

· 基础研究 ·

Caspase-3 抑制剂所致氧化应激状态下肾小管上皮细胞差异表达基因的筛选及功能验证

骆长亮¹, 张秋红², 孙林春^{3*}

¹苏州大学附属儿童医院检验科, 江苏 苏州 215000; ²南京鼓楼医院集团宿迁医院检验科, 江苏 宿迁 223800; ³南京医科大学附属儿童医院儿科研究所, 江苏 南京 210008

[摘要] 目的: 研究 caspase-3 抑制剂引起的氧化应激状态下肾小管上皮细胞基因表达特点, 筛选潜在的候选基因, 为揭示 caspase-3 调控活性氧(reactive oxygen species, ROS)损伤肾小管上皮细胞的机制奠定基础。方法: 将人肾小管上皮细胞 HK-2 用 H₂O₂(300 μmol/L)处理 6 h 后, 随机分为对照组和 caspase-3 抑制剂组(Ac-DEVD-CHO, 15 μmol/L), 运用 Illumina HiSeq 2500 测序平台完成基因测序, 筛选差异基因并进行相关富集分析, 用定量 PCR 对筛选到的前 10 位差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)进行验证。将 H₂O₂(300 μmol/L)处理 6 h 后的 HK-2 细胞随机分为对照组、caspase-3 抑制剂组(Ac-DEVD-CHO, 15 μmol/L)、CTNNB1 组[pcDNA3.1(+)-CTNNB1]、caspase-3 抑制剂+CTNNB1 组[Ac-DEVD-CHO, 15 μmol/L+pcDNA3.1(+)-CTNNB1]以及 caspase-3 抑制剂+CTNNB1 NC 组[Ac-DEVD-CHO, 15 μmol/L+pcDNA3.1(+)-CTNNB1 NC], MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞技术检测细胞凋亡和 ROS 水平, Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白表达。结果: 芯片共筛选出 185 个 DEG, 经定量 PCR 验证, 显著性差异排名前 10 的基因中 FIS1、EZR、COL7A1、RPL5、MAP4、CEBPB 和 CTNNB1 mRNA 在 caspase-3 抑制剂组细胞中低表达($P < 0.05$), SNRPB mRNA 高表达($P < 0.05$)。Caspase-3 抑制剂组增殖率高于对照组($P < 0.05$), CTNNB1 组增殖率低于对照组($P < 0.05$), caspase-3 抑制剂+CTNNB1 组增殖率低于 caspase-3 抑制剂组($P < 0.05$), 但仍高于对照组($P < 0.05$)。Caspase-3 抑制剂组细胞凋亡率、cleaved-caspase-3 和 cleaved-PARP 蛋白水平低于对照组($P < 0.05$), CTNNB1 组细胞凋亡率、cleaved-caspase-3 和 cleaved-PARP 蛋白水平高于对照组($P < 0.05$), caspase-3 抑制剂+CTNNB1 组细胞凋亡率、cleaved-caspase-3 和 cleaved-PARP 蛋白水平较 caspase-3 抑制剂组高($P < 0.05$), 但仍低于对照组($P < 0.05$)。caspase-3 抑制剂组 ROS 较对照组降低($P < 0.05$), CTNNB1 组 ROS 较对照组升高($P < 0.05$), caspase-3 抑制剂+CTNNB1 组 ROS 较 caspase-3 抑制剂组高($P < 0.05$), 但仍低于对照组($P < 0.05$)。结论: Caspase-3 抑制剂引起的肾小管上皮基因异常表达与氧化应激状态下的肾损伤有关; 氧化应激对肾小管上皮细胞的损伤具有 caspase-3 依赖性, 抑制 caspase-3 对肾损伤有保护作用, CTNNB1 参与了这一过程。

[关键词] 肾损伤; 氧化应激; 线粒体; 生物信息学; β-连环蛋白

[中图分类号] R393

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)01-017-10

doi: 10.7655/NYDXBNS20230103

Screening and functional verification of differentially expressed genes induced by caspase-3 inhibitor in renal tubular epithelial cells under oxidative stress

LUO Changliang¹, ZHANG Qiuhong², SUN Linchun^{3*}

¹Clinical Laboratory, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, ²Clinical Laboratory, Suqian Hospital of Nanjing Drum Tower Hospital Group, Suqian 223800; ³Pediatric Research Center, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China

[Abstract] **Objective:** To study the gene expression characteristics of renal tubular epithelial cells under oxidative stress caused by caspase-3 inhibitors via screening the potential candidate genes, which will lay the foundation for revealing the mechanism of caspase-3 regulating ROS injury in renal tubular epithelial cells. **Methods:** The renal tubular epithelial cells HK-2 were treated with H₂O₂ at a

[基金项目] 南京市卫生科技发展专项(YKK20125)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 451377086@qq.com

final concentration of 300 $\mu\text{mol/L}$ for 6 h, and then randomly divided into control group and caspase-3 inhibitor group (Ac-DEVD-CHO, 15 $\mu\text{mol/L}$). The sequencing was completed by using the Illumina HiSeq 2500 platform. Enrichment analysis and an interaction network were performed to screen differential genes. Quantitative PCR was used to verify the first 10 differentially expressed genes (DEGs). The HK-2 cells treated with H_2O_2 (300 $\mu\text{mol/L}$) for 6 h were then divided into control group, caspase-3 inhibitor group (Ac-DEVD-CHO, 15 $\mu\text{mol/L}$), CTNNB1 group (pcDNA3.1(+)-CTNNB1), caspase-3 inhibitor+CTNNB1 group (Ac-DEVD-CHO, 15 $\mu\text{mol/L}$ +pcDNA3.1(+)-CTNNB1) and caspase-3 inhibitor+CTNNB1 NC group (Ac-DEVD-CHO, 15 $\mu\text{mol/L}$ +pcDNA3.1(+)-CTNNB1 NC) randomly. MTT assay was used to detect cell proliferation, flow cytometry was used to detect cell apoptosis and ROS level, Western blot was used to detect apoptosis-related proteins. **Results:** A total of 185 DEGs were selected in the control group and the caspase-3 inhibitor group. Quantitative PCR showed FIS1, EZR, COL7A1, RPL5, MAP4, CEBPB and CTNNB1 mRNA were lowly expressed (all $P < 0.05$) and SNRPB mRNA was highly expressed in caspase-3 inhibitor group ($P < 0.05$). The proliferation was higher in the caspase-3 inhibitor group and was lower the CTNNB1 group compared to the control (both $P < 0.05$). The proliferation of the caspase-3 inhibitor+CTNNB1 group was lower than that of the caspase-3 inhibitor group ($P < 0.05$), but still higher than the control ($P < 0.05$). The apoptosis and the expression of cleaved-caspase-3 and cleaved-PARP were lower in caspase-3 inhibitor group and were higher in CTNNB1 group compared to the control (both $P < 0.05$). The apoptosis and the expression of cleaved-caspase-3 and cleaved-PARP in caspase-3 inhibitor+CTNNB1 group were higher than those in the caspase-3 inhibitor group ($P < 0.05$), but were still lower than the control ($P < 0.05$). The ROS in the caspase-3 inhibitor group was lower but was higher in CTNNB1 group compared to that of the control group ($P < 0.05$). The ROS in the caspase-3 inhibitor+CTNNB1 group was higher than that of the caspase-3 inhibitor group ($P < 0.05$), but was still lower than the control ($P < 0.05$). **Conclusion:** Aberrant gene expression induced by caspase-3 inhibitor is associated with renal injury under oxidative stress. The injury of oxidative stress on renal tubular epithelial cells is caspase-3 dependent. Inhibition of caspase-3 has a protective effect on renal injury and CTNNB1 is involved in this process.

