

绒毛蛋白 1 在单侧肾切除 Habu 肾炎小鼠模型中的作用

蒋红利, 马红叶, 薛瑾虹, 孙凌霄, 陈 蕾

(西安交通大学第一附属医院血液净化科, 西安 710061)

[摘要] 目的 探讨单侧肾切除(UNX)小鼠 Habu 肾炎模型与正常小鼠 Habu 肾炎模型在肾脏功能、肾脏病理表现及肾小球蛋白绒毛蛋白 1(VIL 1)表达等方面的异同及其分子机制。方法 将 24 只 6 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠(18~20 g)随机分为 2 组, 实验组($n=12$)接受 UNX 后通过尾静脉注射竹叶青蛇毒(HSV)构建 Habu 肾炎模型(HSV-UNX 组), 对照组($n=12$)接受假手术后行蛇毒尾静脉注射构建 Habu 肾炎模型(HSV 组); 通过血液生化检测 2 组小鼠肾功能水平, 并采用过碘酸-雪夫染色观察 2 组小鼠肾组织病理改变; 进一步通过蛋白质组学对二者肾小球蛋白表达量进行分析, 筛选出 2 组间的表达差异蛋白, 于体外小鼠系膜细胞中研究差异蛋白对细胞增殖及凋亡的作用及机制。结果 HSV-UNX 组小鼠的血肌酐和尿素氮水平较 HSV 组显著升高(均 $P<0.01$), 其肾组织系膜溶解水平高于 HSV 组($P<0.0001$), 系膜增殖水平低于 HSV 组($P<0.001$); 蛋白组学分析及 Western blotting 证实 VIL1 在 HSV-UNX 组小鼠的表达量低于 HSV 组; 在小鼠系膜细胞中, 敲低 VIL1 表达可通过上调 caspase 3、Bax、p21 及 p27 蛋白表达, 促进细胞凋亡($P<0.01$), 抑制细胞增殖($P<0.05$)。结论 VIL1 在单侧肾切除 Habu 肾炎小鼠模型中表达下调, VIL1 下调可通过抑制细胞增殖和促进细胞凋亡导致肾小球自我修复能力下降, 加重肾功能损害。**[关键词]** 单侧肾切除(UNX); Habu 肾炎; 绒毛蛋白 1(VIL1); 小鼠模型

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2020)01-0001-08

系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MesGN)是中国最常见的肾小球肾炎类型, 也是引发终末期肾病的主要病因。MesGN 以系膜细胞增殖伴系膜基质扩张为特征, 其发生机制被认为与细胞增殖、凋亡和免疫失衡

有关。竹叶青蛇毒(Habu snake venom, HSV)诱导的小鼠 Habu 肾小球肾炎是与人类 MesGN 肾小球病变相似的经典实验动物模型^[1-3]。研究^[4]显示, 单次注射 HSV 诱导的肾小球改变可在 1 个月后自愈, 然而, 单侧肾切除术(unilateral nephrectomy, UNX)后再行注射抗 HSV, 将导致更严重的肾损伤和不可逆的肾小球硬化。上述现象表明, UNX 可加剧 Habu 肾炎模型肾功能不全表现, 但其机制尚不清楚。

绒毛蛋白 1(villin-1, VIL1)是一种细胞骨架蛋白, 广泛存在于哺乳动物中, 具有调节微绒毛肌动蛋白丝重组的作用, 参与肌动蛋白成核、肌动蛋白丝束组装、肌动蛋白丝封盖和切断等过程^[5], 故而在调节细胞形态、细胞侵袭、细胞迁移和细胞凋亡中发挥重要作用。在肾脏疾病中, VIL1 与

[收稿日期] 2019-04-10

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81570670); 陕西省重点研发计划项目(2017ZDXM-SF-057)

[作者简介] 蒋红利(1967-), 女, 博士, 主任医师, 从事专业: 肾脏病学与血液净化。E-mail: j92106@sina.com
马红叶(1990-), 女, 硕士研究生, 住院医师, 从事专业: 重症医学与血液净化。

E-mail: rainbow_ma@qq.com

[通信作者] 陈蕾(1987-), 女, 博士, 助理研究员。从事专业: 肾脏病学与血液净化。

E-mail: chl1221@hotmail.com

急性肾损伤密切相关,可作为急性肾小管损伤的新型生物标志物,但其在肾小球肾炎系膜细胞受损过程中的作用及机制尚不清楚。

本研究分别于正常 C57BL/6 小鼠和 UNX 的 C57BL/6 小鼠中建立了 HSV 诱导的 Habu 肾炎模型,比较二者在肾功能、细胞增殖及凋亡水平的异同,并采用蛋白质组学方法筛选出在二者中差异表达的 VIL1 蛋白,探索 VIL1 在 UNX 后肾小球肾炎中的作用和相关机制,为进一步阐明此类疾病的发病机制提供新的视角。

