

网络出版时间: 2021-4-2 16:03 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210402.1339.010.html>

足细胞损伤中 JAK2/STAT3 通路与 TRPC6 相互作用的机制探讨

吴 慢¹ 王先鹤¹ 高 慧¹ 邓 芳²

摘要 目的 研究在血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导的足细胞损伤中 JAK2/STAT3 通路与瞬时受体电位非选择性阳离子通道蛋白6(TRPC6)相互作用的机制。方法 将小鼠足细胞分为对照、AngⅡ损伤、AngⅡ+氯沙坦、AngⅡ+AG490、AngⅡ+SKF96365组等,通过Western blot、qRT-PCR检测各分组的TRPC6、JAK2/STAT3通道蛋白及mRNA表达水平,通过ELISA检测各分组的肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6的分泌水平。结果 与对照组比较,AngⅡ损伤组的JAK2/STAT3、TRPC6、TNF- α 和IL-6表达水平增高($P < 0.05$);与AngⅡ损伤组比较,AngⅡ+氯沙坦组的JAK2/STAT3、TRPC6、TNF- α 和IL-6表达水平降低($P < 0.05$);AngⅡ+AG490组的JAK2/STAT3、TRPC6、TNF- α 和IL-6表达水平降低($P < 0.05$);AngⅡ+SKF96365组的JAK2/STAT3、TRPC6、TNF- α 和IL-6表达水平降低($P < 0.05$)。结论 AngⅡ能够介导TRPC6通道蛋白激活JAK2/STAT3信号通路,抑制JAK2/STAT3信号通路也能下调TRPC6通道蛋白的表达,两者之间存在正反馈机制。

关键词 足细胞; JAK2/STAT3 通路; TRPC6; 血管紧张素Ⅱ

中图分类号 R 725.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)05-0716-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.05.009

过敏性紫癜性肾炎(henoch-schnlein purpura nephritis,HSPN)是儿童常见的继发性肾小球疾病,可进展至终末期肾脏病,其确切的发病机制尚不明确。足细胞被覆于肾小球基底膜外侧,是肾小球滤过膜,最终也是肾小球最重要的屏障,HSPN的发生与足细胞的损伤有着密切的关系^[1]。瞬时受体电位非选择性阳离子通道蛋白(transient receptor potential canonical,TRPC)6位于肾小球足细胞,是裂隙膜的

2020-12-25 接收

基金项目: 安徽省2020年重点研究与开发计划项目(编号:202004j07020028)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院儿科,合肥 230022

²安徽省儿童医院肾内科,合肥 230051

作者简介: 吴 慢,女,硕士研究生;

邓 芳,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: dengfang@ahmu.edu.cn

重要组成部分,TRPC6主要介导Ca²⁺内流发挥作用^[2]。有研究^[3]发现,HSPN患儿肾内存在肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system,RAS)的异常活化,血管紧张素Ⅱ(angiotensinⅡ,AngⅡ)作为RAS中主要效应分子,可诱导肾小球细胞损伤,刺激JAK2/STAT3信号通路的过表达引起肾脏炎性。在此过程中,TRPC6也会过度表达^[4]。另外有研究^[5]表明,Ca²⁺能够参与调节JAK2/STAT3信号通路。因此,猜测在AngⅡ损伤足细胞过程中,TRPC6与JAK2/STAT3信号通路存在一定的相互作用关系。该研究以此为出发点来探讨在足细胞中TRPC6通道蛋白与JAK2/STAT3信号通路的相互作用及其机制,为肾脏炎性疾病防治提供新的药物靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 IV型胶原酶、胰蛋白酶及转铁蛋白、AngⅡ(美国Sigma公司);DMEM低糖培养基(美国HyClone公司);胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)(以色列BI公司);TRPC6受体抑制剂(SKF96365)、AngⅡ受体抑制剂氯沙坦(ab120997)、JAK2/STAT3通路抑制剂(AG490)(上海abcam公司);反转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒(日本Takara公司);实时荧光PCR引物[生工生物工程(上海)股份有限公司];兔抗TRPC6、p-JAK2、JAK2、p-STAT3、STAT3抗体(美国CST公司);兔抗β-actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(武汉三鹰公司);增强化学发光(enhanced chemiluminescent,ECL)试剂盒(上海Tanon公司);小鼠肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)- α 、小鼠白细胞介素(interleukin,IL)-6、ELISA(enzyme-linked immuno sorbent assay,ELISA)试剂盒(美国R&D公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠足细胞(mouse podocyte clone,MPC)的分离和培养 MPC细胞株(购自北京北纳创联生物技术研究院,中国医学科学院基础医学研究所系用

于全部实) 将复苏的足细胞放入 33 ℃、5% CO₂ 孵箱中进行传代培养, 培养液成分为 DMEM 低糖培养基、10% 胎牛血清以及补充剂(胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸钠)。当细胞生长至 70%~80% 融合时, 转至 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中使用相同的培养液继续培养 10~14 d, 至细胞分化完全, 选择第 5~15 代分化完全的足细胞用于实验研究。

1.2.2 实验分组 待足细胞长到 70%~80% 融合时, 接种到 6 孔板中, 使每孔细胞浓度达到 80% 后用于实验。将实验进行分组: ① 对照组(NC 组); ② Ang II 损伤组: 加入 Ang II, 使其浓度保持在 1 μmol/L; ③ Ang II + 氯沙坦组: 加入 Ang II 和氯沙坦, 使其浓度分别保持在 1 μmol/L 和 20 μmol/L; ④ Ang II + AG490 组: 加入 Ang II 和 AG490, 使其浓度分别保持在 1 μmol/L 和 40 μmol/L; ⑤ Ang II + SKF96365 组: 加入 Ang II 和 SKF96365, 使其浓度分别保持在 1 μmol/L 和 40 μmol/L。将上述分组在培养箱中继续培养 24 h 后进行实验。

