

网络出版时间:2024-04-10 14:59:47 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240410.1010.014

靶向 STAT3 通过调控糖酵解及间皮间充质转分化改善腹膜透析相关腹膜纤维化

邓启磊^{1,2}, 符姣^{1,3}, 李楠¹, 何萌萌¹, 黄大可⁴, 张培¹

摘要 目的 研究高糖对人腹膜间皮细胞系(HMrSV5)间皮-间充质转化(MMT)的影响及机制,以及药理阻断信号转导和转录激活因子(STAT3)对大鼠腹膜的保护作用。方法 将动物分为3组:假手术组(Sham组)、模型组和STAT3抑制剂组。在大鼠背侧皮肤下手术植入微型腹膜透析导管,每日注射高糖透析液诱导大鼠腹膜纤维化模型。10周后,苏木精-伊红(HE)染色观察腹膜组织病理改变,免疫组化方法检测腹膜组织转化生长因子- β 1(TGF- β 1)的表达。模拟高糖微环境对HMrSV5进行细胞培养,转染si-STAT3,Western blot方法检测STAT3蛋白和磷酸化水平及糖酵解相关代谢酶6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-双磷酸酶-3(PFKFB3)、乳酸脱氢酶A(LDHA)的表达。结果 HE染色显示STAT3抑制剂(BP-1-102)可抑制高糖透析大鼠的腹膜下组织增厚及血管增生。模型组大鼠腹膜组织TGF- β 1蛋白表达显著高于假手术组,STAT3抑制剂组大鼠腹膜TGF- β 1蛋白表达显著低于模型组($P < 0.05$)。与对照组相比,高糖诱导HMrSV5细胞STAT3激活,以及 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的上调和E-钙黏蛋白(E-cadherin)下调($P < 0.05$)。此外,高糖处理导致间皮细胞糖酵解相关代谢酶(PFKFB3、LDHA)的表达增加($P < 0.05$)。si-STAT3能有效抑制高糖诱导的间皮细胞STAT3活化,降低高糖诱导的PFKFB3、LDHA和 α -SMA高表达,同时升高E-cadherin水平($P < 0.05$)。结论 STAT3信号通路参与高糖诱导的HMrSV5过度糖酵解和MMT的发生,靶向STAT3有助于减轻大鼠腹膜透析液诱导的腹膜纤维化和血管新生。

关键词 STAT3;PFKFB3;腹膜纤维化;间皮-间充质转化;糖酵解;腹膜透析;BP-1-102

中图分类号 R 459.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0647-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.014

2024-02-21 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81900679)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院肾脏内科,合肥 230032

² 安徽医科大学附属阜阳医院肾脏内科,阜阳 236112

³ 云南省宣威市中医院,宣威 655499

⁴ 安徽医科大学基础医学院综合实验中心,合肥 230032

作者简介:邓启磊,男,硕士研究生;

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

腹膜透析作为终末期肾病患者的一种治疗方式,其使用在全球范围内正在增加^[1]。腹膜透析相关性腹膜纤维化是腹膜透析最常见的并发症之一。信号转导和转录激活因子(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)参与多种生物学过程,对细胞增殖、存活、分化和血管生成起到重要调节作用^[2-3]。在高糖腹膜透析液诱导的小鼠腹膜纤维化模型和高糖刺激的间皮细胞以及脱落的人腹膜间皮细胞中发现STAT3信号活化,且对STAT3的药理抑制可通过调控缺氧诱导因子-1 α 减轻间皮细胞的上皮-间充质转化^[4]。间皮-间充质转化(mesothelial-mesenchymal transition,MMT)是发生于胸膜、腹膜等间皮细胞的II型上皮-间充质转化,在致腹膜纤维化等过程中发挥重要作用。暴露于葡萄糖腹膜透析液会导致间皮细胞过度糖酵解,促进细胞表型转变和增殖^[5]。该研究旨在探讨高糖是否通过激活STAT3上调HMrSV5糖酵解相关酶的表达和促进MMT,阐明STAT3与糖酵解的交互对话机制以及抑制STAT3对腹膜透析过程中腹膜纤维化和血管新生的影响,为腹膜纤维化防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要实验材料

1.1.1 实验动物 健康雄性Sprague-Dawley大鼠18只,180~200g,SPF级,4~6周龄,由安徽医科大学实验动物中心提供(批准号:LLSC20211055)。整个实验期间,给予所有大鼠标准饮食,自由饮水,适应性饲养1周后开始正式实验,整个实验周期为10周。

