

· 基础研究 ·

## STAT3通过血小板反应蛋白4诱导足细胞凋亡及炎症反应

庄一波\*, 杨 勇, 宁晶晶

常州市第一人民医院儿科, 江苏 常州 213004

**[摘要]** 目的:探讨血小板反应蛋白4(thrombospondin-4, TSP-4)对高糖(high glucose, HG)刺激足细胞增殖、凋亡、氧化应激及炎症反应的潜在影响,揭示TSP-4在糖尿病肾脏病(diabetic kidney disease, DKD)发生发展中的作用。方法:①通过实时荧光定量聚合酶链反应和蛋白质印迹法检测HG诱导的足细胞中TSP-4和信号转导因子和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription3, STAT3)的表达水平;②在HG诱导的足细胞中干扰TSP-4后,通过细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)和5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)测定增殖能力;通过流式细胞术测定足细胞的凋亡和细胞周期分布;使用试剂盒检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)的相对含量。此外,通过酶联免疫吸附法检测炎症因子白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 和IL-6的表达水平;③应用染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)验证转录因子STAT3与TSP-4的启动子区域的关系,并通过双荧光素酶报告基因检测进一步验证。结果:①TSP-4和p-STAT3在HG诱导的足细胞中呈时间依赖性上调( $P < 0.05$ );②干扰TSP-4可以逆转HG诱导的足细胞凋亡、氧化应激、炎症反应和受抑制的增殖( $P < 0.05$ );③STAT3可以结合TSP-4的启动子区域,从而诱导转录,对TSP-4启动子活性具有正向调控作用。结论:干扰TSP-4可减轻HG诱导的足细胞凋亡、氧化应激和炎症反应,对足细胞具有保护作用;转录因子STAT3对TSP-4基因启动子活性具有正向调控作用。

**[关键词]** 足细胞;糖尿病肾脏病;血小板反应蛋白-4;细胞凋亡;炎症反应

**[中图分类号]** R587.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2022)08-1087-07

**doi:**10.7655/NYDXBNS20220806

## STAT3 - activated thrombospondin - 4 induces apoptosis and inflammatory response in podocytes

ZHUANG Yibo\*, YANG Yong, NING Jingjing

Department of Pediatrics, the First People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213004, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the potential influence of thrombospondin-4 (TSP-4) on the proliferation, apoptosis, oxidative stress and inflammatory response in podocytes stimulated by high glucose (HG), thus revealing the function of TSP-4 in the development of diabetic kidney disease (DKD). **Methods:** ① Relative levels of TSP-4 and signal transducer and activator of transcription3 (STAT3) in HG-induced podocytes were examined by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot. ② After intervention of TSP-4 in HG-induced podocytes, proliferative ability was examined by cell counting kit-8 (CCK-8) and 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assay. The apoptosis and cell cycle distribution of podocytes were determined by flow cytometry. Relative contents of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were detected by commercial kits. In addition, the expression levels of inflammatory factors interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and IL-6 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. ③ The interaction between the transcription factor STAT3 and the promoter region of TSP-4 was validated by chromatin immunoprecipitation (ChIP) and further confirmed by dual-luciferase reporter assay. **Results:** ① TSP-4 and p-STAT3 were time-dependently upregulated in HG-induced podocytes ( $P < 0.05$ ). ② Knockdown of TSP-4 could reverse the inhibited proliferation, apoptosis, oxidative stress and inflammatory response in HG-induced podocytes ( $P < 0.05$ ). ③ STAT3 could bind the promoter region of TSP-4, thus inducing the transcription, and positively regulating the TSP-4 promoter activity.

**[基金项目]** 常州市卫生健康青苗人才培养工程项目(CZQM2020056)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhuangyibo87@163.com

**Conclusion:** Knockdown of TSP-4 alleviates HG-induced apoptosis, oxidative stress and inflammatory response in podocytes, thus showing a protective effect on podocytes. Transcription factor STAT3 has positive function to the promoter activity of TSP-4.

