

· 基础研究 ·

转录因子 AP2A 对肾病相关基因 Gas6 的调控研究

颜 凤,周国平*

南京医科大学第一附属医院儿科,江苏 南京 210009

[摘要] 目的:探究肾脏病相关生长抑制特异性基因6(growth arrest specific 6, Gas6)与肾脏疾病、凋亡的相关关系。研究转录因子 AP-2a(transcription factor AP-2 alpha, TFAP2A)对基因 Gas6 的影响及其机制。方法:构建阿霉素肾病细胞模型,检测该模型中 Gas6 的表达变化;用 Gas6 蛋白刺激 MPC5 细胞,检测肾病相关指标的表达变化。用 Gas6 蛋白干预 HEK-293T 细胞,检测细胞凋亡率或凋亡相关指标的表达变化。构建 Gas6 启动子片段的萤光素酶基因报告重组质粒,检测 Gas6 基因启动子片段在 HEK-293T 细胞中的活性,预测 Gas6 启动子区的功能性转录因子结合位点并验证,在 HEK-293T 细胞中敲低或过表达 TFAP2A 后检测 Gas6 启动子片段活性、mRNA 表达、蛋白表达的变化。结果:Gas6 在阿霉素肾病细胞模型中高表达,且过量的 Gas6 可诱导 MPC5 细胞中肾病相关指标 Nephrlin 和 Podocin 与阿霉素肾病细胞模型趋势相同。与对照组相比, Gas6 蛋白组的细胞凋亡明显减少。成功构建有活性的 Gas6 基因启动子片段萤光素酶基因报告重组质粒,且在此片段内含有 TFAP2A 的结合位点。TFAP2A 可在启动子、mRNA 及蛋白水平对 Gas6 正向调控。结论: Gas6 对肾病综合征的发生有促进作用, Gas6 在 HEK-293T 细胞中有抗凋亡作用, TFAP2A 对 Gas6 有正向转录调控作用。

[关键词] Gas6; TFAP2A; 启动子; 转录调控; 肾病综合征; 凋亡

[中图分类号] R692

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)08-1085-09

doi: 10.7655/NYDXBNS20230807

The transcription factor AP2A regulating human nephrosis-related gene Gas6

YAN Feng, ZHOU Guoping*

Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China

[Abstract] **Objective:** To explore the correlation between nephrosis-related growth arrest specific 6(Gas6) and nephrotic syndrome and apoptosis. The effect of AP-2 transcription factor a(TFAP2A) on Gas6 was investigated. **Methods:** The cell model of adriamycin nephropathy(AN) was constructed to detect the expression of Gas6, and MPC5 cells were stimulated with Gas6 protein to measure the expression of nephropathy related indicators. HEK-293T cells were intervened with Gas6 protein to measure apoptosis rate or the expression of apoptosis-related indicators. The luciferase gene reporter recombinant plasmid of Gas6 promoter was constructed to measure the activity of Gas6 promoter in HEK-293T cells. And the potential transcriptional binding sites were predicted and verified. The effects of knockdown or overexpression of TFAP2A on Gas6 gene expression were measured at the promoter, mRNA, and protein levels. **Results:** Gas6 was highly expressed in AN cell model, and excessive Gas6 may induce the nephropathy-related indicators in MPC5 cells the same trend as that of AN cell model. Apoptosis was significantly reduced in the Gas6 protein group compared to control in HEK-293T cells. The active luciferase reporter plasmid of human Gas6 promoter fragment was successfully constructed, and the binding sites of TFAP2A were included. TFAP2A positively regulated Gas6 at the promoter, mRNA, and protein levels. **Conclusion:** Gas6 promotes the development of nephrotic syndrome. Gas6 is antiapoptotic in HEK-293T cells. TFAP2A positively promotes the expression of human nephrosis-related gene Gas6.

[Key words] Gas6; TFAP2A; promoter; transcriptional regulation; nephrotic syndrome; apoptosis

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(08): 1085-1093]

[基金项目] 国家自然科学基金(82270068)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guopzhou@126.com

肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)是常见的小儿肾脏疾病,指蛋白尿过多,伴有低白蛋白血症、水肿和高脂血症^[1]。儿童NS的病程反复,可并发感

染、静脉血栓栓塞和急性肾损伤。由于病因异质性,目前儿童NS没有一种万全的治疗方法。虽然特发性NS患儿通过治疗病情可获得高度缓解,但接受肾活检的激素抵抗型肾病综合征(steroid-resistant nephrotic syndrome, SRNS)患儿中有12%~15%对免疫抑制治疗无反应,其中约50%将进展为终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)^[2]。因此,非常需要阐明NS进展的潜在分子机制,并为NS的治疗开辟新的道路。

生长抑制特异性基因6(growth arrest specific 6, Gas6)编码一种维生素K依赖的分泌型蛋白。Gas6蛋白是一种与受体酪氨酸激酶Tyr03、Axl和Mer结合的细胞因子。大量研究表明Gas6与Axl相互作用可促进癌症进展^[3]。Gas6还可促进毛囊干细胞生长^[4],增强非小细胞肺癌的增殖^[5]。通过与TAM(Tyr03-Axl-Mer)受体相互作用激活下游信号通路(如PLC γ 、PI3K、ERK和NF- κ B)来调节细胞存活、增殖、迁移、分化、黏附和凋亡^[6]。Gas6在IgA肾病和狼疮性肾炎患者的肾脏中的表达比在健康者中明显增多,且Gas6激活Axl受体可促进肾小球损伤^[7-9],而肾小球损伤可以导致NS。

