

· 基础研究 ·

用 sublytic C5b-9 刺激上调的 KLF5 对大鼠肾小球系膜细胞合成 IL-36 α 的影响

罗 灿¹, 王文博¹, 吴志皎¹, 刘龙飞¹, 谢梦晓¹, 邱 文¹, 张 婧¹, 赵 聘¹, 季明德^{2*}, 王迎伟^{1*}

¹南京医科大学基础医学院免疫学系, 江苏 南京 211166; ²南京中医药大学附属江苏省中医院检验科, 江苏 南京 210029

[摘 要] 目的:探讨转录因子 Krüppel 样因子 5(Krüppel-like factor, KLF5)调控 sublytic C5b-9 刺激大鼠肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cell, GMC)合成促炎因子白细胞介素(interleukin, IL)-36 α 的作用。方法:首先,培养大鼠 GMC,体外用 sublytic C5b-9 刺激 GMC 后,不同时间点行反转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)和蛋白质印迹(Western blot)检查 KLF5、IL-36 α mRNA 和蛋白水平的变化。接着,构建 KLF5 的过表达(pIRES2-KLF5)及发夹状小干扰 RNA(shKLF5)质粒。将 pIRES2-KLF5 转染 GMC 或在 shKLF5 转染 GMC 后再用 sublytic C5b-9 刺激,行 RT-PCR 和 Western blot 检查过表达或沉默 KLF5 基因后对 GMC 合成 IL-36 α 的影响。同时用荧光素酶报告实验检查过表达或沉默 KLF5 基因对 IL-36 α 启动子活性的影响。结果:用 sublytic C5b-9 刺激 GMC,能显著上调 KLF5 和 IL-36 α 的 mRNA 和蛋白表达,且 KLF5 的表达时相早于 IL-36 α 。过表达 KLF5 能上调 IL-36 α 的生成,而沉默 KLF5 基因后再行 sublytic C5b-9 刺激,由 GMC 产生的 IL-36 α 则显著下降。sublytic C5b-9 刺激 GMC 或过表达 KLF5 基因均可提高 IL-36 α 启动子的活性,而沉默 KLF5 基因则能明显减低 sublytic C5b-9 上调 IL-36 α 启动子的活性。结论:KLF5 的表达对 sublytic C5b-9 诱导 GMC 合成 IL-36 α 有促进作用。

[关键词] sublytic C5b-9; 肾小球系膜细胞(GMC); krüppel 样因子 5(KLF5); 白细胞介素-36 α (IL-36 α)

[中图分类号] R692.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)03-367-07

doi:10.7655/NYDXBNS20200312

Effects of KLF5 expression on IL - 36 α production in the glomerular mesangial cell stimulated by sublytic C5b-9

LUO Can¹, WANG Wenbo¹, WU Zhijiao¹, LIU Longfei¹, XIE Mengxiao¹, QIU Wen¹, ZHANG Jing¹, ZHAO Dan¹, JI Mingde^{2*}, WANG Yingwei^{1*}

¹Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 211166;

²Department of Clinical Laboratory, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to explore the regulatory role of transcription factor Krüppel-like factor 5 (KLF5) in the proinflammatory factor [i.e. interleukin (IL)-36 α] production in rat glomerular mesangial cells (GMC) stimulated by sublytic C5b-9. **Methods:** First, the changes of KLF5 or IL-36 α mRNA and protein at different time were examined by reverse transcription PCR (RT-PCR) and Western blot in the GMC stimulated by sublytic C5b-9. Then, the plasmids of KLF5 overexpression (pIRES2-KLF5) and KLF5 short hairpin RNA (shKLF5) were generated and transfected rat GMC respectively, and the cells were treated with or without sublytic C5b-9. The effects of overexpressing KLF5 gene or silencing KLF5 gene on IL-36 α synthesis in the GMC induced by sublytic C5b-9 were detected by RT-PCR and Western blot. Meanwhile, the activity of IL-36 α promoter after KLF5 gene overexpression or knockdown in the GMC was measured by luciferase reporter assay. **Results:** The mRNA and protein expression of KLF5 and IL-36 α were obviously elevated in the GMC stimulated by sublytic C5b-9, and the expression phase of KLF5 was earlier than that of IL-36 α . KLF5 overexpression could promote IL-36 α production, but KLF5 knockdown markedly decreased IL-36 α expression in the GMC upon sublytic C5b-9 incubation. Sublytic C5b-9 treatment or KLF5 overexpression could significantly up-regulate IL-36 α promoter

[基金项目] 国家自然科学基金(81603358, 31770934, 81971468)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 37693532@qq.com; yingweiwang@njmu.edu.cn

activity, but KLF5 gene knockdown remarkably declined IL-36 α promoter activity stimulated by sublytic C5b-9. **Conclusion:** The up-regulation of KLF5 has a promoting role in IL-36 α synthesis in rat GMC stimulated by sublytic C5b-9.

