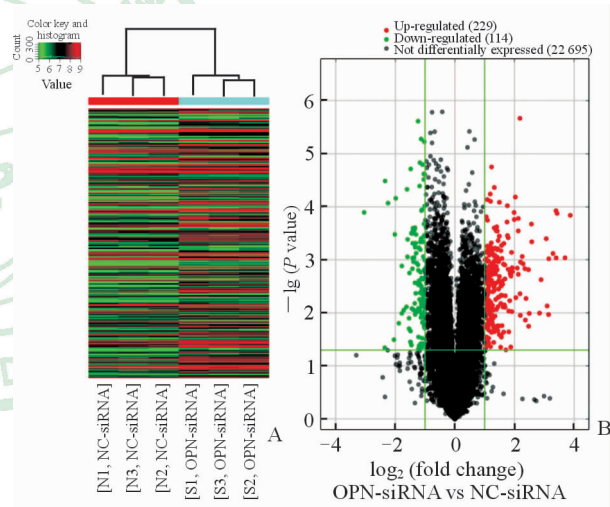


图 2 LncRNA 聚类分析热图(A)和火山图(B)

Fig 2 LncRNA clustering analysis plot (A) and volcano plot (B)

Red color indicates up-regulated expression and green color indicates down-regulated expression in Fig 2A. NC-siRNA group: The cells were transfected with negative random control sequence; OPN-siRNA group: The cells were transfected with OPN siRNA. LncRNA: Long non-coding RNA; OPN: Osteopontin

2.3 备选 lncRNA 表达的验证 通过 qPCR 验证筛选出的差异倍数最高的 3 个 lncRNA: ENST00000448948(fold change = 8.896 445 3)、ENST00000415627(fold change = 5.540 096 5)、NR_046764(fold change = 10.539 770 9)进行验证,其在 OPN-siRNA 组表达均高于 NC-siRNA 组($P<0.05$,图 3)。

表 2 10 个差异表达倍数最高的 lncRNA

Tab 2 Ten lncRNAs with the greatest expression difference

Sequence name	Gene symbol	Source	RNA length (nt)	Chr	Fold change	P value	Regulation
ENST00000448948	RP1-122K4. 2	GENCODE	696	ChrX	8. 896 445 3	0. 05	Up
ENST00000415627	AC012360. 6	GENCODE	781	Chr2	5. 540 096 5	0. 05	Up
ENST00000413645	AP000473. 5	GENCODE	550	Chr21	10. 511 093 5	0. 05	Up
NR_046764	AOAH-IT1	RefSeq	573	Chr7	10. 539 770 9	0. 05	Up
TCONS_00003851	XLOC_001659	RNA-seq	523	Chr2	14. 649 370 8	0. 05	Up
GSE61474_TCONS_00324028	GSE61474_XLOC_062416	RNA-seq	17 159	Chr8	8. 249 787	0. 05	Down
T206895	G047911	RNA-seq	4 651	Chr2	5. 101 833 1	0. 05	Down
NR_110271	LOC101927701	RefSeq	740	Chr2	5. 065 95	0. 05	Down
ENST00000609367	RP11-290M5. 4	GENCODE	243	Chr1	4. 727 316 1	0. 05	Down
T083366	G019348	RNA-seq	462	Chr12	4. 121 582 7	0. 05	Down

LncRNA: Long non-coding RNA; Chr: Chromosome

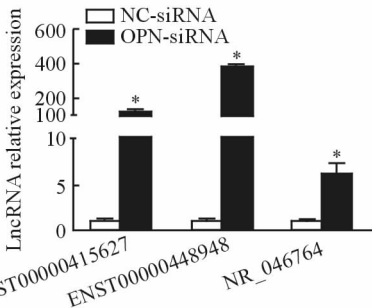


图 3 qPCR 验证差异表达 lncRNA

Fig 3 Differentially expressed lncRNAs by qPCR

NC-siRNA group: The cells were transfected with negative random control sequence; OPN-siRNA group: The cells were transfected with OPN siRNA. LncRNA: Long non-coding RNA; OPN: Osteopontin. * $P<0.05$ vs NC-siRNA group. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.4 差异表达 lncRNA 生物信息学分析 通过对差异 lncRNA 与其邻近相关 mRNA 进行联合分析可知,差异表达的 lncRNA 主要参与细胞内信号转导、细胞增殖、细胞凋亡、炎症反应等生物学过程。图 4 所示为差异表达 lncRNA 的 GO 分析结果。其中上调转录本靶向作用最显著的 GO 是细胞外基质形成 (GO: 0030198; 图 4A)、细胞外结构域 (GO: 0005509; 图 4B)、细胞外受体结合位点 (GO: 0005576; 图 4C),而下调转录本靶向作用最显著的 GO 是细胞进程 (GO: 0009987; 图 4D)、细胞器膜结合位点 (GO: 0005667; 图 4E)、酶活性调节 (GO: 0030234; 图 4F)。

