

陈小丽,罗富里,童梦瑶. HDAC6 抑制剂通过保护肾小球内皮细胞线粒体稳态和 EMT 改善糖尿病肾病 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(10): 71-80.

Chen XL, Luo FL, Tong MY. Histone deacetylases 6 inhibitor improves diabetic nephropathy by protecting mitochondrial homeostasis and inhibiting epithelial-mesenchymal transition of glomerular endothelial cells [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(10): 71-80.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.10.010

HDAC6 抑制剂通过保护肾小球内皮细胞线粒体稳态和 EMT 改善糖尿病肾病

陈小丽¹, 罗富里², 童梦瑶^{3*}

(1.井冈山大学附属医院肾病风湿免疫科,江西吉安 343000;2.江西中医药大学附属医院肾病科,南昌 330006;
3.江西中医药大学第二附属医院呼吸科,南昌 330006)

【摘要】 目的 探讨组蛋白去乙酰化酶 6(histone deacetylases 6,HDAC6) 特异性小分子抑制剂 Tubastatin A 对糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)小鼠肾损伤的保护作用和机制。方法 C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组:对照组、DN 组和 Tubastatin A 组。DN 组和 Tubastatin A 组行包膜下肾切除术以切除右肾,并通过腹膜内注射 STZ 诱导 DN。Tubastatin A 组接受 Tubastatin A 治疗,每 3 d 1 次,连续治疗 8 周。RNA 测序分析 DN 组和 Tubastatin A 组肾组织中差异表达基因。通过透射电子显微镜评估线粒体受损情况,以及 DHE 染色估计肾组织中的活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平。将小鼠肾小球内皮细胞(mice glomerular endothelial cell, mGEC)暴露于高葡萄糖(high glucose, HG)培养基或 40 mmol/L 甘露醇(对照),加入或不加入 Tubastatin A 处理。采用蛋白质印迹分析 HDAC6、肾损伤标志物 KIM1 和上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)标志物的表达情况,以及流式细胞仪检测细胞中线粒体 ROS 和细胞凋亡情况。结果 DN 小鼠肾组织和暴露于 HG 的 mGEC 细胞中 HDAC6 表达上调,并与 KIM1 水平升高一致。组织学分析显示 DN 小鼠的显著形态学变化,包括肾小球肥大、肾小球系膜基质积聚、肾小球基底膜增厚、肾小管基底膜增厚和出现肾小球、肾小管间质纤维化;Tubastatin A 治疗缓解了这些不良改变。与对照 DMSO 相比, Tubastatin A 在 HG 处理下显著降低了 mGEC 细胞中肾损伤分子 1(kidney injury molecular1, KIM1)、HDAC6、 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、N-钙粘蛋白、波形蛋白表达($P < 0.05$),并上调 E-钙粘蛋白表达($P < 0.05$)。透射电子显微镜显示 Tubastatin A 组小鼠的肾小球内皮细胞受损线粒体的比例较 DN 组显著降低($P < 0.01$)。Tubastatin A 组小鼠肾组织中 ROS 水平较 DN 组降低($P < 0.01$)。RNA 测序结果表明,与 DN 组小鼠相比, Tubastatin A 组小鼠肾组织中与 ECM-受体相互作用和与三羧酸(TCA)循环相关的基因富集。在 mGEC 细胞中, Tubastatin A 处理下调了 HG 诱导的 mGEC 细胞中的线粒体 ROS 水平($P < 0.01$),以及减少了细胞凋亡($P < 0.05$)。结论 Tubastatin A 改善了 HG 诱导的肾小球内皮细胞损伤和 DN 进展,其作用机制与保护线粒体稳态和抑制 EMT 发生相关。

【关键词】 组蛋白去乙酰化酶 6; Tubastatin A; 糖尿病肾病; 线粒体; 肾小球内皮细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 10-0071-10

Histone deacetylases 6 inhibitor improves diabetic nephropathy by protecting mitochondrial homeostasis and inhibiting epithelial-mesenchymal transition of glomerular endothelial cells

【基金项目】 江西省青年科学基金资助项目(20192BAB215051)。

【作者简介】 陈小丽(1976—),女,副主任医师,研究方向:肾病学。E-mail:skyer200207@163.com

【通信作者】 童梦瑶(1993—),女,主治医师,研究方向:肾病学。E-mail:qq09wwq@163.com

CHEN Xiaoli¹, LUO Fuli², TONG Mengyao^{3*}

(1. Department of Rheumatology, Affiliated Hospital of Jingtangshan University, Ji'an 343000, China.

2. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006.

3. Respiratory Department, the Second Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect and mechanism of histone deacetylase 6 (HDAC6)-specific small molecule inhibitor tubastatin A on renal injury in diabetic nephropathy (DN) mice. **Methods** C57BL/6J mice were randomly divided into control, DN and tubastatin A groups. Mice in DN and tubastatin A groups were intraperitoneally injected with 80 mg/kg STZ daily for 3 days after removal of one kidney. The tubastatin A group received tubastatin A treatments every 3 days for 8 weeks. RNA-sequencing of differentially expressed genes was performed in kidney tissue of DN and tubastatin A groups. Mitochondrial damage was assessed by transmission electron microscopy. ROS levels in kidney tissue were estimated by DHE staining. Mouse glomerular endothelial cells (mGECs) were exposed to high glucose (HG) medium or 40 mmol/L mannitol (control) with or without tubastatin A treatment. Western blot was used to analyze expression of HDAC6, kidney injury marker KIM1, and Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) markers. Flow cytometry was used to detect mitochondrial ROS and apoptosis in cells. **Results** HDAC6 expression was upregulated in DN mouse kidney tissue and mGECs exposed to HG, which was consistent with the increased level of KIM1. Histological analysis showed significant morphological changes in DN mice, including glomerular hypertrophy, mesangial matrix accumulation, glomerular basement membrane thickening, tubular basement membrane thickening, and the presence of glomerular intertubular fibrosis. Tubastatin A treatment alleviated these changes. Compared with DMSO as the control, tubastatin A significantly decreased expression of KIM1, HDAC6, α -SMA, N-cadherin and vimentin ($P<0.05$) and up-regulated E-cadherin expression ($P<0.05$) in mGECs under HG treatment. RNA-sequencing revealed enrichment of genes related to ECM-receptor interactions and the tricarboxylic acid cycle in kidney tissue of the Tubastatin A group compared with the findings in the DN group. Transmission electron microscopy showed that the proportion of damaged mitochondria in glomerular endothelial cells in the Tubastatin A group was significantly lower than that in the DN group ($P<0.01$). The ROS level in kidney tissue of the Tubastatin A group was lower than that in the DN group ($P<0.01$). In mGECs, tubastatin A treatment downregulated HG-induced mitochondrial ROS levels ($P<0.01$) and reduced apoptosis ($P<0.05$). **Conclusions** Tubastatin A ameliorates HG-induced glomerular endothelial cell injury and DN progression, and its mechanism is related to protection of mitochondrial homeostasis and inhibition of EMT.

