DOI:10.16016/j.2097-0927.202310103

HES5 对肾小管上皮细胞转分化和凋亡的影响及其机制研究

张羽寒[1],衡 雪[2],朱 琳[1],谢 攀[1],许桂莲[3],彭侃夫[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):第一附属医院肾科[1],第一附属医院烧伤科[2],基础医学院免疫学教研室[3]

[摘要] **目的** 探讨 HES5(hairy and enhancer of split 5)对 TGF-β1 诱导的肾小管上皮细胞转分化和凋亡的作用及其潜在机制。**方法** 分析和筛选 GSE66494 数据中的差异表达基因。建立小鼠的输尿管梗阻模型(unilateral uretera obstruction,UUO),检测肾组织中 HES5 的表达水平。TGF-β1(10 ng/mL)处理 HK-2 细胞 24 h 建立肾小管上皮-间质转化模型后,通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 HES5 的表达水平。用过表达 HES5 的质粒转染 HK-2 细胞,24 h 后检测其纤连蛋白(Fibronectin,FN)、胶原蛋白Ⅰ(Collagen Ⅰ)和波形蛋白(Vimentin)及凋亡相关标志物(Bax、Bcl2)等蛋白表达;然后,将 HK-2 细胞分为 4 组:Control 组、siHES5 组、TGF-β1 组、siHES5+TGF-β1 组,检测各组的纤维化及凋亡标志物的表达情况。运用 TUNEL 及流式细胞术检测各组细胞的凋亡情况。Western blot 检测各组 AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K 的蛋白表达。通过加入 PI3K 抑制剂(LY294002)处理过表达 HES5 的 HK-2 细胞后,检测 Vimentin 的表达。**结果** HES5 的表达在慢性肾脏病(chronic kidney disease,CKD)和小鼠纤维化肾组织中均显著上调;过表达 HES5 可以促进 HK-2 细胞中 FN、Collagen Ⅰ、Vimentin、Bax 的合成,抑制 Bcl2 的表达($P<0.05$);敲低 HES5 不仅下调纤维化标志物的表达,还抑制了肾小管上皮细胞凋亡;此外,HES5 基因敲低使 TGF-β1 诱导的 HK-2 细胞内 PI3K/AKT 信号通路的激活程度降低($P<0.05$);PI3K/AKT 信号通路抑制剂减弱了 HES5 对 Vimentin 的诱导作用。**结论** 敲低 HES5 可以抑制 TGF-β1 诱导的肾小管上皮细胞转分化和凋亡,这可能与 PI3K/AKT 信号通路活性降低有关。

[关键词] HES5;上皮-间质转分化;细胞凋亡;PI3K/AKT 信号通路;TGF-β1
[中图法分类号] R322.61; R329.25; R394.2 [文献标志码] A

Effect of HES5 on transdifferentiation and apoptosis of renal tubular epithelial cells and its underlying mechanism

ZHANG Yuhan[1], HENG Xue[2], ZHU Lin[1], XIE Pan[1], XU Guilian[3], PENG Kanfu[1] [1]Department of Nephrology, First Affiliated Hospital, [2]Department of Burns, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [3]Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of hairy and enhancer of split 5 (HES5) on transdifferentiation and apoptosis of renal tubular epithelial cells induced by TGF-β1 and its potential mechanism. **Methods** The differentially expressed genes in GSE66494 data were analyzed and screened. The mouse model of unilateral uretera obstruction (UUO) was established, and the expression level of HES5 was detected in the renal tissue. HK-2 cells were treated with 10 ng/mL TGF-β1 for 24 h to establish a tubular epithelial-mesenchymal transition (EMT) model, and then qRT-PCR and Western blotting were performed to

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873606);重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0570)
[通信作者] 彭侃夫,E-mail:392906786@qq.com
许桂莲,E-mail:xuguilian2004@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

detect the expression of HES5 at mRNA and protein levels. After HK-2 cells were transfected with the plasmid overexpressing HES5, the protein levels of fibronectin, collagen Ⅰ, vimentin, apoptosis markers Bax and Bcl2 were detected in 24 h later. Then, HK-2 cells were divided into Control group, siHES5 group, TGF-β1 group, and siHES5+TGF-β1 group. The protein level of fibrosis and apoptosis markers were measured in above groups with Western blotting. TUNEL staining and flow cytometry were employed to detect cell apoptosis. Western blotting was applied to determine the protein levels of AKT, p-AKT, PI3K and p-PI3K. HK-2 cells overexpressing HES5 were treated with PI3K inhibitor LY294002, and the expression of vimentin was detected. **Results** The expression of HES5 was significantly up-regulated in both chronic kidney disease (CKD) and fibrotic kidneys of mice. Overexpression of HES5 promoted the synthesis of fibronectin, collagen Ⅰ, vimentin and Bax in HK-2 cells, and inhibited the expression of Bcl2 ($P<0.05$). HES5 knockdown not only down-regulated the expression of fibrosis markers, but also inhibited the apoptosis of HK-2 cells. Furthermore, HES5 knockdown inhibited the activation of PI3K/AKT signaling pathway induced by TGF-β1 in HK-2 cells ($P<0.05$). Inhibitors of the PI3K/AKT signaling pathway inhibitor attenuated the induction of HES5 on vimentin. **Conclusion** HES5 knockdown inhibits the transdifferentiation and apoptosis in TGF-β1-induced renal tubular epithelial cells, which may be related to the decreased activity of the PI3K/AKT signaling pathway.

[**Key words**] hairy and enhancer of split 5; epithelial-mesenchymal transition; cell apoptosis; PI3K/AKT signaling pathway; TGF-β1

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81873606) and the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2023NSCQ-MSX0570). Corresponding author: PENG Kanfu, E-mail: 392906786@qq.com; XU Guilian, E-mail: xuguilian2004@163.com

慢性肾脏病(chronic kidney disease,CKD)进展至肾衰竭的最常见病理表现是肾脏纤维化,其特征为肾小球硬化、肾小管萎缩和肾间质纤维化[1-2]。由于缺乏靶向治疗来延缓肾纤维化,患有 CKD 的患者常面临着不良的预后和沉重的经济负担。其中,肾小管上皮细胞的上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)是触发肾纤维化形成的关键机制,然而目前临床上尚缺乏特异性生物标志物和有效治疗靶点。因此积极寻找调控肾小管上皮细胞 EMT 发生的关键靶分子,对于进一步揭示肾纤维化病理机制尤显重要[3-4]。

HES5(hairy and enhancer of split 5)是碱性-螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix,bHLH)超家族成员,作为一个重要转录因子广泛参与了细胞分化、凋亡、增殖乃至肿瘤发生等生理病理过程[5-7]。前期研究对于 HES5 的关注点主要集中在神经分化和恶性肿瘤,而最近的研究开始聚焦在肾脏领域。研究发现,注射丹参芍药散血清可以抑制 Notch 信号通路,治疗组的 Jagged1、Notch1、HES5、NICD、α-SMA 和 Vimentin 的蛋白和 mRNA 水平显著降低,从而改善肾小管细胞上皮-间充质转化[8]。另有研究显示:在小鼠的单侧输尿管梗阻模型中,HES5 的 mRNA 表达上调,同时伴随着 IL-22 的上调;而 HES5 在正常小鼠的肝脏和肾脏中的表达较低[9]。一系列研究证实,Notch 信号通路促进肾纤维化的进展[10-11]。而 HES5 是 Notch 通路的下游靶基因,其参与多种肾脏疾病,但在肾纤维化中的作用及机制尚不清楚。

EMT 是一个动态而复杂的过程,包括 TGF-β 信号通路、Wnt 信号通路、RAAS 信号通路和 Notch 信号通路参与[11-13]。除此,磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B,PI3K/AKT)信号通路的激活也是发生 EMT 的一个关键驱动因素[14-15]。研究证实,TGF-β1 可以激活 PI3K,导致其下游效应分子 AKT 发生磷酸化,从而激活肾间质纤维化进展[16-17]。综上所述,本研究主要通过建立肾小管上皮-间质转化模型,探究 HES5 是否参与肾小管上皮细胞转分化和细胞凋亡;进一步探讨敲低 HES5 抑制肾小管上皮细胞发生 EMT 的机制是否与 PI3K/AKT 信号通路有关。

