

PI3K/AKT 通路与 TRPC6 通道在 Ang II 诱导足细胞损伤中的相互作用

王先鹤¹ 吴 慢¹ 邓 芳^{1,2} 高 慧¹

摘要 目的 探讨磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT) 通路与瞬时受体电位阳离子通道蛋白 6(TRPC6) 在血管紧张素 II(Ang II) 诱导的肾小球足细胞损伤过程中的作用及其可能机制。方法 体外培养小鼠肾小球足细胞, 分别利用 Ang II、氯沙坦、PI3K/AKT 通路抑制剂(LY294002)、TRPC6 通道阻滞剂(SKF96365) 进行处理, 将细胞分为空白对照组、Ang II 组、Ang II + 氯沙坦组、氯沙坦组、Ang II + LY294002 组、LY294002 组、Ang II + SKF96365 组、SKF96365 组, 采用 qRT-PCR 检测各分组细胞 TRPC6 mRNA 的变化。采用 Western blot 检测各分组细胞 AKT、磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)、TRPC6 蛋白质表达的变化。采用 Hoechst 33258 染色法检测各组足细胞凋亡情况。结果 与空白对照组相比, Ang II 组 AKT 磷酸化水平降低, TRPC6 的表达升高, 足细胞凋亡增加($P < 0.05$)。与 Ang II 组相比: Ang II + SKF96365 组 AKT 磷酸化水平升高, TRPC6 的表达下降, 足细胞凋亡减少($P < 0.05$); Ang II + LY294002 组 AKT 磷酸化水平减少, 足细胞凋亡增加($P < 0.05$); Ang II + 氯沙坦组 AKT 磷酸化水平升高, TRPC6 的表达下降, 足细胞凋亡减少($P < 0.05$)。结论 Ang II 可能通过激活 TRPC6 通道进而抑制 PI3K/AKT 通路的激活而导致足细胞损伤。

关键词 血管紧张素 II; 足细胞; 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B; 瞬时受体电位阳离子通道蛋白 6

中图分类号 R 363; R 725

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)06-0882-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.009

众所周知, 足细胞是肾小球滤过膜的重要组成部分, 其结构的损伤和功能的改变都会影响肾小球滤过膜的通透性。肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS) 在维持肾脏生理功能及肾

脏疾病的发生、发展过程中发挥着重要作用。血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II) 是 RAS 的主要效应分子, 在足细胞损伤以及蛋白尿的发生过程中发挥主要作用。足细胞表达的瞬时受体电位阳离子通道蛋白 6(transient receptor potential cation channel protein 6, TRPC6) 是一种非选择性阳离子通道, 属于足细胞裂孔膜蛋白的一种。磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路是足细胞肌动蛋白细胞骨架动力学的重要调节剂, 该信号通路的激活, 是维持足细胞功能完整性的重要组成部分^[1]。该研究旨在进一步探讨 PI3K/AKT 信号通路与 TRPC6 通道在 Ang II 诱导的肾小球足细胞损伤中的相互作用, 为肾小球疾病的诊治和用药新靶点的研究提供新的思路及依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 小鼠足细胞 MPC5 细胞株购自北京北纳创联生物技术研究院; DMEM 低糖培养基购自美国 HyClone 公司; 胎牛血清(FBS) 购自以色列 BI 公司; Ang II 购自美国 Sigma 公司; 氯沙坦(货号: ab120997)、PI3K/AKT 通路抑制剂(货号: LY294002)、TRPC6 通道阻滞剂(货号: SKF96365)、兔抗磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, p-AKT) 抗体购自英国 Abcam 公司; 兔抗 AKT、TRPC6 抗体购自美国 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 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 增强化学发光(ECL) 试剂盒购自上海 Tanon 公司; 反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司; 实时荧光 PCR 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Hoechst 33258 染色试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 足细胞的培养 将 MPC5 足细胞置于含 1% 的青链霉素、10% 胎牛血清的 DEME 低糖培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养, 每 2 d

2021-03-07 接收

基金项目: 安徽省公益性技术应用研究联动计划项目(编号: 1704f0804027); 安徽省教育厅 2017 年度高校学科拔尖人才学术资助项目(编号: gxbjZD07); 2020 年安徽省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: 王先鹤, 男, 硕士研究生;