1 材料与方法

1.1 动物和细胞

SPF 级 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 24 只,体质量 18~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0011]),并饲养于西安交通大学医学院实验动物中心[SYXK(陕)2015-002],温度 24℃,湿度 40%~70%,12 h 光照 12 h 黑暗交替,自由摄取食物和水。动物福利和实验程序严格按照《实验室动物护理和使用指南》(美国国家研究委员会,1996 年)执行。

小鼠系膜细胞(MMCs)系 SV40 MES 13 细胞(ATCC®CRL-1927™)购自美国 ATCC 公司。

1.2 主要试剂

HSV 购自日本 Wako Pure Chemical Industries 公司,5% 胎牛血清(货号: 26140)、ClickiT®EdU Alexa Fluor®555 成像试剂盒(货号: C10638)、Hoechst 33342 试剂(货号: 3570)和 Thermo BCA 试剂盒(货号: 23235)购自美国 Invitrogen 公司,RPMI 1640 培养基(货号: 10-040-CVR-500 mL)购自美国康宁公司,VIL1 抗体(货号: 16488-1-AP)购自美国 Proteintech 公司,caspase 3 抗体(货号: ab90437)及 p21 抗体(货号: ab86696)购自英国 Abcam 公司,Bax 抗体(货号: 2772S)及 p27 抗体(货号: 2552S)购自美国 Cell Signaling Technology 公司, β -actin 抗体(货号: SAB1305546)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体(货号: A0208)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠抗体(货号: A0216)购自武汉碧云天生物技术公司;siRNA 序列由上海吉玛公司设计合成。

1.3 主要仪器

液相串联质谱分析仪(XEVO QTOF)购自英国 Waters 公司;正置光学显微镜(BX43)购自日本奥林巴斯公司,荧光倒置显微镜(TI-E)购自日本尼康公司;UVP 凝胶成像系统(EC3-410)购于美国 UVP 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 HSV 肾炎模型的建立 将 24 只小鼠随机分为 2 组。实验组($n=12$)接受 UNX: 质量分数 1% 戊巴比妥钠溶液(80 mg/kg)腹腔注射麻醉,麻醉满意后常规备皮、消毒、铺无菌巾,小鼠左侧卧位,行背部右侧切口,位置为脊柱右旁开 0.5 cm,肋弓下缘起始,长约 1 cm 竖行切口,暴露右肾,钝性分离肾蒂,1 号线结扎肾蒂,从结扎处远端离断肾血管及输尿管,摘除右肾,逐层缝合肌层、皮肤。对照组($n=12$)仅接受假手术(即背部右侧纵行切口切开缝合术,不行右肾摘除)。一周后,上述 2 组小鼠通过尾静脉注射 HSV (2.5 mg/kg)诱导 Habu 模型(分别标记为 HSV 组及 HSV-UNX 组)。2 组小鼠均于 HSV 注射后 7 d 以 1% 戊巴比妥钠溶液(80 mg/kg)腹腔注射麻醉,采用心脏取血法采集血液标本用于生化检测;行腹正中切口,取小鼠肾皮质组织,其中一半固定于体积分数 10% 甲醛溶液中,用于病理学和免疫组织化学检测;另一半肾皮质组织采用筛网技术分离肾小球并置于液氮保存,用于后续蛋白组学和 Western blotting 检测;取材结束后,以颈椎脱臼法对小鼠实施安乐死。

1.4.2 过碘酸-雪夫染色(PAS 染色) 观察小鼠肾组织病理改变 将固定于体积分数 10% 甲醛溶液的肾脏组织常规脱水、石蜡包埋、制片。切片常规脱蜡后,放入 1% 过碘酸浸泡 15 min, Schiff 液浸泡 20 min, 苏木素浸泡 3 min 染细胞核; 1% 盐酸乙醇分化数秒,水洗后氨水返蓝,流水充分冲洗; 85%、95%、100% 乙醇梯度脱水、二甲苯透明,树脂封固;于光学显微镜($\times 400$)下观察肾组织病理改变。

1.4.3 肾组织蛋白组学检测 从 HSV 组及 HSV-UNX 组分别取 6 只小鼠的肾组织用于蛋白组学检测。首先,对肾小球蛋白行二维凝胶电泳分析:用裂解缓冲液分离肾小球蛋白,采用 50 mmol/L NaOH 将蛋白 pH 值调整为 8.5,用裂解液将质量

