

Sublytic C5b-9 刺激上调 KLF4 促进肾小球系膜细胞生成 IL-23 的作用

虞天一^{1,2}, 赵晨卉³, 何风霞^{1,4}, 刘玉¹, 宫雅娟¹, 赵聃¹, 邱文¹, 张婧^{1*}, 王迎伟^{1*}

¹南京医科大学免疫学系, 江苏 南京 211166; ²东南大学附属中大医院妇产科, 江苏 南京 210009; ³南京医科大学第一附属医院肿瘤科, 江苏 南京 210029; ⁴南京医科大学第二附属医院病理科, 江苏 南京 210003

[摘要] 目的: 研究转录因子 KLF4 调控 sublytic C5b-9 刺激肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cell, GMC) 诱导促炎因子白介素-23(IL-23) 生成的作用。方法: 构建 KLF4 的短发夹状小干扰 RNA(shKLF4) 及过表达质粒(pIRES2-KLF4)。将 pIRES2-KLF4 或 shKLF4 转染 GMC 后再行 sublytic C5b-9 刺激, 用 qPCR、Western blot 和 ELISA 法检查沉默或过表达 KLF4 基因后对 GMC 产生 IL-23 的影响。此外, 构建 IL-23 基因近端启动子全长质粒, 行荧光素酶报告基因实验测定沉默或过表达 KLF4 基因后对 IL-23 启动子活性的影响。结果: ① Sublytic C5b-9 刺激 GMC 后能明显促进 IL-23 的生成, 而沉默 KLF4 基因后, 由 sublytic C5b-9 诱导 GMC 产生的 IL-23 明显减少, 但过表达 KLF4 后 IL-23 的水平则显著增加。② Sublytic C5b-9 刺激 GMC 能显著上调 IL-23 的启动子活性, 而沉默 KLF4 基因后由 sublytic C5b-9 诱导的 IL-23 启动子活性明显降低, 但过表达 KLF4 后又能显著升高 IL-23 的启动子活性。结论: Sublytic C5b-9 刺激诱导 IL-23 的生成可通过其刺激上调转录因子 KLF4 的表达而实现。

[关键词] Sublytic C5b-9; 肾小球系膜细胞(GMC); KLF4; IL-23

[中图分类号] R692.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)10-1331-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20181001

Sublytic C5b - 9 induces IL - 23 production of rat glomerular mesangial cells *via* up - regulated KLF4 expression

Yu Tianyi^{1,2}, Zhao Chenhui³, He Fengxia^{1,4}, Liu Yu¹, Gong Yajuan¹, Zhao Dan¹, Qiu Wen¹, Zhang Jing^{1*}, Wang Yingwei^{1*}

¹Department of Immunology, NMU, Nanjing 211166; ²Department of Obstetrics and Gynecology, Zhongda Hospital, Medical School, Southeast University, Nanjing 210009; ³Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029; ⁴Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210003, China

[Abstract] **Objective:** To explore the regulatory role of KLF4, as a transcription factor, in the production of pro-inflammation cytokine IL-23 gene in rat glomerular mesangial cells(GMC) induced by sublytic C5b-9. **Methods:** The plasmids of KLF4 short hairpin RNA (shKLF4) and KLF4 overexpression (pIRES2-KLF4) were first generated and transfected rat GMC respectively, then the cells were treated with or without sublytic C5b-9. The roles of silencing KLF4 gene in IL-23 synthesis induced by sublytic C5b-9 or overexpressing KLF4 gene in IL-23 production were detected by qPCR, Western blot and ELISA. Moreover, the plasmid of IL-23 promoter(full-length, FL) was also constructed. After co-transfection, the activity of IL-23 promoter with or without sublytic C5b-9 after KLF4 gene knockdown or overexpression was measured by luciferase reporter assay. **Results:** ① Sublytic C5b-9 could obviously elevate IL-23 production in rat GMC, and after KLF4 gene knockdown with shKLF4, the increase of IL-23 expression upon sublytic C5b-9 was remarkably diminished, but KLF4 overexpression in the GMC could markedly elevate IL-23 synthesis. ② The IL-23 promoter activity incubated with sublytic C5b-9 was significantly up-regulated. Meanwhile, after KLF4 gene knockdown, the IL-23 promoter activity in the GMC stimulated by sublytic C5b-9 was obviously declined, but KLF4 overexpression greatly increased IL-23 promoter activity. **Conclusion:** Sublytic C5b-9 could induce IL-23 production of GMCs through the increase of KLF4 expression.