目前对Gas6的研究主要集中在其与下游信号通路的相互作用上,对于Gas6自身的转录调控机制研究较少。本研究通过构建阿霉素肾病细胞模型来探究Gas6与NS的相关关系,通过Gas6细胞因子直接作用于HEK-293T细胞来探究Gas6对HEK-293T细胞凋亡的影响,通过构建人Gas6启动子萤光素酶报告质粒,并将其转染至HEK-293T细胞,分析Gas6启动子的萤光素酶活性,同时敲低和过表达转录因子AP-2a(transcription factor AP-2 alpha, TFAP2A),应用双萤光素酶基因报告系统、qRT-PCR和蛋白质免疫印迹实验分别检测Gas6启动子活性、mRNA表达量、蛋白表达量是否改变。本研究首次探索Gas6对NS的影响,为阐明NS的分子机制奠定了一定基础,同时为进一步研究人Gas6基因的转录调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人胚肾细胞(HEK-293T)、小鼠肾足细胞(MPC5)、pRL-TK(海肾萤光素酶报告质粒)、pGL3-basic质粒为本实验室保存;Gas6基因启动子萤光素酶报告质粒pGas6-1450、结合位点突变质粒pGas6-1450 mut、TFAP2A小干扰RNA siTFAP2A及其阴性对照siNC、TFAP2A过表达质粒pENTER-TFAP2A及

空载体pENTER、引物合成(南京擎科生物科技有限公司);DMEM培养基(Gibco公司,美国);胎牛血清、LB肉汤(Sigma公司,美国);青链霉素双抗、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、Western blot一抗稀释液、Western blot二抗稀释液、染色质免疫沉淀检测试剂盒(ChIP Assay Kit)(上海碧云天);去内毒素小量质粒提取试剂盒、RNA提取试剂盒(Omega公司,美国);逆转录酶、SYBR Green qPCR Master Mix(TaKaRa公司,日本);质粒转染试剂Lipofectamine 3000脂质体(Invitrogen公司,美国);双萤光素酶报告基因检测试剂盒(Promega公司,美国);琼脂糖粉(Biowest公司,西班牙);总蛋白提取试剂盒(南京凯基);TFAP2A一抗(Abcam公司,美国);辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗、Gas6、NPHS2、NPHS1、GAPDH一抗(Proteintech公司,中国);Bax、BCL-2一抗(上海Abmart公司);DNA Marker(TaKaRa公司,日本);蛋白Marker(Thermo Fisher Scientific公司,美国);全DNA提取试剂盒(北京天根生化);GelRed核酸染料(南京诺唯赞);LB培养板粉(Boykyo公司,日本);Gas6细胞因子(MCE公司,美国);流式细胞仪(BD Biosciences公司,美国);紫外光栅分光光度计(Eppendorf公司,德国);TD 20/20n single tube luminometer(武汉盖尔德纳科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 生信分析

用GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>和<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/>)预测NS病理表型之一的肾小球硬化的高表达及低表达基因聚类分析结果;用JASPAR数据库(<https://jaspar.genereg.net/>)和PROMO数据库(http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3/)预测Gas6启动子的转录因子结合位点;用GEPIA数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)预测Gas6和TFAP2A在肾皮质中的相关关系。

1.2.2 细胞培养

HEK-293T细胞和MPC5细胞在含有10%胎牛血清和1%青链霉素双抗的DMEM高糖培养基中培养,并置于37℃、5%CO₂培养箱,2~3 d传代1次。实验操作均采用对数期生长细胞。

1.2.3 流式细胞术

流式细胞术检测经Gas6细胞因子刺激24 h后的HEK-293T细胞的凋亡百分率。分别用等体积生理盐水、10 ng/mL Gas6细胞因子、100 ng/mL Gas6细

胞因子刺激 HEK-293T 细胞 24 h,用 PBS 洗涤细胞 2 次,收集细胞,用 100 μ L 1 \times Binding Buffer 重悬,加入 Annexin V-FITC 和 PI staining solution 各 2.5 μ L,混匀,室温避光孵育 10 min,加入 300 μ L 1 \times Binding Buffer,混匀,使用流式细胞仪检测。

1.2.4 染色质免疫沉淀(ChIP)

使用 ChIP Assay Kit 试剂盒,根据其说明书进行实验及分析。将 HEK-293T 细胞在 1% 甲醛中固定 10 min,沉淀细胞并充分裂解,超声剪切基因组 DNA 使其断裂成 200~1 000 bp 大小(去除交联,纯化 DNA,进行琼脂糖凝胶电泳观察超声处理效果)。样品特异性免疫沉淀后去除交联并纯化,选择引物进行 PCR 或 qRT-PCR 并进行琼脂糖凝胶电泳(目的 PCR 产物碱基编号:-418~-283,上游引物:5'-AAACCGTCGCATTTCACTCG-3',下游引物:5'-CCCCGAATCTACTGCATCCT-3';Control Primers:上游引物:5'-TACTAGCGGTTTTACGGGCG-3',下游引物:5'-TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA-3')。

1.2.5 人 Gas6 启动子及转录因子结合位点突变的启动子的荧光素酶报告基因重组质粒的构建与鉴定

人 Gas6 基因(GenBank 编号:NC_000013.11)序列从美国国立生物技术中心数据库 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)找到起始密码子上游 1 400 bp 片段、下游 50 bp 片段序列。将人 Gas6 启动子的转录起始位点(TSS)设置为+1。将人 Gas6 启动子片段-1 400~+50 nt 的序列插入 pGL3-Basic 载体中,命名为 pGas6-1450 并测序,使用 NCBI 的 blast(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)功能鉴定该质粒的正确性。以 pGas6-1450 为模板构建 TFAP2A 结合位点突变的启动子质粒,分别命名为 pGas6-1450 mut1、pGas6-1450 mut2、pGas6-1450 mut1+2(下文合称为 pGas6-1450 mut)并测序核对。具体突变点见图 1。

