DOI:10.16016/j.2097-0927.202404080

转录因子 Six1 调控肾源性分子表达促进肾脏损伤修复

张曼玲[1,2],徐腾飞[2],王宇彤[1],马 旭[1],金 永[1,2] 010050 呼和浩特,内蒙古医科大学:附属医院风湿免疫科[1],内蒙古自治区风湿病发病机制与免疫诊断重点实验室[2]

[摘要] **目的** 探讨急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)后肾源性转录因子正弦眼同源异型盒1(sine oculis homeobox 1, Six1)调控损伤修复的作用机制。**方法** 将 C57BL/6J 小鼠进行肾脏缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)实验,并于造模后第 1、2 和 3 天收集血清样品与肾脏组织;检测血肌酐、血尿素氮水平及肾脏 HE 染色;检测肾源性分子(Six1、Pax2 等)、细胞增殖/迁移基因(Cyclin A1、MMP9 等)表达及分布。在 Six1 过表达/基因敲除及氯化钴诱导损伤等细胞模型中,检测凋亡通路(Bcl2、Caspase3 等)及细胞增殖等分子的表达。此外,利用腺相关病毒体内过表达 Six1 并建立 IRI 模型,检测 Six1 等相关分子的表达。**结果** IR 损伤后,Six1 在上皮细胞中被显著激活;肾源性及细胞增殖/迁移分子(Pax2、Cyclin A1、MMP9 等)表达显著上调($P<0.05$),并与 Six1 表达正相关,且增殖迁移分子(Ki67、MMP9)同样定位于小管上皮细胞。在 Six1 过表达细胞模型中,肾源性与细胞增殖/迁移分子(Pax2、Cyclin A1、MMP9 等)表达水平也显著上调($P<0.05$)。在过表达 Six1 肾脏中,肾源性及抗凋亡分子(Six2、Pax2、Bcl2 等)表达上调,肾损伤分子(Kim1)表达减少;而在 IR 损伤第 2 天,过表达 Six1 肾脏中抗凋亡基因(Bcl2、Stat3)显著上调($P<0.05$),损伤及凋亡分子(Kim1、Caspase3)显著下调($P<0.05$)。在氯化钴诱导模型中,与对照正常细胞比较,细胞增殖率在 Six1 敲除细胞(TCMK1-Six1$^{-/-}$)中显著下降($P<0.05$),而在 Six1 过表达细胞(TCMK1-Six1)中升高($P<0.05$);肾源性、抗凋亡通路及细胞增殖/迁移分子(Pax2、Bcl2、Cyclin A1、MMP9 等)表达在 TCMK1-Six1$^{-/-}$中减少,凋亡与肾损伤(Caspase3、Kim1)分子在 TCMK1-Six1 中显著下调($P<0.05$)。**结论** AKI 后激活的 Six1 通过上调肾源性分子的表达,并诱导抗凋亡通路分子表达,促进肾小管上皮细胞的增殖/迁移,参与了 IR 诱导肾脏损伤的修复。

[关键词] 急性肾损伤;肾源性分子;转录因子 Six1;细胞增殖与迁移
[中图法分类号] R363.22; R394.3; R692 [文献标志码] A

Transcription factor Six1 regulates expression of nephrogenic molecules to promote repair of kidney injury

ZHANG Manling[1,2], XU Tengfei[2], WANG Yutong[1], MA Xu[1], JIN Yong[1,2] [1]Department of Rheumatology and Immunology, the Affiliated Hospital; [2]Inner Mongolia Key Laboratory for Pathogenesis of Rheumatic Diseases and Immunological Diagnosis, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia Autonomous Region, 010050, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and mechanism of sine oculis homeobox 1 (Six1), a nephrogenic transcription factor, in regulating injury repair after acute kidney injury (AKI). **Methods** C57BL/6J mice were inflicted with renal ischemia reperfusion (IR) injury to establish AKI model, and then the serum samples and kidney tissues were collected at days 1, 2, and 3 after modeling. Serum creatinine (Cr) and blood urea nitrogen (BUN) levels were measured and renal morphology was observed with HE staining. The expression and distribution of nephrogenic molecules (Six1 and Pax2, *etc.*) and cell proliferation/migration genes (Cyclin A1, MMP9, *etc.*) were detected with RT-PCR, Western blotting, and

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82260138,82360140);内蒙古自然科学基金项目(2022QN08022);内蒙古高校青年科技英才项目(NJYT23049);内蒙古医科大学附属医院引进博士科研启动金(2022NYFYBS005)

[通信作者] 金 永,E-mail:20212308@immu.edu.cn

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/)

immunofluorescence assay and immunohistochemical assay. The expression of apoptosis pathway (Bcl2, Caspase3, *etc.*) and cell proliferation related molecules were evaluated in Six1 overexpression/knockout human epithelial cells (HK2) with $CoCl_2$-induced injury. Additionally, after the adeno-associated viruses carrying Six1 overexpression vector were used to overexpress the molecule in the mice, the expression of Six1 and other related molecules were detected after IR injury modeling. **Results** After renal IR injury, Six1 was significantly activated in epithelial cells, the expression of nephrogenic and cell proliferation/migration molecules (Pax2, Cyclin A1, MMP9, *etc.*) was obviously up-regulated ($P<0.05$), which was positively correlated with Six1 expression, while the proliferation/migration molecules (Ki67, MMP9) were also localized within the tubular epithelial cells. In cellular models of Six1 overexpression, the expression levels of nephrogenic and cell proliferation/migration molecules (Pax2, Cyclin A1, MMP9, *etc.*) were also notably up-regulated ($P<0.05$). In the mice with renal overexpression of Six1, the nephrogenic molecules as well as anti-apoptotic ones (Six2, Pax2, Bcl2, *etc.*) were up-regulated, while the expression of kidney injury-related molecule (Kim1) in kidneys was reduced in the renal tissues. While, in 2 d after IR injury, the anti-apoptotic gene (Bcl2, Stat3) was significantly up-regulated ($P<0.05$), and the apoptotic and injury molecules (Kim1, Caspase3) showed remarkable down-regulation ($P<0.05$) in the mice with renal Six1 overexpression. Furthermore, $CoCl_2$-inducion significantly decreased the cell proliferation rate in the Six1 knockout group (TCMK1-Six1$^{-/-}$) ($P<0.05$) but increased the rate in the Six1 overexpression group (TCMK1-Six1) when compared to the control cells ($P<0.05$). And, the expression of nephrogenic, anti-apoptotic pathways and cell proliferation/migration molecules (Pax2, Bcl2, Cyclin A1, MMP9, *etc.*) were reduced in TCMK1-Six1$^{-/-}$ group, and apoptosis and kidney injury molecules (Caspase3, Kim1) were significantly down-regulated in TCMK1-Six1 group ($P<0.05$). **Conclusion** Activation of Six1 after AKI can promote the proliferation/migration of renal tubular epithelial cells by up-regulating nephrogenic molecules and inducing anti-apoptotic pathway molecules, and then, participate in IR-induced renal injury repair.

[**Key words**] acute kidney injury; nephrogenic molecule; transcription factor Six1; cell proliferation and migration

Supported by the National Natural Science Foundation of China (82260138, 82360140), the Natural Science Foundation of Inner Mongolia (2022QN08022), the Science and Technology Project for Young Talents of Inner Mongolia Colleges and Universities (NJYT23049), and the Scientific Research Initiation Foundation for Introduced Doctors of the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University (2022NYFYBS005). Corresponding author: JIN Yong, E-mail: 20212308@immu.edu.cn

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是多种原因引起的以肾功能快速下降及代谢废物蓄积为表现的临床危重综合征,其发病率和死亡率一直居高不下。在住院患者中 AKI 发病率可高达 8%~10%[1]。值得庆幸的是肾脏具有一定的自我修复能力,即使是严重的损伤,当损伤因素终止后,患者的肾功能也有可能重新恢复[2-3]。最新研究提示,肾脏在内源性修复过程中,肾脏胚胎发育相关的关键分子被重现激活,并对损伤修复起积极作用[4-6]。这些在肾脏发生过程中显著表达,肾脏发育结束后不表达或低表达,而在肾脏损伤修复中的重新激活的分子被称为肾源性分子,如性别决定区 Y 框蛋白 9(SRY-related high-mobility group box gene 9,Sox9)[4]、配对盒基因 2 蛋白(paired box gene 2, Pax2)[6]、性别决定区 Y 框蛋白 4(SRY-related high-mobility group box gene 4,Sox4)[7]、正弦眼同源异型盒 1(sine oculis homeobox 1, Six1)[8]等。基于对损伤后关键发育基因重新激活的研究,肾脏损伤修复"重现"胚肾发育途径的说法被提出[9]。然而,重新激活的基因是否使用发育过程中类似的基因调控网络来再生修复受损细胞,是否在损伤修复的细胞分子通路中存在关键的基因,尚不清楚。