1.1.2 实验药物和主要试剂 STAT3抑制剂BP-1-102(S776901)购自Selleck公司,化学式: $C_{29}H_{27}F_5N_2O_6S$,分子量:626.59,BP-1-102是高效的特异性的STAT3小分子抑制剂,可抑制Stat3与pTyr肽段的相互作用和STAT3的激活。人腹膜间皮细胞系(HMrSV5)来源于上海子实生物科技有限公司。通用二步法试剂盒PV-6000、DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒购自北京中杉金桥公司;青霉素/

链霉素溶液、胰蛋白酶购自上海碧云天生物技术有限公司;胎牛血清、MEM 培养基购自美国 Gibco 公司;葡萄糖购自美国 Sigma 公司。兔抗 p-STAT3 克隆抗体和鼠抗 STAT3 多克隆抗体购自美国 CST 公司;兔抗 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-双磷酸酶-3(6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3, PFKFB3)、乳酸脱氢酶 A(lactate dehydrogenase A, LDHA)购自美国 Affinity Biosciences 公司;鼠抗 β -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔/鼠 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、BCA 蛋白测定试剂盒、无蛋白快速封闭液均购自上海雅酶生物科技有限公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 高糖腹膜透析液诱导建立腹膜纤维化大鼠模型 所有雄性 SD 大鼠在安徽医科大学实验动物中心的特定无病原体条件下饲养。将动物分为 3 组($n=6$):假手术组、模型组和 STAT3 抑制剂组。在大鼠背侧皮肤下手术植入微型腹膜透析导管,导管尖端置于腹膜内。假手术组:除了植入微型腹膜透析导管外,不进行其他任何处理;模型组:每天早晚通过腹膜透析导管注射 10 ml 含 4.25% 葡萄糖的腹膜透析液(peritoneal dialysis fluid, PDF)诱导腹膜纤维化;STAT3 抑制剂组:为了探索靶向抑制 STAT3 对腹膜纤维化的影响,STAT3 抑制剂 BP-1-102 以 1 mg/kg 的剂量溶于 10 ml 含 4.25% 葡萄糖的 PDF 中,并通过腹膜透析导管给药。10 周后,对大鼠进行腹膜平衡实验并收集大鼠腹膜组织及 PDF 用于进一步分析。

1.2.2 腹膜平衡实验 在大鼠吸入麻醉后,给予腹腔注射 20 ml 4.25% PDF,并在腹腔保留 90 min。90 min 后吸入麻醉下剪开大鼠腹腔,用注射器吸出 PDF,记录 PDF 总量,计算超滤量,超滤量=腹腔最后的出液量-20 ml。

1.2.3 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色

大鼠腹膜组织用 4% 多聚甲醛固定 48 h,包埋在石蜡中,制成 3 μ m 厚的切片,切片常规脱蜡后通过浓度梯度的二甲苯和乙醇进行洗脱再水化,然后根据制造商(美国 Sigma 公司)提供的方案进行 HE 染色。

1.2.4 免疫组化检测 大鼠腹膜组织经过脱水、透

明、包埋后制成石蜡切片,将腹膜组织切片脱蜡、再水化,用内源性过氧化物酶阻断剂封闭内源性过氧化物酶。通过高压锅修复腹膜组织表面抗原、山羊血清封闭。去除山羊血清后,将标本在 4 $^{\circ}$ C 下用 1:100 稀释 TGF- β 1 抗体,孵育过夜。第 2 天,复温后,加入二抗,使用 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色。经过脱水、透明和封片后,用正置荧光显微镜进行观察并捕获图像。

1.2.5 细胞培养 人腹膜间皮细胞系(HMrSV5)培养在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素溶液的 MEM 培养基中,所有细胞置于饱和湿度、5% CO_2 、37 $^{\circ}$ C 的温箱中常规培养。高糖处理前,将间皮细胞均匀接种至 6 孔板中培养过夜。MEM 补充为葡萄糖浓度 84、138、236 mmol/L 的高糖溶液,用于模拟高葡萄糖透析环境,这相当于目前在临床上用于腹膜透析的含有 1.5%、2.5%、4.25% 葡萄糖的腹膜透析液。

1.2.6 siRNA 转染 使用 siRNA 特异性靶序列实现基因表达的沉默。所有 siRNA 特异性靶序列均来自上海吉玛制药技术有限公司。将细胞接种至 6 孔板培养孔中,使转染时细胞密度达 60%~80%,去除孔板中的培养基,用含有 Lipofectamine 2000(In-vitrogen)的 Opti-MEM 将靶序列或阴性对照(NC)瞬时转染 HMrSV5 细胞。分组进行处理:对照组、HG 组(236 mmol/L 葡萄糖)、HG + NC siRNA 组、HG + STAT3 siRNA 组,其中,siRNA 转染 6 h 后换成完全培养基,加葡萄糖(236 mmol/L)刺激 48 h 后检测相关蛋白(STAT3、p-STAT3、PFKFB3、LDHA、E-cadherin、 α -SMA)的表达。