[Key words] sublytic C5b-9; glomerular mesangial cells(GMC); KLF4; IL-23

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(10):1331-1336, 1387]

[基金项目] 国家自然科学基金(31500701, 81471626); 江苏省自然科学基金(BK20140910)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jingzh2005@163.com; wangyw1508@njmu.edu.cn

系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)是人类常见肾小球肾炎的一种病理类型^[1],其病理特征主要是肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cell, GMC)的异常增生和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度分泌^[2]。大鼠Thy-1肾炎(Thy-1N)是一种研究MsPGN的动物模型^[3-4]。由于幼龄大鼠胸腺细胞和GMC表面含有共同的Thy-1抗原,故给大鼠注射抗胸腺细胞抗血清(含Thy-1抗体)后,该抗体可与GMC表面的Thy-1抗原结合,继而激活补体产生C5b-9复合物导致肾脏损害^[5]。已有证据表明,在MsPGN患者的肾小球内存在C5b-9的沉积,且C5b-9的沉积量与组织损伤明显相关^[6]。

业已证实,补体C5b-9对靶细胞的作用分为全溶解(lytic)和亚溶解(sublytic)两种类型。Lytic C5b-9能在有核细胞膜上形成跨膜通道导致细胞溶解,而sublytic C5b-9则能刺激靶细胞,引起细胞凋亡^[7-8]、增殖^[9-10]和促炎因子的合成^[11]等。本课题组以往的研究已发现,大鼠Thy-1N发病具有sublytic C5b-9的依赖性。Sublytic C5b-9可作为GMC损伤的启动源,活化胞内多条信号转导通路,最终促使细胞产生不同的生物学效应^[7-12]。

就sublytic C5b-9刺激GMC诱导促炎因子生成而言,这不仅需要相关信号的级联反应,还需要转录因子的促进作用。本课题前期的实验已证实,Thy-1N大鼠的肾组织(体内)和体外受sublytic C5b-9刺激的GMC中,其转录因子KLF4和促炎因子白介素-23(interleukin, IL-23)的表达水平均明显升高,且KLF4的上调时间早于IL-23基因的表达。提示KLF4或许与IL-23生成有一定的联系。

KLF4是Kruppel样家族的一个转录因子。大鼠的KLF4含482个氨基酸,它的表达不仅能影响细胞的发育与分化,而且还能调控相应的炎症反应^[13]。有人报告^[14],KLF4能经调控NF- κ B信号参与上皮细胞的炎症过程,而过量的KLF4既可激活上皮细胞产生促炎因子,又可在TGF- β 诱导的炎症中发挥作用。

IL-23是属于IL-12家族的一个促炎因子。有文献报道,IL-23能通过刺激T细胞分泌IL-6和IL-17参与诱导肠道炎症^[15]。此外,IL-23在自身免疫性关节炎中也起到了一定的促炎效应^[16]。

本课题组前期的实验已发现,Thy-1N肾炎大鼠和体外用sublytic C5b-9刺激的GMC中,KLF4和IL-23表达均有上调,且KLF4的表达峰值早于IL-23的升高。故推测,KLF4的表达或许能对sublytic C5b-9

诱导IL-23的基因启动和表达产生影响。为了验证这一设想,进行了以下实验。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠GMC细胞株(HBZY-1)由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。pIRES2-EGFP载体由上海捷瑞生物工程有限公司提供。pGPU6/GFP/Neo/shRNA载体购自上海吉玛基因化学技术有限公司。pGL3-basic和pRL-SV40双荧光素酶报告载体来源于美国Promega公司。

多克隆兔抗大鼠胸腺细胞血清(含Thy-1 Ab,效价>1:640)由本实验室制备^[7-8]。补体来自20例健康人志愿者新鲜血清(normal human serum, NHS)。补体热灭活血清(heat-inactive serum, HIS)是指56℃ 30 min灭活后的正常人血清。人补体C6缺陷血清(human C6 deficient serum, C6DS)购于美国Complement Technology公司。重组人C6来自北京义翘神州生物技术有限公司。qPCR酶SYBR Green Master Mix由南京诺唯赞(Vazyme)公司提供。羊KLF4多克隆抗体(sc-1905)购于美国Santa Cruz公司。大鼠IL-23的ELISA试剂盒由上海酶联免疫生物制品有限公司提供。Neon™细胞电转染系统购自美国Invitrogen公司。双荧光素酶报告基因检测(Dual-Luciferase® Reporter Assay)试剂盒来源于美国Promega公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠GMC培养和sublytic C5b-9剂量的确定

将大鼠GMC细胞株加入完全MEM培养液中,采用棋盘滴定法,即以不同浓度Thy-1抗体致敏GMC,然后用不同浓度正常人血清(NHS,提供补体)孵育。之后,用乳酸脱氢酶(LDH)法测定GMC溶解的百分率,由补体介导的GMC溶解率小于5%被视为亚溶解剂量。因此,本实验最终确定以5% Thy-1抗体与4% NHS作为形成sublytic C5b-9的最佳刺激剂量^[10,12]。