Six1 为 Six 基因家族的一员,是调控哺乳动物胚胎发育的关键转录因子,同时参与多种组织器官的发育[10-11]和恶性肿瘤的发生[12]。研究报道 Six1 通过调节肾源性始祖细胞的活力,促进小鼠肾脏的发育[13],此外,作为影响肾脏发育的 Six-Pax-Gdnf 信号通路的关键转录因子,影响包括 Six2、Six4、Pax2、Pax8、Gdnf 等调节因子的表达[14-16]。本课题组前期研究发现 Six1 通过促进细胞增殖/迁移以及抑制炎症来减轻小鼠缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)诱导的肾脏损害[8]。但对于 Six1 调控其他肾源性分子表达进而促进肾脏损伤修复的研究有待深入探索。因此,本研

究拟在前期研究基础上通过构建 IR 小鼠模型、Six1 过表达动物与细胞模型及细胞损伤模型,观察肾源性分子在 IR 诱导的 AKI 中的激活,探究 Six1 对肾源性分子表达的调控作用,及促进肾脏损伤修复的机制,为临床防治 AKI 提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞

C57BL/6J 雄性小鼠,8~10 周,体质量 18~25 g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司(许可证号:SCXK 京 2019-0010)提供,所有动物实验经过内蒙古医科大学医学伦理委员会批准(YKD202201187);人 HK2、小鼠 TCMK1 细胞、Six1 基因敲除细胞(TCMK1-Six1$^{-/-}$)以及过表达载体 pCAGDNA3、T-载体、绿色荧光蛋白载体 pEGFP-C1 由内蒙古自治区风湿病发病机制与免疫诊断重点实验室提供;用于小鼠体内过表达 Six1 的腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)(AAV-Six1)及对照病毒(AAV-Control)由上海吉凯基因公司提供。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM、FBS 等细胞培养试剂购自美国 GIBCO 公司;Hi Script Ⅱ Q RT Super Mix 试剂盒购自中国诺唯赞生物公司;脂质体 Lipofectamine 3000、遗传霉素 G418 购自美国 Thermo 公司;RNA 提取试剂盒购自美国 Promega 公司;Ki67(兔源抗小鼠)、Pax2(兔源抗小鼠)、Wt1(兔源抗小鼠)、Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)(羊源抗小鼠)抗体购自美国 Abcam 公司;Six1(鼠源抗人)抗体购自美国 SANTA 公司;Six1(兔源抗小鼠)抗体购自美国 CST 公司; Six2(兔源抗人)、Aqp1(鼠源抗人)、MMP9(兔源抗人)、Gapdh(鼠源抗人)抗体购自中国 Proteintech 公司;Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor™ 488/546(羊源抗兔)、Goat anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor™ 488/546(羊源抗鼠)、Goat anti-Rabbit IgG (H+L), HRP(羊源抗兔)抗体, 购自美国 Thermo 公司。PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司,电泳槽及凝胶成像仪购自美国 BIO-RAD 公司,荧光倒置显微镜购自日本 Nikon 公司,荧光定量 PCR 仪购自美国罗氏公司。

1.3 方法

1.3.1 缺血再灌注诱导的肾损伤小鼠模型的构建

使用 8~10 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,建立单侧肾脏 IR 诱导损伤模型。实验模型组与假手术对照组(Sham 组,只暴露左侧肾蒂,并不夹闭),每组小鼠 5 只。小鼠麻醉后,左侧腹背切口并暴露左侧肾脏,利用微血管钳夹闭肾蒂 45 min,当肾脏颜色由鲜红转变为暗红色,判断夹闭成功。夹闭时间完成后,即刻取下微血管钳,随后手术缝合。造模手术后的第 1 天(IRI 1 d 组)、第 2 天(IRI 2 d 组)和第 3 天(IRI 3 d 组)进行血清样品与肾脏组织样品取样。利用酶法测定血肌酐(serum creatinine,SCr)及血尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)的浓度,具体方法见试剂盒说明(南京建成生物公司)。小鼠模型肾脏病理染色(HE)与损伤评分参照前期已发表论文[8]。

1.3.2 AKI 后肾源性分子及损伤修复基因的表达分析

1.3.2.1 Six1 及相关分子在损伤肾脏中的表达与定位 Six1 等分子 mRNA 检测:肾脏匀浆并提取总 RNA,利用 Hi Script Ⅱ Q RT Super Mix,获得 cDNA;以 Gene Bank 已报道的肾源性(Six1、Pax2、Six2、Sox9 及 Vimentin)与损伤修复(Cyclin A1、Cyclin D1、C-myc 及 MMP9),抗凋亡(Bcl2 和 Stat3),以及损伤凋亡(Kim1、Bax、Caspase3、Caspase9)等分子序列,设计相应的引物见表 1,进行实时定量 PCR,检测上述基因相对于内参基因(β-Actin)的表达量。

表 1 目的基因引物序列

基因名称	引物序列(5′→3′)	片段大小/bp
Six1	AAGGAGGGAACCTGGAAC GGTGATTGTGAGGCGAGAAG	174
Pax2	TACGAGACTGGCAGCATCAA CGGGTTCTGTCGCTTGTATT	105
Six2	TGTGGGAGGGCGATAGATTC CCAAAGGATACCGAGCAGACC	119
Sox9	CCAGGTGCTGAAGGGCTAC CTCCTCCACGAAGGGTCTC	238
Vimentin	CCCAGATTCAGGAACAGCA AGGGCATCCACTTCACAGG	259
Cyclin A1	CCACCACCCATGCCCAGTCAGA CCAACCTCCACCAGCCAGTCCA	199
Cyclin D1	TGTGAGGAGCAGAAGTGCGAAGA GCCGGATAGAGTTGTCAGTGTAGATG	199
C-myc	GAGATGATGACCGAGTTACTTGGAGG CTCAGGCTGGTGCTGTCTTTGC	191
MMP9	CACGGCAACGGAGAAGGCAAAC CGTCCACTCGGGTAGGGCAGAA	166
Bcl2	GTGGTGGAGGAACTCTTCAGGG GCCGGTTCAGGTACTCAGTCAT	154
Stat3	ACTTCAGACCCGCCAACAAA CTCCACCACGAAGGCACTCT	151
Kim 1	ATGCCCATCTTCTGCTTGTC CCATCCAGGAATCTCCACTC	184
Bax	CAGGATGCGTCCACCAAGAA CAAAGTAGAAGAGGGCAACCAC	196
Caspase3	GGGACTGATGAGGAGATGGC GGGACTGGATGAACCACGAC	127
Caspase9	TGCGGTGGTGAGCAGAAAGA CTGGGAAGGTGGAGTAGGACA	190

Six1 蛋白印迹检测:蛋白样品加入上样缓存液后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,随后通过转膜电泳将目的蛋白转移至聚偏氟乙烯膜;脱脂奶粉封闭后,进行一抗孵育(Six1, 1∶2 000),4 ℃过夜;经过洗涤,室温进行二抗[Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP),1∶4 000]孵育1.5 h;洗膜后,利用化学发光液浸润聚偏氟乙烯膜,在凝胶成像仪中进行显影拍照。

肾脏 Six1 与 Aqp1/ MMP9 免疫荧光共染色:冰冻切片经 10% 的山羊血清封闭后,加入一抗(Six1, 1∶100;AQP1,1∶100)或(Six1,1∶100;MMP9,1∶100),4 ℃过夜。避光加二抗[Goat anti-Rabbit/ Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor™ 488: 1∶500; Goat anti-Mouse/ Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor™ 546: 1∶500],避光孵育 1 h 后,移除二抗。加入适量细胞核染色液,荧光显微镜下观察。

肾脏 Ki67 免疫组织化学染色:石蜡组织切片经二甲苯脱蜡、乙醇水化、柠檬酸/柠檬酸三钠抗原修复、过氧化氢处理及山羊血清封闭后,加入一抗(Ki67, 1∶100),4 ℃过夜。加二抗[Goat anti-Rabbit IgG(H+L), HRP: 1∶500],室温避光孵育 1 h 后。向切片中加入适量配置显色液,光学显微镜下观察染色结果。

1.3.2.2 Six1 表达与肾源性等分子表达的相关性分析 基于 AKI 后不同阶段小鼠肾脏中 Six1 及肾源性、损伤修复分子 mRNA 表达结果,利用 GraphPad Prism 6.0 统计分析软件,对 Six1 及不同基因的 mRNA 表达进行相关性分析。

1.3.3 转染 Six1 过表达载体上皮细胞的建立

1.3.3.1 Six1 过表达载体的构建 小鼠 Six1 基因克隆:提取肾脏总 RNA,反转录获得 cDNA;利用 PCR 引物:上游 5′-GCGAGCTCCCCAGCTCTGCTCACTG-3′,下游 5′-GCAAGCTTCCCACTTAGGAACCCAA-3′进行扩增,经过电泳及凝胶回收,获得 Six1 cDNA;将该 cDNA 与 T-载体连接,并测序比对。