1.2.3 Western blot 检测 取足细胞置于冰上, PBS 清洗 3 遍后, 用干净的细胞刷将细胞刮下并搜集, 分别提取各组细胞的总蛋白, 低温离心后取上清液, 用 BCA 试剂盒测定各组蛋白浓度, 加入上样缓冲液煮沸 10 min 后, 每组蛋白取 20 μg 上样, 用 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳, 湿电转至 NC 膜上, 5% 脱脂牛奶-PBST 溶液室温封闭 2 h, 再用 PBS 清洗 3 遍, 分别加入一抗 JAK2(1:2 000); p-JAK2(1:2 000); STAT3(1:2 000); p-STAT3(1:2 000); TRPC6(1:5 000); β-actin(1:35 000), 于 4 ℃ 孵育过夜后, 洗膜, 显影, 采用 β-actin 作为内参, 系统软件 Image-J 进行灰度分析。

1.2.4 qRT-PCR 检测细胞因子 mRNA 表达水平 收集各组细胞, 采用 TRIzol 法提取各组细胞 mRNA, 并以提取的 RNA 样品为模板反转录为 cDNA。根据 SYBR Green 试剂盒说明书对 cDNA 样品进行实时荧光定量 PCR。引物序列见表 1。反应条件为: 95 ℃ 预变性 10 min 后进入循环; 95 ℃、10 s, 60 ℃、30 s, 扩增 40 个循环; 每组设 3 个复孔, 采用 2^{-ΔΔCt} 法分析相对表达量。

1.2.5 ELISA 法检测各组培养上清液细胞因子含量 收取各组细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书用 ELISA 方法检测各组细胞 TNF-α 和 IL-6 表达水平。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 软件对

实验数据进行分析, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示实验结果, 采用单因素方差分析进行组间比较, 采用 SNK-q 检验进行均数之间的两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 PCR 引物列表

基因	引物序列(5'-3')
β-actin	F: CTACCTCATGAAGATCCTGACC R: CACAGCTTCTTTGATGTCAC
IL-6	F: CTCCAACAGACCTGTCTATAC R: CCATTGCACAACCTTTCTCA
TNF-α	F: ATGTCTCAGCCTTTCTCATTC R: GCTGTCACTCGAATTGAGA
TRPC6	F: GTGGTGGGAAGATGCTAGAAGAG R: AAGCTGGATGGTGAGGATTGCC

2 结果

2.1 Ang II 对足细胞 JAK2/STAT3 通路蛋白与 TRPC6 蛋白表达的影响 对照组、Ang II 损伤组、Ang II + 氯沙坦组的 p-JAK2 表达相对量差异有统计学意义($F = 23.55, P = 0.0014$); 3 组间的 p-STAT3 表达相对量差异有统计学意义($F = 23.40, P = 0.0015$); 3 组间的 TRPC6 表达相对量差异有统计学意义($F = 9.73, P = 0.0131$)。两两比较结果提示, 与对照组相比, Ang II 损伤组的 p-JAK2、p-STAT3 与 TRPC6 蛋白表达水平较高(P 均 < 0.05); 与 Ang II 损伤组相比, Ang II + 氯沙坦组 p-JAK2、p-STAT3 与 TRPC6 蛋白表达水平较低(P 均 < 0.05)。见图 1。因此, 在足细胞受到 Ang II 刺激时, JAK2/STAT3 通路蛋白磷酸化水平与 TRPC6 蛋白表达量升高。

2.2 AG490 对足细胞 JAK2/STAT3 通路蛋白与 TRPC6 蛋白表达的影响 对照组、Ang II 损伤组、Ang II + AG490 组的 p-JAK2 表达相对量差异有统计学意义($F = 20.83, P = 0.002$); 3 组间的 p-STAT3 表达相对量差异有统计学意义($F = 12.35, P = 0.008$); 3 组间的 TRPC6 表达相对量差异有统计学意义($F = 6.546, P = 0.031$)。两两比较结果提示, 与 Ang II 损伤组相比, Ang II + AG490 组的 p-JAK2、p-STAT3 与 TRPC6 蛋白表达水平较低(P 均 < 0.05)。见图 2。因此, 在 AG490 对 JAK2/STAT3 通路的阻断下, 不仅 JAK2/STAT3 通路蛋白磷酸化水平降低, TRPC6 蛋白表达量也随着降低。