1.2.2 质粒的构建与鉴定

1.2.2.1 KLF4 shRNA(shKLF4)质粒的构建与鉴定

由上海吉玛基因化学技术有限公司设计合成4个针对KLF4基因不同靶点的pGPU6/GFP/Neo/shRNA,其靶点和序列如下:①shKLF4-1(靶点+138~+158 nt): TGGCGAGAGGAAGCTCTCTCACATGAAGC-GACTTCCCC;②shKLF4-2(靶点+276~+296 nt): CG-GAGGGAGACCGAGGAGTTCAACGATCTCCTGGA-

CC;③shKLF4-3(靶点+300~+320 nt):GAAACACCG-GACCTAGACTTTATCCTTTCTTCAAGAG;④shKLF4-4(靶点+726~+746 nt):AGCCCTTCGGTCATCAGT-GTTAGCAAAGGAAGCCCAG。以空载体作为阴性对照(SHCTR)。

1.2.2.2 pIRES2-KLF4表达质粒的构建与鉴定

登录NCBI,搜索GenBank数据库中大鼠KLF4 mRNA序列(NM_053713.1)CDS区,用Primer Premier 5软件设计引物,并交南京金斯瑞生物技术有限公司合成。引物序列如下(上游引物下划线处为Bgl II酶切位点,下游引物下划线处为EcoR I酶切位点):上游5'-GAAGATCTACTTCGGGGTTTGGG-TA-3';下游5'-CGGAATTCTGGGTCATGTCCACGAT-3'(产物大小为1539 bp)。此外,以大鼠GMC cDNA为模板扩增目的片段。PCR产物的胶回收、pIRES2-EGFP载体与目的基因片段的酶切与连接及重组质粒的鉴定等均参照文献方法进行^[9]。

1.2.2.3 IL-23基因启动子全长质粒的构建与鉴定

登录NCBI,搜索GenBank数据库中的大鼠IL-23 DNA序列(NM_130410.2),用Primer Premier 5软件设计IL-23基因启动子全长-1316~+307 nt引物,序列如下:上游5'-CGACGCGTCTCCCACTTT-GTCCC-3';下游5'-CCCTCGAGCTTGTTGCCT-GCTTCTC-3'(产物大小为1623 bp)。之后,抽提GMC的DNA。PCR扩增IL-23启动子全长序列。将pGL3-basic载体及IL-23启动子序列酶切、连接。最后经DNA测序鉴定后将构建的重组质粒命名为pGL3-IL-23。

1.2.3 质粒转染GMC筛选最佳效率的shKLF4及验证pIRES2-KLF4质粒的表达

质粒用Neon™细胞电转染系统转染至GMC中,先观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达以评估转染效率。随后,先将GMC分为shKLF4-1+ sublytic C5b-9组、shKLF4-2+ sublytic C5b-9组、shKLF4-3+ sublytic C5b-9组、shKLF4-4+ sublytic C5b-9组、shCTR + sublytic C5b-9组和Sublytic C5b-9组。转染上述小干扰质粒后48 h,再行sublytic C5b-9刺激3 h。取分组处理细胞加入蛋白裂解液,提取GMC蛋白,用Western blot筛选干扰效率最强的KLF4小干扰质粒。另外,再将GMC分为pIRES2和pIRES2-KLF4两组,转染48 h后提取细胞蛋白,如上用Western blot验证KLF4的表达。Western blot方法是:每组取20 μg蛋白上样于10%的SDS-PAGE胶电泳2 h,用湿转至PVDF膜上。加入

KLF4一抗4℃过夜。洗涤后加入HRP标记的二抗45 min,用ECL发光液涂抹并置自动成像系统曝光。对比内参β-actin行半定量分析。

1.2.4 检查沉默或过表达KLF4基因后GMC中IL-23基因的表达

1.2.4.1 GMC分组处理

GMC细胞分组如下:①shKLF4 + sublytic C5b-9组;②shCTR + sublytic C5b-9组;③pIRES2组;④pIRES2-KLF4组;⑤Sublytic C5b-9组;⑥MEM组。①、②组转染shKLF4质粒后48 h再用sublytic C5b-9刺激5或6 h;③、④组分别转染pIRES2和pIRES2-KLF4质粒48 h。

1.2.4.2 qPCR检查细胞内IL-23 mRNA水平

用TRIzol抽提GMC的总RNA,并测定RNA的含量和纯度。将RNA逆转录成cDNA。此后,用Primer Premier软件辅助设计IL-23引物,交金斯瑞生物技术有限公司合成。引物序列是:上游5'-TCAAGGACAACAGCCAGTTC-3',下游5'-GCCCAG-TAGGGAGGTATGAA-3'。qPCR反应总体系为20 μL(含cDNA模板,AceQ® qPCR SYBR® Green Master Mix和上下游引物)。反应在ABI Prime 7300上进行。参数为95℃/5 min、95℃/10 s、60℃/20 s和72℃/20 s。后3步重复40个循环,在60℃进行单点荧光检测(每个样本设3个复孔)。对于实验数据,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行计算。