过表达载体构建:限制性内切酶 BamH Ⅰ酶切 Six1-T-载体及 pCAGDNA3 载体,经凝胶电泳并回收 DNA 片段;将 Six1 cDNA 片段与 pCAGDNA3 载体片段连接;通过重组质粒酶切鉴定,获得正确连接的 pCAGDNA3-mSix1 载体。

1.3.3.2 Six1 过表达细胞的建立及相关分子表达鉴定 细胞转染及筛选具体方法参照已发表论文[8],Six1 过表达人与小鼠上皮细胞(HK2-Six1 组,TCMK1-Six1 组),转染空载体的细胞(Control 组)进行总 RNA 及总蛋白提取,利用实时定量 PCR 检测 TCMK1-Six1 中 Six1、Six2、Pax2、Sox9、Cyclin A1、C-myc 及 MMP9 mRNA 水平;利用抗体(Six1, Six2, Pax2, Wt1)免疫印迹检测 HK2-Six1 中 Six1、Six2、Pax2 及 Wt1 蛋白表达。

1.3.4 肾脏过表达 Six1 小鼠模型的建立 腺相关病毒注射具体方法见文献[8]。病毒注射感染肾脏 2 周后,进行相关分子(Six1、Six2、Pax2、Sox9、Bcl2、Stat3 及 Kim1)mRNA 表达检测。Six1 过表达小鼠(AAV- Six1 组)与对照小鼠(AAV-Control 组),在 IRI 2 d 进行血清与肾脏样品收集,并检测 SCr 与 BUN 水平,同时检测 Bcl2、Stat3、Kim1、Bax、Caspase3、Caspase9 分子 mRNA 表达水平。

1.3.5 氯化钴诱导细胞损伤模型的建立及相关分子表达鉴定 细胞增殖率检测:对照组(TCMK1-Control 组)、基因敲除(TCMK1-Six1$^{-/-}$ 组)及过表达(TCMK1-Six1 组)细胞,以 5.0×10^3 个/孔细胞接种于 96 孔培养皿中(每组 5 个复孔),DMEM/F12 中培养 24 h 后,添加氯化钴(终浓度为 100 ng/mL),处理 24 h。随后利用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖率。同时提取各组细胞总 RNA,并利用实时定量 PCR 检测相关分子(Six2、Sox9、Pax2、Bcl2、Caspase3、Kim1、Cyclin A1、Cyclin D1 及 MMP9)的表达。

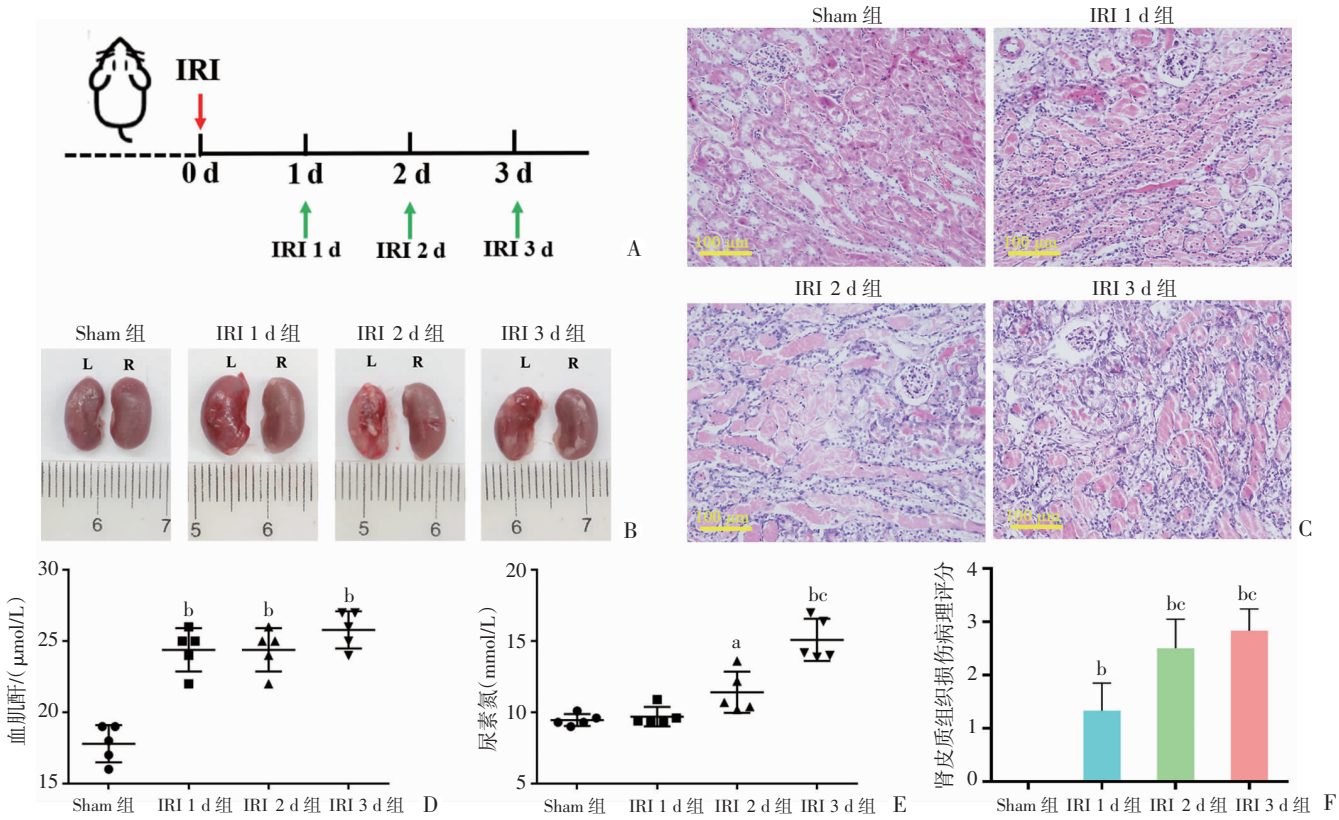
1.4 统计学分析

研究数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。当比较 2 组数据时,使用独立样本 t 检验进行统计分析。当比较 3 组或多组数据时,进行单因素方差分析,接着进行 Dunnett 检验或 Bonferroni 校正。使用SPSS 10.0 软件评估差异。$P<0.05$ 视为差异具有统计学意义。采用 GraphPad Prism 6.0 软件绘制柱状、点状图。

2 结果

2.1 IRI 后小鼠肾脏损伤显著

利用 IR 诱导建立小鼠 AKI 模型。图 1A 为建立模型的具体策略。经过造模处理后,发现:与假手术(Sham 组)肾脏形态对比,IRI 1 d 组肾脏明显充血并呈现鲜红色,IRI 2 d 组出现肿胀,而 IRI 3 d 组充血肿胀最为显著(图 1B)。肾脏 HE 染色表明:IRI 1 d 组开始出现小管上皮细胞极性改变、刷状缘脱落、轻微的蛋白管型形成,免疫细胞浸润,肾小球出现萎缩;在 IRI 2 d 组中,小管上皮细胞脱落明显,在管腔中形成大量的蛋白管型,免疫细胞浸润明显,肾小球明显萎缩,毛细血管毁坏;而在 IRI 3 d 组中蛋白管型严重阻塞肾小管,免疫细胞浸润严重,肾小球显著萎缩(图 1C);肾脏损伤评分提示,IRI 2 d、IRI 3 d 组损伤显著高于 IRI 1 d 组($P<0.05$)(图 1F)。IRI 1 d、IRI 2 d、IRI 3 d 组,SCr 水平显著高于 Sham 组($P<0.05$),而在造模组之间没有显著差异;BUN 水平在 IRI 2 d、IRI 3 d 组中显著高于 Sham 组,且在 IRI 3 d 组中最高($P<0.05$)(图 1D、E)。



a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 Sham 组比较;c:$P<0.05$,与 IRI 1 d 组比较

A: AKI 小鼠模型构建策略;B:不同时间点造模组(IRI 1 d、IRI 2 d、IRI 3 d)与假手术组(Sham)肾脏形态 L:左侧肾脏,R:右侧肾脏;C:不同组别肾脏 HE 病理染色;D、E:血肌酐及尿素氮水平;F. 肾脏损伤病理评分

图 1 缺血再灌注对小鼠肾脏病理及功能影响($n=5,\bar{x}\pm s$)