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

换液 1 次,待培养瓶中细胞增殖至 80% 左右时接种到 6 孔板或 12 孔板中,使每孔细胞数量达到 80% 后用于进一步实验。

1.2.2 实验分组 根据实验目的将足细胞进行分组:① 空白对照组,空白处理。② Ang II 组:加入 Ang II,使其浓度保持在 $1 \mu\text{mol/L}$ 。③ Ang II + 氯沙坦组:加入 Ang II 和氯沙坦,使其浓度均保持在 $1 \mu\text{mol/L}$ 。④ 氯沙坦组:加入氯沙坦,使其浓度保持在 $1 \mu\text{mol/L}$ 。⑤ Ang II + LY294002 组:加入 Ang II 和 LY294002,使其浓度分别保持在 $1 \mu\text{mol/L}$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$ 。⑥ LY294002 组:加入 LY294002,使其浓度保持在 $10 \mu\text{mol/L}$ 。⑦ Ang II + SKF96365 组:加入 Ang II 和 SKF96365,使其浓度分别保持在 $1 \mu\text{mol/L}$ 和 $40 \mu\text{mol/L}$ 。⑧ SKF96365 组:加入 SKF96365,使其浓度保持在 $40 \mu\text{mol/L}$ 。将上述分组细胞置于培养箱继续培养 24 h 后进行试验。

1.2.3 qRT-PCR 反应 采用 TRIzol Reagent 试剂 (1 ml/孔) 提取各组足细胞中的总 RNA,并以提取的 RNA 样本为模板反转录为 cDNA。采用 SYBR Green 法对 cDNA 样品进行实时荧光定量 PCR。反应条件为: 95°C 预变性 10 min 后进入循环; 95°C 、10 s、 60°C 、30 s 扩增 40 个循环; 每组设 3 个复孔,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析相对表达量。反应引物合成序列为: $\beta\text{-actin}$, (F) $5'\text{-CATCCTCATGAAGATCCTGACC-3'}$, (R) $5'\text{-CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC-3'}$; TRPC6, (F) $5'\text{-CTTCC TGGCTCTCATATACTGG-3'}$, (R) $5'\text{-TGTGCTACAACTTCATGAACG-3'}$ 。

1.2.4 Western blot 实验 采用 Western blot 测定足细胞中 AKT、p-AKT、TRPC6 蛋白质表达的变化。将细胞培养板置于冰上, PBS 清洗后, 收集细胞并且提取足细胞总蛋白, BCA 法测定各组蛋白的浓度, 按照蛋白定量的结果上样, 经过 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 恒定电流转至 NC 膜上, 然后放入 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 经 TBST 洗膜, 放入一抗 AKT (1 : 1 000)、p-AKT (1 : 1 000)、TRPC6 (1 : 1 000) 中 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜, 室温下孵育羊抗兔二抗 (1 : 5 000) 2 h, 再次 TBST 洗膜后, 加入 ECL 显影液进行显色曝光, 通过化学发光检测系统曝光记录图片并分析条带灰度值。以 $\beta\text{-actin}$ 为内参照。

1.2.5 Hoechst 33258 染色法 采用 Hoechst 33258 染色法检测足细胞凋亡情况。将足细胞接种于放有玻片的 12 孔板中, 待细胞接种 24 h 后, 去除培养液, 用 PBS 洗涤 3 遍。室温下用 4% 多聚甲醛固定细胞 5 min, PBS 洗涤 3 次。随后加入适量 Hoechst