[Key words] sublytic C5b-9; glomerular mesangial cells(GMC); krüppel-like factor 5(KLF5); interleukin-36 α (IL-36 α)

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(03):367-373]

人类系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)是一种免疫性炎症肾脏疾病,其肾组织中常有多种促炎细胞因子的生成增多^[1]。大鼠Thy-1肾炎(Thy-1 nephritis, Thy-1N)是当今公认研究MsPGN的动物模型^[2-3],其制作原理是用幼龄大鼠胸腺细胞[因其表面含有与大鼠肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cell, GMC)共同的Thy-1抗原]免疫家兔,制备抗大鼠胸腺细胞血清(含Thy-1抗体),给大鼠注射该血清,抗体能迅速与鼠GMC表面的Thy-1抗原结合,继而激活补体系统,最终产生终末效应产物(C5b-9复合物),导致肾脏损害。已有文献报告,在MsPGN患者的肾小球内也可见C5b-9的沉积,且C5b-9的沉积量与组织损伤明显相关^[4]。

近年研究表明,补体C5b-9对靶细胞的作用可分为全溶解(lytic)和亚溶解(sublytic)两大类。已知lytic C5b-9能引起有核细胞膜穿孔,致使细胞溶解,而sublytic C5b-9虽不导致细胞破裂,但能引起细胞凋亡^[5-6]、增殖^[7]和合成促炎因子^[8]。本课题组以往实验已经证实,大鼠Thy-1N病变有sublytic C5b-9的依赖性。sublytic C5b-9在体外刺激GMC后可活化细胞多条信号转导通路,诱导细胞产生不同的生物学效应^[5-8]。

业已发现,体外sublytic C5b-9刺激GMC生成促炎因子时,不仅可激活信号分子,而且还需要转录因子的辅助^[8]。本课题前期实验已显示,Thy-1N大鼠的肾组织和用sublytic C5b-9刺激的GMC中,转录因子Krüppel样因子5(Krüppel-like factor, KLF5)和炎症因子白细胞介素(interleukin, IL)-36 α 的表达均显著升高,且KLF5的升高时间还略早于IL-36 α 基因的表达。这一结果提示,KLF5的表达可能与IL-36 α 的合成存在联系。

KLF5是一种属于SP/KLF家族成员的转录因子,广泛表达于人体的不同组织^[9]。已知KLF5的羧基端含3个共同的C₂H₂锌指结构域(ZF),具有结合DNA的功能。此外,KLF5还含脯氨酸的转录激活结构域(TAD),可调控靶基因转录和表达^[9]。Fujiu

等^[10]发现,在小鼠肾脏中,KLF5能参与调节小鼠肾小管间质的炎症反应。提示KLF5的表达升高与炎症损伤有一定关系。

IL-36 α 属于IL-1家族的一个成员,在皮肤和其他器官的上皮组织炎症中有促炎作用^[11]。已有文献报道,在炎性肠病时,IL-36 α 能促进人结肠上皮肌成纤维细胞分泌IL-6和趋化因子^[12]。另有资料显示,IL-36 α 在银屑病^[11]和类风湿关节炎^[13]中也有促炎效应。

本课题组前期研究已表明,Thy-1N肾炎大鼠的肾组织和体外受sublytic C5b-9刺激的GMC中,KLF5和IL-36 α 表达均显著升高,且KLF5的表达高峰还稍早于IL-36 α 的上升峰值。于是猜测,KLF5的表达上调可能对sublytic C5b-9诱导的IL-36 α 合成有一定影响。鉴于此,本课题开展了下列实验。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和载体

大鼠GMC细胞株HBZY-1(武汉大学中国典型培养物保藏中心);pIRES2-EGFP载体(滁州通用生物系统有限公司);pGPU6/GFP/Neo/shRNA载体(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(Promega公司,美国);pIRES2-KLF5过表达质粒(滁州通用生物系统有限公司);IL-36 α 基因启动子全长报告质粒由本课题组构建保存。

1.1.2 主要试剂

多克隆兔抗大鼠胸腺细胞血清(anti-thymocyte serum, ATS),含Thy-1抗体,效价>1:640,由本实验室自制^[5-8,14],56℃水浴30 min灭活补体后使用。新鲜补体来自20例健康人志愿者新鲜血清(normal serum, NS)。MEM培养液(Gibco公司,美国)。2×Taq Plus Master Mix(DyePlus)(南京诺唯赞生物科技有限公司);小鼠抗大鼠KLF5多克隆抗体(sc-398470)(Santa Cruz公司,美国);兔抗大鼠IL-36 α 多克隆抗体(abs134452)(上海爱必信生物科技