**[Key words]** podocytes; diabetic kidney disease; thrombospondin-4; apoptosis; inflammatory response

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(08): 1087-1092, 1106]

糖尿病肾脏病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病的一种进行性微血管并发症,由肾小球毛细血管损伤引起。其病理表现为持续性蛋白尿、肾小球滤过率降低、动脉血压升高等<sup>[1]</sup>。迄今为止,DKD已成为糖尿病患者预期寿命缩短的主要原因。由于糖尿病发病率的增加,DKD的年发病率在过去10年中增加了1倍以上。目前DKD约占终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)病例的50%<sup>[2]</sup>。DKD的发病机制十分复杂,尚未明确。一般认为足细胞损伤、减少以及蛋白尿是DKD的主要病理因素<sup>[3]</sup>。足细胞是肾小球的先天细胞之一,从根本上充当肾小球滤过膜的最后一道屏障。多种原因引起的足细胞损伤使肾小球滤过膜的通透性增加,导致蛋白尿,加速肾脏疾病的进展<sup>[4]</sup>。血小板反应蛋白(thrombospondins, TSP)是一组多域糖蛋白,存在于胚胎的细胞外基质中。它们通过与受体分子结合而负责细胞-细胞相互作用和细胞-基质相互作用<sup>[5]</sup>。TSP有5个家族成员,其中TSP-4是一种细胞外钙结合蛋白,具有调节细胞迁移、增殖、黏附和重塑等多种功能<sup>[6]</sup>。TSP-4在保护心脏中发挥重要作用,包括心肌组织重塑和心肌肥大的预防。它也是一种与癌症相关的调节剂。TSP-4可通过触发血管生成,可作为治疗癌症的新靶点。此外,TSP-4还具有调节肌腱和骨骼肌的结构和功能的作用。文献报道了TSP-4在加速瘢痕形成和介导局部炎症反应中的作用<sup>[7-8]</sup>。目前TSP-4在DKD中的作用机制研究较少。本研究旨在探讨TSP-4在高糖(high glucose, HG)诱导的足细胞损伤中的作用及其潜在机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

小鼠足细胞系(ATCC,美国),RPMI 1640培养基和0.25%胰蛋白酶(HyClone公司,美国),胎牛血清(Gibco公司,美国),TRIzol、Lipofectamine 2000(Invitrogen公司,美国)。鼠抗TSP-4多克隆抗体(R&D公司,美国),增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒、细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)、5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷

(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒、Hoechst 33342试剂盒、RIPA裂解液、葡萄糖、兔抗信号转导因子和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription3, STAT3)多克隆抗体、兔抗p-STAT3多克隆抗体和抗 $\beta$ -actin单克隆抗体等(上海碧云天生物技术公司),STAT3激动剂Colivelin(Selleck公司,美国),实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)试剂盒(TaKaRa公司,日本),Annexin V-FITC(BD Biosciences公司,美国),EdU溶液、酶标仪(Thermo Fisher Scientific公司,美国),丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)使用试剂盒(南京建成生物工程研究所),2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)(Sigma公司,美国),电泳仪和转膜仪(北京六一公司),凝胶成像系统(Bio-Rad公司,美国),双荧光素酶报告系统(Promega公司,美国),高速低温离心机(Eppendorf公司,德国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养与转染

小鼠足细胞系在RPMI 1640 37℃培养,以30 mmol/L葡萄糖刺激作为HG组,5 mmol/L葡萄糖诱导作为阴性对照组。使用Lipofectamine 2000常规进行细胞转染。接种在24孔板中的细胞生长至30%~50%。6 h更换新鲜培养基。48 h后,收集细胞用于后续实验。

