

C/EBP β 介导 *NPHP1* 敲低的肾小管上皮细胞 TNF- α 通路下游炎症因子的表达

黄丹梅, 刘雅清, 李丹彤, 张静兰, 杨翌晨, 孙良忠
南方医科大学南方医院儿科, 广东 广州 510515

摘要:目的 探讨 *NPHP1* 基因缺陷肾小管上皮细胞 TNF- α 信号通路激活及其调控的炎症因子表达。方法 使用重组慢病毒 LV-*NPHP1*-RNAi 构建敲低 *NPHP1* 表达的人近端肾小管细胞株(HK2)细胞(*NPHP1*^{KD} HK2)。通过实时荧光定量 PCR、Western blot、酶联免疫吸附实验法检测各细胞株 TNF- α 表达、p38 和 C/EBP β 激活状态及其调控炎症因子 CXCL5、CCL20、IL-1 β 、IL-6、MCP-1 等表达情况。通过构建 siRNA 敲低野生型和 *NPHP1*^{KD} HK2 细胞 C/EBP β 表达, 观察上述指标变化。结果 敲低 *NPHP1* 表达后, *NPHP1*^{KD} HK2 细胞 TNF- α 、C/EBP β 、CXCL5、IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 表达量增加 ($P < 0.05$); Western blotting 结果显示, phospho-p38、C/EBP β 表达上调 ($P < 0.05$); 培养液上清 IL-6 水平增加 ($P < 0.05$)。使用 siRNA 敲低 C/EBP β 表达后, *NPHP1*^{KD} HK2 细胞 CSF2、CCL20、IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 表达水平下调 ($P < 0.05$); Western blot 显示 phospho-p38 表达下调 ($P < 0.05$); 培养液上清 IL-6 水平下降 ($P < 0.001$)。结论 *NPHP1* 基因缺陷的 *NPHP1*^{KD} HK2 细胞中 TNF- α 信号通路被激活, 其调控的下游印证因子表达上调。C/EBP β 可能是介导 *NPHP1*^{KD} HK2 细胞 TNF- α 信号通路相关炎症因子表达的关键转录因子。

关键词: 肾单位肾痹; TNF- α ; C/EBP β ; 炎症因子; *NPHP1*

C/EBP β mediates expressions of downstream inflammatory factors of the tumor necrosis factor- α signaling pathway in renal tubular epithelial cells with *NPHP1* knockdown

HUANG Danmei, LIU Yaqing, LI Dantong, ZHANG Jinglan, YANG Yichen, SUN Liangzhong
Department of Pediatrics, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To explore the activation of tumor necrosis factor- α (TNF- α) signaling pathway and the expressions of the associated inflammatory factors in *NPHP1*-defective renal tubular epithelial cells. **Methods** A human proximal renal tubular cell (HK2) model of lentivirus-mediated *NPHP1* knockdown (*NPHP1*^{KD}) was constructed, and the expressions of TNF- α , p38, and C/EBP β and the inflammatory factors CXCL5, CCL20, IL-1 β , IL-6 and MCP-1 were detected using RT-qPCR, Western blotting or enzyme-linked immunosorbent assay. A small interfering RNA (siRNA) was transfected in wild-type and *NPHP1*^{KD}HK2 cells, and the changes in the expressions of TNF- α , p38, and C/EBP β and the inflammatory factors were examined. **Results** *NPHP1*^{KD}HK2 cells showed significantly increased mRNA expressions of TNF- α , C/EBP β , CXCL5, IL-1 β , and IL-6 ($P < 0.05$), protein expressions of phospho-p38 and C/EBP β ($P < 0.05$), and IL-6 level in the culture supernatant ($P < 0.05$), and these changes were significantly blocked by transfection of cells with siRNA-C/EBP β ($P < 0.05$). **Conclusion** TNF- α signaling pathway is activated and its associated inflammatory factors are upregulated in *NPHP1*^{KD}HK2 cells, and C/EBP β may serve as a key transcription factor to mediate these changes.

Keywords: nephronophthisis; tumor necrosis factor- α ; C/EBP β ; inflammatory factor; *NPHP1*

肾单位肾痹(NPH)是一种常染色体隐性遗传性慢性间质性囊性肾病,是导致儿童及青少年肾衰竭最主要的遗传性疾病,占儿童肾衰竭患者的5%~15%^[1,2]。根据患者进入终末期肾病的平均年龄不同,将NPH分为婴儿型(肾衰竭平均年龄为1岁)、少年型(平均13岁)、青年型(平均19岁)和成人型迟发型^[3]。临床上以少年型最常见。研究发现NPH也是成人肾衰竭的重要病因^[4]。NPH特征性肾脏病理改变为皮髓质交界处肾小管扩张和肾囊肿形成,肾小管基底膜增厚分层撕裂,弥漫肾间

质纤维化和炎症细胞浸润^[5]。NPH的肾间质纤维化和炎症出现在疾病的早期,其机制尚不清楚。

NPH致病基因目前已发现26种,其中*NPHP1*突变最常见,约占NPH病例的20%^[6]。NPH致病基因编码蛋白大多数位于初级纤毛过渡区、inversin隔室及内转运(IFT)复合体亚基上^[7],与初级纤毛的结构和功能有关^[8]。纤毛主要分为动力纤毛和非动力纤毛。非动力纤毛,即初级纤毛,广泛分布于除淋巴细胞以外的各种静止细胞,主要感受细胞外信号,通过不同的细胞内信号途径调节组织细胞和器官的发育、分化和成熟^[9]。初级纤毛结构和功能缺陷导致的疾病称为(初级)纤毛病。目前已发现多种初级纤毛相关的信号通路,如Wnt通路、Hedgehog通路、DNA损伤反应(DDR)通路、Hippo通路、cAMP通路和mTOR通路等^[10]。目前研究认为这些信号通路可能参与介导初级纤毛病的发生发展,但具体

收稿日期:2023-08-28

基金项目:广东省自然科学基金(2022A1515012307;2020A1515010286);北京白求恩公益基金会(SCE093DS);南方医科大学南方医院院长基金青年项目(2020C021)

作者简介:黄丹梅,在读硕士研究生,E-mail: hdm_03@126.com

通信作者:孙良忠,主任医师,博士生导师,E-mail: sunlzh2018@smu.edu.cn

机制不详。

课题组前期研究发现, *NPHP1* 敲低的犬远曲小管上皮细胞, 以及 *NPHP1* 和 *NPHP5* 缺陷患者尿液上皮细胞转录组测序结果均显示肿瘤坏死因子(TNF- α)信号通路相关信号因子被激活, TRAF2/5、C/EBP β 、IL-1 β 和IL-6等表达上调。TNF- α 信号通路是调节免疫和炎症的关键信号通路之一。为探究 TNF- α 信号通路在 *NPHP1* 缺陷肾小管上皮细胞的激活情况及其在 NPH 发病中可能的作用, 本研究通过体外敲低人近端肾小管上皮细胞株 HK2 细胞 *NPHP1* 表达 (*NPHP1*^{KO}HK2 细胞), 观察 TNF 信号通路的激活情况。结果显示, 敲低 *NPHP1* 表达后, HK2 细胞 TNF 及其调控的验证因子表达升高, 调控相关炎症因子表达的转录因子 C/EBP β 表达升高, 提示 TNF 信号通路调控的炎症因子可能参与介导 NPH 疾病的发生发展。