有限公司); Invitrogen Lipofectamine[®] 2000 Reagent (赛默飞世尔科技公司, 美国); 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Dual-Luciferase[®] Reporter Assay) (Promega 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 GMC 培养和传代

将大鼠 GMC 细胞株接种于 MEM 完全培养液内, 置 CO₂ 孵箱中培养 48 h。当细胞密度达到 90% 左右时, 先用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 1 遍, 再用 1 mL 胰蛋白酶消化细胞, 随后加入 MEM 完全培养液终止消化。收集细胞悬液至离心管中, 1 000 g 离心 5 min, 弃上清, 再用 MEM 完全培养液重悬细胞, 按照 1:3 比例种于新的培养皿中继续培养。

1.2.2 sublytic C5b-9 刺激大鼠 GMC 最佳剂量的确定

将 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, 然后用不同浓度的 NS (提供补体) 进行孵育。随后, 用乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 法检查 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。本实验最终确定以 5% Thy-1 抗体与 3% NS 作为形成 sublytic C5b-9 的最佳剂量, 具体方法详见文献 [5-8] 所述。

1.2.3 KLF5 shRNA (shKLF5) 表达质粒的构建与鉴定

4 个针对 KLF5 基因不同靶点的 pGPU6/GFP/Neo/shRNA 由上海吉玛基因化学技术有限公司设计合成, 其靶点和靶序列如下: ① shKLF5-1 (靶点 KLF5-rat-570): 5'-GCTTCCTCCAGTTCCGATAAT-3'; ② shKLF5-2 (靶点 KLF5-rat-874): 5'-GCGCCAGAGGTGAACAATATC-3'; ③ shKLF5-3 (靶点 KLF5-rat-966): 5'-GCTGTTGAATACACCTGATCT-3'; ④ shKLF5-4 (靶点 KLF5-rat-1376): 5'-GCATC-CATTCTGTGATTATG-3'。实验以空载体作为阴性对照 (shCTR)。

1.2.4 验证 pIRES2-KLF5 的表达和筛选最佳沉默效率的 shKLF5

将 GMC 分为 pIRES2-EGFP 和 pIRES2-KLF5 两组, 转染 48 h 后提取细胞蛋白质, 行 Western blot 实验验证 KLF5 的表达。与此同时, 将 shCTR 质粒用 Lipo2000 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, 将 GMC 分为 6 组: 即 shCTR 组、shCTR+sublytic C5b-9 组、shKLF5-1+sublytic C5b-9 组、shKLF5-2+sublytic C5b-9 组、shKLF5-3+sublytic C5b-9 组、shKLF5-4+sublytic C5b-9 组 (即转染相应 shKLF5

质粒后再行 sublytic C5b-9 刺激细胞 3 h)。提取细胞蛋白, 用 Western blot 筛选沉默效率最高的 shKLF5。

1.2.5 sublytic C5b-9 刺激 GMC 后不同时间 KLF5 和 IL-36 α 基因转录和表达的变化

使用 sublytic C5b-9 刺激大鼠 GMC 不同时间 (0、1、2、3、6、12 h), 提取细胞 RNA 和蛋白, 行 RT-PCR 和 Western blot 检查其 KLF5 和 IL-36 α 的 mRNA 和蛋白表达的变化, 并比较两个指标的变化时相。RT-PCR 测定 KLF5 和 IL-36 α mRNA: 用 TRIzol 法抽提 GMC 的总 RNA。另用 Primer Premier 5 软件设计大鼠 KLF5 和 IL-36 α RT-PCR 引物, 并交由南京金斯瑞生物技术有限公司合成。引物序列如下: KLF5 上游 5'-GGTCCAGACAAGATGTGAAA-3', 下游 5'-GGTG-GCTGAAAATGGTAAC-3'; IL-36 α 上游 5'-GCAAT-GAACCAACCAGGG-3', 下游 5'-CGGGAAGGGAA-CATACTG-3'。PCR 反应在 ABI 2720 Thermal Cycler 上进行, 产物行琼脂糖凝胶电泳、成像 [5-6]。Western blot 检查 KLF5 和 IL-36 α 蛋白表达: 取 30 μ g 蛋白质上样于 10% 的 SDS-PAGE 胶中, 先 45 V 浓缩再用 120 V 电泳 2 h, 接着用 0.3 A 恒流湿转 120 min。PVDF 膜封闭后加入 KLF5 或 IL-36 α 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗涤后用 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, 洗涤后用 ECL 发光液涂沫并行曝光 [5-8]。