#### 1.2.2 定量逆转录聚合酶链反应

使用TRIzol收集总RNA。使用商业试剂盒从总RNA的逆转录中获得cDNA,使用SYBR Green PCR Master Mix将其用作qRT-PCR的模板。95℃预变性30 s,95℃10 s变性,60℃退火10 s,72℃延伸20 s循环40个循环。GAPDH为内参,相对水平采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。GAPDH的序列为5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'(正向)和5'-GGGGTCTTGATGGCAACA-3'(反向),TSP-4的序列为5'-ACCGACAGTAGAGATGGTCTTCC-3'(正向)和5'-CGTCACAT-

CTGAAGCCAGGAGA-3'(反向)。

### 1.2.3 蛋白质印迹法

细胞裂解30 min,4 ℃、12 000 r/min 离心15 min,使用BCA法测定蛋白质浓度后,制备蛋白质样品用于SDS-PAGE(每泳道30 μg)并转移到PVDF膜上。在特定条件下阻断膜上的非特异性抗原后,用一抗[抗TSP-4(1:2 000)、抗STAT3(1:2 000)和抗p-STAT3(1:2 000)]和二抗(1:5 000)。使用ECL方法检测蛋白质信号。

### 1.2.4 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

收集细胞上清液,5 000 r/min、4 ℃离心10 min。按照推荐使用ELISA试剂盒检测促炎因子的相对水平。

### 1.2.5 流式细胞术

PBS洗涤后,离心细胞并重悬。在黑暗中用10 μL Annexin V-FITC 诱导细胞,然后1 000 r/min 离心5 min。重悬的沉淀剂在4 ℃避光下用5 μL PI进一步诱导。使用流式细胞术在30 min内检查凋亡细胞。通过PI染色类似地检查细胞周期分布。

### 1.2.6 CCK-8检测

细胞接种于96孔板中,接种量为 $3 \times 10^3$ 个/孔。空白组只填充培养基。在指定时间点,每孔加入10 μL CCK-8溶液,培养4 h。通过酶标仪测量450 nm处的光密度值。

### 1.2.7 EdU检测

将细胞以 $1 \times 10^6$ 个/孔接种于24孔板中,培养过夜。使用EdU溶液染色,Hoechst 33342用于在黑暗中染色细胞核。捕获了EdU染色的细胞(红色)、Hoechst 33342染色的细胞核(蓝色)以及合在一起的细胞图像。

### 1.2.8 MDA、SOD和CAT的测量

MDA、SOD和CAT的相对水平使用试剂盒按照建议进行检测。

### 1.2.9 活性氧(reactive oxygen species, ROS)的测量

DCFH-DA方法测量细胞内ROS水平。分别测量了485 nm发射波长和530 nm发射波长下的光密度。

### 1.2.10 染色质免疫沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)

$2 \times 10^7$ 个细胞用1%甲醇裂解,超声处理制备200~1 000 bp的DNA片段。细胞裂解物与1 μg抗IgG或抗STAT3一起孵育。然后在4 ℃下在20 μL蛋白A/G免疫沉淀磁珠中诱导染色质上清液过

夜。第2天,蛋白质-DNA复合物被洗脱和纯化,获得的DNA样品进行qRT-PCR。

### 1.2.11 双荧光素酶报告基因检测

将接种在96孔板中的细胞与含有野生型或突变型TSP-4启动子和STAT3的小干扰RNA(small interfering-STAT3, si-STAT3)/阴性siRNA序列(si-negative control, si-NC)的pGL3荧光素酶报告载体共转染。双荧光素酶报告系统用于测量相对荧光素酶活性,以海肾荧光素酶活性作为内参。

## 1.3 统计学方法

Western blot图像的数据提取使用Image Lab软件。使用SPSS 22.0进行统计分析。两组间的对比在正态性检验之后用独立样本 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析。所有实验重复3次。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HG诱导的足细胞中TSP-4的上调

检测HG诱导0、24、48、72 h的足细胞中TSP-4的表达水平。结果表明,TSP-4的核酸(图1A)和蛋白质水平(图1B、C)均呈时间依赖性上调,在72 h达到峰值。