浓度调整为 5 mg/mL。将 2 组样品中等量的蛋白质汇集在一起作为内参。每个样品取 50 μ g 蛋白质置于冰上, 采用 400 pmol Cy3、Cy5 分别标记 HSV 组及 HSV-UNX 组蛋白, 用 400 pmol Cy2 标记内参, 共 30 min, 后加入 1 μ L 赖氨酸(10 mmol/L)淬灭。将 50 μ g 已标记 Cy3 及 Cy5 的蛋白混合后, 再与 50 μ g 标记 Cy2 的蛋白混合, 再加入 2 倍体积的缓冲液, 将加入缓冲液后的样本置于 23 cm、pH3, 11 (NL) IPG 上, 采用 IPGphor IEF 系统进行等电聚焦。等电聚焦设置为: 30 V 共 12 h, Grd 200 V 共 6 h, Grd 500 V 共 3 h, Grd 10000 V 共 1 h, 64 000 V 共 1 h。将 IPG 条带置于 12% 均质聚丙烯酰胺凝胶的顶部, 将 0.9% 琼脂糖包覆于含溴酚蓝流动缓冲液中, 置于 15 $^{\circ}$ C 的 Ettan DALT 6 电泳系统中电泳过夜。电泳结束后, 用 Typhoon 9400 成像仪扫描二维凝胶。根据说明书, 使用 DeCyder 6.0 软件(GE Healthcare)对二维凝胶上的蛋白斑点进行分析, 确定 2 组间存在显著变化的斑点。其次, 对 2 组间存在显著变化的斑点进行蛋白鉴定: 对具有显著变化蛋白斑点切胶回收并脱色后, 置于 10 mmol/L 二硫苏糖醇中 56 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 在 55 mmol/L IAM 中室温避光 45 min。采用离心冻干法冻干凝胶, 并用 0.05 mg/mL 胰蛋白酶过夜消化, 以 2% 三氟乙酸停止反应。采用二维液相串联质谱分析仪对多肽进行分析。在第一维度使用溶剂 A(200 mmol 甲酸铵, pH 值 10.0)和溶剂 B (CH₃CN), 采用 Masslynx 4.1 自动设置的 3 个溶剂塞, 依次洗脱馏分。在第二个维度, 使用 nanoACQUITY 系统进行肽筛选。程序和数据步骤与先前研究^[6]相似。对于得到的数据使用自归一化函数进行归一化, 使用 NCBI 数据库(2012 年 3 月发布)作为参考数据库, 仅保留高置信度蛋白(OK=2)作进一步分析。采用 PLGS 2.4 进行统计分析, 差异表达蛋白(differentially expressed proteins, DEPs)定义为: $P < 0.05$ 且 Fold Change > 1.5 。

1.2.4 MMCs 培养及 siRNA 转染

MMCs 置于含 5% 胎牛血清(购自美国 Invitrogen 公司)的 RPMI 1640 培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 恒温细胞孵育箱中培养。稳定培养 MMCs, 待细胞汇合度超过 70% 时, 使用 0.25% 胰酶消化, 常温 1 300 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入新鲜培养基重悬细胞,

细胞计数; 以每孔 4×10^5 细胞数接种入 6 孔板中; 将 6 μ L siRNA(si-VIL1 或 NC)加入 250 μ L Oppti-medium(每孔), 充分混匀后室温静置 5 min, 再加入 6 μ L RNAi Max (每孔), 振荡混匀, 室温静置 15 min 后将含 siRNA 的转染混合液垂直缓慢滴入六孔板中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后, 更换新鲜培养液, 再培养 48 h 收集细胞, 待后续检测。

1.2.5 Hoechst 染色检测细胞凋亡

将洁净盖玻片置于体积分数 70% 乙醇溶液中浸泡 10 min, 取出后放于无菌超净台内吹干, 用细胞培养液洗涤 3 次后, 将盖玻片置于 6 孔板内, 接种 MMCs 后培养并按照 1.2.4 中的步骤转染 siRNA。转染 48 h 后, 吸尽培养液, 加入 0.5 mL 固定液固定 10 min。吸取固定液后每孔加入 2 mL PBS, 置于摇床上漂洗 3 min, 共漂洗 2 次。吸尽 PBS 后, 加入 10 μ g/mL Hoechst 33342 试剂, 于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min。孵育结束后, 用 PBS 洗 2 次, 每次 3 min。加一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上贴有细胞的盖玻片。在 200 倍荧光显微镜下, 每孔随机选取 5 个视野, 观察细胞核浓缩细胞。通过计算细胞核浓缩细胞占细胞总数的百分比, 明确细胞凋亡的程度。

1.2.6 5'-乙炔基-2' 脱氧尿嘧啶核苷(EdU)染色检测细胞增殖

使用 ClickiT[®]EdU Alexa Fluor[®]555 成像试剂盒对转染 48 h 的 MMCs 进行 EdU 检测, 所有步骤严格遵循说明书进行。染色后, EdU 阳性细胞的细胞核为红色, 在 200 倍荧光显微镜下, 每孔随机选取 5 个视野, 观察并计数 EdU 阳性细胞及总细胞数。通过计算 EdU 阳性细胞占细胞总数的百分比, 明确细胞增殖程度。