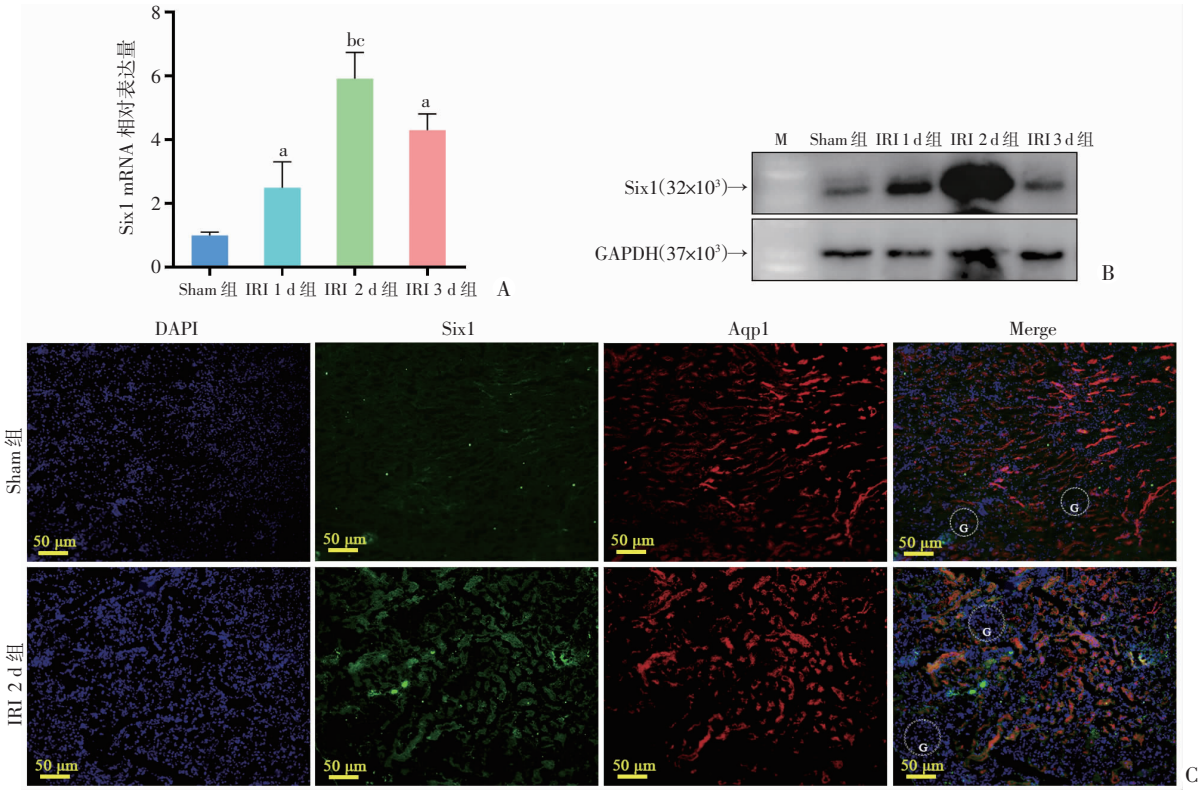
2.2 AKI 后 Six1 在肾小管上皮细胞中表达上调

实时定量 PCR 对损伤肾脏 mRNA 表达分析,发现 Six1 在 AKI 后被激活,其表达在损伤后第 1 天(IRI 1 d)显著增加(2.4 倍,$P<0.05$),在第 2 天(IRI 2 d)时达到峰值(5.9 倍),随后在第 3 天(IRI 3 d)时有所下降(4.3 倍),但与假手术组(Sham)相比,Six1 的表达均显著升高($P<0.05$)(图 2A)。Six1 蛋白质表达趋势与 mRNA 相同(图 2B)。为证实 Six1 表达分布,对 IRI 2 d 组与 Sham 组肾脏标本,进行免疫荧光检测,发现 Six1 基因定位于肾小管上皮细胞,并与近端小管细胞标记 Aqp1 共定位(图 2C)。

2.3 肾脏发育基因及细胞增殖/迁移分子在肾脏损伤后表达上调并与 Six1 表达正相关

实时定量 PCR 检测发现:肾源性转录因子 Pax2 与 Six2 在 IRI 2 d、3 d 肾脏中显著表达($P<0.05$),与 Sham 组相比,分别升高 1.8 倍、2.3 倍与 2.4 倍、1.5 倍;同样肾脏源性分子 Sox9 与 Vimentin,在 IRI 1 d、2 d、3 d 肾脏中均表达显著上调($P<0.05$),与 Sham 组相比,分别升高 4.2 倍、6.2 倍、3.5 倍与 2.2 倍、1.8 倍、3.3 倍(图 3A)。上述结果并结合 Six1 表达趋势,统计分析表明 Six1 表达与 Pax2($r=0.512\ 7$;$P=0.158\ 1$)、Sox9($r=0.663\ 1$;$P=0.051\ 6$)、Six2($r=0.832\ 0$;$P=0.005\ 4$)表达均正相关(图 3C),其中 Six1 与 Six2 表达显著相关($P<0.05$)。

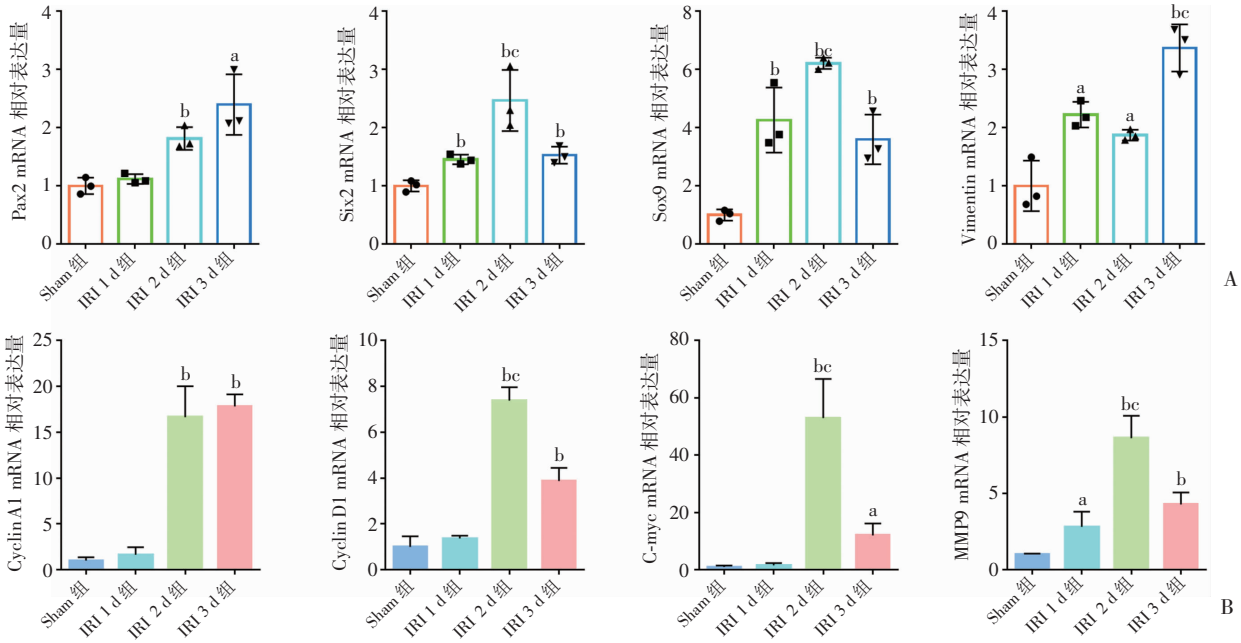
此外,与 Sham 组相比,细胞周期分子 Cyclin A1、Cyclin D1 及 C-myc 表达,同样在 IRI 2 d、3 d 肾脏中显著上调($P<0.05$);而细胞迁移分子 MMP9 在 IRI 1 d、2 d、3 d 肾脏中表达均显著上调($P<0.05$)(图 3B)。利用统计分析软件,损伤后肾脏中 Cyclin A1($r=0.745\ 8$;$P=0.021\ 0$)、C-myc($r=0.806\ 4$;$P=0.008\ 6$)及 MMP9($r=0.846\ 2$;$P=0.004\ 0$)表达均与 Six1 表达呈显著正相关($P<0.05$),其中细胞增殖分子 C-myc 与细胞迁移分子 MMP9 表达与 Six1 表达相关性较好(图 3D)。



a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 Sham 组比较;c: $P<0.05$, 与 IRI 1 d 组比较

A: AKI 后肾脏中 Six1 mRNA 表达水平;B: Six1 蛋白质表达水平 M:分子量标准;C: IRI 2 d 组与 Sham 组肾脏中 Six1 表达分布及与 AQP1 共表达情况 Ⓖ:示肾小球

图 2 转录因子 Six1 在 AKI 后的肾小管上皮细胞中的表达($n=3, \bar{x}\pm s$)