### 2.2 干扰TSP-4抑制HG诱导的足细胞凋亡

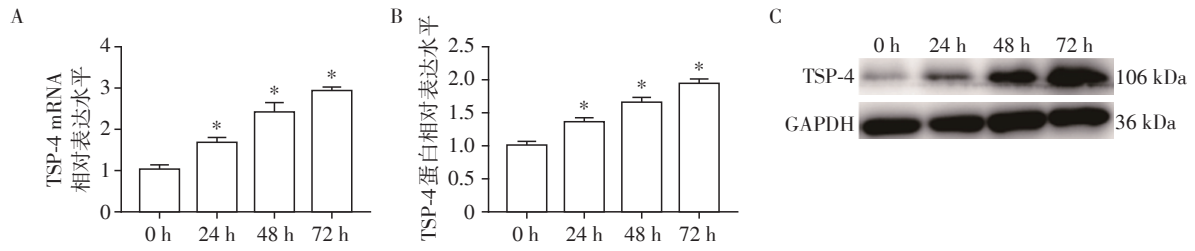
足细胞凋亡是DKD发展过程中的一个重要事件。我们发现在足细胞中,HG降低了细胞活力和EdU阳性细胞比例(图2A~C)。有趣的是,我们应用siRNA干扰了TSP-4后,细胞活力和EdU阳性细胞显著高于对照组,表明干扰TSP-4后促进了足细胞的增殖。流式细胞术结果表明HG刺激增加了G1期的细胞凋亡率和细胞比例,但是应用si-TSP后会抑制这种情况(图2D、E)。因此,抑制TSP-4的表达可以阻断HG诱导的足细胞损伤。

### 2.3 干扰TSP-4可减轻HG诱导的足细胞氧化应激

氧化应激有助于DKD的恶化。为了确定TSP-4对HG诱导的足细胞氧化应激的影响,我们使用DCF-DA方法检测了细胞内ROS水平。结果表明HG诱导ROS的表达,可被si-TSP-4逆转(图3A)。此外,还检测了MDA、SOD和CAT的相对表达水平。HG诱导的足细胞中MDA表达升高,SOD和CAT活性降低,与HG诱导ROS的表达变化一致,从而进一步证明HG诱导了氧化应激。但它们的水平均可通过si-TSP-4来逆转(图3B~D)。

