

· 基础研究 ·

tRF-011690对阿霉素诱导的足细胞自噬的影响

赵唐明,王 娥,张琳琳,黄 婵,甘卫华*

南京医科大学第二附属医院儿肾科,江苏 南京 210003

[摘要] 目的:探究tRNA衍生片段-011690(tRNA-derived fragment-011690, tRF-011690)在阿霉素(adriamycin, ADR)诱导的足细胞自噬中的作用及机制。方法:用ADR(1 $\mu\text{g/mL}$)和tRF-011690 mimic干预足细胞,分为Control组、ADR组、ADR+tRF-011690 mimic组和ADR+tRF-011690 NC组;RT-qPCR法检测各组tRF-011690、LC3和p62的mRNA表达水平;Western blot法测定各组LC3 II/I和p62蛋白的表达量。用ADR(1 $\mu\text{g/mL}$)和雷帕霉素(Rapamycin)200 ng/mL干预足细胞,分为Control组、ADR组、ADR+Rapamycin组和Rapamycin组;RT-qPCR法检测各组tRF-011690表达水平,Western blot检测各组p-mTOR、LC3 II/I和p62蛋白相对表达量。结果:同Control组相比,ADR组足细胞中tRF-011690表达水平下降,LC3和p62 mRNA表达水平升高,LC3 II/I和p62蛋白表达量显著增加($P < 0.05$);同ADR+tRF-011690 NC组相比,ADR+tRF-011690 mimic组tRF-011690表达水平显著上升($P < 0.05$),LC3和p62 mRNA表达量显著降低,LC3 II/I和p62蛋白表达量显著降低($P < 0.05$)。同Control组相比,ADR组p-mTOR、LC3 II/I和p62蛋白表达量均增加($P < 0.05$);同ADR组相比,ADR+Rapamycin组p-mTOR、LC3 II/I和p62蛋白表达量均降低,tRF-011690表达显著上升($P < 0.05$)。结论:tRF-011690可能作为mTOR通路的下游效应分子抑制ADR诱导的足细胞自噬。

[关键词] tRF-011690;足细胞;自噬;mTOR信号通路

[中图分类号] R329

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)11-1515-05

doi:10.7655/NYDXBNS20231106

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)是指肾脏结构或功能异常超过3个月的一类疾病,主要病理表现为肾小球硬化、肾小管萎缩和间质纤维化。CKD是一个全球性的重大公共卫生问题,发展为终末期肾病后只能依靠血液透析、腹膜透析及肾脏移植等维持生命,造成了严重的家庭和社会经济负担^[1-3]。

自噬是真核细胞将胞内物质降解并循环利用的过程,其在细胞、组织和生物体稳态中起重要作用,自噬相关基因突变与人类疾病之间存在明确的病因学联系^[4]。研究表明,肾脏中基础水平的自噬对维持内环境稳态至关重要,但在炎症、饥饿及缺氧等应激条件下,自噬失调可导致足细胞的损伤和缺失,从而进一步造成肾脏损害,急性肾损伤、肾脏纤维化以及CKD中都涉及这一机制^[5]。因此,对足细胞自噬的深入研究具有重要临床意义。

tRNA的衍生片段(transfer RNA-derived RNA fragment, tRF)属于非编码小RNA家族,在细胞或组织中由RNA核酸内切酶切割tRNA产生,根据切割位点的不同,可产生不同类型及功能的tRF^[6]。已有许多研究表明tRF在癌症、神经退行性疾病、心血管疾病等多类疾病中发挥作用,具有巨大的临床价值和应用潜力^[7-8]。在肾脏疾病中,Shi等^[9]研究发现tRF参与足细胞分化与损伤、肾小管细胞纤维化等病理过程。

本课题组通过高通量测序在分化的足细胞中发现多条差异表达的tRF,其中表达下调的AS-tDR-011690、tDR-003634和AS-tDR-13354被证实参与足细胞损伤,其中tRF-011690低表达最为显著,且目前尚未有研究探讨tRF-011690与足细胞损伤的关系及机制,因此本研究选择tRF-011690为研究对象。此外,KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)分析显示mTOR信号通路与差异表达的tRF之间存在紧密联系^[10]。有研究证实,mTOR信号通路与肾自噬相关^[11],因此,本研究通过探讨tRF-011690在阿霉素(adriamycin, ADR)诱导的足细胞损伤中的作用,以及tRF-011690与mTOR信号通路间的可能