1.2.6 过表达或沉默 KLF5 基因对 GMC 合成 IL-36 α 的影响

首先将 GMC 分成以下 5 组: ① pIRES2-EGFP 组; ② pIRES2-KLF5 组; ③ shCTR; ④ shCTR+sublytic C5b-9 组; ⑤ shKLF5+sublytic C5b-9 组。①、② 组转染 pIRES2-EGFP 或 pIRES2-KLF5 质粒后 48 h 提取 RNA 和蛋白质; ③、④、⑤ 组则分别转染 shCTR 或 shKLF5 质粒后 48 h 再行 sublytic C5b-9 刺激 6 h, 接着提取 RNA 和蛋白质, 用 RT-PCR 和 Western blot 实验检查 KLF5 和 IL-36 α 的基因转录与表达水平。具体方法见前 1.2.5 所述。

1.2.7 过表达或沉默 KLF5 基因对 IL-36 α 基因启动子活性的影响

将前述质粒分别与 IL-36 α 全长启动子质粒共转染 GMC (分组同前)。然后用 1 \times 被动裂解缓冲液 (PLB) 裂解细胞, 行双荧光素酶报告实验测定 IL-36 α 启动子活性。先在检测管中加入 25 μ L 荧光素酶检测试剂 II, 放入荧光发光仪中, 接着转移 5 μ L PLB 裂解的细胞液到检测管中, 混合后检测萤火虫荧光素酶的活性, 最后向检测管中加入 25 μ L Stop&Glo[®] Reagent, 混匀后检测海肾荧光素酶的活性。萤火虫荧

光值/海肾荧光值的比值即为最终结果^[5-8]。

1.3 统计学方法

所有实验均独立重复3次,所得定量数据以均数±标准误($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)表示,两两比较采用配对 t 检验,组间比较则采用单因素方差分析。应用GraphPad-prism软件(版本5.01)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 sublytic C5b-9 刺激 GMC 不同时间点 KLF5 和 IL-36 α 基因表达的变化

用sublytic C5b-9刺激大鼠GMC 0、1、2、3、6、12 h,提取细胞RNA和蛋白质,行RT-PCR和Western blot

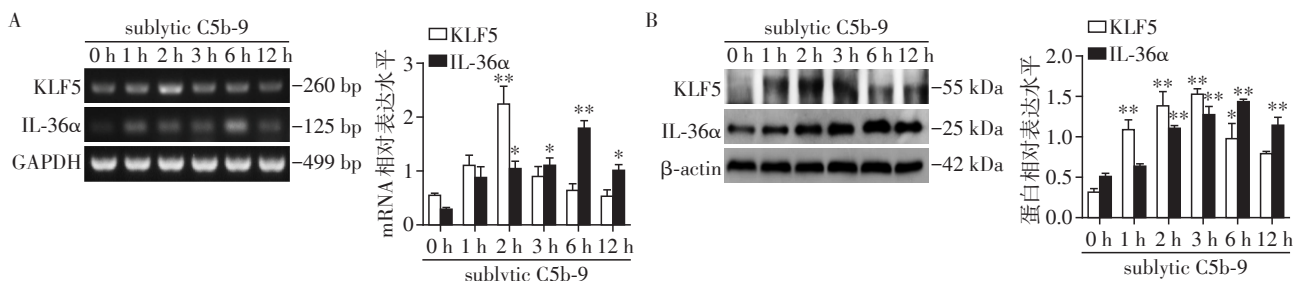
检查发现,sublytic C5b-9刺激GMC能上调KLF5和IL-36 α 基因的转录与表达,且KLF5 mRNA的升高在刺激2 h时达到峰值,而IL-36 α mRNA的升高则在6 h达到峰值(图1A)。此外,KLF5和IL-36 α 蛋白的上升则分别在3 h和6 h达到峰值(图1B)。

2.2 pIRES2-KLF5 过表达质粒表达蛋白的验证

将pIRES2-KLF5和pIRES2-EGFP对照质粒分别用Lipo2000转染至GMC中48 h,裂解细胞收取蛋白质,行Western blot检查证实,pIRES2-KLF5质粒转染组KLF5蛋白的表达水平明显高于对照组,差异有统计学意义(图2)。

