

史添立, 罗贞, 焦石. YAP 在特发性膜性肾病中的表达及其对 C5b-9 诱导足细胞损伤的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 1-8.

Shi TL, Luo Z, Jiao S. Expression of YAP in idiopathic membranous nephropathy and its role in C5b-9-induced podocyte injury [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 1-8.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.03.001

# YAP 在特发性膜性肾病中的表达及其对 C5b-9 诱导足细胞损伤的作用

史添立<sup>1</sup>, 罗贞<sup>1\*</sup>, 焦石<sup>2</sup>

(1.海口市人民医院肾内科,海口 570208; 2.中山市博爱医院肾病风湿科,广东 中山 510603)

**【摘要】** 目的 在特发性膜性肾病(IMN)中探究转录共激活因子 Yes 相关蛋白(YAP)的表达及其在膜攻击复合物 C5b-9 诱导足细胞损伤的作用。方法 免疫组织化学染色检测 YAP 蛋白在 IMN 患者肾组织及正常对照肾组织中的表达;选用亚溶解剂量的膜攻击复合物 C5b-9(以下简称 C5b-9)在体外建立人足细胞系 MPC5 的损伤模型,Western blot 检测随 C5b-9 刺激时间的延长,足细胞中 YAP 蛋白的表达变化;使用 siRNA 瞬时转染技术,靶向沉默足细胞中 YAP 基因表达,qRT-PCR 及 Western blot 检测转染效率;按足细胞处理的不同将其分为 4 组,正常培养的 Control 组,经 C5b-9 处理的 C5b-9 组,C5b-9 处理转染 si-NC 或 si-YAP 的 C5b-9+si-NC 组与 C5b-9+si-YAP 组;应用 CCK-8 实验检测上述各组细胞的增殖活力,Annexin V-FITC 双染色联合流式细胞数检测各组细胞的凋亡发生率,DCFH-DA 法检测细胞中活性氧(ROS)含量,Western blot 检测各组细胞中足细胞标志性蛋白 Nephritin、WT1 与紧密连接蛋白 ZO-1、表型转换蛋白 Snail 及纤连蛋白 Fibronectin 的蛋白表达水平。结果 与正常对照肾组织相比,YAP 在 IMN 中的表达显著增加( $P<0.05$ );随 C5b-9 刺激时间的延长,足细胞中 YAP 蛋白的表达水平逐渐升高;转染 si-YAP 后,足细胞中 YAP mRNA 及蛋白水平均显著降低( $P<0.05$ );与 Control 组相比,C5b-9 组、C5b-9+si-NC 组及 C5b-9+si-YAP 组细胞的增殖活力均显著降低( $P<0.05$ ),而凋亡率及 ROS 含量均显著增加( $P<0.05$ );但与 C5b-9 组或 C5b-9+si-NC 组相比,C5b-9+si-YAP 组细胞增殖活力显著增加( $P<0.05$ ),凋亡率及 ROS 含量显著减少( $P<0.05$ );Western blot 检测各组细胞中相关蛋白的表达结果显示,与 Control 组相比,C5b-9 组、C5b-9+si-NC 组及 C5b-9+si-YAP 组细胞中 Nephritin、WT1 及 ZO-1 蛋白表达均显著降低( $P<0.05$ ),Snail 与 Fibronectin 蛋白表达均显著增加( $P<0.05$ );而与 C5b-9 组或 C5b-9+si-NC 组相比,C5b-9+si-YAP 组细胞中 Nephritin、WT1 及 ZO-1 蛋白表达显著增加( $P<0.05$ ),而 Snail 与 Fibronectin 蛋白表达显著减少( $P<0.05$ )。结论 本研究结果表明 YAP 蛋白在 IMN 患者肾小球中的表达显著增加,而沉默足细胞中 YAP 基因表达能够明显改善 C5b-9 诱导的细胞功能损伤,并抑制其凋亡的发生。

**【关键词】** 特发性膜性肾病;转录共激活因子 Yes 相关蛋白;膜攻击复合物 C5b-9;足细胞

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0001-08

## Expression of YAP in idiopathic membranous nephropathy and its role in C5b-9-induced podocyte injury

SHI Tianli<sup>1</sup>, LUO Zhen<sup>1\*</sup>, JIAO Shi<sup>2</sup>

(1. Department of Nephrology, Haikou People's Hospital, Haikou 570208, China.

2. Department of Nephrology and Rheumatology, Bo'ai Hospital, Zhongshan 510603)

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81473618);海南省卫生计生行业科研项目(19A200057)。