1 材料与方法

1.1 差异表达基因的筛选

从基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus,GEO)下载序列号为 GSE66494 的基因表达谱。GSE66494 数据包括正常肾活检组织样本(8 个)和 CKD 患者肾活检组织样本(53 个)。以 $|\log_2 FC| \geq 1$ 和 $P<0.05$ 作为筛选标准选出差异表达基因(differentially expressed gene,DEG)后,利用 R 语言,借助 ggplot2 绘制火山图,并且注释出 NOTCH 信号通路下游的靶基因。

1.2 输尿管梗阻模型(unilateral uretera obstruction, UUO)建立

16只8周龄雄性C57BL/6背景野生型小鼠,体质量20~23 g,购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,饲养于陆军军医大学免疫学研究所的层流动物房,恒温、恒湿条件下自由饮水,实验方案由陆军军医大学实验动物福利伦理委员会批准(AMUWEC20210702)。实验分组如下:假手术组(Sham组)、手术组(UUO组),每组8只。建立小鼠UUO模型,即给予1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉之后,取腹部正中1 cm切口,逐层分离至左侧肾脏及输尿管,充分暴露输尿管,6-0丝线结扎后自中间剪断输尿管,观察无明显出血后关闭腹腔。假手术组仅分离输尿管,不结扎剪断,其余步骤同手术组。保温毯上复苏小鼠后,分笼饲养并每日观察小鼠状态。14 d后,收集小鼠左侧肾脏用于下一步实验。

1.3 肾小管上皮-间质转化模型的构建

HK-2细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司)在37 ℃、5%CO_2的孵箱中培养,2~3 d换液1次。当细胞铺板后达到约70%密度时,将HK-2细胞饥饿24 h,接着用终浓度为0、5、10、15 ng/mL TGF-β1(武汉爱博泰克生物科技有限公司)分别处理24 h或者用终浓度为10 ng/mL TGF-β1分别刺激0、24、48、72 h。最后,使用倒置显微镜(日本尼康公司)观察细胞的形态和Western blot检测纤连蛋白(Fibronectin,FN)、胶原蛋白Ⅰ(Collagen Ⅰ)和波形蛋白(Vimentin)蛋白。

1.4 质粒及siRNA设计

通过qRT-PCR扩增合成HES5的编码序列,并克隆到T载体质粒上。T-HES5构建体后,T-HES5和pcDNA3.1+经*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ双重酶切。将靶标*HES5*片段和pcDNA3.1+骨架连接起来,随后转入大肠杆菌感受态细胞。选择单克隆菌落后,鉴定重组的pcDNA3.1-HES5构建体,并由上海生物工程公司测序。

根据人*HES5*信使RNA(mRNA)序列设计了3种*HES5*特异性siRNA,并由上海生物工程公司合成。这些靶向序列如下:*HES5*-207:CGAGCAGCUGAAGCUGCUGCUTT;*HES5*-354:CCAGGACUACAGCGAAGGCUATT和*HES5*-420:CGCCAGCGACACGCAGAUGAATT。设置Control组、siNC组、siHES5-3组、siHES5-2组、siHES5-1组,运用qRT-PCR和Western blot鉴定最有效的siRNA。一种无关的双链RNA,UUCUCCGAACGUGUCACGUTT被用作阴性对照。

1.5 瞬时转染

当HK-2细胞达到70%~80%汇合率时,通过Lipofectamine 3000(Invitrogen,美国)以转染指定的质粒或小干扰RNA(siRNA)。用pcDNA 3.1-HES5转染HK-2细胞48 h构建过表达模型,设置对照组(Control组)、空载组(Vector组)、HES5组(HES5质粒转染组);用HES5 siRNA敲低处理HK-2细胞24 h后,使用在浓度为10 ng/mL TGF-β1的培养基或者普通培养基继续诱导其24 h,设置Control组、siHES5组、TGF-β1组、siHES5+TGF-β1组(TGF-β1诱导转染HES5 siRNA的HK-2细胞组),以备后续实验。

1.6 RNA分离和qRT-PCR检测

借助TRIzol试剂盒(Invitrogen,美国)提取各组HK-2细胞的总RNA,然后参考制造商的方案,逆转录为cDNA后进行扩增,通过比较循环阈值并以*β-tubulin*作为内参计算,检测各组细胞中*HES5*的mRNA相对表达水平。*HES5*上游引物:5′-ACCGCATCAACAGCAGCATT-3′,下游引物:5′-AGGCTTTGCTGTGCTTCAGGT-3′;*β-tubulin*上游引物:5′-ATCCAGAGCAGGGAAAGCTG-3′,下游引物:5′-CTCAGGCCGTTGTTCTAGGG-3′。

1.7 蛋白质印迹分析

使用含磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液(Thermo Fisher Scientific,美国)提取细胞总蛋白,并测定浓度后保存。将蛋白样品依次进行电泳、转膜、封闭后,分别予以一抗HES5(中国ABclonal,1∶500)、Bax(美国CST,1∶1 000)、Bcl2(美国CST,1∶1 000)、Fibronectin(美国Bioworld,1∶1 000)、Vimentin(美国Bioworld,1∶3 000)、Collagen Ⅰ(美国CST,1∶1 000)、p-PI3K(中国Bioss,1∶1 000)、PI3K(中国Bioss,1∶1 000)、p-AKT(中国Bioss,1∶1 000)、AKT(中国Bioss,1∶1 000)、β-tubulin(美国Bioworld,1∶3 000)。在4 ℃下过夜。次日复温、洗涤后,孵育二抗,显影。最后,将各条带灰度值直接与内参β-tubulin相比,并将3次独立实验所得结果进行统计分析。

1.8 免疫荧光及TUNEL检测

在6孔板里制备细胞爬片,转染或加药处理一定时间后,用4%甲醛固定细胞30 min后透化、封闭、一抗过夜。次日,将细胞与Cy3/Dylight488偶联的二抗(Biolegend,美国)避光孵育1 h。最后,用Hoechst 33258(Beyotime,中国)对细胞核进行共染色,并使用荧光显微镜(奥林巴斯,日本)观察并采集图像。

用4%甲醛固定制备的细胞爬片30 min,然后根据制造商(Beyotime,中国)的说明进行TUNEL测定。最后,通过荧光显微镜观察并采集图像。

1.9 流式细胞仪检测细胞凋亡率

根据需求处理各组实验细胞,用0.25%胰蛋白酶

(不含 EDTA)处理后,利用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(BestBio,中国)及流式细胞仪(BD,美国)检测凋亡的 HK-2 细胞。

1.10 统计学分析

所有实验按 3 次独立实验进行,应用 GraphPad Prism 8.0 进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用非配对 t 检验。$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HES5 在慢性肾脏病中的差异性表达

根据 GSE66494 芯片的分析结果绘制成火山图(图 1)。在 GSE66494 数据集中注释出 Notch 通路的一系列下游靶基因:HES1、HES4、HES5、HES6、HES7、HEYL、HEY2。不难发现,其中 HES5 是在 CKD 中显著上调的差异性基因($P<0.05$)。并且,在小鼠的 UUO 模型中也得到相似的结论:与 Sham 组相比,HES5 在纤维化的肾组织中表达明显增加(图 2)。

2.2 HES5 在 TGF-β1 处理的 HK-2 细胞中表达显著上调

HK-2 细胞在终浓度为 0、5、10、15 ng/mL 的 TGF-β1 刺激 24 h 后,纤连蛋白(Fibronectin,FN)、胶原蛋白Ⅰ(Collagen Ⅰ)和波形蛋白(Vimentin)均以剂量依赖性方式上调(图 3A),结果显示 10 ng/mL TGF-β1 能明显诱导 HK-2 细胞的转分化。因此,本研究以 10 ng/mL TGF-β1 分别处理 HK-2 细胞 0、24、48、72 h,其中 24 h 组显示 3 种纤维化相关因子的表达上调均具有统计学意义($P<0.05$,图 3B)。综合考虑,选用 10 ng/mL TGF-β1 处理 HK-2 细胞 24 h 作为后续实验建立体外肾纤维化模型的条件。