### 2.4 干扰TSP-4抑制HG诱导的足细胞炎症反应

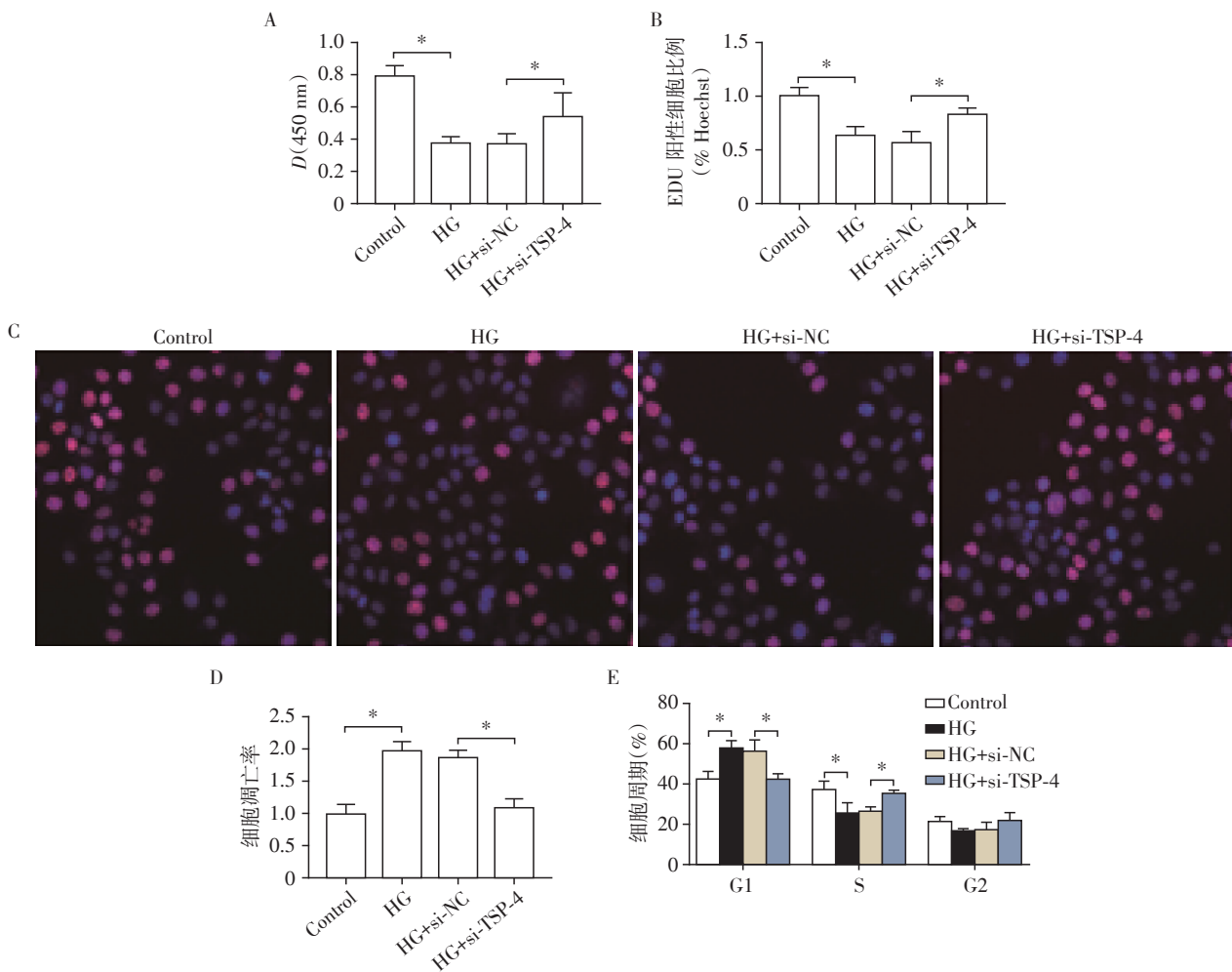
我们通过检测促炎因子的相对表达水平,进一



检测HG诱导0、24、48、72 h的足细胞中TSP-4的相对表达水平。A:通过qRT-PCR检测TSP-4的mRNA水平;B、C:通过蛋白质印迹(B)及其代表性灰色条带(C)检测TSP-4的蛋白表达水平。与对照组比较,\* $P < 0.05$ ( $n=3$ )。

图1 HG呈时间依赖性诱导足细胞中TSP-4的表达

Figure 1 Upregulation of TSP-4 in HG-induced podocytes



足细胞采用空白对照、HG诱导、HG诱导+ si-NC转染或HG诱导+ si-TSP-4转染处理。A:CCK-8法检测细胞活力;B、C:EdU阳性细胞比例和代表性图像( $\times 200$ ),其中EdU染色的细胞为红色,Hoechst 33342染色的细胞为蓝色;D:通过流式细胞术检查细胞凋亡;E:通过流式细胞术检查G1、S和G2期的细胞周期分布。两组比较,\* $P < 0.05$ ( $n=3$ )。