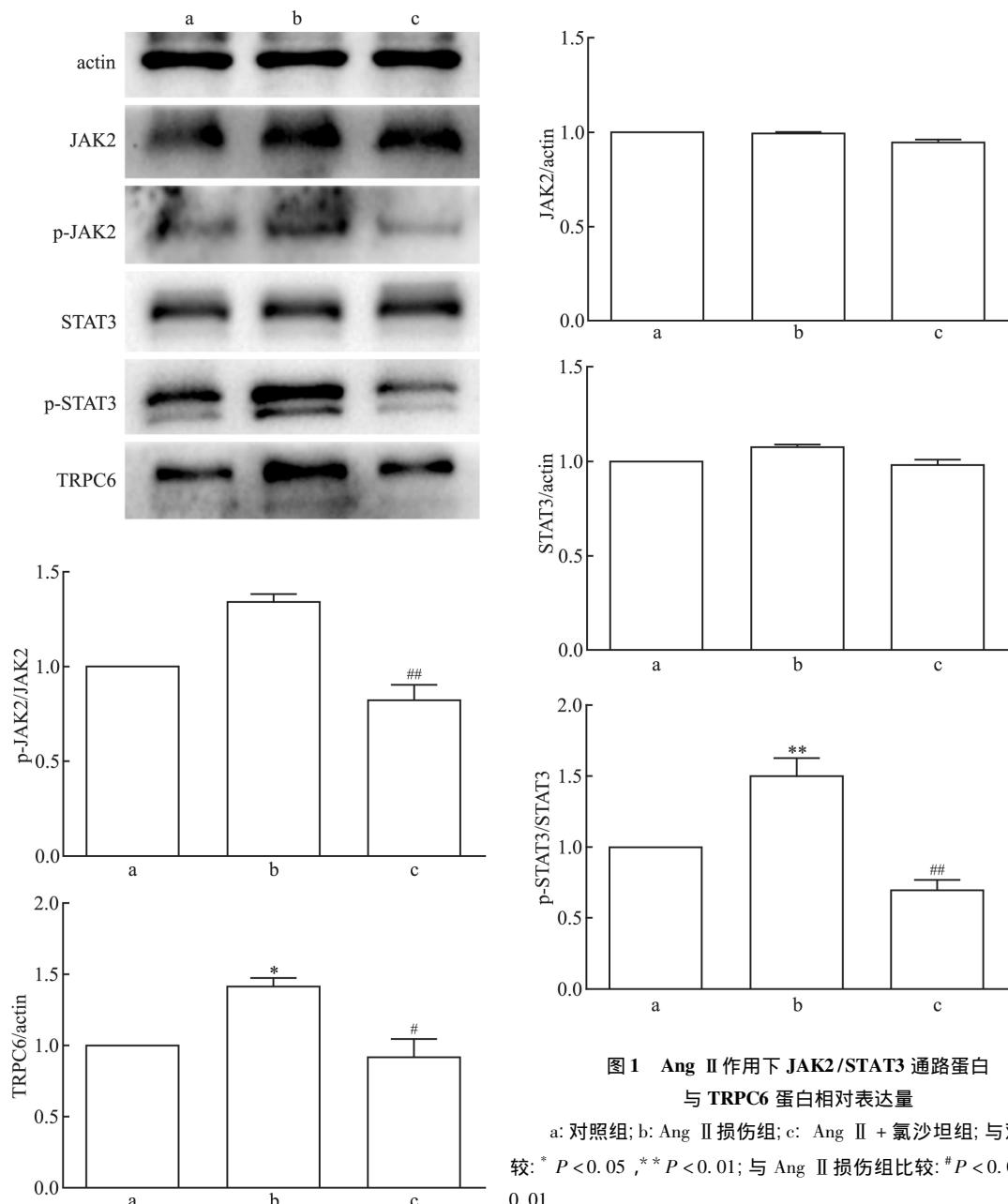


图 1 Ang II 作用下 JAK2/STAT3 通路蛋白

与 TRPC6 蛋白相对表达量

a: 对照组; b: Ang II 损伤组; c: Ang II + 氯沙坦组; 与对照组比较: $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$; 与 Ang II 损伤组比较: $^# P < 0.05$, $^{##} P < 0.01$

2.3 SKF96365 对足细胞 JAK2/STAT3 通路蛋白与 TRPC6 蛋白的影响 对照组、Ang II 损伤组、Ang II + SKF96365 组的 p-JAK2 表达相对量差异有统计学意义 ($F = 13.03, P = 0.007$) ; 3 组间的 p-STAT3 表达相对量差异有统计学意义 ($F = 9.351, P = 0.014$) ; 3 组间的 TRPC6 表达相对量差异有统计学意义 ($F = 26.47, P = 0.001$) 。两两比较结果提示, 与 Ang II 损伤组相比, Ang II + SKF96365 组的 p-JAK2、p-STAT3 与 TRPC6 蛋白表达水平较低 (P 均 < 0.05) 。详见图 3。因此, 在 SKF96365 对 TRPC6 的阻断下, 不仅 TRPC6 蛋白表达量降低, JAK2/

STAT3 通路蛋白磷酸化水平也随着降低。

2.4 Ang II 及各蛋白阻滞剂对足细胞 TRPC6 mRNA 表达的影响 对照组、Ang II 损伤组、Ang II + 氯沙坦组的 TRPC6 mRNA 表达相对量差异有统计学意义 ($F = 39.18, P < 0.001$) ; 对照组、Ang II 损伤组、Ang II + AG490 组的 TRPC6 mRNA 表达相对量差异有统计学意义 ($F = 39.61, P < 0.001$) ; 对照组、Ang II 损伤组、Ang II + SKF96365 组的 TRPC6 mRNA 表达相对量差异有统计学意义 ($F = 37.15, P < 0.001$) 。两两比较结果提示, 与对照组相比, Ang II 损伤组的 TRPC6 mRNA 表达水平较高 ($P <$

