

[文章编号] 1000-4718(2019)04-0698-05

# 特异性小干扰 RNA 沉默 *CHOP* 对肾小管上皮细胞凋亡的影响\*

祝高红<sup>△</sup>, 王筱雯, 戚畅, 栾江威

(华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院肾病内科, 湖北 武汉 430010)

**[摘要]** **目的:** 研究 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 对肾小管上皮 HK2 细胞凋亡的影响。**方法:** 采用 qPCR 法检测急性肾损伤患者及健康对照者血清中 CHOP 的 mRNA 水平。体外培养肾小管上皮 HK2 细胞, 随机分为对照组、阴性组和 si-CHOP 组, si-CHOP 组和阴性组分别转染 *CHOP* 小干扰 RNA (siRNA) 和阴性对照 siRNA, 通过转化生长因子  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) 诱导细胞损伤。MTT 法检测细胞的活力, 流式细胞术检测细胞的凋亡率, Western blot 检测细胞中细胞核抗原 Ki-67、增殖细胞核抗原 (PCNA)、caspase-3 和 cleaved caspase-3 的蛋白水平。**结果:** 与健康对照者相比, 急性肾损伤患者血清中 CHOP 的表达量显著增加 ( $P < 0.05$ ); 转染 *CHOP* siRNA 显著降低肾小管上皮细胞 HK2 中 CHOP 的水平, 与对照组相比差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。敲减 *CHOP* 的表达显著增加肾小管上皮 HK2 细胞的活力 ( $P < 0.05$ ), 降低其凋亡率 ( $P < 0.05$ ), 增加 Ki-67 和 PCNA 的表达量 ( $P < 0.05$ ), 下调 cleaved caspase-3 的蛋白水平 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 在急性肾损伤患者血清中 CHOP 的水平增加。敲减 *CHOP* 表达通过调节增殖和凋亡相关蛋白的表达抑制肾小管上皮 HK2 细胞的凋亡。

**[关键词]** 肾小管上皮细胞; 细胞凋亡; C/EBP 同源蛋白; 增殖细胞核抗原**[中图分类号]** R692.9; R363.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.04.019

## Effect of *CHOP* expression knock-down on apoptosis of renal tubular epithelial cells

ZHU Gao-hong, WANG Xiao-wen, QI Chang, LUAN Jiang-wei

(Department of Nephrology, Wuhan Children's Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430010, China. E-mail: 32799310@qq.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To study the effect of C/EBP homologous protein (CHOP) on the apoptosis of renal tubular epithelial HK2 cells. **METHODS:** The serum mRNA levels of CHOP in the patients with acute kidney injury and healthy controls were detected by qPCR. *In vitro*, renal tubular epithelial HK2 cells were divided into control group, negative group (transfected with negative control siRNA), si-CHOP group (transfected with *CHOP* siRNA), and induced by transforming growth factor- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ). The viability of the cells was measured by MTT assay, and the apoptotic rate was analyzed by flow cytometry. The protein levels of nuclear antigen Ki-67, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), caspase-3 and cleaved caspase-3 were determined by Western blot. **RESULTS:** Compared with the healthy controls, the serum mRNA levels of CHOP in the patients with acute kidney injury were increased significantly ( $P < 0.05$ ). Transfection with *CHOP* siRNA significantly decreased the expression of CHOP in the renal tubular epithelial HK2 cells ( $P < 0.05$ ). Knock-down of *CHOP* expression by siRNA significantly increased the viability of renal tubular epithelial HK2 cells ( $P < 0.05$ ), decreased the apoptotic rate ( $P < 0.05$ ), increased the expression of Ki-67 and PCNA ( $P < 0.05$ ), and down-regulated the protein level of cleaved caspase-3 ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** The serum mRNA levels of CHOP were increased in the patients with acute kidney injury. Knock-down of *CHOP* expression inhibits the apoptosis of renal tubular epithelial cells by regulating the expression of proliferation- and apoptosis-related proteins.