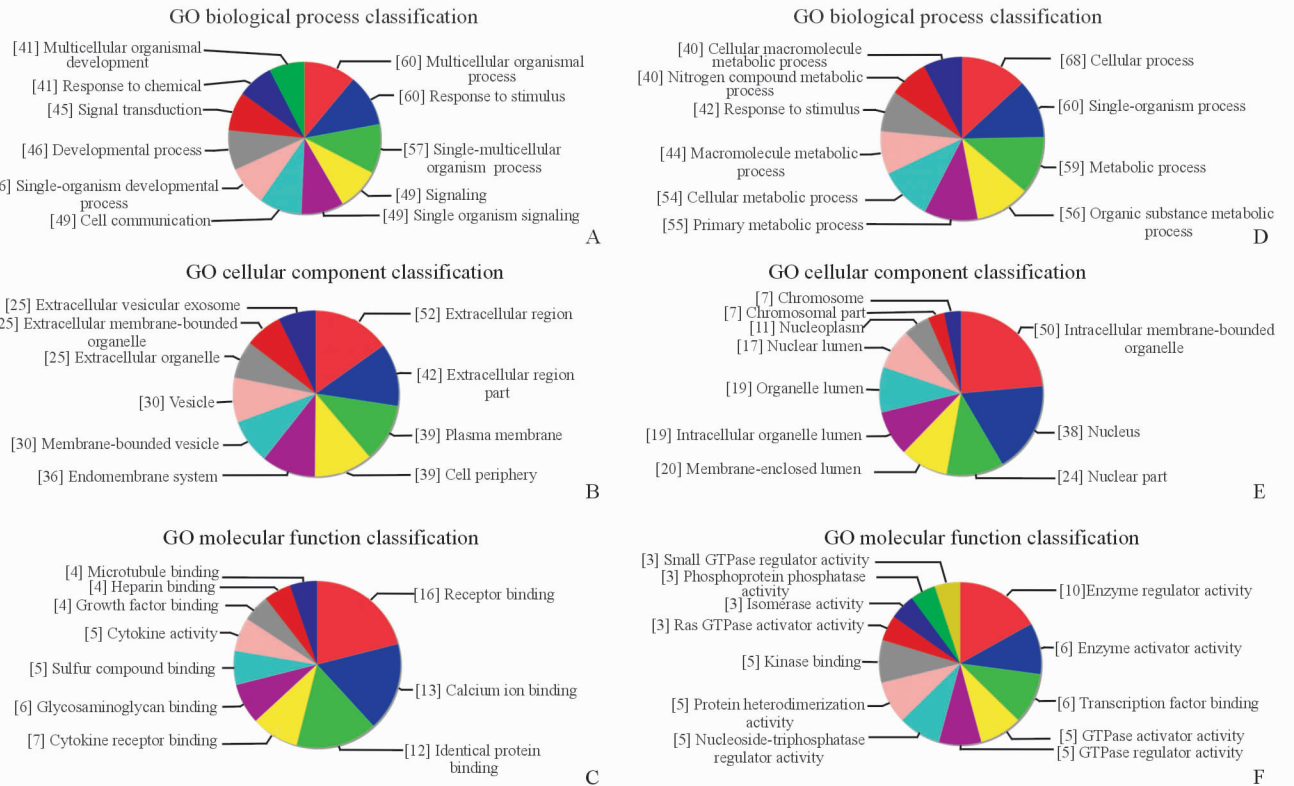


图 4 GO 分析差异表达的 lncRNA

Fig 4 Gene ontology (GO) analysis of differentially expressed lncRNAs

The top several GOs were showed in the most significant enrichment (fold change>2, $P<0.05$). A-C: The up-regulated GO targets; D-F: The down-regulated GO targets. LncRNA: Long non-coding RNA

3 讨 论

肾结石是临床常见病、多发病,多见于 20~60 岁人群,且复发率较高^[10]。尽管目前治疗肾结石方法较多,但其高复发率使得肾结石仍严重影响患者的生活质量,因此,扩展肾结石的研究方向,探寻有效治疗和预防肾结石复发的靶点十分重要。目前研究发现代谢异常与尿石症存在共生和伴随关系^[11],但其具体机制仍不清楚。探讨肾结石的早期病变——肾结晶,及其诱导的肾损伤以及修复机制是近年来该领域的研究热点。