[Key words] kidney injury; oxidative stress; mitochondria; bioinformatics; CTNNB1

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(01):017-026]

氧化应激损伤是造成急性和慢性肾损伤的重要机制之一。人体正常的生物代谢会产生超氧阴离子自由基、过氧化氢等活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 体内完善的抗 ROS 系统能及时将多余的 ROS 清除, 较低水平的 ROS 对肾小管和微循环的生理调节有积极作用^[1]; 但是在受到各种病原体或炎症因子刺激时, 肾小管细胞中氧化还原状态调控失衡, 造成 ROS 在肾组织蓄积、细胞膜损伤和超氧阴离子渗漏, 最终导致肾损伤^[2]。以氧化应激为治疗靶点已经成为肾损伤治疗的热点。

Caspase-3 介导的线粒体途径凋亡是经典的细胞凋亡通路。有研究指出, 氧化应激损伤和 caspase-3 介导的线粒体途径细胞凋亡存在关联^[3-4]。我们在前期研究中发现, H_2O_2 处理的人肾小管上皮细胞 HK-2 中氧化应激水平升高, 细胞增殖受到抑制、细胞凋亡增多; 而 caspase-3 抑制剂能降低 H_2O_2 处理后肾小管细胞 ROS 水平, 对氧化应激引起的细胞损伤有改善作用, 说明肾小管上皮细胞的氧化应激损伤具有 caspase-3 依赖性, 抑制 caspase-3 途径的细胞凋亡对 ROS 引起的脓毒症肾小管上皮细胞损伤有一定保护作用^[5]。Kaleem 等^[6]指出, caspase 的释放受

细胞中超氧阴离子浓度的调节。但是目前对肾小管上皮损伤中 ROS 和 caspase-3 途径细胞凋亡的研究还较少, caspase-3 对 ROS 的调控是直接起作用, 还是引起了其他基因、蛋白或通路的变化? 除了线粒体-caspase 途径介导细胞凋亡, 其他凋亡通路是否也参与其中? 这些问题目前尚不清楚。

本研究拟利用芯片测序, 对 caspase-3 抑制剂处理的氧化应激状态下肾小管上皮细胞转录组进行分析, 筛选 caspase-3 抑制剂引起的差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG), 对 DEG 进行 GO 分析和 KEGG 富集分析, 对筛选出的关键基因进行生物学验证, 深入探讨和揭示 caspase-3 调控 ROS 损伤肾小管上皮细胞的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人肾小管上皮细胞 HK-2 (上海中科院典型培养物保藏中心)、Ac-DEVD-CHO (上海碧云天生物技术有限公司)、VigoFect 转染试剂盒 (北京威格拉斯生物技术有限公司)、TRIzol 试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本)、SuperReal PreMix Plus (北京天根生化科技有

限公司)、MTT试剂盒(南京建成生物工程研究所)、细胞凋亡试剂盒(BD公司,美国)、Western blot一抗(ABI公司,美国)、Western blot二抗(上海优宁维生物科技股份有限公司)。荧光定量PCR仪(ABI公司,美国)、凝胶成像系统(Bio-Rad公司,美国)、流式细胞仪(Beckman公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 芯片样本制备

本研究利用H₂O₂诱导HK-2细胞建立氧化应激状态,通过酶生化法检测HK-2细胞内的抗氧化指标的含量:超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和丙二醛(malonic dialdehyde, MDA),验证模型是否成功。将对数生长长期的人肾小管上皮细胞HK-2接种在直径90 mm的细胞培养皿,用终浓度为300 μmol/L的H₂O₂处理6 h后,随机分为对照组(不做处理)和caspase-3抑制剂组(Ac-DEVD-CHO, 15 μmol/L),各组设置3个独立样本,将样本送公司完成测序及分析。

1.2.2 DEG的筛选

本次所用测序平台为Illumina Hiseq 2500, 100PE。用R软件Affy包(Version: R3.4.0)的RMA法通过质控标准过滤去除原始数据中的接头序列、低质量数据和未检出碱基等无效数据,得到有效数据;将原始图像数据转化为序列数据。用R语言的Limma包^[7]分析各组基因表达,采用随机方差 t 检验筛选差异基因,计算 P 值并多重检验进行校正,将校正后的 P 值由小到大排列,同时满足 $\log_2FC(\text{fold change}) \geq 2$ 和校正 P 值 < 0.05 的基因为差异表达基因。用完全链接聚类法(complete-linkage clustering)对差异基因进行聚类分析,用pheatmap包绘制热图,用ggplot2包做火山图。

1.2.3 GO分析和KEGG通路富集分析

用DAVID数据库^[8]对筛选出的DEG进行GO通路^[9]和KEGG通路^[10]富集分析。当通路上的差异基因数 > 2 个,且矫正后的 $P < 0.05$ 时,认为富集结果有统计学意义。