1 材料和方法

1.1 细胞株与试剂来源

野生型人肾近曲小管上皮细胞株(HK2细胞)由南方医院肾内科聂静教授课题组惠赠。主要试剂: 细胞/组织总RNA提取试剂盒、HiScript II 逆转录试剂盒、高灵敏性染料法定量PCR检测试剂盒(南京诺唯赞生物

科技股份有限公司), 胎牛血清(Sigma), DMEM/F12、DMEM basic(Gibco), 0.25%胰蛋白酶-EDTA(Gibco), 10⁴/mL 青-链霉素(Gibco), 嘌呤霉素(Sigma), 1 \times 磷酸盐缓冲液(1 \times PBS, 0.0067 mol/L)(Gibco), 转铁蛋白、重组人胰岛素(细胞培养级别)(北京索莱宝科技有限公司), GP-transfect-Mate(苏州吉玛基因股份有限公司), 兔抗 *NPHP1* 多克隆抗体(Sigma), 兔抗 β -tubulin 单克隆抗体(沈阳万类生物科技有限公司), 兔抗CEBP beta 单克隆抗体(上海Abcam), 兔抗p38 MAPK、phospho-p38 单克隆抗体(上海艾比玛特医药科技有限公司), 山羊抗兔 IgG(H+L)-HRP 辣根过氧化物酶标记(杭州弗德生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 体外人源 *NPHP1* 稳定低表达 HK2 细胞模型构建 构建敲低 *NPHP1* 基因表达的慢病毒短发夹 RNA(LV-*NPHP1*-RNAi, 干扰序列见表1, 上海吉凯基因公司), 转染 HK2 细胞, 构建体外人源 *NPHP1* 稳定低表达细胞 HK2 模型。按照说明书选择最佳实验条件, 设计复感染指数梯度, 并使用配套的 HiTransG A 感染增强液进行转染。按照嘌呤霉素工作浓度梯度, 筛选加药培养 48 h 全部细胞死亡的最低浓度。

表1 干扰序列

Tab.1 Interference sequence

Number	Accession NO.	Target Seq	GC
<i>NPHP1</i> -RNAi (106032-1)	NM_207181	ccAAGTCGTATTTCATTGATT	26.32%
Description	Homo sapiens nephrocystin 1 (<i>NPHP1</i>), transcript variant 2, mRNA		

1.2.2 敲低 C/EBP β 表达的小干扰 RNA(siRNA) 的构建与转染 siRNA-C/EBP β 及阴性对照由北京擎科生物公司合成, 干扰序列见表2。转染试剂 GP-transfect-Mate, 由苏州吉玛基因公司提供, 实验过程严格按照说明书进行。

1.2.3 细胞培养与实验分组 所有细胞放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。HK2 细胞培养使用 DMEM basic+10%FBS+1%双抗。 *NPHP1*^{KO}HK2 细胞

培养使用完全培养基: 10%FBS+1%双抗+0.02%嘌呤霉素+88.98% DMEM basic。细胞分6组: 野生型(WT)、野生敲低型(WT+siRNA-C/EBP β)、野生空载型(WT+siRNA-nc)、 *NPHP1* 敲低型(KD)、 *NPHP1* 敲低并 C/EBP β 敲低型(KD+siRNA-C/EBP β)、敲低空载型(KD+siRNA-nc)。

1.2.4 细胞免疫荧光 使用24孔细胞培养板制作细胞爬片, 经过洗涤、固定、通透、封闭后, 一抗室温封闭1h, 荧光二抗封闭1h, 滴加含 DAPI 的封片剂, 于荧光显微镜下观察并拍摄, imageJ 进行荧光定量。

1.2.5 实时荧光定量PCR qPCR 引物由深圳华大基因合成, 序列见表3。通过细胞/组织总RNA提取试剂盒提取细胞总RNA, HiScript II 逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA, 高灵敏性染料法定量PCR检测试剂盒配置 qPCR 反应液, 以上试剂盒都由南京诺唯赞生物科技有限公司提供, 具体实验步骤严格按照说明书进行。

表2 干扰序列

Tab.2 Interference sequence

Number	Sequence (5' \rightarrow 3')
C/EBP β -RNAi-1	UUCUUUAAAUAACACCACGGG
C/EBP β -RNAi-2	UUCAUGGAUUUAAAGGCAGG
C/EBP β -RNAi-3	AAGAGGUCGGAGAGGAAGUCG
Negative control	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT

表3 qPCR引物序列
Tab.3 Sequences of qPCR primers

Target gene	qPCR primer (5'→3')	Amplification products	GC (%)	Temperatures of anneal
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT (Upstream)	197 bp	52.38	59.86 °C
	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG (Downstream)		47.83	59.38 °C
NPHP1	GCTACAGAAGGCACTATTAGGT (Upstream)	177 bp	45.45	57.33 °C
	TGTGGCTCTGACTGTATGAATG (Downstream)		45.45	58.13 °C
TNF-α	GCTGCACCTTGGAGTGATCG (Upstream)	108 bp	55.55	59.55 °C
	TCACTCGGGTTCGAGAAGA (Downstream)		55.55	60.25 °C
C/EBPβ	GGAGCCCGTCGGTAATTT (Upstream)	76 bp	55.56	57.05 °C
	TCTGCATGTGCGGTTGG (Downstream)		58.82	57.87 °C
CCL2	AGCCAGATGCAATCAATGCC (Upstream)	119 bp	50.00	59.25 °C
	AGCTTCTTTGGGACACTTGCT (Downstream)		47.62	60.13 °C
IL-1β	ACAGTGGCAATGAGGATG (Upstream)	129 bp	50.00	54.54 °C
	TGTAGTGGTGGTCGGAGA (Downstream)		55.56	56.74 °C
IL-6	GTACATCCTCGACGGCATC (Upstream)	98 bp	57.89	57.82 °C
	TCAGGTTGTTTTCTGCCAGT (Downstream)		45.00	57.56 °C
CCL20	GCGAATCAGAAGCAGCAAGC (Upstream)	116b p	55.00	60.52 °C
	GATGTCACAGCCTTCATTGGC (Downstream)		52.38	59.87 °C
CXCL5	CAGACCACGCAAGGAGTTCA (Upstream)	82 bp	55.00	60.25 °C
	CTTCCACCTTGGAGCACTGT (Downstream)		55.00	59.89 °C
P38	GGCAGGAGCTGAACAAGACA (Upstream)	92 bp	55.00	60.25 °C
	AGCACACACAGAGCCATAGG (Downstream)		55.00	59.75 °C
CSF2	GAAACTTCTGTGCAACCC (Upstream)	121 bp	52.63	56.73 °C
	CATCTGGCCGGTCTCACTC (Downstream)		63.16	59.86 °C
AP-1	TCGCTGCCTCAAGTGCCGAAA (Upstream)	134 bp	59.09	67.20 °C
	AAGCTGTGCCACCTGTTCCCT (Downstream)		57.14	64.32 °C
CREB5	AAGACTGCCAATAACAGCC (Upstream)	150 bp	50.00	58.16 °C
	CCACCTCGCTGACCGATG (Downstream)		66.67	60.20 °C