1.2.6 双荧光素酶报告基因实验

将 HEK-293T 细胞接种到 96 孔板中(1 \times 10⁴个/孔)。24 h 后,将 100 ng pGas6-1450 或 pGas6-1450 mut 或

原始序列-397 5'-TGGCCCCAGTGGG.....CAACCACCGCCTG-3' -152
突变序列-397 5'-TGGTCCCCAGTGGG.....CAACCACCGTCTG-3' -152
mut1 mut2

图 1 突变序列

Figure 1 The mutated sequences

pGL3-basic 质粒与 4 ng pRL-TK 质粒共同转染到细胞中,24 h 后检测 pGas6-1450 或 pGas6-1450 mut 的启动子活性;将 100 ng pGas6-1450 或 pGas6-1450 mut 和 siTFAP2A(50 nmol/L)或 siNC(50 nmol/L)与 4 ng pRL-TK 质粒共同转染到细胞中,24 h 后检测敲低 TFAP2A 对 pGas6-1450 或 pGas6-1450 mut 启动子活性的影响;同时,将 100 ng pGas6-1450 或 pGas6-1450 mut 和 100 ng pENTER-TFAP2A 或 pENTER 与 4 ng pRL-TK 质粒共同转染到细胞中,24 h 后检测过表达 TFAP2A 对 pGas6-1450 或 pGas6-1450 mut 启动子活性的影响。检测方法采用双荧光素酶报告基因系统,使用 TD 20/20 荧光光度计,按照双荧光素酶检测试剂盒步骤分别检测 pGL3-basic、pGas6-1450、pGas6-1450 mut 以及敲低和过表达 TFAP2A 后 pGas6-1450 和 pGas6-1450 mut 的启动子活性,并将其标准化为 pRL-TK 的活性。结果至少重复 3 次。具体小干扰 RNA 序列见表 1。

1.2.7 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

将 MPC5 细胞或 HEK-293T 细胞接种到 12 孔板中(1 \times 10⁵个/孔)。24 h 后用阿霉素(adriamycin,

表 1 小干扰 RNA 序列

Table 1 Sequences of siRNA

siRNA	序列(5'→3')
siTFAP2A	正义链:CCUGCUCACAUCACUAGUATT
	反义链:UACUAGUGAUGUGAGCAGGTT
siNC	正义链:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	反义链:ACGUGACACGUUCGGAGAATT

ADR)(0.2 μ g/mL)或等体积生理盐水(normal saline, NS)刺激 MPC5 细胞,检测肾病相关指标 mRNA 表达量的变化以确定阿霉素细胞模型构建成功与否,同时检测 Gas6 mRNA 表达量的变化;用 Gas6 细胞因子(100 ng/mL)或等体积 NS 刺激 MPC5 细胞后检测肾病相关指标表达量的变化;用 Gas6 细胞因子(100 ng/mL)刺激 HEK-293T 细胞检测凋亡相关指标表达量的变化;将小干扰 RNA 或过表达质粒或相应的对照试剂转染到 HEK-293T 细胞中检测敲低或过表达 TFAP2A 对 Gas6 mRNA 表达量的影响。24 h 后使用 Omega RNA 提取试剂盒从细胞系中提取总 RNA,并将其逆转录为第 1 链 cDNA,进行 qRT-PCR 实验。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C

30 s, 72 °C 30 s(三步骤循环40次), 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。所有样品均以GAPDH作为内参进行3次以上qRT-PCR实验,并以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算mRNA的相对表达水平。相关指标的引物序列见表2。

表2 qRT-PCR引物序列
Table 2 Sequences of qRT-PCR primers

名称	序列(5'→3')
TFAP2A	上游引物:CGCCGATCCATGAAAATGCT 下游引物:TAAGGATCTTGCGACTGGGG
Gas6	上游引物:TGGCATGTGGCAGACAATCT 下游引物:ATACCTCCCACGGTCAGGTT
GAPDH	上游引物:GAGTCAACGGATTTGGTCGT 下游引物:TTGATTTTGGAGGGATCTCG
Bax	上游引物:CCGTTCTGATTCTGCACCCT 下游引物:GGGGTTGATACCACGATCCC
BCL-2	上游引物:CAACTGGCACACAATGGG 下游引物:GGCCTGATTTGAGAGTGCCT
NPHS1	上游引物:GTGAGGAGAGACCCTTCCCT 下游引物:TAGCCAGGAAGGATGGTTGC
NPHS2	上游引物:AAAGACAAGCCAAAAGTGGCG 下游引物:TCTGCCAGTGCCTAATGAA

1.2.8 蛋白免疫印迹(Western blot)

在6孔板(2×10^5 个/孔)中进行与上述提取总RNA前相同的实验,48 h后使用总蛋白提取试剂盒从细胞系中提取总蛋白,加入5×上样缓冲液混匀并100 °C煮沸8~10 min。制备10% SDS-PAGE凝胶,进行电泳,电泳条件:90 V 30 min, 120 V 40 min。电泳完成后用快速转膜液常温恒流400 mA, 30 min将蛋白转至PVDF膜,室温封闭2 h后4 °C孵育一抗过夜(12~16 h),TBST洗膜3次(30 min/次),室温孵育二抗2 h,再洗膜3次后曝光显影。以GAPDH作为内参,实验独立重复3次以上。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism6及SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生信分析

用GEO数据库分析NS病理表型之一的肾小球硬化的高表达(红色)及低表达(绿色)基因, Gas6属于高表达基因(图2);用JASPAR数据库和PROMO数据库预测TFAP2A在Gas6启动子上的结合位点并取交集,得到多个结合位点(以此设计突变位点);用GEPIA数据库分析Gas6和TFAP2A在肾皮质中的