【Keywords】 histone deacetylase 6; Tubastatin A; diabetic nephropathy; mitochondria; glomerular endothelial cells

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是全球终末期肾病的主要原因,因为一半以上需要透析的患者患有糖尿病^[1]。尽管目前建议对 DN 治疗进行早期干预,以最佳血糖和血压控制来预防主要不良肾结果,但不良肾和心血管结果的残余风险仍然很高^[2]。因此,理解 DN 的发病分子机制、识别可靠的生物标志物,是开发新的治疗方法来阻止或逆转 DN 进展的必要途径。

肾小球内皮细胞由于其持续高水平的能量消耗而含有丰富的线粒体^[3]。肾疾病的早期阶段通常发生代谢改变,它们会破坏线粒体稳态,如线粒体功能障碍和能量代谢受损^[4],并伴随着线粒体的一系列变化,包括破碎的形态、活性氧的产生升高和线粒体膜电位的丧失,导致足细胞丢失和脱离以及足突消失,最终出现肾小球滤过屏障破坏和蛋白尿^[5]。最近的研究证明组蛋白去乙酰化酶 (histone

deacetylases, HDAC) 在维持足细胞功能平衡方面发挥着至关重要的作用^[6]。在人类鉴定的 18 种 HDAC 中,HDAC6 是特异性的 HDAC,因为它有两个活性去乙酰化酶结构域和一个锌指基序,可优先定位于细胞质^[7]。HDAC6 的亚细胞定位使其与影响细胞迁移、增殖和错误折叠蛋白分解代谢的其他细胞质蛋白和多泛素链相互作用^[8-9]。最近研究证实,HDAC6 可能是 DN 治疗的有希望的治疗靶点^[7]。此外,HDAC6 抑制通过抑制上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 减轻梗阻性肾病的肾纤维化^[8]。还有研究发现 HDAC6 是线粒体动力学多种机制中的关键调节因子,其抑制与减轻线粒体功能障碍密切相关^[10]。然而,目前尚不清楚 HDAC6 是否通过破坏肾小球内皮细胞线粒体稳态参与 DN 的病理机制。

在本研究中,我们从 EMT 以及线粒体介导的细

胞凋亡等方面检测了 HDAC6 特异性小分子抑制剂 Tubastatin A 对 DN 小鼠肾损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

30 只 SPF 级 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠(体重 18~22 g)购自南京君科生物科技有限公司[SCXK(苏)2019-0046]。小鼠饲养于江西中医药大学实验动物中心[SYXK(赣)2019-0002],在标准 SPF 级动物房饲养,湿度为 40%~70%,温度为 20~22℃,12 h/12 h 光/暗循环。动物实验经井冈山大学附属医院动物实验伦理委员会审核批准(JGSH2020016),并严格遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞

小鼠肾小球内皮细胞(mice glomerular endothelial cell, mGEC)购自美国 ATCC,维持在含有 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 中。

1.2 主要试剂与仪器

Tubastatin A、STZ 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;尿蛋白、血清尿素氮和血清肌酐商业试剂盒购自南京建成生物工程研究所;DHE 染色剂、RIPA 缓冲液、BCA 蛋白质定量试剂盒购自上海 Beyotime 公司;5%白蛋白牛 V 购自北京 Solarbio 公司;HDAC6、KIM1 兔一抗购自英国 Abcam 公司;N-cadherin、E-cadherin、Vimentin、 α -SMA、 β -actin 兔一抗、抗兔 IgG 二抗均购自美国 Proteintech 公司。

BX-51 光学显微镜购自日本 Olympus 公司;H7650 显微镜购自日本日立公司;蛋白质印迹检测系统购自美国 Bio-Rad Laboratories;CytoFLEX S 流式细胞仪购自美国 Beckman 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组($n=10$):对照组、DN 组和 Tubastatin A 组。参照文献方法^[11],对 DN 组和 Tubastatin A 组小鼠进行 DN 诱导,具体操作为:在异氟醚麻醉下,小鼠进行包膜下肾切除术以切除右肾。每天对小鼠腹膜内注射 STZ (80 mg/kg),持续 3 d。在 STZ 注射后,Tubastatin A 组腹膜内注射 Tubastatin A,剂量为 30 mg/kg^[12],每 3 d 注射 1 次,连续治疗 8 周。对照组和 DN 组在相同时间注射等体积 DMSO。对照组接受剖腹手术,但不进行肾切除和腹膜内注射 STZ。

1.3.2 生化测量

使用商业试剂盒测量小鼠 24 h 尿蛋白、血清尿素氮和血清肌酐。

1.3.3 组织病理学分析

对于苏木精和伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,肾组织用 10%中性甲醛固定,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋并切片(5 μ m)。然后将切片分别用苏木精和伊红染色 15 min 和 5 min。对于 PAS 分析,肾切片首先用高碘酸孵育 15 min,然后用希夫溶液染色 10 min。洗涤后,切片用苏木精复染 3 min。对于 Masson 测定,在对肾石蜡切片进行常规脱蜡后,用 Masson 三原色染料对切片进行染色。在 BX-51 光学显微镜下观察组织学变化。从每个肾中随机选择 20 个肾小球,使用 Image J 软件量化系膜面积和 Masson 染色的阳性区域。

1.3.4 RNA 测序分析

8 周后,从 DN 组和 Tubastatin A 组各取 3 只小鼠的肾组织中提取总 RNA。RNA 测序由北京基因组研究所按照标准方案进行。使用 BGISEQ-500 平台对文库进行测序。

1.3.5 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)

对小鼠的肾组织进行 TEM 分析。将肾组织切成 1 mm³ 块并浸入 2.5%戊二醛中。用 0.1 mol/L 磷酸冲洗肾组织并用锇酸固定 30 min。然后将切片脱水并包埋在丙酮中。50~60 nm 切片用 3%醋酸铀-柠檬酸铅钠染色,并安装在铜网格上,在 H7650 显微镜下拍照。将底片数字化,获得最终放大倍数约为 $\times 23\ 000$ 的图像。畸形线粒体被定义为具有可见嵴的局灶性丧失、在外周线粒体膜处残留嵴聚集和碎片化(长度 $<2\ \mu$ m)的线粒体。