1.2.6 Western blotting 检测 使用RIPA蛋白裂解液(强)和苯甲基磺酰氟PMSF、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,加入蛋白Loading buffer金属浴15 min变性。配置10%SDS-PAGE凝胶,按50 μg/孔的浓度上样,电泳分离蛋白各组分后,电转至PVDF膜上,5%BSA-TBST溶液封闭1 h。4 °C孵育NPHP1(1:1000)、C/EBPβ(1:1000)、p38(1:1000)、phospho-p38(1:1000)一抗过夜(至少8 h)。TBST洗膜10 min,重复3次。加入1:10 000稀释的对应二抗室温孵育1 h。再次TBST洗膜10 min,重复3次。ECL超敏发光显影并拍照。以β-tubulin为内参,使用ImageJ软件分析各条带的平均灰度值。各蛋白的表达水平=各蛋白灰度值/对应内参灰度值。

1.2.7 酶联免疫吸附实验(ELISA) ELISA试剂盒由武汉华美生物工程有限公司提供。细胞培养液上清的提

取在无菌条件下进行,实验全程严格按照试剂盒说明书步骤进行。根据浓度梯度标准品A值拟合曲线,样品孔A值减去本底值即为样品A值,代入曲线方程计算浓度。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism9.0统计学软件分析。计量资料均以均数±标准差表示。两组资料比较采用t检验,多组资料比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建NPHP1低表达HK2细胞模型

结果显示,LV-NPHP1-RNAi(106032-1)转染的NPHP1^{KD}HK2细胞NPHP1的mRNA表达降低74%(图1A),其编码蛋白nephrocystin-1相对灰度值较NPHP1WTHK2细胞低,下降约30%(图1B~C, $P < 0.05$)。

细胞免疫荧光图像显示, *NPHP1* 的荧光显色主要在细胞质至细胞膜的部分。与 *NPHP1*WT HK2 细胞相比,

NPHP1^{KD} HK2 细胞中 TRITC 荧光(红色)表达丰度明显下降(图 1D~E, $P < 0.05$)。

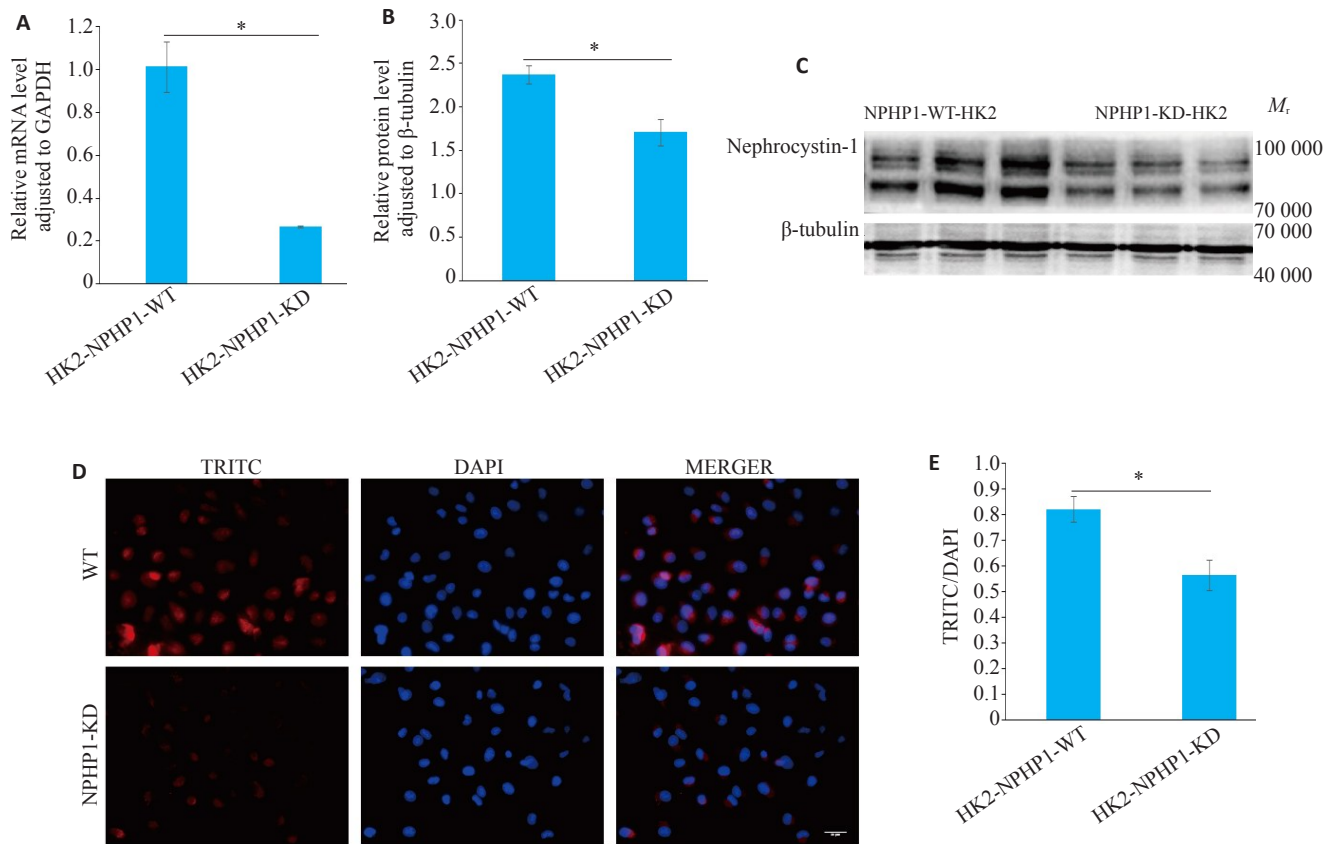


图1 转染LV-*NPHP1*-RNAi后HK2细胞*NPHP1*的表达

Fig.1 Expression of *NPHP1* in HK2 cells after LV-*NPHP1*-RNAi transfection. **A**: Relative *NPHP1* mRNA level. **B**: Relative protein levels of nephrocystin-1 ($n=3$). **C**: Western blotting for detecting nephrocystin-1 expression in *NPHP1*WT HK2 and *NPHP1*^{KD} HK2. **D**: Immunofluorescence staining images of *NPHP1*WT HK2 and *NPHP1*^{KD} HK2 (scale bar=50 μ m). **E**: Quantification of *NPHP1* staining. * $P < 0.05$.