1.2.4.3 ELISA法测定培养上清液IL-23的蛋白含量

GMC分组处理同前。收集细胞培养上清液,行双抗体夹心ELISA法检查上清中IL-23的分泌水平,每个样本设3个复孔。操作步骤见ELISA试剂盒说明书。反应完成后用酶标仪在450 nm处测定吸光度。以标准品浓度为横坐标,测得的吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。根据标本的吸光度值在标准曲线上查出其相应的浓度。

1.2.5 检查沉默或过表达KLF4基因后GMC中IL-23基因启动子的活性

将不同质粒与IL-23启动子质粒分别共转染GMC(分组处理同前)。然后裂解细胞,行双荧光素酶报告基因检测试剂盒(luciferase reporter assay)测定IL-23基因启动子活性(每个样本设3个复孔)。实验步骤参见试剂盒说明书。将细胞裂解样品放入Modulus™荧光计中检测,读取萤火虫荧光值。之后再处理的样品置于Modulus™荧光计中测定,读取海肾荧光值。最终结果以萤火虫荧光值/海肾荧光值表示^[11]。

1.3 统计学方法

所得定量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用Bonferroni检验。应用SPSS 17.0软件进行统计学分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 shKLF4质粒的构建与鉴定

将公司合成的4个针对KLF4基因不同靶点的shRNA质粒进行DNA测序,经BLAST比对证实,目的DNA片段已正确克隆入pGCSI-U6/Neo/GFP/shRNA载体中。表明,重组4个shKLF4质粒均构建成功。之后,将空载质粒shCTR电转染入GMC,观察表达GFP的细胞占总GMC的百分比。结果显示,质粒转染GMC后48h,转染效率可达到80%以上(图1A)。此外,将前述4个shKLF4及其shCTR质粒分别电转染GMC后48h再用sublytic C5b-9刺激3h。Western blot检查显示,KLF4 shRNA-1可明显下调sublytic C5b-9诱导KLF4蛋白的表达,差异有统计学意义(图1B),故后续实验选取shKLF4-1用以沉默KLF4基因,并统一简称为shKLF4。

2.2 pIRES2-KLF4表达质粒的构建与鉴定

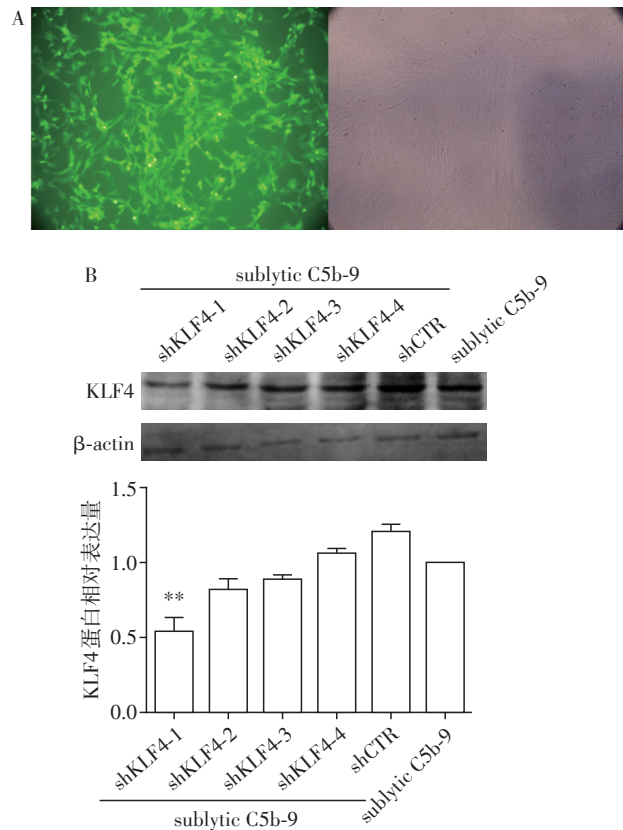
以GMC的mRNA为模板,PCR扩增大鼠KLF4基因CDS区,将扩增产物插入pIRES2-EGFP表达载体中。经测序和BLAST比对后证实,pIRES2-KLF4质粒构建成功。将pIRES2-KLF4和其pIRES2对照质粒分别电转染GMC 48h,裂解细胞行Western blot检查显示,pIRES2-KLF4重组质粒转染组的KLF4蛋白表达明显增多,差异有统计学意义(图2)。