1.2.7 免疫印迹分析 将 6 孔板置于冰上,PBS 清洗细胞后,使用含有 2% 蛋白酶抑制剂、2% 磷酸酶抑制剂和 2% 乙二胺四乙酸的 RIPA 缓冲液裂解后提取总蛋白,测定各组总蛋白浓度。用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,然后转移到 PVDF 膜。用无蛋白快速封闭液封闭 45 min,将蛋白质与一抗(抗 STAT3 1:1 000、抗 p-STAT3 1:1 000、抗 E-cadherin 1:1 000、抗 α -SMA 1:1 000、抗 LDHA 1:1 000、抗 PFKFB3 1:1 000、抗 β -actin 1:5 000)在 4 $^{\circ}$ C 下过夜。次日,用 TBST 洗涤 3 次,然后与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗室温下孵育 45 min。ECL 试剂用于在全自动化学发光成像仪上检测抗体-抗原复合物。对获得的条带进行可视化和分析,结果用内源性参照物 β -actin 进行标准化。

1.3 统计学处理 采用 Graphpad Prism 8 软件、Image J 软件进行分析,数据表示为平均值 \pm 标准误。使用 Levene 方法进行方差齐性检验,多组数据间的差异通过单因素方差分析(one-way ANOVA)比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠腹膜结构和功能的改变 SD 大鼠每天注射高糖腹膜透析液,10 周后发现假手术组腹膜组织结构未见异常,模型组腹膜组织病理改变明显,表现为腹膜下区域增厚、胶原纤维沉积和血管新生,提示大鼠腹膜纤维化模型已成功构建。STAT3 抑制剂组腹膜下区域增厚和血管新生情况较模型组明显改善。免疫组化染色显示,假手术组腹膜下区域 TGF- β 1 表达较弱,模型组表达明显高于 Sham 组($F = 200.3, P < 0.05$),STAT3 抑制剂组腹膜组织及腹膜下区域 TGF- β 1 表达明显低于模型组($P < 0.05$)。腹膜平衡实验结果显示,假手术组超滤量均值为 8.3 ml,模型组的超滤量均值为 3.3 ml($F = 71.91, P$

< 0.05),腹膜组织超滤功能受损,STAT3 抑制剂组超滤量均值为 5.8 ml,功能较模型组改善($P < 0.05$),见图 1、2。

2.2 高糖激活 HMrSV5 细胞中的 STAT3 使用蛋白质印迹分析探讨高糖对间皮细胞(HMrSV5) STAT3 活化的影响。蛋白质印迹结果表明,在不同浓度葡萄糖(84、138、236 mmol/L)刺激后,STAT3 磷酸化水平较对照组升高,差异有统计学意义($F = 55.54, P < 0.05$),其中 236 mmol/L 葡萄糖处理的 HMrSV5 细胞中 STAT3 磷酸化最明显,见图 3。

2.3 高糖引起 HMrSV5 细胞糖酵解增加和 MMT

使用蛋白质印迹分析探索高糖对人腹膜间皮细胞(HMrSV5)糖酵解和 MMT 的影响。结果表明,HMrSV5 细胞在 138、236 mmol/L 的葡萄糖环境培养 48 h 后,LDHA 蛋白表达升高($F = 9.859, P < 0.05$),高糖(236 mmol/L)诱导 HMrSV5 细胞 PFKFB3 蛋白的表达增加($F = 13.36, P < 0.05$)。同时测定与 MMT 相关的上皮间黏附蛋白标志物 E-cadherin 和间充质标志物 α -SMA 的表达。蛋白印迹

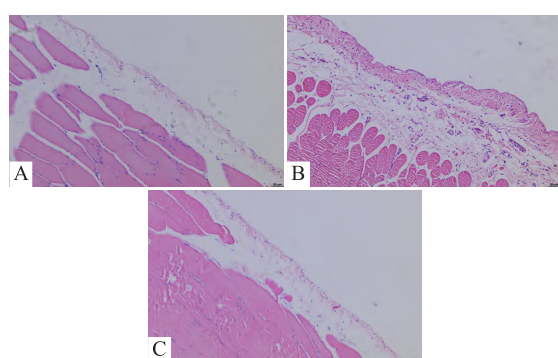


图1 各组大鼠腹膜组织 HE 染色 $\times 100$

A:假手术组;B:模型组;C:STAT3 抑制剂组;D:各组大鼠腹膜下区域厚度的定量分析;E:各组大鼠腹膜下区域中血管数量的定量分析;与假手术组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:### $P < 0.001$