**[KEY WORDS]** Renal tubular epithelial cells; Apoptosis; C/EBP homologous protein; Proliferating cell nuclear antigen

[收稿日期] 2018-09-12 [修回日期] 2018-10-23

\* [基金项目] 武汉市卫生计生委科研计划资助项目 (No. WZ18Q03)

<sup>△</sup>通讯作者 Tel: 15927637211; E-mail: 32799310@qq.com

急性肾损伤是一种严重危害人类健康的临床危重症,可导致机体多种器官发生损伤<sup>[1-2]</sup>。近年来临床治疗和研究急性肾损伤的技术在不断提高,但仍然无法解决急性肾损伤患者住院周期长、耗费医疗资源多及预后差等问题,给社会和家庭带来严重的经济负担。目前,研究表明肾小管上皮细胞凋亡率的增加、氧化应激、炎症以及内质网应激等异常在急性肾损伤的发生、发展中起作用<sup>[3-6]</sup>。

C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP) 是内质网应激相关蛋白。在细胞的凋亡过程中,内质网应激活化 CHOP, 促进细胞的凋亡。研究表明,肾组织中 CHOP 的表达量异常,促进肾小管上皮细胞凋亡,加重肾损伤程度,提示 CHOP 在肾损伤过程中发挥重要作用<sup>[7-8]</sup>。因此本实验通过小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 特异性敲减 CHOP 的表达量,观察其表达量的变化对体外培养的肾小管上皮 HK2 细胞凋亡的影响。

## 材 料 和 方 法

### 1 一般资料

收集 2014 年~2017 年武汉市儿童医院肾内科 1~10 岁肾损伤患者 103 例以及健康对照 98 例,1 000 ×g 离心收集患者静脉血清,患者或其家属均签署知情同意书,并由武汉市儿童医院医学伦理委员会审批通过。

### 2 实验试剂和仪器

肾小管上皮 HK2 细胞购自中科院上海细胞库。胎牛血清和 DMEM 培养基购自 Gibco;青-链霉素、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA)、MTT 试剂盒和转化生长因子 β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1) 购自 Sigma;增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒购自上海普飞生物公司;细胞凋亡检测试剂盒购自江苏碧云天生物有限公司;TRIzol 购自 Invitrogen;荧光定量 PCR 试剂盒购自赛默飞世尔公司;Lipofectamine 2000 购自杭州吉诺生物有限公司;siRNA 购自上海吉玛生物公司;抗 CHOP 抗体和抗 GAPDH 抗体购自北京博奥森生物有限公司;抗细胞核抗原 Ki-67 抗体、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 抗体、caspase-3 抗体及 cleaved caspase-3 抗体购自 Cellular Signaling Technology。PCR 扩增仪购自 BIO-RAD;酶标仪购自赛默飞世尔公司。

### 3 方法

**3.1 qPCR 实验** 根据 TRIzol 试剂说明书提取血清

或细胞中总 RNA,反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应。上海生工合成 CHOP 引物,CHOP 的上游引物序列为 5'-AGTCTCTGCCTTTCGCCTTT-3',下游引物序列为 5'-GGTGCTTGTGACCTCTGCT-3'。反应条件为:95 °C 5 min;95 °C 15 s、60 °C 30 s、72 °C 30 s,40 cycles。以 GAPDH 为内参照,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算 CHOP mRNA 的相对表达量。

**3.2 细胞的培养和处理** 肾小管上皮细胞 HK2 培养于含 10% 胎牛血清和 1% 的青-链霉素的 DMEM 培养基,放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中,当细胞浓度达到 80% 左右,加入胰酶进行消化、传代。选取生长状态良好的细胞,加入 TGF-β1 (5 μg/L) 处理细胞,构建肾小管上皮细胞损伤模型<sup>[9]</sup>。