1.2.7 Western blotting 检测蛋白表达量

向收集的肾组织/细胞加入裂解液, 提取总蛋白, 根据 Thermo BCA 试剂操作手册测定蛋白浓度; 根据测定结果加入相应体积的 2 \times SDS Sample Buffer 与蛋白质样品混匀, 水浴锅 95 $^{\circ}$ C 孵育 10 min 变性; 利用聚丙烯酰胺凝胶行蛋白电泳, 半干法转膜; 以 1 : 500 的比例稀释 VIL1 抗体, 1 : 1 000 稀释 caspase 3、p21、Bax、p27 和 β -actin 抗体; 将相应硝酸纤维素膜条带置于稀释好的抗体中 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育; 采用 TBST 室温漂洗膜条带 8 min(共 3 次)后, 将其放入相应种属来源的二抗(1 : 1 000)

中, 室温孵育 1 h; 孵育后再次使用 TBST 室温漂洗 8 min \times 3 次; 混合足量等体积显色试剂(A 和 B), 将膜放于玻璃皿中, 向其均匀滴加显色剂, 利用 UVP 成像系统显色成像。

1.2.8 统计学分析 应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 先进行方差齐性检验, 方差齐者 2 组间数据比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用 GraphPad Prism 6.0 软件生成图表。

2 结果

2.1 小鼠肾功能水平比较

HSV-UNX 小鼠组血清肌酐水平($16.18 \pm 0.87 \mu\text{mol/L}$)显著高于 HSV 组($52.92 \pm 10.74 \mu\text{mol/L}$) ($P=0.0067$); HSV-UNX 组小鼠血清尿素氮水平($16.07 \pm 0.80 \text{mmol/L}$)也显著高于 HSV 组($26.40 \pm 2.32 \text{mmol/L}$) ($P=0.0018$)。

2.2 小鼠肾脏病理表现比较

在 HSV 组小鼠肾脏中, 可见弥漫性系膜增殖和细胞外基质积累, 无明显系膜溶解现象; 在 HSV-UNX 组模型中, 均可观察到明显的系膜溶解现象, 且其增殖表现主要为局部细胞增殖(图 1)。进一步的半定量分析显示, HSV-UNX 组系膜溶解指数(0.100 ± 0.013)与 HSV 组(0.455 ± 0.025)比较差异显著($P < 0.01$), 系膜增殖指数(1.550 ± 0.054)与 HSV 组(0.822 ± 0.041)比较差异也显著($P < 0.01$)。上述结果提示, 持续的系膜溶解和系

膜增殖修复能力减弱可能影响 HSV-UNX 组小鼠肾小球结构修复, 引起肾功能恶化。

2.3 小鼠肾小球中 VIL1 表达存在差异

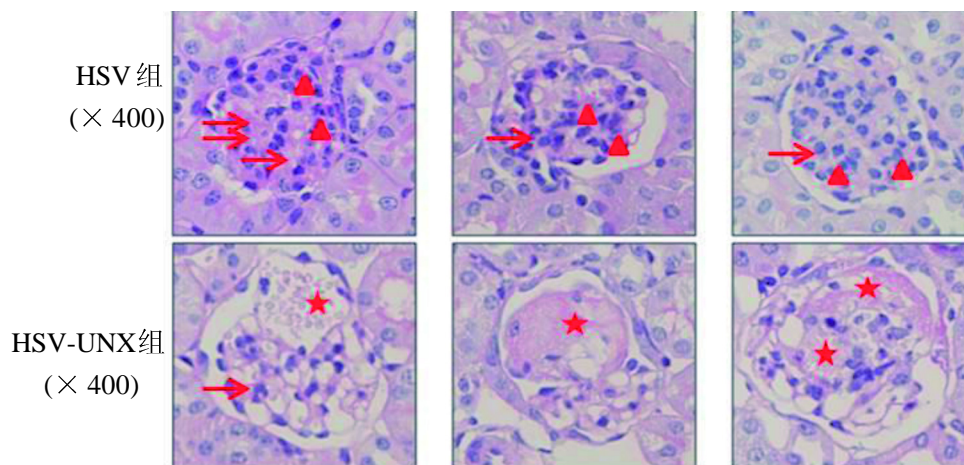
与 HSV 组相比, HSV-UNX 组共有 413 个蛋白表达下调, 92 个蛋白表达上调(部分差异蛋白相对表达量见表 1), 表达下调蛋白较多。在表达下调蛋白中, VIL1 为细胞内重要的骨架蛋白, 可能参与调节细胞增殖、凋亡过程, 故进一步使用 Western blotting 验证其肾小球蛋白表达量, 结果表明, 在 HSV-UNX 模型中, VIL1 表达较 HSV 组显著下调(图 2)。

2.4 MMCs 中敲低 VIL1 对细胞增殖及凋亡水平的影响

结果显示, 转染 48 h 后, 与 NC 组(对照组)相比, siVIL1 组细胞总数显著减少(图 3A)。Hoechst 染色结果提示, 与 NC 组相比, siVIL1 组细胞凋亡水平明显增高(图 3B); EdU 试验表明, siVIL1 组细胞增殖水平显著低于 NC 组(图 3C)。上述结果表明, 敲低 MMCs 中 VIL1 的表达, 可在促进细胞凋亡的同时降低细胞增殖能力。