相关关系,发现两者呈正相关($P < 0.01$,图3)。

2.2 Gas6与肾病综合征

为了进一步探究Gas6与NS的关系,用0.2 μg/mL的ADR作用于MPC5细胞以构建研究NS的典型细胞模型,即阿霉素肾病细胞模型,NPHS1(Nephrin)与NPHS2(Podocin)表达下调为模型构建成功的标志。通过qRT-PCR和Western blot检测到在该模型中Gas6表达升高($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$,图4);并且用Gas6细胞因子直接作用于MPC5细胞,通过qRT-PCR和Western blot检测到NS相关指标Nephrin与Podocin表达下调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图5)。

2.3 Gas6与凋亡

为了探究Gas6与凋亡的关系,用Gas6细胞因子作用于HEK-293T细胞,通过qRT-PCR和Western blot观察到Gas6可使凋亡相关指标BCL-2表达增多($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$,图6)、Bax表达减少($P < 0.05$ 和 $P < 0.001$,图6);通过流式细胞术可检测到实验组凋亡细胞较对照组明显减少($P < 0.001$,图6)。

2.4 TFAP2A是否与Gas6启动子结合

为了探究TFAP2A是否与Gas6启动子结合,用HEK-293T细胞进行了ChIP实验,结果表明TFAP2A抗体所沉淀蛋白可结合在Gas6的启动子区的扩增序列上,而对照抗体IgG不能沉淀结合该序列的蛋白,即TFAP2A在Gas6启动子区有结合位点($P < 0.05$,图7)。

2.5 检测人Gas6启动子、突变启动子活性以及TFAP2A对其活性的影响

将合成的pGas6-1450和pGas6-1450 mut重组质粒进行序列测定,结果提示与目标序列完全一致,说明人Gas6启动子及转录因子结合位点突变启动子的萤光素酶报告基因重组质粒构建成功。在HEK-293T细胞中进行双萤光素酶报告基因实验,检测到与pGL3-Basic组相比,pGas6-1450组的HEK-293T细胞的相对萤光素酶活性明显增加($P < 0.001$);与pGas6-1450组相比,pGas6-1450 mut组的HEK-293T细胞的相对萤光素酶活性有不同程度的降低($P < 0.05$ 和 $P < 0.001$);在转染了pGas6-1450质粒的HEK-293T细胞中,与siNC组相比,siTFAP2A组的HEK-293T细胞的相对萤光素酶活性明显降低($P < 0.01$),与pENTER组相比,pENTER-TFAP2A组的HEK-293T细胞的相对萤光素酶活性明显增加($P < 0.001$);在转染了pGas6-1450 mut质粒的HEK-293T细胞中,与对照组相比,siTFAP2A组的HEK-293T细胞的相对萤光素酶活性略微降低($P < 0.05$)

