

## SP1 基因在 sublytic C5b-9 促大鼠肾小球系膜细胞增殖中的作用

朱宇峰<sup>1</sup>, 蔡梦媛<sup>1</sup>, 刘昌伟<sup>1</sup>, 王庆林<sup>1</sup>, 张恩瑞<sup>1</sup>, 钱宝梅<sup>2</sup>, 张志伟<sup>2</sup>, 赵 聃<sup>2</sup>, 邱 文<sup>2\*</sup>, 王迎伟<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学第一临床医学院临床医学系(长学制), 江苏 南京 211166; <sup>2</sup>南京医科大学基础医学院免疫学系, 江苏 南京 211166

**[摘要]** 目的: 检查特异性蛋白1(specificity protein 1, SP1)在Thy-1肾炎(Thy-1 nephritis, Thy-1N)大鼠肾组织中和亚溶解型C5b-9(sublytic C5b-9)刺激的大鼠肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cells, GMCs)中的表达情况, 并探讨SP1表达上调对sublytic C5b-9促大鼠GMCs增殖的作用。方法: 复制大鼠Thy-1N模型, 同时用sublytic C5b-9刺激体外培养的大鼠GMCs, 分别用real-time PCR和Western blot检查Thy-1N大鼠肾组织(体内)和sublytic C5b-9刺激的大鼠GMCs(体外)中SP1基因的mRNA和蛋白表达水平及其表达时相。与此同时, 构建SP1基因的表达质粒(pEGFP-N1/SP1-His)和发夹状小干扰RNA质粒(SP1 shRNA, shSP1)。将上述质粒分别转染大鼠GMCs(同时设对照质粒转染组), 再给予或不给予sublytic C5b-9刺激。用real-time PCR和Western blot检查SP1表达量, 并行CCK-8实验检查GMCs的增殖情况。结果: 在Thy-1N大鼠肾组织和sublytic C5b-9刺激的大鼠GMCs中, SP1 mRNA和蛋白表达水平均显著上调, 且其体内外表达时相较为一致。体外过表达SP1可显著促进GMCs增殖, 而沉默SP1可明显抑制sublytic C5b-9诱导的GMCs增殖反应。结论: Sublytic C5b-9刺激大鼠GMCs后能通过上调SP1表达促进GMCs增殖。

**[关键词]** Thy-1肾炎(Thy-1N); 肾小球系膜细胞(GMCs); 增殖; 亚溶解型C5b-9(sublytic C5b-9); 特异性蛋白1(SP1)

**[中图分类号]** R392.12

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)11-1499-07

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20181103

### The role of SP1 gene in sublytic C5b-9-induced GMC proliferation

Zhu Yufeng<sup>1</sup>, Cai Mengyuan<sup>1</sup>, Liu Changwei<sup>1</sup>, Wang Qinglin<sup>1</sup>, Zhang Enrui<sup>1</sup>, Qian Baomei<sup>2</sup>, Zhang Zhiwei<sup>2</sup>, Zhao Dan<sup>2</sup>, Qiu Wen<sup>2\*</sup>, Wang Yingwei<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Clinical Medical Science of the First Clinical Medical College, NMU, Nanjing 211166; <sup>2</sup>Department of Immunology, School of Basic Medicine, NMU, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** To detect the expression of specificity protein 1 (SP1) in the renal tissues of rats with Thy-1 nephritis (Thy-1N) and in the glomerular mesangial cells (GMCs) stimulated with sublytic C5b-9, and investigate the role of SP1 expression in sublytic C5b-9-induced GMC proliferation. **Methods:** Rat Thy-1N was induced, and the cultured rat GMCs were stimulated with sublytic C5b-9. The expression of SP1 in the renal tissues of rats with Thy-1N (*in vivo*) and in the GMCs stimulated with sublytic C5b-9 (*in vivo*) was detected by real-time PCR and Western blot, respectively. Meantime, SP1 expression plasmid (pEGFP-N1/SP1-His) and SP1 shRNA (shSP1) were constructed. Above-mentioned plasmids and control plasmids were transfected into rat GMCs followed by sublytic C5b-9 stimulation or not. The expression levels of SP1 were evaluated by real-time PCR and Western blot, and the cellular proliferation was determined by CCK-8. **Results:** The expression levels of SP1 in the renal tissues of rats with Thy-1N and in the GMCs stimulated with sublytic C5b-9 were markedly increased with similar time points. SP1 overexpression could markedly promote GMCs proliferation, while SP1 knockdown could obviously reduce sublytic C5b-9-induced GMCs proliferation. **Conclusion:** Sublytic C5b-9 promotes rat GMCs proliferation through up-regulation of SP1.