本研究首先运用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 TGF-β1(10 ng/mL)处理 HK-2 细胞 24 h 后 HES5 的表达,结果显示:TGF-β1 处理后,HES5 在基因和蛋白水平的表达均显著上调($P<0.05$,图 4A)。除此,研究发现 TGF-β1 以时间和剂量依赖性方式诱导 HES5 的蛋白表达(图 4B、C)。以上结果表明,HES5 在 TGF-β1 诱导的 HK-2 细胞中表达显著上调。不难发现,HK-2 细胞的成纤维细胞样改变越明显,HES5 表达越高,结果提示两者可能存在着某种联系。

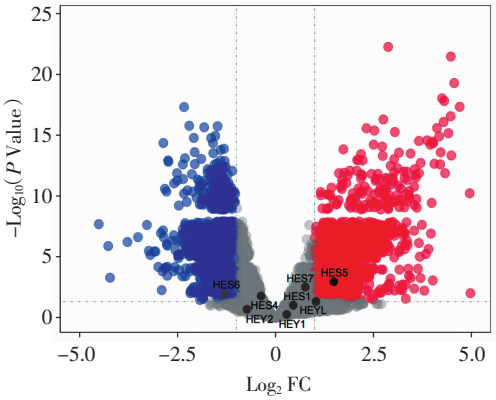


图 1 GSE66494 中 DEG 的火山图

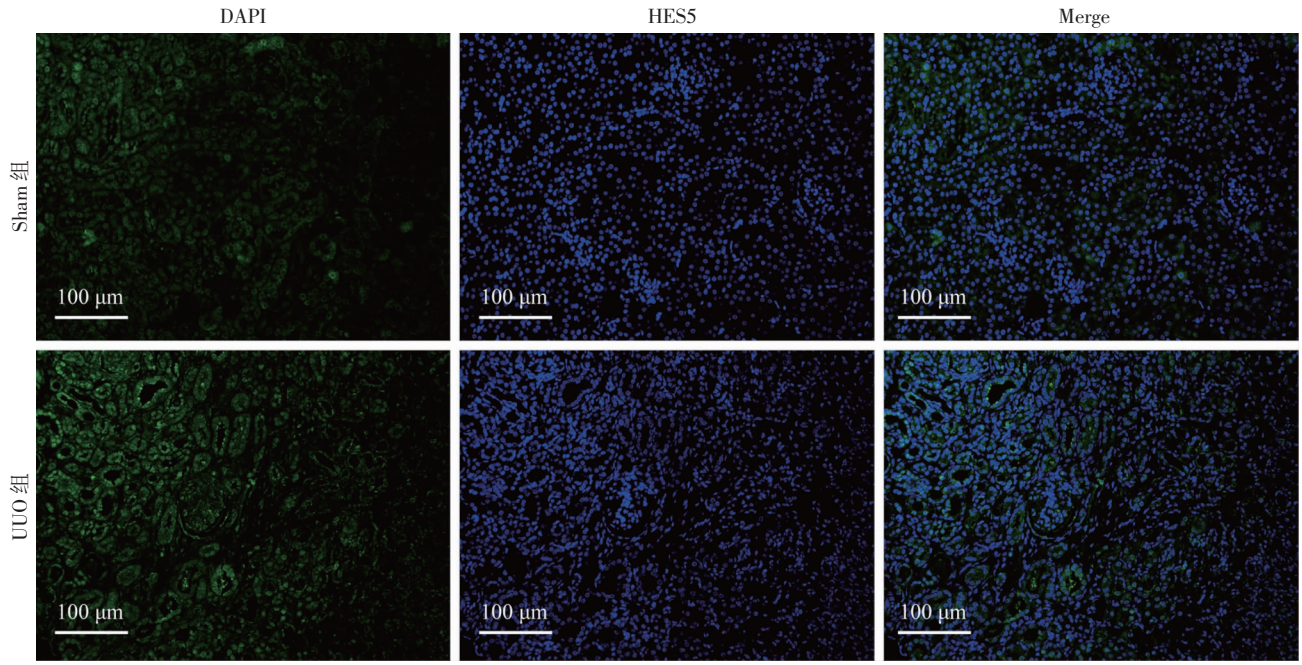
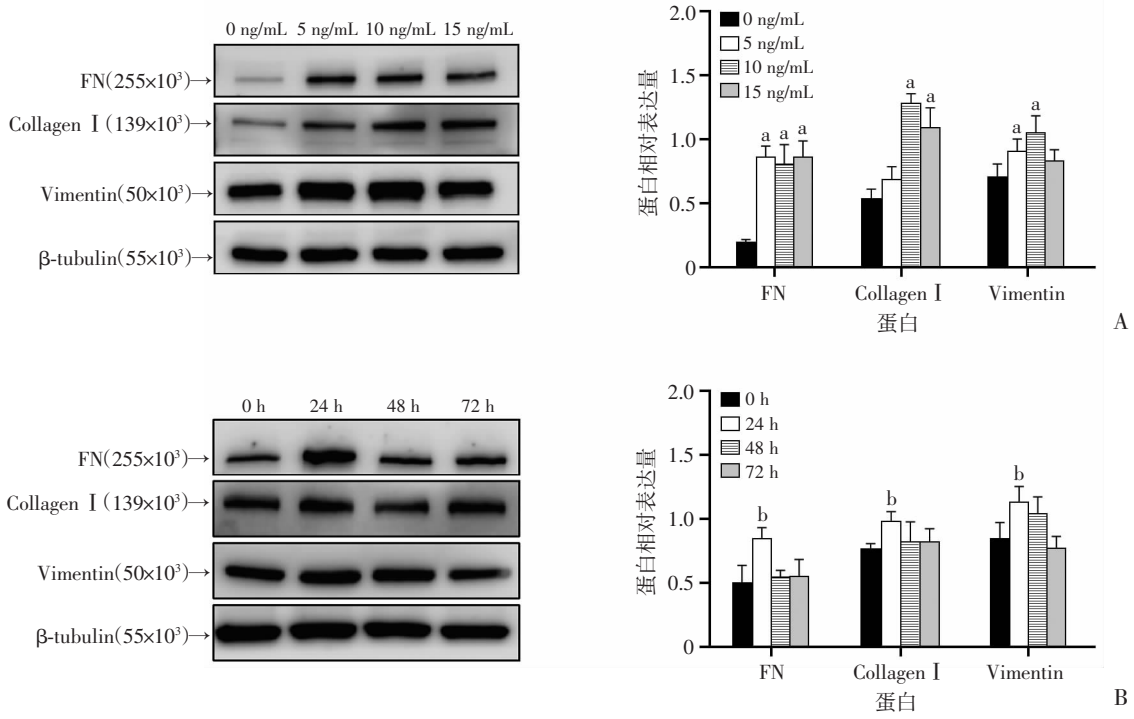
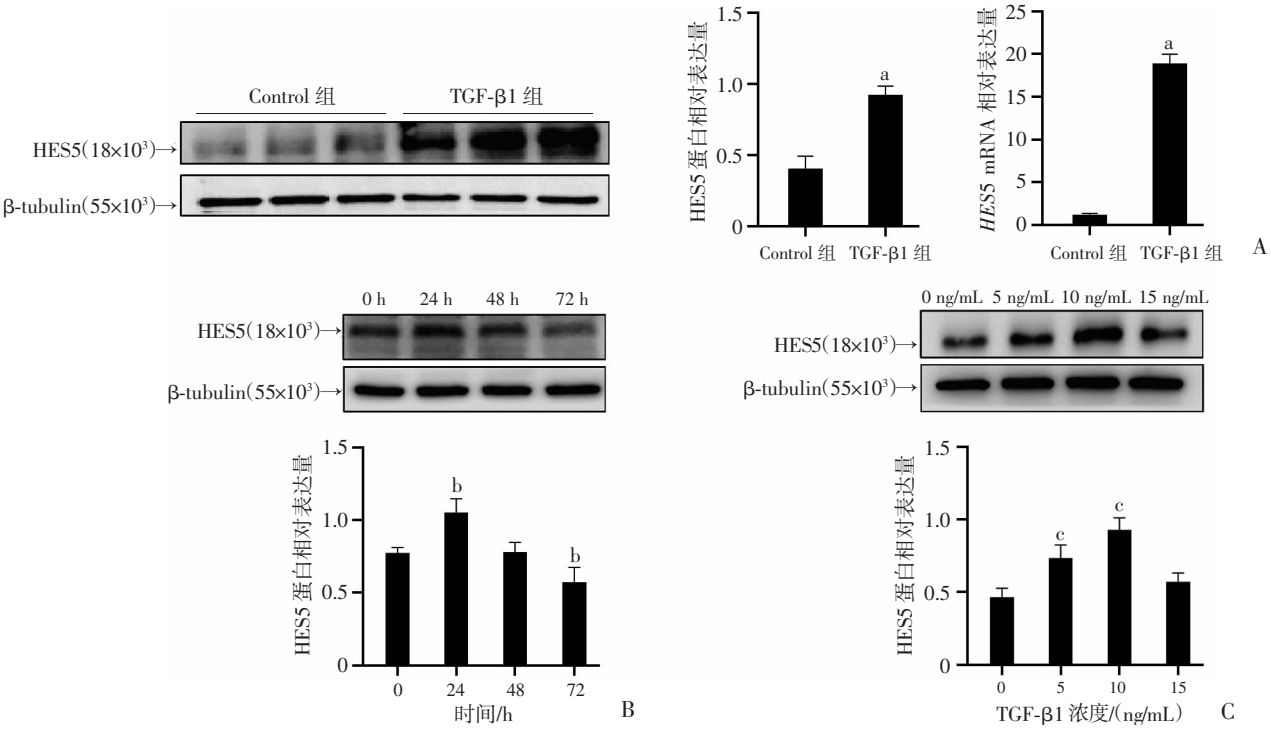