LncRNA 作为真核生物基因组组成部分之一,在多种疾病的发病机制中具有重要作用。尽管大部分 lncRNA 的功能仍然未知,但作为一种重要的调控真核细胞转录的分子已被广泛报道,可以在表观遗传、转录调控以及转录后调控等多个层面影响基因的表达^[12]。研究发现 lncRNA 在多种疾病中对编码蛋白基因具有调控作用^[13]。Yang 等^[14]研究发现 lncRNA-LET 表达下调参与了低氧诱导的肝癌侵袭转移过程。Lorenzen 等^[15]研究发现循环血中 lncRNA-TapSAKI 的表达量可能是预测急性肾损伤(AKI)患者死亡的指标之一,而肾结石相关 lncRNA 的研究更是少之又少。

OPN 是肾小管上皮细胞分泌的大分子物质,且是肾结石有机基质的组成部分^[16],在肾结石形成过程中具有关键作用。既往研究表明 OPN 可通过精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列(RGD)以及钙结合位点结合钙离子,从而促进含钙结石形成^[17];体外培养犬肾细胞(MDCK 细胞)中观察到 OPN 可以促进草酸钙结石黏附^[18]。此外,OPN 作为一种细胞外基质蛋白能通过抑制转录因子 IRF1 激活 lncRNA HOTAIR 的表达,使肿瘤细胞的侵袭性增加、恶性化程度增高^[19]。鉴于 OPN 在肾脏疾病中的重要作用以及前期研究揭示的结晶肾损伤小鼠模型中 lncRNA 差异表达^[20],我们推测 lncRNA 可能参与调控 OPN 在结晶肾损伤中的作用。

本研究首次利用生物芯片技术及生物信息学方法对结晶肾损伤中 OPN 相关 lncRNA 以及 mRNA 进行了联合分析,确定 OPN-siRNA 组有 583 个 lncRNA 差异表达。进一步运用生物信息学方法对潜在的靶基因进行 GO 和 KEGG 分析:GO 分析结

果表明差异表达 lncRNA 与细胞分化、细胞外基质形成、酶活性调节等相关联;KEGG 分析结果发现差异表达 lncRNA 对应多条细胞内信号通路。其中 NOD 样受体信号通路、AGE-RAGE 信号通路、炎症性肠病相关信号通路、细胞周期调控、脂肪酸的生物合成以及 TGF- β 受体信号通路得到显著富集。

LncRNA 常通过微小 RNA(miRNA)介导的内源性竞争性 RNA 以及 miRNA“海绵吸附”作用机制来调控各种生物学进程^[21]。1 个 lncRNA 分子可以吸附多个 miRNA,而 1 个 miRNA 分子可调节多个靶基因^[21-22]。有研究表明 miR-21 可以通过调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对 TGF- β 1 基因进行调控^[23],lncRNA H19 可以在胎盘发育的后期表达增加,并通过与 miR-675 相互作用抑制胎盘发育过度的作用^[24]。因此,基于本研究 lncRNA 的生物信息学分析结果,我们后续研究将进一步探讨 lncRNA 调控 OPN 相关基因表达的不同机制,并猜测 lncRNA 也可能会通过 miRNA 分子参与 OPN 的调控作用,或与 PI3K/AKT/mTOR 信号以及 TGF- β 相关通路相互关联,从而参与结晶肾损伤的发生。

综上所述,本研究初步通过生物信息学方法,从 GO 和 KEGG 分析层面对 OPN 相关 lncRNA 可能参与的结晶肾损伤的发生机制进行初步探讨。随着对分子生物学以及表观遗传学研究的深入,本研究从基因分析角度探讨结晶肾损伤的发病机制,有助于阐明 lncRNA 在调控结晶肾损伤方面的功能和在分子机制中的作用,以为该类疾病的防治提供线索和潜在干预靶点。

[参 考 文 献]

- [1] CUNNINGHAM P, NOBLE H, AI-MODHEFER A K, WALSH I. Kidney stones: pathophysiology, diagnosis and management[J]. Br J Nurs, 2016, 25: 1112-1116.
- [2] HUANG H S, MA M C, CHEN J. Low-vitamin E diet exacerbates calcium oxalate crystal formation via enhanced oxidative stress in rat hyperoxaluric kidney [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296: F34-F45.
- [3] OKADA A, YASUI T, FUJII Y, NIIMI K, HAMAMOTO S, HIROSE M, et al. Renal macrophage migration and crystal phagocytosis via