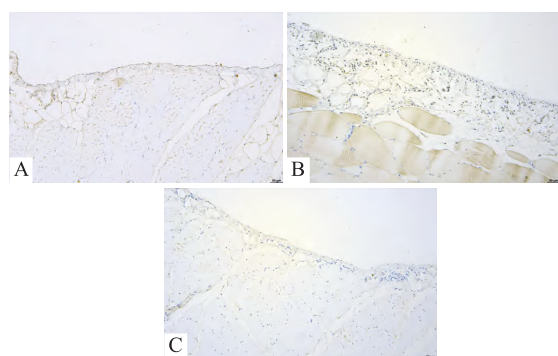
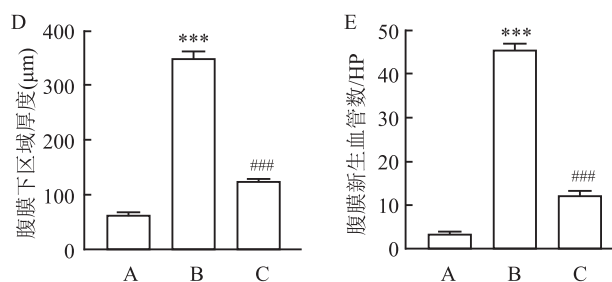
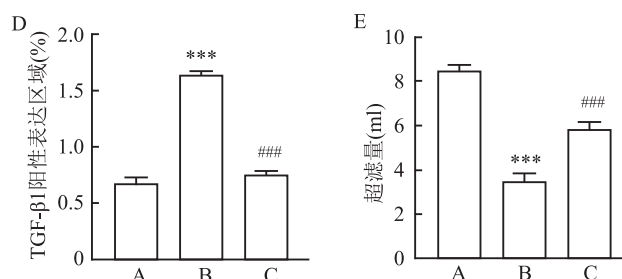


图2 免疫组化检测各组大鼠腹膜组织 TGF- β 1 表达情况 $\times 100$

A:假手术组;B:模型组;C:STAT3 抑制剂组;D:腹膜组织 TGF- β 1 的表达;E:大鼠腹膜超滤量的变化;与假手术组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:### $P < 0.001$



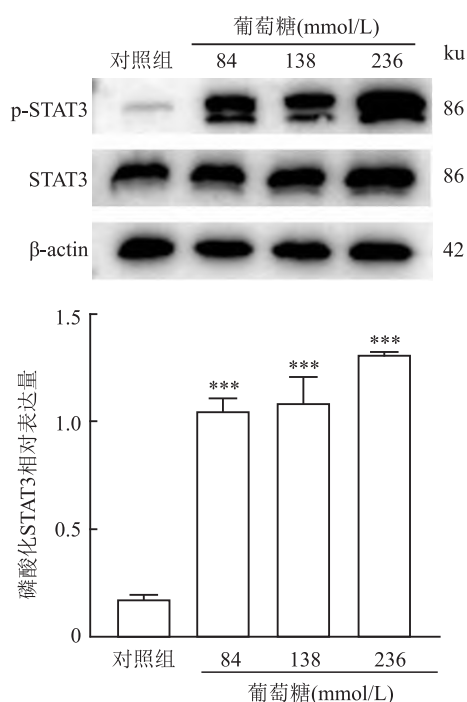


图3 蛋白质印迹法检测不同浓度高糖作用于 HMrSV5 细胞 48 h p-STAT3、STAT3 蛋白的表达水平
与对照组比较: *** $P < 0.001$

分析显示高糖 (138、236 mmol/L) 培养基处理 HMrSV5 细胞上调 α -SMA 的表达 ($F = 33.81, P < 0.05$), 高糖 (236 mmol/L) 处理下调 E-cadherin 的表达 ($F = 4.457, P < 0.05$)。由此推断 236 mmol/L 葡萄糖可引起 HMrSV5 细胞高糖酵解和 MMT, 见图 4。

2.4 STAT3 siRNA 抑制高糖环境中 STAT3 信号通路的激活 与对照组 (未处理的细胞) 相比, HG 组 (236 mmol/L 葡萄糖处理的细胞) 的 STAT3 的磷酸化蛋白增多 ($F = 29.20, P < 0.05$); HG + NC siRNA 组磷酸化 STAT3 较高糖组无变化 ($P > 0.05$); 与 HG + NC siRNA 组相比, HG + STAT3 siRNA 组降低高糖诱导的 HMrSV5 细胞中 STAT3 蛋白磷酸化 ($P < 0.05$), 见图 5。