2.2 敲低HK2细胞*NPHP1*表达, TNF- α 及其调控的炎症因子CXCL5、CSF2、IL-1 β 、IL-6表达增加

qRT-PCR结果显示, *NPHP1*^{KD} HK2细胞中TNF- α 、转录因子C/EBP β 及其下游的CXCL5、IL-1 β 和IL-6的mRNA表达上调(图2A~F, $P < 0.05$)。提示*NPHP1*缺陷HK2细胞, TNF- α 信号通路被激活。但TNF- α 相关的炎症因子CCL2、CCL20的mRNA表达下调(图2G、H)。

2.3 C/EBP β 介导*NPHP1*^{KD} HK2细胞TNF信号通路下游炎症因子表达

敲低HK2细胞*NPHP1*表达后, C/EBP β 的mRNA表达上调, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 但AP-1和CREB5的mRNA表达与对照组比, 差异无统计学意义($P > 0.05$, 图3)。转染siRNA-C/EBP β 后, *NPHP1*WT HK2和*NPHP1*^{KD} HK2细胞, C/EBP β 的mRNA表达下降, 蛋白

表达水平明显降低, C/EBP β 的蛋白亚基LAP*和LIP的表达趋势降低较为明显($P < 0.05$, 图4)。

进一步验证敲低C/EBP β 表达, 对*NPHP1*^{KD} HK2细胞TNF信号通路调控炎症因子表达的影响。结果显示, 敲低C/EBP β 表达, *NPHP1*^{KD} HK2细胞CSF2、CCL20、CXCL5、IL-1 β 、IL-6的mRNA表达水平下降, 而CCL2表达上调($P < 0.05$, 图5)。

酶联免疫吸附实验结果显示, 敲低转录因子C/EBP β 表达后, IL-6的分泌显著减少($P < 0.001$); IL-1 β 的分泌也减少, 但因表达量较低, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 另外MCP-1的分泌增加($P < 0.001$)。

2.4 敲低C/EBP β 对TNF- α 信号通路细胞内信号转导因子的影响

分析敲低*NPHP1*以及同时敲低C/EBP β 对p38表

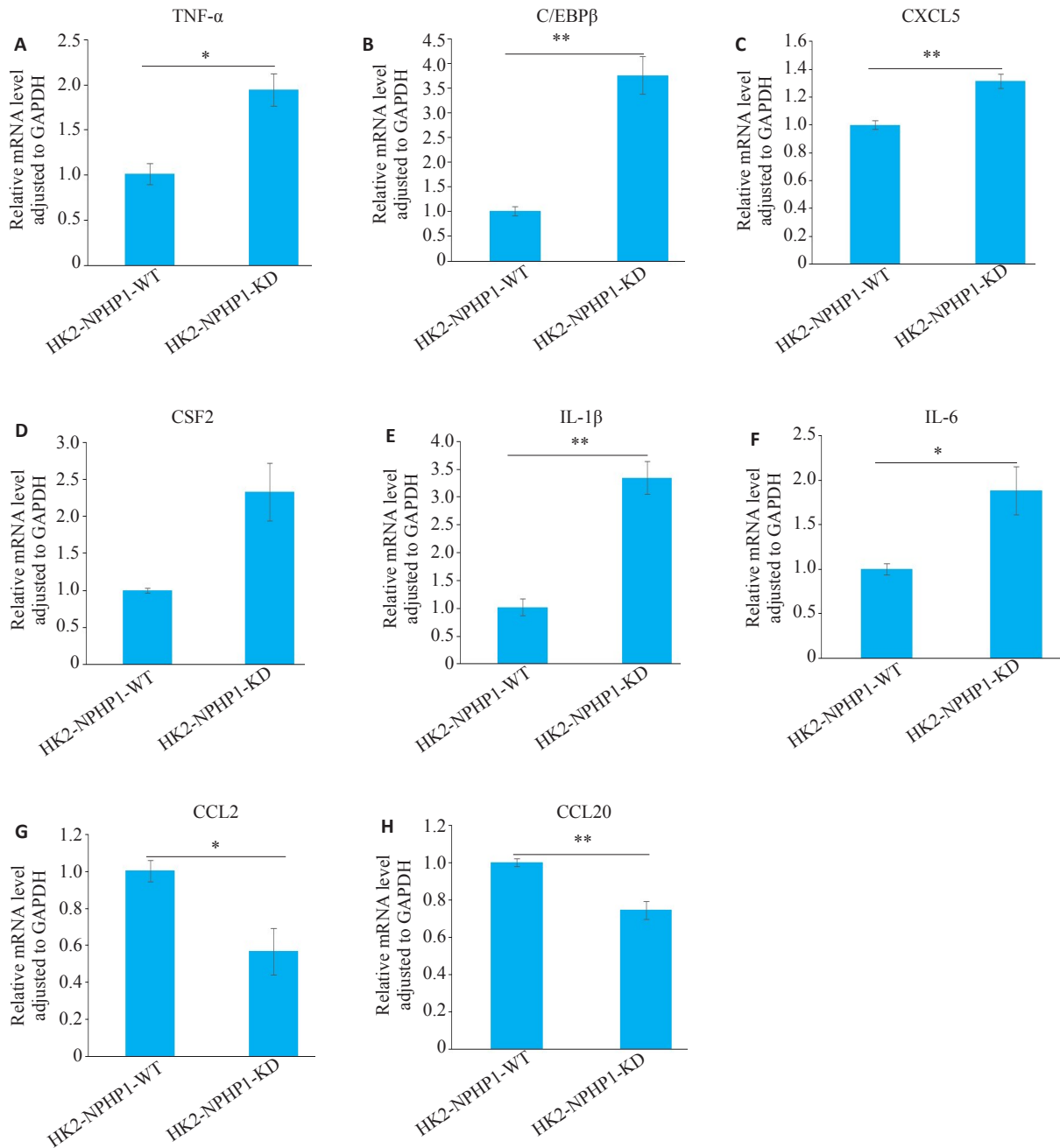


图2 敲低NPHP1表达对TNF-α信号通路的影响

Fig.2 Effect of NPHP1 knockdown on TNF-α signaling pathway in HK2 cells. A-H: Relative mRNA levels normalized to GAPDH. Compared with NPHP1WT HK2 cells, the expression of TNF-α, C/EBPβ, CXCL5, IL-1β and IL-6 was up-regulated, and the expression of CCL2 and CCL20 was down-regulated in NPHP1^{KD} HK2 cells (n=3). *P<0.05; **P<0.01.