2.5 MMCs 中敲低 VIL1 对 caspase 3、Bax、p21 及 p27 表达的作用

VIL1 低表达可引起 caspase 3、Bax、p21 及 p27 蛋白表达水平显著上调(图 4)。由于 caspase 3、Bax 为经典的促凋亡因子, p21 及 p27 为细胞抑制因子, VIL1 可能通过对上述蛋白的调控影响细胞增殖及凋亡能力, 更详细的机制仍需进一步研究。



→所示为细胞外基质积聚, ▲所示为系膜细胞增殖, ★所示为系膜溶解

图 1 HSV 组与 HSV-UNX 组小鼠肾组织 PAS 染色结果(400 \times)

Figure 1 Periodin-schiff staining of kidney in HSV group and HSV-UNX group

表 1 蛋白组学鉴定出的部分差异表达蛋白

序号	蛋白 ID	蛋白名称	差异倍数 (HSV-UNX/HSV)
1	NP_001153510	NDUFS1	4.76
2	NP_031887	DLD	4.26
3	NP_663533	HADHB	4.26
4	NP_079683	UQCRC1	2.83
5	NP_034249	EHD1	2.66
6	NP_034339	FH1	2.34
7	NP_001029101	THNSL2	2.25
8	NP_061359	YWHAG	2.25
9	NP_065603	EHD3	2.18
10	NP_032321	HSD3B5	1.95
11	NP_659170	ATP1A3	0.48
12	NP_033535	VIL1	0.48
13	NP_038593	ITGA3	0.47
14	NP_001028399	SLC5A10	0.47
15	NP_031848	CYP4A14	0.45
16	NP_034708	ITGB1	0.45
17	NP_001240822	DNM2	0.43
18	NP_848473	SLC25A31	0.38
19	NP_031476	SLC25A4	0.37
20	NP_001153510	NDUFS1	0.25

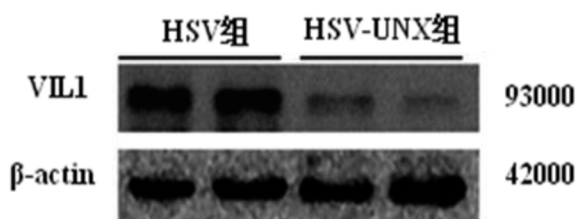


图 2 HSV 组与 HSV-UNX 组肾小球组织 VIL1 蛋白表达水平检测

Figure 2 The expression level of VIL1 in glomeruli of HSV group and HSV-UNX group detected by Western blotting