2.3 shKLF5 质粒的构建与鉴定

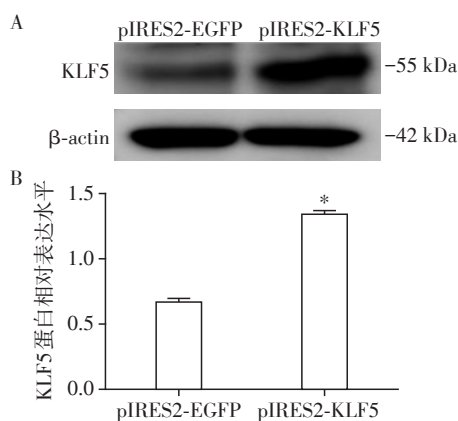
将公司合成的4个针对KLF5基因不同靶点的



A:用sublytic C5b-9刺激大鼠GMC 0、1、2、3、6、12 h,RT-PCR检查受刺激的GMC不同时间点KLF5和IL-36 α mRNA的变化;B:Western blot检查受刺激的GMC不同时间点KLF5和IL-36 α 蛋白水平的变化;与0 h比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图1 sublytic C5b-9刺激GMC不同时间KLF5和IL-36 α 基因mRNA和蛋白表达的变化

Figure 1 The changes of KLF5 or IL-36 α mRNA and protein at different time in rat GMC stimulated by sublytic C5b-9



A: Western blot 检测结果;B:半定量分析柱形图,与pIRES2-EGFP组比较,* $P < 0.01$ ($n=3$)。

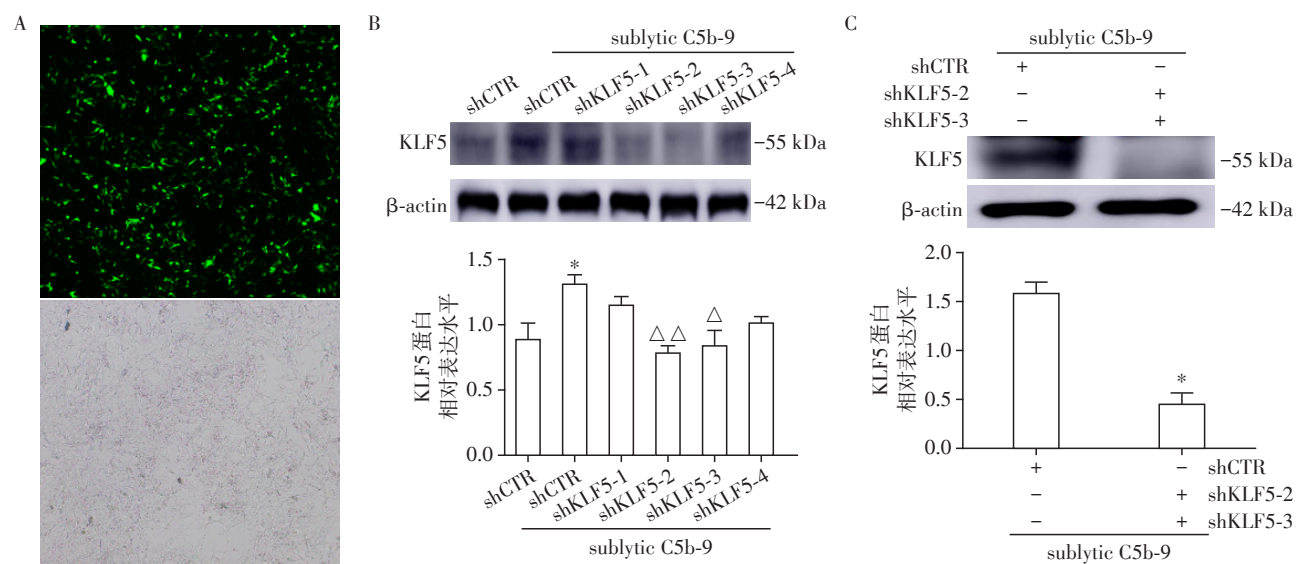
图2 pIRES2-KLF5质粒转染GMC KLF5蛋白表达的鉴定
Figure 2 Identification of KLF5 protein expression in the GMC transfected by pIRES2-KLF5

shRNA质粒先行DNA测序,然后经BLAST比对,结果显示目的DNA片段正确克隆入pGPU6/GFP/Neo-shRNA载体中,提示重组的4个shKLF5质粒均成功构建。接着,将空载质粒shCTR转染至GMC中,观

察表达GFP的细胞占总GMC的百分比。实验显示,质粒转染GMC后48 h,其转染效率为80%以上(图3A)。随后,将前述4个shKLF5及shCTR质粒分别转染GMC后48 h,再用sublytic C5b-9刺激3 h。结果发现,shKLF5-2和shKLF5-3能明显下调由sublytic C5b-9诱导的KLF5蛋白表达(图3B),故后续实验选取了shKLF5-2和shKLF5-3共同来沉默GMC中的KLF5基因。同时也观察了shKLF5-2和shKLF5-3联合共转染GMC后的沉默效率更高(图3C)。