**[Key words]** Thy-1 nephritis (Thy-1N); glomerular mesangial cells (GMCs); proliferation; sublytic C5b-9; specificity protein 1 (SP1)

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(11): 1499-1505]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31470853, 81471626); 江苏省高等学校大学生创新训练计划项目(201710312020Z)

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

人类系膜增生性肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)是一种免疫相关的肾脏疾病,其发病率占临床原发性肾小球肾炎的40%左右<sup>[1]</sup>。MsPGN主要病变特征是肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cells, GMCs)异常增生和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度积聚<sup>[2]</sup>。由于大多数MsPGN患者因肾组织纤维化诱发肾功能衰竭而死亡,故国内外众多学者对MsPGN进行了深入研究,但其病因及其致病机制至今尚未阐明。因此,继续探讨MsPGN发病的始动因素及其病变的分子机制是当今医学领域中的一项艰巨任务。

大鼠Thy-1肾炎(Thy-1 nephritis, Thy-1N)是一种公认的研究人类MsPGN的动物模型<sup>[3-4]</sup>。给大鼠注射Thy-1抗体(Thy-1 Ab)后,该抗体能与大鼠GMCs表面的Thy-1抗原结合,形成免疫复合物,后者可通过激活补体导致肾小球损伤和继发增生病变。本课题组前期研究已揭示,在大鼠Thy-1N病变早期,肾小球内部分GMCs表面可见补体C5b-9复合物沉积,但此时大多细胞形态完好,并且部分细胞还呈现出增殖反应<sup>[5]</sup>,提示作用于GMCs的C5b-9属于亚溶解型C5b-9(sublytic C5b-9)。已发现sublytic C5b-9可作为有核细胞的刺激原,活化细胞内多条信号通路和上调多种转录因子,从而改变细胞的生物学行为<sup>[6-7]</sup>。此外,本课题组体外用sublytic C5b-9刺激大鼠GMCs后,GMCs亦呈现明显的增殖反应<sup>[5,8]</sup>。提示,sublytic C5b-9对GMCs的刺激确能引起细胞增殖反应,但其促增殖的机制尚未完全阐明。

为了揭示sublytic C5b-9促进Thy-1N大鼠GMCs增殖的分子机制,本课题组前期实验先利用基因芯片检查了sublytic C5b-9刺激大鼠GMCs后40 min和3 h时基因表达谱系的变化,并与Thy-1N发病早期(40 min和3 h)肾组织基因谱的改变进行比对,结果发现了一些体内外同期共上调的基因。其中,芯片检查显示特异性蛋白1(specificity protein 1, SP1)上述两时段的上调倍数均较高。

SP1基因位于人类染色体的12q13.13区域,编码长737个氨基酸的蛋白,SP1属于SP/krüppel样转录因子家族成员,在体内广泛表达<sup>[9]</sup>。已发现SP1具有诱导细胞增殖和分化等功能。如Liu等<sup>[10]</sup>报道,SP1能通过上调组织分化诱导非蛋白编码RNA(tissue differentiation-inducing non-protein coding RNA, TINCR)的表达促进乳腺癌细胞增殖。另外,Li等<sup>[11]</sup>研究表明,微小RNA-376a(microRNA-376a)

可通过靶向降解SP1 mRNA下调其蛋白表达量,从而抑制胶质瘤细胞增殖。不过迄今为止,有关SP1表达上调与GMCs增殖的关系尚未见文献报道。据此,本研究拟分别从体内(Thy-1N大鼠的肾组织)和体外(sublytic C5b-9刺激的大鼠GMCs)检查SP1的表达水平及其时相,然后构建大鼠SP1野生型表达质粒和发夹状小干扰RNA(shRNA)表达质粒,借此探讨过表达或沉默SP1基因对sublytic C5b-9诱导大鼠GMCs增殖病变的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验动物雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠,180~200 g,购自英国B&K公司。大鼠GMCs(HBZY-1)购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。Thy-1抗体根据文献由本室制备<sup>[12-13]</sup>。补体来自混合后分装的20名健康志愿者新鲜血清(normal human serum, NHS)。TRIzol(Invitrogen公司,美国),逆转录试剂盒(HiScript II Q RT SuperMix for qPCR)(南京诺唯赞生物科技有限公司),ECL化学发光试剂盒(Cell Signaling公司,美国),PVDF膜(Roche公司,瑞士),pEGFP-N1质粒(Clontech公司,美国),pGenesil-1/GFP载体、DNA片段(上海吉玛制药技术有限公司),T4 DNA连接酶、各种限制性内切酶(Fermentas公司,美国),质粒抽提试剂盒(Qiagen公司,德国),Neon™电转缓冲液(Invitrogen公司,美国),CCK-8(cell counting kit-8)试剂盒(同仁化学研究所,日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 复制大鼠Thy-1N模型

取雄性SD大鼠(180~200 g),尾静脉注射Thy-1抗体(0.75 mL/100 g)。分别于注射Thy-1抗体前(即0 h)和注射Thy-1抗体后不同时间点(即2、4、6、8、10、12、24 h)取大鼠肾皮质( $n=6$ ),标本冻存后分别用于mRNA和蛋白表达的检查。同法SD大鼠尾静脉注射Thy-1抗体(同时设对照组, $n=6$ ),取实验7 d时大鼠肾组织标本,行石蜡包埋。