1.2.4 候选基因的定量PCR验证

用TRIzol试剂盒提取各组细胞的总RNA,反转录为cDNA后,以其为模板,用荧光定量PCR仪,用SuperReal PreMix Plus进行定量PCR反应,20 μL总体系中包含2×SuperReal PreMix Plus 10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各0.6 μL,50×ROX Reference Dye II 2 μL, cDNA 2 μL,用灭菌去离子水补足体积。定量PCR引物序列见表1。扩增程序为:95 °C 15 min;

95 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 32 s,共进行36个循环;4 °C 10 min。以5批独立cDNA为模板,每组设3个复孔,以GAPDH为内参基因。根据内参基因和候选基因的C_T值,用 $\Delta\Delta C_T$ 法进行基因表达的相对定量分析。

1.2.5 CTNNB1表达载体转染HK-2细胞

将HK-2细胞接种到6孔板中,以铺满板底40%密度为宜,用终浓度为300 μmol/L的H₂O₂处理6 h后,将细胞随机分组:对照组(不做处理)、caspase-3抑制剂组(Ac-DEVD-CHO, 15 μmol/L)、CTNNB1组[pcDNA3.1(+)-CTNNB1]、caspase-3抑制剂+CTNNB1组[Ac-DEVD-CHO, 15 μmol/L+pcDNA3.1(+)-CTNNB1]以及caspase-3抑制剂+CTNNB1 NC组[Ac-DEVD-CHO, 15 μmol/L+pcDNA3.1(+)-CTNNB1 NC]。转染前1 h更换新鲜培养基,用VigoFect转染试剂盒,根据操作说明进行转染,将细胞放回培养箱培养,6 h后更换新鲜完全培养基。48 h后收集细胞检测转染效率。

1.2.6 细胞增殖和凋亡检测

将HK-2细胞按 1×10^5 个/孔接种到96孔板,根据不同分组给予相应处理,在第0 h和第48 h,向每孔各加入20 μL MTT溶液,放在培养箱中培养4 h,取出用酶标仪检测490 nm的吸光度,换算成存活率,并以时间为横坐标,存活率为纵坐标绘制细胞生长曲线。将HK-2细胞制成 1×10^5 个/mL悬液,并加入100 μL至流式管中,分别加入20 μL Annexin-FITC和PI染料,避光孵育20 min后,加入500 μL PBS,用涡旋仪震荡混匀后,流式细胞仪检测凋亡细胞百分数。

1.2.7 Western blot检测

胰蛋白酶消化并收集各组HK-2细胞,提取总蛋白,用BCA蛋白定量后,加入1×上样缓冲液煮沸蛋白5 min。先用80 V恒压电泳20 min,再120 V恒压电泳90 min;用硝酸纤维素薄膜90 V恒压转膜120 min。用5%脱脂奶粉封闭蛋白膜2 h,分别用1:1 000稀释的一抗4 °C孵育过夜和用1:500稀释的二抗溶液室温孵育45 min;洗膜后,用显影剂显影并用凝胶成像系统记录分析蛋白条带。

1.2.8 细胞ROS检测

胰蛋白酶消化并收集各组HK-2细胞,将细胞制成 1×10^5 个/mL的单细胞悬液,向流式细胞管中加入100 μL细胞悬液,再加入5 μmol/L DHE,室温避光孵育30 min,用PBS洗涤后,流式细胞仪检测ROS。

表1 定量PCR引物序列
Table 1 Quantitative PCR primer sequences

基因名称	引物序列(5'→3')	长度(bp)
FIS1	上游:GTAGGGTTACATGGATGCCAGAGA 下游:GGCAAAGCTCCTCCAGCAG	181
SOX18	上游:CGCGTGATGTGGTFC 下游:ATGTAACCCTGGCAACTC	126
EZR	上游:TAGAGGCTGACCGTATGGCT 下游:TGTGCTGCCACTCTTCAACTT	178
SPARC	上游:CATTGGCGAGTTGAGAAGG 下游:GGAATTCGGTCAGCTCAGAGT	117
COL7A1	上游:GGGTGTAGCTGTACAGCCAC 下游:CCCTCTCCCTCACTCTCCT3	100
SNRPB	上游:GAGATAAGATGGGAAAAGG 下游:GGGGACGAGGTGGAACA	109
RPL5	上游:GAAGAGAGAGAGAGAGAGAGGTGTAAA 下游:CTGCCGAGAGACTATCATATC	112
MAP4	上游:CCGGAACTCAGAGTCAAAGA 下游:CTCCATGACCACCATTTGGCT	134
ATF3	上游:CGAAGACTGGAGCAAAATGATG 下游:CATCCAGGCCAGGTCTCTGCCTCAG	153
CEBPB	上游:TGTCCAAACCAACCGCACAT 下游:ATCAACTTCGAAACCGGCC	119
CTNNB1	上游:CCCAGAATGCAGTTCGCCTT 下游:TAGTCGTGGAATGGCACCT	122
β-actin	上游:AGCGAGCATCCCCAAAAGTT 下游:GGGCACGAAGGCTCATCATT	131

1.3 统计学方法

数据分析用SPSS 17.0软件,服从正态分布的计量资料统一表示为均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$),两组间比较用独立样本 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

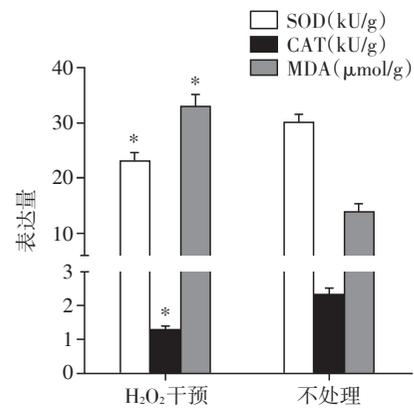
2 结果

2.1 H₂O₂干预后HK-2细胞SOD、CAT和MDA的表达变化

由图1可见,H₂O₂处理后的HK-2细胞的SOD和CAT水平分别为(23.07 ± 1.62)kU/g和(1.28 ± 0.10)kU/g,较正常HK-2细胞的SOD和CAT水平降低($P < 0.05$),MDA水平为(33.18 ± 2.16)μmol/g,较正常HK-2细胞升高($P < 0.05$),说明H₂O₂干预成功诱导了细胞的氧化应激状态。