图2 干扰TSP-4抑制HG诱导的足细胞凋亡

Figure 2 Knockdown of TSP-4 inhibits HG-induced apoptosis in podocytes

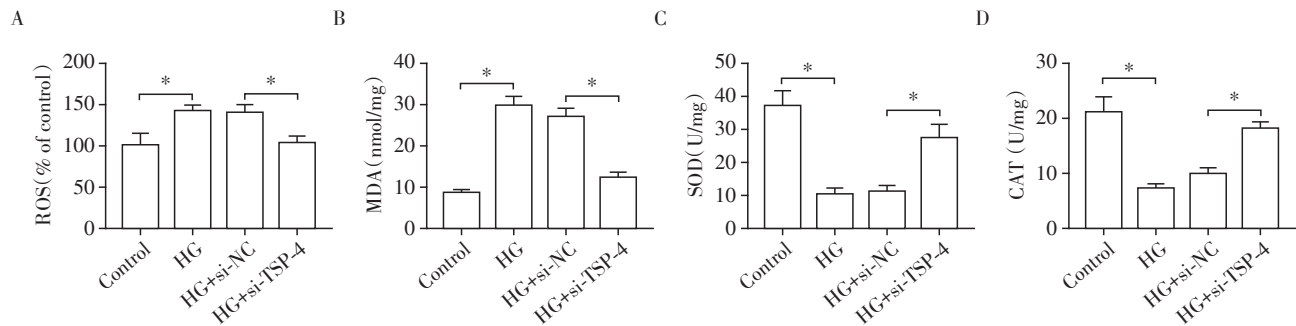
步检查了TSP-4在HG诱导的足细胞炎症反应中的潜在作用。HG上调足细胞中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-6的表达水平,并且应用si-TSP-4后它们的表达水平降低(图4)。因此,干扰TSP-4可有效抑制HG诱导

的炎症反应。

### 2.5 STAT3激活TSP-4的转录

使用JASPAR预测TSP-4启动子区域中的潜在结合位点与STAT3结合(数据未显示)。STAT3是一

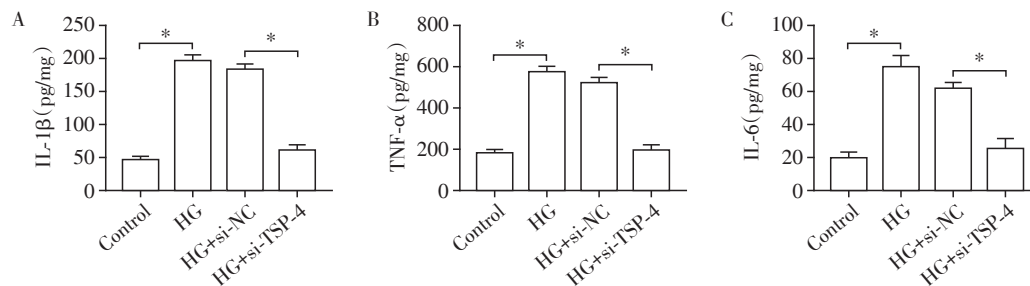




足细胞用空白对照、HG诱导、HG诱导+ si-NC转染或HG诱导+si-TSP-4转染处理。A:使用DCF-DA方法检测ROS水平;B~D:MDA(B)、SOD(C)和CAT(D)的相对水平使用试剂盒检测。两组比较,\* $P < 0.05$ ( $n=3$ )。

图3 干扰TSP-4减轻HG诱导的足细胞氧化应激

Figure 3 Knockdown of TSP-4 alleviates oxidative stress in HG-induced podocytes



足细胞用空白对照、HG诱导、HG诱导+si-NC转染或HG诱导+si-TSP-4转染处理。通过ELISA测量IL-1 $\beta$ (A)、TNF- $\alpha$ (B)和IL-6(C)的相对表达水平。两组比较,\* $P < 0.05$ ( $n=3$ )。

图4 干扰TSP-4抑制HG诱导的足细胞炎症反应

Figure 4 Knockdown of TSP-4 inhibits HG-induced inflammatory response in podocytes