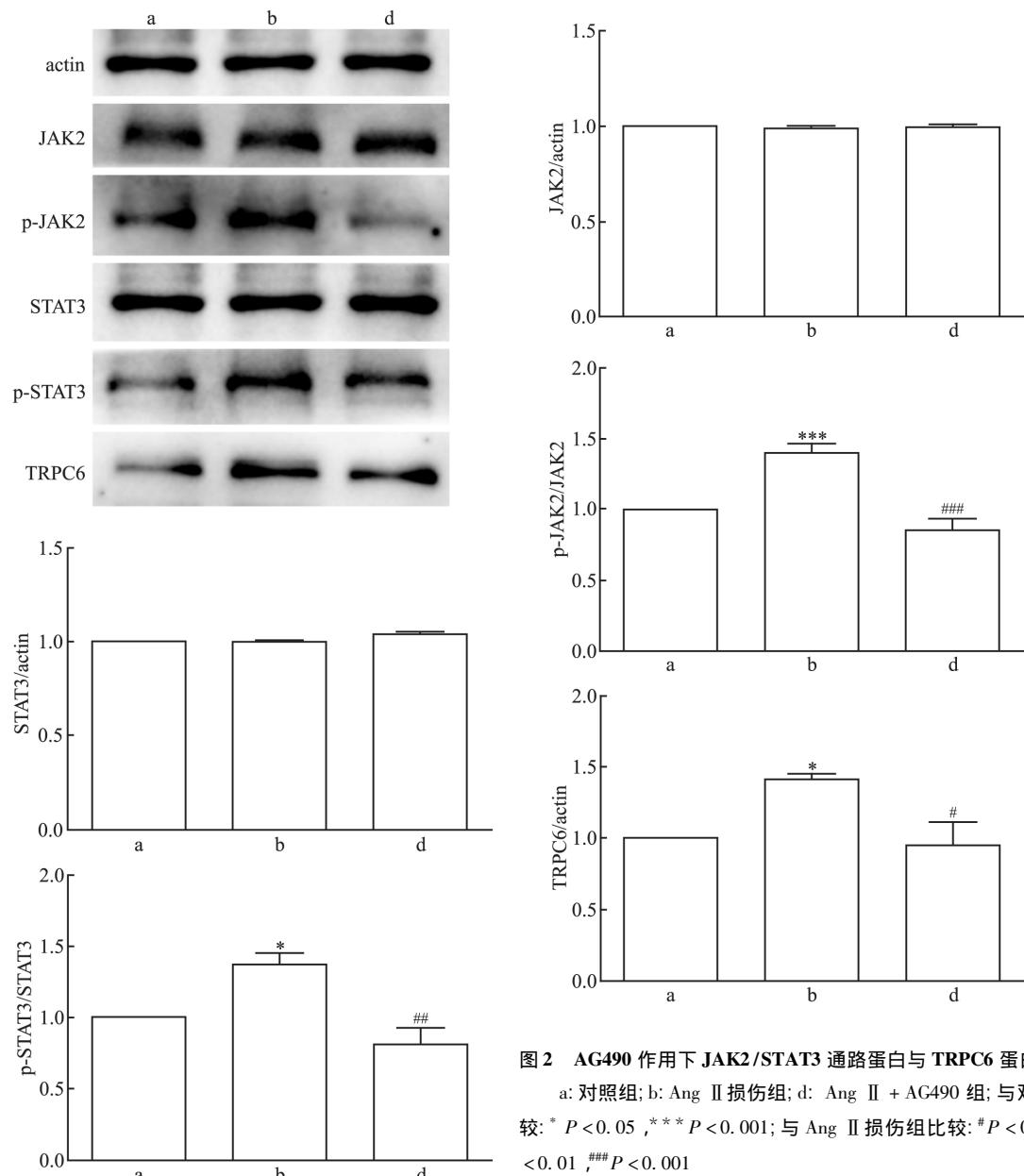


图 2 AG490 作用下 JAK2/STAT3 通路蛋白与 TRPC6 蛋白表达量
 a: 对照组; b: Ang II 损伤组; d: Ang II + AG490 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与 Ang II 损伤组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

0.05)。与 Ang II 损伤组相比, Ang II + 氯沙坦组、Ang II + AG490 组和 Ang II + SKF96365 组的 TRPC6 mRNA 表达水平较低 (P 均 < 0.05)。详见图 4。因此, 对 Ang II、JAK2/STAT3 和 TRPC6 的抑制均能降低 TRPC6 mRNA 的表达。

2.5 Ang II 及各蛋白阻滞剂对足细胞 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达的影响 对照组、Ang II 损伤组、Ang II + 氯沙坦组的 TNF- α mRNA 表达相对量差异有统计学意义 ($F = 21.27, P = 0.002$) ; 对照组、Ang II 损伤组、Ang II + AG490 组的 TNF- α mRNA 表达相对量差异有统计学意义 ($F = 23.62, P = 0.001$) ; 对照组、Ang II 损伤组、Ang II + SKF96365 组的 TNF- α

mRNA 表达相对量差异有统计学意义 ($F = 32.21, P < 0.001$)。两两比较结果提示, 与对照组相比, Ang II 损伤组的 TNF- α 表达水平较高 ($P < 0.05$) ; 与 Ang II 损伤组相比, Ang II + 氯沙坦组、Ang II + AG490 组和 Ang II + SKF96365 组的 TNF- α mRNA 表达水平较低 (P 均 < 0.05)。

对照组、Ang II 损伤组、Ang II + 氯沙坦组的 IL-6 mRNA 表达相对量差异有统计学意义 ($F = 29.30, P < 0.001$) ; 对照组、Ang II 损伤组、Ang II + AG490 组的 IL-6 mRNA 表达相对量差异有统计学意义 ($F = 23.17, P = 0.002$) ; 对照组、Ang II 损伤组、Ang II + SKF96365 组的 IL-6 mRNA 表达相对量