1.3.6 细胞处理

对于高葡萄糖(high glucose, HG)处理,将 mGEC 细胞暴露于补充有 20 mmol/L 和 40 mmol/L d-葡萄糖的完全培养基 48 h^[13]。用 5.5 mmol/L d-葡萄糖或 40 mmol/L 甘露醇培养的细胞用作对照。为了考察 Tubastatin A 对 HG 环境下的 mGEC 细胞损伤的改善作用,将细胞以 5×10^4 /孔接种于 6 孔板中,并分为以下 4 组:对照 + DMSO 组、对照 + Tubastatin A 组、HG + DMSO 组和 HG + Tubastatin A 组。对照 + DMSO 组加入 40 mmol/L 甘露醇和 DMSO 处理细胞 48 h;对照 + Tubastatin A 组加入 40 mmol/L 甘露醇和 500 nmol/L Tubastatin A 处理细胞

48 h; HG + DMSO 组加入 40 mmol/L d-葡萄糖和 DMSO 处理细胞 48 h; HG + Tubastatin A 组加入 40 mmol/L d-葡萄糖和 500 nmol/L Tubastatin A 处理细胞 48 h。所有分组一式三份。

1.3.7 ROS 水平检测

使用线粒体超氧化物指示剂测量 mGEC 细胞中的线粒体 ROS。细胞用 PBS 洗涤两次以去除培养基,随后在 5 μ mol/L MitoSOX Red 中于 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,用 PBS 洗涤 3 次。然后通过流式细胞术检测细胞。使用 DHE 染色估计肾组织中的 ROS 水平。将冷冻肾切片在丙酮中浸泡 30 min,并在 37 $^{\circ}$ C 下与 DHE(5 μ mol/L)一起孵育 30 min。使用 BX-51 光学显微镜捕获图像。

1.3.8 蛋白质印迹分析

使用 RIPA 裂解缓冲液提取细胞或肾组织中的总蛋白。使用 BCA 蛋白质定量试剂盒测量蛋白质浓度。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质并转移到聚偏二氟乙烯膜上。在室温下用含 5% 牛血清白蛋白 PBS 液封闭 1 h 后,将膜与兔一抗(HDAC6, 1 : 800; N-cadherin、E-cadherin、Vimentin、 α -SMA, 1 : 500; KIM1, 1 : 500)在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。然后洗涤膜并与二抗(抗兔 IgG, 1 : 3000)在室温下孵育 1.5 h。抗 β -actin 抗体(1 : 1000)作为对照。用增强的化学发光试剂观察蛋白质条带,并

使用蛋白质印迹检测系统量化信号密度。

1.3.9 流式细胞仪检测细胞凋亡

通过流式细胞术估计培养细胞的凋亡。将处理后的细胞加入 5 μ L Annexin V-FITC,在室温下避光孵育 10 min。然后加入 10 μ L 碘化丙啶染色液,冰浴避光放置 15 min,随后使用 CytoFLEX S 流式细胞仪进行分析。

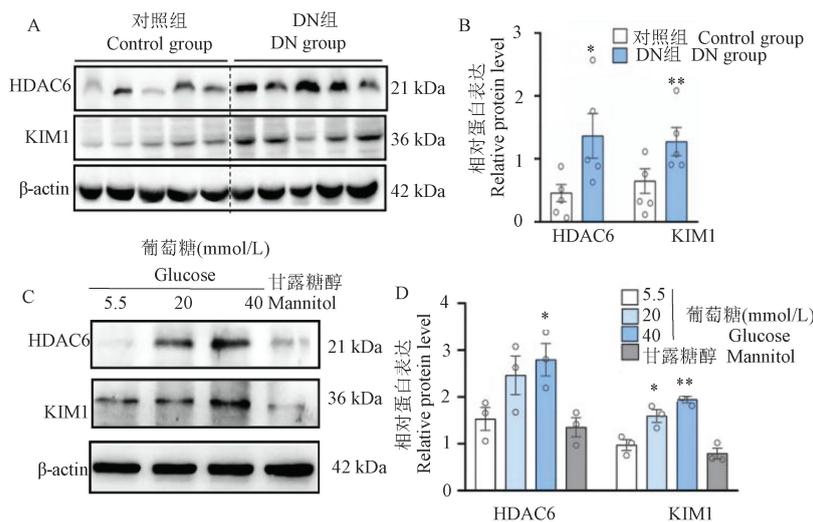
1.4 统计学方法

所有数据均使用 SPSS 18.0 软件进行分析,并表示为平均数 \pm 标准误差($\bar{x}\pm s\bar{x}$)。t 检验用于两组之间的比较,单因素方差分析(ANOVA)和 Tukey 多重比较后检验用于 3 组或更多组的比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HDAC6 在 DN 小鼠的肾组织中上调

为了初步评估 HDAC6 在 DN 中的潜在参与,首先使用免疫印迹分析显示 DN 小鼠肾组织中 HDAC6 的上调,这与肾损伤标志物 KIM1 水平升高一致(图 1A、1B)。在不同浓度葡萄糖(20 mmol/L 和 40 mmol/L)的 mGEC 细胞中,HDAC6 表达也上调,伴随着 KIM1 的表达增加(图 1C、1D)。这些结果表明 HDAC6 表达在 DN 肾组织中增加,提示 HDAC6 可能参与 DN 的发病机制。



注: A、B: 对照组小鼠($n=5$)和 DN 组小鼠($n=5$)肾组织中 HDAC6 和 KIM-1 表达的蛋白质印迹分析和蛋白相对量。C、D: 用高葡萄糖处理的 mGEC 细胞中 HDAC6 和 KIM-1 的蛋白质印迹分析和蛋白相对量。与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 HDAC6 在 DN 小鼠的肾组织和高葡萄糖处理的 mGEC 细胞中上调