#### 1.2.2 大鼠GMCs培养和sublytic C5b-9刺激

将大鼠GMCs接种于50 mL细胞培养瓶内,培养基为MEM(minimal essential medium)及10%胎牛血清(FBS),置于37℃、5% CO<sub>2</sub>孵育箱孵育,当细胞生长至90%融合时,加入0.25%胰蛋白酶1 mL,于孵育箱中孵育消化3~5 min,收集细胞,离心5 min(1 000 r/min),弃上清,同法用PBS离心洗涤2次,再用营养液稀释至所需浓度转种于培养瓶内继续培养。当GMCs生长

至60%融合时,分别给予Thy-1抗体和NHS,即:MEM中加入Thy-1抗体(50 μL/mL)于37℃CO<sub>2</sub>孵箱内培养30 min,取出经PBS缓冲液洗1次,加入NHS(40 μL/mL,提供补体)在孵箱内按所需时间培养(0、2、4、6、8、10、12、24 h, n=3),裂解细胞分别用于mRNA和蛋白表达的测定。

### 1.2.3 大鼠SP1基因真核表达载体的构建与鉴定

使用PCR法获得大鼠SP1基因mRNA的编码区(同时在3'端加上His标签)。将纯化的SP1-His PCR产物和pEGFP-N1质粒用Hind III和Kpn I行双酶切,割胶法纯化酶切后的SP1-His PCR产物和线性化的pEGFP-N1。将两者在T4 DNA连接酶的作用下进行反应,连接产物转化感受态细菌*E. Coli* Top10,涂布于含卡那霉素抗性(终浓度为100 μg/mL)的LB平板上,37℃恒温箱过夜,挑取单克隆菌落接种于3 mL含卡那霉素抗性(终浓度为100 μg/mL)的LB培养液中,37℃培养过夜。用质粒纯化试剂盒提取质粒,送南京金斯瑞生物科技有限公司进行DNA测序分析确证,构建的重组质粒命名为pEGFP-N1/SP1-His。

### 1.2.4 大鼠SP1基因发卡状小干扰RNA的设计、构建与鉴定

使用BLOCK-iT™ RNAi Designer(Thermo Fisher Scientific公司,美国)设计3个针对大鼠SP1基因的发卡状小干扰RNA(shRNA),序列见表1。合成的DNA片段两端设计有BamH I和Hind III酶切位点,便于与pGenesil-1/GFP载体克隆连接。以上序列由上海吉玛制药技术有限公司合成,测序证实目的DNA片段克隆入pGenesil-1/GFP中。构建的重组质粒分别命名为SP1 shRNA-1(shSP1-1)、SP1 shRNA-2(shSP1-2)和SP1 shRNA-3(shSP1-3)。

表1 SP1 shRNA的干扰序列

Table 1 SP1 shRNA interference sequences		
shRNA	序列(5'→3')	位点(bp)
shSP1-1	GCGACCAAGATCACTCAATGG	43~63
shSP1-2	GCAAGTTCTGACAGGTCTACC	515~535
shSP1-3	GCAACATTATTGCTGCTATGC	706~726

### 1.2.5 大鼠GMCs转染

使用Neon™电转仪将pEGFP-N1/SP1-His和pEGFP-N1分别转染到大鼠GMCs(步骤见Neon™电转仪说明书),将转染后的细胞继续培养48 h,用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)的表达情况,同时收集细胞检测SP1蛋白

表达(n=3)和细胞增殖(n=5)。同法,将shSP1-1、shSP1-2、shSP1-3和shCTR分别转染大鼠GMCs,转染后48 h测SP1的mRNA丰度(筛选出最佳沉默效率的shSP1),或将shSP1和shCTR分别转染到大鼠GMCs,转染后48 h给予sublytic C5b-9刺激4 h(测SP1蛋白表达, n=3)和48 h(测细胞增殖, n=5)。

### 1.2.6 real-time PCR测定SP1的mRNA水平

利用Primer-BLAST(NCBI)设计real-time PCR引物,用以扩增大鼠SP1和β-actin基因。引物序列如下:SP1上游引物5'-CCCAGGAAACCCTCCAGAAC-3', SP1下游引物5'-GCATAGGGGCCAAGGTGATT-3'; β-actin上游引物5'-TCACCCACACTGTGCCATCTATGA-3', β-actin下游引物5'-CATCGGAACCGCTCATTGCCGATAG-3'。采用TRIzol一步法抽提大鼠肾组织或GMCs中的总RNA。取1 μg总RNA作为模板,逆转录成cDNA,再用real-time PCR检测SP1和β-actin基因的mRNA丰度。反应参数为50℃2 min, 95℃10 min; 95℃15 s, 60℃1 min, 重复40个循环;在60℃进行单点荧光检测。以下列公式计算实验结果:  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 。

### 1.2.7 Western blot检查SP1蛋白表达

取大鼠肾皮质或大鼠GMCs,加入裂解液进行裂解,裂解物12 000 r/min离心5 min,取上清煮沸5 min使蛋白变性,而后上样电泳,再将蛋白转到PVDF膜上。将PVDF膜封闭后放进一抗中孵育(4℃过夜),TBST洗涤10 min×3次。将PVDF膜放进二抗中孵育(室温1 h),洗涤后加入ECL发光液进行曝光。