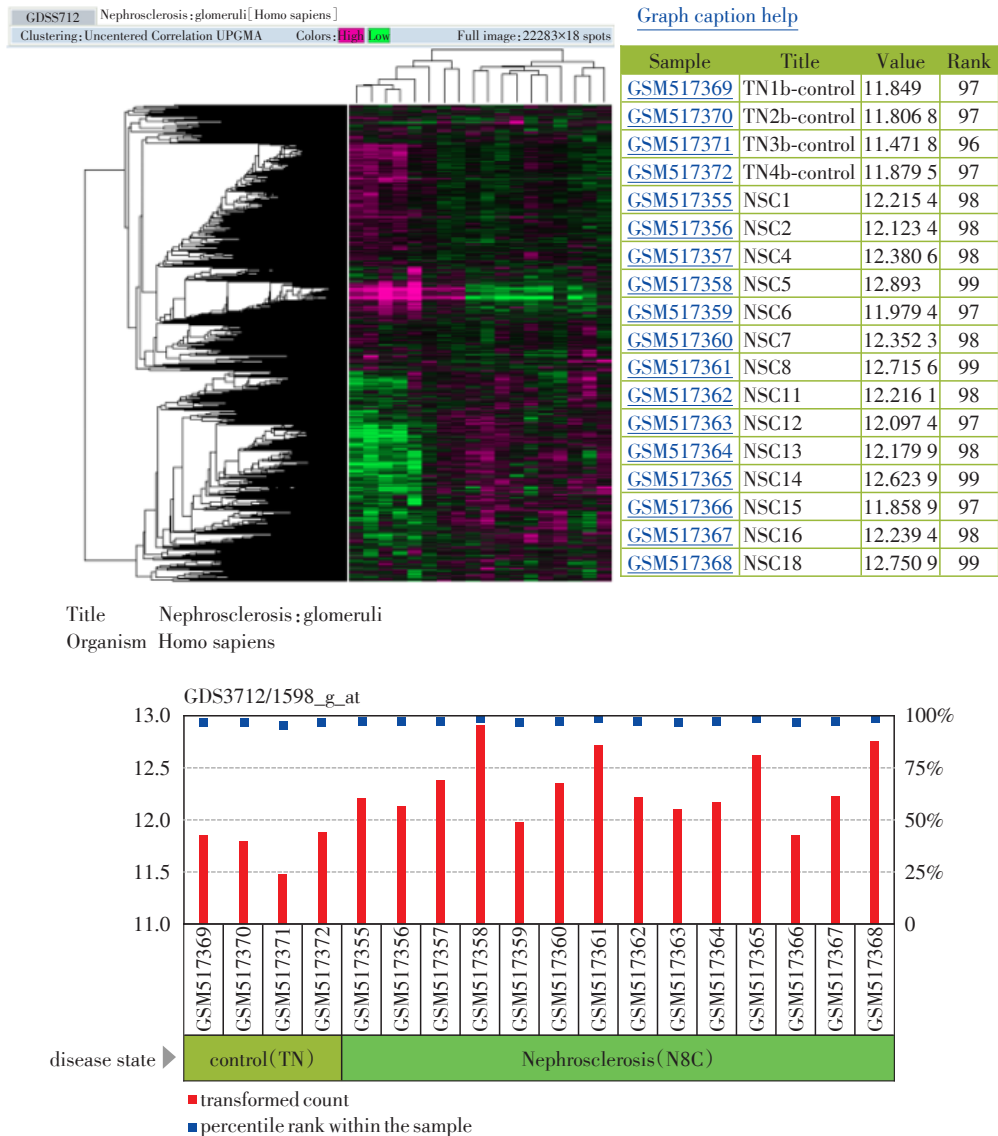


图2 Gas6在肾小球硬化中高表达

Figure 2 Gas6 is highly expressed in glomerulosclerosis

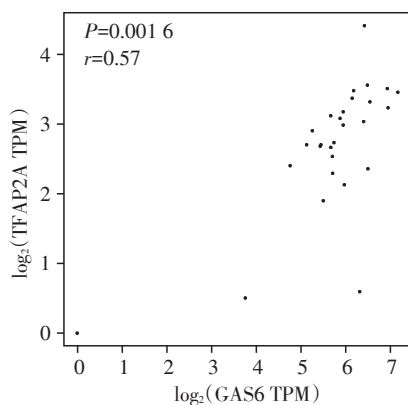


图3 TFAP2A与Gas6呈正相关

Figure 3 TFAP2A is positively correlated with Gas6

或无明显变化, pENTER-TFAP2A组的HEK-293T细胞的相对萤光素酶活性略微升高($P < 0.01$)或无明显

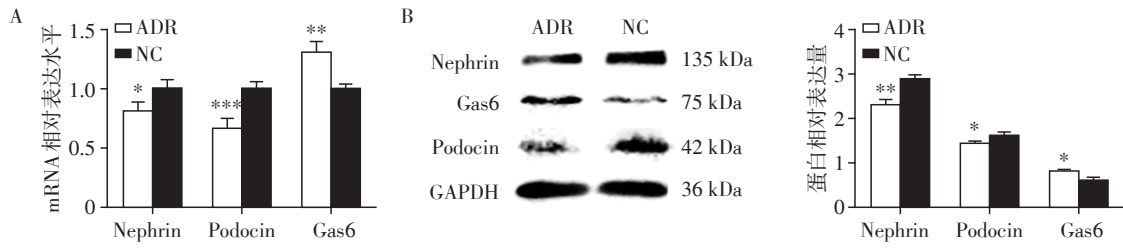
变化(图8)。

2.6 TFAP2A 对人 Gas6 mRNA 水平的调控

为在 mRNA 水平上探究 TFAP2A 对人 Gas6 的调控作用,在 HEK-293T 细胞中敲低或过表达 TFAP2A,通过 qRT-PCR 检测 TFAP2A 的敲低或过表达效率,同时检测在敲低或过表达 TFAP2A 后 Gas6 mRNA 的表达有无变化。与 siNC 组相比, siTFAP2A 组 TFAP2A 与 Gas6 的 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.001, P < 0.01$);与 pENTER 组相比, pENTER-TFAP2A 组 TFAP2A 与 Gas6 的 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01, P < 0.05$,图9)。

2.7 TFAP2A 对人 Gas6 蛋白水平的调控

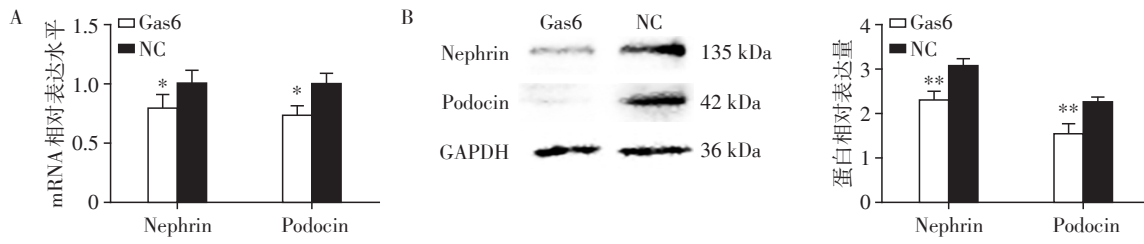
为进一步研究 TFAP2A 对 Gas6 基因的表达调控,在 HEK-293T 细胞中敲低或过表达 TFAP2A,



A:qRT-PCR;B:Western blot。与NC相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图4 阿霉素肾病细胞模型中Gas6表达升高