2.2 差异基因筛选

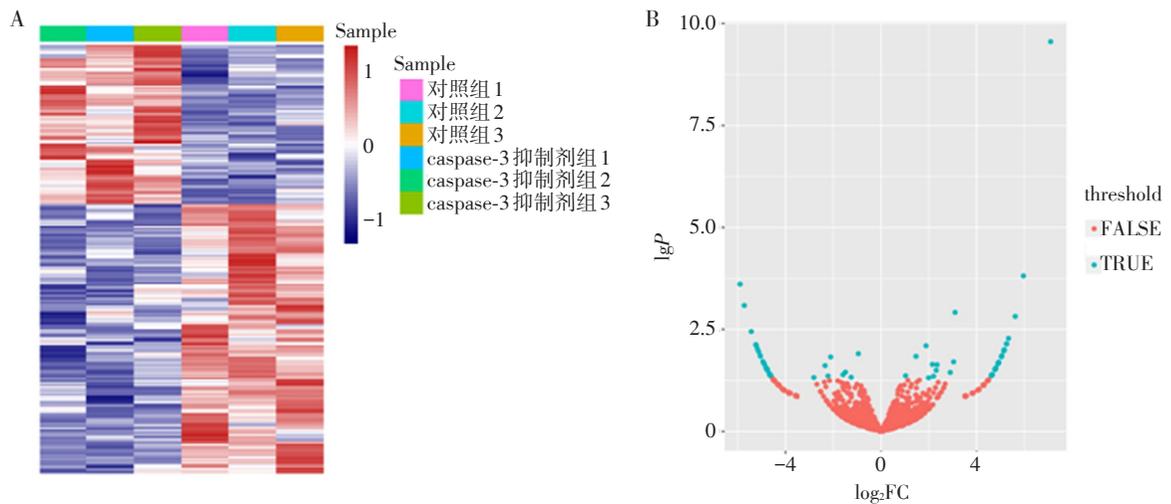
统计结果如图2所示,在对照组和caspase-3抑



与不处理的HK-2细胞相比,* $P < 0.05$ ($n=5$)。

图1 H₂O₂干预后HK-2细胞SOD、CAT和MDA水平
Figure 1 SOD, CAT and MDA levels of HK-2 cells after H₂O₂ intervention

制剂组中共筛选出185个DEG,聚类热图和火山图见图2A、B。筛选出的显著性最高的前10位差异表达基因依次为FIS1、SOX18、EZR、SPARC、COL7A1、SNRPB、RPL5、MAP4、CEBPB和CTNNB1。



A: 聚类热图, 红色代表高表达, 蓝色代表低表达; B: 火山图, 横坐标为 \log_2FC , 纵坐标为 $\lg P$ 值。

图2 差异基因的聚类热图和火山图

Figure 2 Clustering heatmap and volcano map of DEG

表2 排名前10的GO通路名称

Table 2 The top 10 GO entries

组别	名称	P值	基因名称
BP	GO:0032989(细胞成分的形态发生)	0.014	FIS1、ATOH1、CCK、EZR、SSBP1、CTNNB1
	GO:0048562(胚胎器官形态发生)	0.030	STRA6、MTHFD1L、SOX18、KCNQ4、HOXA2
	GO:0030522(细胞内受体介导的通路)	0.030	DNAJA1、CALR、CTNNB1
	GO:0070584(线粒体形态发生)	0.034	FIS1、SSBP1
CC	GO:0005815(微管组织中心)	0.012	KIF2B、EZR、FAM110C、DCTN3、CTNNB1
	GO:0044420(细胞外基质成分)	0.012	COL7A1、COL11A2、SPARC、TNXB
	GO:0005581(胶原蛋白三聚体)	0.019	COL13A1、COL7A1、COL11A2、TNXB
	GO:0030529(核糖核蛋白复合物)	0.033	RPSA、SND1、SNRNP200、SNRPB、RPL5、CALR
MF	GO:0005198(结构分子活性)	0.001	RPSA、TUBB2A、ARPC2、MAP4、RPL5、DCTN3、PLEC
	GO:0015171(氨基酸跨膜转运蛋白活性)	0.026	SLC7A11、SLC7A5、SLC7A1、SLC7A9

2.3 差异基因的GO通路和KEGG通路富集分析

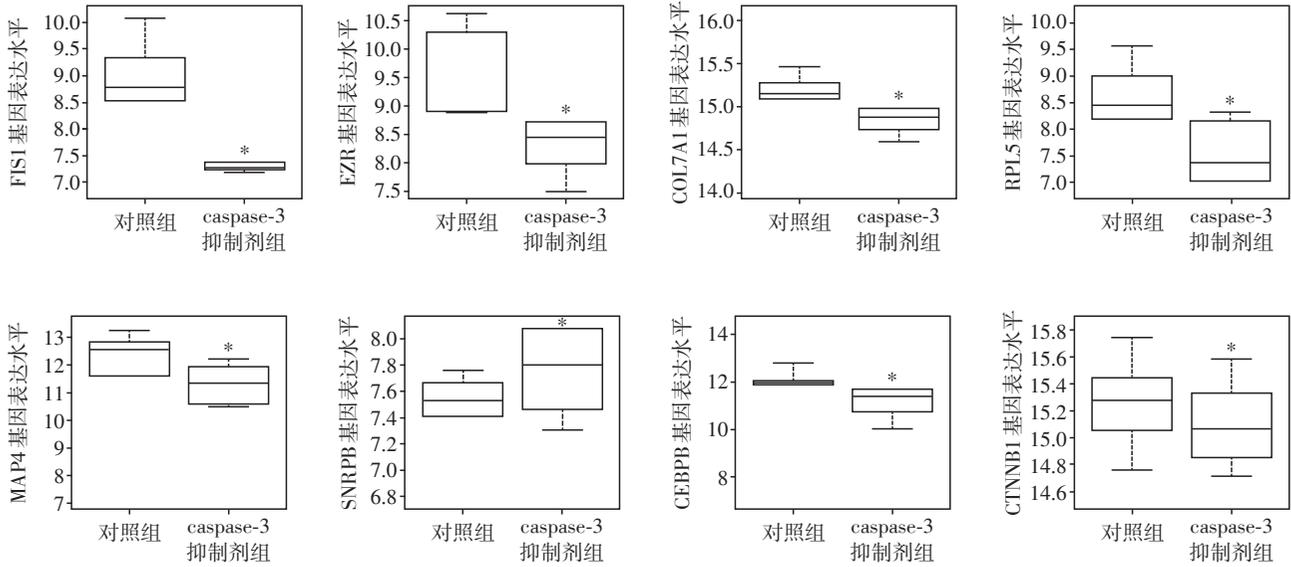
GO注释表明,DEG的功能主要集中在细胞成分的形态发生、胚胎器官形态发生、细胞内受体介导的通路、线粒体形态发生等生物学过程(biological process, BP),微管组织中心、细胞外基质成分、胶原蛋白三聚体、核糖核蛋白复合物等细胞组分