33258 染色液覆盖玻片, 置于 37°C 孵箱孵育 20 min 后, 吸除 Hoechst 33258 染色液, 用 PBS 洗涤 3 次。最后进行封片, 在荧光显微镜下观察。当细胞发生凋亡时, 在荧光显微镜下观察会看到凋亡细胞的细胞核呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计学处理, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述分布特征, 各组间均数比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 均数之间的两两比较用 SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang II 及 SKF96365 加药处理后对足细胞 TRPC6 蛋白及 PI3K/AKT 通路的影响 通过 qRT-PCR 检测各组细胞 TRPC6 mRNA 表达量, 结果显示: 与空白对照组相比, Ang II 组的 TRPC6 mRNA 表达增多 ($F = 25.460, P < 0.01$); 与 Ang II 组相比, Ang II + SKF96365 组的 TRPC6 mRNA 表达减少 ($F = 16.431, P < 0.01$), 差异有统计学意义, 见图 1。Western blot 测定各组细胞 TRPC6、AKT、p-AKT 蛋白表达量, 结果显示: 与空白对照组相比, Ang II 组的 TRPC6 蛋白表达增多 ($F = 18.750, P < 0.05$); 与 Ang II 组相比, Ang II + SKF96365 组 TRPC6 的蛋白表达减少 ($F = 13.596, P < 0.01$), 差异有统计学意义。各组细胞 AKT 的表达差异无统计学意义。与空白对照组相比, Ang II 组 AKT 的磷酸化水平降低 ($F = 15.610, P < 0.01$); 与 Ang II 组相比, Ang II + SKF96365 组 AKT 的磷酸化水平升高 ($F = 33.839, P < 0.05$), 差异均有统计学意义, 见图 2。

2.2 Ang II 及 LY294002 加药处理后对足细胞 TRPC6 蛋白及 PI3K/AKT 通路的影响 通过 qRT-

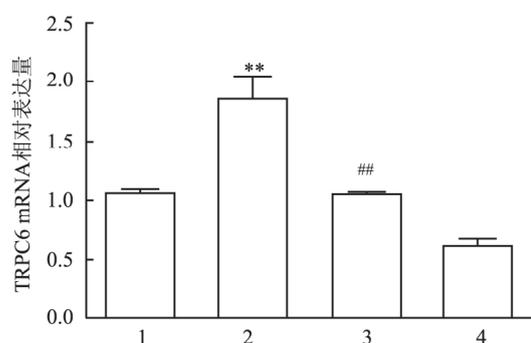


图 1 各组足细胞 TRPC6 mRNA 表达量

1: 空白对照组; 2: Ang II 组; 3: Ang II + SKF96365 组; 4: SKF96365 组; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 Ang II 组比较: ## $P < 0.01$

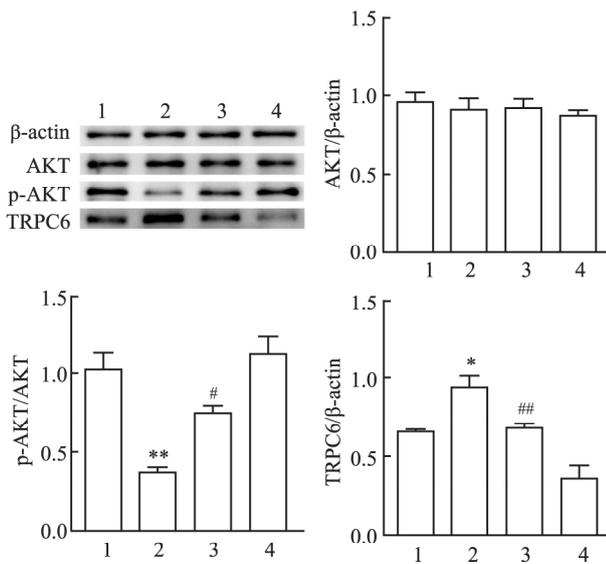


图2 各组足细胞 AKT、p-AKT、TRPC6 蛋白表达量

1: 空白对照组; 2: Ang II 组; 3: Ang II + SKF96365 组; 4: SKF96365 组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Ang II 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