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK20211385);南京医科大学第二附属医院“789”卓越人才培养计划(789ZYRC202080119、789ZYRC202090251)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:wei huagan@njmu.edu.cn

作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

永生化小鼠足细胞(MPC5)由南京医科大学第二附属医院肾脏病研究中心馈赠。ADR和mTOR特异性磷酸化抑制剂雷帕霉素(Rapamycin)(Med Chem Express公司,美国);干扰素(interferon, IFN)- γ (Pepro Tech公司,美国);tRF-011690 mimic试剂盒、RT-qPCR试剂盒及U6、tRF-011690引物(广州锐博生物科技有限公司);Lipofectamine 2000转染试剂、Opti-MEM试剂及Trizol试剂(Invitrogen公司,美国); β -actin和p62抗体(Affinity Biosciences公司,美国);LC3 II/I和p-mTOR抗体(Cell Signaling公司,美国);羊抗兔二抗和羊抗鼠二抗(南京凯基生物技术有限公司)。 β -actin、p62、LC3和mTOR的PCR引物由上海锐真生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

MPC5细胞在含10%胎牛血清、1%双抗(青霉素100 U/mL、链霉素100 U/mL)及1%IFN- γ (10 U/mL)的RPMI-1640培养基中培养,置于33℃、5% CO₂的细胞培养箱内;每隔1~2 d换液,镜下视野细胞融合至80%~90%时进行传代,置于不含双抗和IFN- γ 的完全培养液,放入37℃、5% CO₂的细胞培养箱内分化10~14 d;每隔1~2 d更换培养液1次,待细胞融合率为60%~70%时更换无血清培养基继续培养12 h使细胞同步化,收集细胞以备后续实验。

1.2.2 tRF-011690过表达转染

将对数生长期足细胞接种至6孔板,按脂质体转染试剂Lipofectamine 2000操作说明书操作,用50 nmol/L的tRF-011690 mimic和tRF-011690 NC以及Lipofectamine 2000转染试剂转染细胞。培养4~6 h后,更换完全培养基用ADR干预24 h。

1.2.3 细胞干预实验

观察过表达tRF-011690对足细胞自噬的影响,细胞用ADR(1 μ g/mL)^[10]干预,分为Control组、ADR组、ADR+tRF-011690 mimic组和ADR+tRF-011690 NC组。观察阻断mTOR信号通路对tRF-011690及足细胞自噬的影响,用ADR(1 μ g/mL)与Rapamycin(200 ng/mL)^[12]干预,分为Control组、ADR组、ADR+Rapamycin组与Rapamycin组。

1.2.4 RT-qPCR检测目的基因的表达水平

用Trizol试剂盒提取各组总RNA,利用分光光

度计对每个样品的RNA浓度和纯度进行检测。根据反转录试剂盒说明书制备cDNA;根据RT-qPCR试剂盒说明书进行PCR扩增反应。依据熔解曲线进行产物的特异性分析。U6作为内参,采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算tRF-011690相对表达量。 β -actin作为内参,采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算p62、LC3和p-mTOR mRNA的相对表达量。各样本均设置3个复孔,实验重复3次。目的基因引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

目的基因	引物序列(5'→3')
LC3	F:GCAGCCTGGATGTTTCAGAAT
	R:TGGATTGCCTGAGACTCCTT
p62	F:ACCCATCCACAGGTGAACTC
	R:GTGGGAGATGTGGGTACAGG
mTOR	F:TCCTGAAGAACATGTGCGAG
	R:CCAAAGTACAAGCGAGAGCC
β -actin	F:CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC
	R:ATGGAGCCACCGATCCACA