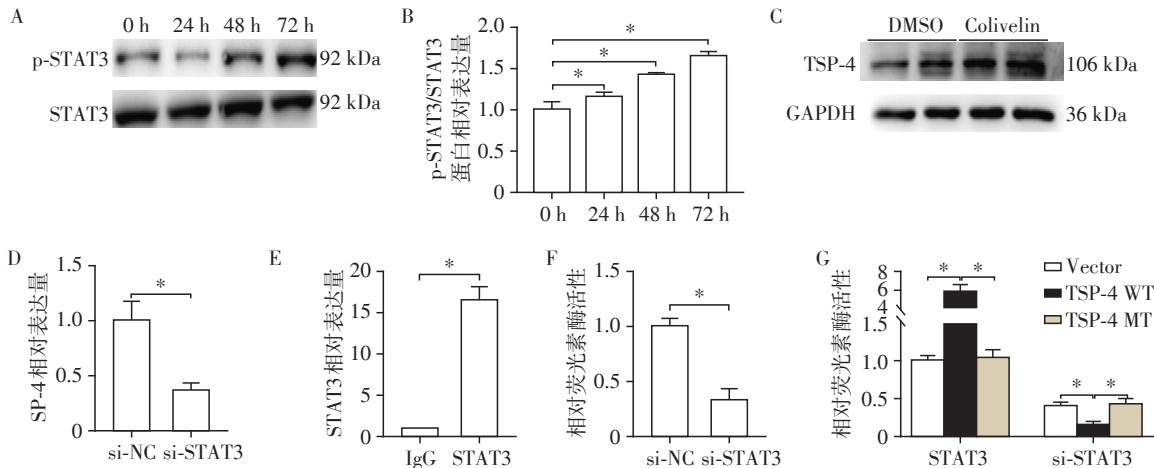
种经典的转录因子,它通过靶向基因表达来介导基因表达。发现p-STAT3在HG诱导的足细胞中呈时间依赖性上调(图5A、B)。加入STAT3激动剂Colivelin后,TSP-4的表达水平明显上调,抑制STAT3的表达可显著下调TSP-4(图5C、D),表明STAT3可能介导TSP-4的转录。推测STAT3通过直接结合其启动子来激活TSP-4的表达水平。通过ChIP检测分析,证实STAT3蛋白能够与TSP-4的启动子结合(图5E)。此外,双荧光素酶报告基因检测阐明STAT3激活了野生型TSP-4的启动子,而不是突变型1(图5F、G)。故足细胞中的TSP-4可以被STAT3激活。

### 3 讨论

DKD的全球死亡率相对较高。更重要的是,随着发病率的逐年增加,医疗费用增多。DKD的发病机制非常复杂且不确定,涉及多种类型细胞和各种因素<sup>[9-10]</sup>。本研究发现,TSP-4在HG诱导的足细胞中显著上调,从而加剧了足细胞的凋亡和炎症反应。文献报道HG刺激导致细胞中大量产生晚期糖

基化终产物(AGE),并不断积累<sup>[11]</sup>。同时,在AGE的产生过程中,线粒体会释放大量的ROS。过量的ROS最终会导致氧化和抗氧化系统失衡,从而导致细胞受损。氧化应激可直接导致足细胞凋亡,或通过肌动蛋白重排、内皮素-1合成增加或微血管通透性改变等间接引起足细胞凋亡<sup>[12]</sup>。本研究结果表明,HG诱导的足细胞中ROS水平显著增加,可通过抑制TSP-4的表达而降低。这表明抑制TSP-4的表达发挥了抗氧化作用。

氧化应激与炎症反应密切相关,它们的协同作用引发了DKD的恶化。全身和局部炎症反应都参与了DKD的发展。以往研究表明,DKD患者肾脏中过量的ROS会诱导炎症细胞的浸润和募集,从而进一步加速IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 和NF- $\kappa$ B等促炎因子的产生,并启动DKD的发作<sup>[13]</sup>。血浆IL-6和TNF- $\alpha$ 也有助于DKD的进展。它们能够提高系膜细胞的增殖率,扩大细胞外基质,重要的是通过在正反馈回路中产生ROS来增加内皮细胞通透性<sup>[14]</sup>。NF- $\kappa$ B是启动糖尿病炎症反应的主要转录因子。它在DKD患者的肾脏中上调,可以调节黏附分子和促炎因子如