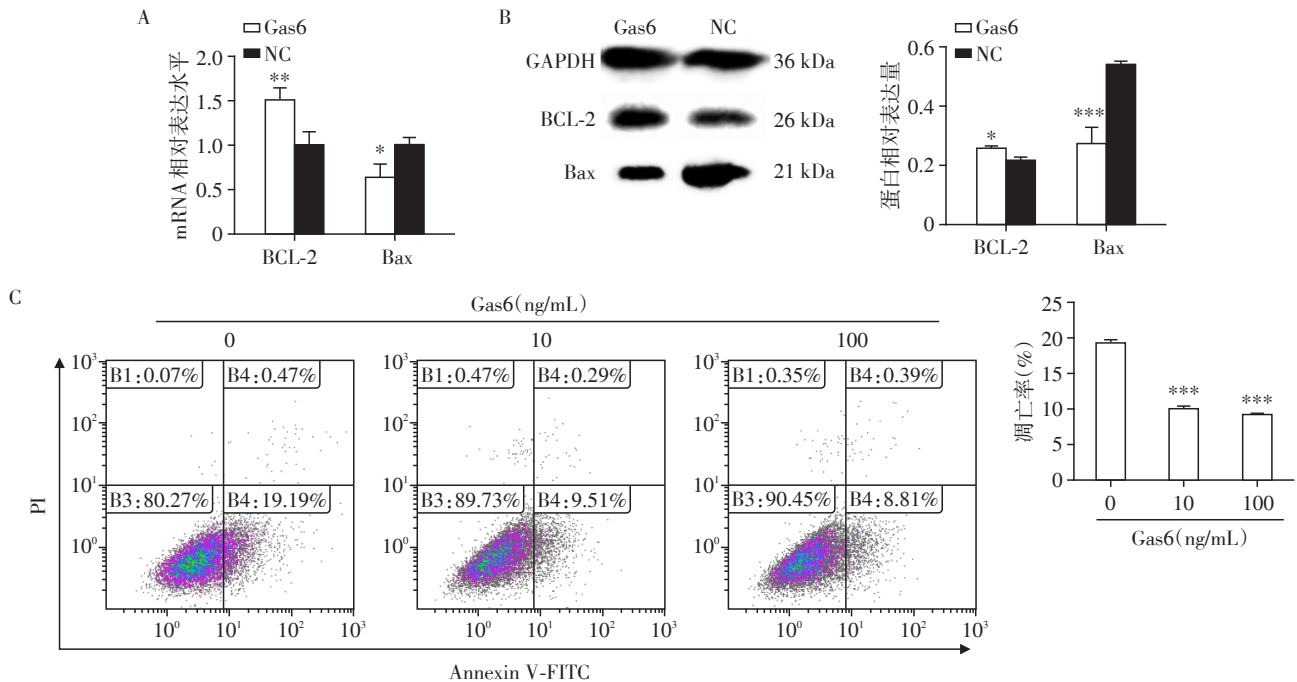
Figure 4 Gas6 is highly expressed in adriamycin nephropathy cell model



A:qRT-PCR;B:Western blot。与NC相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图5 Gas6刺激MPC5细胞

Figure 5 MPC5 cells were stimulated by Gas6



A:qRT-PCR;B:Western blot;C:流式细胞术。与NC或对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图6 在HEK-293T细胞中Gas6抗凋亡

Figure 6 Gas6 is antiapoptotic in HEK-293T cells

通过 Western blot 检测 TFAP2A 敲低或过表达效率,同时检测在敲低或过表达 TFAP2A 后 Gas6 蛋白的表达是否改变。与 siNC 组相比,siTFAP2A 组 TFAP2A 与 Gas6 的蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);与 pENTER 组相比,pENTER-TFAP2A 组 TFAP2A 与 Gas6 的蛋白表达水平明显升

高($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$,图 10)。

3 讨论

真核生物基因的表达调控是十分复杂的,涉及许多具有调控功能的核酸序列和蛋白质调控因子。转录因子、辅因子、染色质调节因子、RNA 聚合

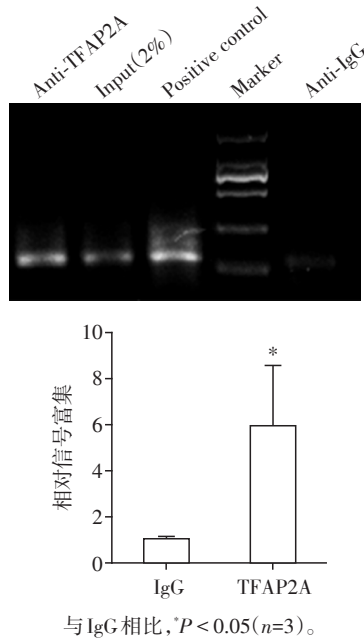


图7 TFAP2A 可与 Gas6 启动子结合

Figure 7 TFAP2A can bind to the promoter of Gas6

酶 II (Pol II) 和其他反式作用因子直接或间接地与转录调控元件(包括启动子、增强子和超级增强子)

结合,从而调节靶标基因的表达^[10]。研究转录因子对启动子的调控作用对进一步认识转录调控机制和疾病小分子机制的研究以及疾病的预防、治疗等都具有重要意义。然而,目前对 Gas6 基因的研究主要集中在其下游蛋白水平,对 Gas6 基因的启动子调控方面的研究却很少。本研究通过建立肾病细胞模型、用 Gas6 细胞因子作用于 MPC5 细胞,证明 Gas6 可促进 NS 的发展,并通过用 Gas6 细胞因子干预 HEK-293T 细胞证明 Gas6 在 HEK-293T 细胞中具有抗凋亡作用。本研究还通过 ChIP 实验证明转录因子 AP2A 可与 Gas6 启动子结合,同时构建人 Gas6 启动子萤光素酶基因报告质粒 pGas6-1450 并证明其是有启动转录活性的启动子,并对其预测得到的关键转录结合位点进行定点突变,明确 TFAP2A 在 Gas6 启动子上的关键性结合位点,同时通过敲低或过表达 TFAP2A 证明 TFAP2A 在启动子、mRNA 和蛋白水平对 Gas6 基因均有正向转录调控。

生长抑制特异性基因 (growth arrest - specific transcripts, GAS) 在进化过程中结构和功能高度保守,其家族成员众多,它们的基因编码产物在微丝