1.2.5 Western blot法检测目的蛋白表达水平

收集干预完成的足细胞,弃去培养基,PBS冲洗后置于4℃冰上,加入RIPA及蛋白酶抑制剂PMSF进行裂解,细胞刮刮下细胞移至1.5 mL EP管中,冰上裂解40 min,4℃、12 000 r/min离心30 min,取上清,BCA法测蛋白浓度。每组蛋白上样量为25 μ g,经SDS-PAGE电泳、转膜、5%脱脂牛奶封闭2 h,分别加入 β -actin、p62、LC3 II/I和p-mTOR一抗(稀释比例为1:1 000),4℃孵育过夜,TBST洗膜后加入相应二抗(稀释比例为1:3 000),室温下置于摇床孵育1 h,洗膜3次,ECL显色液显影,凝胶成像仪曝光。Image J软件分析灰度值,以 β -actin为内参计算目的蛋白表达量。实验重复3次。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 8软件进行统计学分析,数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验进行两组间比较,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多组间比较分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达tRF-011690对足细胞自噬的影响

RT-qPCR结果表明,与Control组相比,ADR组的tRF-011690表达水平显著降低($P < 0.05$)。与ADR组及ADR+tRF-011690 NC组相比,ADR+tRF-011690 mimic组tRF-011690表达显著升高,证明

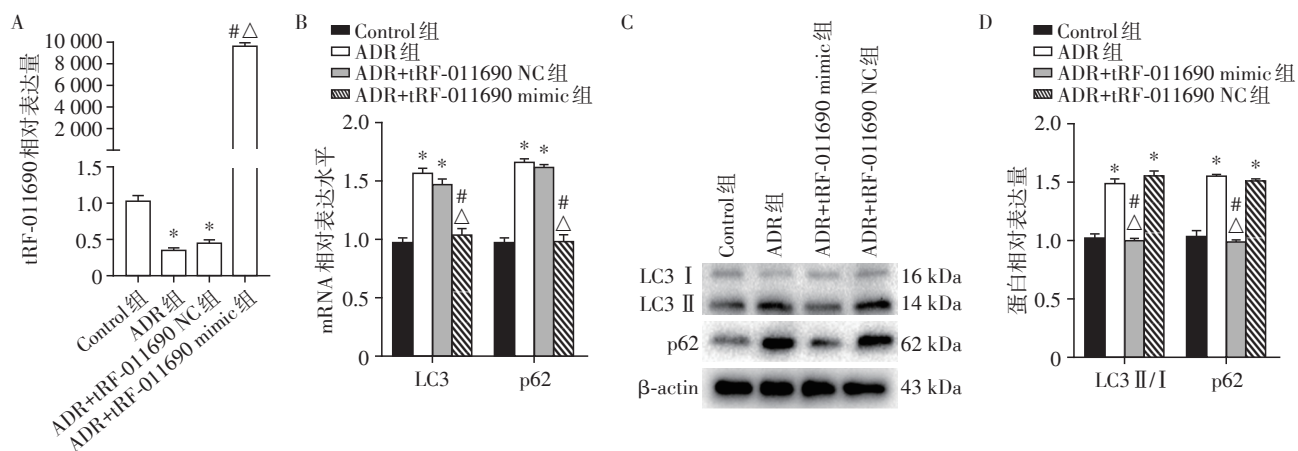
tRF-011690过表达成功($P < 0.05$,图1A)。

RT-qPCR结果显示,与Control组比较,ADR组LC3和p62 mRNA表达量明显上升($P < 0.05$),与ADR+tRF-011690 NC组相比,ADR+tRF-011690 mimic组LC3和p62 mRNA表达量减少($P < 0.05$,图1B)。Western blot结果表明,与Control组比较,ADR组的LC3 II/I和p62蛋白表达量明显上升($P < 0.05$),与ADR+tRF-011690 NC组相比,ADR+tRF-011690 mimic组LC3 II/I和p62蛋白表达量减少($P < 0.05$,

图1C、D)。

2.2 阻断mTOR信号通路对tRF-011690及足细胞自噬的影响

RT-qPCR结果表明,与Control组相比,ADR组mTOR表达水平上升、tRF-011690表达水平下降($P < 0.05$),与ADR组相比,ADR+Rapamycin组mTOR表达水平下降、tRF-011690表达水平升高($P < 0.05$,图2A、B)。Western blot结果表明,与Control组相比,ADR组p-mTOR、LC3 II/I和p62蛋