达及其活性的影响,结果显示, p38 在各组细胞的 mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义(图 7A~C)。但磷酸化 P38 的水平,在 NPHP1^{KD}HK2 细胞明显升高,同时敲低 C/EBPβ 表达后显著下降(P<0.05,图 7B、D)。

3 讨论

目前已发现 950 余种纤毛相关基因,这些基因的突变可能会导致人类疾病发生,已有超过 35 种人类基因

遗传性病被称为“纤毛病”,与 180 余种已确定的纤毛病相关蛋白有关,这些纤毛病通常以肾脏纤毛病为特征起病,严重影响肾脏发育和生理功能^[12, 13]。纤毛是一种进化保守的细胞器,几乎所有稳定细胞都存在纤毛^[14],这其中包括肾小管细胞。肾脏纤毛病由于纤毛的调节细胞极性功能失调,常常表现为囊肿性肾病。肾单位肾痹是一种属于初级纤毛基因缺陷所导致的遗传病。囊肿形成、间质纤维化和炎症是 NPH 的特征性病理改变,

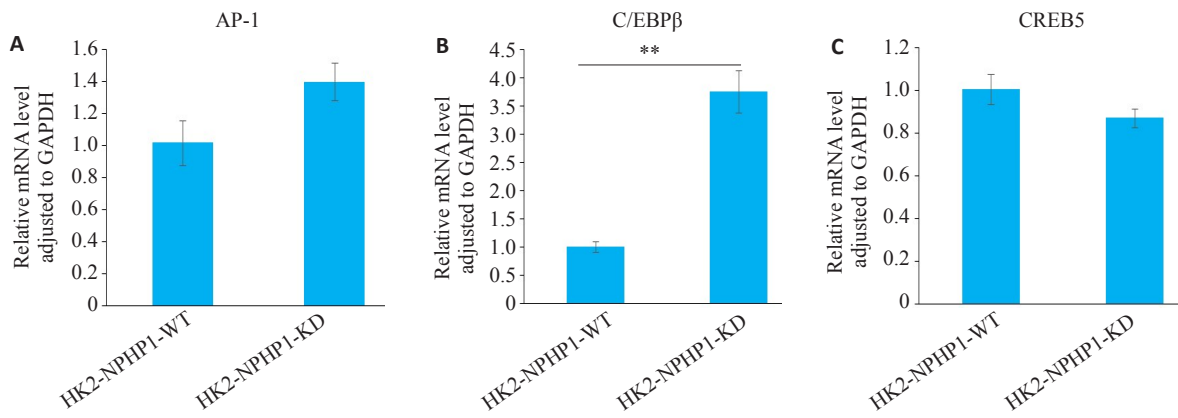


图3 敲低 *NPHP1* 表达对 TNF- α 通路相关 3 种转录因子表达水平的影响

Fig.3 Relative mRNA expressions of the transcription factors AP-1 (A), C/EBP β (B) and CREB5 (C) of TNF- α signaling pathway in *NPHP1*^{KD} HK2 cells ($n=3$). ** $P<0.01$.

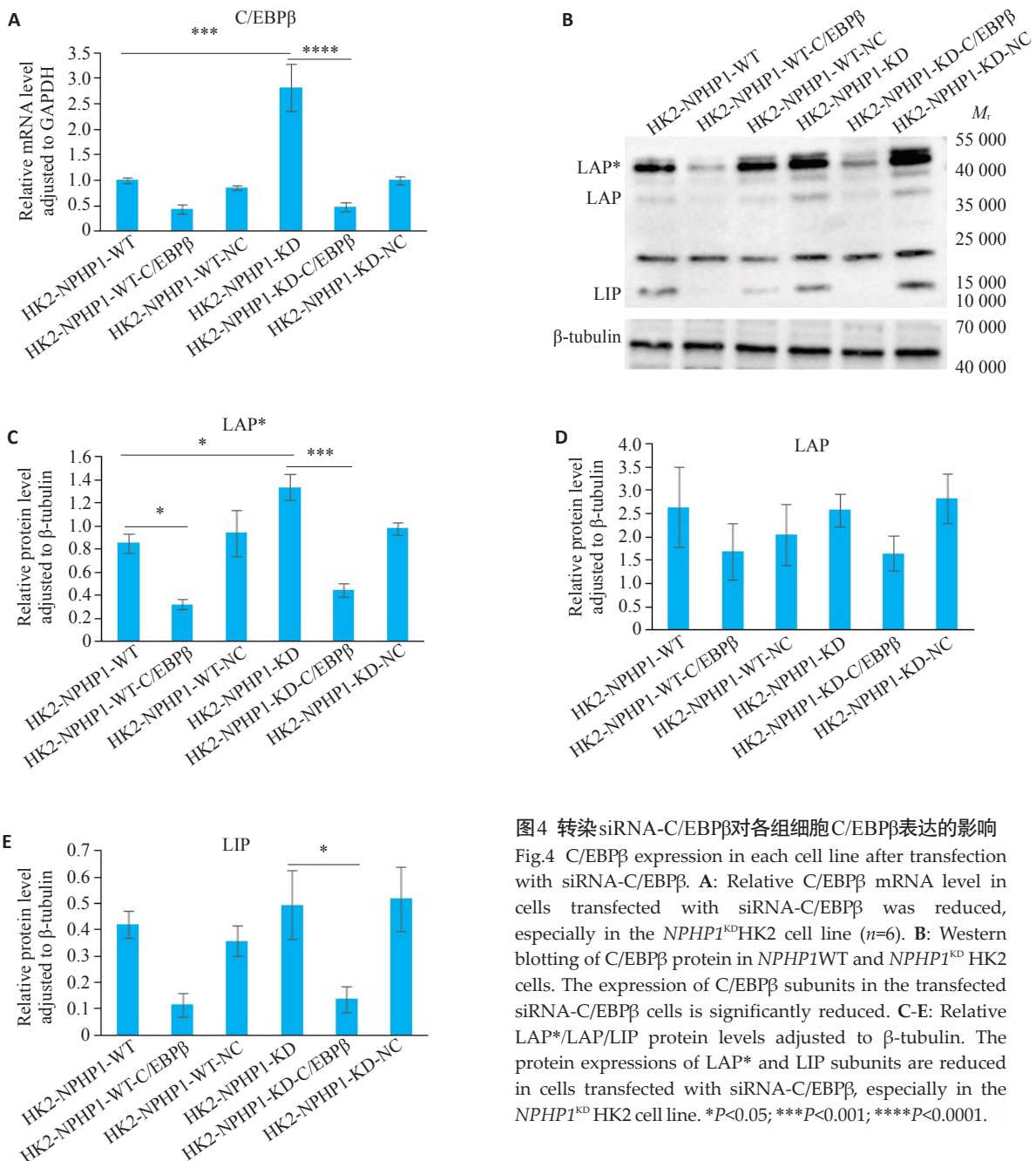


图4 转染 siRNA-C/EBP β 对各组细胞 C/EBP β 表达的影响

Fig.4 C/EBP β expression in each cell line after transfection with siRNA-C/EBP β . A: Relative C/EBP β mRNA level in cells transfected with siRNA-C/EBP β was reduced, especially in the *NPHP1*^{KD}HK2 cell line ($n=6$). B: Western blotting of C/EBP β protein in *NPHP1*^{WT} and *NPHP1*^{KD} HK2 cells. The expression of C/EBP β subunits in the transfected siRNA-C/EBP β cells is significantly reduced. C-E: Relative LAP*/LAP/LIP protein levels adjusted to β -tubulin. The protein expressions of LAP* and LIP subunits are reduced in cells transfected with siRNA-C/EBP β , especially in the *NPHP1*^{KD} HK2 cell line. * $P<0.05$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$.