- inflammatory-related gene expression during kidney stone formation and elimination in mice; detection by association analysis of stone-related gene expression and microstructural observation[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25: 2425-2435.
- [4] NAGANO T, FRASER P. No-nonsense functions for long noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2011, 145: 178-181.
- [5] CESANA M, CACCHIARELLI D, LEGNINI I, SANTINI T, STHANDIER O, CHINAPPI M, et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA[J]. *Cell*, 2011, 147: 358-369.
- [6] GEISLER S, LOJEK L, KHALIL A M, BAKER K E, COLLIER J. Decapping of long noncoding RNAs regulates inducible genes[J]. *Mol Cell*, 2012, 45: 279-291.
- [7] ZHOU Q, CHUNG A C, HUANG X R, DONG Y, YU X, LAN H Y. Identification of novel long noncoding RNAs associated with TGF- β /Smad3-mediated renal inflammation and fibrosis by RNA sequencing[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184: 409-417.
- [8] SUI W, LI H, OU M, TANG D, DAI Y. Altered long non-coding RNA expression profile in patients with IgA-negative mesangial proliferative glomerulonephritis[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30: 173-178.
- [9] MARONI P D, KOUL S, MEACHAM R B, CHANDHOKE P S, KOUL H K. Effects of oxalate on IMCD cells; a line of mouse inner medullary collecting duct cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1030: 144-149.
- [10] MELLO M F, MARCHINI G S, CÂMARA C, DANILOVIC A, LEVY R, ELUF-NETO J, et al. A large 15-year database analysis on the influence of age, gender, race, obesity and income on hospitalization rates due to stone disease[J]. *Int Braz J Urol*, 2016, 42: 1150-1159.
- [11] KHAN S R. Is oxidative stress, a link between nephrolithiasis and obesity, hypertension, diabetes, chronic kidney disease, metabolic syndrome? [J]. *Urol Res*, 2012, 40: 95-112.
- [12] YI H, PENG R, ZHANG L Y, SUN Y, PENG H M, LIU H D, et al. LincRNA-Gm4419 knockdown ameliorates NF- κ B/NLRP3 inflammasome-mediated inflammation in diabetic nephropathy [J/OL]. *Cell Death Dis*, 2017, 8: e2583. doi: 10.1038/cddis.2016.451.
- [13] WAPINSKI O, CHANG H Y. Long noncoding RNAs and human disease[J]. *Trends Cell Biol*, 2011, 21: 354-361.
- [14] YANG F, HUO X S, YUAN S X, ZHANG L, ZHOU W P, WANG F, et al. Repression of the long noncoding RNA-LET by histone deacetylase 3 contributes to hypoxia-mediated metastasis [J]. *Mol Cell*, 2013, 49: 1083-1096.
- [15] LORENZEN J M, SCHAUERTE C, KIELSTEIN J T, HUBNER A, MARTINO F, FIEDLER J, et al. Circulating long noncoding RNA TapSAKI is a predictor of mortality in critically ill patients with acute kidney injury[J]. *Clin Chem*, 2015, 61: 191-201.
- [16] MILLER N L, EVAN A P, LINGEMAN J E. Pathogenesis of renal calculi[J]. *Urol Clin North Am*, 2007, 34: 295-313.
- [17] HAMAMOTO S, NOMURA S, YASUI T, OKADA A, HIROSE M, SHIMIZU H, et al. Effects of impaired functional domains of osteopontin on renal crystal formation; analyses of OPN transgenic and OPN knockout mice[J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25: 2712-2723.
- [18] YAMATE T, KOHRI K, UMEKAWA T, AMASAKI N, ISIKAWA Y, IGUCHI M, et al. The effect of osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals to Madin-Darby canine kidney cells[J]. *Eur Urol*, 1996, 30: 388-393.
- [19] YANG G, ZHANG S, GAO F, LIU Z, LU M J, PENG S, et al. Osteopontin enhances the expression of HOTAIR in cancer cells via IRF1[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1839: 837-848.
- [20] 张彩虹, 湛卫, 袁继行, 张杰, 马文杰, 刘敏, 等. 应用微阵列芯片分析草酸钙结晶肾损伤中 LncRNA 表达谱的差异[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2016, 17: 14-17.
- [21] TAY Y, RINN J, PANDOLFI P P. The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition[J]. *Nature*, 2014, 505: 344-352.
- [22] MUKHERJI S, EBERT M S, ZHENG G X, TSANG J S, SHARP P A, VAN OUDENAARDEN A. MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression[J]. *Nat Genet*, 2011, 43: 854-859.
- [23] BAI L, LIANG R, YANG Y, HOU X, WANG Z, ZHU S, et al. MicroRNA-21 regulates PI3K/AKT/mTOR signaling by targeting TGF β I during skeletal muscle development in pigs[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10: e0119396. doi: 10.1371/journal.pone.0119396.
- [24] KENIRY A, OXLEY D, MONNIER P, KYBA M, DANDOLO L, SMITS G, et al. The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and *Igf1r*[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 659-665.