**【作者简介】** 史添立(1978—),男,硕士,副主任医师,研究方向:肾内科疾病的诊治及相关研究。E-mail:historical990@163.com

**【通信作者】** 罗贞(1982—),女,研究方向:肾内科疾病的诊治及相关研究。E-mail:8363568@qq.com

**【Abstract】 Objective** To investigate expression of YAP in idiopathic membranous nephropathy (IMN). **Methods** Expression of YAP protein in IMN patients and normal renal tissues was detected by immunohistochemistry. An injury model of the human podocyte line MPC5 was established *in vitro* with C5b-9. Expression of YAP protein in podocytes was detected by Western blot. siRNA transient transfection was used to silence YAP gene expression in podocytes. The transfection efficiency was assessed by qRT-PCR and Western blot. Podocytes were divided into four groups: control, C5b-9, C5b-9+si-NC and C5b-9+si-YAP groups. A CCK-8 assay was used to assess the proliferation activity, annexin V-FITC double staining combined with flow cytometry was used to assess apoptosis, DCFH-DA staining was used to detect the content of reactive oxygen species (ROS). Western blot was used to measure the apoptosis rate. The expression of podocyte marker protein nephrin, WT1, tight junction protein ZO-1, phenotype transition protein snail and fibronectin was detected by Western blot. **Results** Compared with normal renal tissue, the expression of YAP in IMN was increased significantly ( $P < 0.05$ ). With prolongation of the C5b-9 stimulation time, the expression level of YAP protein was increased in podocytes ( $P < 0.05$ ). After si-YAP transfection, the mRNA and protein levels of YAP in podocytes were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, cell proliferation in C5b-9, C5b-9+si-NC and C5b-9+si-YAP groups was decreased significantly, while the apoptosis rate and ROS content were increased significantly ( $P < 0.05$ ). However, compared with C5b-9 and C5b-9+si-NC groups, cell proliferation in the C5b-9+si-YAP group was increased significantly and the ROS content in cells was decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Expression of nephrin, WT1 and ZO-1 in C5b-9, C5b-9+si-NC and C5b-9+si-YAP groups was significantly lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). Compared with C5b-9 and C5b-9+si-NC groups, the protein expression of nephrin, WT1 and ZO-1 in the C5b-9+si-YAP group was increased significantly, while the protein expression of Snail and fibronectin was decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** This study showed that YAP protein expression in glomeruli of IMN patients is significantly increased and silencing YAP gene expression in podocytes significantly improves C5b-9-damaged induced functions and inhibits apoptosis

**【Keywords】** idiopathic membranous nephropathy; YAP; C5b-9; podocytes

膜性肾病(membranous nephropathy, MN)是导致原发性肾病综合征的重要病因,严重威胁患者的生命健康<sup>[1]</sup>。其中约 25%~30%的 MN 患者与潜在的疾病相关,如系统性红斑狼疮、恶性肿瘤及各种病毒或细菌引起的感染性疾病等,而当继发性原因不明显时则归为特发性膜性肾病(idiopathic membranous nephropathy, IMN),后者约占 70%<sup>[2-3]</sup>。尽管近年来针对 IMN 的特异性分子标记物的研究取得了一定的进展,但其具体病因及发病机制仍未阐明,极大影响了 IMN 的治疗及预后。

既往研究证实 IMN 是一种原位免疫复合物或循环免疫复合物沉积于肾小球上皮细胞下,并引起补体的异常激活,形成补体膜攻击复合物 C5b-9,进而损伤足细胞的正常结构及功能的相关疾病<sup>[4-5]</sup>。其中亚溶解剂量的 C5b-9 介导的足细胞损伤在 IMN 中得到广泛认可,该假说认为亚溶解剂量的 C5b-9 对足细胞所产生的损伤并非完全溶解效应,但能够激活足细胞中多种信号通路,进而产生大量炎症因子、活性氧(reactive oxygen species, ROS)及蛋白质,导致细胞发生间质细胞转变(即表型转化),细胞骨架紊乱乃至凋亡等,最终损伤肾小球的滤过屏障,产生大量蛋白尿等肾损伤现象<sup>[6]</sup>。转录共激活

因子 Yes 相关蛋白(yes-associated protein, YAP)是经典的 Hippo 信号通路的重要效应因子之一,其在调控细胞增殖、生长、分化和死亡等多个环节均具有重要地位<sup>[7-8]</sup>。近年来,随着对 YAP/Hippo 通路在肾发育过程中作用的认识,人们发现 YAP 信号的异常表达也参与调控了多种肾疾病的发生进展<sup>[8]</sup>。然而在 IMN 中, YAP 在肾组织中的表达及相关作用尚鲜有报道。本研究欲通过探究 YAP 的 IMN 患者中的表达,并建立 C5b-9 损伤肾小球足细胞的体外模型,进而阐明其相关作用,以期进一步揭示 IMN 的发病机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 细胞

人肾小球足细胞 MPC5 细胞系购自中国科学院上海细胞库。

#### 1.1.2 临床标本来源

选取 2018 年 2 月至 2020 年 2 月于海口市人民医院肾内科确诊的 IMN 患者 121 例(IMN 组),所有患者肾活检均证实为 IMN,其中男性 62 例,女性 59 例,平均年龄(47.1±3.9)岁。另取年龄、性别相匹

配的同时期于我院泌尿科行肾肿瘤切除术的癌旁正常对照肾组织 91 例 (Normal 组)。纳入标准: (1) 所有受试者年龄  $\geq 18$  岁; (2) IMN 符合 Ehrenreich-Churg 诊断标准<sup>[9]</sup>, 且排除经临床资料核查及实验室检查发现的继发性 IMN 患者; (3) 受试者入院前 3 个月未使用任何免疫抑制剂、细胞毒性药物或糖皮质激素等; (4) 临床资料完整, 且患者或家属签署知情同意书。本研究符合伦理学相关要求, 且经海口市人民医院伦理委员会批准 (2018AKB206-01)。