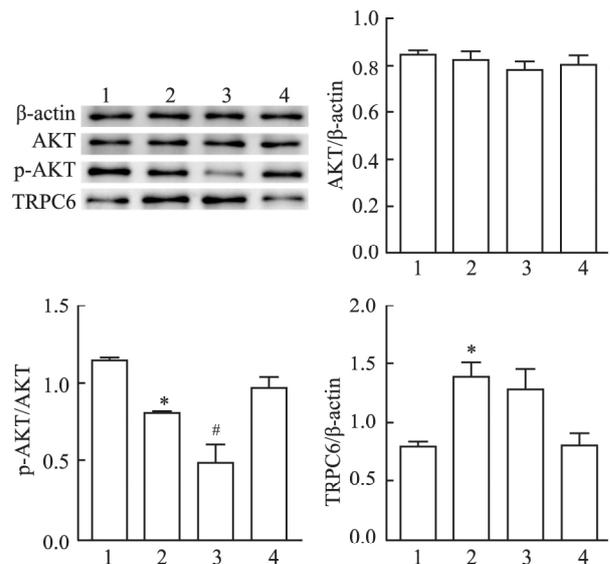


图4 各组足细胞 AKT、p-AKT、TRPC6 蛋白表达量

1: 空白对照组; 2: Ang II 组; 3: Ang II + LY294002 组; 4: LY294002 组; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 Ang II 组比较: # $P < 0.05$

PCR 检测各组细胞 TRPC6 mRNA 表达量,结果显示:与空白对照组相比,Ang II 组的 TRPC6 mRNA 表达增多 ($F = 27.011, P < 0.01$),差异有统计学意义;与 Ang II 组相比较,Ang II + LY294002 组 TRPC6 mRNA 表达差异无统计学意义。见图 3。Western blot 测定各组细胞 TRPC6、AKT、p-AKT 蛋白表达量,结果显示:与空白对照组相比,Ang II 组的 TRPC6 蛋白表达增加 ($F = 6.699, P < 0.05$),差异有统计学意义;与 Ang II 组相比较,Ang II + LY294002 组 TRPC6 蛋白表达差异无统计学意义。各组细胞 AKT 的表达差异无统计学意义。与空白对照组相比,Ang II 组 AKT 的磷酸化水平降低 ($F = 16.371, P < 0.05$);与 Ang II 组相比,Ang II + LY294002 组 AKT 的磷酸化水平降低 ($F = 33.839, P < 0.05$),差异有统计学意义。见图 4。

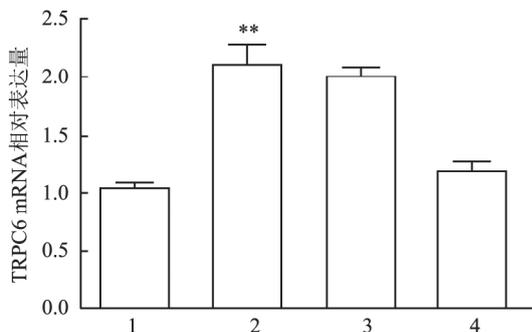


图3 各组足细胞 TRPC6 mRNA 表达量

1: 空白对照组; 2: Ang II 组; 3: Ang II + LY294002 组; 4: LY294002 组; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$

2.3 Ang II 及氯沙坦加药处理后对足细胞 TRPC6 蛋白及 PI3K/AKT 通路的影响 通过 qRT-PCR 检测各组细胞 TRPC6 mRNA 表达量,结果显示:与空白对照组相比,Ang II 组 TRPC6 mRNA 表达增多 ($F = 7.116, P < 0.05$);与 Ang II 组相比,Ang II + 氯沙坦组 TRPC6 mRNA 表达减少 ($F = 18.713, P < 0.05$),差异有统计学意义。见图 5。Western blot 测定各组细胞 TRPC6、AKT、p-AKT 蛋白表达量,结果显示:与空白对照组相比,Ang II 组的 TRPC6 蛋白表达增多 ($F = 18.001, P < 0.01$);与 Ang II 组相比,Ang II + 氯沙坦组的 TRPC6 蛋白表达减少 ($F = 43.204, P < 0.01$),差异均有统计学意义。各组细胞 AKT 的表达差异无统计学意义。与空白对照组相比,Ang II 组 AKT 的磷酸化水平降低 ($F = 23.570, P < 0.01$);与 Ang II 组相比,Ang II + 氯沙坦组 AKT 的磷酸化水平升高 ($F = 25.975, P < 0.01$),差异有统计学意义。见图 6。