图 2 HES5 高表达于 UUO 诱导的小鼠纤维化肾组织中



A:不同浓度 TGF-β1 对 FN、Collagen Ⅰ及 Vimentin 蛋白表达的影响 a:$P<0.05$,与 0 ng/mL 比较;B:不同刺激时间 TGF-β1 对 FN、Collagen Ⅰ及 Vimentin 蛋白表达的影响 b:$P<0.05$,与 0 h 比较

图 3 TGF-β1 诱导肾小管上皮细胞发生 EMT



A:TGF-β1(10 ng/mL)处理 HK-2 细胞 24 h 后 HES5 的蛋白和基因表达情况 a:$P<0.05$,与 Control 组比较;B:不同刺激时间 TGF-β1 对 HES5 蛋白表达的影响 b:$P<0.05$,与 0 h 比较;C:不同浓度 TGF-β1 对 HES5 蛋白表达的影响 c:$P<0.05$,与 0 ng/mL 比较

图 4 TGF-β1 诱导的 HK-2 细胞中 HES5 表达的情况

2.3 过表达 HES5 促进肾小管上皮细胞转分化和凋亡

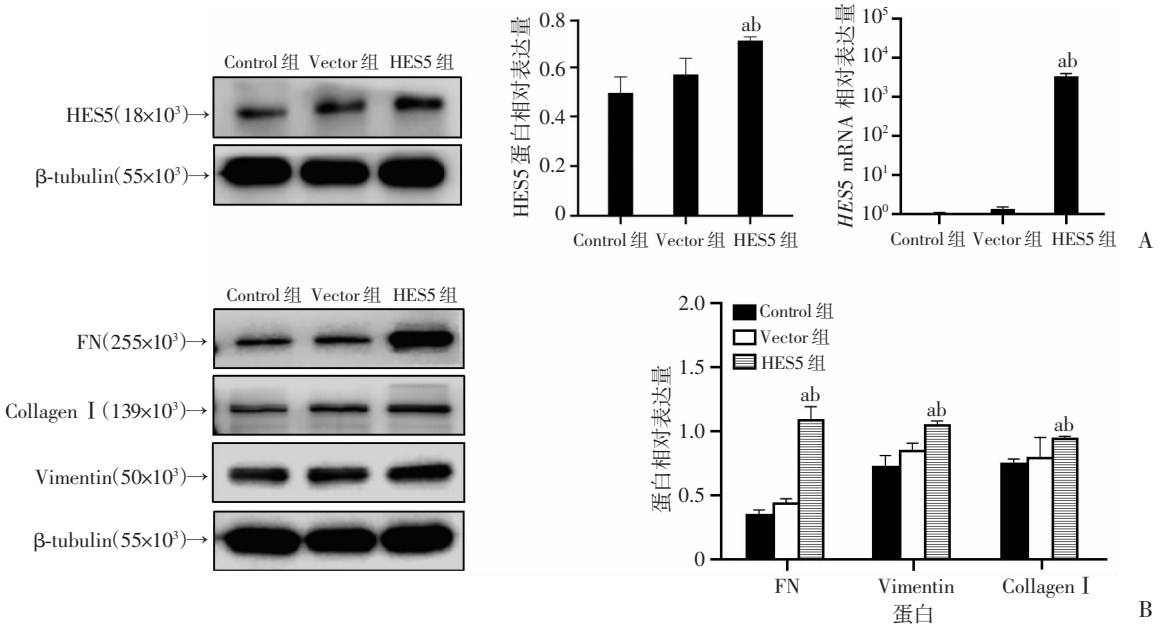
为了验证这一推测,本研究将含有 HES5 的质粒瞬时转染到 HK-2 细胞中。首先,通过 Western blot 和 qRT-PCR 验证质粒构建的有效性,结果显示:在转染 pcDNA3.1-HES5 的 HK-2 细胞中,HES5 蛋白表达量高于对照组(Control 组)和空载体组(Vector 组),并具有统计学意义;与 Control 及 Vector 组相比,HES5 组 mRNA 表达量明显升高($P<0.05$,图 5A),以上结果均说明成功构建了过表达 HES5 的 HK-2 细胞模型。其次,本研究运用 Western blot 评估了每组 FN、Collagen Ⅰ、Vimentin 的表达水平。结果显示:HES5 组的 FN、Collagen Ⅰ、Vimentin 的蛋白表达与 Control 组相比明显增加($P<0.05$,图 5B)。此外,与 Control 组相比,HES5 过表达组显示出 Bax 表达的增加和 Bcl2 表达的减少,结果具有统计学意义($P<0.05$,图 6A)。通过 TUNEL 进一步验证,HES5 组的细胞凋亡与 Control 组相比明显增加(图 6B)。以上结果证实,过表达 HES5 触发了肾小管上皮-间质转化和细胞凋亡的开关。

2.4 敲低 HES5 减轻了 TGF-β1 诱导的肾小管上皮细胞转分化和凋亡

为了进一步验证 HES5 在肾纤维化中的作用,本研究通过 Western blot 和 qRT-PCR 筛选最有效的干扰序列,结果显示:并非所有 HES5 siRNA 均能有效地抑制 HES5 蛋白的表达,相较于其他 2 组 HES5 的干扰序列,HES5 siRNA-1 的抑制效果最佳($P<0.05$),其抑制率约为 50%(图 7A)。通过 Western blot 检测证实,与 TGF-β1 刺激野生型 HK-2 细胞相比,用 TGF-β1 刺激 HES5 敲低的 HK-2 细胞,其 FN、Collagen Ⅰ、Vimentin 的表达均下调(图 7B)。免疫荧光检测得出了一致的结论(图 7C)。另外,Western blot 和流式细胞术的结果表明,HES5 基因的敲低削弱了 TGF-β1 诱导的 HK-2 细胞凋亡($P<0.05$,图 8)。以上实验结果证实,敲低 HES5 可以在体外显著抑制肾小管上皮-间质转化和细胞凋亡。