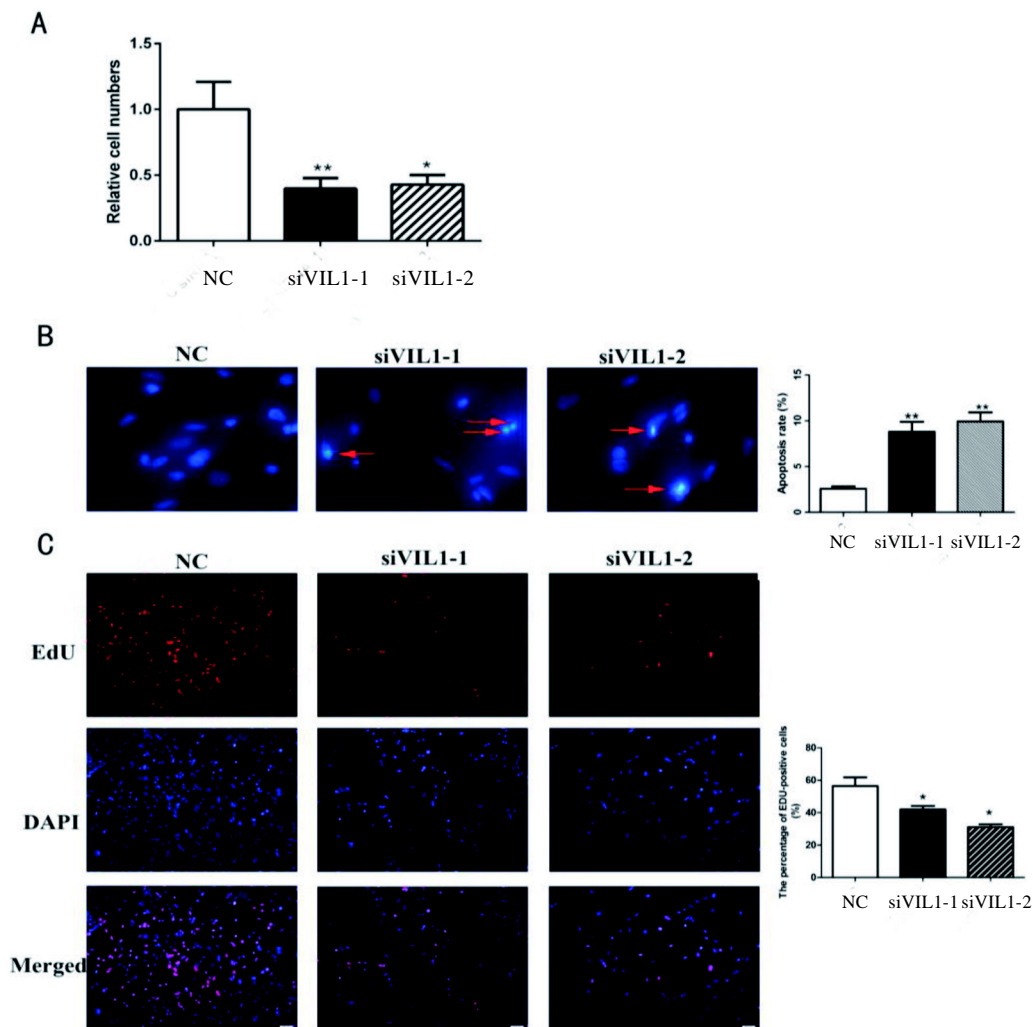
3 讨论

本研究通过建立 HSV 肾炎和 HSV-UNX 肾炎模型,探讨二者在疾病进展过程中的差异,并借助蛋白质组学方法寻找可能导致其病程差异的重要分子及其作用机制。本研究结果显示,与 HSV 模型相比,HSV-UNX 模型肾损伤更严重,血清肌酐和血尿素氮水平更高;同时发现,在 HSV-UNX 模型中,系膜溶解程度较 HSV 模型重,而系膜

细胞增殖水平较后者轻。上述病理差异可能在 HSV-UNX 模型中起到加剧肾功能损伤的作用。

众所周知,在系膜增生性肾炎中,细胞增殖和凋亡的失衡是导致其病理进展的重要原因^[1,7,8]。本研究在 HSV 模型中发现系膜增殖引起肾小球结构重构,促进了系膜溶解损伤修复。但在 HSV-UNX 模型中,系膜细胞增殖能力低于 HSV 模型,但凋亡水平升高,抑制了系膜溶解的修复,导致局部损伤加重。上述结果表明,在 HSV-UNX 模型中,系膜溶解修复异常是加重其肾功能损害的重要原因。在临床中,由于各种生理和病理性原因(如先天性“孤独肾”、肾移植供体、肾肿瘤单侧肾切除术、单侧尿路梗阻伴肾功能不全等),许多患者一侧肾脏缺如或失去功能,仅保留单侧健康肾脏。在正常情况下,孤独肾个体(包括人和动物)的存余侧肾脏几乎无病理性改变^[9,10];然而,暴露于有害刺激后,此类个体罹患肾小球疾病的风险和患病严重程度显著增加^[11,12]。本研究中,UNX 加重 Habu 肾炎肾功损伤的现象和病理机制为孤独肾患者更易罹患肾小球肾炎的学说增添了新的证据,为其发生发展的机制提供了新的视角。

为进一步明确 HSV-UNX 模型中系膜溶解修复异常的分子机制,本研究利用蛋白组学方法分析了 2 个不同模型在蛋白表达方面的差异,筛选出具有显著表达差异的蛋白。通过信号通路富集分析,本研究证实 2 组间差异蛋白主要与细胞增殖和凋亡机制密切相关。如前所述,在肾小球肾炎中,细胞增殖与凋亡是影响系膜增殖与溶解的关键调节因素,结合 2 组模型的病理表现差异,本研究进一步表明,细胞增殖与凋亡异常是 HSV-UNX 模型损伤后修复不良及肾功恶化的主要分子机制。此外,本研究还发现,与 HSV 组相比,VIL1 蛋白表达量在 HSV-UNX 组明显降低。VIL1 是一种细胞骨架蛋白,既往研究表明,VIL1 以钙依赖的方式与肌动蛋白结合^[13],在调节肌动蛋白动力学、维持细胞形态、抗细胞凋亡、细胞增殖和细胞迁移调节和上皮-间质转化等方面具有重要作用,并可通过上述作用参与肝癌、宫颈癌、结肠癌等疾病的发生发展^[14-17]。Decuypere 等^[18]研究显示,VIL1 与肾小管细胞死亡密切相关,是急性肾损伤的新型预测因子,但尚未有 VIL1 在肾小



A: 相对细胞数(relative cell numbers); B: Hoechst 染色检测细胞凋亡(apoptosis)水平(400 ×); C: EdU 染色检测细胞增殖(proliferation)水平(200 ×); 与 NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 3 VIL1 敲低对 MMCs 增殖凋亡水平的作用

Figure 3 The effect of VIL1 knockdown on the proliferation and apoptosis levels in MMCs