## 1.2 主要试剂与仪器

DMEM/HG 培养基, 0.25% 胰酶 (美国 Hyclone 公司, 批号: AD13203319、AD15802247); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号: 11416-791); TRIzol、反转录试剂盒、转染试剂 Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司, 批号: 4339218、426019、711035); SYBR Premix Ex Taq (日本 TaKaRa 公司, 批号: T108241R73661); CCK-8 试剂盒, Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂 (江苏碧云天生物科技公司, 批号: C191029、C200914、C190518、ST170514、ST190211); DCFH-DA 试剂盒 (美国 Sigma 公司, 批号: EZ1911D0032); 沉默 YAP 的 siRNA (si-YAP) 及阴性对照序列 si-NC (广州锐博生物技术有限公司, 批号: 201029BZ); 补体来自 8 名健康体检者新鲜血清 (normal human serum, NHS); 人补体 C5b-6 复合物 (美国 Merck 公司, 批号: M1129); 大鼠抗 YAP、p-YAP、 $\beta$ -actin 抗体 (美国 Cell Signaling 公司, 批号: 191128、200711、20120706); 大鼠抗 Nephlin、WT1、ZO-1 (美国 Cayman 公司, 批号: C1908A04、C2004A16、C1811A26); 兔抗 Snail、Fibronectin (美国 Abcam 公司, 批号: ab924417、ab101732); 兔抗大鼠或山羊抗兔二抗 (上海爱必信生物技术有限公司, 批号: A190211、A191122); qRT-PCR 引物由上海生工合成。凝胶成像系统, 凝胶电泳仪, PCR 及 qRT-PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: 005、X10-7、T10-9、IQ5); 流式细胞仪 FACS-Calibur (美国 BD 公司, 型号: FACSC- II); 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司, 型号: 荧光 CKX-19)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 免疫组织化学染色 (immunohistochemistry, IHC)

将固定于 4% 甲醛溶液的肾组织样本进行常规石蜡包埋, 切片机进行连续切片后, 二甲苯脱蜡, 梯

度乙醇脱水, 3% 的过氧化氢消除内源性过氧化物酶, 高压柠檬酸钠进行抗原恢复, 5% 的牛血清白蛋白封闭抗体后, 加入稀释后的 YAP 抗体 (1: 800), 4℃ 孵育过夜, 加入二抗 (1: 1000) 室温孵育 1 h, DAB 显色, 苏木素复染, 中性树脂封片后, 显微镜下观察拍照。

### 1.3.2 细胞的培养, 转染和分组处理

MPC5 在含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素混合液的 DMEM/HG 培养基中, 并置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中进行培养。取处于对数生长期的足细胞, 0.25% 的胰酶常规消化后, 按  $5 \times 10^4$  个/孔接种于 6 孔板中, 当细胞生长融合至 70% 时, 参考 Lipofectamin 2000 转染试剂说明书方法将 Opti-MEN 稀释后的转染试剂及 si-YAP 或 si-NC 按 1: 1 比例加入足细胞中进行转染, 6 h 后更换为新鲜培养, 继续培养 48 h 后应用 qRT-PCR 及 Western blot 实验检测转染效率。参考文献<sup>[10]</sup>方法, 使用亚溶解剂量的 C5b-9 与 NHS 进行处理 MPC5 细胞, 并将细胞分为 4 组, 正常培养的 MPC5 细胞 (control 组), 0.4  $\mu$ g/mL 的 C5b-9 与 NHS 处理的 MPC5 细胞 (C5b-9 组) 和 0.4  $\mu$ g/mL 的 C5b-9 与 NHS 处理的 si-NC 细胞 (C5b-9+si-NC 组) 和 0.4  $\mu$ g/mL 的 C5b-9 与 NHS 处理的 si-YAP 细胞 (C5b-9+si-YAP 组)。各组细胞均置于上述条件的培养箱中培养 48 h 后进行后续相关实验。

### 1.3.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

取各组待测足细胞, TRIzol 法提取细胞中总 RNA, 应用反转录试剂盒反转录为 cDNA。参考 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒说明书确定 qRT-PCR 反应体系及条件, qRT-PCR 的引物序列为: YAP-F: 5'-CAAGCTGGCTAGCGTTTAAACGG-3', YAP-R: 5'-GTAGTCGGATCCTAACCACGTGAGAAAG-3';  $\beta$ -actin-F: 5'-CCTGGCACCCAGCACAAAT-3',  $\beta$ -actin-R: 5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3'。以  $\beta$ -actin 作为内参, 按照  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算待测细胞中目的基因的表达。

### 1.3.4 CCK-8 检测足细胞增殖活力

取对数生长期各组细胞, 按  $1 \times 10^4$  个/孔接种至 96 孔板中, 于培养箱中培养 0、12、24、48 h 后加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂, 继续孵育 1 h 后, 在酶标仪 450 nm 波长处检测各孔光密度值。每组每个时间点设置 3 个复孔。统计软件计算并分析各组细胞的增殖活力。

### 1.3.5 Annexin V-FITC 双染法联合流式细胞术检测足细胞凋亡

取培养 48 h 后上述各组细胞, 常规消化细胞

后,2000 r/min 离心细胞 5 min 后,取细胞沉淀加入 195  $\mu$ L 的 Annexin V-FITC 结合液进行重悬细胞,随后再依次加入 5  $\mu$ L 与 10  $\mu$ L 的 V-FITC 与 PI 染液,充分混匀后 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min,过滤细胞团块后,上机进行分析。

### 1.3.6 细胞内活性氧(ROS)检测

取对数生长期各组细胞,按  $5 \times 10^4$  个/孔接种至 6 孔板中,待细胞生长融合至 80% 时,弃去原培养液,每孔加入 1 mL 终浓度为 5  $\mu$ mol/L 的 DCFH-DA,37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min 后,PBS 洗涤细胞后,收集细胞,应用流式细胞仪进行检测。实验单独重复 3 次。