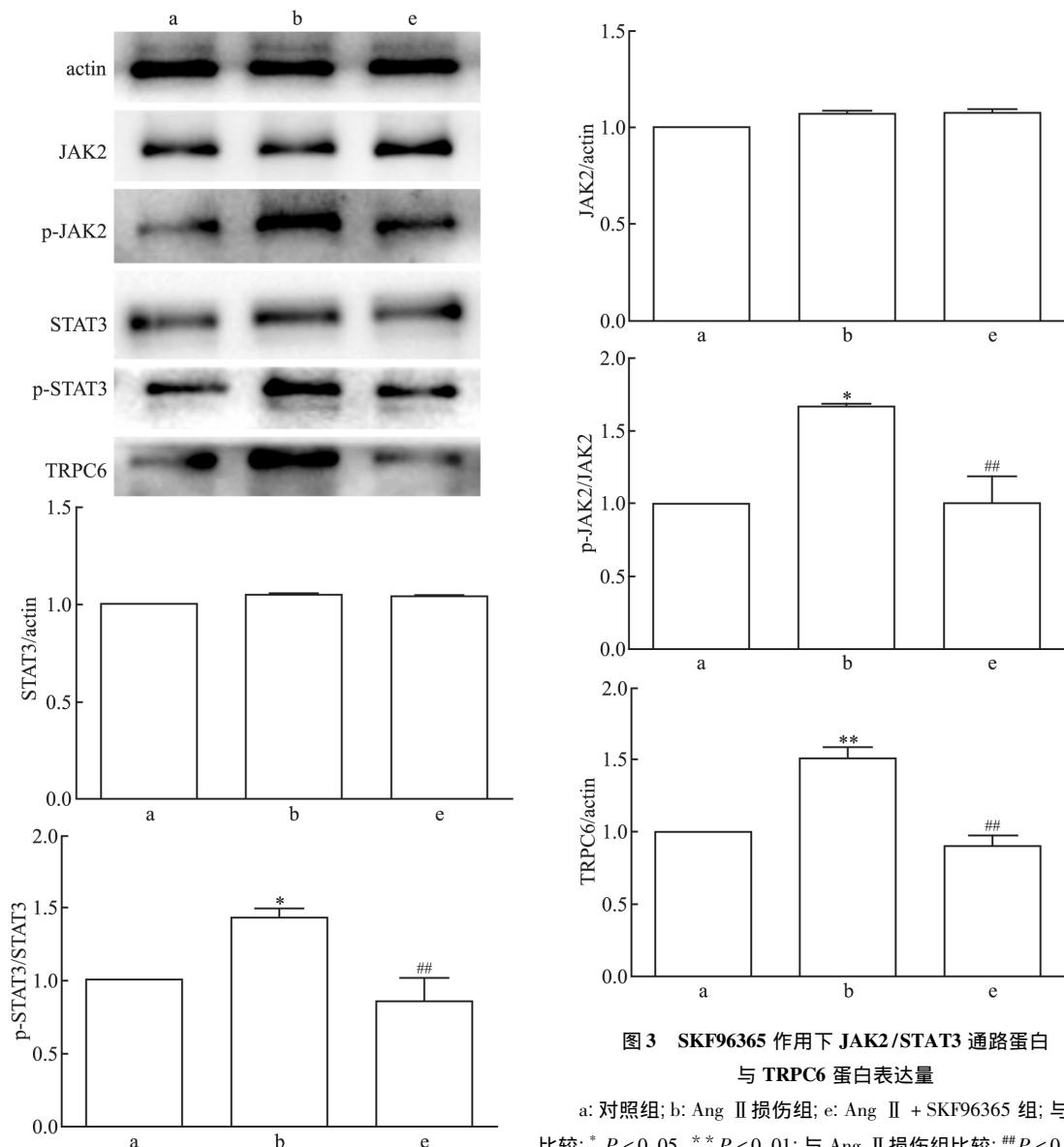


图3 SKF96365 作用下 JAK2/STAT3 通路蛋白与 TRPC6 蛋白表达量

a: 对照组; b: Ang II 损伤组; e: Ang II + SKF96365 组; 与对照组

比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Ang II 损伤组比较: ## $P < 0.01$

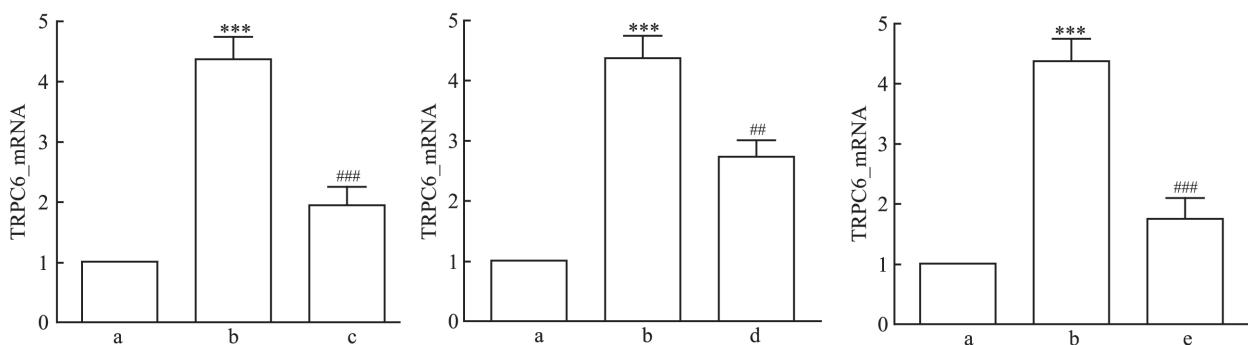


图4 Ang II 刺激及各蛋白阻滞剂处理 mpc 后 TRPC6 mRNA 表达量

a: 对照组; b: Ang II 损伤组; c: Ang II + 氯沙坦组; d: Ang II + AG490 组; e: Ang II + SKF96365 组; 与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与 Ang II