2.4 Ang II 及 SKF96365、LY294002、氯沙坦加药处理后对足细胞凋亡的影响 通过 Hoechst 33258 染色法进行检测各组细胞凋亡情况,图中细胞核呈致密浓染或呈碎块状致密浓染的细胞为凋亡细胞,统计各组细胞凋亡率,结果显示:与空白对照组相比,Ang II 组的细胞凋亡增多 ($F = 496.2, P < 0.05$);与 Ang II 组相比,Ang II + SKF96365 组的细胞凋亡减少 ($F = 506.3, P < 0.05$),差异均有统计

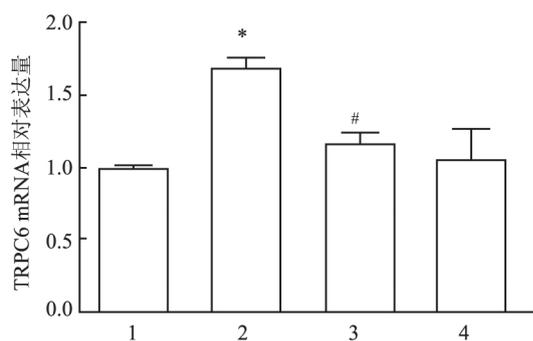


图5 各组足细胞 TRPC6 mRNA 表达

1: 空白对照组; 2: Ang II 组; 3: Ang II + 氯沙坦组; 4: 氯沙坦组;
与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 Ang II 组比较: # $P < 0.05$

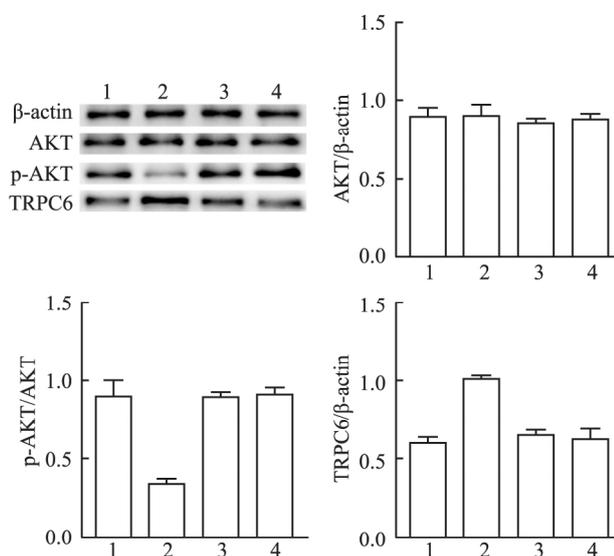


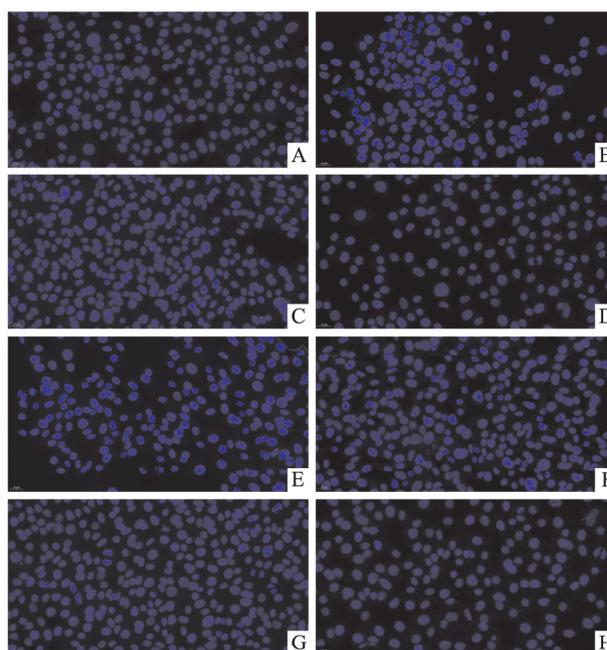
图6 各组足细胞 AKT、p-AKT、TRPC6 蛋白表达

1: 空白对照组; 2: Ang II 组; 3: Ang II + 氯沙坦组; 4: 氯沙坦组;
与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 Ang II 组比较: ## $P < 0.01$