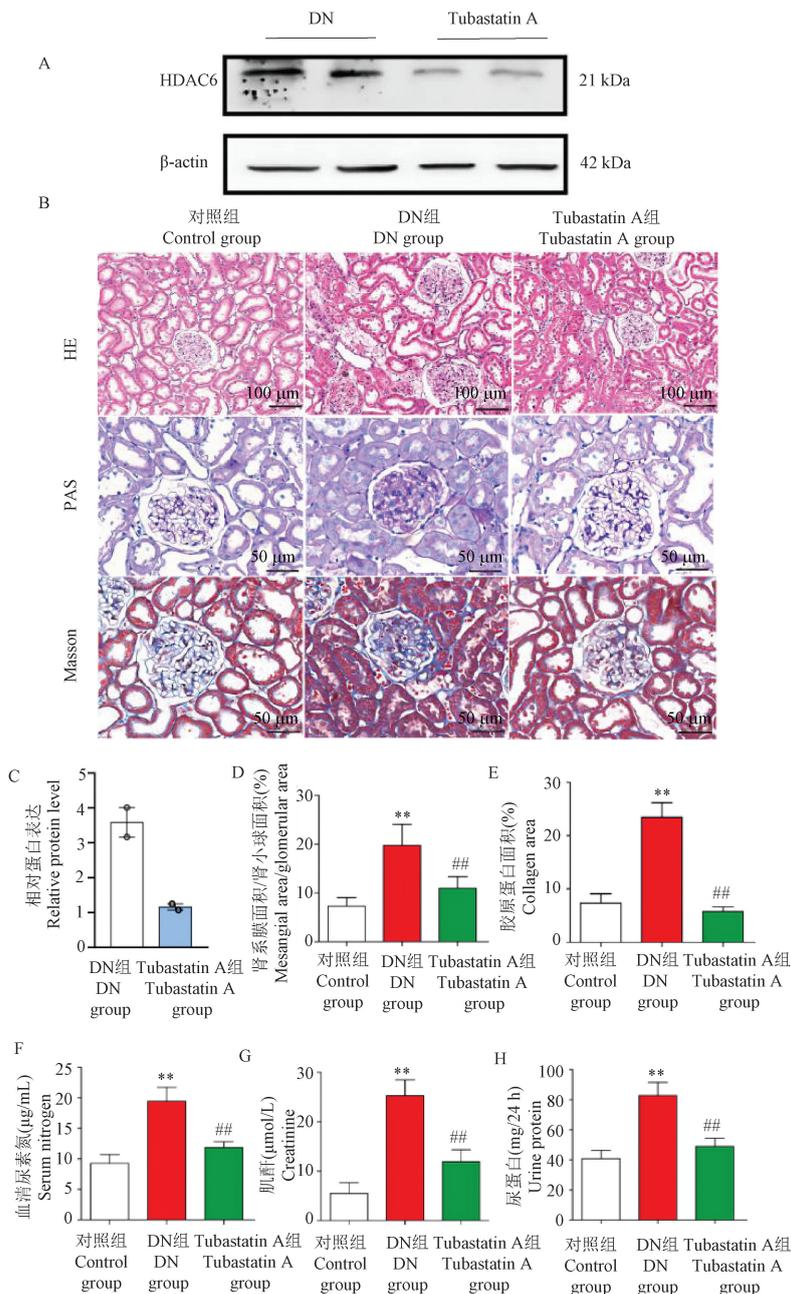
Note. A/B, Western blot analysis and optical density quantification of HDAC6 and KIM-1 expression in the kidney tissue of control mice ($n=5$) and DN group mice ($n=5$). C/D, Western blot analysis and optical density quantification of HDAC6 and KIM-1 in mGEC cells treated with high glucose quantification. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Upregulation of HDAC6 in renal tissue and high glucose treated mGEC cells of DN mice

2.2 Tubastatin A 可减轻 DN 中的肾损伤和纤维化

为了进一步评估 HDAC6 在 DN 进展中的作用,

我们向小鼠腹腔注射 Tubastatin A 有效降低了肾组织中 HDAC6 表达(图 2A, 2C)。HE 和 PAS 染色显示 DN 小鼠发生显著形态学变化,包括肾小球肥大、



注:A,C:DN 组小鼠($n=5$)和 Tubastatin A 组小鼠($n=5$)肾组织中 HDAC6 和 KIM-1 表达的蛋白质印迹分析和相对蛋白量;B:对照组小鼠($n=5$)、DN 组小鼠($n=5$)和 Tubastatin A 组小鼠($n=5$)肾的 HE、PAS 和 Masson 染色;D:肾系膜面积/肾小球面积的量化;E:肾胶原蛋白面积的量化;F:血清尿素氮;G:血清肌酐;H:24 h 的尿蛋白。与对照组相比, ** $P<0.01$;与 DN 组相比, ## $P<0.01$ 。

图 2 Tubastatin A 减轻肾的形态变化并改善肾功能

Note. A/C, Protein blot analysis and optical density quantification of HDAC6 and KIM-1 expression in renal tissue kidney tissues of DN group ($n=5$) and Tubastatin A group ($n=5$). B, HE, PAS and Masson staining of the kidney in control group ($n=5$), DN group ($n=5$) and Tubastatin A group ($n=5$). D, Quantification of renal tract area/glomerular area. E, Quantification of renal collagen area. F, Serum urea nitrogen. G, Serum creatinine. H, Urine protein at 24 h. Compared with control group, ** $P<0.01$. Compared with DN group, ## $P<0.01$.

Figure 2 Tubastatin A attenuates morphological changes in the kidney and improves renal function