损伤组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

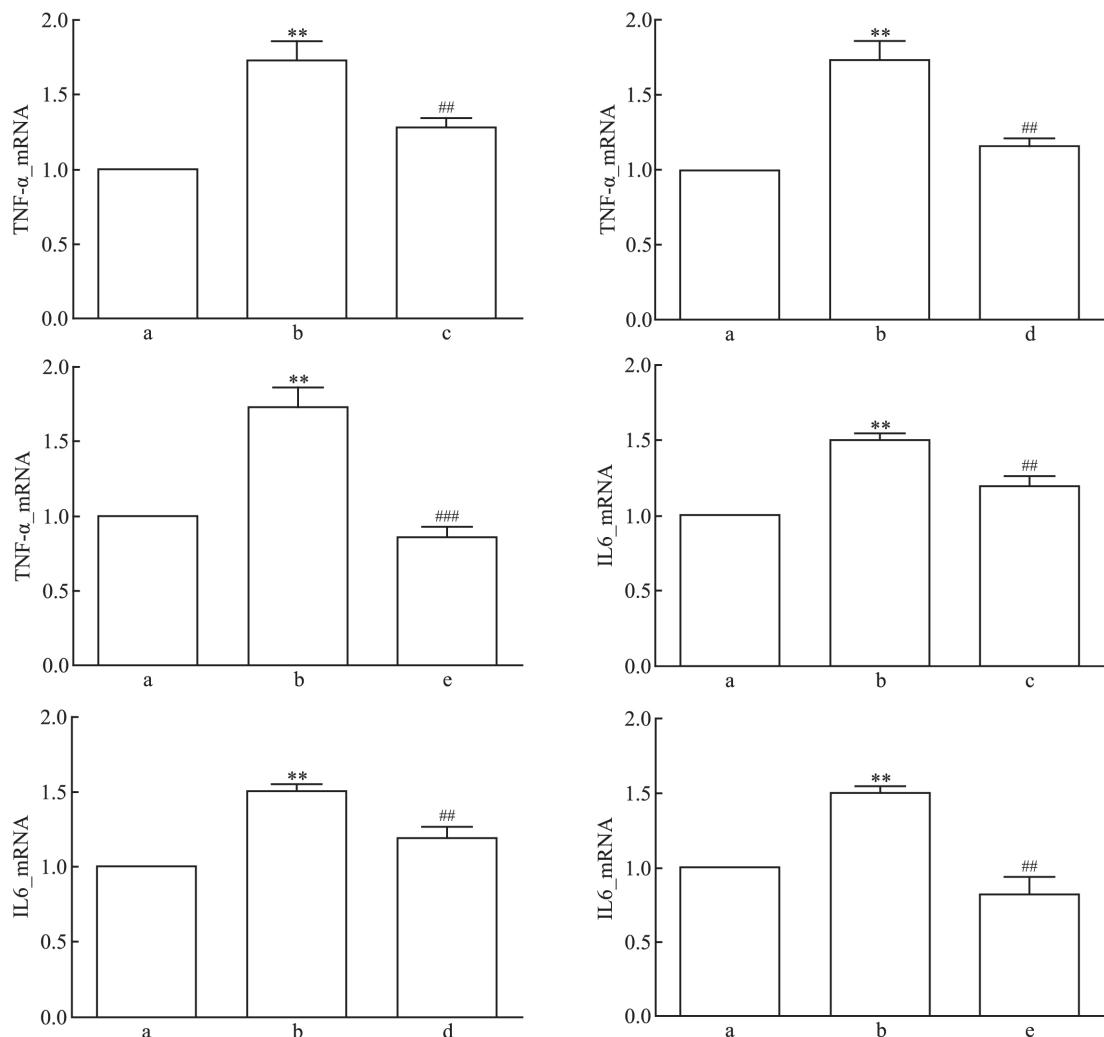


图 5 Ang II 刺激及各蛋白阻滞剂处理 mpc 后 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达量

a: 对照组; b: Ang II 损伤组; c: Ang II + 氯沙坦组; d: Ang II + AG490 组; e: Ang II + SKF96365 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 Ang II 损伤组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

差异有统计学意义($F = 23.91, P = 0.001$)。两两比较结果提示,与对照组相比,Ang II 损伤组的 IL-6 mRNA 表达水平较高($P < 0.05$);与 Ang II 损伤组相比,Ang II + 氯沙坦组、Ang II + AG490 组和 Ang II + SKF96365 组的 IL-6 mRNA 表达水平较低(P 均 < 0.05)。详见图 5。

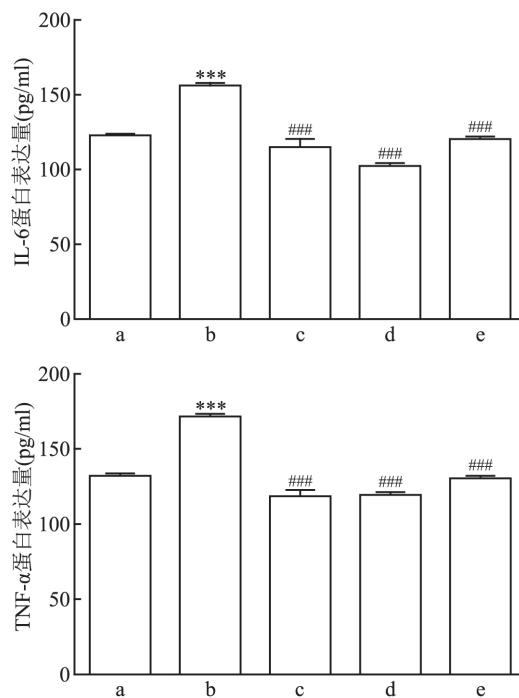
因此,对 Ang II、JAK2/STAT3 和 TRPC6 的阻断均能降低炎症因子 TNF- α 、IL-6 mRNA 的表达。