2.5 STAT3 siRNA 抑制高糖诱导的糖酵解相关代谢酶的高表达和 MMT 使用蛋白质印迹检测 PFKFB3 和 LDHA 的表达变化, 结果显示高糖刺激后可以使 PFKFB3 和 LDHA 表达上调 ($F = 40.92, P < 0.05$; $F = 22.74, P < 0.05$)。此外, 高糖刺激后 E-cadherin 表达下调 ($F = 14.67, P < 0.05$), α -SMA 表达上调 ($F = 9.589, P < 0.05$)。HG + NC siRNA 组上述相关蛋白的表达较 HG 组无变化。STAT3 siRNA 预处理的 HMrSV5 细胞中 PFKFB3、LDHA 和 α -SMA 的表达较 HG + NC siRNA 组下降, E-cadherin

的表达较 HG + NC siRNA 组上调, 见图 6。

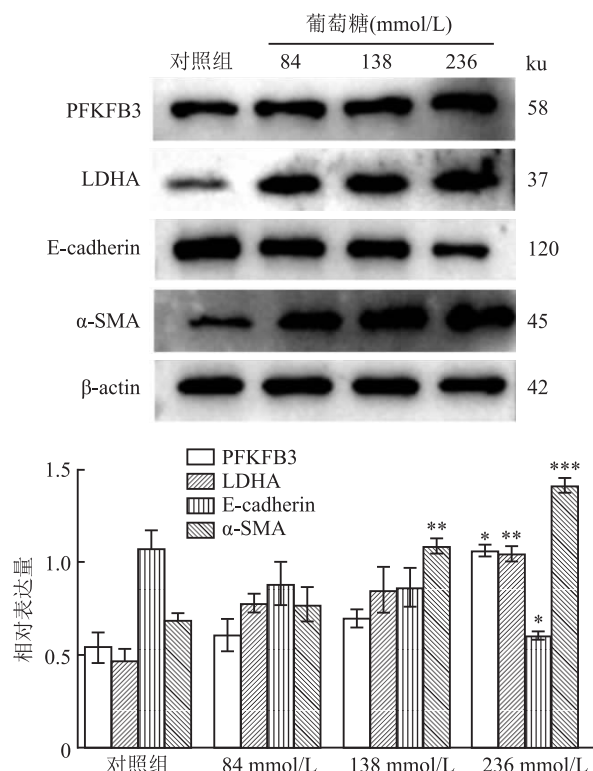


图4 蛋白质印迹法检测不同浓度高糖 (84、138、236 mmol/L) 作用于 HMrSV5 细胞 48 h PFKFB3、LDHA、E-cadherin、 α -SMA 蛋白的表达水平
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

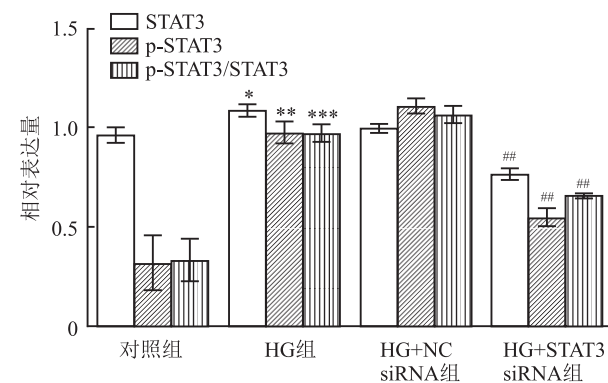
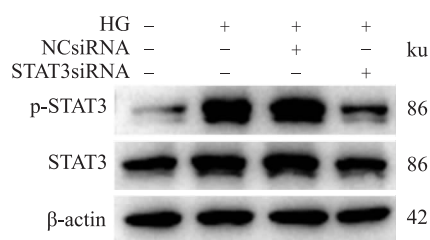


图5 敲低 STAT3 对高糖刺激的 HMrSV5 中相关蛋白的影响
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 HG + NC siRNA 组比较: ## $P < 0.01$