### 1.3.7 Western blot 实验

取各组待测细胞,将 RIPA 细胞裂解液及蛋白酶抑制剂按 100 : 1 的比例进行混合后,提取细胞中总蛋白,4 $^{\circ}$ C 下 24000 r/min 离心 15 min,收集上清液,BCA 法进行蛋白定量,加入蛋白上样缓冲液后将蛋白样品经沸水中加热变性 5 min。10% SDS-PAGE 电泳,转膜,5% 脱脂奶粉室温下进行抗体封闭 2 h 后,加入 YAP(1 : 500)、Nephrin(1 : 1000)、WT1(1 : 1000)、ZO-1(1 : 1000)和 Snail(1 : 800)、Fibronectin(1 : 800)及  $\beta$ -actin(1 : 2000),4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜,随后加入相应二抗(1 : 10000),TBST 溶液洗膜后,加入 ECL 发光液于 Bio-Rad 图像分析仪进行蛋白条带灰度扫描,以  $\beta$ -actin 为内参,分析目的蛋白表达水平。实验单独重复 3 次。

### 1.4 统计学方法

GraphPad Prism 5.0 进行统计分析,数据结果用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间样本使用  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用 Turkey 检验。以  $P < 0.05$

表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 YAP 在 IMN 肾组织中的表达

IHC 染色结果显示,Normal 组肾小球中有少量 YAP 蛋白表达,且主要表达于细胞胞质中,而在 IMN 患者中,YAP 蛋白在肾小球中表达明显增加( $P < 0.05$ ),且多数表达于细胞核中(图 1)。

### 2.2 C5b-9 激活足细胞中 YAP 信号表达

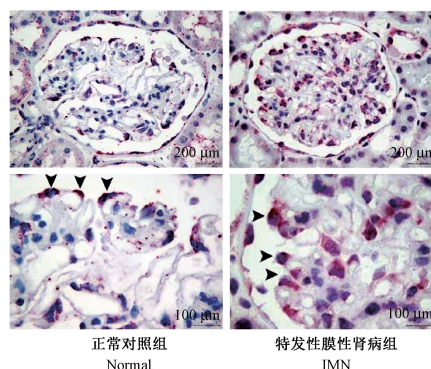
Western blot 实验结果显示,随 C5b-9 刺激时间的延长,p-YAP 蛋白表达无明显变化,而非磷酸化 YAP 蛋白表达逐渐增加,且以 24 h 增加趋势最为明显,故足细胞中 p-YAP/YAP 比值随 C5b-9 刺激时间而不断降低( $P < 0.05$ )。而在细胞中 p-YAP 蛋白不能进入细胞核以激活下游靶基因的转录,但 YAP 蛋白则能够完成上述作用,提示 C5b-9 能够激活 YAP 信号表达(图 2)。

### 2.3 转染 si-YAP 后足细胞中 YAP mRNA 及蛋白的表达水平

qRT-PCR 及 Western blot 实验结果显示,转染沉默 YAP 表达的 si-YAP 后足细胞中 YAP mRNA 及蛋白的表达水平均显著降低( $P < 0.05$ ),而转染 si-NC 后足细胞无明显变化( $P > 0.05$ ,图 3)。

### 2.4 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后的足细胞活性的影响

CCK-8 检测结果显示,与 Control 组相比,C5b-9 组、C5b-9+si-NC 组及 C5b-9+si-YAP 组细胞活力均显著降低( $P < 0.05$ );但与 C5b-9 组或 C5b-9+si-NC 组相比,C5b-9+si-YAP 组细胞活力显著增加( $P < 0.05$ ),前两组无明显差异( $P > 0.05$ ,图 4)。

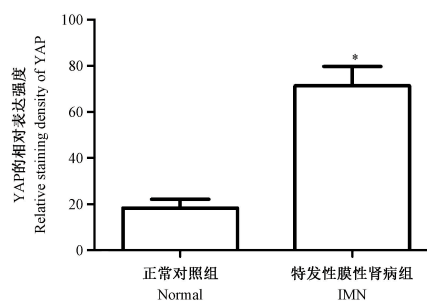


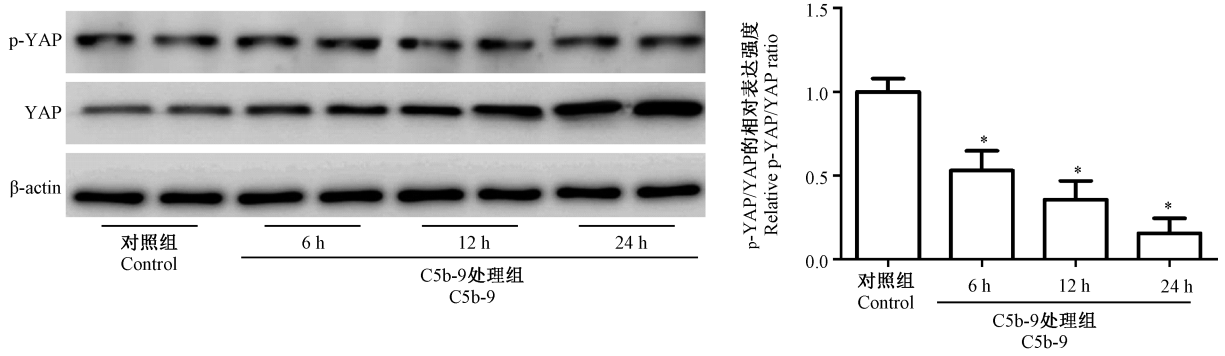
注:与 Normal 组相比, \*  $P < 0.05$ 。

图 1 YAP 在 IMN 肾组织中的表达显著增加

Note. Compared with Normal group, \*  $P < 0.05$ .