A:通过蛋白质印迹检测HG诱导0、24、48、72 h的足细胞中p-STAT3的蛋白质水平;B:p-STAT3/STAT3蛋白相对表达量的半定量分析;C:通过蛋白质印迹检测加入STAT3激动剂Colivelin后,TSP-4的蛋白水平;D:si-NC或si-STAT3转染的足细胞中TSP-4的相对水平;E:抗IgG和抗STAT3中STAT3的相对富集;F:si-NC或si-STAT3转染后野生型TSP-4中的相对荧光素酶活性;G:si-NC或si-STAT3转染后野生型和突变型TSP-4中的相对荧光素酶活性。两组比较,\* $P < 0.05(n=3)$ 。

图5 STAT3激活TSP-4的转录

Figure 5 STAT3 activates the transcription of TSP-4

MCP-1、TNF- $\alpha$ 和IL-6的表达水平<sup>[15]</sup>。文献报道<sup>[16]</sup> ESRD患者粒细胞和单核细胞中Mac-1(CD11b/CD18)上调与血浆MDA含量增加以及超氧化物和过氧化氢的产生有关,表明氧化应激和炎症反应之间存在相互作用。本研究发现干扰TSP-4的表达可抑制HG诱导的足细胞中炎症因子水平的增加。然而,TSP-4的相关炎症机制尚不清楚。

STAT3位于人染色体17q21.2,通过作用于细胞表面的多肽受体发挥生物学效应<sup>[17]</sup>。它是一种参与DKD发病机制的功能性转录因子。抑制STAT3活性可以减轻大鼠DKD的发展<sup>[18]</sup>。本研究中,HG诱导的足细胞中STAT3的磷酸化水平显著升高,通过诱导TSP-4转录,从而上调了TSP-4的表达水平。

本研究存在一些局限性。应用HG刺激足细胞形成体外DKD模型,在未来的研究中需要一个体内DKD模型来验证发现。此外,虽然发现STAT3调节TSP-4的表达,但TSP-4是否负责STAT3的功能还需要进一步验证。综上所述,在HG诱导的足细胞中TSP-4上调,这可能是由STAT3磷酸化水平增加引起的。抑制TSP-4的表达对减轻HG诱导的足细胞凋亡、氧化应激和炎症反应具有保护作用。结合本研究,认为TSP-4是DKD的一个重要的新治疗靶点,为DKD的治疗带来了新的启发和实验依据。

[参考文献]

[1] BARRERA-CHIMALI J, LIMA-POSADA I, BAKRIS G L, et al. Mineralocorticoid receptor antagonists in diabetic

kidney disease - mechanistic and therapeutic effects [J]. Nat Rev Nephrol, 2022, 18(1): 56-70

[2] SAEEDI P, PETERSOHN I, SALPEA P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2019, 157: 107843

[3] FANG Y, CHEN B, GONG A Y, et al. The ketone body  $\beta$ -hydroxybutyrate mitigates the senescence response of glomerular podocytes to diabetic insults [J]. Kidney Int, 2021, 100(5): 1037-1053

[4] PODGÓRSKI P, KONIECZNY A, LIS Ł, et al. Glomerular podocytes in diabetic renal disease [J]. Adv Clin Exp Med, 2019, 28(12): 1711-1715

[5] LEE C H, SETO W K, LUI D T, et al. Circulating thrombospondin-2 as a novel fibrosis biomarker of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes [J]. Diabetes Care, 2021, 44(9): 2089-2097

[6] STENINA - ADOGNRAVI O, PLOW E F. Thrombospondin-4 in tissue remodeling [J]. Matrix Biol, 2019, 75-76: 300-313

[7] MUPPALA S, XIAO R, KRUKOVETS I, et al. Thrombospondin-4 mediates TGF- $\beta$ -induced angiogenesis [J]. Oncogene, 2017, 36(36): 5189-5198

[8] MUPPALA S, XIAO R, GAJETON J, et al. Thrombospondin-4 mediates hyperglycemia- and TGF-beta-induced inflammation in breast cancer [J]. Int J Cancer, 2021, 148(8): 2010-2022

(下转第1106页)