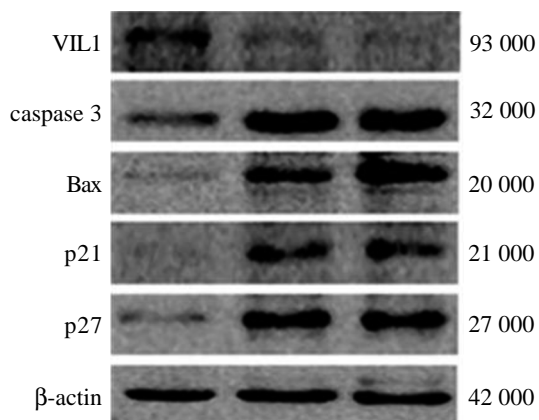


图 4 VIL1 敲低对小鼠 MMCs 中 caspase 3、Bax、p21 及 p27 蛋白表达的作用

Figure 4 The effects of VIL1 knockdown on expressions of caspase 3, Bax, p21 and p27 in MMCs

球疾患中作用及机制的研究。本研究则证实, 在系膜细胞中, 敲除 VIL1 可增加 p21、p27、Bax 和 caspase 3 的表达, 抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡。众所周知, p21 和 p27 是细胞周期的负调控因子^[19], 二者可与周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)家族中 CDK2/4/6 结合并发挥抑制作用, 从而使细胞周期阻滞于 G1 期, 抑制细胞增殖。此外, Bax 和 p21 可通过激活 caspase 3 诱导线粒体相关细胞凋亡^[20]。既往研究显示, VIL1 在其 headpiece 域中有一个 F-actin 结合位点, 可以结合并切断 F-actin^[13], 而 VIL1 的下调可能通过与 F-actin 相互作用来调控 p21、p27、Bax 和 caspase 3 等蛋白表达^[21-22], 进而影响 p53、ERK

和 AKT 信号通路^[23-25]。这些信号通路的异常最终可引发系膜细胞增殖和凋亡失衡。因此, VIL1 的下调可能通过抑制系膜细胞增殖及促进细胞凋亡, 导致系膜溶解修复障碍, 最终在 UNX 术后 Habu 肾炎模型的肾功能损伤加剧中发挥重要作用。

综上所述, 与 HSV 模型相比, HSV-UNX 模型中加剧的系膜溶解和局灶性系膜增生加重了肾功能损害, 其中, VIL1 在 HSV-UNX 模型表达下调可能通过抑制细胞增殖和促进细胞凋亡导致肾小球自我修复能力下降, 加重肾功能损害。本研究为孤独肾状态下肾小球肾炎进展加剧的学说增添了新的证据, 并提出了可能的分子机制, 上述结果对于改善肾小球肾炎进展率、防治特殊人群肾小球肾炎具有潜在应用价值。

参考文献:

- [1] Gao J, Wu L, Wang Y, et al. Knockdown of Cxcl10 inhibits mesangial cell proliferation in murine Habu nephritis via ERK signaling[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(5):2118-2129.
- [2] Jefferson JA, Johnson RJ. Experimental mesangial proliferative glomerulonephritis (the anti-Thy-1.1 model)[J]. *J Nephrol*, 1999, 12(5):297-307.
- [3] Emancipator SN. Prospects and perspectives on IgA nephropathy from animal models[J]. *Contrib Nephrol*, 2011, 169:126-152.
- [4] Haas CS, Campean V, Kuhlmann A, et al. Analysis of glomerular VEGF mRNA and protein expression in murine mesangioproliferative glomerulonephritis[J]. *Virchows Arch*, 2007, 450(1):81-92.
- [5] Nag S, Larsson M, Robinson RC, et al. Gelsolin: The tail of a molecular gymnast[J]. *Cytoskeleton*, 2013, 70(7):360-384.
- [6] Lu Y, Cai G, Cui S, et al. FHL2-driven molecular network mediated Septin2 knockdown inducing apoptosis in mesangial cell[J]. *Proteomics*, 2014, 14(21-22):2485-2597.
- [7] Abe-Yoshio Y, Abe K, Miyazaki M, et al. Involvement of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in glomerular capillary repair in Habu snake venom-induced glomerulonephritis[J]. *Virchows Arch*, 2008, 453(1):97-106.
- [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):477-491.
- [9] Blantz RC, Steiner RW. Benign hyperfiltration after living kidney donation [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(3):972-744.
- [10] Wormser C, Aronson LR. Perioperative morbidity and long-term outcome of unilateral nephrectomy in feline kidney donors: 141 cases (1998-2013) [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 2016, 248(3):275-281.
- [11] Rayner HC, Ward L, Walls J, et al. Cholesterol feeding following unilateral nephrectomy in the rat leads to glomerular hypertrophy[J]. *Nephron*, 1991, 57:453-459.
- [12] Uil M, Scantlebery AML, Butter LM, et al. Combining streptozotocin and unilateral nephrectomy is an effective method for inducing experimental diabetic nephropathy in the 'resistant' C57Bl/6J mouse strain[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):5542.
- [13] Bretscher A, Weber K. Villin is a major protein of the microvillus cytoskeleton which binds both G and F actin in a calcium-dependent manner[J]. *Cell*, 1980, 20(3):839-847.
- [14] Roy S, Esmailniakooshkghazi A, Patnaik S, et al. Villin-1 and gelsolin regulate changes in actin dynamics that affect cell survival signaling pathways and intestinal inflammation [J]. *Gastroenterology*, 2017, 154(5):1405-1420.
- [15] Xieraili M, Yasen M, Mogushi K, et al. Villin 1 is a predictive factor for the recurrence of high serum alpha-fetoprotein-associated hepatocellular carcinoma after hepatectomy[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(8):1493-1501.
- [16] Wang Y, Srinivasan K, Siddiqui MR, et al. A novel role for Villin in intestinal epithelial cell survival and homeostasis [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(14):9454-9464.
- [17] Nakamura E, Satoh T, Iwakawa M, et al. Villin1, a diagnostic marker for endometrial adenocarcinoma with high grade nuclear atypia.[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 12(3):181-190.
- [18] Decuyper JP, Ceulemans LJ, Wylin T, et al. Plasmatic villin 1 is a novel *in vivo* marker of proximal tubular cell injury during renal ischemia-reperfusion[J]. *Transplantation*, 2017, 101(11):1-25.
- [19] Jing X, Huang WH, Tang YJ, et al. Eucommia ulmoides Oliv. (Du-Zhong) lignans inhibit angiotensin II-stimulated proliferation by affecting p21, p27, and Bax expression in rat mesangial cells[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015(3):1-8.
- [20] Ding Y, Wang Y, Chen J, et al. p21 overexpression sensitizes osteosarcoma U2OS cells to cisplatin via evoking caspase-3 and Bax/Bcl-2 cascade[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(4):3119-3123.
- [21] Wang Y, George SP, Srinivasan K, et al. Reorganization of cytoskeleton as basis for apoptosis[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(4)(suppl 1):A-70.
- [22] Meng J, Vardar D, Wang Y, et al. High-resolution crystal