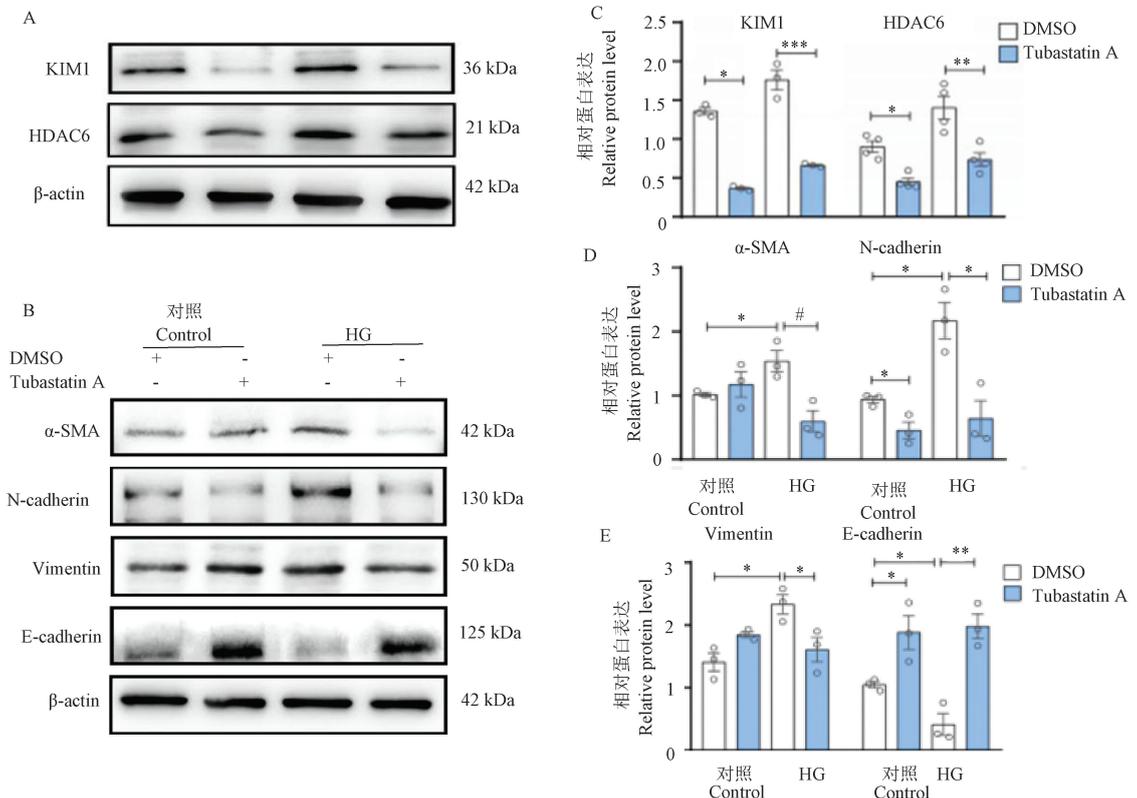
肾小球系膜基质积聚、肾小球基底膜增厚和肾小管基底膜增厚。Tubastatin A 治疗缓解了这些不良改变(图 2B、2D)。Masson 染色显示 DN 小鼠出现肾小球和肾小管间质纤维化, Tubastatin A 治疗后纤维化程度得到缓解($P<0.05$)(图 2E)。此外, 与对照组相比, DN 组肾功能标志物尿蛋白/24 h、血清尿素氮和血清肌酐显著升高, 而 Tubastatin A 治疗降低了它们的水平($P<0.05$)(图 2F~2H)。这些数据表明, Tubastatin A 改善了 DN 小鼠的肾功能。

2.3 Tubastatin A 改善 HG 环境下的 mGEC 细胞损伤和 EMT

使用 mGEC 进一步证实了 HDAC6 参与 HG 诱导的肾小球内皮细胞。与体内数据一致, 与对照 DMSO 相比, Tubastatin A 在 HG 处理下显著降低了 mGEC 细胞中 KIM1、HDAC6、 α -SMA、N-钙粘蛋白、波形蛋白表达($P<0.05$), 并上调 E-钙粘蛋白表达($P<0.05$)(图 3)。

2.4 Tubastatin A 改善线粒体稳态并减少 HG 环境下 mGEC 凋亡

TEM 显示 Tubastatin A 组小鼠的肾小球内皮细胞受损线粒体的比例较 DN 组显著降低($P<0.01$), 表现为线粒体肿胀、内膜和/或外膜断裂以及线粒体嵴破裂(图 4A、4B)。此外, DHE 染色显示 Tubastatin A 组小鼠肾组织中 ROS 水平较 DN 组降低($P<0.01$)(图 4C、4D), 为了进一步研究 HDAC6 如何调节 HG 诱导的肾小球内皮细胞损伤和 EMT 进展, 我们对 DN 组和 Tubastatin A 组小鼠的肾进行了转录组学分析。RNA 测序(RNA-seq)揭示了总共 1294 个差异表达基因(DEG), 包括 821 个下调基因和 473 个上调基因, 1 定义为倍数变化 ≥ 2.00 , 调整后 $P\leq 0.001$ (图 5A)。基因集富集分析(GSEA)揭示了与 DN 组小鼠相比, Tubastatin A 组小鼠肾组织中与 ECM-受体相互作用和与三羧酸(TCA)循环相关的基因富集(图 5B、5C), 证实了 HDAC6 的调



注: A、C; KIM1 和 HDAC6 表达的蛋白质印迹分析和相对蛋白量; B、D、E; α -SMA、N-钙粘蛋白、波形蛋白和 E-钙粘蛋白的蛋白质印迹分析和相对蛋白量。与 Control+DMSO 组相比, # $P<0.05$; 与 HG+DMSO 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

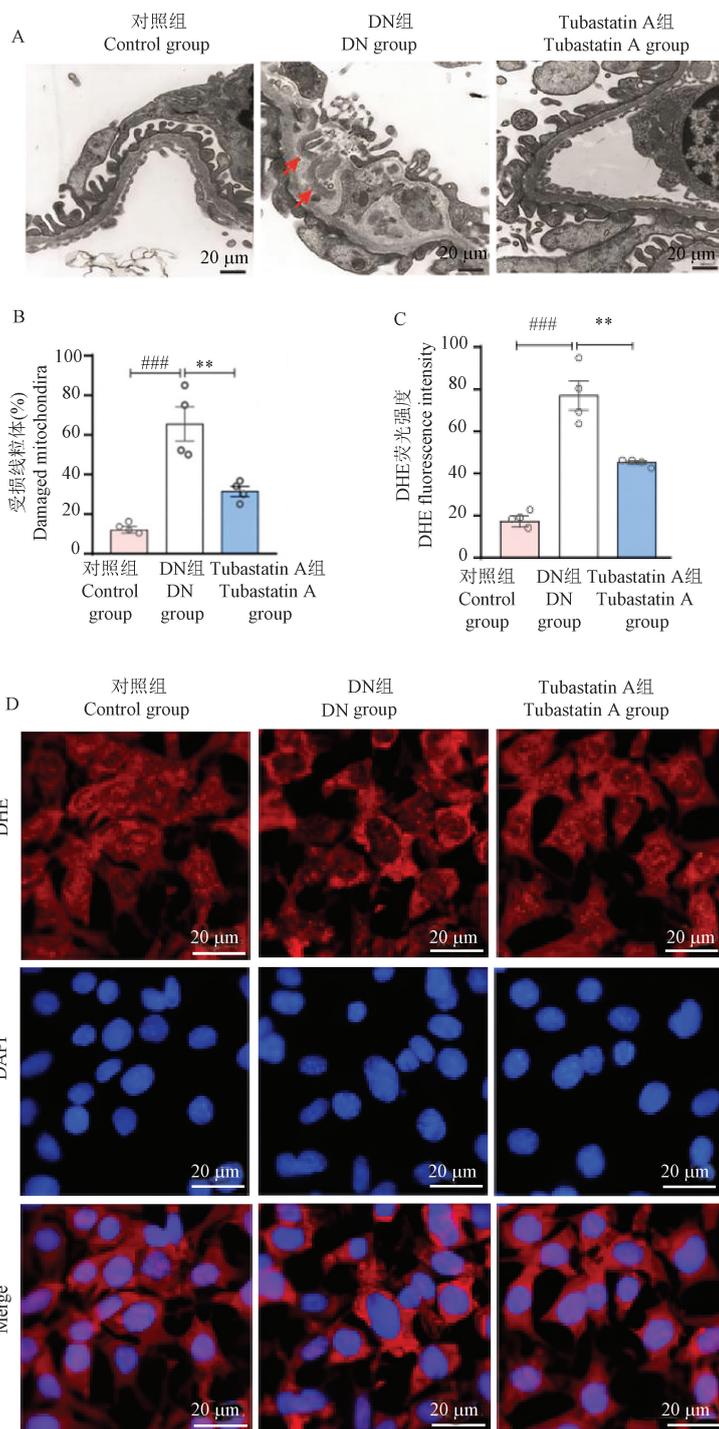
图 3 Tubastatin A 改善 HG 环境下的 mGEC 细胞损伤和 EMT