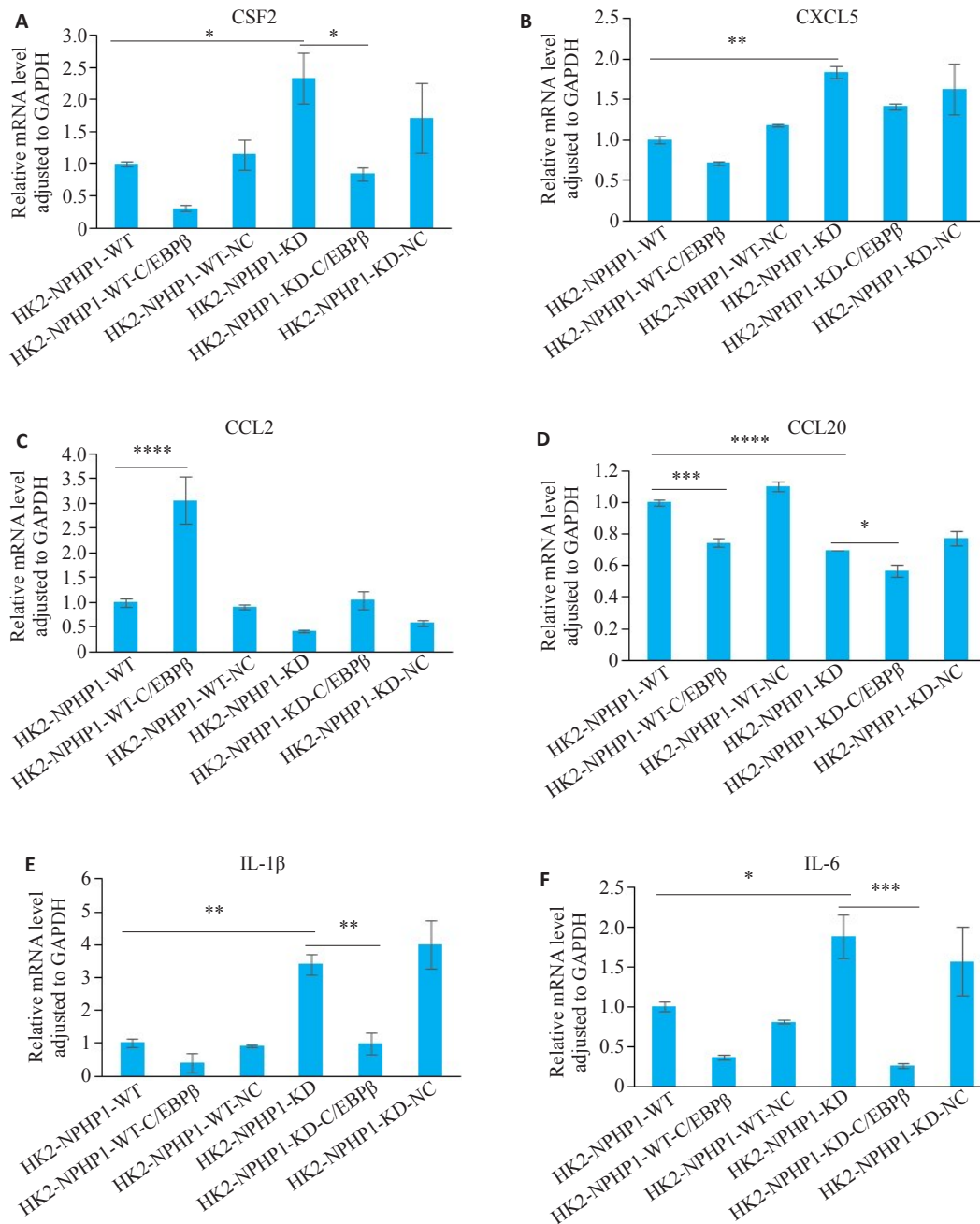


图5 敲低HK2细胞C/EBPβ对TNF-α信号通路调控炎症因子mRNA表达水平的影响

Fig.5 Effect of C/EBPβ knockdown on the expression of inflammatory factors related to TNF-α signaling pathway in HK2 cell lines. A-F: Relative each target mRNA level adjusted to GAPDH. CSF2, CCL20, IL-1β, and IL-6 are decreased and CCL2 is increased with the downregulation of C/EBPβ, and the change of CXCL5 is not statistically significant. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001.

关于NPH囊肿和纤维化的研究已有相关成果^[2,15,16]。但是肾脏炎症机制的探究尚不足。本研究根据NPHP1敲低的犬远曲小管上皮细胞,以及NPHP1和NPHP5缺陷患者尿液上皮细胞转录组测序结果,通过差异基因富集分析筛选,将研究聚焦在TNF-α信号通路。

TNF-α信号通路是调控细胞凋亡、炎症和免疫的主要机制,参与多种病理生理过程和多种疾病的发生发展^[17]。肿瘤坏死因子受体1(TNFR1)是大多数细胞

TNF起作用的媒介,而肿瘤坏死因子受体2(TNFR2)主要在免疫细胞、内皮细胞等中起作用^[18]。TNF-R1识别TNF-α分子后转移至细胞膜的脂质筏上,诱导受体胞内段发生构象变化,使配体-受体复合物能够招募适应分子TNFR1相关的死亡结构蛋白(TRADD),TRADD进一步募集受体相互作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1(RIPK1)^[19-21]。至此TNFR1复合物I的组装就完成了,该复合物是指导下游信号通路激活的关键分子。