2.6 Ang II 及各蛋白阻滞剂对足细胞 TNF- α 、IL-6 表达的影响 对照组、Ang II 损伤组、Ang II + 氯沙坦组、Ang II + AG490 组、Ang II + SKF96365 组的 TNF- α 的表达量差异有统计学意义($F = 78.35, P < 0.001$);各组间 IL-6 的表达量差异有统计学意义($F = 46.30, P < 0.001$)。两两比较结果提示,与对照组相比,Ang II 损伤组的 TNF- α 、IL-6 表达量较高(P

均 < 0.05);与 Ang II 损伤组相比,Ang II + 氯沙坦组、Ang II + AG490 组和 Ang II + SKF96365 组的 TNF- α 、IL-6 表达量较低(P 均 < 0.05)。详见图 6。因此,对 Ang II、JAK2/STAT3 和 TRPC6 的阻断均能降低炎症因子 TNF- α 、IL-6 的表达,与 mRNA 水平变化趋势与之一致。

3 讨论

HSPN 患儿的肾脏损害是影响其预后的重要因素,其发病机制尚未明确。近年来研究^[3]发现肾内 RAS 在肾小球滤过率的调节中发挥着重要作用, HSPN 患儿肾内存在 RAS 的异常活化,而 Ang II 作为该系统中主要效应分子参与了肾脏病理炎症改变。本研究通过 Ang II 刺激足细胞,模拟足细胞在炎症中受到的刺激,并通过 TRPC6 和 JAK2/STAT3

图 6 不同刺激条件下的 TNF- α 和 IL6 蛋白表达量

a: 对照组; b: Ang II 损伤组; c: Ang II + 氯沙坦组; d: Ang II + AG490 组; e: Ang II + SKF96365 组; 与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与 Ang II 损伤组比较: ## $P < 0.001$

阻断剂分别抑制 TRPC6 和 JAK2/STAT3 的表达, 来研究 TRPC6 离子通道蛋白与 JAK2/STAT3 信号通路的相互作用与机制。本研究实验结果: ① Ang II 通过上调 TRPC6 通道蛋白以及 JAK2/STAT3 信号通路产生炎症因子, 使足细胞损伤; ② 通过抑制剂抑制 TRPC6 通道蛋白能够下调 JAK2/STAT3 信号通路的表达; ③ 通过抑制剂抑制 JAK2/STAT3 信号通路能够下调 TRPC6 通道蛋白的表达; ④ 分别使用抑制剂抑制 JAK2/STAT3 信号通路以及 TRPC6 通道蛋白的同时, 炎症因子也在减少, 足细胞损伤得到控制。

小儿 HSPN 常常伴有大量蛋白尿, 具体机制尚不明确, 足细胞作为肾小球滤过膜的重要结构, 在蛋白尿中发挥着重要作用^[6]。Ang II 作为炎症递质能够作用于足细胞上足突 AT1 受体损伤足细胞产生炎症因子, 破坏肾小球滤过屏障从而产生大量蛋白尿^[7]。TRPC6 通道是足突细胞钙转运的重要递质, 并参与调节肾小球滤过, 其过表达或功能增强可导致足细胞足突消失, 使小鼠肾脏受到损伤而诱发蛋白尿^[8]。TRPC6 的表达与多种细胞因子有关, 包括 nephrin、podocin、CD 2AP 等这些足细胞骨架蛋白, 并且 TRPC6 能够结合并激活 Calpain 调节足突细胞骨架、参与细胞黏附和运动^[9-10]。有研究^[8]已经发

现, Ang II 能够导致 TRPC6 启动子活性增加, TRPC6 通道过度表达, 从而诱导足细胞损伤, 本实验一通过 Ang II 刺激足细胞, TRPC6 蛋白及 mRNA 表达量升高, 炎症因子 TNF- α 和 IL-6 随之增加, 从而使足细胞损伤加重; 当给予氯沙坦时, TRPC6 及 TNF- α 和 IL-6 表达量下降, 足细胞损伤减轻, 从而证实 Ang II 能够介导足细胞损伤影响 TRPC6 的表达。

JAK2/STAT3 信号通路在炎症中起着重要的作用, 能够参与细胞增殖、分化、生长和凋亡^[11]。JAK2/STAT3 通路对心血管系统的影响也很重要, 越来越多的证据^[12-14]表明 JAK2/STAT3 通路参与刺激诱导各种心血管并发症, 包括凋亡、网状应激、ROS、收缩功能障碍和炎症。有研究^[15]表明, Ang II 能够在多种疾病中激活 JAK2/STAT3 通路, 损伤靶细胞, 产生炎症因子, 本实验通过 Ang II 刺激足细胞, p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达增高, 炎症因子 TNF- α 和 IL-6 也随之增加, 足细胞受到损伤; 当给予氯沙坦时, p-JAK2、p-STAT3 及 TNF- α 和 IL-6 表达量下降, 足细胞损伤减少, 从而证实 Ang II 能够介导足细胞损伤影响 JAK2/STAT3 通路的表达。

同时, TRPC6 也能够与多种信号通路发生作用。TRPC6 作为一种非选择性的阳离子通道蛋白, 主要介导 Ca^{2+} 内流发挥作用^[2], 并且 Ca^{2+} 能够参与调节 JAK2/STAT3 信号通路^[5]。因此, 猜测在 Ang II 损伤足细胞过程中, TRPC6 与 JAK2/STAT3 信号通路存在一定的相互作用关系。本研究以此为出发点来探讨在足细胞中 TRPC6 通道蛋白与 JAK2/STAT3 信号通路的相互作用及其机制。通过分别加入 TRPC6 通道蛋白与 JAK2/STAT3 通路蛋白抑制剂, 用 Western blot、q-PCR、ELISA 等实验方法检测两者蛋白、mRNA、及细胞炎症因子的表达量来验证两者的关系。结果显示, 当加入 SKF96365 时能够下调 JAK2/STAT3 信号通路蛋白磷酸化的表达, 肾脏炎症因子随之减少, 足细胞损伤得以减轻; 当加入 AG490 时, TRPC6 通道蛋白以及 mRNA 的表达也在减少, 其肾脏炎症因子 TNF- α 和 IL-6 也随之减少, 足细胞损伤得到改善。但两者的具体联系是否通过 Ca^{2+} 介导有待进一步实验验证。