**3.3 Western blot 实验** 提取各组细胞中的总蛋白,BCA 法检测浓度,沸水变性 10 min;吸取 40 μg 总蛋白进行 10% SDS-PAGE。将分离得到的蛋白转移至聚偏氟乙烯膜中,室温下置于 5% 的脱脂奶粉溶液中封闭 30 min;加入 I 抗,4 °C 孵育过夜,TBST 漂洗后加入 II 抗,37 °C 孵育 2 h,TBST 漂洗后加入 ECL 液孵育 5 min,曝光、拍照,Quantity One 分析蛋白质灰度值。

**3.4 细胞的转染** 肾小管上皮 HK2 细胞分为 3 组:对照 (control) 组、阴性 (negative) 组和 si-CHOP 组。对照组为常规培养的细胞,阴性组和 si-CHOP 组分别转染阴性对照 siRNA 和 CHOP siRNA。转染前 24 h,将细胞接种于 6 孔板中培养,待细胞密度达到 90%,根据 Lipofectamine 2000 说明书开始转染,qPCR 和 Western blot 鉴定转染效果。

**3.5 MTT 法检测细胞活力** 将各组肾小管上皮 HK2 细胞的密度调整 5 × 10<sup>3</sup> 个,接种于 96 孔板上,培养 48 h 后,加入 20 μL MTT 溶液,37 °C 孵育 4 h,加入 200 μL DMSO,酶标仪中检测细胞在 570 nm 的吸光度 (A)。

**3.6 流式细胞术检测细胞的凋亡情况** 调整肾小管上皮 HK2 细胞密度为 1 × 10<sup>6</sup>/L,培养 24 h 后,每孔加入 10 μL 膜联蛋白 V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶,避光,4 °C 染色 15 min,流式细胞术分析细胞的凋亡率。

### 4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计处理。实验重复 3 次,实验结果以均数 ± 标准差表示 (mean ± SD)。两组间数据的比较采用 *t* 检验,多组数据间的比较采用单因素方差分析,组间多重比较使用 SNK-*q* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 CHOP mRNA 在肾损伤患者血清中的水平

qPCR 检测健康对照和肾损伤患者血清中 CHOP 的 mRNA 水平,结果显示肾损伤患者血清中 CHOP 的 mRNA 水平明显高于健康对照者 ( $P < 0.05$ ),见图 1。

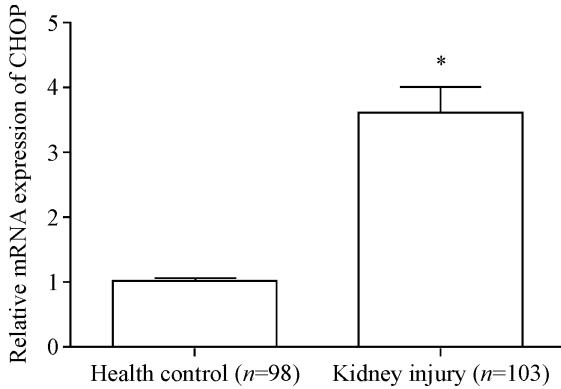


Figure 1. The mRNA levels of CHOP were detected by qPCR. Mean  $\pm$  SD. \*  $P < 0.05$  vs health control.