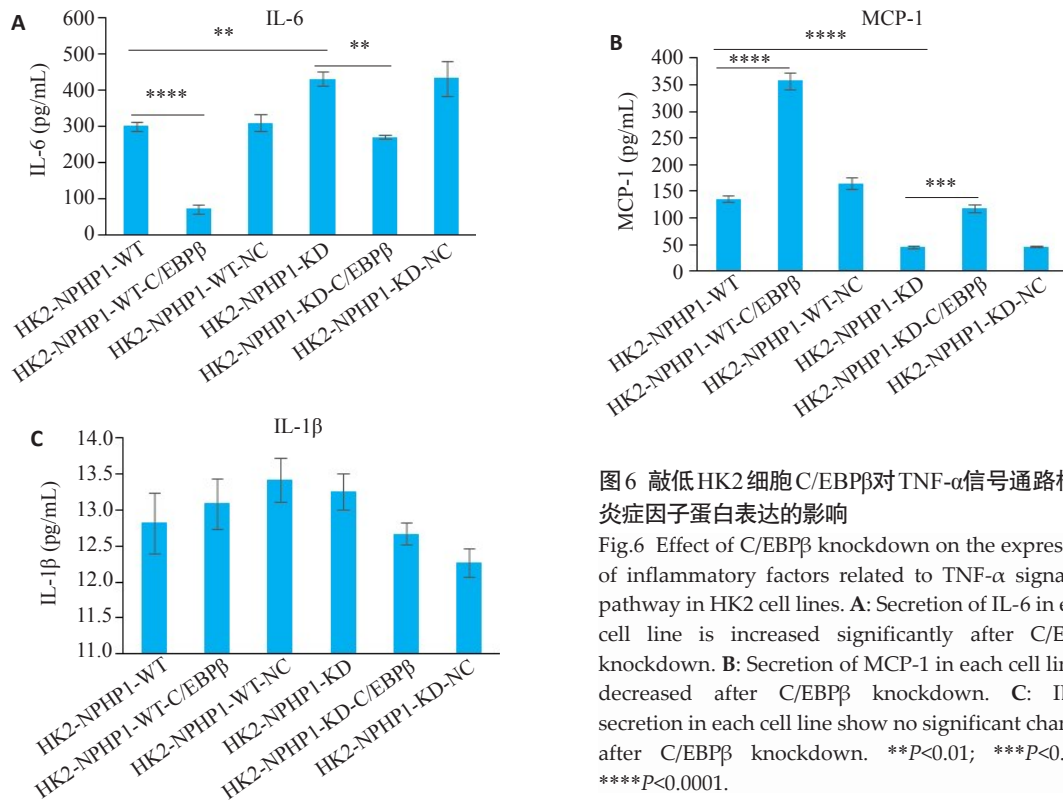


图6 敲低HK2细胞C/EBPβ对TNF-α信号通路相关炎症因子蛋白表达的影响
 Fig.6 Effect of C/EBPβ knockdown on the expression of inflammatory factors related to TNF-α signaling pathway in HK2 cell lines. A: Secretion of IL-6 in each cell line is increased significantly after C/EBPβ knockdown. B: Secretion of MCP-1 in each cell line is decreased after C/EBPβ knockdown. C: IL-1β secretion in each cell line show no significant changes after C/EBPβ knockdown. **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001.

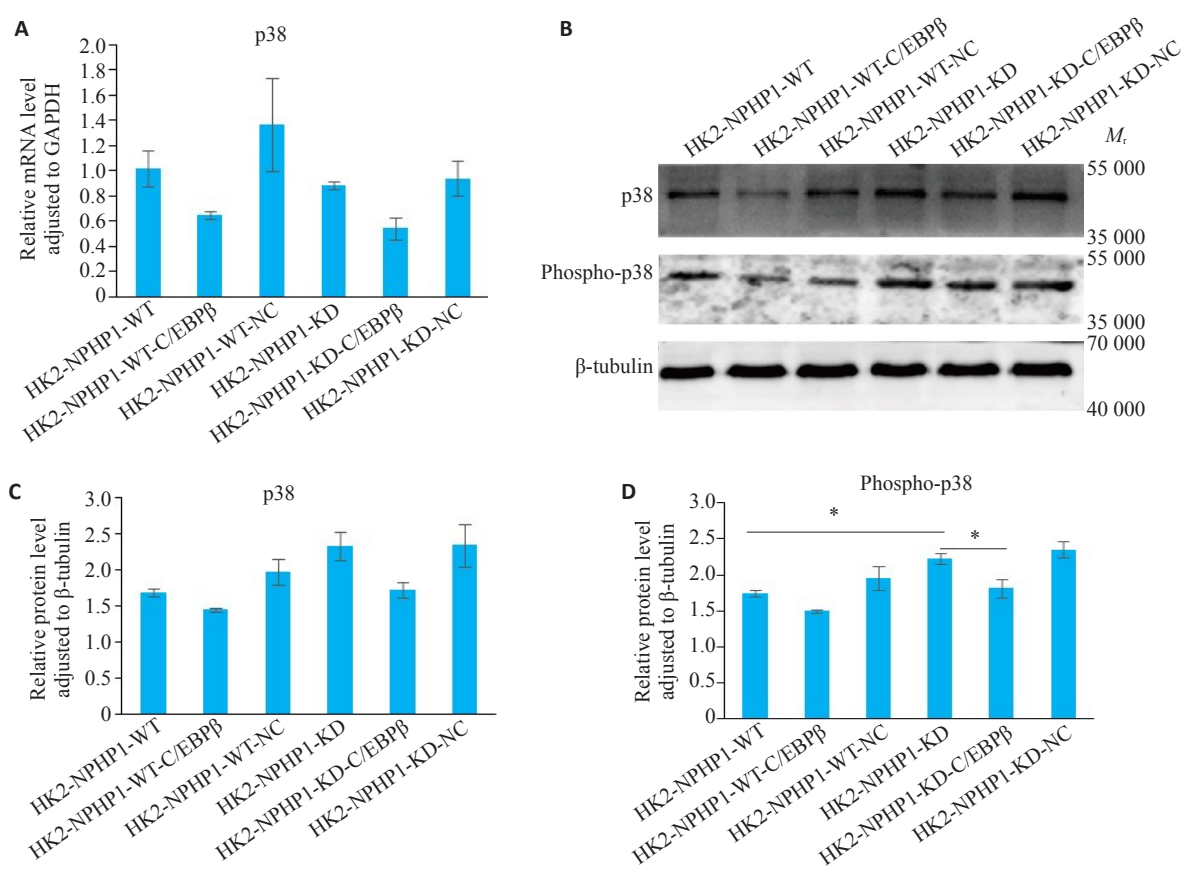


图7 敲低各组HK2细胞C/EBPβ表达对P38活性的影响
 Fig.7 Effect of C/EBPβ knockdown on the activation of p38 in each HK2 cell line. A-C: Both p38 mRNA and protein levels are downregulated after C/EBPβ knockdown in NPHP1WTHK2 cell line, but the changes are not significant between each cell groups. D: Phospho-p38 protein level is increased significantly in NPHP1^{KD}HK2 cells compared with NPHP1WTHK2 cell, and is decreased significantly after C/EBPβ knockdown in NPHP1^{KD}HK2 cells (Western blotting). *P<0.05.

TNFR1复合物 I 招募转化生长因子 β 激活激酶1(TAK1), 进而介导p38激活^[22]。而p38 MAPKs能够激活多种转录因子, 包括CCAAT增强子结合蛋白 β (C/EBP β)、ATF1/2/6、血清反应因子附属蛋白1等^[23]。C/EBP β 是维持上皮细胞稳定性所必需的^[24], 它的激活对体内细胞因子分泌至关重要^[11,25]。由此我们推测p38-C/EBP β 轴对NPH肾脏炎症损伤有重要调控作用^[26,27]。