Figure 1 Expression of YAP significantly increased in IMN renal tissue



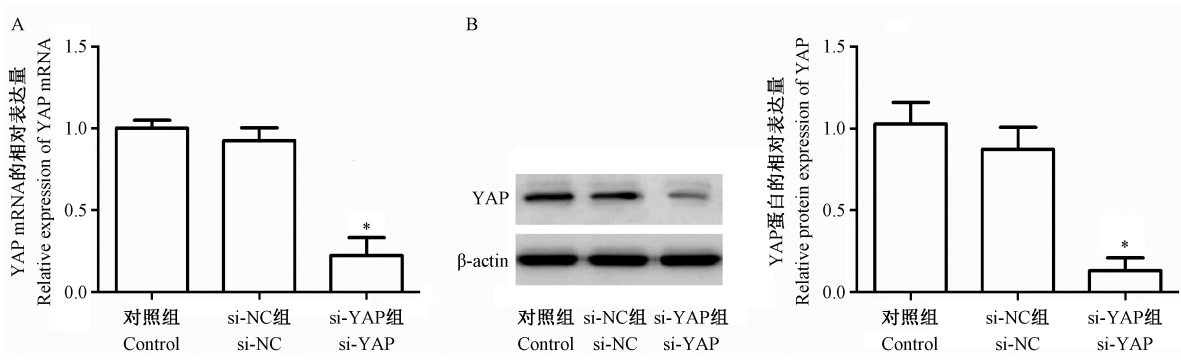


注:与 Control 组相比, \* $P < 0.05$ 。

图 2 C5b-9 激活足细胞中 YAP 信号表达

Note. Compared with Control group, \* $P < 0.05$ .

Figure 2 YAP signal expression in podocytes activated by C5b-9

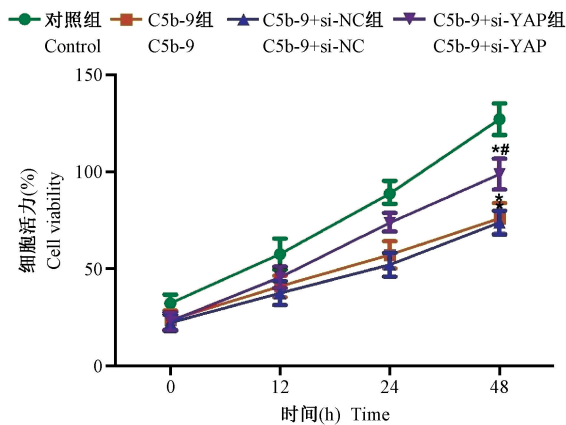


注:A;qRT-PCR 检测足细胞中 YAP mRNA 表达;B:Western blot 检测足细胞中 YAP 蛋白表达。与 Control 组相比, \* $P < 0.05$ 。

图 3 转染 si-YAP 后显著抑制足细胞中 YAP mRNA 及蛋白表达

Note. A, Expression of YAP mRNA in podocytes was detected by qRT-PCR. B, Expression of YAP protein in podocytes was detected by Western blot. Compared with Control group, \* $P < 0.05$ .

Figure 3 Expression of YAP mRNA and protein in podocytes was significantly inhibited after transfection of si-YAP



注:与 Control 组相比, \* $P < 0.05$ ;与 C5b-9 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 4 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后的足细胞活性的影响

Note. Compared with Control group, \* $P < 0.05$ . Compared with C5b-9 group, # $P < 0.05$ .

Figure 4 Effect of YAP gene silencing on podocyte activity after C5b-9 stimulation

## 2.5 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后足细胞凋亡影响

Annexin V-FITC 结合流式细胞术检测各组足细胞凋亡结果表明,与 Control 组相比,C5b-9 组、C5b-9+si-NC 组及 C5b-9+si-YAP 组细胞凋亡比例均显著增加( $P < 0.05$ );但与 C5b-9 组或 C5b-9+si-NC 组相比,C5b-9+si-YAP 组细胞凋亡比例显著减少( $P < 0.05$ ),前两组无明显差异( $P > 0.05$ ,图 5)。