### 1.2.8 CCK-8检查GMCs增殖水平

使用NeonS电转仪将pEGFP-N1/SP1-His和pEGFP-N1分别转染大鼠GMCs,46 h后加入CCK-8继续培养2 h。培养结束后,用酶标仪(450 nm)检测吸光度值。此外,将shSP1和shCTR分别转染到大鼠GMCs,48 h后给予sublytic C5b-9刺激,继续培养46 h后再加入CCK-8继续培养2 h,最后检测450 nm时的吸光度值。

### 1.2.9 HE染色观察Thy-1N大鼠肾组织形态学变化

取大鼠肾组织石蜡标本切片,行HE染色后显微镜下观察两组大鼠肾组织结构并计算肾小球细胞总数,即每个标本计数100个最大直径的肾小球内细胞数,取均值表示结果。

### 1.3 统计学方法

所得数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用SPSS18.0软件进行方差分析和Bonfferoni检验, P ≤ 0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Thy-1N大鼠肾组织内SP1基因的表达情况

大鼠肾组织内SP1 mRNA于Thy-1N诱导后2 h时显著上调,并达到峰值,从4 h开始逐渐降低(图1A),而SP1蛋白表达于Thy-1N诱导后2~4 h时达到峰值,之后逐渐降低(图1B、C)。HE染色显示,诱导Thy-1N后7 d时,大鼠肾小球细胞数较对照组显著增多(图1D、E)。表明大鼠Thy-1N模型复制成功。

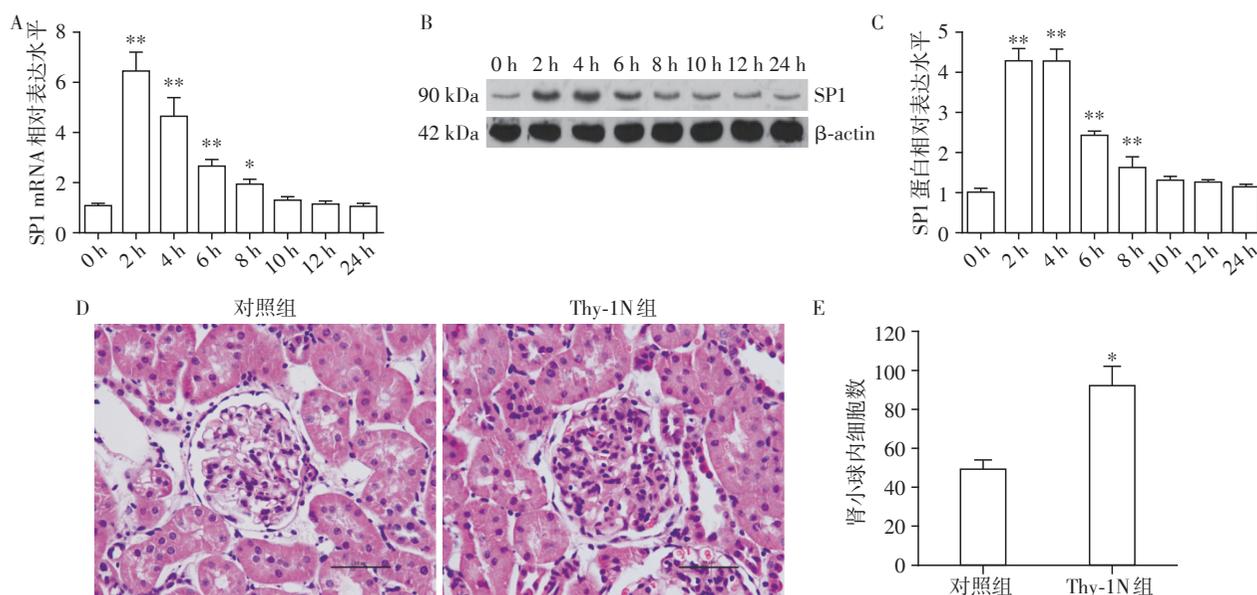
### 2.2 Sublytic C5b-9刺激大鼠GMCs中SP1基因的表达水平

Sublytic C5b-9刺激GMCs后2 h,SP1的mRNA明显上调,之后逐渐降低(图2A)。SP1蛋白表达水平于2~4 h时达到峰值,之后逐渐降低(图2B、C)。综合