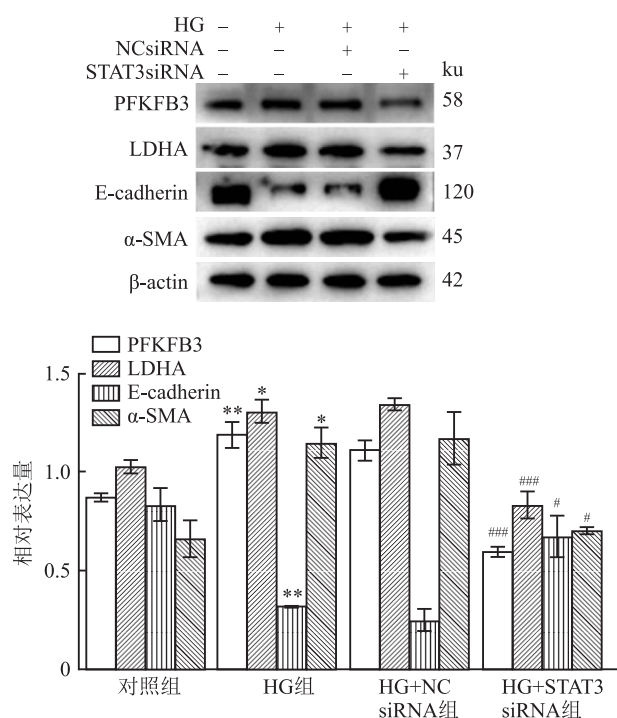


图6 敲低 STAT3 对高糖刺激的 HMrSV5 中糖酵解与 MMT 相关蛋白的影响

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 HG + NC siRNA 组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$

3 讨论

完整的腹膜结构和功能有助于达到良好的腹膜透析效果。长期腹膜透析治疗中的各种不利因素损伤腹膜结构和功能,最终导致腹膜纤维化。STAT3 是一种关键的信号蛋白,参与多种生物学过程,包括细胞增殖、分化、纤维化和血管生成^[2-3]。研究^[6]表明,抑制肾小管上皮细胞中的 STAT3 可以预防链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠肾纤维化和肾病。BET-溴结构域抑制剂 JQ-1 可抑制 STAT3 信号的激活进而部分改善日本血吸虫卵诱导的肝纤维化^[7]。STAT3 在肾脏、腹膜以及肝脏等器官纤维化过程中激活,介导器官损伤^[4, 6, 8-9]。本研究通过构建腹膜透析动物模型,模拟人体长期腹膜透析环境,用以阐明 STAT3 参与腹膜纤维化的分子机制。HE 染色结果显示腹膜纤维化大鼠模型中胶原纤维积累、皮下区域增厚和血管密度增加。免疫组化显示腹膜中 TGF- β 1 (一种关键的纤维化因子) 阳性表达增加。这些变化与接受长期腹膜透析的患者中发现的腹膜透析相关腹膜纤维化的关键病理特征相似^[10]。本研究显示 STAT3 抑制剂 BP-1-102 显著降低血管密度、减轻 TGF- β 1 阳性表达和皮下区域增厚,说明 STAT3 信号传导的药理学抑制可减弱高糖腹膜透

析液介导的腹膜纤维化及血管新生。在腹膜纤维化患者中,由于间皮细胞的丢失、细胞外基质聚集、炎性细胞的渗出和血管新生,最终导致腹膜超滤衰竭。在模型组大鼠,发现超滤量降低,STAT3 抑制剂 BP-1-102 明显改善透析所致的超滤量的减少,证明抑制 STAT3 信号传导有助于改善透析所致的腹膜超滤损伤。

腹膜纤维化的发展过程中,可以检测到与上皮-间充质转化相类似的间皮细胞转变的一种特殊形式,称为 MMT^[11]。上皮-间充质转化过程中上皮细胞的极性消失,转移和侵袭能力增强,同时伴有上皮细胞标志物的缺失和间充质标志物的获得,E-cadherin 和 α -SMA 为腹膜间皮细胞 MMT 的特异性生化标志物。本研究利用高糖刺激腹膜间皮细胞,以此模拟腹膜透析时的高糖微环境,结果显示高糖诱导间皮细胞 E-cadherin 的低表达和 α -SMA 的高表达,证明高糖刺激诱导间皮细胞发生 MMT。通过抑制腹膜透析刺激的 MMT 来预防腹膜纤维化已成为腹膜纤维化机制研究的主要策略。对正常腹膜活检中获得的间皮细胞和腹膜透析治疗患者的流出物的单细胞转录组进行分析,发现 MMT 的发展伴随着糖酵解相关代谢酶的改变,暴露于腹膜透析液会导致间皮细胞过度糖酵解,阻断过度糖酵解在两种类型的间皮细胞中都极大地抑制了 MMT^[5]。进而,本研究检测间皮细胞中糖酵解相关代谢酶的表达,结果显示高糖诱导间皮细胞高表达 PFKFB3 和 LDHA,同时伴随 STAT3 激活。研究^[12]表明,缺氧条件下 STAT3 通过下调 LINC00671 的表达激活 LDHA,调节甲状腺癌的糖酵解、生长和转移。在肝细胞癌中,靶向抑制 STAT3 可阻止糖酵解关键酶的表达,并诱导免疫原性细胞死亡从而重建肿瘤免疫微环境^[13]。LCN2 可通过激活 JAK2/STAT3 信号通路促进有氧糖酵解,加速肝癌细胞的恶性增殖^[14]。本研究中用 siRNA 影响细胞 STAT3 的基因表达后,下调高糖诱导的糖酵解相关代谢酶 PFKFB3 和 LDHA 的高表达,表明靶向抑制 STAT3 可以调控高糖诱导的腹膜间皮细胞糖酵解活化,同时且逆转高糖诱导间皮细胞 MMT 标志性蛋白 E-cadherin 和 α -SMA 的表达。本研究结果表明,siRNA 抑制 STAT3 信号通路通过下调间皮细胞 PFKFB3、LDHA 的表达减轻 HMrSV5 细胞 MMT。