2.3 IL-23基因启动子全长报告质粒的构建与鉴定

以大鼠GMC基因组DNA为模板,用PCR扩增IL-23启动子全长(-1 316~+307 nt),将扩增产物插入pGL3-basic荧光素酶报告载体上的酶切位点Mlu I和Xho I之间(图3A)。经菌液PCR鉴定显示,阳性条带出现在目标位置,即1 623 bp处(图3B)。DNA测序并比对后证实,扩增序列完全正确。表明重组pGL3-IL23(-1 316~+307 nt)质粒构建成功。

2.4 沉默或过表达KLF4基因对sublytic C5b-9上调IL-23基因表达的影响

将最佳干扰效率的shKLF4质粒转染GMC 48h,再给予sublytic C5b-9刺激5h或6h。同时,将pIRES2-KLF4和其对照pIRES2质粒分别转染GMC 48h,分别提取各组细胞的mRNA和收集上清液后行qPCR和ELISA测定IL-23 mRNA和蛋白的分泌水



A: shCTR空载体转染GMC后48h,评估GFP转染效率约为80%以上。B:分别将针对KLF4不同靶点的4个shRNA及对照shCTR转染GMC 48h,再行sublytic C5b-9刺激3h,Western blot检查KLF4蛋白表达。* $P < 0.01$ vs. shCTR+sublytic C5b-9。

图1 shCTR转染GMC效率的评估及最佳shKLF4沉默效率的筛选

Figure 1 Evaluation of efficiency in the GMC transfected by shCTR and screening of optimal shKLF4 silencing

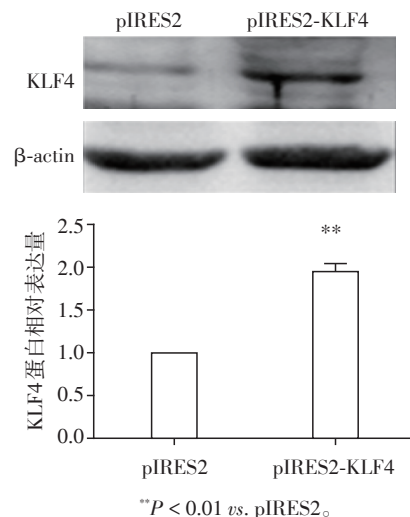
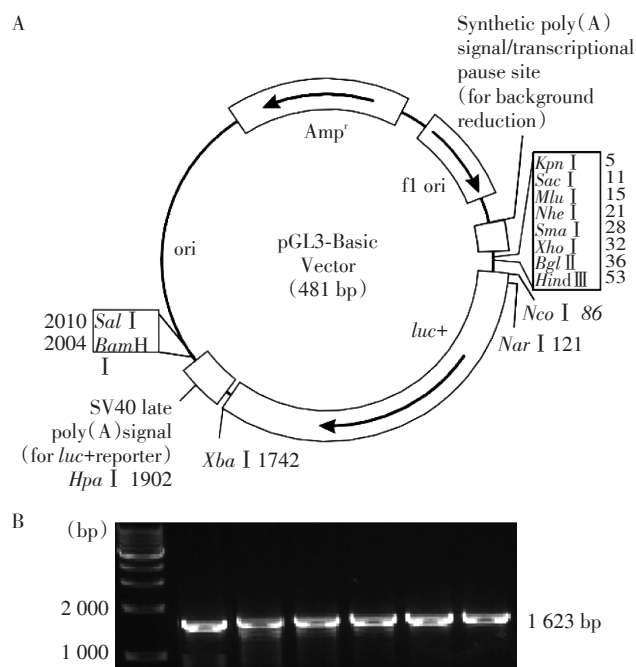


图2 pIRES2-KLF4质粒转染GMC表达KLF4蛋白的鉴定
Figure 2 Identification of KLF4 protein expression in the GMC transfected by pIRES2-KLF4



A: 基因启动子全长荧光素酶报告质粒图谱; B: 菌液 PCR 电泳条带。

图3 IL-23基因启动子全长荧光素酶报告质粒的构建与鉴定

Figure 3 Construction and identification of full-length luciferase reporter plasmid of IL-23 gene promoter