图 1 qPCR 检测 CHOP 的 mRNA 水平

### 2 敲减 CHOP 表达对肾小管上皮 HK2 细胞中 CHOP 表达量的影响

肾小管上皮 HK2 细胞转染 CHOP siRNA 后, CHOP 的 mRNA 表达量较对照组显著降低 ( $P < 0.05$ ),见图 2。

### 3 敲减 CHOP 表达对肾小管上皮 HK2 细胞活力的影响

敲减 CHOP 表达后,肾小管上皮 HK2 细胞的活力较对照组显著增强 ( $P < 0.05$ ),见图 3。

### 4 敲减 CHOP 表达对肾小管上皮细胞 HK2 凋亡的影响

敲减 CHOP 表达后,肾小管上皮 HK2 细胞的凋亡率较对照组显著降低 ( $P < 0.05$ ),见图 4。

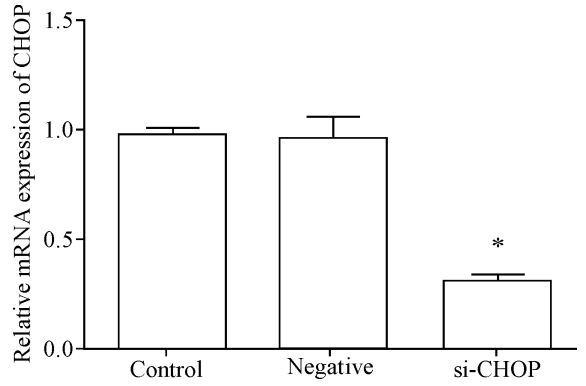


Figure 2. The mRNA expression of CHOP was detected by qPCR after transfection. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group.

图 2 qPCR 检测转染后 CHOP 的 mRNA 表达量

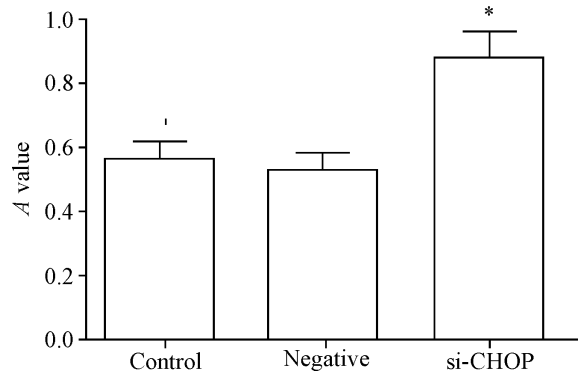


Figure 3. The effect of CHOP expression knock-down on the viability of renal tubular epithelial HK2 cells. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group.

图 3 敲减 CHOP 表达对肾小管上皮 HK2 细胞活力的影响

### 5 敲减 CHOP 表达对增殖和凋亡相关蛋白水平的影响

与对照组相比,敲减 CHOP 表达显著增加肾小管上皮 HK2 细胞中 Ki-67 和 PCNA 的蛋白水平,降低 cleaved caspase-3 的蛋白水平 ( $P < 0.05$ ),但对 caspase-3 蛋白水平无显著影响,见图 5。

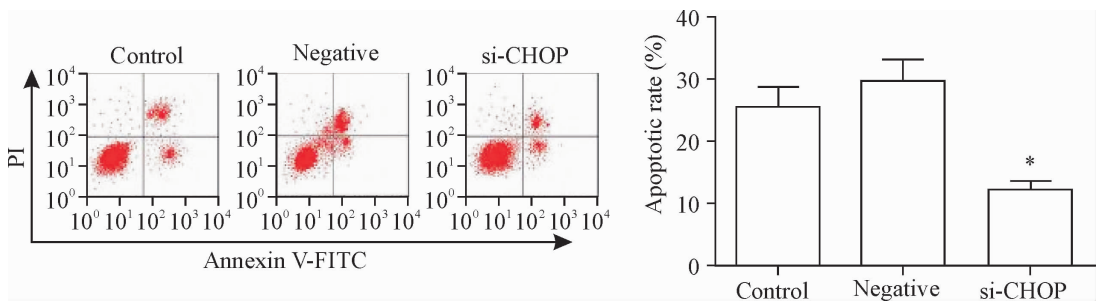


Figure 4. The effect of CHOP expression knock-down on the apoptosis of renal tubular epithelial HK2 cells. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group.