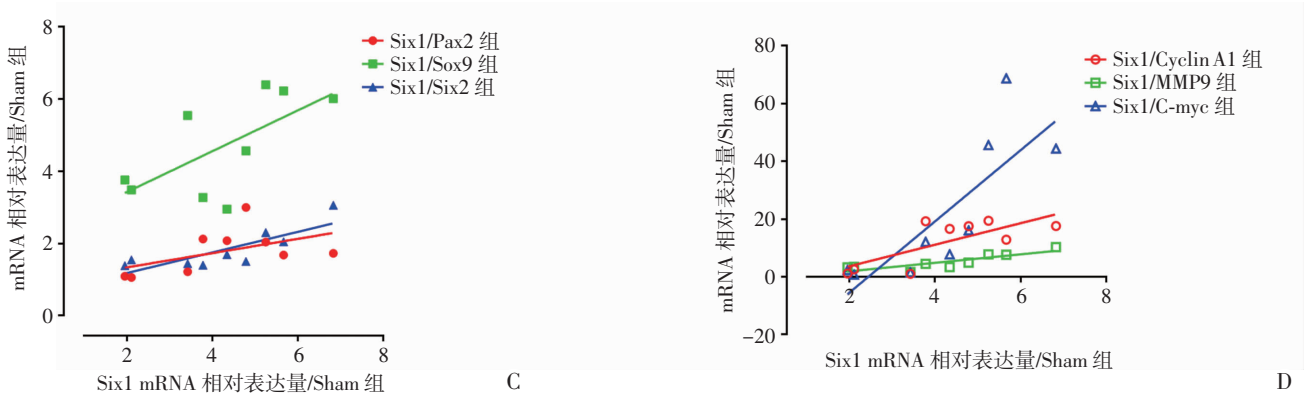


a :$P<0.05$, b: $P<0.01$, 与 Sham 组比较;c: $P<0.05$, 与 IRI 1 d 组比较

A、B: 肾脏中肾源性(Pax2、Six2、Sox9、Vimentin),细胞增殖/迁移(Cyclin A1、Cyclin D1、C-myc、MMP9)分子 mRNA 表达水平

图 3 AKI 后肾脏发育相关分子与细胞增殖/迁移基因表达情况($n=3, \bar{x}\pm s$)

(图 3C、D 续下页)

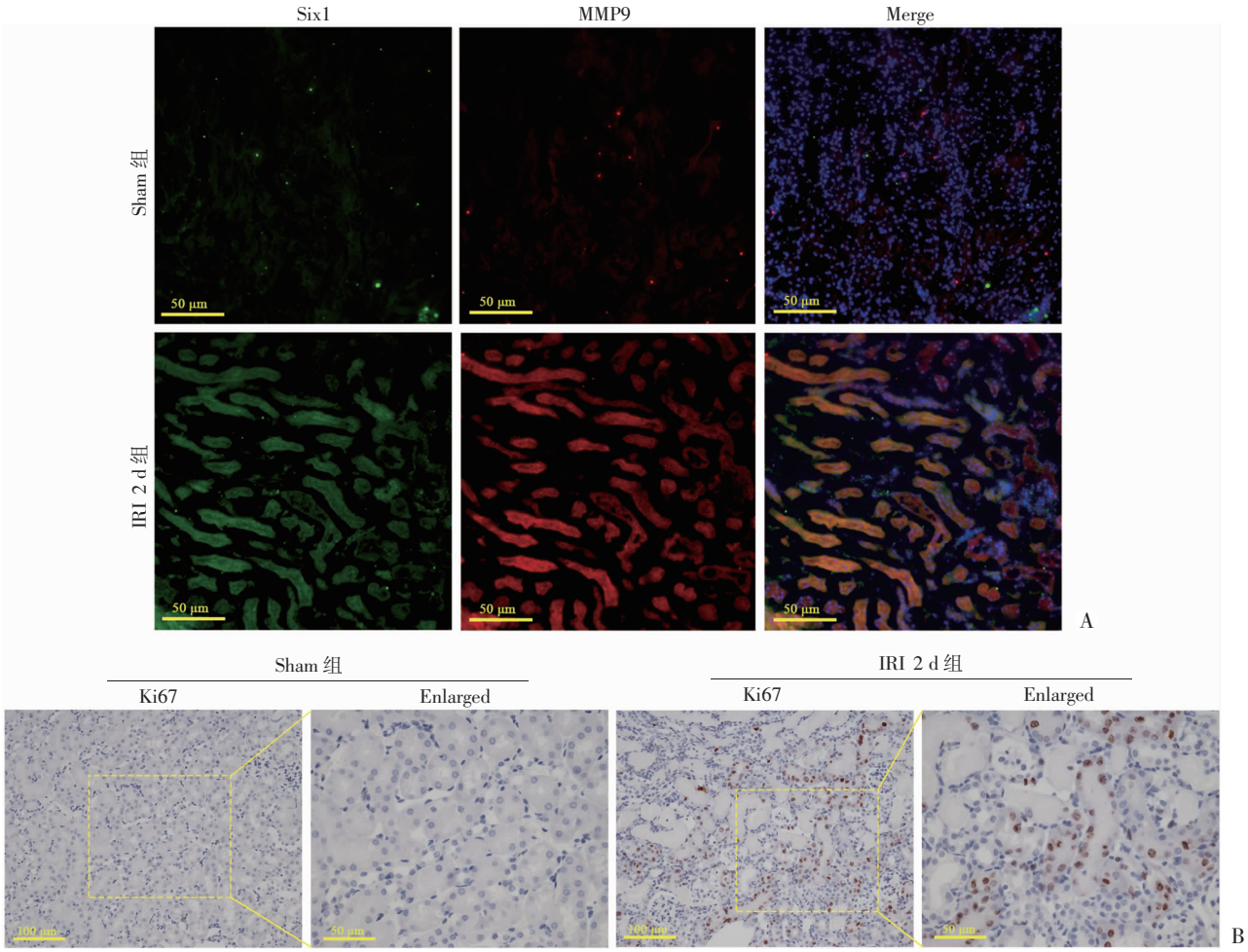


C、D：Pax2、Sox9、Six2、Cyclin A1、C-myc 及 MMP9 mRNA 表达与 Six1 表达线性相关性分析

续图 3　AKI 后肾脏发育相关分子与细胞增殖/迁移基因表达情况（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

2.4　IR 诱导损伤后肾脏细胞增殖/迁移分子表达定位与 Six1 分布有关

免疫荧光染色表明，AKI 后小管上皮细胞中迁移分子 MMP9 在 IRI 2 d 中显著提升，并与 Six1 基因分布密切相关（图 4A）。基于 Six1 基因在 IR 损伤后第 2 天表达最高，且与细胞周期蛋白表达正相关，进一步通过免疫组织化学染色对 IRI 2 d 中细胞增殖标记物 Ki67 进行检测，发现上皮细胞中 Ki67 表达显著上调（图 4B）。

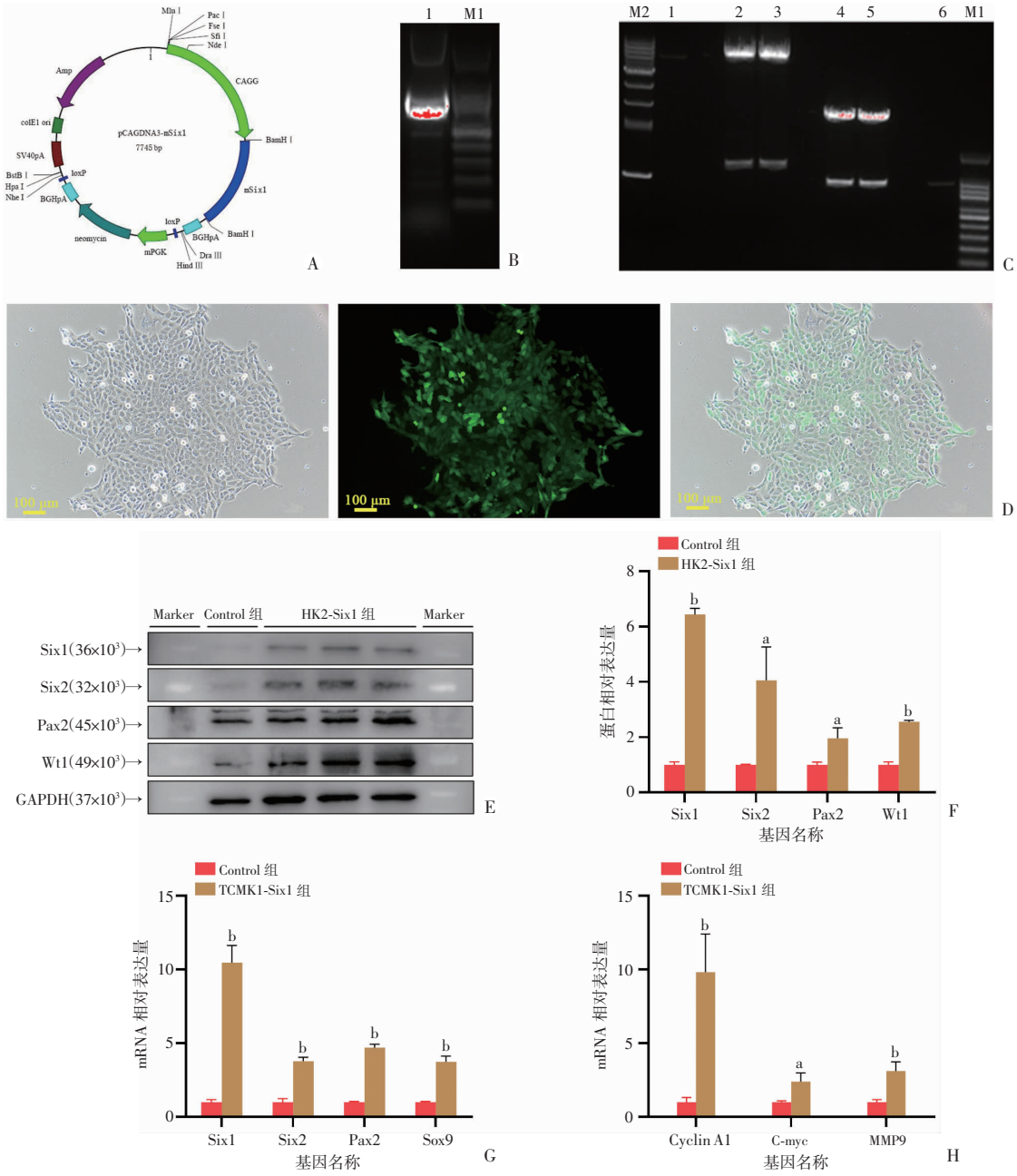


A：免疫荧光检测 IRI 2 d 组与 Sham 组肾脏 MMP9 及 Six1 表达及分布情况；B：免疫组织化学检测 Ki67 在 IRI 2 d 组与 Sham 组中表达与分布情况