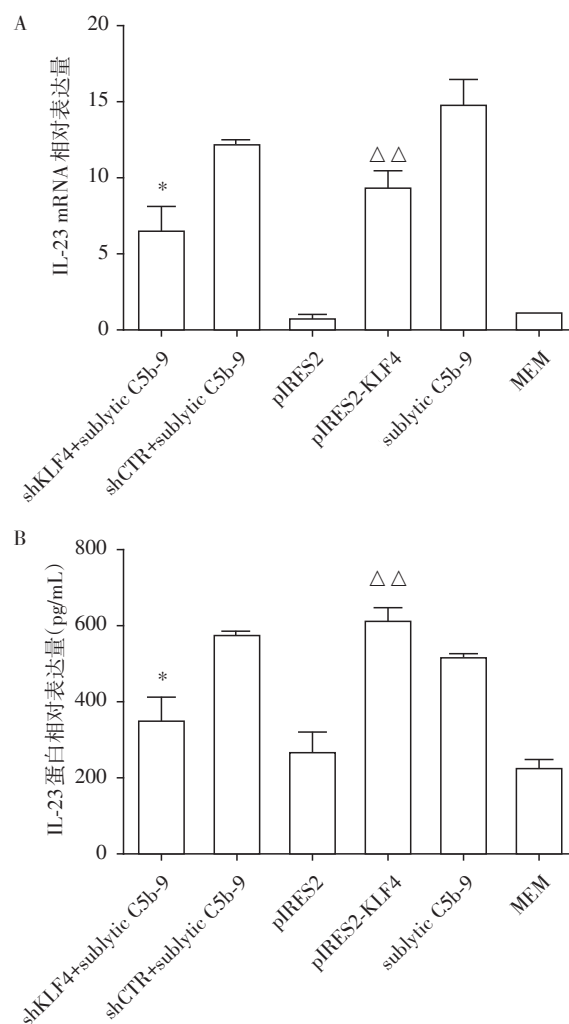
平。结果显示, shKLF4 + sublytic C5b-9组的 IL-23 mRNA (5 h) 和蛋白水平(6 h)均明显低于 shCTR + sublytic C5b-9组和 sublytic C5b-9组, 差异有统计学意义。另转染了 pIRES2-KLF4 过表达质粒的 GMC 组, IL-23 mRNA (图 4A) 和蛋白的分泌水平(图 4B) 均明显升高, 差异有统计学意义。

2.5 KLF4 表达对 sublytic C5b-9 刺激 GMC 诱导 IL-23 基因启动的影响

将 IL-23 启动子质粒分别与 KLF4 的小干扰和过表达质粒(包括各自的对照质粒)共转染 GMC, 培养 48 h 再行 sublytic C5b-9 刺激 5 h(共转染过表达质粒组不予刺激), 测定 IL-23 启动子的活性。结果发现, 沉默或过表达 KLF4 基因后可明显降低或升高 IL-23 的启动子活性, 差异有统计学意义(图 5)。

3 讨论

大鼠 Thy-1N 的病理改变与人类 MsPGN 极为相似, 是目前研究 MsPGN 的一种较好的动物模型^[17]。大量证据已经表明, GMC 的炎症反应是肾组织损伤的重要原因, 而补体激活形成的 sublytic C5b-9 又是 Thy-1N 致病的关键因素^[11, 18-19]。本课题组过去的实



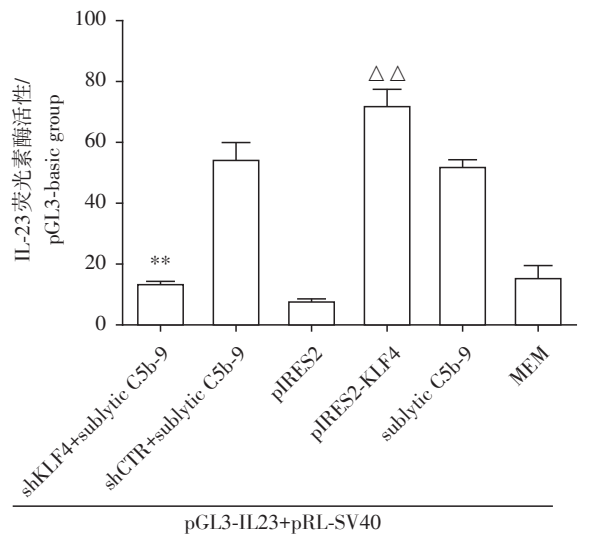
将 shKLF4 转染 GMC 后 48 h 再给予 sublytic C5b-9 刺激 5 h 或 6 h 或将 pIRES2-KLF4 质粒及对照质粒转染 GMC 后 48 h(转染过表达质粒的 GMC 不予 sublytic C5b-9 刺激), 随后用 qPCR(A) 和 ELISA(B) 检查沉默 KLF4 基因后由 sublytic C5b-9 刺激 GMC 或过表达 KLF4 基因后, 其 IL-23 mRNA 丰度和蛋白的分泌水平(* $P < 0.01$ vs. shCTR + sublytic C5b-9 组; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs. pIRES2 组)。

图4 沉默或过表达 KLF4 后对 IL-23 基因表达的影响

Figure 4 Effect of KLF4 gene silence or overexpression on IL-23 gene expression

验已证实, 在 Thy-1N 发病早期, 大鼠 GMC 表面可见 sublytic C5b-9 的沉积, 且体外用 sublytic C5b-9 刺激 GMC 后也能诱导 IL-6 的生成^[11], 但目前有关 GMC 生成促炎因子的分子机制并未阐明。