2.4 过表达或沉默KLF5基因对sublytic C5b-9刺激GMC合成IL-36 α 的影响

先将pIRES2-KLF5和对照pIRES2-EGFP质粒分别转染GMC 48 h或将shCTR、shKLF5-2和shKLF5-3质粒分别转染GMC后48 h,再给予sublytic C5b-9刺激6 h。提取各组细胞的mRNA和蛋白,进行RT-PCR和Western blot实验,检查IL-36 α 的mRNA和蛋白的水平。结果表明,转染pIRES2-KLF5过表达质粒的GMC,IL-36 α mRNA(图4A)和蛋白水平(图4B)均明显升高($P < 0.05$),而shKLF5-



A: shCTR空载转染GMC后48 h, GFP转染效率为80%以上。B: Western blot检查KLF5的蛋白表达发现, shKLF5-2或shKLF5-3均可明显降低由sublytic C5b-9诱导的KLF5蛋白表达。与shCTR组比较, $^*P < 0.05$; 与shCTR+sublytic C5b-9组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ ($n=3$)。C: Western blot显示, shKLF5-2和shKLF5-3双靶点共转后能明显抑制由sublytic C5b-9诱导的KLF5蛋白表达。与shCTR+sublytic C5b-9组比较, $^*P < 0.05$ ($n=3$)。

图3 shCTR转染GMC效率的评估及最佳shKLF5沉默靶点的筛选

Figure 3 Evaluation of efficiency in the GMC transfected by shCTR and selection of optimal shKLF5 silencing target

2+sublytic C5b-9 和 shKLF5-3+sublytic C5b-9 组, IL-36 α 的 mRNA (图 4C) 和蛋白表达量 (图 4D) 则显著低于 shCTR+ sublytic C5b-9 组 ($P < 0.01$)。

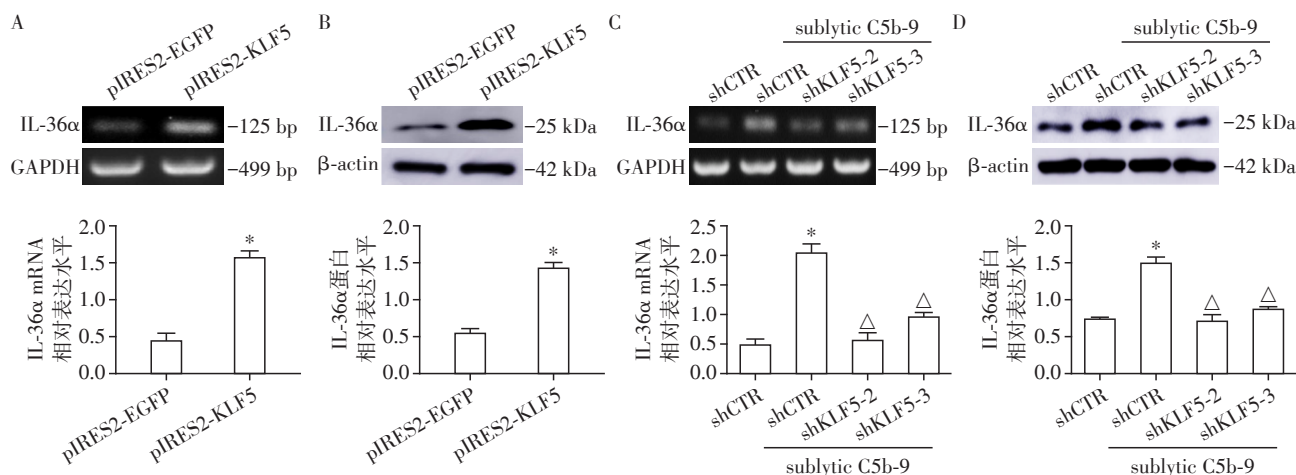
2.5 KLF5 表达对 sublytic C5b-9 刺激 GMC 诱导 IL-36 α 基因启动的影响

同上, 将 IL-36 α 启动子全长质粒分别与 KLF5 的过表达和小干扰质粒 (包括各自的对照质粒) 共转染 GMC 后 48 h, 再行 sublytic C5b-9 刺激 6 h (共转

染过表达质粒组不给予刺激), 测定 IL-36 α 全长启动子的活性。结果发现, 过表达或沉默 KLF5 基因后可明显升高或降低 IL-36 α 启动子的活性, 差异具有统计学意义 (图 5)。