图 4 敲减 CHOP 表达对肾小管上皮 HK2 细胞凋亡的影响

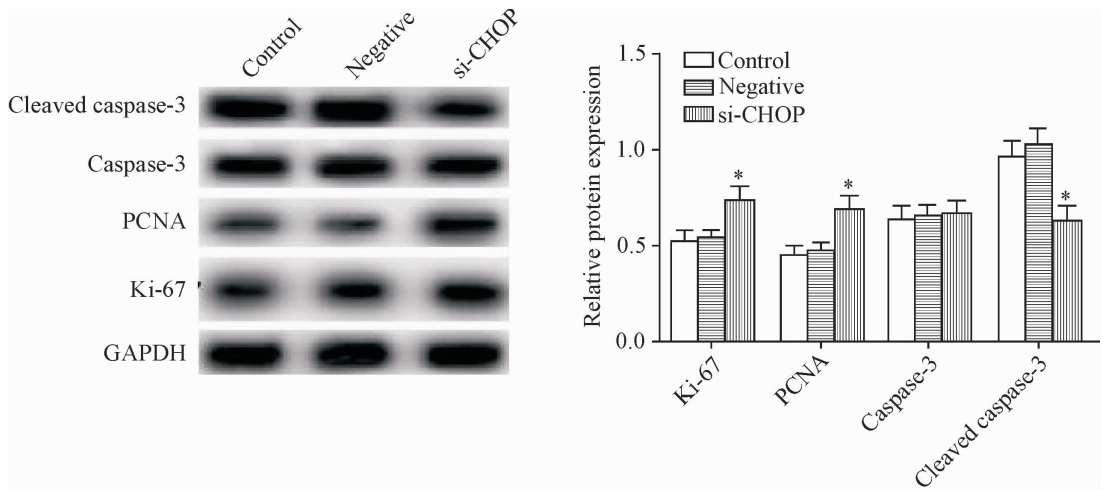


Figure 5. The effect of *CHOP* expression knock-down on the expression levels of proliferation- and apoptosis-related proteins. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group.

图5 敲减 *CHOP* 表达对增殖和凋亡相关蛋白水平的影响

## 讨 论

急性肾损伤是一种发病率较高的临床危重症,受多种因素的影响导致肾功能低下,伴有少尿或无尿的症状,其死亡率较高。内质网应激在急性肾损伤发病机制中起重要作用,并在急性肾损伤的预防、诊断和治疗过程中发挥重要的作用,有望成为治疗急性肾损伤的新靶点,具有重要的应用前景<sup>[10-11]</sup>。因此研究急性肾损伤的分子机制、寻找治疗急性肾损伤的新靶点,有助于提高其治疗手段,降低急性肾损伤的死亡率以及提高其预后,对早期诊断、治疗急性肾损伤具有重要意义。*CHOP* 是内质网应激中的重要转录因子,在哺乳动物细胞中广泛表达。机体在正常状态下,*CHOP* 在细胞浆中少量表达,当病理状态下,发生内质网应激促进 *CHOP* 的表达量,调控基因的表达。研究发现,在穿心莲内脂诱导的肾小管上皮 HK2 细胞凋亡增加的过程中,降低 *CHOP* 表达量显著抑制细胞的凋亡<sup>[12]</sup>。醛固酮可导致肾小管上皮细胞凋亡率升高,加重肾损伤过程,siRNA 特异性降低 *CHOP* 表达量可逆转醛固酮的肾损伤作用<sup>[13]</sup>,表明 *CHOP* 在肾损伤导致的肾小管上皮细胞凋亡的过程中发挥重要作用。在本实验中,肾损伤患者的血清中 *CHOP* 表达量显著高于健康对照组,表明 *CHOP* 的表达量调节肾损伤的发生、发展过程。

细胞的增殖以及凋亡的动态平衡对机体器官和组织正常生长、发育具有十分重要的作用。Ki-67、PCNA 及 caspase-3 对细胞的增殖和凋亡具有重要意义。Ki-67 位于 10q2.5 染色体上,是检测肿瘤细胞

增殖活性的重要标志物,目前已经应用于多种肿瘤的早期诊断和预防过程中<sup>[14-16]</sup>。PCNA 在正常细胞以及病理状态下的细胞中均有表达,是检测细胞异常增殖的关键蛋白。Caspase-3 是细胞凋亡信号通路 caspase 家族的枢纽蛋白,当细胞凋亡信号通路被激活,可诱导产生酶级联反应,激活 caspase-3 蛋白的活化,从而诱导细胞的凋亡。本研究结果显示,给予 TGF- $\beta$ 1 构建的肾小管上皮 HK2 细胞损伤模型中,细胞中 *CHOP* 的表达量增加,细胞活力降低,凋亡率显著升高;转染 *CHOP* siRNA 显著降低肾小管上皮 HK2 细胞中 *CHOP* 的表达量;特异性敲减 *CHOP* 的表达量显著增加肾小管上皮 HK2 细胞的活力,抑制其凋亡,增加 Ki-67 和 PCNA 蛋白的表达,下调 cleaved caspase-3 的蛋白水平。