A: 各组tRF-011690的相对表达量;B: 各组LC3和p62 mRNA的相对表达量;C、D: Western blot检测各组LC3 II/I和p62蛋白的相对表达量(C)及定量分析(D)。与Control组相比,* $P < 0.05$;与ADR组相比,# $P < 0.05$;与ADR+tRF-011690 NC组相比,Δ $P < 0.05$ ($n=3$)。

图1 过表达tRF-011690对足细胞自噬的影响

白表达量增加($P < 0.05$),与ADR组相比,ADR+Rapamycin组p-mTOR、LC3 II/I和p62蛋白表达量降低($P < 0.05$,图2C~F)。

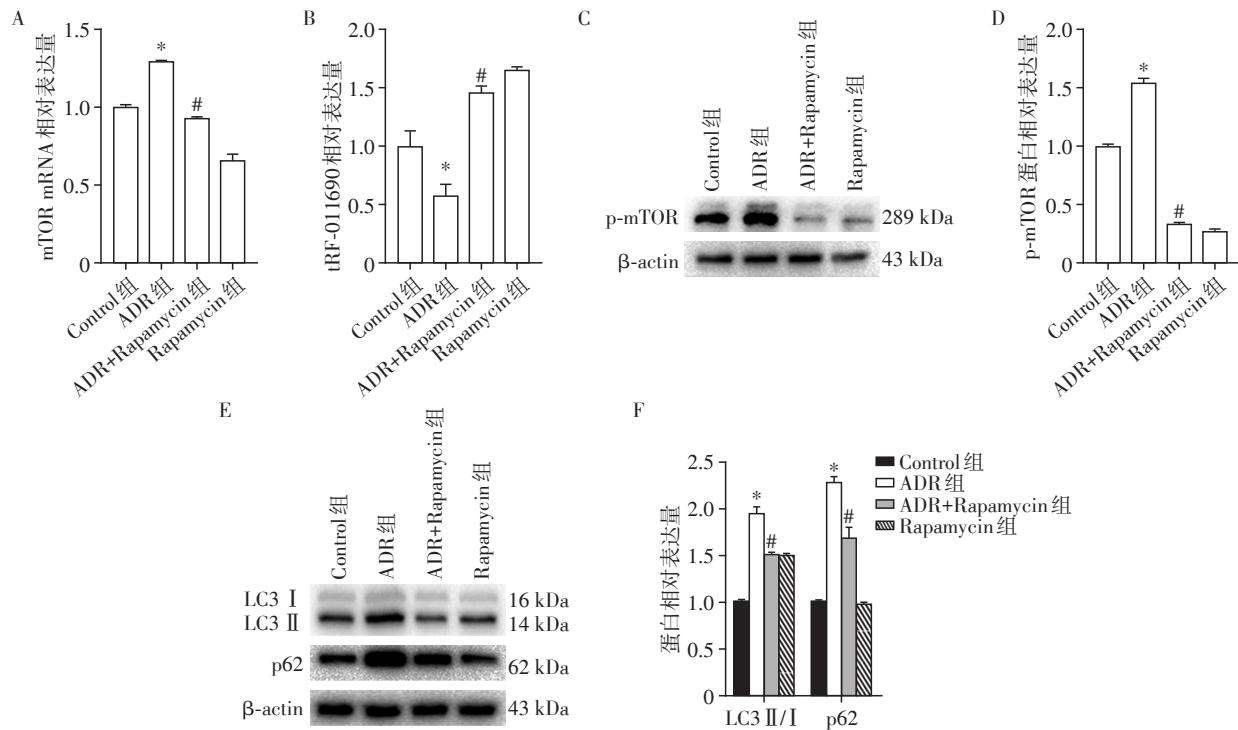
3 讨论

CKD是由多种原因引起的慢性肾脏结构和功能障碍,其病理过程十分复杂,涉及多种细胞因子和信号通路。目前CKD治疗手段有限,只能一定程度上延缓疾病进程,因此寻找特异且有效的治疗靶点迫在眉睫。