2.5 调控 HES5 对 TGF-β1 激活的 PI3K/AKT 信号通路的影响

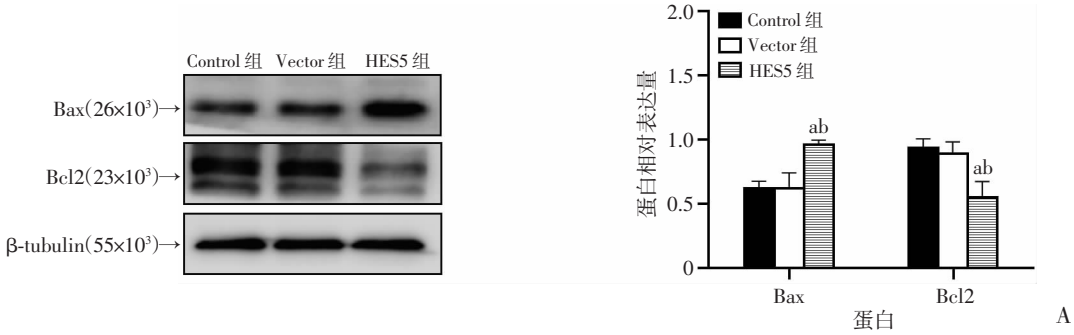
本研究在细胞层面进一步探讨 HES5 调控上皮-间质转分化的信号机制。由于 PI3K/AKT 信号通路与肾纤维化的发展过程密切相关,因此对 PI3K/AKT 信号通路相关指标的表达进行检测。Western blot 检测结果显示,与 TGF-β1 组比较,用 TGF-β1 刺激 HES5 敲低组的 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达量明显减少($P<0.05$),提示 HES5 基因敲低使 TGF-β1 诱导的 HK-2 细胞内 PI3K/AKT 信号通路的激活程度降低(图 9)。通过加入 PI3K 抑制剂后,Vimentin 的表达较单纯 HES5 组明显降低(图 10),说明 PI3K/AKT 信号通路可能与肾小管上皮-间质转化有关。



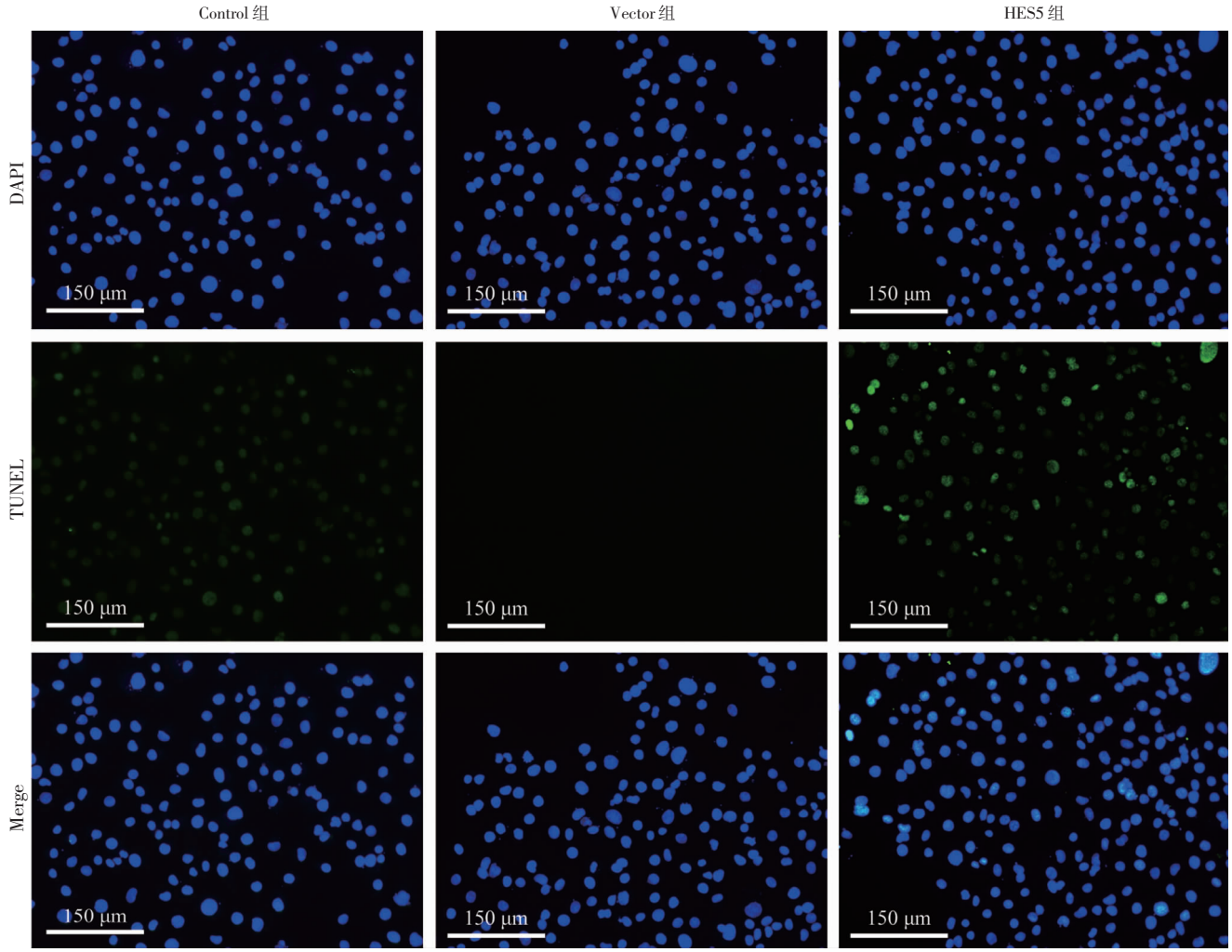
a:$P<0.05$,与 Control 组比较; b:$P<0.05$,与 Vector 组比较