(cell constitutes, CC),以及结构分子活性、氨基酸跨膜转运蛋白活性等分子功能(molecule function, MF)(表2)。KEGG通路富集分析显著性排名前5的条目包括RAC1信号通路、RNA代谢通路、RhoA信号通路、糖尿病途径和细胞蛋白的凋亡裂解通路(表3)。

表3 排名前5的KEGG通路名称

Table 3 The top 5 KEGG pathway entries

名称	基因	P值
RAC1信号通路	PREX2、CTNNB1、EZR、ARPC2	0.022
RNA代谢通路	SNRPB、PSMC3、KHSRP、RPL5、RPSA	0.022
RhoA信号通路	PREX2、CTNNB1、EZR、ARPC2	0.022
糖尿病途径	CALR、RPN1、RPL5、RPSA	0.023
细胞蛋白的凋亡裂解通路	CTNNB1、PLEC	0.036



与对照组相比, $P < 0.05$ 。

图3 定量PCR验证候选基因的表达

Figure 3 Quantitative PCR to verify the expression of candidate genes

2.4 候选基因的定量PCR验证

由图3可见,显著性排名前10的DEG中,FIS1、EZR、COL7A1、RPL5、MAP4、CEBPB和CTNNB1 mRNA在对照组细胞中高表达(P 均 < 0.05),SNRPB mRNA在对照组细胞中低表达($P < 0.05$),与芯片结果一致。

2.5 CTNNB1对caspase-3抑制剂处理的氧化应激状态HK-2细胞增殖和凋亡的影响

由图4A可见,对照组、caspase-3抑制剂组、CTNNB1组、caspase-3抑制剂+CTNNB1组和caspase-3抑制剂+CTNNB1 NC组的细胞增殖率分别为 $(125.20 \pm 5.24)\%$ 、 $(166.21 \pm 3.85)\%$ 、 $(116.43 \pm 3.08)\%$ 、 $(140.27 \pm 7.31)\%$ 和 $(170.45 \pm 8.23)\%$ 。结果显示,caspase-3抑制剂组增殖率高于对照组($P < 0.05$);CTNNB1组增殖率低于对照组($P < 0.05$),caspase-3抑制剂+CTNNB1组增殖率较caspase-3抑制剂组低($P < 0.05$),但仍高于对照组($P < 0.05$)。

Caspase-3抑制剂组cleaved-caspase-3和cleaved-PARP蛋白水平低于对照组($P < 0.05$);CTNNB1组cleaved-caspase-3和cleaved-PARP蛋白水平高于对照组($P < 0.05$);caspase-3抑制剂+CTNNB1组cleaved-caspase-3和cleaved-PARP蛋白水平均较caspase-3抑制剂组高($P < 0.05$),但低于对照组($P < 0.05$)。对照组、caspase-3抑制剂组、CTNNB1组、caspase-3抑制剂+CTNNB1组和caspase-3抑制剂+CTNNB1 NC组细胞的凋亡率分别为 $(16.35 \pm$

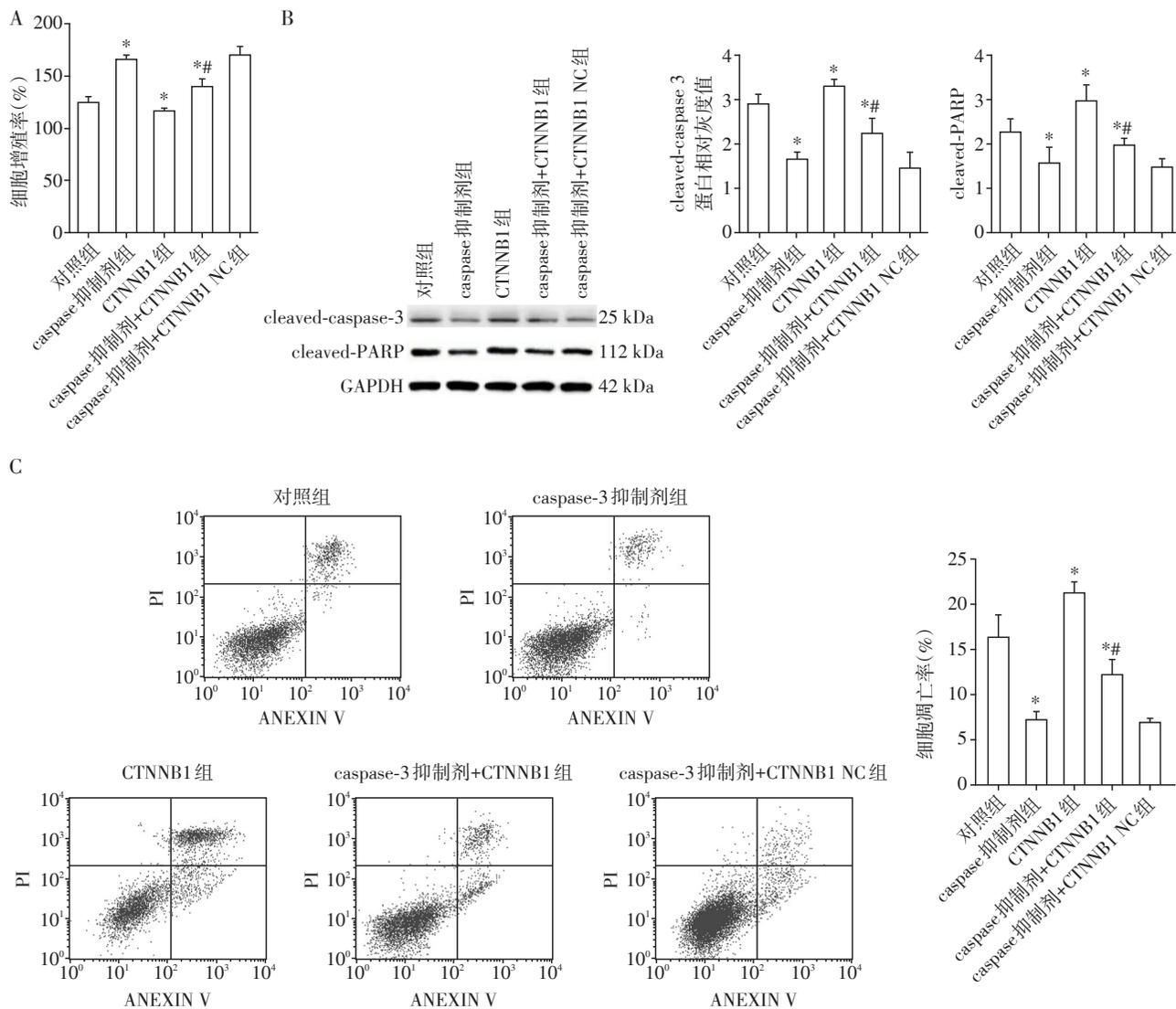
$2.45)\%$ 、 $(7.21 \pm 0.98)\%$ 、 $(22.24 \pm 1.21)\%$ 、 $(12.17 \pm 1.67)\%$ 和 $(6.90 \pm 0.48)\%$ 。caspase-3抑制剂组凋亡率低于对照组($P < 0.05$),CTNNB1组凋亡率高于对照组($P < 0.05$);caspase-3抑制剂+CTNNB1组凋亡率高于caspase-3组($P < 0.05$),但低于对照组($P < 0.05$),图4B、C)。