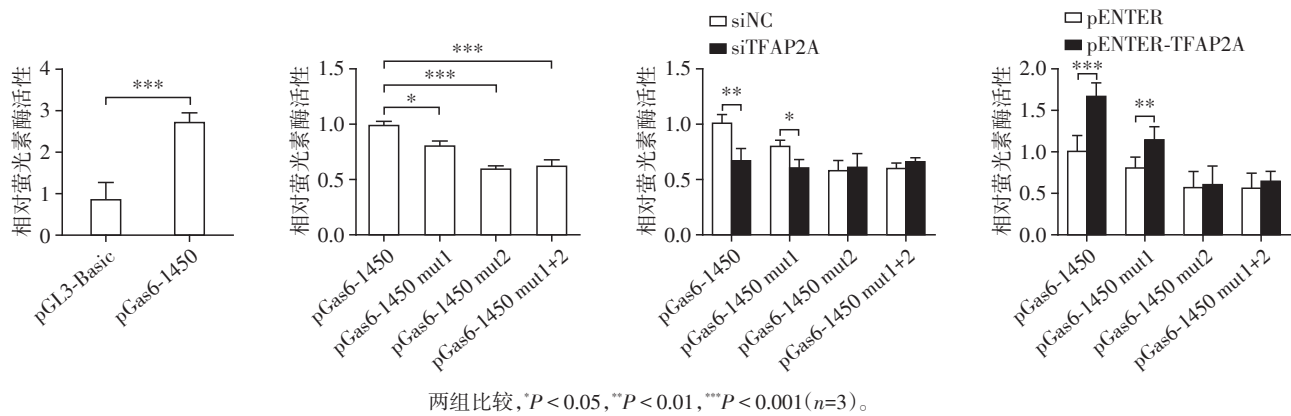


图8 人 Gas6 启动子、突变启动子活性以及 TFAP2A 对其活性的影响

Figure 8 The activity of human Gas6 gene's promoter and its mutants and affected by TFAP2A

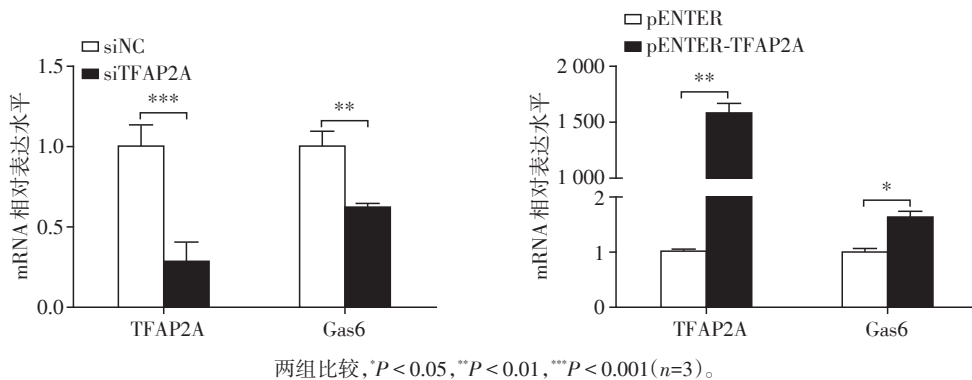


图9 TFAP2A 在 mRNA 水平调控人 Gas6 基因表达

Figure 9 TFAP2A regulates the human Gas6 gene at the mRNA level

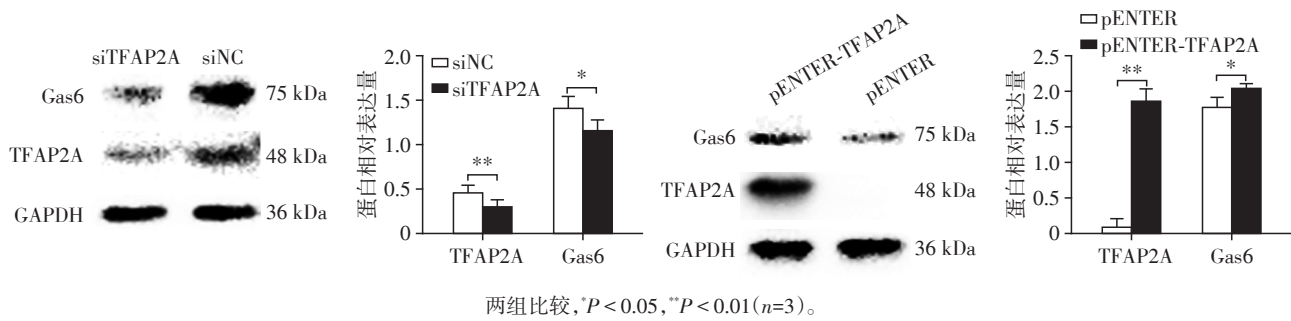


图10 TFAP2A在蛋白水平调控人Gas6基因表达

Figure 10 TFAP2A regulates the human Gas6 gene at the protein level

组装、细胞生长分化或凋亡、细胞周期调控等方面都具有重要功能。Gas6基因是GAS基因家族中的重要一员,它编码一种含有 γ -羧基谷氨酸(Gla)的蛋白质,被认为与刺激细胞增殖有关。该基因在多种癌症中过度表达,并被认为是一种不良预后的标志物。其蛋白水平升高还与多种疾病状态相关,包括静脉血栓栓塞性疾病、系统性红斑狼疮、慢性肾功能衰竭和先兆子痫。在肺、子宫内膜、肾脏和其他24种组织中普遍表达。研究表明Axl抑制剂可显著改善尿白蛋白的排泄和血清肌酐的升高,还抑制肾小管间质纤维化和肾小管损伤,抑制由TGF β 1和Gas6协同作用引起的上皮间质转化(EMT),在小鼠中也有这种抑制作用,这表明Axl抑制剂可以通过抑制肾小管细胞中的EMT来改善肾小球肾炎的肾功能障碍,同时也表明,Gas6/Axl促进肾小球肾炎的疾病进展^[9]。且有研究表明在急性肾损伤中下调Gas6/Axl信号转导可以减轻肾纤维化并且可以延缓急性肾损伤进展为慢性肾脏病^[11]。有研究者证明Axl抑制剂治疗狼疮性肾炎可改善肾功能,显著降低血尿素氮和肾小球增殖,并显著降低磷酸激酶B(Akt)磷酸化和肾炎性细胞因子及趋化因子的表达^[12]。这些研究都表明Gas6/Axl对肾脏病甚至其他疾病有重要意义,而本研究Gas6自身的表达调控可直接影响到Gas6/Axl信号转导,这为后续研究提供了方向。