前两部分的实验结果,发现SP1蛋白在体内(Thy-1N大鼠肾组织中)和体外(sublytic C5b-9刺激的大鼠GMCs中)均显著上调,且其表达时相基本一致。

### 2.3 过表达SP1基因能促进大鼠GMCs的增殖

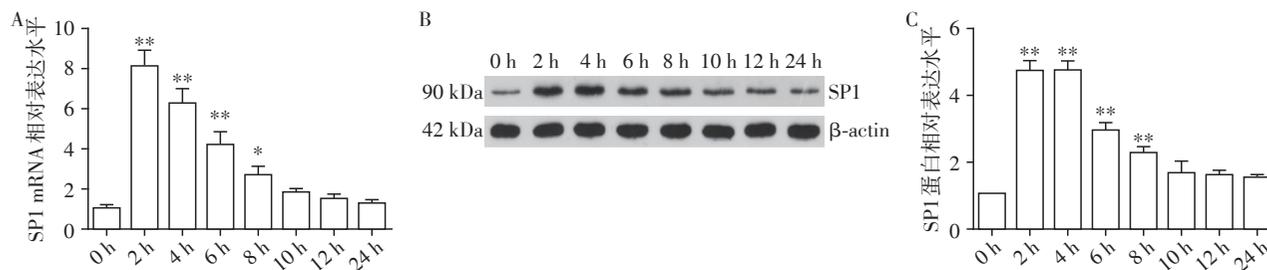
为探讨SP1基因过表达与大鼠GMCs增殖病变之间的关系,构建了大鼠SP1基因表达质粒(pEGFP-N1/SP1-His),并将pEGFP-N1/SP1-His和空载对照质粒(pEGFP-N1)分别转染大鼠GMCs,于转染后48 h开展如下检查:通过荧光显微镜观察大鼠GMCs中GFP的表达情况(图3);使用抗SP1抗体和抗His抗体行Western blot鉴定SP1的表达量(图4A、B);行CCK-8实验测定GMCs的增殖水平(图4C)。上述结果显示,转染质粒后48 h大鼠GMCs中GFP表达率约为80%。与pEGFP-N1组相比,pEGFP-N1/SP1-



A~C: real-time PCR和Western blot检查Thy-1N大鼠肾组织中SP1的mRNA(A)和蛋白水平(B;电泳图;C:半定量分析)。与0 h比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ( $n=6$ )。D~E: HE染色观察大鼠肾小球增生情况。D: HE染色代表图片( $\times 400$ )。E:计数两组大鼠肾小球内细胞数,与对照组比较,\* $P < 0.01$ ( $n=6$ )。

图1 Thy-1N大鼠肾组织中SP1的表达水平和肾小球病理改变

Figure 1 The expression of SP1 in the renal tissues of Thy-1N rats and the glomerular pathological changes

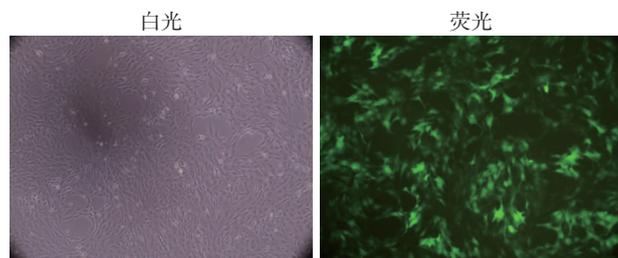


Real-time PCR检查受sublytic C5b-9刺激的大鼠GMCs中SP1的mRNA丰度(A)和蛋白水平(B;电泳图;C:半定量分析)。与0 h比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ( $n=3$ )。

图2 sublytic C5b-9刺激的大鼠GMCs中SP1的表达水平

Figure 2 The expression of SP1 in rat GMCs induced by sublytic C5b-9

His 质粒转染大鼠 GMCs 后 SP1 的表达显著上调,细胞增殖水平亦明显提高。提示,SP1 基因可能具有促大鼠 GMCs 增殖的功能。



将 pEGFP-N1 质粒转染大鼠 GMCs, 转染后 48 h 使用荧光显微镜观察 GMCs 中 GFP 蛋白的表达。

图3 大鼠 GMCs 中 GFP 的表达情况 (×100)

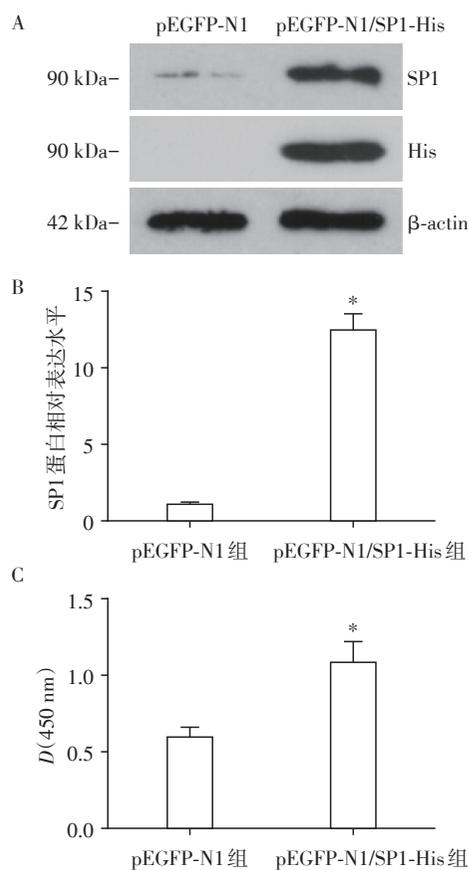
Figure 3 GFP expression in rat GMCs (×100)