A:质粒转染 48 h 后检测 HES5 的蛋白及 mRNA 的表达情况;B:各组细胞中 FN、Collagen Ⅰ及 Vimentin 蛋白表达的影响

图 5 过表达 HES5 诱导肾小管上皮细胞发生 EMT



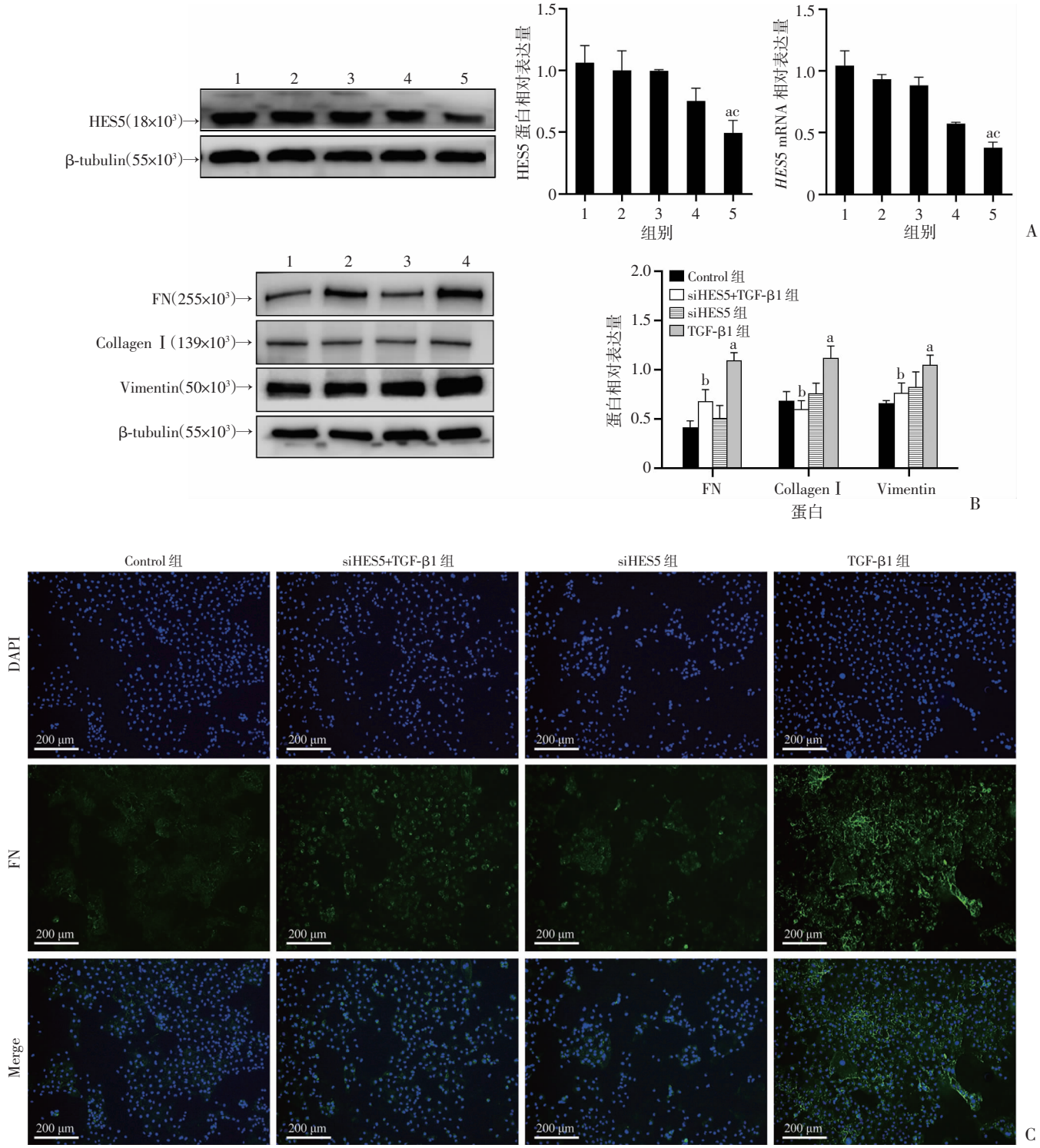
A



B

A:各组细胞 Bax、Bcl2 蛋白表达的情况 a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 Vector 组比较;B:TUNEL 荧光染色观察各组肾小管上皮细胞凋亡情况

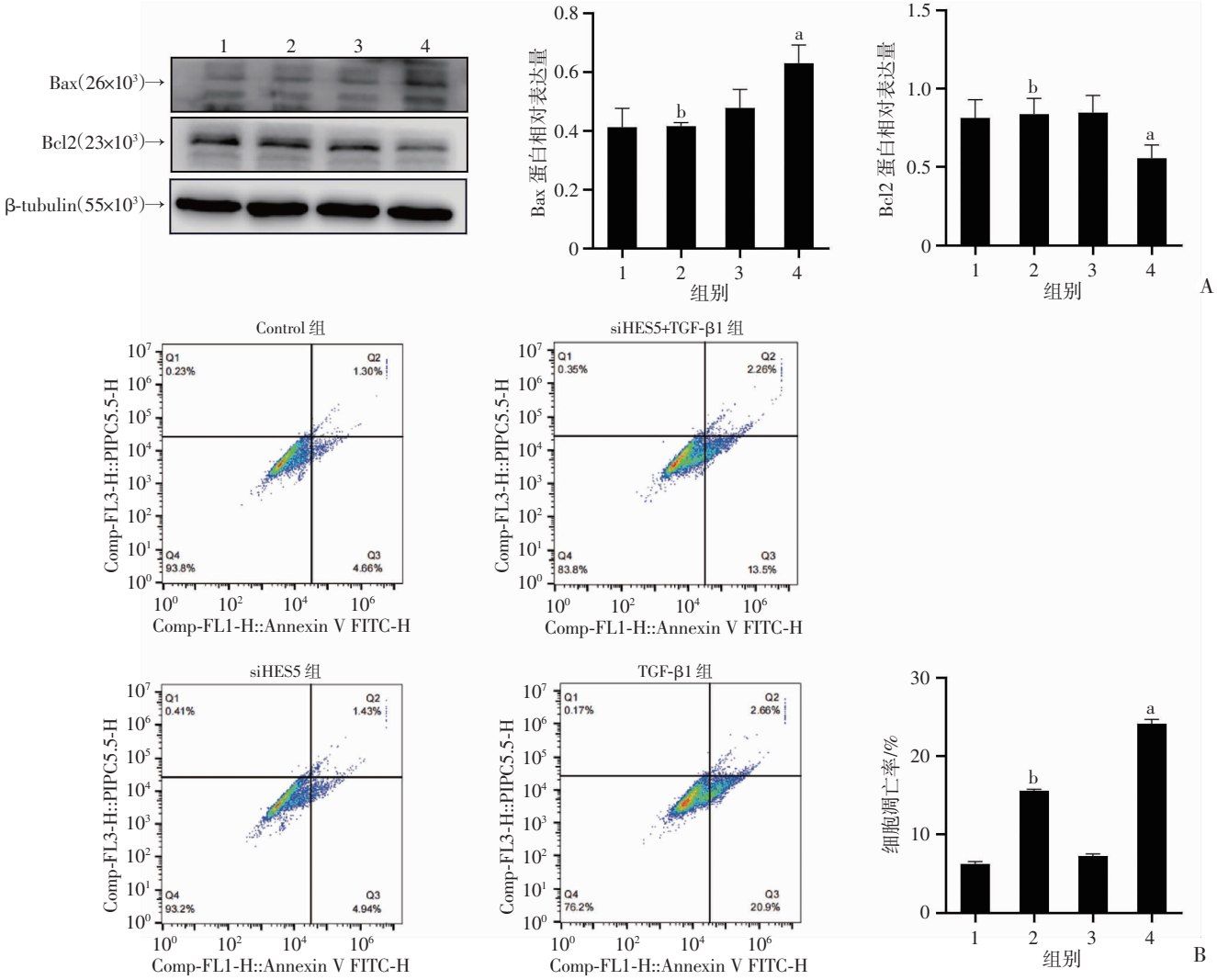
图 6 过表达 HES5 诱导肾小管上皮细胞凋亡



a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 TGF-β1 组比较;c:$P<0.05$,与 siNC 组比较

A:siHES5 转染 48 h 后检测 HES5 的蛋白及 mRNA 表达情况 1:Control 组;2:siNC 组;3:siHES5-3 组;4:siHES5-2 组;5:siHES5-1 组;B:Western blot 检测各组细胞中 FN、Collagen Ⅰ、Vimentin 蛋白表达的影响 1:Control 组;2:siHES5+TGF-β1 组;3:siHES5 组;4:TGF-β1 组;C:免疫荧光检测各组细胞中 FN 表达的情况

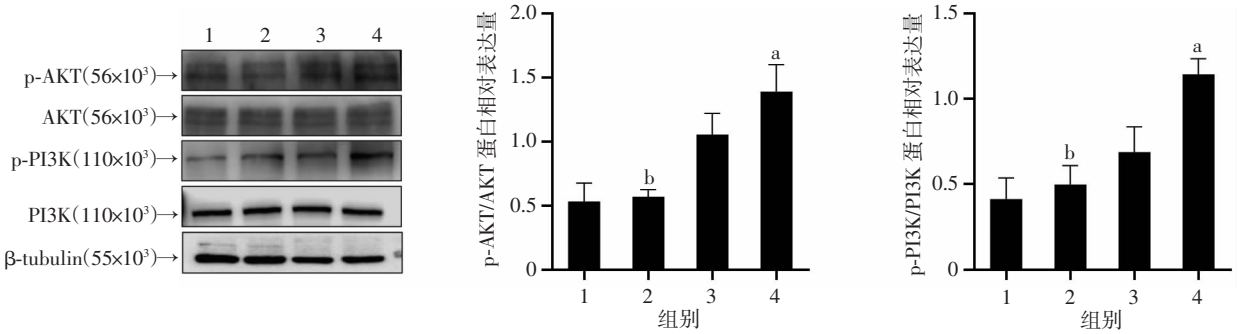
图 7 敲低 HES5 对 TGF-β1 诱导肾小管上皮细胞发生 EMT 的影响



1:Control 组;2:siHES5+TGF-β1 组;3:siHES5 组;4:TGF-β1 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 TGF-β1 组比较