2.6 CTNNB1对caspase-3抑制剂处理的氧化应激状态HK-2细胞ROS的影响

由图5可见,对照组、caspase-3抑制剂组、CTNNB1组、caspase-3抑制剂+CTNNB1组和caspase-3抑制剂+CTNNB1 NC组细胞中ROS平均荧光强度分别为 $1\ 615 \pm 112$ 、 $1\ 212 \pm 69$ 、 $1\ 798 \pm 85$ 、 $1\ 476 \pm 101$ 和 $1\ 179 \pm 76$ 。caspase-3抑制剂组ROS水平较对照组降低($P < 0.05$),CTNNB1组ROS水平较对照组升高($P < 0.05$),caspase-3抑制剂+CTNNB1组细胞中ROS水平较caspase-3抑制剂组高($P < 0.05$),但仍高于对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

我们在对照组和caspase-3抑制剂组中共筛选到185个DEG,可见无论在caspase-3抑制剂处理还是氧化应激状态下,肾小管上皮细胞内时刻都在发生着大量复杂的生物学事件。KEGG分析主要富集到的有RAC1信号通路、RNA代谢通路、RhoA信号通路、糖尿病途径和细胞蛋白的凋亡裂解通路。CTNNB1基因的编码产物—— β -连环蛋



A: 细胞增殖; B: cleaved-caspase-3 和 cleaved-PARP 蛋白表达; C: 细胞凋亡; 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 caspase-3 抑制剂组相比, # $P < 0.05$ ($n=5$)。

图4 各组细胞增殖和凋亡检测

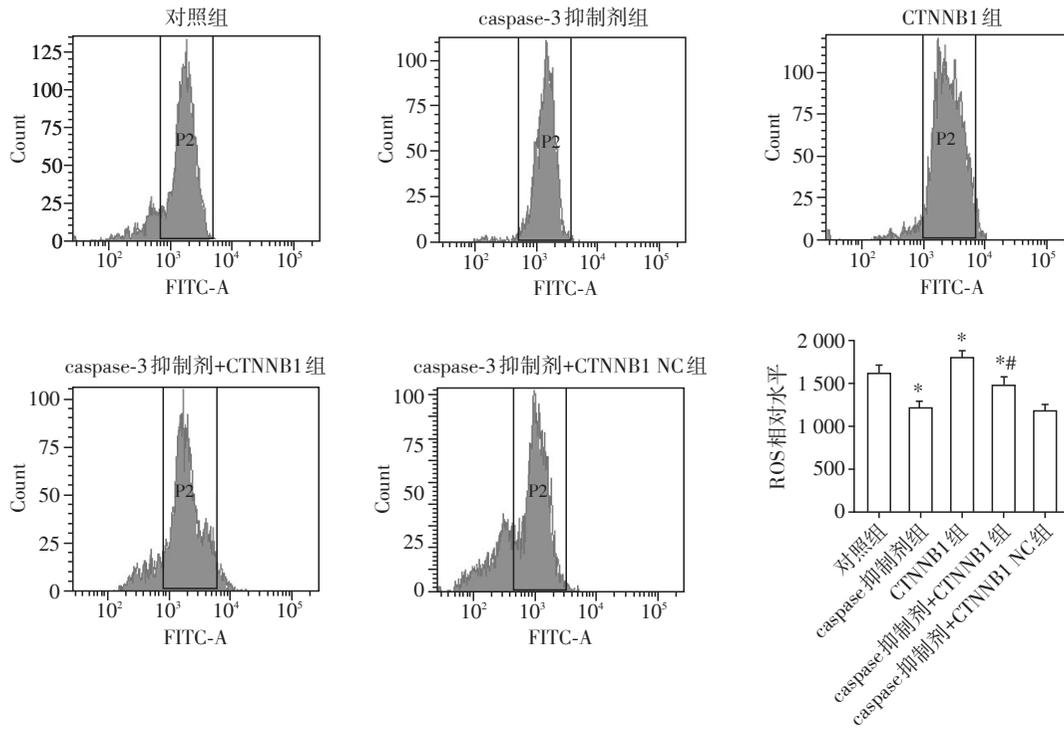
Figure 4 Detection of proliferation and apoptosis in each group

白(β -catenin)是经典 Wnt 信号通路的核心组分, Wnt/ β -catenin 通路是一条非常重要的信号通路,在人类诸多生理活动和病理过程中都有广泛的调节作用。在结肠癌中,活化 caspase-3 能特异性降解 β -catenin,抑制 Wnt/ β -catenin 通路诱导的细胞凋亡^[11];而抑制 Wnt/ β -catenin 通路信号能加速 H_2O_2 诱导的成纤维细胞凋亡^[12]。