足细胞作为肾脏最重要的固有细胞之一,是肾小球滤过屏障的重要组成部分,可以阻止蛋白从尿液丢失,对维持肾脏结构和功能的稳定具有重要意义^[13-14]。研究表明足细胞功能失调与自噬关系密切,足细胞自噬在一定程度上会造成足细胞数量减少,而足细胞数量减少是预测肾脏疾病进展的重要指标^[15],自噬失调会导致肾脏疾病进展产生大量蛋白尿。

tRF作为新型非编码RNA,是来自成熟tRNA或前体tRNA的衍生片段,研究表明tRF并不是

tRNA的随机降解产物,它在不同状态的干细胞中差异表达,分别在转录、转录后和表观遗传水平调控基因表达,在细胞周期、氧化应激、凋亡、自噬等生物学过程中发挥重要调节作用^[16-18]。本课题组前期通过高通量测序发现,正常足细胞与ADR造成的损伤足细胞之间存在许多差异表达的tRF,选取低表达改变最为显著的tRF-011690进行后续功能和机制研究。课题组前期研究ADR诱导肾病小鼠模型,证明ADR能够诱导足细胞凋亡^[19]。自噬流是一个由多个步骤组成的动态过程,自噬流阻滞时LC3 II/I和p62可能同时升高^[20-21]。本研究发现ADR组LC3 II/I和p62蛋白表达量均明显上升,这可能与实验过程中检测自噬标志蛋白的时间密切相关,后续研究可以设置多个时间节点对LC3 II/I和p62进行检测,进一步完善研究结果。本研究Western blot检测ADR组LC3 II/I和p62蛋白表达量均明显上升,并且在ADR诱导的足细胞损伤模型中,细胞自噬水平升高,tRF-011690表达量下降。进一步在足细胞中过表达tRF-011690,结果显示与ADR组及ADR+tRF-011690 NC组相比,ADR+tRF-011690



A:mTOR mRNA 的相对表达量;B:tRF-011690 的相对表达量;C、D:p-mTOR 蛋白的相对表达量(C)及定量分析(D);E、F:LC3 II/I 和 p62 的蛋白相对表达量(E)及定量分析(F)。与 Control 组比较,* $P < 0.05$;与 ADR 组比较,# $P < 0.05$ ($n=3$)。

图2 阻断mTOR信号通路对tRF-011690及足细胞自噬的影响

mimic 组 LC3 和 p62 mRNA 表达明显降低,LC3 II / I 和 p62 蛋白表达也明显降低,表明过表达 tRF-011690 能够调节 ADR 诱导的足细胞自噬。

mTOR 信号通路是调节细胞自噬的重要通路,在营养缺乏、缺氧和药物治疗诱导的应激条件下,mTOR 通路对自噬的调控是细胞存活的关键机制^[21]。mTOR 可以分为 mTOR 复合物 1(mTORC1)和复合物 2(mTORC2),其中 mTORC1 是细胞自噬的重要调节器,Rapamycin 及其类似物可以通过抑制 mTORC1 活性来阻断 mTOR 信号通路,进而抑制自噬^[22]。课题组前期通过 KEGG 分析筛选出多条与 tRF 相关的信号通路,在这些信号通路中,本研究显示 ADR 干预足细胞后 mTOR 信号通路中的关键蛋白 p-mTOR 表达量显著升高,因此猜想 tRF-011690 是否通过该信号通路影响足细胞自噬。用 Rapamycin 阻断 mTOR 信号通路后通过测量 tRF-011690 的表达水平来探究这二者之间的联系。结果表明,阻断 mTOR 信号通路后,tRF-011690 表达上调,足细胞自噬被抑制,推测 tRF-011690 可能作为 mTOR 通路的下游效应分子发挥抑制足细胞自噬的作用。

综上所述,本研究发现 ADR 干预足细胞后,自噬水平升高,mTOR 信号通路被激活,tRF-011690 表达下调。过表达 tRF-011690 后,可以降低 ADR

诱导的足细胞自噬水平;进一步阻断 mTOR 信号通路后,足细胞自噬水平降低,tRF-11690 表达上调。本研究的主要目的在于探索 tRF-011690 对 ADR 诱导肾病小鼠足细胞自噬的影响,同时研究 tRF-011690 与 mTOR 信号通路间可能的作用方式,以便为 CKD 的治疗研究提供一个新的研究思路。