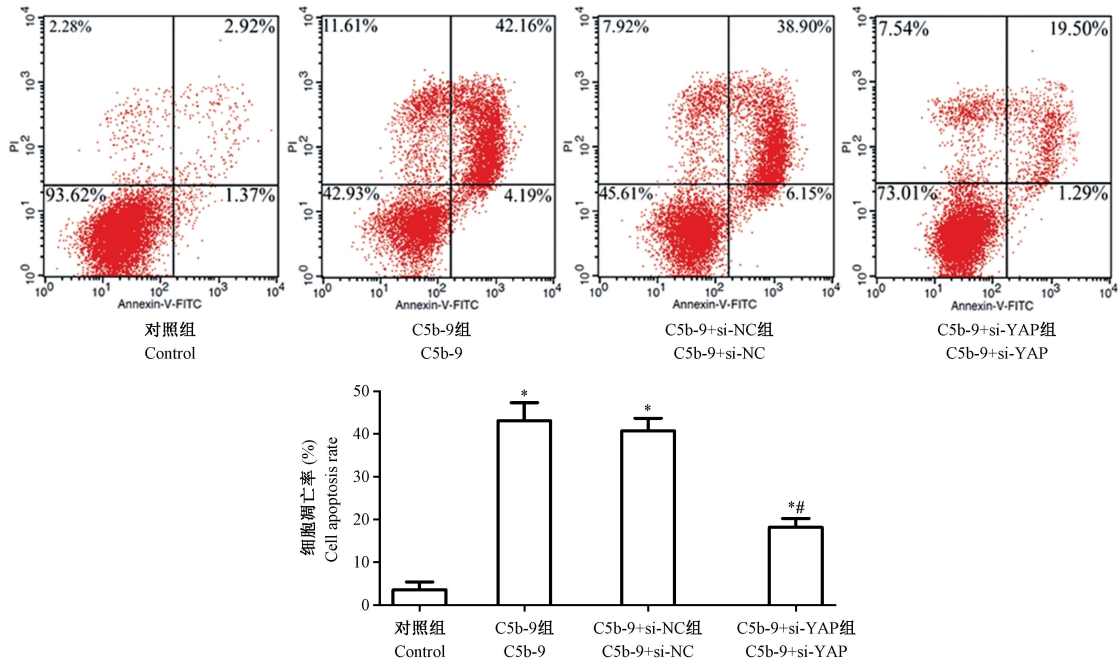
## 2.6 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后足细胞中 ROS 产生的影响

流式细胞仪检测各组足细胞中 ROS 表达的结果显示,与 Control 组相比,C5b-9 组、C5b-9+si-NC 组及 C5b-9+si-YAP 组细胞中 ROS 含量显著增加( $P < 0.05$ );但与 C5b-9 组或 C5b-9+si-NC 组相比,C5b-9+si-YAP 组细胞中 ROS 显著减少( $P < 0.05$ ),前两组无显著差异( $P > 0.05$ ,图 6)。

## 2.7 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后足细胞标志蛋白、紧密连接蛋白和表型转换蛋白表达的影响

Western blot 检测各组细胞中足细胞标志蛋白 Nephrin、WT1 及紧密连接蛋白 ZO-1 和表型转换蛋白 Snail、纤连蛋白 Fibronectin 的表达结果显示,与 Control 组相比,C5b-9 组、C5b-9+si-NC 组及 C5b-

9+si-YAP 组细胞中 Nephrin、WT1 及 ZO-1 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), Snail 与 Fibronectin 蛋白表达显著增加 ( $P < 0.05$ ); 但与 C5b-9 组或 C5b-9+si-NC 组相比,C5b-9+si-YAP 组细胞中 Nephrin、WT1 及 ZO-1 蛋白表达显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而 Snail 与 Fibronectin 蛋白表达显著减少 ( $P < 0.05$ , 图 7)。

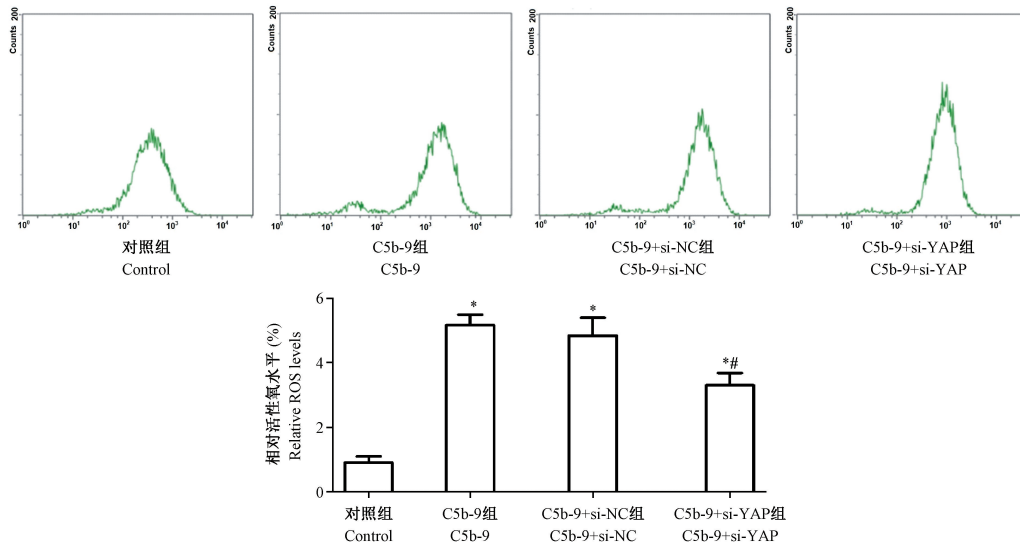


注:与 Control 组相比, \* $P < 0.05$ ; 与 C5b-9 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 5 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后足细胞凋亡影响

Note. Compared with Control group, \* $P < 0.05$ . Compared with C5b-9 group, # $P < 0.05$ .