#### 2.4 沉默 SP1 基因可抑制 sublytic C5b-9 诱导的大鼠 GMCs 增殖反应

为进一步阐明 sublytic C5b-9 上调 SP1 表达与 GMCs 增殖之间的关系,构建了 SP1 发夹状小干扰质粒 (shSP1-1、shSP1-2、shSP1-3),并将 shSP1-1、shSP1-2、shSP1-3 及其乱序对照质粒 (shCTR) 分别转入大鼠 GMCs,转染后 48 h 再给予 sublytic C5b-9 刺激 2 h,行 real-time PCR 检查各组细胞内 SP1 的 mRNA 含量,发现 shSP1-1 转染组的 SP1 mRNA 水平最低(图 5)。提示,shSP1-1 为最佳沉默效率的 shRNA。接着将 shSP1-1 和 shCTR 转染大鼠 GMCs,转染后 48 h 再给予 sublytic C5b-9 刺激,4 h 后测定 SP1 蛋白表达(图 6A、B),48 h 后检测细胞增殖水平(图 6C)。结果发现,shSP1-1 可明显抑制由 sublytic C5b-9 诱导的 SP1 蛋白表达和 GMCs 增殖。上述结果提示,sublytic C5b-9 诱导大鼠 GMCs 增殖过程中,其上调 SP1 基因的表达有促进 GMCs 增殖的作用。

### 3 讨论

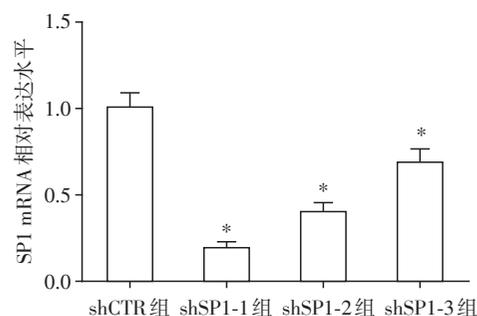
大鼠 Thy-1N 的病理变化类似于人类 MsPGN,因此该肾炎模型常被用于 MsPGN 的实验研究<sup>[3,14]</sup>。已知大鼠 Thy-1N 病变具有补体依赖性<sup>[15]</sup>。本课题组前期研究揭示,在大鼠 Thy-1N 发病早期,肾小球内出现了补体 C5b-9 复合物的沉积,并且被 C5b-9 复合物包绕的 GMCs 并未溶解,部分 GMCs 还发生了增殖反应<sup>[5]</sup>。提示,此种 C5b-9 复合物属于 sublytic C5b-9 复合物,而 GMCs 增殖可能与 sublytic C5b-9 直接刺激有一定关系。已知 sublytic C5b-9 的形成是由于有核细胞的表面存在膜辅助蛋白(membrane cofactor protein, MCP)、衰变加速因子(decay-accelerating



A、B:将 pEGFP-N1/SP1-His 和 pEGFP-N1 质粒分别转染大鼠 GMCs, 转染后 48 h 检查 SP1、His 的表达 (A: Western blot; B: 半定量分析, n=3); C: CCK-8 检测细胞增殖情况 (n=5)。与 pEGFP-N1 转染组比较, \*P < 0.01。

图4 pEGFP-N1/SP1-His 转染对 SP1 表达和大鼠 GMCs 增殖的影响

Figure 4 The effects of pEGFP-N1/SP1-His transfection on SP1 expression and GMC proliferation

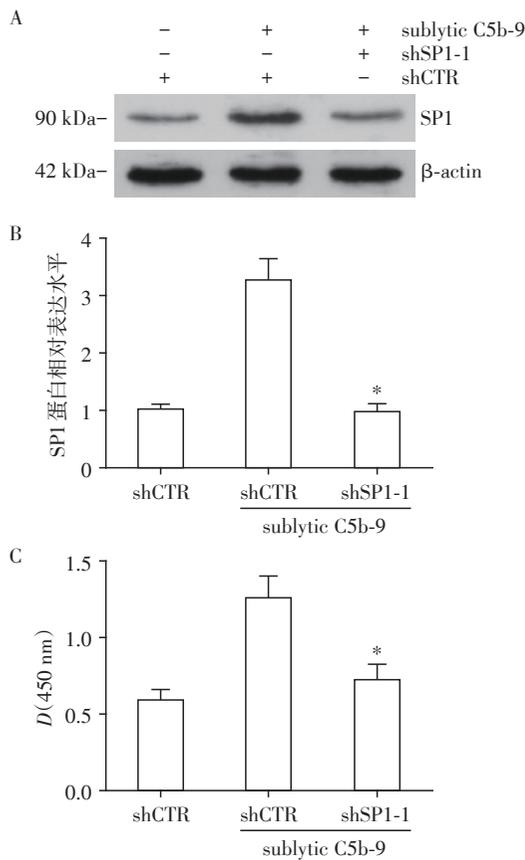


将 shSP1-1、shSP1-2、shSP1-3 和 shCTR 分别转入大鼠 GMCs, 转染后 48 h 提取 RNA, 行 real-time PCR 检查各组细胞内 SP1 mRNA 含量。与 shCTR 转染组比较, \*P < 0.01 (n=3)。