本研究结果显示, 在敲低*NPHPI*表达后, HK2细胞的TNF- α 表达上调, phospho-p38磷酸化水平和C/EBP β 表达升高, 其调控下游的炎症因子CXCL5、CSF2、IL-1 β 、IL-6的表达升高。结果提示TNF- α 可能介导*NPHPI*基因缺失的炎症反应发生。TNF- α 信号通路主要通过转录因子AP-1、C/EBP β 和CREB5介导下游炎症因子表达^[28-30]。为进一步清理TNF- α 信号通路在*NPHPI*^{KD}HK2细胞中的传导链, 阐明TNF- α 信号通路的作用机制, 我们筛选了AP-1、C/EBP β 和CREB5。结合文献及实验结果, 认为p38-C/EBP β 轴可能是TNF- α 在*NPHPI*^{KD}HK2中信号传导的重要介质。为进一步证明该推论, 本研究通过siRNA敲低转录因子C/EBP β 表达, 实验结果显示, C/EBP β 低表达后, CCL20、CSF2、IL-1 β 、IL-6的表达也随之下调, 证明在*NPHPI*基因缺陷的HK2细胞, C/EBP β 介导其调控的下游炎症因子表达。同时, 我们还观察到, 敲低C/EBP β 表达后, phospho-p38的表达水平受到抑制, 提示TNF- α 信号通路的p38-C/EBP β 轴存在一定的负反馈调控。后续研究将进一步阐明TNF- α 细胞内的调控机制。既往有研究表明, 在构建的NPH模型(Lkb Δ tub)小鼠中, CCL2的表达上调^[31], 但在本研究中的NPH的细胞模型, CCL2的表达会随着*NPHPI*基因的低表达而下调。这可能是体内实验与体外实验的差别, 我们将于*NPHPI*KO的小鼠模型中再次验证。

综上所述, 本研究表明, *NPHPI*基因缺陷导致TNF- α 信号通路激活, C/EBP β 介导其下游炎症因子表达。*NPHPI*基因缺陷导致TNF- α 信号通路激活介导炎症因子的高表达, 可能参与NPH疾病的发生发展, 但有待更多的研究证实。

参考文献:

- [1] Stokman MF, Saunier S, Benmerah A. Renal ciliopathies: sorting out therapeutic approaches for nephronophthisis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 653138-45.
- [2] Wu XH, Wang HY, Chen HM, et al. Overexpression of smad7 inhibits the TGF- β /Smad signaling pathway and EMT in *NPHPI*-defective MDCK cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 582: 57-63.
- [3] 孙良忠, 林宏容, 岳智慧, 等. 少年型肾单位肾病13例临床特点和基因突变分析[J]. *中华儿科杂志*, 2016, 54(11): 834-9.
- [4] Snoek R, van Setten J, Keating BJ, et al. *NPHPI* (nephrocystin-1) gene deletions cause adult-onset ESRD[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29(6): 1772-9.
- [5] Hu QL, Lai JY, Chen HM, et al. Reducing GEF-H1 expression inhibits renal cyst formation, inflammation, and fibrosis *via* RhoA signaling in nephronophthisis[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3504-10.
- [6] Halbritter J, Bizet AA, Schmidts M, et al. Defects in the IFT-B component IFT172 cause Jeune and Mainzer-Saldino syndromes in humans[J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 93(5): 915-25.
- [7] Srivastava S, Sayer JA. Nephronophthisis[J]. *J Pediatr Genet*, 2014, 3(2): 103-14.
- [8] Srivastava S, Molinari E, Raman S, et al. Many genes-one disease genetics of nephronophthisis (NPHP) and NPHP-associated disorders[J]. *Front Pediatr*, 2018, 5: 287-93.
- [9] Anvarian Z, Mykytyn K, Mukhopadhyay S, et al. Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(4): 199-219.
- [10] Luo FL, Tao YH. Nephronophthisis: a review of genotype-phenotype correlation[J]. *Nephrology*, 2018, 23(10): 904-11.
- [11] Bégay V, Baumeier C, Zimmermann K, et al. The C/EBP β LIP isoform rescues loss of C/EBP β function in the mouse[J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 841-7.
- [12] McConnachie DJ, Stow JL, Mallett AJ. Ciliopathies and the kidney: a review[J]. *Am J Kidney Dis*, 2021, 77(3): 410-9.
- [13] Reiter JF, Leroux MR. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(9): 533-47.
- [14] Fliegauf M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(11): 880-93.
- [15] Attanasio M, Uhlenhaut NH, Sousa VH, et al. Loss of GLIS2 causes nephronophthisis in humans and mice by increased apoptosis and fibrosis[J]. *Nat Genet*, 2007, 39(8): 1018-24.
- [16] Wang QY, Zou BJ, Wei XY, et al. Identification of renal cyst cells of type I Nephronophthisis by single-nucleus RNA sequencing [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1192935-42.
- [17] Paul BM, Vanden Heuvel GB. Kidney: polycystic kidney disease[J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2014, 3(6): 465-87.
- [18] Gonzalez Caldito N. Role of tumor necrosis factor-alpha in the central nervous system: a focus on autoimmune disorders[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1213448-56.
- [19] Jang DI, Lee AH, Shin HY, et al. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2719-26.
- [20] Moatti A, Cohen JL. The TNF- α /TNFR2 pathway: targeting a brake to release the anti-tumor immune response[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 725473-82.
- [21] Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(6): 362-74.
- [22] Bai BB, Ji ZL, Wang FF, et al. CTRP12 ameliorates post-myocardial infarction heart failure through down-regulation of cardiac apoptosis, oxidative stress and inflammation by influencing the TAK1-p38 MAPK/JNK pathway [J]. *Inflamm Res*, 2023, 72(7): 1375-90.
- [23] Cuadrado A, Nebreda A. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling[J]. *Biochem J*, 2010, 429(3): 403-17.

- [24] Ding H, Chen JJ, Qin JP, et al. TGF- β -induced α -SMA expression is mediated by C/EBP β acetylation in human alveolar epithelial cells [J]. Mol Med, 2021, 27(1): 1-12.
- [25] Hu B, Ullenbruch MR, Jin H, et al. An essential role for CCAAT/enhancer binding protein β in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. J Pathol, 2007, 211(4): 455-62.
- [26] Canovas B, Nebreda AR. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(5): 346-66.
- [27] Liu X, Huang ZS, Zhang YY, et al. Lacidipine ameliorates the endothelial senescence and inflammatory injury through CXCR7/P38/C/EBP- β signaling pathway[J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 692540-9.
- [28] Chen TL, Zhang XD, Zhu GL, et al. Quercetin inhibits TNF- α induced HUVECs apoptosis and inflammation *via* downregulating NF- κ B and AP-1 signaling pathway *in vitro*[J]. Medicine, 2020, 99(38): e22241-8.
- [29] Qi YC, Duan GZ, Mao W, et al. Taurochenodeoxycholic acid mediates cAMP-PKA-CREB signaling pathway [J]. Chin J Nat Med, 2020, 18(12): 898-906.
- [30] Xia PY, Zhang R, Ge GX. C/EBP β mediates TNF- α -induced cancer cell migration by inducing MMP expression dependent on p38 MAPK[J]. J Cell Biochem, 2015, 116(12): 2766-77.
- [31] Quatredeniens M, Bienaimé F, Ferri G, et al. The renal inflammatory network of nephronophthisis [J]. Hum Mol Genet, 2022, 31(13): 2121-36.

(编辑:林萍)