Figure 5 Effect of YAP gene silencing on podocytes apoptosis after C5b-9 stimulation

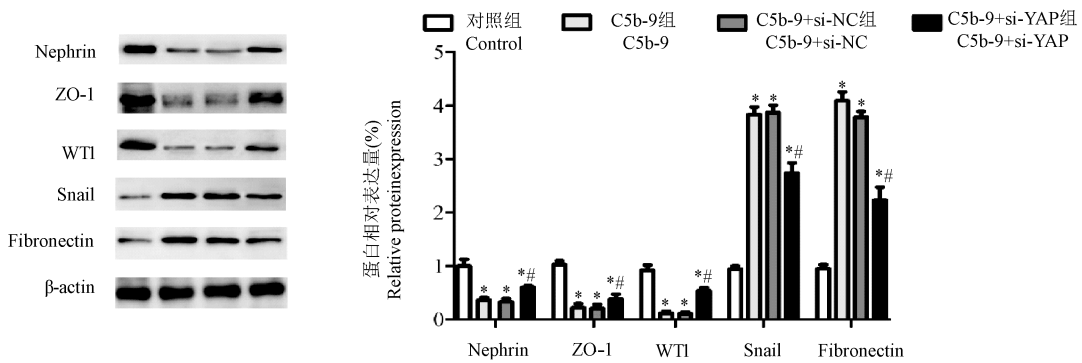


注:与 Control 组相比, \* $P < 0.05$ ; 与 C5b-9 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 6 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后足细胞中 ROS 产生的影响

Note. Compared with Control group, \* $P < 0.05$ . Compared with C5b-9 group, # $P < 0.05$ .

Figure 6 Effect of YAP gene silencing on ROS production in podocytes stimulated by C5b-9



注:与 Control 组相比, \* $P<0.05$ ;与 C5b-9 组相比, # $P<0.05$ 。

图 7 沉默 YAP 基因对 C5b-9 刺激后足细胞中足细胞标志性蛋白 Nephrin、WT1 及紧密连接蛋白 ZO-1 和表型转换蛋白 Snail 及纤连蛋白 Fibronectin 表达的影响

Note. Compared with Control group, \* $P<0.05$ . Compared with C5b-9 group, # $P<0.05$ .

Figure 7 Effects of YAP gene silencing on the expression of podocellular marker proteins Nephrin, WT1, tight binding protein ZO-1, phenotypic transition protein Snail and Fibronectin in podocellular cells stimulated by C5b-9

### 3 讨论

足细胞是位于肾组织毛细血管球外侧的终末分化细胞,其不仅是构成肾小球过滤屏障的重要组成部分,同时也是免疫介导和非免疫损伤的重要作用靶点<sup>[11]</sup>。而持续的足细胞损伤则会导致细胞数量的减少,进而引起肾功能不全,乃至终末期肾病的发生。既往研究证实补体系统的异常活化在 IMN 足细胞损伤中具有重要地位,而 C5b-9 作为补体活化的终产物,更能直接破坏足细胞的正常结构与功能<sup>[5]</sup>。因此积极探究 C5b-9 损伤足细胞的相关机制对阐明 IMN 的发生发展具有重要意义。本研究结果显示,通过 siRNA 转染技术沉默在 IMN 肾组织中过表达的 YAP 基因能够显著改善 C5b-9 诱导的足细胞损伤,这提示 YAP 信号可能在 IMN 的致病机制中具有重要作用。

YAP/Hippo 信号通路是近年来受到广大学者关注的一条调控细胞增殖、分化和凋亡相关基因转录和表达的重要信号通路<sup>[7]</sup>。研究发现 Hippo 途径在动物体内具有高度保守性,其主要由 Mst1/2 激酶, Lats1/2 激酶和共转录激活因子 YAP 或 TAZ 构成<sup>[12]</sup>。在细胞中,上游的相关调控元件如 NF2、KIBRA 等,磷酸化 Mst1/2 激酶,并使其转为激活状态,从而进一步同样磷酸化并活化 Lats1/2 激酶,而活化 Lats1/2 激酶可以直接使下游的 YAP 蛋白发生磷酸化。分子机制相关研究发现,骨架蛋白 14-3-3 等能够与磷酸化的 YAP 相结合,使其滞留在胞浆中,并经泛素化途径被降解。而未发生磷酸化的

YAP 蛋白能够顺利进入细胞核,并与 TEAD 结合,启动下游相关靶基因的转录及表达,参与调控细胞的增殖与凋亡过程<sup>[13-15]</sup>。提示未发生磷酸化的核内 YAP 才具有发挥相关生物学活性的作用。在本研究中,我们通过免疫组织化学染色发现 YAP 蛋白在 IMN 患者肾小球足细胞中的表达异常增加,且其定位多位于细胞核内。这提示在 IMN 中 YAP 可能通过调控下游相关靶基因的转录导致参与 IMN 的发生进展。

随着对 YAP/Hippo 信号通路认识的加深,人们发现主要定位于肾小球足细胞内的 YAP 蛋白与细胞的损伤,凋亡,细胞骨架的异常及间质性表型转换等密切相关,然而其具体作用仍存在争议。如 Campbell 等<sup>[16]</sup>研究发现, YAP 蛋白能通过分子结构中的 WW 结构域与树突蛋白 dendrin 的相关序列进行结合,从而抑制细胞核内促凋亡信号的转录,避免阿霉素或星形孢菌素所诱导的足细胞凋亡。同样在局灶节段性肾小球硬化中,足细胞核内 YAP 蛋白的含量减少,加速了基质中胶原纤维的产生及足细胞的丢失<sup>[17]</sup>。这些研究提示 YAP 在保护足细胞功能及维持肾小球过滤屏障中具有关键作用。然而,其他研究也表明,细胞核内 YAP 信号的过度表达则会造成足细胞的损伤及凋亡。如在糖尿病肾病(DN)中,足细胞核中异常聚集的 YAP 蛋白与患者收缩压、血尿素氮,肌酐的升高及 DN 的病理分级呈正相关,提示抑制 YAP 活性可能具有延缓 DN 进展的作用<sup>[18]</sup>。国内学者谢可炜<sup>[19]</sup>在阿霉素肾病的体内外研究中发现,过表达足细胞中 YAP 蛋