Note. A/C, Protein blot analysis and optical density quantification of KIM1 and HDAC6 expression. B/D/E, Protein blot analysis and optical density quantification of α -SMA, N-cadherin, vimentin and E-cadherin. Compared with Control+DMSO group, # $P<0.05$. Compared with HG+DMSO group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 3 Tubastatin A ameliorates mGEC cell injury and EMT in HG environment

节在 EMT 过程和线粒体受损中的作用。在 mGEC 细胞中, Tubastatin A 处理下调了 HG 诱导的 mGEC

细胞中的线粒体 ROS 水平 ($P < 0.01$) (图 5D、5E), 以及减少了细胞凋亡 ($P < 0.05$) (图 5F、5G)。

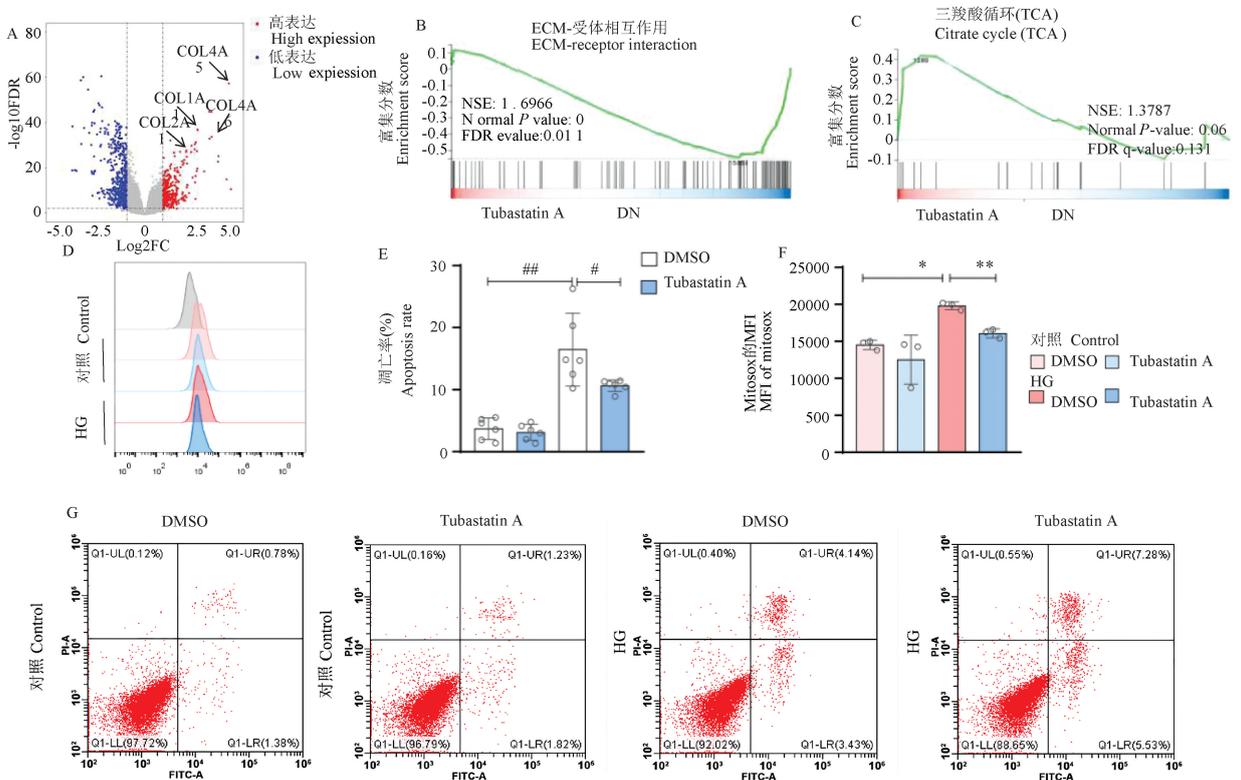


注: A、B: 线粒体形态的 TEM 图像和受损线粒体的统计图 (箭头表示细胞中的畸形线粒体); C、D: DHE 染色的代表性图像和统计图。与 DN 组相比, $** P < 0.01$; 与对照组相比, $### P < 0.001$ 。

图 4 Tubastatin A 改善 HG 诱导线粒体损伤和肾氧化损伤

Note. A/B, TEM images of mitochondrial morphology and statistical plots of damaged mitochondria (arrows indicate aberrant mitochondria in cells). C/D, Representative images and statistical plots of DHE staining. Compared with DN group, $** P < 0.01$. Compared with the control group, $### P < 0.001$.