本研究表明抑制 STAT3 可部分减缓腹膜纤维化和血管新生的进展,高糖微环境中 STAT3 信号通路的激活在促进 HMrSV5 细胞 MMT 过程中发挥促

进作用,而抑制 STAT3 信号通路的激活能通过下调间皮细胞 PFKFB3、LDHA 的表达减轻 HMrSV5 细胞 MMT。综上所述,在腹膜纤维化中,靶向 STAT3 信号通路通过调控腹膜间皮细胞糖酵解减缓腹膜透析相关腹膜纤维化和血管新生,为腹膜纤维化防治提供新思路。

参考文献

- [1] Cho Y, Bello A K, Levin A, et al. Peritoneal dialysis use and practice patterns: An international survey study [J]. *Am J Kidney Dis*,2021,77(3):315–25.
- [2] Hanlon M M, Rakovich T, Cunningham C C, et al. STAT3 mediates the differential effects of oncostatin M and TNF α on RA synovial fibroblast and endothelial cell function [J]. *Front Immunol*, 2019,10:2056.
- [3] Lee H, Jeong A J, Ye S K. Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy [J]. *BMB Rep*,2019,52(7):415–23.
- [4] Yang X, Bao M, Fang Y, et al. STAT3/HIF-1 α signaling activation mediates peritoneal fibrosis induced by high glucose [J]. *J Transl Med*,2021,19(1):283.
- [5] Si M, Wang Q, Li Y, et al. Inhibition of hyperglycolysis in mesothelial cells prevents peritoneal fibrosis [J]. *Sci Transl Med*, 2019,11(495):eaav5341.
- [6] Zheng C, Huang L, Luo W, et al. Inhibition of STAT3 in tubular epithelial cells prevents kidney fibrosis and nephropathy in STZ-induced diabetic mice [J]. *Cell Death Dis*,2019,10(11):848.
- [7] Ding H, Yang X, Tian J, et al. JQ-1 ameliorates schistosomiasis liver fibrosis by suppressing JAK2 and STAT3 activation [J]. *Biomed Pharmacother*,2021,144:112281.
- [8] Borza C M, Bolas G, Bock F, et al. DDR1 contributes to kidney inflammation and fibrosis by promoting the phosphorylation of BCR and STAT3 [J]. *JCI Insight*,2022,7(3):e150887.
- [9] Tian S, Zhou X, Zhang M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes protect against liver fibrosis *via* delivering miR-148a to target KLF6/STAT3 pathway in macrophages [J]. *Stem Cell Res Ther*,2022,13(1):330.
- [10] Shang J, He Q, Chen Y, et al. miR-15a-5p suppresses inflammation and fibrosis of peritoneal mesothelial cells induced by peritoneal dialysis *via* targeting VEGFA [J]. *J Cell Physiol*,2019,234(6):9746–55.
- [11] Kimura Y, Ohzawa H, Miyato H, et al. MiR-29b may suppresses peritoneal metastases through inhibition of the mesothelial-mesenchymal transition (MMT) of human peritoneal mesothelial cells [J]. *Sci Rep*,2022,12(1):205.
- [12] Huo N, Cong R, Sun Z J, et al. STAT3/LINC00671 axis regulates papillary thyroid tumor growth and metastasis *via* LDHA-mediated glycolysis [J]. *Cell Death Dis*,2021,12(9):799.
- [13] Li Y, Song Z, Han Q, et al. Targeted inhibition of STAT3 induces immunogenic cell death of hepatocellular carcinoma cells *via* glycolysis [J]. *Mol Oncol*,2022,16(15):2861–80.
- [14] Han B, An Z, Gong T, et al. LCN2 promotes proliferation and glycolysis by activating the JAK2/STAT3 signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2024, 196(2):717–28.