白可能通过促进周期相关蛋白 CDK4 和 CyclinD1 的表达,从而诱导静止期的足细胞重新进入细胞周期,并发生间充质细胞分化,严重影响足细胞的正常功能,并使其发生“有丝分裂灾难”,加速足细胞的丢失。本研究通过体外建立 C5b-9 损伤足细胞模型发现,随着 C5b-9 刺激时间的延长,足细胞中非磷酸化 YAP 蛋白的表达逐渐增加,而沉默 YAP 基因表达能显著缓解 C5b-9 诱导的足细胞增殖活性降低,凋亡增加、ROS 产生及足细胞损伤与间质细胞表型转化现象,同样提示 YAP 在足细胞的异常表达及定位可能通过损伤足细胞的功能,促进 IMN 的发生发展。

综上,本研究结果表明 YAP 蛋白在 IMN 患者肾小球中的表达显著增加,沉默足细胞中 YAP 基因表达能够明显改善 C5b-9 诱导的细胞功能损伤,抑制其凋亡的发生。虽然 YAP 在足细胞损伤中的具体作用机制仍需进一步研究,但本研究有望为 YAP 在 IMN 治疗的潜在作用靶点提供实验室及理论基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Ronco P, Plaisier E, Debiec H. Advances in membranous nephropathy [J]. J Clin Med, 2021, 10(4): 607-621.
- [ 2 ] Hoxha E, von Haxthausen F, Wiech T, et al. Membranous nephropathy-one morphologic pattern with different diseases [J]. Pflugers Arch, 2017, 469(7-8): 989-996.
- [ 3 ] Stahl RA, Reinhard L, Hoxha E. Characterization of autoantibodies in primary membranous nephropathy and their clinical significance [J]. Expert Rev Clin Immunol, 2019, 15(2): 165-175.
- [ 4 ] Ronco P, Debiec H. Membranous nephropathy: current understanding of various causes in light of new target antigens [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2021, 10(81): e1097.
- [ 5 ] 钟珍,李俊佳,胡海滢,等.补体攻膜复合物 C5b-9 在特发性膜性肾病发病中作用研究进展 [J].中华实用诊断与治疗杂志, 2015, 29(7): 631-633.
- [ 6 ] Koopman JJE, van Essen MF, Rennke HG, et al. Deposition of the membrane attack complex in healthy and diseased human kidneys [J]. Front Immunol, 2021, 11(22): e599974.
- [ 7 ] Wong JS, Meliambro K, Ray J, et al. Hippo signaling in the kidney: the good and the bad [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2016, 311(2): F241-F248.
- [ 8 ] Bonse J, Wennmann DO, Kremerskothen J, et al. Nuclear YAP localization as a key regulator of podocyte function [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(9): e850.
- [ 9 ] Mirza MK, Kim L, Kadambi PV, et al. Membranous nephropathy transplanted in the donor kidney: observations of resolving glomerulopathy in serial allograft biopsies [J]. Nephrol Dial Transplant, 2014, 29(12): 2343-2347.
- [ 10 ] Sha W, Shen L, Zhou L, et al. Silencing of CXCL12 performs a protective effect on C5b-9-induced injury in podocytes [J]. Int Urol Nephrol, 2018, 50(8): 1535-1544.
- [ 11 ] Liu W, Gao C, Liu Z, et al. Idiopathic membranous nephropathy: glomerular pathological pattern caused by extrarenal immunity activity [J]. Front Immunol, 2020, 11(79): e1846.
- [ 12 ] 郑志煌,张志刚,吴慧娟,等. Hippo 信号通路与肾病 [J].临床与病理杂志, 2017, 37(7): 1518-1523.
- [ 13 ] Xu C, Wang L, Zhang Y, et al. Tubule-Specific Mst1/2 deficiency induces CKD via YAP and non-YAP mechanisms [J]. J Am Soc Nephrol, 2020, 31(5): 946-961.
- [ 14 ] Vargas RE, Duong VT, Han H, et al. Elucidation of WW domain ligand binding specificities in the Hippo pathway reveals STXBP4 as YAP inhibitor [J]. EMBO J, 2020, 39(1): e102406.
- [ 15 ] Meliambro K, Wong JS, Ray J, et al. The Hippo pathway regulator KIBRA promotes podocyte injury by inhibiting YAP signaling and disrupting actin cytoskeletal dynamics [J]. J Biol Chem, 2017, 292(51): 21137-21148.
- [ 16 ] Campbell KN, Wong JS, Gupta R, et al. Yes-associated protein (YAP) promotes cell survival by inhibiting proapoptotic dendrin signaling [J]. J Biol Chem, 2013, 288(24): 17057-17062.
- [ 17 ] Bonse J, Wennmann DO, Kremerskothen J, et al. Nuclear YAP localization as a key regulator of podocyte function [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(9): 850-912.
- [ 18 ] Ma R, Ren JM, Li P, et al. Activated YAP causes renal damage of type 2 diabetic nephropathy [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(2): 755-763.
- [ 19 ] 谢可炜. YAP 信号调节阿霉素肾病足细胞进入细胞周期及分化 [D]. 上海:上海交通大学, 2018.

[ 收稿日期 ] 2021-08-19