图 4　肾脏损伤后细胞增殖/迁移分子表达定位与 Six1 分布情况

2.5　细胞模型中 Six1 过表达促进肾源性分子与细胞增殖/迁移分子表达

成功构建 Six1 过表达载体(图 5A),克隆并获得小鼠 Six1 基因表达序列(图 5B),经 DNA 测序比对正确后,将目的片段与表达载体骨架(图 5C)连接并获得完整的过表达载体。随后转染人肾小管上皮细胞(HK2),建立 Six1 过表达细胞模型(HK2-Six1)(图 5D);Western Blot 检测发现:与对照组(Control 组)相比,HK2-Six1 组中 Six1、Six2、Pax2、Wt1 蛋白表达增加(图 5E、F)。此外,在 Six1 过表达鼠上皮细胞(TCMK1-Six1 组)中,Six1、Six2、Pax2、Sox9、Cyclin A1、C-myc 及 MMP9 mRNA 水平也显著性高于 Control 组($P<0.05$)(图 5G、H)。



a:$P<0.05$, b: $P<0.01$, 与 Control 组比较; Control:对照细胞;HK2-Six1:Six1 过表达人上皮细胞;TCMK1-Six1:Six1 过表达鼠上皮细胞

A: Six1 过表达载体结构;B: 小鼠 Six1 基因 PCR 产物(Lane 1)　M1:100 bp 分子量标准;C: Six1 与表达载体酶切产物(Lane 4、5 和 Lane 2、3)及片段回收产物电泳(Lane 6 和 Lane 1)　M1:100 bp 分子量标准;M2: 1K bp 分子量标准;D: 药物筛选后 Six1 过表达细胞;E: HK2-Six1 中 Six1 、Six2、Pax2、Wt1 的蛋白表达水平;F: 定量分析 HK2-Six1 与 Control 中基因蛋白表达差异;G: TCMK1-Six1 中肾源性(Six1、Six2、Pax2 及 Sox9)分子的 mRNA 表达水平; H: 增殖/迁移(Cyclin A1、C-myc、MMP9)分子在 TCMK1-Six1 中的 mRNA 表达水平

图 5　过表达 Six1 细胞中肾源性分子及细胞增殖/迁移基因的表达($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.6 体内过表达的 Six1 上调肾源性、抗凋亡基因及抑制凋亡分子并减轻肾脏损伤

成功构建肾脏过表达 Six1 小鼠模型,实时定量 PCR 检测发现,与对照小鼠(AAV-Control 组)相比,Six1 过表达小鼠(AAV-Six1 组)肾脏中,Six1、Six2、Sox9、Pax2 及抗凋亡信号通路基因(Bcl2 和 Stat3)mRNA 表达水平显著性上调($P<0.05$)(图 6A、B),肾脏损伤分子 Kim1 下调。而 IR 诱导损伤第 2 天(IRI 2 d),AAV-Six1 组小鼠与 AAV-Control 组比较,SCr 和 BUN 水平显著下降($P<0.05$)(图 6C、D)。与 AAV-Control 组相比,AAV-Six1 组中 Bcl2 和 Stat3 mRNA 表达显著增加($P<0.05$);损伤凋亡分子(Kim1、Bax、Caspase3 和 Caspase9)表达下调(图 6E)。

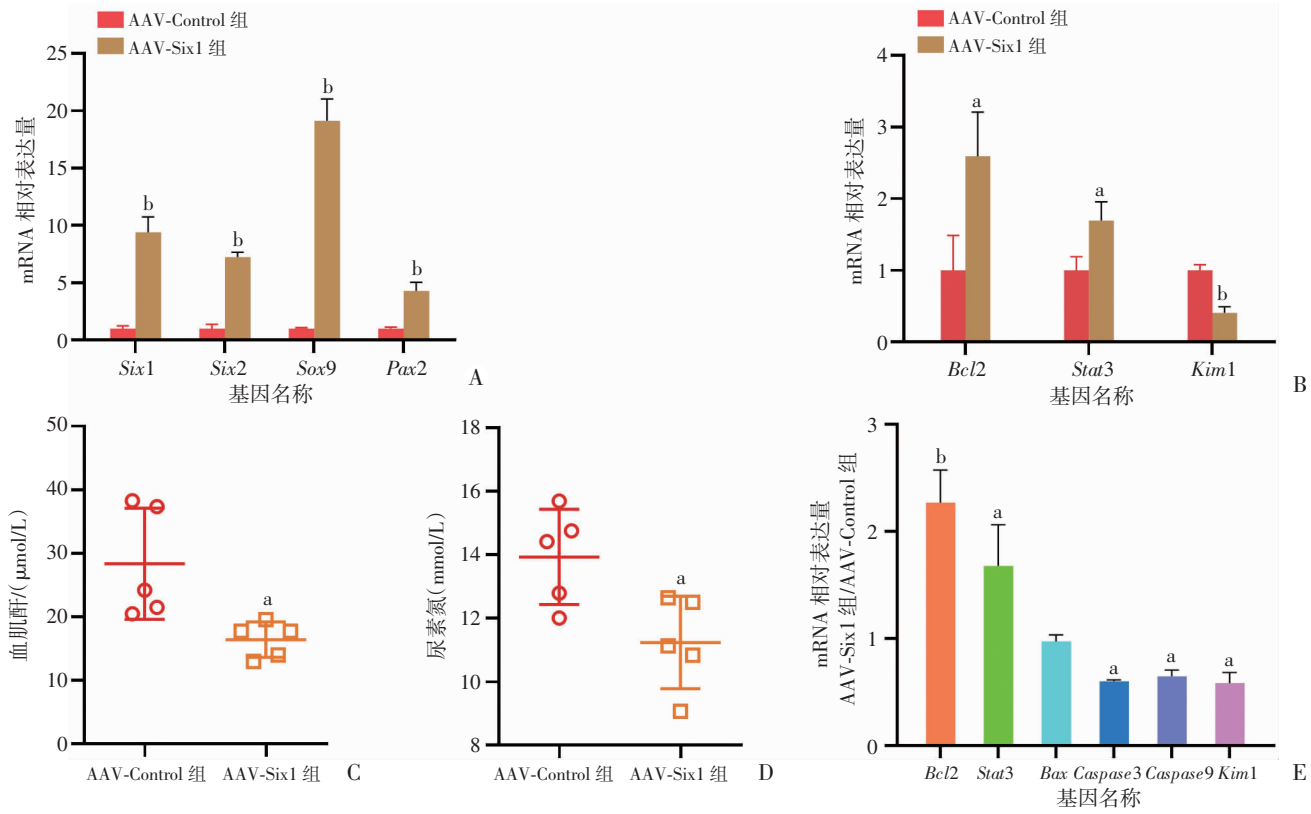
2.7 细胞损伤模型中 Six1 过表达促进细胞增殖而 Six1 敲除抑制细胞增殖

利用 CCK-8 法对氯化钴处理的不同细胞进行细胞增殖率检测,发现:与 TCMK1-Control 组比较,细胞增殖率在 TCMK1-Six1$^{-/-}$组中显著下降($P<0.05$),而 TCMK1-Six1 组中升高(图 7A);实时定量 PCR 检测表明,Six2、Sox9、Pax2、Bcl2、Cyclin A1、Cyclin D1 及 MMP9 表达,在 TCMK1-Six1$^{-/-}$组中减少而在 TCMK1-Six1 组中增加,Caspase3 与 Kim1 在 TCMK1-Six1$^{-/-}$组中上调而在 TCMK1-Six1 组中下调(图 7B~D)。