学意义。与 Ang II 组相比, Ang II + LY294002 组的细胞凋亡增多 ($F = 1\ 261.063$, $P < 0.05$), 差异均有统计学意义。与 Ang II 组相比, Ang II + 氯沙坦组的细胞凋亡减少 ($F = 560.184$, $P < 0.05$), 差异均有统计学意义。见图 7。

3 讨论

肾小球滤过屏障由内皮细胞、基底膜和足细胞构成, 足细胞的结构与功能的正常对于肾小球滤过作用非常重要。在肾脏损伤的疾病当中, 肾小球的损伤最为突出, 而足细胞的损伤又是肾小球损伤的中心环节, 因此研究肾小球足细胞的损伤机制显得尤为重要。有研究^[2]表明过敏性紫癜性肾炎患儿发病过程中存在足细胞损伤与脱落, 且疾病活动期足细胞脱落明显增加。作为 RAS 的主要效应分子

图7 各组足细胞的凋亡情况 Hoechst 33258 染色 $\times 400$

A: 空白对照组; B: Ang II 组; C: Ang II + SKF96365 组; D: SKF96365 组; E: Ang II + LY294002 组; F: LY294002 组; G: Ang II + 氯沙坦组; H: 氯沙坦组

之一, Ang II 在正常的肾脏稳态维持中起着重要的作用^[3]。Ang II 的异常分泌与肾脏疾病的发展有关^[4]。研究^[5]报道, Ang II 可促进足细胞损伤。李涛等^[6]研究表明过敏性紫癜性肾炎患儿尿中血管紧张素原水平显著增高, 提示肾内 RAS 可能参与了过敏性紫癜性肾炎的发病。以上研究表明 Ang II 水平的升高会损伤足细胞, 本研究结果也支持此观点。

TRPC6 通道蛋白被证实属于足细胞裂孔膜蛋白之一并指出 Ang II 通过作用于 TRPC6 通道蛋白参与足细胞细胞骨架的重构^[7]。有研究^[8]指出, TRPC6 与 Podocin、Nephrin、ACTN4 及 CD2AP 等多种足细胞裂孔膜蛋白相互作用, 共同维系肾小球足细胞的结构及功能。再结合本研究, 推测 Ang II 主要通过 Ang II 受体 1 激活 TRPC6 通道蛋白的表达, 改变足细胞结构, 从而导致足细胞凋亡。

研究^[9-11]表明, PI3K/AKT 信号通路与肾脏疾病有关, PI3K/AKT 信号通路的激活可以抑制肾细胞凋亡并阻止间质纤维化的形成。AKT 被 PI3K 激活, 而 PI3K/AKT 信号通路在抗足细胞凋亡中起着至关重要的作用。本实验结果显示, 加入 Ang II 处理后, AKT 磷酸化水平降低且细胞凋亡率增加, 与 Wang et al^[12] 研究结果相一致。结果说明, TRPC6

通道蛋白与 PI3K/AKT 信号通路在 Ang II 致足细胞的凋亡过程中均发挥重要作用。

本实验采用 TRPC6 通道阻滞剂 SKF96365 阻断 TRPC6 通道蛋白的活化,研究 TRPC6 通道对于 PI3K/AKT 信号通路的影响;采用 PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002 阻断 PI3K/AKT 信号通路的激活,研究 PI3K/AKT 信号通路对 TRPC6 通道的影响。研究结果显示,Ang II + SKF96365 组与 Ang II 相比较,TRPC6 mRNA 和蛋白的表达减少,而 AKT 的磷酸化水平却相对增加,并且细胞凋亡相对减少;这说明采用 TRPC6 通道阻滞剂阻断 TRPC6 通道蛋白可以增加 PI3K/AKT 信号通路的激活,从而减少细胞凋亡。从 Ang II + LY294002 组与 Ang II 相比较可以看出,加入 LY294002 处理后,足细胞 TRPC6 mRNA 和蛋白的变化差异无统计学意义,但细胞凋亡依然增多,说明抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活可以导致足细胞凋亡增加,但 PI3K/AKT 信号通路的变化对 TRPC6 通道蛋白未见影响。以上结果表明,Ang II 可能通过激活 TRPC6 通道进而抑制 PI3K/AKT 通路的激活而导致足细胞损伤。并且,本实验通过采用氯沙坦阻断 Ang II 受体 1,结果显示 AKT 磷酸化水平升高,TRPC6 的表达下降,而足细胞凋亡相对减少,进一步说明了 Ang II 激活 TRPC6 通道进而抑制 PI3K/AKT 通路的激活而导致足细胞损伤的过程中主要是通过 Ang II 受体 1 的结合而发挥作用。而对于在 Ang II 通过活化 TRPC6 通道调控 PI3K/AKT 信号通路影响足细胞凋亡的过程中其下游具体有哪些因素的参与,有待后续的研究进行探讨。