转录因子是一类能识别基因转录起始位点上游特定DNA序列并与之结合从而调控基因转录的蛋白分子^[13]。激活蛋白-2(AP-2)转录因子家族由AP-2 α 、AP-2 β 、AP-2 γ 、AP-2 δ 和AP-2 ϵ 组成,特定的AP-2家族成员的表达模式和对不同启动子的亲和力不同,它们被认为在胚胎发育过程中刺激细胞增殖并抑制特定细胞类型的终末分化。TFAP2A是一种结合共有序列5'-GCCNNNGGC-3'的转录因子,可作为同源二聚体或作为具有相似家族成员的异

源二聚体发挥作用,既可以作为转录激活因子,也可以作为阻遏因子。目前发现该基因有3个编码不同亚型的转录变体,在皮肤、胎盘、肾和其他4个组织中的表达较多。TFAP2A的缺陷是鳃面综合征(BOFS)的一个原因。目前针对TFAP2A的研究大多是关于各种癌症,有研究表明,肺腺癌中TFAP2A普遍高表达^[14-15],卵巢癌组织中TFAP2A表达也上调^[16],头颈部鳞状细胞癌组织与癌旁正常组织相比,TFAP2A的表达也明显升高^[17]。也有研究证明TFAP2A可下调miR-126,从而上调PLK2并激活I κ B α -NF- κ B通路,从而增加脑缺血后的神经元损伤^[18]。近年有人提出TFAP2A是肾脏发育过程中肾单位分化的新看门人^[19],但目前对于TFAP2A与肾脏疾病之间的研究依旧很少。

本研究首次证明Gas6可促进NS的发生,其次证明Gas6在HEK-293T细胞中有抗凋亡作用,同时成功构建了Gas6启动子萤光素酶基因报告重组质粒,测定其具有启动活性,并验证了TFAP2A在Gas6启动子区的关键功能性结合位点,最后证明了TFAP2A可通过与Gas6启动子结合从而在启动子、mRNA、蛋白质水平正向调控Gas6的表达。

【参考文献】

- [1] CAO H, MENG X. HDL and kidney diseases[J]. Adv Exp Med Biol, 2022, 1377: 163-170
- [2] ZHAO J H, LIU Z H. Treatment of nephrotic syndrome: going beyond immunosuppressive therapy [J]. Pediatr Nephrol, 2020, 35(4): 569-579
- [3] IBRAHIM A, GRAY Z, GOMES A, et al. Gas6 expression is reduced in advanced breast cancers[J]. NPJ Precision Oncology, 2020, 4: 9
- [4] CHOI S, ZHANG B, MA S, et al. Corticosterone inhibits GAS6 to govern hair follicle stem-cell quiescence[J]. Nature, 2021, 592(7854): 428-432
- [5] DU W W, ZHU J J, ZENG Y Y, et al. KPNB1-mediated nuclear translocation of PD-L1 promotes non-small cell

- lung cancer cell proliferation via the Gas6/MerTK signaling pathway[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(4): 1284-1300
- [6] WU G, MA Z, CHENG Y, et al. Targeting Gas6/TAM in cancer cells and tumor microenvironment [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1):20
- [7] GONG S, XU Z, LIU Y, et al. Plasma sMer, sAxl and GAS6 levels correlate with disease activity and severity in lupus nephritis [J]. *Eur J Clin Invest*, 2019, 49(3): e13064
- [8] BELLAN M, QUAGLIA M, NERVIANI A, et al. Increased plasma levels of Gas6 and its soluble tyrosine kinase receptors Mer and Axl are associated with immunological activity and severity of lupus nephritis [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2021, 39(1): 132-138
- [9] KURATA A, TACHIBANA Y, TAKAHASHI T, et al. Novel AXL-specific inhibitor ameliorates kidney dysfunction through the inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition of renal tubular cells [J]. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0232055
- [10] LIU Q, GUO L, LOU Z, et al. Super-enhancers and novel therapeutic targets in colorectal cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(3):228
- [11] CHEN D Q, FENG Y L, CHEN L, et al. Poricoic acid enhances melatonin inhibition of AKI-to-CKD transition by regulating Gas6/Axl/INFB/Nrf2 axis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 134:484-497
- [12] ZHEN Y, LEE I, FINKELMAN F, et al. Targeted inhibition of Axl receptor tyrosine kinase ameliorates anti-GBM-induced lupus-like nephritis [J]. *J Autoimmun*, 2018, 93: 37-44
- [13] 刘 爽,陈 曦,周国平. 转录因子 E2F4 对哮喘相关基因 Six1 的转录调控 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(7):943-948
- [14] XIONG Y, FENG Y, ZHAO J, et al. TFAP2A potentiates lung adenocarcinoma metastasis by a novel miR-16 family/TFAP2A/PSG9/TGF- β signaling pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4):352
- [15] CUI Y, ZHANG C, MA S, et al. TFAP2A-induced SLC2A1-AS1 promotes cancer cell proliferation [J]. *Biol Chem*, 2021, 402(6):717-727
- [16] XU H, WANG L, JIANG X. Silencing of lncRNA DLEU1 inhibits tumorigenesis of ovarian cancer via regulating miR-429/TFAP2A axis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(2):1051-1061
- [17] LIANG Y, CHENG G, HUANG D, et al. Linc00467 promotes invasion and inhibits apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma by regulating miR-1285-3p/TFAP2A [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(6): 6248-6259
- [18] GAO Z, ZHANG J, WU Y. TFAP2A inhibits microRNA-126 expression at the transcriptional level and aggravates ischemic neuronal injury [J]. *Biochem Cell Biol*, 2021, 99(4):403-413
- [19] CHAMBERS B, GERLACH G, CLARK E, et al. Tfap2a is a novel gatekeeper of nephron differentiation during kidney development [J]. *Development*, 2019, 146(13): dev172387

[收稿日期] 2022-10-30

(本文编辑:唐 震)