本实验室前期研究结果显示, Thy-1N 大鼠的肾组织内及体外用 sublytic C5b-9 刺激 GMC 后均能诱导转录因子 KLF4 和促炎因子 IL-23 的表达上调, 且 KLF4 的表达时相早于 IL-23 的产生。据此, 本文推测, KLF4 或许能在 IL-23 的基因转录和表达中起一定的作用。



** $P < 0.01$ vs. shCTR+sublytic C5b-9 和 sublytic C5b-9 组; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs. pIRES2 组和 MEM 组。

图5 KLF4对sublytic C5b-9刺激GMC上调IL-23启动子活性的影响

Figure 5 Effect of KLF4 on upregulating IL-23 promoter in the GMC stimulated by sublytic C5b-9

已知用真核表达载体在细胞内转录生成短发夹状shRNA是目前RNAi技术的一种常见手段,其优点是能够长时间且高效地诱导基因表达沉默^[20]。在本实验中,成功构建了4个KLF4的shRNA。将这些干扰质粒分别转染GMC后进行最佳沉默效率的筛选。结果发现,shKLF4-1沉默目的基因的效率最为显著。因此,后续的功能研究中,将选择shKLF4-1进行相关的实验。

除了沉默目的基因外,还将KLF4基因的CDS区插入真核表达载体pIRES2-EGFP中构建了KLF4的过表达质粒(pIRES2-KLF4)。之后,又将其转染入GMC,并行Western blot实验证实,pIRES2-KLF4能在GMC中表达KLF4蛋白。

为了检查KLF4的表达对sublytic C5b-9诱导GMC生成IL-23的影响,进行了KLF4基因沉默或过表达实验。结果发现,当沉默KLF4基因后,sublytic C5b-9刺激诱导的IL-23明显减少,而过表达KLF4后则能显著增加IL-23的分泌。提示,KLF4的表达确能促进sublytic C5b-9诱导的IL-23合成与分泌。

KLF4作为一种核转录因子,其C端包含3个连续锌指结构的DNA结合结构域^[13]。据此猜想,KLF4调控sublytic C5b-9诱导IL-23的表达可能与其激活了该基因的启动子有关。为了证明这个推断,本研究利用荧光素酶报告基因实验进行了相关的研究。先构建了大鼠IL-23的启动子全长质粒,即

pGL3-IL-23(-1 316~+307 nt)。随后,将此pGL3-IL-23质粒转染GMC后48 h再给予sublytic C5b-9刺激5 h。结果发现,sublytic C5b-9刺激GMC后能明显上调IL-23的启动子活性,而在沉默或过表达KLF4基因后则又可显著降低或升高IL-23的启动子活性。

综上所述,本研究证实了转录因子KLF4能够调控促炎因子IL-23基因的启动子活性,并促进其基因转录与表达。这一结果为后续深入研究大鼠Thy-1N发病时,由sublytic C5b-9刺激GMC诱导IL-23生成及其相应的调控机制提供了前期数据,同时也为今后探讨人类MsPGN的发病机制等提供了必要的实验依据。

[参考文献]

- [1] Mestecky J, Raska M, Julian BA, et al. IgA nephropathy: molecular mechanisms of the disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2013, 8:217-240
- [2] Tamouza H, Chemouny JM, Raskova Kafkova L, et al. The IgA1 immune complex-mediated activation of the MAPK/ERK kinase pathway in mesangial cells is associated with glomerular damage in IgA nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2012, 82(12):1284-1296
- [3] Cina DP, Xu H, Liu L, et al. Renal tubular angiogenic dysregulation in anti-Thy1.1 glomerulonephritis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 300(2):488-498
- [4] Cove-Smith A, Mulgrew CJ, Rudyk O, et al. Anti-proliferative actions of T-type calcium channel inhibition in Thy1 nephritis [J]. *Am J Pathol*, 2013, 183(2):391-401
- [5] Stangou M, Alexopoulos E, Pantzaki A, et al. C5b-9 glomerular deposition and tubular alpha3beta1-integrin expression are implicated in the development of chronic lesions and predict renal function outcome in immunoglobulin A nephropathy [J]. *Scand J Urol Nephrol*, 2008, 42(4):373-380
- [6] Falk RJ, Sisson SP, Dalmaso AP, et al. Ultrastructural localization of the membrane attack complex of complement in human renal tissues [J]. *Am J Kidney Dis*, 1987, 9:121-128
- [7] Liu L, Qiu W, Wang H, et al. Sublytic C5b-9 complexes induce apoptosis of glomerular mesangial cells in rats with Thy-1 nephritis through role of interferon regulatory factor-1-dependent caspase 8 activation [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(20):16410-16423
- [8] He F, Zhou M, Yu T, et al. Sublytic C5b-9 triggers glomerular mesangial cell apoptosis in rat Thy-1 nephritis via Gadd45 activation mediated by Egr-1 and p300-dependent ATF3 acetylation [J]. *J Mol Cell Biol*, 2016, 8(6):