- structures of villin headpiece and mutants with reduced F-actin binding activity[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(36): 11963-11973.
- [23] Heijden MVD, Versteilen AMG, Sipkema P, et al. Rho-kinase-dependent F-actin rearrangement is involved in the inhibition of PI3-kinase/Akt during ischemia-reperfusion-induced endothelial cell apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2008, 13(3):404-412.
- [24] Lockett S, Verma C, Brafman A, et al. Quantitative analysis of F-actin redistribution in astrocytoma cells treated with candidate pharmaceuticals[J]. *Cytometry A*, 2014, 85(6): 512-521.
- [25] Ye JY, Liang EY, Cheng YS, et al. Serotonin enhances megakaryopoiesis and proplatelet formation via p-Erk1/2 and F-actin reorganization.[J]. *Stem Cells*, 2015, 32(11): 2973-2982.

The Role of Villin-1 in Model of Habu Nephritis Mice with Unilateral Nephrectomy

JIANG Hongli, MA Hongye, XUE Jinhong, SUN Lingshuang, CHEN Lei
(Dialysis Department of Nephrology Hospital, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

[Abstract] Objective To investigate the differences of renal function, renal pathological manifestations and proteins expression between the Habu nephritis mice model with or without unilateral nephrectomy (UNX), as well as the molecular mechanism leading to these differences. **Methods** Twenty-four male SPF C57BL/6 mice (18-20 g) at the age of 6 weeks were randomly divided into two groups. One group ($n=12$) received UNX and then received tail vein injection of Habu snake venom (HSV-UNX group) after 1 week, and the other group ($n=12$) received sham surgery and then received tail vein injection of Habu snake venom (HSV group). The renal function of mice in the two groups was detected by blood biochemistry, and the renal histopathological changes of two groups were measured through periodinate-schiff staining. Furthermore, the expression levels of protein in glomeruli of the two groups were analyzed by comparative proteomics, and the differentially expressed proteins between the two groups were screened out. The levels of proteins, such as villin-1(IL1), caspase 3, Bax, p21 and p27, were validated by Western blotting. **Results** The renal function injury of the HSV-UNX group was worse than that of the HSV group ($P<0.01$), and the renal mesangiolysis level was higher than that of the HSV group ($P<0.0001$), while the mesangial proliferation was milder than that of the HSV group ($P<0.001$). It is confirmed by proteomic analysis and western blotting that VIL1 expression level in the HSV-UNX group was lower than that of the HSV group. In mouse mesangial cells (MMCs), cell apoptosis ($P<0.01$) and inhibiting cell proliferation ($P<0.05$) were promoted by VIL1 knockdown through up-regulating the expressions of caspase 3, Bax, p21 and p27 proteins. **Conclusion** VIL1 is down-regulated in the HSV-UNX mouse model, which impairs the self-repair ability of glomerular and aggravates the renal function damage by inhibiting cell proliferation and promoting cell apoptosis.

[Key words] Unilateral nephrectomy (UNX) ; Habu nephritis; Villin-1(VIL1); Mouse model