[参考文献]

- [1] KIDNEY DISEASE; IMPROVING GLOBAL OUTCOMES (KDIGO) DIABETES WORK GROUP. KDIGO 2020 clinical practice guideline for diabetes management in chronic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2020, 98 (4s) : S1-S115
- [2] DIWAN V, BROWN L, GOBE G C. Adenine - induced chronic kidney disease in rats [J]. *Nephrology*, 2018, 23 (1) :5-11
- [3] GLASSOCK R J, WARNOCK D G, DELANAYE P. The global burden of chronic kidney disease: estimates, variability and pitfalls [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13 (2) : 104-114
- [4] LEVINE B, KROEMER G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective [J]. *Cell*, 2019, 176 (1/2) :11-42
- [5] TANG C Y, LIVINGSTON M J, LIU Z W, et al. Autophagy in kidney homeostasis and disease [J]. *Nat Rev Nephrol*,

- 2020,16(9):489-508
- [6] GOODARZI H, LIU X H, NGUYEN H C B, et al. Endogenous tRNA-derived fragments suppress breast cancer progression via YBX1 displacement [J]. *Cell*, 2015, 161(4):790-802
- [7] CHEN H, XU Z, LIU D, et al. Small non-coding RNA and colorectal cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5):3050-3057
- [8] LI S Q, XU Z P, SHENG J H. tRNA-derived small RNA: a novel regulatory small non-coding RNA [J]. *Genes*, 2018, 9(5):246
- [9] SHI H M, YU M Y, WU Y, et al. tRNA-derived fragments (tRFs) contribute to podocyte differentiation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(1):1-8
- [10] LI S W, LIU Y W, HE X W, et al. tRNA-derived fragments in podocytes with adriamycin-induced injury reveal the potential mechanism of idiopathic nephrotic syndrome [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020:7826763
- [11] CHEN Y, ZHENG Y F, LIN X H, et al. Dendrobium mixture attenuates renal damage in rats with diabetic nephropathy by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(2):590
- [12] WU L L, FENG Z, CUI S Y, et al. Rapamycin upregulates autophagy by inhibiting the mTOR-ULK1 pathway, resulting in reduced podocyte injury [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5):e63799
- [13] NOVELLI R, BENIGNI A, REMUZZI G. The role of B7-1 in proteinuria of glomerular origin [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(9):589-596
- [14] BRINKKOETTER P T, ISING C, BENZING T. The role of the podocyte in albumin filtration [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2013, 9(6):328-336
- [15] WANG P, LI M, LIU Q C, et al. Detection of urinary podocytes and nephrin as markers for children with glomerular diseases [J]. *Exp Biol Med*, 2015, 240(2):169-174
- [16] KUSCU C, KUMAR P, KIRAN M, et al. tRNA fragments (tRFs) guide ago to regulate gene expression post-transcriptionally in a Dicer-independent manner [J]. *RNA*, 2018, 24(8):1093-1105
- [17] LI P F, TANG T, LIU T, et al. Systematic analysis of tRNA-derived small RNAs reveals novel potential therapeutic targets of traditional Chinese medicine (buyang-Huanwu-decoction) on intracerebral hemorrhage [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(4):895-908
- [18] SHI J C, ZHANG Y F, TAN D M, et al. PANDORA-seq expands the repertoire of regulatory small RNAs by overcoming RNA modifications [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(4):424-436
- [19] SULEIMAN H A, SAID S, SALEH H A, et al. Heparanase increases podocyte survival and autophagic flux after adriamycin-induced injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20):12691
- [20] 吕晓希,胡卓伟. 自噬流的检测方法[J]. *药学学报*, 2016, 51(1):45-51
- [21] ZHENG Q W, SU H B, RANEK M J, et al. Autophagy and p62 in cardiac proteinopathy [J]. *Circ Res*, 2011, 109(3):296-308
- [22] LIEBERTHAL W, LEVINE J S. Mammalian target of rapamycin and the kidney; I. The signaling pathway [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 303(1):1-10

[收稿日期] 2023-07-19

(本文编辑:陈汐敏)