综上所述,敲减 *CHOP* 的表达量可通过调节增殖和凋亡相关蛋白水平抑制肾小管上皮 HK2 细胞的凋亡,增强细胞的活力。本研究为急性肾损伤的分子诊断和治疗提供了潜在的靶点。

## 【参 考 文 献】

- [1] Ali BH, Al-Salam S, Al Za'abi M, et al. Renoprotective effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid on cisplatin-induced acute renal injury in rats [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2015, 116(1):62-68.
- [2] Baptista Sincos APW, Mazzeo A, Sincos IR, et al. Duplex scan and histologic assessment of acute renal injury in a kidney-kidney crosstalk swine experimental model [J]. J Vasc Surg, 2018, 68(2):588-595.
- [3] Sancho-Martínez SM, López-Novoa JM, López-Hernández

- FJ. Pathophysiological role of different tubular epithelial cell death modes in acute kidney injury[J]. *Clin Kidney J*, 2015, 8(5):548-559.
- [4] Ahmad A, Olah G, Szczesny B, et al. AP39, a mitochondrially-targeted hydrogen sulfide donor, exerts protective effects in renal epithelial cells subjected to oxidative stress *in vitro* and in acute renal injury *in vivo* [J]. *Shock*, 2016, 45(1):88-97.
- [5] Huang J, Wan D, Li J, et al. Histone acetyltransferase PCAF regulates inflammatory molecules in the development of renal injury[J]. *Epigenetics*, 2015, 10(1):62-72.
- [6] 刘杰, 朱凯, 杨定平. 内质网应激在急性肾损伤中的研究进展[J]. *临床肾脏病杂志*, 2017, 17(9): 516-520.
- [7] Ding X, Ma M, Teng J, et al. Numb protects human renal tubular epithelial cells from bovine serum albumin-induced apoptosis through antagonizing CHOP/PERK pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(1):163-171.
- [8] Noh MR, Kim JI, Han SJ, et al. C/EBP homologous protein (*CHOP*) gene deficiency attenuates renal ischemia/reperfusion injury in mice [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(9):1895-1901.
- [9] 闫燕, 王利华. miR-29a 对肾小管上皮细胞凋亡的影响及其机制研究[J]. *中国医师杂志*, 2018, 20(2): 195-199.
- [10] Taniguchi M, Yoshida H. Endoplasmic reticulum stress in kidney function and disease[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertension*, 2015, 24(4):345-350.
- [11] Sun Y, Peng PA, Ma Y, et al. Valsartan protects against contrast-induced acute kidney injury in rats by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2017, 15(2):174-183.
- [12] Gu LL, Zhang XY, Xing WM, et al. Andrographolide-induced apoptosis in human renal tubular epithelial cells: Roles of endoplasmic reticulum stress and inflammatory response[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 45(7): 257-264.
- [13] Ding W, Yang L, Zhang M, et al. Reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress contributes to aldosterone-induced apoptosis in tubular epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 418(3): 451-456.
- [14] Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, et al. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64, 196 patients [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 153(3):477-491.
- [15] Hoster E, Rosenwald A, Berger F, et al. Prognostic value of Ki-67 index, cytology, and growth pattern in mantle-cell lymphoma: results from randomized trials of the European mantle cell lymphoma network [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(12):1386-1394.
- [16] Regan MM, Pagani O, Francis PA, et al. Predictive value and clinical utility of centrally assessed ER, PgR, and Ki-67 to select adjuvant endocrine therapy for premenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-negative early breast cancer: TEXT and SOFT trials [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 154(2):275-286.

(责任编辑: 林白霜, 罗森)