图5 shSP1 最佳靶点的筛选

Figure 5 The selection of most effective shSP1

factor, DAF) 和 CD59 等诸多膜保护因子,这些补体调节蛋白不仅妨碍了 C5b-9 插入靶细胞膜,而且还



A、B: 将 shSP1-1 和 shCTR 转染大鼠 GMCs, 转染 48 h 后再给予 sublytic C5b-9 刺激, 4 h 后测定 SP1 蛋白表达 (A: Western blot; B: 半定量分析, n=3); C: CCK-8 检测细胞增殖水平 (n=5)。与 shCTR+sublytic C5b-9 组比较, \*P < 0.01。

图6 shSP1-1 对 sublytic C5b-9 诱导的 SP1 表达和 大鼠 GMCs 增殖的影响

Figure 6 The effects of shSP1-1 on SP1 expression and GMCs proliferation induced by sublytic C5b-9

阻止了 C9 在胞膜上的聚合<sup>[16]</sup>。研究表明, sublytic C5b-9 虽不能导致靶细胞溶解坏死, 但能诱导靶细胞发生多种生物学效应, 如引发细胞增殖等<sup>[6]</sup>。

已发现细胞增殖与增殖相关基因的表达上密切相关<sup>[17]</sup>。本课题组以往基因芯片数据显示, 在 Thy-1N 发病早期的大鼠肾组织和 sublytic C5b-9 刺激的大鼠 GMCs 中, 增殖相关基因 SP1 的上调倍数较为明显。已知 SP1 基因在体内广泛表达, 具有诱导细胞增殖等功能<sup>[10-11]</sup>。但是 SP1 是否参与 sublytic C5b-9 诱导的 Thy-1N 大鼠 GMCs 增殖, 目前尚未见文献报道。本研究首先复制了大鼠 Thy-1N 模型, 并于不同时间点提取肾组织, 检查其 SP1 mRNA 和蛋白表达水平。同时, 体外用 sublytic C5b-9 刺激大鼠 GMCs, 测定其不同时间点 SP1 的表达量。结果发现, SP1 的 mRNA 和蛋白表达均显著上调, 且在体内

和体外呈现出相似的表达趋势。鉴于 SP1 的生物学功能与细胞增殖明显相关, 加上本研究已发现 SP1 基因在体内和体外均显著表达, 故进一步探讨了 SP1 表达在 sublytic C5b-9 诱导大鼠 GMCs 增殖中的作用。

本研究构建了大鼠 SP1 野生型表达质粒 (pEGFP-N1/SP1-His) 和针对 3 个不同靶点的大鼠 SP1 shRNA (即 shSP1-1、shSP1-2、shSP1-3) 表达质粒, 分别将其导入大鼠 GMCs 中 (同时设 pEGFP-N1 或 shCTR 对照质粒转染组), 再给予或不给予 sublytic C5b-9 刺激, 检查其 SP1 基因的表达和沉默情况, 同时测定细胞增殖水平。实验发现, 将 pEGFP-N1/SP1-His 质粒转染大鼠 GMCs 后, 既能明显上调 GMCs 中 SP1 的表达, 又能显著促进 GMCs 增殖。另外, 将 shSP1-1、shSP1-2 和 shSP1-3 质粒转染大鼠 GMCs 后均能下调细胞中 SP1 表达, 其中以 shSP1-1 质粒沉默 SP1 基因的效果最佳。进一步用 shSP1-1 质粒处理大鼠 GMCs, 发现其不仅可有效抑制 sublytic C5b-9 诱导的 SP1 表达, 而且还能明显减低 sublytic C5b-9 刺激诱导的 GMCs 增殖。综上所述, 在 Thy-1N 大鼠发病的早期, SP1 基因的表达上调参与了 sublytic C5b-9 引发的大鼠 GMCs 增殖反应。由于 SP1 是一个促增殖转录因子, 故本研究所获结果提供了有用的前期实验依据, 便于今后进一步深入研究 SP1 基因调控 sublytic C5b-9 诱导的 Thy-1N 大鼠 GMCs 增殖的分子机制。

[参考文献]

[1] Wang C, Feng Y, Wang M, et al. Volatile organic metabolites identify patients with mesangial proliferative glomerulonephritis, IgA nephropathy and normal controls [J]. Sci Rep, 2015, 5: 14744

[2] Axelsen M, Smith Pedersen R, Heaf JG, et al. Mesangioproliferative glomerulonephritis: a 30-year prognosis study [J]. Nephron Extra, 2014, 4(1): 26-32

[3] Bai J, Geng W, Mei Y, et al. Effect of huaier on the proliferation of mesangial cells in anti-Thy-1 nephritis [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(6): 2441-2452

[4] 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

[5] Qiu W, Zhang Y, Liu XM, 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