(下转第1387页)

- [6] 岳林先,陈琴. 甲状腺影像报告和数据系统的共识与问题[J]. 临床超声医学杂志,2016,18(3):185-188
- [7] Al-Hilli Z, Strajina V, McKenzie TJ, et al. Thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration improves the diagnosis of cervical lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*,2017,24(3):739-744
- [8] 陈晓康,陈少华,吕国荣,等. 超声 TI-RADS 分类对甲状腺结节的诊断价值[J]. 中国超声医学杂志,2012,28(12):1066-1068
- [9] Eszlinger M, Lau L, Ghaznavi S, et al. Molecular profiling of thyroid nodule fine-needle aspiration cytology [J]. *Nat Rev Endocrinol*,2017,13(7):415-424
- [10] 刘晓云,陈欢欢,戎荣,等. 超声引导下甲状腺细针穿刺在甲状腺疾病诊治中的临床应用评价[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2012,32(6):831-836
- [11] 陈曼,何永刚,周建桥,等. 超声引导下甲状腺结节细针穿刺细胞学检查与超声评估的临床价值[J]. 中国超声医学杂志,2011,27(10):888-890
- [12] Mokhtari M, Kumar PV, Hayati K. Fine-needle aspiration study of cystic papillary thyroid carcinoma: Rare cytological findings[J]. *J Cytol*,2016,33(3):120-124
- [13] 陈杰. 注意甲状腺肿瘤病理诊断中的问题[J]. 中华病理学杂志,2014,43(5):289-290
- [14] Rosario PW, Silva AL, Calsolari MR. Is fine needle aspiration really not necessary in patients with thyroid nodules \leq 1 cm with highly suspicious features on ultrasonography and candidates for active surveillance? [J]. *Diagn Cytopathol*,2017,45(4):294-296
- [15] 唐鹤文,张波,姜玉新. 超声引导下甲状腺结节细针穿刺活检进展[J]. 中国实用外科杂志,2015,35(6):679-683
- [收稿日期] 2017-12-13

(上接第1336页)
477-491

- [9] Qiu W, Zhang Y, Liu X, et al. Sublytic C5b-9 complexes induce proliferative changes of glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through TRAF6-mediated PI3K-dependent Akt1 activation [J]. *J Pathol*,2012,226(4):619-632
- [10] Gao L, Zhang Y, Qiu W, et al. Effects of PI3-k/Akt short hairpin RNA on proliferation, fibronectin production and synthesis of thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta1 in glomerular mesangial cells induced by sublytic C5b-9 complexes [J]. *Cell Prolif*,2009,42(1):83-93
- [11] Zhang J, Li Y, Shan K, et al. Sublytic C5b-9 induces IL-6 and TGF-beta1 production by glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through p300-mediated C/EBPbeta acetylation [J]. *FASEB J*,2014,28(3):1511-1525
- [12] Jiang X, Zhang J, Xia M, et al. Role of activating transcription factor 3(ATF3) in sublytic C5b-9-induced glomerular mesangial cell apoptosis [J]. *Cell Mol Immunol*,2010,7(2):143-151
- [13] Hamik A, Lin Z, Kumar A, et al. Kruppel-like factor 4 regulates endothelial inflammation [J]. *J Biol Chem*,2007,282(18):13769-13779
- [14] Mreich E, Chen XM, Zaky A, et al. The role of KLF4 in TGFbeta induced inflammatory and fibrotic responses in human proximal tubule cells [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*,2015,42(6):680-686
- [15] Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6 [J]. *J Clin Invest*,2006,116(5):1310-1316
- [16] Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, et al. Divergent pro- and anti-inflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation [J]. *J Exp Med*,2003,198(12):1951-1957
- [17] Darvill AM, Ballardie FW. Mesangial autoantigens in IgA nephropathy: matrix synthesis and localization [J]. *J Lab Clin Med*,2006,147(6):301-309
- [18] Qiu W, Che N, Feng X, et al. Apoptosis of glomerular mesangial cells induced by sublytic C5b-9 complexes in rats with Thy-1 nephritis is dependent on Gadd45 gamma up-regulation [J]. *Eur J Immunol*,2009,39(11):3251-3266
- [19] Cantaluppi V, Medica D, Mannari C, et al. Endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicles protect from complement-mediated mesangial injury in experimental anti-Thy1.1 glomerulonephritis [J]. *Nephrol Dial Transplant*,2015,30(3):410-422
- [20] Chen ZY, Liang K, Lin Y, et al. Study of the UTMD-based delivery system to induce cervical cancer cell apoptosis and inhibit proliferation with shRNA targeting survivin [J]. *Int J Mol Sci*,2013,14:1763-1777
- [收稿日期] 2018-02-24