3 讨论

3.1 肾脏损伤修复中肾源性分子激活的研究现状

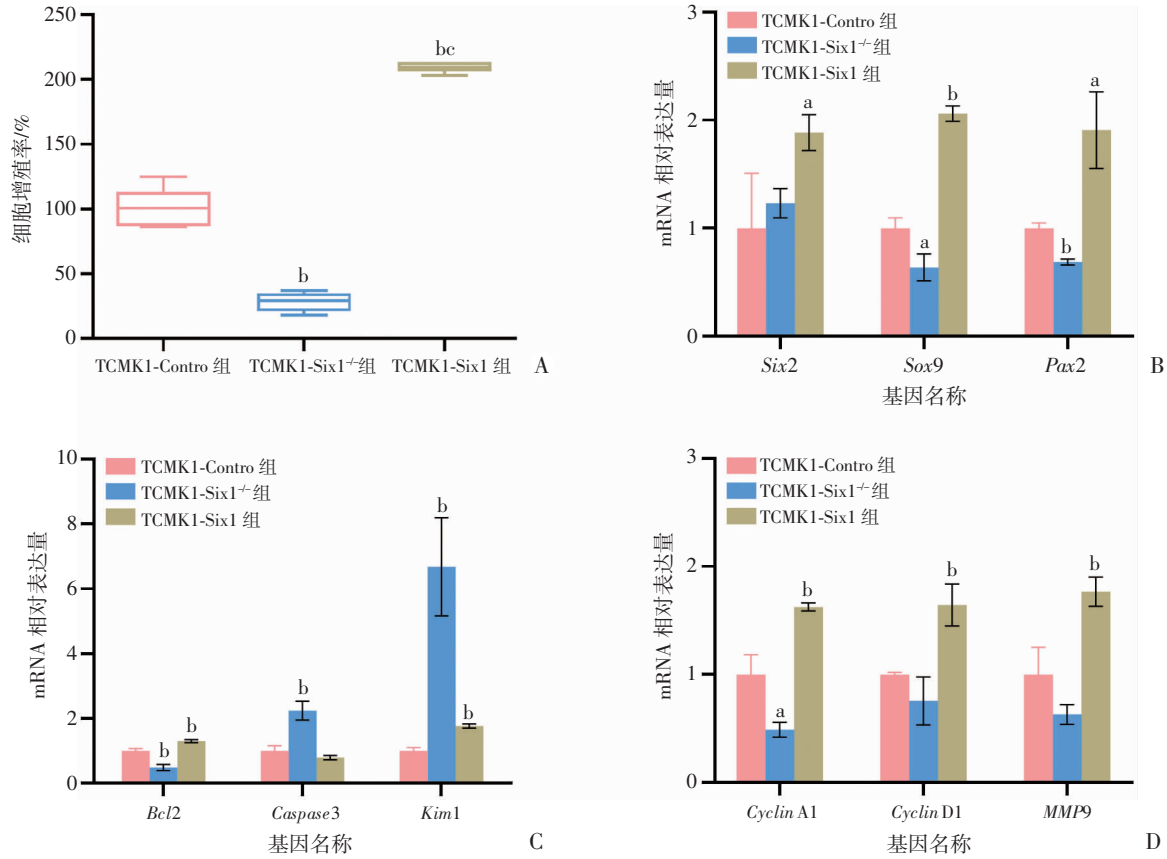
肾脏内源性修复,是 AKI 转归的决定性因素。当损伤发生后,持续的间质性炎症诱发毛细血管毁坏、肾小管丧失、肾小球硬化,导致内源性修复调控失调,最终出现肾小管萎缩和肾间质纤维化,即“适应不良性修复”[17]。而在多种细胞分子的精密调控下,正常启动的内源性修复通路可协调无菌炎症的消退及损伤的肾小管上皮细胞的再生,促进肾小管正常结构与功能的重建,完成“适应性修复”[18]。在这种“适应性修复”过程中,一些肾脏早期发育的基因(Sox9、Pax2 等)被证实重新激活,并参与了损伤的修复[19]。在本研究中发现,转录因子 Six1 在 IR 损伤后的上皮细胞中被激活,且其表达与肾损伤后激活的肾源性分子及细胞



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 AAV-Control 组比较;AAV-Control:对照组小鼠;AAV-Six1:Six1 过表达小鼠

A、B:AAV 感染后肾脏中肾源性(Six1、Six2、Pax2、Sox9),凋亡相关(Bcl2、Stat3、Kim1)基因的 mRNA 表达水平;C、D:IR 诱导损伤第 2 天,AAV-Six1 组与 AAV-Control 组血清肌酐及尿素氮水平;E:Bcl2、Stat3、Kim1、Bax、Caspase3、Caspase9 在 AAV-Six1 小鼠肾脏中的 mRNA 表达水平

图 6 体内 Six1 过表达对肾源性、凋亡相关等分子表达以及肾脏功能的影响($n=5$,$\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$, b: $P<0.01$, 与 TCMK1-Control 组比较; c: $P<0.05$, 与 TCMK1-Six1$^{-/-}$组比较;TCMK1-Control:对照组细胞;TCMK1-Six1$^{-/-}$:Six1 基因敲除细胞;TCMK1-Six1:Six1 过表达细胞

A: CCK-8 分析不同细胞损伤后增殖率;B: 不同细胞中肾源性分子 Six2、Sox9、Pax2 的 mRNA 表达水平;C: 凋亡相关分子 Bcl2、Caspase3、Kim1 的 mRNA 表达水平;D: 增殖/迁移分子 Cyclin A1、Cyclin D1、MMP9 的 mRNA 表达水平

图 7 在细胞损伤模型中 Six1 过表达与敲除对相关基因表达及细胞增殖的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

增殖/迁移密切相关。进一步的体外体内模型研究证实,Six1 可诱导肾源性分子、抗凋亡信号通路基因、细胞周期蛋白及细胞迁移分子的表达,同时抑制损伤凋亡分子的表达,进而促进细胞再生,减轻肾脏损伤。

在肾脏发育早期阶段,Six1 通过调控肾祖细胞的功能活性,来影响肾脏的发育[20]。而 AKI 中,发现 Six1 的激活与上皮细胞的增殖/迁移存在着紧密的时空关联性,提示激活的 Six1 的功能可能与其在胚肾发育过程中的功能存在着一定的相似性。此外,AKI 后,Six1 基因的表达在第 1 天时增加,第 2 天时达到高峰,而第 3 天时下降,这种激活表达模式与其在肾脏发育中的模式相似,同样与先前报道的肾源性分子 Pax2 损伤后瞬时激活表达模式一致[16, 21]。

3.2 肾源性分子 Six1 对细胞增殖/迁移与抗凋亡的调控

在大多数成体组织中,Six1 基因并不表达[22]。然而,在多种肿瘤细胞中,Six1 基因被激活,其表达显著上调,并且被证实其通过促进细胞增殖和迁移,参与肿瘤的生长。研究表明,Six1 通过靶向结合细胞周期蛋白 Cyclin A 启动子,上调其表达水平,进而促进乳腺细胞增殖[23]。而在胰腺癌中,激活的 Six1 可上调细胞周期蛋白 Cyclin D1 的 mRNA 和蛋白的表达,并显著增强 Cyclin D1 启动子的活性[24]。本研究证实,在肾损伤修复过程中 Six1 能够增加 Cyclin A1 与 Cyclin D1 等分子表达,并促进细胞的增殖。此外,Six1 可诱导抗凋亡通路分子表达及抑制凋亡分子表达。这与已报道的在增殖细胞中 Six1 可调控 Bcl2 等抗凋亡细胞信号通路研究一致[25]。上述研究结果均提示,高表达的 Six1 可能通过促增殖抗凋亡等多种信号通路在细胞再生中发挥关键作用。

3.3 Six1 调控肾源性分子表达影响细胞损伤再生

目前认为,肾脏在 AKI 后“重现”肾脏的胚胎发育,提示损伤后残存的小管上皮细胞通过“去分化”、增殖、再分化等过程完成损伤的修复[19]。本研究证实

Six1、Pax2 、Six2、Sox9 与 Vimentin[14, 26-28]在 AKI 后被激活,但这些肾源性分子是否通过促进上皮细胞 的“去分化”,来参与损伤的修复,尚未报道。而在肿瘤干细胞的研究中,Six1 可通过上调 Wnt 信号通路分子,激活上皮细胞向间质细胞转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT),促进上皮细胞“去分化”而呈现干细胞/祖细胞表型[29]。在类似的研究中,Six1 可以促进转移生长因子(transforming growth factor-β, TGF-β)信号通路,诱导人乳腺癌细胞在小鼠体内发生 EMT 转化及细胞增殖/迁移[30]。在肿瘤细胞中,这些肾源性分子恰恰与 EMT 密切相关,如 Pax2[31]、Sox9[32]、Vimentin[33]等。本研究发现,Six1 可促进这些肾源性分子的表达。同时过表达 Six1 可上调抗凋亡基因并抑制损伤凋亡基因表达,减轻 IR 诱导的肾脏损伤。这些结果提示:AKI 后激活的 Six1 基因,可能以其在肾脏发育中类似的基因调控网络上调肾源性分子表达,进而促进上皮细胞的 EMT 与“去分化”进程,并呈现祖细胞表型,通过促进细胞增殖/迁移及抗细胞凋亡,参与损伤与修复。

综上所述,本研究证实转录因子 Six1 通过上调肾源性分子的表达,“重现”肾脏发育的分子网络信号通路,进而促进细胞的增殖/迁移,为临床预防和治疗 AKI 提供了新的理论依据。此外,基于本研究中过表达 Six1 可显著促进损伤细胞再生的发现,提示过表达 Six1 可能具有促进临床患者肾功能修复的潜力,因此 Six1 有望成为 AKI 治疗的新靶点。

参考文献:

[1] LIBÓRIO A B, LEITE T T, NEVES F M, *et al*. AKI complications in critically ill patients: association with mortality rates and RRT[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2015, 10(1): 21-28. DOI: 10.2215/CJN.04750514.