3 讨论

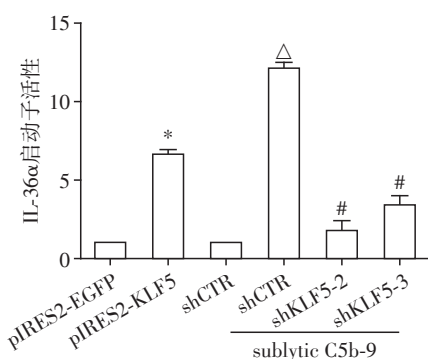
大鼠 Thy-1N 是当今研究人类 MsPGN 常用的一种实验动物模型, 其肾组织中的炎症反应, 尤其是



A、B: RT-PCR (A) 和 Western blot (B) 检查过表达 KLF5 基因后 IL-36 α mRNA 和蛋白的水平; 与 pIRES2-EGFP 组比较, $^*P < 0.05$ ($n=3$)。C、D: RT-PCR (C) 和 Western blot (D) 检查沉默 KLF5 基因后 IL-36 α mRNA 和蛋白的水平。与 shCTR 组比较, $^*P < 0.01$; 与 shCTR+sublytic C5b-9 组比较, $^{\Delta}P < 0.01$ ($n=3$)。

图4 过表达或沉默KLF5后对IL-36α基因表达的影响

Figure 4 Effect of KLF5 gene overexpression or silence on IL-36 α gene expression



GMC中过表达或沉默KLF5基因能明显上调或下调IL-36α启动子的活性。与pIRES2-EGFP组比较,* $P < 0.01$;与shCTR组比较, $^{\Delta}P < 0.01$;与shCTR+sublytic C5b-9组比较,# $P < 0.01$ ($n=3$)。

图5 KLF5表达对sublytic C5b-9刺激上调GMC IL-36α启动子活性的影响

Figure 5 Effect of KLF5 expression on IL-36α promoter activity in the GMC under sublytic C5b-9 stimulation

GMC生成多量的促炎因子是造成组织损伤的主要原因^[8,15]。在Thy-1N发病进程中,肾小球内免疫复合物激活补体形成sublytic C5b-9,是诱发GMC损伤的始发因素^[5-8]。尽管本课题组前期研究已揭示,在Thy-1N发病1 h时,大鼠GMC表面便能测到sublytic C5b-9的沉积,而用sublytic C5b-9刺激GMC也能促使其生成IL-6^[15],但至今为止,有关sublytic C5b-9作用GMC后还能诱导哪些促炎因子的合成与分泌,目前并不十分清楚。

本研究结果显示,大鼠GMC受sublytic C5b-9刺激后能引起转录因子KLF5和促炎性因子IL-36α的表达明显升高,且KLF5上升的高峰时相早于IL-36α。据此,我们推测,KLF5可能在IL-36α基因表达时起一定的调控作用。

为了证实上述推测,本研究先构建了KLF5过表达质粒,即将KLF5基因的CDS区插入真核表达载体pIRES2-EGFP中,制备pIRES2-KLF5。之后,将pIRES2-KLF5转染GMC,再行Western blot检查。结果发现,pIRES2-KLF5确可在GMC中表达KLF5蛋白。

已知短发夹状shRNA的优点是能够长时间并高效地沉默靶基因^[16]。本研究针对KLF5的4个靶点,构建了4个shKLF5表达质粒。之后,将这些shKLF5质粒分别转染大鼠GMC进行了shKLF5最佳沉默效率的筛选。实验证实,shKLF5-2和shKLF5-3沉默靶基因的效果较为显著。因此,后续研究选择了shKLF5-2和shKLF5-3进行了相关的实验。

在大鼠GMC中过表达或沉默KLF5基因发现,

过表达KLF5后能明显促进IL-36α的分泌,而沉默KLF5基因后,由sublytic C5b-9刺激GMC诱导的IL-36α合成显著减少。提示,KLF5的表达确能影响GMC中IL-36α的生成。

有文献报道,KLF5属于含有锌指结构的核转录因子,其C端有3个连续锌指结构的DNA结合结构域^[9]。为了探究KLF5能否增强IL-36α基因启动子的活性,利用IL-36α基因启动子全长质粒,即pGL3-IL-36α(-1215~+514 nt),将此pGL3-IL-36α启动子质粒转染大鼠GMC 48 h时再行sublytic C5b-9刺激6 h。荧光素酶报告实验证实,sublytic C5b-9刺激GMC后能明显升高IL-36α的启动子活性。将已构建的过表达或小干扰shKLF5质粒与IL-36α启动子质粒共转染GMC,后者还给予sublytic C5b-9刺激6 h,结果发现,过表达或沉默KLF5基因后能明显升高或下调IL-36α的启动子活性。提示,在sublytic C5b-9诱导促炎因子IL-36α基因启动的过程中,KLF5基因表达的升高确实对IL-36α基因的启动有一定促进作用。由于转录因子通常能与靶基因的启动子区结合,最终诱导其基因的启动^[8],加上我们用生物信息学软件对IL-36α启动子上KLF5的结合部位进行预测发现,IL-36α启动子上含有KLF5的结合元件,故我们推测,KLF5或许可直接结合在IL-36α的启动子区域,进而促进了基因的启动。不过,这一猜想还有待于今后的染色质免疫沉淀(ChIP)实验进行确定。