综上所述,Ang II 激活 TRPC6 通道导致足细胞损伤的过程中,可能是通过进一步抑制 PI3K/AKT 通路激活实现的。阻断 TRPC6 通道的活化,有利于 PI3K/AKT 信号通路的激活,进而减少足细胞凋亡从而起到保护足细胞的调控作用。

参考文献

- [1] Hall G, Lane B M, Khan K, et al. The human FSGS-causing ANLN R431C mutation induces dysregulated PI3K/AKT/mTOR/Rac1 signaling in podocytes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29 (8): 2110–22.
- [2] 朱颖,鹿玲. 尿足细胞标志蛋白检测对肾脏疾病的诊断价值[J]. *实用儿科临床杂志*, 2009, 24(5): 361–3.
- [3] Lewko B, Maryn A, Latawiec E, et al. Angiotensin II modulates podocyte glucose transport [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 418.
- [4] Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(2): 288–96.
- [5] Zhang L, Ren Z, Yang Q, et al. Csk regulates angiotensin II-induced podocyte apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(7): 846–55.
- [6] 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.
- [7] Winn M P, Conlon P J, Lynn K L, et al. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis [J]. *Science*, 2005, 308(5729): 1801–4.
- [8] Wieder N, Greka A. Calcium, TRPC channels, and regulation of the actin cytoskeleton in podocytes: towards a future of targeted therapies [J]. *Pediatr Nephrol*, 2016, 31(7): 1047–54.
- [9] Chen F, Sun Z, Zhu X, et al. Astilbin inhibits high glucose-induced autophagy and apoptosis through the PI3K/Akt pathway in human proximal tubular epithelial cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 1175–81.
- [10] Lin X, Jiang C, Luo Z, et al. Protective effect of erythropoietin on renal injury induced in rats by four weeks of exhaustive exercise [J]. *BMC Nephrol*, 2013, 14: 130.
- [11] Zhang Y, Chen X, Yuan L, et al. Down-regulation of IRAK1 attenuates podocyte apoptosis in diabetic nephropathy through PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 506(3): 529–35.
- [12] Wang X M, Yao M, Liu S X, et al. Interplay between the Notch and PI3K/Akt pathways in high glucose-induced podocyte apoptosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306(2): F205–13.

Study on the interaction between PI3K/AKT pathway and TRPC6 channel in Ang II-induced podocyte injury

Wang Xianhe¹, Wu Man¹, Deng Fang^{1,2}, et al

(¹Dept of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Nephrology, Anhui Provincial Children's Hospital, Hefei 230051)

Abstract Objective To investigate the role and possible mechanism between phosphatidylinositol-3-kinase/protein

网络出版时间: 2021-05-14 14:53 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210513.1449.009.html>

miR-138-5p 靶向 TCF4 调节 眼葡萄膜黑色素瘤细胞的恶性生物学行为

魏 丽¹, 连红梅², 刘 鹏¹, 刘兴华¹, 吴书一³, 刘萌萌¹

摘要 目的 探讨 miR-138-5p 与转录因子 4(TCF4) 对眼葡萄膜黑色素瘤 MuM-2B 细胞恶性生物学行为的影响。方法 miR-138-5p mimic 和 pcDNA-TCF4 分别或共转染 MuM-2B 细胞 构建小鼠体内移植瘤模型。RT-qPCR 检测细胞转染效率; 生物信息学软件预测 miR-138-3p 和 TCF4 靶向位点; 双荧光素酶报告基因实验验证靶向关系; 克隆形成实验检测细胞增殖; Transwell 实验检测细胞侵袭能力; Western blot 检测 TCF4 及上皮-间质转化(EMT) 相关蛋白表达; 免疫组化检测 Ki67、VEGF、Vimentin 在肿瘤组织中的表达。结果 与对照组相比 转染组 miR-138-5p 和 TCF4 均升高($P < 0.05$) 且 miR-138-5p 和 TCF4 是靶向关系。miR-138-5p 过表达通过