A:Western blot 检测各组细胞中 Bax、Bcl2 蛋白表达的情况;B:流式细胞仪检测各组 HK-2 细胞凋亡情况

图 8 敲低 HES5 对 TGF-β1 诱导肾小管上皮细胞凋亡影响



1:Control 组;2:siHES5+TGF-β1 组;3:siHES5 组;4:TGF-β1 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 TGF-β1 组比较

图 9 敲低 HES5 对 TGF-β1 激活的 PI3K/AKT 信号通路的影响

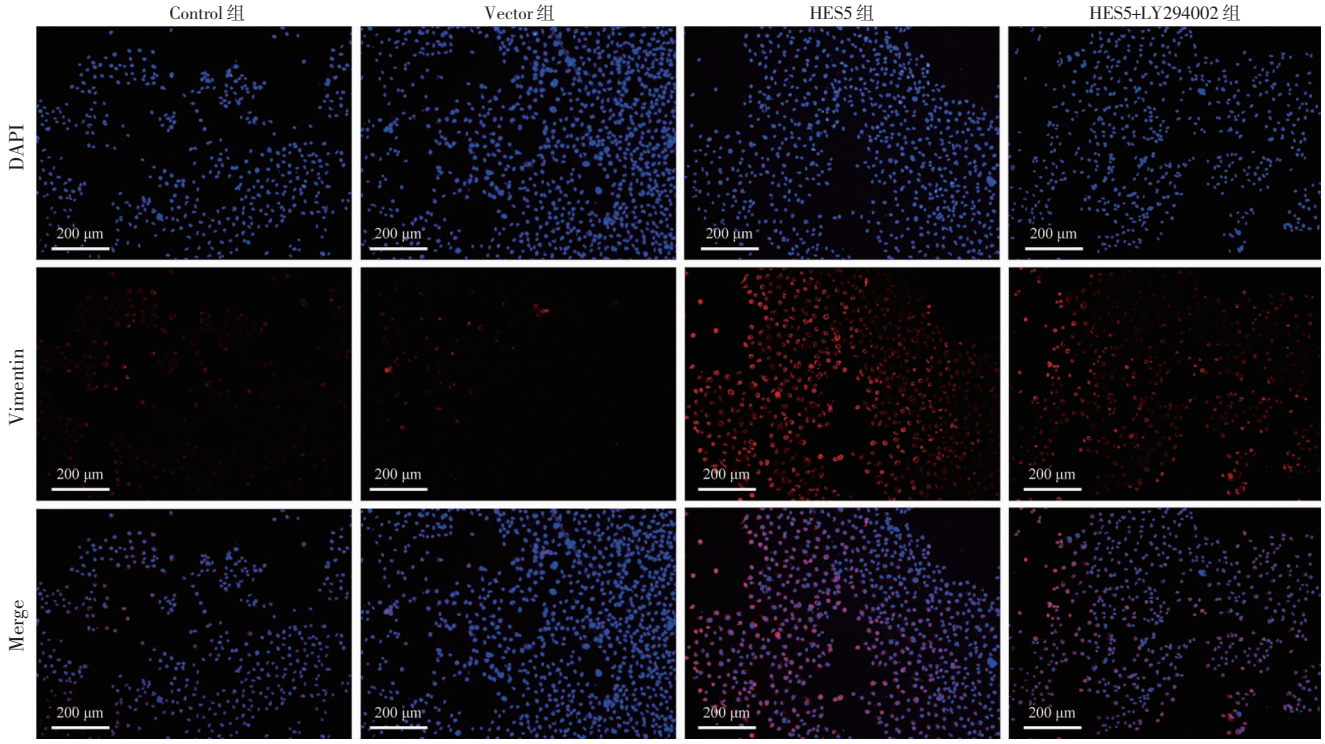


图 10 PI3K/AKT 信号通路抑制剂对 HES5 诱导的 Vimentin 影响

3 讨论

慢性肾脏病定义为各种原因引起的肾脏结构或功能损害(≥3 个月),具有病程长、预后差、并发症多及经济负担重等特点,迄今由于缺乏有效治疗手段而面临严峻挑战[2]。肾脏纤维化是慢性肾病的共性,与疾病的进展密切相关。最近的一些重要进展已经阐明了上皮-间质转化(EMT)在肾纤维化背后的核心地位,可作为一种延缓肾纤维化的潜在治疗靶标[3-4]。因此,探索调控肾小管上皮细胞 EMT 发生的核心靶分子,对于防治慢性肾脏病,延缓肾纤维化进展具有重要临床意义。

既往研究证实,Notch 信号通路参与 IgA 肾病、糖尿病肾病、高血压肾病的肾纤维化进程,而 HES5 作为 Notch 通路下游的靶基因是否参与肾纤维化尚无定论[13, 18-19]。本研究首先借助基因的差异性和 UUO 模型分析得出:HES5 的表达在 CKD 和小鼠纤维化肾组织中均显著上调,这与以往研究结论相似[8-9]。接着,研究发现 TGF-β1 以剂量依赖性和时间依赖性的方式上调 HES5 的蛋白表达,HES5 表达的增加伴随着 FN、Collagen Ⅰ、Vimentin 等促纤维化指标的表达增加,故本研究通过建立过表达或敲低 HES5 的细胞模型来进一步探讨 HES5 在肾小管 EMT 中的作用。研究发现,HES5 过表达可以促进肾小管上皮细胞 EMT 的进展,体现在与野生型 HK-2 细胞相比,质粒组的 HK-2 细胞中 FN、Collagen Ⅰ、Vimentin 表达较高。此外,敲低 HES5 显著抑制 TGF-β1 诱导 HK-2 细胞发生 EMT,降低了 FN、Collagen Ⅰ、Vimentin 的表达。这些结果进一步支持 HES5 参与了 EMT 的发生发展且可以独立于 TGF-β1 发挥作用。

除此,HES5 已被报道参与多种细胞的凋亡过程,如精原细胞、肝细胞、肠上皮细胞、神经元等[20-22]。有研究表明,在非酒精性脂肪性肝病中 HES5 抑制的 LIGHT 转录可能有助于肝细胞凋亡[20];而在高同型半胱氨酸血症中可以通过下调 HES1 和 HES5 表达来诱导嗅球神经元的凋亡[21]。本研究利用基因转染技术调控 HES5 的表达,借助 Western blot、TUNEL 及流式细胞术等实验技术探究 HES5 对肾小管上皮细胞凋亡的调控作用。实验发现质粒组的 HK-2 细胞中 Bax 蛋白增加和 Bcl2 蛋白减少;流式细胞术结果提示敲低 HES5 表达降低了 TGF-β1 诱导 HK-2 细胞凋亡率。肾间质炎症反应、肾小管上皮细胞凋亡和进行性纤维化是慢性肾损伤的主要表现,其中细胞凋亡与肾纤维化关系密切[23]。大量研究证实,抑制或逆转细胞凋亡可

延缓肾纤维化的进程,改善 CKD 患者的预后,提示细胞凋亡在肾纤维化的演变过程中扮演着重要的角色[24-25]。本研究揭示 HES5 是肾细胞调控凋亡的重要分子,并且敲低 HES5 有可能通过减少细胞凋亡来参与阻止肾纤维化的进展。

肾小管上皮细胞被认为是 EMT 的参与者,也是受害者,其失去自身的细胞特性而获得肌成纤维细胞特性的过程在各类 CKD 发生肾纤维化中起重要作用[12, 26]。既往研究证实,PI3K 的激活触发其下游的关键激酶 AKT 的活化,从而促进肾小管上皮细胞发生 EMT[14-16]。PI3K/AKT 信号通路的激活可以对肾组织产生不同的生物学效应,包括细胞凋亡、脂质代谢和 EMT 等。有研究发现,抑制 Notch 途经可以通过下调 PI3K/AKT 途径来减轻高糖诱导的足细胞凋亡,从而对糖尿病肾病起保护作用[27];槲皮素通过靶向抑制 PI3K/AKT 途径可能最大限度地减轻大鼠的肾纤维化和细胞凋亡[28]。本研究结果显示 TGF-β1 会诱导 HK-2 细胞中 PI3K/AKT 通路表达上调,而敲低 HES5 可抑制 TGF-β1 诱导的 PI3K/AKT 通路的激活。通过使用 PI3K 抑制剂处理过表达 HES5 组后,Vimentin 表达的促进作用被减弱。以上研究结果表明,敲低 HES5 有可能通过降低 PI3K/AKT 的活化程度发挥其抗纤维化的作用。

综上所述,本研究发现 HES5 可能在肾小管上皮细胞的 EMT 进程中扮演关键的角色。敲低 HES5 的表达可抑制肾小管上皮细胞转分化和凋亡,这可能与 PI3K/AKT 信号通路活性降低有关。在一定程度上,有望为慢性肾脏病患者抗纤维化治疗提供新思路和有效靶点,但具体机制还有待进一步探讨。

参考文献:

[1] JHA V, GARCIA-GARCIA G, ISEKI K, *et al*. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives[J]. Lancet, 2013, 382(9888): 260-272. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60687-X.