Figure 4 Tubastatin A improves HG-induced mitochondrial damage and kidney oxidative damage



注:A:对来自 DN 组和 Tubastatin A 组小鼠的肾组织进行 RNAseq 分析(Log₂(倍数变化)与 Log₁₀(P 值)的火山图,图中箭头指示 DE 基因中的 EMT 指标);B、C:与 ECM-受体相互作用和柠檬酸循环相关的失调基因的 GSEA 分析;D、E:mGEC 细胞中 MitoSox 的流式细胞术分析的代表性图和统计图。与 DMSO 组相比, #*P*<0.05, ##*P*<0.01。F、G:mGEC 细胞中凋亡细胞的流式细胞术分析的代表性图和统计图。与 HG+DMSO 组相比, **P*<0.05, ***P*<0.01。

图 5 Tubastatin A 调节 HG 诱导的肾小球内皮细胞损伤和 EMT 进展

Note. A, RNAseq analysis of renal tissues from mice in the DN and Tubastatin A groups (volcano plot of Log₂ (fold change) versus Log₁₀ (P value)). The arrow in the figure indicates the EMT index in DE gene). B/C, Dysregulated genes associated with ECM-receptor interactions and citric acid cycle for GSEA analysis. D/E, Representative plots and statistical plots of flow cytometry analysis of MitoSox in mGEC cells. Compared with DMSO group, #*P*<0.05, ##*P*<0.01. F/G, Representative plots and statistical plots of flow cytometry analysis of apoptotic cells in mGEC cells. Compared with HG+DMSO group, **P*<0.05, ***P*<0.01.

Figure 5 Tubastatin A modulates HG-induced renal glomerular endothelial cell damage and EMT progression

3 讨论

越来越多的研究证实, Tubastatin A 通过抑制 HDAC6 表达在许多疾病中发挥保护作用^[14], 如 Chi 等^[15]报道 Tubastatin A 可有效减轻血管紧张素 II 诱导的高血压; Zheng 等^[16]发现 Tubastatin A 通过改善线粒体功能减轻骨关节炎的进展。近年来, 有学者发现, Tubastatin A 能够阻止了错误折叠的蛋白质聚集在慢性肾病大鼠模型肾小管上皮细胞中的积累, 减轻了蛋白尿的进展, 限制了肾小管细胞的死亡和减少了肾小管间质胶原基质的沉积^[12]。此外, 最近研究证实, Tubastatin A 抑制肾小管上皮细胞-间充质转化及肾间质成纤维细胞活化, 表明其有望成为防治肾间质纤维化的新型药物靶点^[17]。与

先前的研究一致, 本研究确定了 Tubastatin A 对 DN 小鼠肾损伤的保护作用, 提示 HDAC6 在调节 DN 进展中的关键作用。在 HG 条件下, HDAC6 破坏肾小球内皮细胞中的线粒体稳态和诱导了 EMT 发生。我们的数据表明, HDAC6 上调是肾小球内皮细胞损伤和 EMT 的催化剂, 通过 Tubastatin A 抑制 HDAC6 上调, 最终减缓了 DN 的发展。

近年来肾小球损伤在糖尿病肾病发病机制中的重要性得到强调^[18-19]。据报道, 肾小球损伤是 DN 进展的独立预测因子, 并且 EMT 是肾小球损伤的始动因素之一^[20]。我们的数据表明, HDAC6 表达在 DN 小鼠模型的肾组织中显著上调。重要的是, 通过腹腔注射 Tubastatin A 抑制肾组织中 HDAC6 表达显著减弱了 STZ 诱导的糖尿病小鼠的

肾损伤和纤维化,而且还改善了肾功能(即尿蛋白/24 h、血清尿素氮和血清肌酐显著降低)。与体内数据一致,体外结果证实了 Tubastatin A 抑制了 HG 诱导的 mGEC 细胞的 EMT 发生,表明 Tubastatin A 可能通过减轻 EMT 的发生减缓 DNDN 的发展。因此,HDAC6 是 DN 肾小球细胞损伤的关键调节因子。

肾小球内皮细胞富含线粒体以满足高代谢能量需求,因此,它们容易受到线粒体生物能量学紊乱的影响^[21]。肾小球内皮细胞线粒体中 ATP 产生不足与各种肾疾病有关,包括 DN^[22]。越来越多的证据表明,线粒体动力学缺陷和线粒体过度氧化应激是 DN 肾小管损伤的主要原因^[23]。因此,目前正在开发许多新的线粒体靶向策略来治疗肾疾病^[24]。在这项研究中,我们发现 Tubastatin A 显著改善了线粒体形态,同时在 HG 条件下降低了线粒体 ROS 水平。因此,HDAC6 的抑制降低了肾小球内皮细胞的凋亡率。这些数据表明,HDAC6 通过破坏线粒体稳态导致 HG 诱导的肾小球内皮细胞凋亡。先前研究将 HDAC6 确定为参与坏死性凋亡和细胞凋亡的候选分子^[7]。据报道 HDAC6 通过作用于多种信号通路来调节细胞死亡,例如 Rac1 和 p53 通路^[25]。本研究扩展了先前的发现,证明了 HDAC6 破坏线粒体稳态并导致细胞凋亡,突出了 HDAC6 在操纵细胞命运中的多种调节机制。

总之,这项研究表明,Tubastatin A 改善了 HG 诱导的肾小球内皮细胞损伤和 DN 进展,其作用机制与保护线粒体稳态和抑制 EMT 发生相关。这些发现为 DN 的治疗策略提供新的启示。然而,Tubastatin A 通过何种途径调节线粒体稳态和 EMT 有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 刘苏,徐魏龙,查敏,等. miR-296-5p 在糖尿病肾病 db/db 小鼠血浆外泌体中的表达及功能 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2022, 42(1): 14-22.

[2] Wang Y, Niu A, Pan Y, et al. Profile of podocyte transcriptome during development of type 2 and type 1 diabetic nephropathy using podocyte-specific TRAP mRNA RNA-seq [J]. Diabetes, 2021, 70(10): 2377-2390.

[3] Daehn IS, Duffield JS. The glomerular filtration barrier: a structural target for novel kidney therapies [J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(10): 770-788.

[4] Hernández-Cruz EY, Amador-Martínez I, Aranda-Rivera AK, et al. Renal damage induced by cadmium and its possible therapy by mitochondrial transplantation [J]. Chem Biol Interact, 2022, 361: 109961.

[5] Brinkkoetter PT, Bork T, Salou S, et al. Anaerobic glycolysis maintains the glomerular filtration barrier independent of mitochondrial metabolism and dynamics [J]. Cell Rep, 2019, 27(5): 1551-1566.

[6] Liu Q, Cui Y, Ding N, et al. Knockdown of circ_0003928 ameliorates high glucose-induced dysfunction of human tubular epithelial cells through the miR-506-3p/HDAC4 pathway in diabetic nephropathy [J]. Eur J Med Res, 2022, 27(1): 55.

[7] Liang T, Qi C, Lai Y, et al. HDAC6-mediated α -tubulin deacetylation suppresses autophagy and enhances motility of podocytes in diabetic nephropathy [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(19): 11558-11572.