H_2O_2 诱导 ROS 依赖的信号转导能抑制 β -catenin 下游转录因子的活性^[13]。在恶性肿瘤中存在 β -catenin 信号转导和 ROS 积累的复杂相互作用。可见, β -catenin 和氧化应激存在关联。 β -catenin 参与了 RAC1 信号通路和 RhoA 信号通路,过度激活的 RAC1 参与了氧化应激和炎症反应过程,而 RhoA

通路也能激活 Nox4,通过产生 ROS 产物引起氧化应激,都从侧面印证了 β -catenin 与氧化应激的关系。 Wnt/ β -catenin 通路肾脏疾病的关系已经有大量研究, Zhou 等^[14]报道 Wnt/ β -catenin 能将氧化应激与肾足细胞损伤和蛋白尿联系起来。考虑到 Wnt/ β -catenin 通路在人类疾病中的重要作用、 β -catenin 与氧化应激的关系,以及芯片和定量 PCR 结果都证实了其在 H_2O_2 处理的 HK-2 细胞中异常表达,提示 β -catenin 可能参与氧化应激状态下肾小管细胞损伤,值得更多研究。

我们关注的重点是 β -catenin 对 ROS 和线粒体途径的细胞凋亡之间的调控。用 Ac-DEVD-CHO 联合 H_2O_2 处理 HK-2 细胞,细胞中 ROS 水平较对照



与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 caspase-3 抑制剂组相比, # $P < 0.05$ ($n=5$)。

图5 各组细胞ROS检测

Figure 5 Detection of ROS in each group

组降低,提示 H_2O_2 诱导的氧化应激具有一定的 caspase-3 依赖性,抑制 caspase-3 能部分减弱 HK-2 细胞的氧化应激损伤。细胞生物行为检测显示, caspase-3 抑制剂联合 H_2O_2 处理的 HK-2 细胞增殖率较对照组升高,凋亡率降低,且凋亡蛋白水平降低,说明氧化应激对肾小管细胞增殖和凋亡的作用具有 caspase-3 依赖性, caspase-3 抑制剂能逆转氧化应激对肾小管细胞的增殖和凋亡的效应。用 CTNNB1 表达载体转染细胞后, caspase-3 抑制剂+CTNNB1 组细胞增殖率较 caspase-3 抑制剂组低 ($P < 0.05$),说明 β -catenin 对 caspase-3 抑制剂促进氧化应激状态下肾小管上皮细胞增殖有抑制作用;而细胞凋亡率高于 caspase-3 抑制剂组, β -catenin 能部分抵消 caspase-3 抑制剂对氧化应激状态下肾小管上皮细胞凋亡的抑制作用。 caspase-3 抑制剂+CTNNB1 组细胞的 ROS 水平较 caspase-3 抑制剂组高 ($P < 0.05$),表明 caspase-3 抑制剂能降低 H_2O_2 诱导的 HK-2 细胞氧化应激水平,而 β -catenin 对这一效应有一定逆转作用。我们也观察到, caspase-3 抑制剂+CTNNB1 组细胞的增殖能力减弱,而凋亡增强,但与对照组相比仍有差异,提示除了 β -catenin, caspase-3 途径对氧化应激状态下肾小管上皮的效应可能还有其他作用途径。

除了 CTNNB1,我们还筛选到了其他一些基因可能与 caspase-3 途径调控 ROS,参与氧化应激所致肾小管上皮损伤有关。线粒体分裂蛋白 1 (mitochondrial fission protein 1, FIS1) 主要调控线粒体融合蛋白和视神经萎缩蛋白。 FIS1 主要定位在细胞线粒体外膜,能促进线粒体分裂,抑制线粒体融合,造成动力学平衡破坏,形成小球或小泡状的异常形态结构,线粒体嵴不清或消失,导致细胞的线粒体受损;呼吸链断裂会导致钙离子内流和氧自由基形成,加重氧化应激损伤^[15]。降低大鼠肺泡巨噬细胞中线粒体的 FIS1 水平,能抑制内毒素所致的肺泡内巨噬细胞凋亡,减轻氧化应激和炎症反应^[16]。虽然目前尚未见 FIS1 在肾小管上皮氧化应激的研究,但以上结果都提示 FIS1 与氧化应激状态下的肾小管上皮细胞损伤有关。EZR 基因编码埃兹蛋白 Ezrin,主要参与细胞骨架重组、细胞内信号转导,并与细胞存活、黏附、迁移等有关,在肿瘤发生发展和转移中有重要作用^[17]。目前尚未见 EZR 与氧化应激或肾小管损伤的相关报道。有研究报道,糖体蛋白 L5 (ribosomal protein L5, RPL5) 突变与先天性纯红细胞再生障碍性贫血有关,并会增加癌症的发病风险^[18]。小核核糖核蛋白肽 B 和 B1 (small nuclear

ribonucleoprotein polypeptides B and B1, SNRPB),负责参与对前mRNA的选择性剪接,通过剪接复合体的核心成分,调控细胞的增殖、凋亡和活性^[19]。选择性剪接能参与基因调控、细胞分化和内环境平衡等,导致肌萎缩等的发生,其与肿瘤的关系受到较多关注,但是RPL5和SNRPB在脓毒症肾损伤或与氧化应激之间的关系均未见报道。微管相关蛋白4(microtubule-associated protein 4, MAP4)的C-末端的微管结合域磷酸化对细胞周期有重要的调控作用^[20]。近来一些研究发现,MAP4与肿瘤的过程有关^[21-22],但与肾小管氧化应激损伤无报道。转录因子CCAAT增强结合蛋白 β (CCAAT enhancer-binding protein β , CEBPB)在多种人类实体肿瘤和血液肿瘤中表达异常,与肿瘤的发生发展关系密切^[23-25]。CEBPB主要通过胞外信号分子产生应答,进而实现对靶基因水平的调节,是一种对细胞增殖、分化、凋亡、周期等过程有调控作用的转录因子;还参与炎症、能量代谢等过程^[26-27]。但目前也未见与氧化应激的报道。这些新的差异基因的筛选和鉴定为后续深入探讨caspase-3调控ROS损伤肾小管上皮细胞的机制提供目标靶点。