[6] Vlaicu SI, Tatomir A, Boodhoo D, et al. RGC-32 is ex-

- pressed in the human atherosclerotic arterial wall: Role in C5b-9-induced cell proliferation and migration [J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 101(2):221-230
- [7] Du Y, Teng X, Wang N, et al. NF- $\kappa$ B and enhancer-binding CREB protein scaffolded by CREB-binding protein (CBP)/p300 proteins regulate CD59 protein expression to protect cells from complement attack [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(5):2711-2724
- [8] Gao L, Qiu W, Wang Y, et al. Sublytic complement C5b-9 complexes induce thrombospondin-1 production in rat glomerular mesangial cells via PI3-k/Akt: association with activation of latent transforming growth factor- $\beta$ 1 [J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 144(2):326-334
- [9] O'connor L, Gilmour J, Bonifer C. The role of the ubiquitously expressed transcription factor Sp1 in tissue-specific transcriptional regulation and in disease [J]. *Yale J Biol Med*, 2016, 89(4):513-525
- [10] Liu Y, Du Y, Hu X, et al. Up-regulation of ceRNA TINCR by SP1 contributes to tumorigenesis in breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):367
- [11] Li Y, Wu Y, Sun Z, et al. MicroRNA-376a inhibits cell proliferation and invasion in glioblastoma multiforme by directly targeting specificity protein 1 [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1):1583-1590
- [12] Xu JH, Qiu W, Wang YW, et al. Gene expression profile and overexpression of apoptosis-related genes (NGFI-B and Gadd 45 gamma) in early phase of Thy-1 nephritis model [J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 326(1):159-168
- [13] Wang Y, He Q, Qin H, et al. The complement C5b-9 complexes induced injury of glomerular mesangial cells in rats with Thy-1 nephritis by increasing nitric oxide synthesis [J]. *Life Sci*, 2006, 79(2):182-192
- [14] Rintala JM, Savikko J, Rintala SE, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition with erlotinib ameliorates anti-Thy 1.1-induced experimental glomerulonephritis [J]. *J Nephrol*, 2016, 29(3):359-365
- [15] Sato T, Van Dixhoorn MG, Prins FA, et al. The terminal sequence of complement plays an essential role in antibody-mediated renal cell apoptosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10(6):1242-1252
- [16] Hillman Y, Mazkereth N, Farberov L, et al. Regulation of complement-dependent cytotoxicity by microRNAs miR-200b, miR-200c, and miR-217 [J]. *J Immunol*, 2016, 196(12):5156-5165
- [17] Wu FJ, Lin TY, Sung LY, et al. BMP8A sustains spermatogenesis by activating both SMAD1/5/8 and SMAD2/3 in spermatogonia [J]. *Sci Signal*, 2017, 10(477):1910
- [收稿日期] 2018-05-14

(上接第 1493 页)

- [10] Shundo C, Zhang H, Nakanishi T, et al. Cytotoxicity evaluation of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanoparticles in mouse embryonic stem cells [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012, 97:221-225
- [11] Zhao L, Huo M, Liu J, et al. *In vitro* investigation on the magnetic thermochemo therapy mediated by magnetic nanoparticles combined with methotrexate for breast cancer treatment [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2013, 13: 741-745
- [12] An Y, Tang Q, Rui Y, et al. *In vitro* MR imaging of folate-receptor expression with the folate-specific nanospheres in a C6 glioblastoma model [J]. *Comput Assist Surg (Abingdon)*, 2017, 22(sup1):312-318
- [13] Li HB, Ke F, An YL, et al. Gemcitabine-loaded magnetic albumin nanospheres for cancer chemohyperthermia [J]. *J Nanopart Res*, 2013, 15(3):1513
- [14] Yuan C, An Y, Zhang J, et al. Magnetic nanoparticles for targeted therapeutic gene delivery and magnetic-inducing heating on hepatoma [J]. *Nanotechnology*, 2014, 25(34):345101
- [15] 杜益群, 张东生, 倪海燕, 等. 肿瘤热疗用  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  磁性纳米粒子的生物相容性研究 [J]. *南京大学学报(自然科学版)*, 2006, 36(3):324-330
- [16] Li J, Di Y, Jin C, et al. Gemcitabine-loaded albumin nanospheres (GEM-ANPs) inhibit PANC-1 cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2013, 8(1):176
- [17] Yang R, Chen DZ, Li MF, et al. 20(s)-ginsenoside Rg3-loaded magnetic human serum albumin nanospheres applied to HeLa cervical cancer cells *in vitro* [J]. *Biomed Mater Eng*, 2014, 24(6):1991-1998
- [18] Zhang H, Liang C, Hou XX, et al. Study of the combined treatment of lung cancer using gene-loaded immunomagnetic albumin nanospheres *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11:1039-1050
- [19] Crombet Ramos T, Camilo Rodriguez P, Neningen Vinageras E, et al. CIMAvax EGF (EGF-P64K) vaccine for the treatment of non-small-cell lung cancer [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2015, 14(10):1303-1311
- [20] Yang R, An YL, Miao FQ, et al. Preparation of folic acid-conjugated, doxorubicin-loaded, magnetic bovine serum albumin nanospheres and their antitumor effects *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9:1-13
- [收稿日期] 2018-07-24