[2] BENIGNI A, MORIGI M, REMUZZI G. Kidney regeneration [J]. Lancet, 2010, 375(9722): 1310-1317. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60237-1.

[3] EL SABBAHY M, VAIDYA V S. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair[J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2011, 3(5): 606-618. DOI: 10.1002/wsbm.133.

[4] KUMAR S, LIU J, PANG P, *et al*. Sox9 activation highlights a cellular pathway of renal repair in the acutely injured mammalian kidney[J]. Cell Rep, 2015, 12(8): 1325-1338. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.07.034.

[5] KANG H M, HUANG S Z, REIDY K, *et al*. Sox9-positive progenitor cells play a key role in renal tubule epithelial regeneration in mice[J]. Cell Rep, 2016, 14(4): 861-871. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.12.071.

[6] MAESHIMA A, MAESHIMA K, NOJIMA Y, *et al*. Involvement of *Pax*-2 in the action of activin A on tubular cell regeneration[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(12): 2850-2859. DOI: 10.1097/01.asn.0000035086.93977.e9.

[7] RUDMAN-MELNICK V, ADAM M, POTTER A, *et al*. Single-cell profiling of AKI in a murine model reveals novel transcriptional signatures, profibrotic phenotype, and epithelial-to-stromal crosstalk[J]. J Am Soc Nephrol, 2020, 31(12): 2793-2814. DOI: 10.1681/ASN.2020010052.

[8] JIN Y, ZHANG M L, LI M S, *et al*. SIX1 activation is involved in cell proliferation, migration, and anti-inflammation of acute ischemia/reperfusion injury in mice [J]. Front Mol Biosci, 2021, 8: 725319. DOI: 10.3389/fmolb.2021.725319.

[9] KUMAR S, LIU J, MCMAHON A P. Defining the acute kidney injury and repair transcriptome[J]. Semin Nephrol, 2014, 34(4): 404-417. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2014.06.007.

[10] XU P X, ZHENG W M, HUANG L, *et al*. Six1 is required for the early organogenesis of mammalian kidney [J]. Development, 2003, 130(14): 3085-3094. DOI: 10.1242/dev.00536.

[11] TERAKAWA J, SERNA V A, NAIR D M, *et al*. SIX1 cooperates with RUNX1 and SMAD4 in cell fate commitment of Müllerian duct epithelium[J]. Cell Death Differ, 2020, 27(12): 3307-3320. DOI: 10.1038/s41418-020-0579-z.

[12] ZHU Z L, RONG Z Y, LUO Z, *et al*. Circular RNA circNHSL1 promotes gastric cancer progression through the miR-1306-3p/SIX1/vimentin axis[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 126. DOI: 10.1186/s12943-019-1054-7.

[13] NIE X G, XU J S, EL-HASHASH A, *et al*. Six1 regulates Grem1 expression in the metanephric mesenchyme to initiate branching morphogenesis[J]. Dev Biol, 2011, 352(1): 141-151. DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.01.027.

[14] BRODBECK S, ENGLERT C. Genetic determination of nephrogenesis: the *Pax*/Eya/Six gene network[J]. Pediatr Nephrol, 2004, 19(3): 249-255. DOI: 10.1007/s00467-003-1374-z.

[15] KOBAYASHI A, VALERIUS M T, MUGFORD J W, *et al*. Six2 defines and regulates a multipotent self-renewing nephron progenitor population throughout mammalian kidney development[J]. Cell Stem Cell, 2008, 3(2): 169-181. DOI: 10.1016/j.stem.2008.05.020.

[16] O'BRIEN L L, GUO Q Y, LEE Y, *et al*. Differential regulation of mouse and human nephron progenitors by the Six family of transcriptional regulators[J]. Development, 2016, 143(4): 595-608. DOI: 10.1242/dev.127175.

[17] LOVISA S, LEBLEU V S, TAMPE B, *et al*. Epithelial-to-

mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis[J]. Nat Med, 2015, 21(9): 998-1009. DOI: 10.1038/nm.3902.

[18] SCHOLZ H, BOIVIN F J, SCHMIDT-OTT K M, *et al*. Kidney physiology and susceptibility to acute kidney injury: implications for renoprotection[J]. Nat Rev Nephrol, 2021, 17(5): 335-349. DOI: 10.1038/s41581-021-00394-7.

[19] KUMAR S. Cellular and molecular pathways of renal repair after acute kidney injury[J]. Kidney Int, 2018, 93(1): 27-40. DOI: 10.1016/j.kint.2017.07.030.

[20] KAWAKAMI K, SATO S, OZAKI H, *et al*. Six family genes: structure and function as transcription factors and their roles in development[J]. Bioessays, 2000, 22(7): 616-626. DOI: 10.1002/1521-1878(200007)22: 7616: AID-BIES4>3.0.CO;2-R.

[21] IMGRUND M, GRÖNE E, GRÖNE H J, *et al*. Re-expression of the developmental gene *Pax*-2 during experimental acute tubular necrosis in mice 1[J]. Kidney Int, 1999, 56(4): 1423-1431. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1999.00663.x.

[22] FORD H L, KABINGU E N, BUMP E A, *et al*. Abrogation of the G2 cell cycle checkpoint associated with overexpression of HSIX1: a possible mechanism of breast carcinogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(21): 12608-12613. DOI: 10.1073/pnas.95.21.12608.

[23] COLETTA R D, CHRISTENSEN K, REICHENBERGER K J, *et al*. The Six1 homeoprotein stimulates tumorigenesis by reactivation of cyclin A1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(17): 6478-6483. DOI: 10.1073/pnas.0401139101.

[24] LI Z M, TIAN T, LV F, *et al*. Six1 promotes proliferation of pancreatic cancer cells via upregulation of cyclin D1 expression[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59203. DOI: 10.1371/journal.pone.0059203.

[25] LIU D, ZHANG X X, WAN D Y, *et al*. Sine oculis homeobox homolog 1 promotes α5β1-mediated invasive migration and metastasis of cervical cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(2): 549-554. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.03.002.

[26] LITTLE M H, KAIRATH P. Does renal repair recapitulate kidney development?[J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(1): 34-46. DOI: 10.1681/ASN.2016070748.

[27] MOLL R, HAGE C, THOENES W. Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human kidney: modulations of intermediate filament patterns during development and in damaged tissue[J]. Lab Invest, 1991, 65(1): 74-86.

[28] HOLTHÖFER H, MIETTINEN A, LEHTO V P, *et al*. Expression of vimentin and cytokeratin types of intermediate filament proteins in developing and adult human kidneys[J]. Lab Invest, 1984, 50(5): 552-559.

[29] MCCOY E L, IWANAGA R, JEDLICKA P, *et al*. Six1 expands the mouse mammary epithelial stem/progenitor cell pool and induces mammary tumors that undergo epithelial-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest, 2009, 119(9): 2663-2677. DOI: 10.1172/JCI37691.

[30] MICALIZZI D S, CHRISTENSEN K L, JEDLICKA P, *et al*. The Six1 homeoprotein induces human mammary carcinoma cells to undergo epithelial-mesenchymal transition and metastasis in mice through increasing TGF-beta signaling[J]. J Clin Invest, 2009, 119(9): 2678-2690. DOI: 10.1172/JCI37815.

[31] LIU L, YU T T, REN C C, *et al*. CP-31398 inhibits the progression of cervical cancer through reversing the epithelial mesenchymal transition via the downregulation of PAX2s[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2929-2942. DOI: 10.1002/jcp.27109.

[32] PANDA M, TRIPATHI S K, BISWAL B K. SOX9: an emerging driving factor from cancer progression to drug resistance[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021, 1875(2): 188517. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188517.

[33] ZHANG N, HUA X H, TU H L, *et al*. Isorhapontigenin (ISO) inhibits EMT through FOXO3A/METTL14/VIMENTIN pathway in bladder cancer cells[J]. Cancer Lett, 2021, 520: 400-408. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.07.041.

(收稿:2024-04-17;修回:2024-08-05)

(编辑 刘秋池)