综上所述, Ang II 能够介导 TRPC6 通道蛋白激活 JAK2/STAT3 信号通路, 抑制 JAK2/STAT3 信号通路也能下调 TRPC6 通道蛋白的表达, 为肾脏疾病的研究提供了一个新的方向。

参考文献

- [1] 任献国,何旭,杜丽芳,等.儿童紫癜性肾炎临床病理与尿podocalyxin 的关系[J].医学研究生学报,2013,26(3):265-9.
- [2] Huang H, You Y, Lin X, et al. Inhibition of TRPC6 signal pathway alleviates podocyte injury induced by TGF- β 1[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41(1): 163-72.
- [3] 李涛,邓芳,张晓翠,等.血管紧张素原在儿童过敏性紫癜肾炎发生发展中的作用[J].中国现代医学杂志,2017,27(16):53-7.
- [4] Sonneveld R, van der Vlag J, Baltissen M P, et al. Glucose specifically regulates TRPC6 expression in the podocyte in an AngII-dependent manner[J]. Am J Pathol, 2014, 184(6): 1715-26.
- [5] Soriano S, Serrano A, Hernanz-Falcón P, et al. Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during chemotaxis and calcium flux responses[J]. Eur J Immunol, 2010, 33(5): 1328-33.
- [6] Hanamura K, Tojo A, Fujita T. Urinary and glomerular podocytes in patients with chronic kidney diseases[J]. Clin Exp Nephrol, 2014, 18(1): 95-103.
- [7] Inoue K, Tian X, Velazquez H, et al. Inhibition of endocytosis of clathrin-Mediated angiotensin II receptor type 1 in podocytes augments glomerular injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30(12): 2307-20.
- [8] Paola K, Canales C P, Pamela K, et al. Podocyte-specific overexpression of eild type or mutant trpc6 in mice is sufficient to cause glomerular disease[J]. PLoS One, 2010, 5(9): 12859.
- [9] Grahammer F, Schell C, Huber T B. The podocyte slit diaphragm: from a thin grey line to a complex signalling hub[J]. Nat Rev Nephrol, 2013, 9(10): 587-98.
- [10] Verheijden K A T, Sonneveld R, Bakker-van Bebber M, et al. The calcium-dependent protease calpain-4 links TRPC6 activity to podocyte injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2018, 29(8): 2099-109.
- [11] Qi Q R, Yang Z M. Regulation and function of signal transducer and activator of transcription 3[J]. World J Biol Chem, 2014, 5(2): 231-9.
- [12] Jiang X, Guo C X, Zeng X J, et al. A soluble receptor for advanced glycation end-products inhibits myocardial apoptosis induced by ischemia/reperfusion via the JAK2/STAT3 pathway[J]. Apoptosis, 2015, 20(8): 1033-47.
- [13] Chen J F, Zhang W, Xu Q, et al. Ang-(1-7) protects HUVECs from high glucose-induced injury and inflammation via inhibition of the JAK2/STAT3 pathway[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(5): 2865-78.
- [14] Kandalam U, Clark M A. Angiotensin II activates JAK2/STAT3 pathway and induces interleukin-6 production in cultured rat brain-stem astrocytes[J]. Regul Pept, 2010, 159(1-3): 110-6.
- [15] Rachubik P, Szrejder M, Rogacka D, et al. The TRPC6-AMPK pathway is involved in cytoskeleton reorganization and glucose uptake in podocytes[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(1): 393-410.

The discussion on mechanism

of JAK2/STAT3 pathway and TRPC6 channel in induced podocyte

Wu Man, Wang Xianhe, Gao Hui, et al

(Dept of Pediatric, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the interaction of JAK2/STAT3 pathway and transient receptor potential channel 6 (TRPC6) signaling pathway in Podocyte induced by Angiotensin II (Ang II). **Methods** Podocyte in mice was treated by the Ang II, Ang II + chlorine mitotane, Ang II + AG490, and Ang II + SKF96365. The expression levels of TRPC6, JAK2/STAT3 protein and mRNA were detected by Western blot and qRT-PCR. The secretion of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) was detected by ELISA. **Results** The expression of JAK2/STAT3, TRPC6, TNF- α and IL-6 in Ang II injury group was higher than those in control group ($P < 0.05$). The expression of JAK2/STAT3, TRPC6, TNF- α and IL-6 in Ang II + chlorine mitotane group was lower than those in Ang II injury group ($P < 0.05$). The expression of JAK2/STAT3, TRPC6, TNF- α and IL-6 in Ang II + AG490 group was lower than those in Ang II injury group ($P < 0.05$). The expression of JAK2/STAT3, TRPC6, TNF- α and IL-6 in Ang II + SKF96365 group was lower than those in Ang II injury group ($P < 0.05$). **Conclusion** Ang II can activate JAK2/STAT3 pathway by TRPC6, and the expression of TRPC6 can be cut by the inhibition of JAK2/STAT3. There is a positive feedback mechanism between JAK2/STAT3 and TRPC6.

Key words podocyte; JAK2 / STAT3 channel; transient receptor potential channel 6; angiotensin II