靶向 TCF4 抑制 MuM-2B 细胞增殖和侵袭力并下调 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达量, 上调 N-cadherin 蛋白表达量($P < 0.05$)。在体内移植瘤中, miR-138-5p 过表达减轻肿瘤重量($P < 0.05$), miR-138-5p 过表达下调 Ki67、VEGF、Vimentin 在肿瘤组织中阳性细胞率($P < 0.05$)。结论 miR-138-5p 过表达可下调 TCF4 水平, 进而抑制葡萄膜黑色素瘤 MuM-2B 细胞增殖、侵袭及 EMT。

关键词 miR-138-5p; 转录因子 4; MuM-2B 细胞; 克隆形成; 细胞侵袭

中图分类号 R 773.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)06-0887-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.010

2021-03-02 接收

基金项目: 2019 年度河南省医学科技攻关计划项目(编号: LHGJ20191025)

作者单位: 郑州市第三人民医院¹ 病理科、³ 中心实验室, 郑州 450045

² 郑州大学附属第三人民医院麻醉科, 郑州 450045

作者简介: 魏 丽, 女, 硕士, 副主任医师;

刘萌萌, 女, 硕士, 副主任医师, 责任作者, E-mail: lmm15538376690@163.com

眼葡萄膜黑色素瘤是成人常见的一种眼内原发性恶性肿瘤, 起源于葡萄膜黑色素细胞, 其具有易于增殖和转移的特点^[1]。在各种原发性眼部肿瘤中, 葡萄膜黑色素瘤发病率居于第二位, 仅次于视网膜母细胞瘤^[2]。据报道, 葡萄膜黑色素瘤预后较差, 常发生肝转移^[3-4]。葡萄膜黑色素瘤的发病机制目前尚不清楚, 因此进一步探讨其发病机制、提高对其

kinase B(PI3K/AKT) pathway and transient receptor potential cation channel protein 6(TRPC6) in the process of angiotensin II(Ang II)-induced glomerular podocyte injury. **Methods** Mouse glomerular podocytes were cultured *in vitro* and treated with Ang II, Losartan, PI3K/AKT pathway inhibitor(LY294002), TRPC6 channel blocker(SKF96365). The cells were divided into blank control group and Ang II group, Ang II + Losartan group, Losartan group, Ang II + LY294002 group, LY294002 group, Ang II + SKF96365 group, SKF96365 group. The qRT-PCR was used to detect the changes of TRPC6 mRNA in each group. Western blot was used to detect the changes of AKT, phosphorylated protein kinase B(p-AKT), and TRPC6 protein expression in each group. The apoptosis of podocytes was detected by Hoechst 33258 staining. **Results** Compared with the blank control group, the AKT phosphorylation level of the Ang II group decreased, the expression of TRPC6 increased, and the apoptosis of podocytes increased($P < 0.05$). Compared with the Ang II group, the AKT phosphorylation level of the Ang II + SKF96365 group increased, the expression of TRPC6 decreased, and the apoptosis of podocytes decreased($P < 0.05$); the AKT phosphorylation level of the Ang II + LY294002 group decreased, and the apoptosis of podocytes increased($P < 0.05$); the AKT phosphorylation level of the Ang II + Losartan group increased, the expression of TRPC6 decreased, and the apoptosis of podocytes decreased($P < 0.05$). **Conclusion** Ang II may induce podocyte injury by activating the TRPC6 channel and thereby inhibiting the activation of PI3K/AKT pathway.

Key words angiotensin II; podocytes; phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B; transient receptor potential cation channel protein 6