综合以上,本研究通过基因芯片,筛选到185个在H₂O₂处理的肾小管上皮细胞和caspase-3抑制剂结合H₂O₂处理的肾小管上皮细胞中差异表达的基因,对显著性排名前10的基因进行定量PCR验证,证实了FIS1、EZR、COL7A1、RPL5、MAP4、CEBPB、CTNNB1和SNRPB mRNA表达水平与芯片结果一致。利用CTNNB1表达载体转染细胞,结合细胞生物学行为分析,证明了氧化应激对肾小管细胞的增殖和凋亡的作用具有caspase-3依赖性,而CTNNB1可能参与了caspase-3依赖的氧化应激对肾小管上皮细胞的损伤作用。

[参考文献]

[1] 曾小娜,尹连红,许丽娜. 脓毒症性急性肾损伤发病机制[J]. 生理科学进展,2020,51(2):122-126

[2] XU W, MAO Z, ZHAO B, et al. Vitamin C attenuates vancomycin induced nephrotoxicity through the reduction of oxidative stress and inflammation in HK-2 cells[J]. Ann Palliat Med, 2021, 10(2):1748-1754

[3] HUANG J, HUANG A, POPLAWSKI A, et al. PAK2 activated by Cdc42 and caspase 3 mediates different cellular responses to oxidative stress-induced apoptosis[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020, 1867(4):118645

[4] LI D, NI S, MIAO K S, et al. PI3K/Akt and caspase path-

ways mediate oxidative stress-induced chondrocyte apoptosis[J]. Cell Stress Chaperones, 2019, 24(1):195-202

[5] 孙林春,刘建璟,张利. Caspase依赖的氧化应激对脓毒症肾小管上皮细胞损伤的作用及机制[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2022,42(1):23-29

[6] KALEEM S, SIDDIQUI S, SIDDIQUI H H, et al. Eupalitin induces apoptosis in prostate carcinoma cells through ROS generation and increase of caspase-3 activity[J]. Cell Biol Int, 2016, 40(2):196-203

[7] DIBOUN I, WERNISCH L, ORENCO C A, et al. Microarray analysis after RNA amplification can detect pronounced differences in gene expression using limma[J]. BMC Genomics, 2006, 7:252

[8] HUANG DA W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. Nat Protoc, 2009, 4(1):44-57

[9] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. Nat Genet, 2000, 25(1):25-29

[10] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1):27-30

[11] BECER E, HANOĞLU D Y, KABADAYI H, et al. The effect of Colchicum pusillum in human colon cancer cells via Wnt/ β -catenin pathway[J]. Gene, 2019, 686:213-219

[12] KOOK S H, LEE D, CHO E S, et al. Activation of canonical Wnt/ β -catenin signaling inhibits H₂O₂-induced decreases in proliferation and differentiation of human periodontal ligament fibroblasts[J]. Mol Cell Biochem Int J Chem Biol, 2016, 411(1/2):83-94

[13] TIAN L, SHAO W, IP W, et al. The developmental Wnt signaling pathway effector β -catenin/TCF mediates hepatic functions of the sex hormone estradiol in regulating lipid metabolism[J]. PLoS Biol, 2019, 17(10):e3000444

[14] ZHOU L, CHEN X, LU M, et al. Wnt/ β -catenin links oxidative stress to podocyte injury and proteinuria[J]. Kidney Int, 2019, 95(4):830-845

[15] WANG H H, WU Y J, TSENG Y M, et al. Mitochondrial fission protein 1 up-regulation ameliorates senescence-related endothelial dysfunction of human endothelial progenitor cells[J]. Angiogenesis, 2019, 22(4):569-582

[16] 康元元,史佳,余剑波,等. CORM-2通过p38MAPK信号通路对脂多糖刺激大鼠肺巨噬细胞中线粒体分裂蛋白Fis1的影响[J]. 中华急诊医学杂志,2017,26(4):401-404

[17] AHMED S S, LIM J C T, THIKE A A, et al. Epithelial-

mesenchymal transition and cancer stem cell interactions in breast phyllodes tumours: immunohistochemical evaluation of EZH2, EZR, HMGA2, CD24 and CD44 in correlation with outcome analysis [J]. *J Clin Pathol*, 2022, 75 (5):316-323

[18] YU L, LEMAY P, LUDLOW A, et al. A new murine Rpl5 (uL18) mutation provides a unique model of variably penetrant Diamond-Blackfan anemia[J]. *Blood Adv*, 2021, 5 (20):4167-4178

[19] LIU N, WU Z, CHEN A, et al. SNRPB promotes the tumorigenic potential of NSCLC in part by regulating RAB26[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9):667

[20] YANG H, MAO W, RODRIGUEZ-AGUAYO C, et al. Paclitaxel sensitivity of ovarian cancer can be enhanced by knocking down pairs of kinases that regulate MAP4 phosphorylation and microtubule stability [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(20):5072-5084

[21] YANG H, MAO W, RODRIGUEZ-AGUAYO C, et al. Correction: paclitaxel sensitivity of ovarian cancer can be enhanced by knocking down pairs of kinases that regulate MAP4 phosphorylation and microtubule stability [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(18):5050

[22] ZHANG S, DEEN S, STORR S J, et al. Expression of Syk and MAP4 proteins in ovarian cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(4):909-919

[23] ZHOU Q, SUN X, PASQUIER N, et al. Cell-penetrating CEBPB and CEBPD leucine zipper decoys as broadly acting anti-cancer agents [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13 (10):2504

[24] SUN X, JEFFERSON P, ZHOU Q, et al. Dominant-negative ATF5 compromises cancer cell survival by targeting CEBPB and CEBPD [J]. *Mol Cancer Res*, 2020, 18(2):216-228

[25] WANG F, GAO Y, TANG L, et al. A novel PAK4-CEBPB-CLDN4 axis involving in breast cancer cell migration and invasion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 511 (2):404-408

[26] LU J, CHEN W, LIU H, et al. Transcription factor CEBPB inhibits the proliferation of osteosarcoma by regulating downstream target gene CLEC5A [J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(9):e22985

[27] GUERZONI C, BARDINI M, MARIANI S A, et al. Inducible activation of CEBPB, a gene negatively regulated by BCR/ABL, inhibits proliferation and promotes differentiation of BCR/ABL-expressing cells [J]. *Blood*, 2006, 107 (10):4080-4089

[收稿日期] 2022-04-11
(责任编辑:蒋 莉)