[8] Chen X, Yu C, Hou X, et al. Histone deacetylase 6 inhibition mitigates renal fibrosis by suppressing TGF- β and EGFR signaling pathways in obstructive nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2020, 319(6): F1003-F1014.

[9] Magupalli VG, Negro R, Tian Y, et al. HDAC6 mediates an aggresome-like mechanism for NLRP3 and pyrin inflammasome activation [J]. Science, 2020, 369(6510): eaas8995.

[10] Guo SD, Yan ST, Li W, et al. HDAC6 promotes sepsis development by impairing PHB₁-mediated mitochondrial respiratory chain function [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(6): 5411-5422.

[11] Sharma D, Kumar Tekade R, Kalia K. Kaempferol in ameliorating diabetes-induced fibrosis and renal damage: an *in vitro* and *in vivo* study in diabetic nephropathy mice model [J]. Phytomedicine, 2020, 76: 153235.

[12] Brijmohan AS, Batchu SN, Majumder S, et al. HDAC6 inhibition promotes transcription factor EB activation and is protective in experimental kidney disease [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 34.

[13] Wang Q, Ren D, Li Y, et al. Klotho attenuates diabetic nephropathy in db/db mice and ameliorates high glucose-induced injury of human renal glomerular endothelial cells [J]. Cell Cycle, 2019, 18(6-7): 696-707.

[14] Shen S, Svoboda M, Zhang G, et al. Structural and *in vivo* characterization of tubastatin A, a widely used histone deacetylase 6 inhibitor [J]. ACS Med Chem Lett, 2020, 11(5): 706-712.

[15] Chi Z, Byeon HE, Seo E, et al. Histone deacetylase 6 inhibitor tubastatin A attenuates angiotensin II-induced hypertension by preventing cystathionine γ -lyase protein degradation [J]. Pharmacol Res, 2019, 146: 104281.

[16] Zheng Y, Chen Y, Lu X, et al. Inhibition of histone deacetylase 6 by tubastatin A attenuates the progress of osteoarthritis via improving mitochondrial function [J]. Am J Pathol, 2020, 190(12): 2376-2386.

[17] 施映枫,周瑀,马晓燕,等. 组蛋白去乙酰化酶 6 在肾小管上皮细胞-间充质转化及成纤维细胞活化中的作用 [J]. 中华肾病杂志, 2021, 37(11): 911-917.

[18] 查淑娟,晏继喜. 己酮可可碱对间充质干细胞修复糖尿病肾病小鼠肾小球内皮细胞损伤的促进作用 [J]. 医药导报, 2020, 39(9): 1192-1198.

- [19] Tung CW, Hsu YC, Shih YH, et al. Glomerular mesangial cell and podocyte injuries in diabetic nephropathy [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2018, 23(Suppl 4): 32-37.
- [20] 聂广燕, 孙连芹, 钱军, 等. 肾小球补体 C1q 及 C3c 沉积与糖尿病肾病进展的相关性分析 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2020, 12(12): 999-1005.
- [21] Bhatia D, Capili A, Choi ME. Mitochondrial dysfunction in kidney injury, inflammation, and disease: potential therapeutic approaches [J]. *Kidney Res Clin Pract*, 2020, 39(3): 244-258.
- [22] Tan SM, Ziemann M, Thallas-Bonke V, et al. Complement C5a induces renal injury in diabetic kidney disease by disrupting mitochondrial metabolic agility [J]. *Diabetes*, 2020, 69(1): 83-98.
- [23] Wei PZ, Szeto CC. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease [J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 496: 108-116.
- [24] Dai W, Lu H, Chen Y, et al. The loss of mitochondrial quality control in diabetic kidney disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 706832.
- [25] Pham TQ, Robinson K, Xu L, et al. HDAC6 promotes growth, migration/invasion, and self-renewal of rhabdomyosarcoma [J]. *Oncogene*, 2021, 40(3): 578-591.

[收稿日期]2022-09-23

(上接第 14 页)

- [11] Ranganathan P, McLeod HL. Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(5): 1366-1377.
- [12] 刘霞, 郭俊峰, 蒋德梅, 等. 穴位埋线联合东莨菪碱治疗对吗啡依赖大鼠十二指肠表达 5-羟色胺的影响 [J]. *实验动物科学*, 2016, 33(5): 43-47, 51.
- [13] Chen T, Zhang WW, Chu YX, et al. Acupuncture for pain management: molecular mechanisms of action [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(4): 793-811.
- [14] 梁龙, 杨克新, 周帅琪, 等. 穴位埋线治疗神经根型颈椎病系统评价 [J]. *中医药导报*, 2020, 26(12): 133-138.
- [15] 李小兰, 赵会娟, 杜燕. 穴位埋线联合西药对活动期类风湿关节炎患者的治疗作用探讨 [J]. *饮食保健*, 2019, 6(52): 91.
- [16] Wang Y, Li Z, Zhang Z, et al. Identification ACTA2 and KDR as key proteins for prognosis of PD-1/PD-L1 blockade therapy in melanoma [J]. *Animal Model Exp Med*, 2021, 4(2): 138-150.
- [17] Youngblood B, Oestreich KJ, Ha SJ, et al. Chronic virus infection enforces demethylation of the locus that encodes PD-1 in antigen-specific CD8⁺ T cells [J]. *Immunity*, 2011, 35(3): 400-412.
- [18] Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, et al. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma [J]. *Blood*, 2008, 111(6): 3220-3224.
- [19] Curti BD, Kovacsics-Bankowski M, Morris N, et al. OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(24): 7189-7198.
- [20] Buchan SL, Rogel A, Al-Shamkhani A. The immunobiology of CD27 and OX40 and their potential as targets for cancer immunotherapy [J]. *Blood*, 2018, 131(1): 39-48.
- [21] Zamani MR, Aslani S, Salmaninejad A, et al. PD-1/PD-L and autoimmunity: a growing relationship [J]. *Cell Immunol*, 2016, 310: 27-41.
- [22] Messenheimer DJ, Jensen SM, Afentoulis ME, et al. Timing of PD-1 blockade is critical to effective combination immunotherapy with Anti-OX40 [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(20): 6165-6177.
- [23] Ma Y, Li J, Wang H, et al. Combination of PD-1 inhibitor and OX40 agonist induces tumor rejection and immune memory in mouse models of pancreatic cancer [J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(1): 306-319.

[收稿日期]2022-12-12