值得一提的是:本课题组前期研究已显示,在Thy-1N大鼠发病早期,KLF家族的另一个成员——KLF4在体内外表达升高,也调控了肾组织中IL-36α基因的转录与表达,其机制为KLF4增强IL-36α基因的转录^[8]。鉴于KLF5属于KLF家族的另一成员,且体外研究发现KLF5的作用机制与KLF4较为相似,故我们认为,KLF家族的某些成员在调控sublytic C5b-9刺激GMC诱导IL-36α合成方面可能有协同或叠加作用。由于我们前面开展的研究均为体外实验,因此相关结果还需进行进一步体内实验,即利用大鼠Thy-1N模型加以验证。

[参考文献]

- [1] MAKITA Y, SUZUKI H, KANO T, et al. TLR9 activation induces aberrant IgA glycosylation via APRIL- and IL-6-mediated pathways in IgA nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2020, 97(2): 340-349
- [2] LU T, FAN Z, HOU J, et al. Loquat leaf polysaccharides improve glomerular injury in rats with anti-Thy 1 nephritis via peroxisome proliferator-activated receptor alpha

- pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(6): 3531-3542
- [3] LU T, ZHAO W, ZHANG F, et al. Lycium barbarum polysaccharides attenuate rat anti-Thy-1 glomerulonephritis through mediating pyruvate dehydrogenase [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 116: 109020
- [4] FALK R J, SISSON S P, DALMASSO A P, et al. Ultrastructural localization of the membrane attack complex of complement in human renal tissues[J]. *Am J Kidney Dis*, 1987, 9(2): 121-128
- [5] YAO C, HE F, LIU L, et al. Sublytic C5b-9 induces glomerular mesangial cell apoptosis through miR-3546/SOX4/survivin axis in rat Thy-1 nephritis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(5): 1898-1917
- [6] ZHU G, QIU W, LI Y, et al. Sublytic C5b-9 induces glomerular mesangial cell apoptosis through the cascade pathway of MEKK2-p38 MAPK-IRF-1-TRADD-Caspase 8 in rat Thy-1 nephritis[J]. *J Immunol*, 2017, 198(3): 1104-1118
- [7] YU T, WANG L, ZHAO C, et al. Sublytic C5b-9 induces proliferation of glomerular mesangial cells via ERK5/MZF1/RGC-32 axis activated by FBXO28-TRAF6 complex[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8): 5654-5671
- [8] ZHANG J, XIE M, XIA L, et al. Sublytic C5b-9 induces IL-23 and IL-36 α production by glomerular mesangial cells via PCAF-mediated KLF4 acetylation in rat Thy-1 nephritis[J]. *J Immunol*, 2018, 201(11): 3184-3198
- [9] RANE M J, ZHAO Y, CAI L. Krüppel-like factors (KLFs) in renal physiology and disease[J]. *Ebio Medicine*, 2019, 40: 743-750
- [10] FUJII K, MANABE I, NAGAI R. Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(9): 3425-3441
- [11] SWINDELL W R, BEAMER M A, SARKAR M K, et al. RNA-Seq analysis of IL-1B and IL-36 responses in epidermal keratinocytes identifies a shared MyD88-dependent gene signature[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 80
- [12] KANDA T, NISHIDA A, TAKAHASHI K, et al. Interleukin (IL)-36 α and IL-36 γ induce proinflammatory mediators from human colonic subepithelial myofibroblasts[J]. *Front Med*, 2015, 2: 69
- [13] FREY S, DERER A, MESSBACHER M E, et al. The novel cytokine interleukin-36 α is expressed in psoriatic and rheumatoid arthritis synovium[J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(9): 1569-1574
- [14] HE F X, ZHOU M Y, YU T Y, 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): 477-491
- [15] ZHANG J, LI Y, SHAN K, et al. Sublytic C5b-9 induces IL-6 and TGF- β 1 production by glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through p300-mediated C/EBP β acetylation[J]. *FASEB J*, 2014, 28(3): 1511-1525
- [16] 宫雅娟, 张 婧, 刘 玉, 等. 沉默大鼠 KAT7 基因对亚溶解型 C5b-9 刺激 GMC 诱导趋化因子 MCP-1 生成的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018, 38(4): 423-428

[收稿日期] 2019-09-10