[2] WEBSTER A C, NAGLER E V, MORTON R L, *et al*. Chronic kidney disease[J]. Lancet, 2017, 389(10075): 1238-1252. DOI: 10.1016/s0140-6736(16)32064-5.

[3] HUMPHREYS B D. Mechanisms of renal fibrosis[J]. Annu Rev Physiol, 2018, 80: 309-326. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034227.

[4] LIU Y H. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2011, 7(12): 684-696. DOI: 10.1038/nrneph.2011.149.

[5] BANSOD S, KAGEYAMA R, OHTSUKA T. Hes5 regulates the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in mammalian neocortical development[J]. Development, 2017, 144(17): 3156-3167. DOI: 10.1242/dev.147256.

[6] GU S D, ZHANG R, GU J, *et al*. HES5 promotes cellular proliferation of non-small cell lung cancer through STAT3 signaling[J]. Oncol Rep, 2017, 37(1): 474-482. DOI: 10.3892/or.2016.5268.

[7] LUIKEN S, FRAAS A, BIEG M, *et al*. NOTCH target gene *HES5* mediates oncogenic and tumor suppressive functions in hepatocarcinogenesis[J]. Oncogene, 2020, 39(15): 3128-3144. DOI: 10.1038/s41388-020-1198-3.

[8] LI X B, NIU C L, CHEN W Y, *et al*. Effect of Danggui-Shaoyao-San-Containing serum on the renal tubular epithelial-mesenchymal transition of diabetic nephropathy[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2020, 21(12): 1204-1212. DOI: 10.2174/1389201021666200416094318.

[9] WEIDENBUSCH M, RODLER S, SONG S Q, *et al*. Gene expression profiling of the Notch-AhR-IL22 axis at homeostasis and in response to tissue injury[J]. Biosci Rep, 2017, 37(6): BSR20170099. DOI: 10.1042/BSR20170099.

[10] TANG R, XIAO X C, LU Y, *et al*. Interleukin-22 attenuates renal tubular cells inflammation and fibrosis induced by TGF-β1 through Notch1 signaling pathway[J]. Ren Fail, 2020, 42(1): 381-390. DOI: 10.1080/0886022X.2020.1753538.

[11] YU C, XIONG C X, TANG J H, *et al*. Histone demethylase JMJD3 protects against renal fibrosis by suppressing TGFβ and Notch signaling and preserving PTEN expression[J]. Theranostics, 2021, 11(6): 2706-2721. DOI: 10.7150/thno.48679.

[12] YUAN Q, TANG B, ZHANG C. Signaling pathways of chronic kidney diseases, implications for therapeutics[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 182. DOI: 10.1038/s41392-022-01036-5.

[13] MA T K, LI X, ZHU Y H, *et al*. Excessive activation of Notch signaling in macrophages promote kidney inflammation, fibrosis, and necroptosis[J]. Front Immunol, 2022, 13: 835879. DOI: 10.3389/fimmu.2022.835879.

[14] WANG Z H, CHEN Z, LI B S, *et al*. Curcumin attenuates renal interstitial fibrosis of obstructive nephropathy by suppressing epithelial-mesenchymal transition through inhibition of the TLR4/NF-κB and PI3K/AKT signalling pathways[J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 828-837. DOI: 10.1080/13880209.2020.1809462.

[15] WANG J, ZHU H B, HUANG L Q, *et al*. Nrf2 signaling attenuates epithelial-to-mesenchymal transition and renal interstitial fibrosis via PI3K/AKT signaling pathways[J]. Exp Mol Pathol, 2019, 111: 104296. DOI: 10.1016/j.yexmp.2019.104296.

[16] XU Z X, JIA K Q, WANG H, *et al*. METTL14-regulated PI3K/AKT signaling pathway via PTEN affects HDAC5-mediated epithelial-mesenchymal transition of renal tubular cells in diabetic kidney disease[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(1): 32. DOI: 10.1038/s41419-020-03312-0.

[17] YANG S B, ZHONG S, DENG Z J, *et al*. Hyperforin regulates renal fibrosis via targeting the PI3K-AKT/ICAM1 axis[J]. Cell Signal, 2023, 108: 110691. DOI: 10.1016/j.cellsig.2023.110691.

[18] MUREA M, PARK J K, SHARMA S, *et al*. Expression of Notch pathway proteins correlates with albuminuria, glomerulosclerosis, and renal function[J]. Kidney Int, 2010, 78(5): 514-522. DOI: 10.1038/ki.2010.172.

[19] XIAO M, BAI S J, CHEN J, *et al*. CDKN2B-AS1 participates in high glucose-induced apoptosis and fibrosis *via* NOTCH2 through functioning as a miR-98-5p decoy in human podocytes and renal tubular cells[J]. Diabetol Metab Syndr, 2021, 13(1): 107. DOI: 10.1186/s13098-021-00725-5.

[20] MIAO X L, GUO Y, ZENG S, *et al*. HES5-mediated repression of LIGHT transcription may contribute to apoptosis in hepatocytes[J]. Cell Death Discov, 2021, 7(1): 308. DOI: 10.1038/s41420-021-00707-6.

[21] ZHANG J W, PANG B, ZHAO Q, *et al*. Hyperhomocysteinemia induces injury in olfactory bulb neurons by downregulating Hes1 and Hes5 expression[J]. Neural Regen Res, 2018, 13(2): 272-279. DOI: 10.4103/1673-5374.220779.

[22] WANG H, YUAN Q Q, NIU M H, *et al*. Transcriptional regulation of P63 on the apoptosis of male germ cells and three stages of spermatogenesis in mice[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 76. DOI: 10.1038/s41419-017-0046-z.

[23] HE P, LI D T, ZHANG B R. Losartan attenuates renal interstitial fibrosis and tubular cell apoptosis in a rat model of obstructive nephropathy[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(2): 638-644. DOI: 10.3892/mmr.2014.2304.

[24] CHEN Y K, MU L, XING L L, *et al*. Rhein alleviates renal interstitial fibrosis by inhibiting tubular cell apoptosis in rats[J]. Biol Res, 2019, 52(1): 50. DOI: 10.1186/s40659-019-0257-0.

[25] DOCHERTY N G, O'SULLIVAN O E, HEALY D A, *et al*. Evidence that inhibition of tubular cell apoptosis protects against renal damage and development of fibrosis following ureteric obstruction[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 290(1): F4-F13. DOI: 10.1152/ajprenal.00045.2005.

[26] DJUDJAJ S, BOOR P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis[J]. Mol Aspects Med, 2019, 65: 16-36. DOI: 10.1016/j.mam.2018.06.002.

[27] WANG X M, YAO M, LIU S X, *et al*. Interplay between the Notch and PI3K/AKT pathways in high glucose-induced podocyte apoptosis[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306(2): F205-F213. DOI: 10.1152/ajprenal.90005.2013.

[28] TU H T, MA D H, LUO Y Y, *et al*. Quercetin alleviates chronic renal failure by targeting the PI3K/AKT pathway[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 6538-6558. DOI: 10.1080/21655979.2021.1973877.

(收稿:2023-10-26;修回:2023-11-24)

(编辑 刘秋池)