Targeting STAT3 alleviates peritoneal fibrosis by regulating glycolysis and mesothelial-mesenchymal transition

Deng Qilei^{1,2}, Fu Jiao^{1,3}, Li Nan¹, He Mengmeng¹, Huang Dake⁴, Zhang Pei¹

(¹*Dept of Nephropathy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*Dept of Nephropathy, The Affiliated Fuyang Hospital of Anhui Medical University, Fuyang 236112;*

³*Xuanwei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xuanwei 655499;*

⁴*Comprehensive Experiment Center of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032)*

Abstract Objective To study the effect and mechanism of high glucose on mesothelial-mesenchymal transition (MMT) of peritoneal mesothelial cells (HMrSV5), and the protective effect of pharmacological blocking of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) on rat peritoneal fibrosis (PF) model. **Methods** The animals were divided into three groups: the sham group, the model group, and the STAT3 inhibitor group. A miniature peritoneal dialysis catheter was implanted under the dorsal skin of rat and the rat peritoneal fibrosis model was induced by daily injection of high glucose dialysate. After 10 weeks, HE staining was used to evaluate the histology of the peritoneum, and the level of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in the peritoneum was measured by immunohistochemistry. HMrSV5 was cultured in high glucose and the optimal stimulation concentration of high glucose was determined by Western blot. High glucose was used to stimulate HMrSV5 after successful transfection with si-STAT3 and Western blot was used to measure the protein level of STAT3, p-STAT3, and the key enzymes of glycolysis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase 3 (PFKFB3) and lactate dehydrogenase A (LDHA).

网络出版时间:2024-04-10 14:15:09 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240410.1011.015

王不留行黄酮苷通过抑制铁死亡减轻阿米卡星导致的肾小管上皮细胞损伤

郑松¹, 储超群², 岳琳², 黄申卓凡², 温家根²

摘要 目的 探讨建立阿米卡星(AKN)体外肾损伤模型的方法,研究在AKN体外肾损伤模型中王不留行黄酮苷(VA)的保护作用及机制。**方法** 体外培养人肾小管上皮细胞(HK-2),孵育不同浓度的AKN或VA,MTT法检测细胞活力,确定药物浓度;采用二氢乙锭(DHE)探针和谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)检测试剂盒检测细胞内氧化应激状态的变化;提取总RNA,实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测肾损伤分子-1(KIM-1)和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)基因表达的变化;提取总蛋白,Western blot检测铁死亡相关的蛋白溶质载体蛋白家族47成员11(SLC7A11)和谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)的水平。**结果** 高浓度AKN在体外可以显著引起HK-2细胞活力的下降,AKN对HK-2细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)为(5.74±0.47) mmol/L。25~100 μmol/L的VA可以提高AKN刺激后的HK-2细胞活力($P<0.05$)。AKN(4 mmol/L)处理后,KIM-1和NGAL的mRNA表达水平显著高于阴性对照(NC)组($P<0.001$);

VA(50 μmol/L)可以显著降低KIM-1($P<0.01$)和NGAL($P<0.05$)的mRNA表达水平。AKN处理3 h后DHE染色强度升高但差异无统计学意义,6~24 h后DHE染色强度显著大于0 h组($P<0.01$)。此外,AKN处理6~24 h后MDA水平显著上升,GSH水平显著下降,差异均有统计学意义($P<0.05$)。AKN刺激6~24 h后,铁死亡相关蛋白SLC7A11和GPX4表达均明显下降($P<0.001$)。VA同时孵育24 h,显著逆转DHE染色、GSH和MDA水平的变化及SLC7A11和GPX4蛋白的下降($P<0.001$)。**结论** 该研究通过高浓度AKN体外刺激HK-2细胞建立AKN体外肾损伤模型,并发现VA可能通过抑制过氧化应激相关的铁死亡途径减轻AKN导致的肾小管细胞损伤。

关键词 阿米卡星;肾小管上皮细胞;王不留行黄酮苷;氧化应激;铁死亡;药物性肾损伤

中图分类号 R 965.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0653-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.015

2024-02-22 接收

基金项目:国家自然科学基金青年项目(编号:81800606);安徽省转化医学研究院科研基金项目(编号:2022zhyc-C08);安徽医科大学药学创新基金科研项目(编号:YXCX202203)

作者单位:¹ 安徽省胸科医院结核科,合肥 230032

² 安徽医科大学药学院基础与临床药理学教研室,合肥 230032

作者简介:郑松,男,副主任医师;

温家根,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: jia-gen168@163.com

阿米卡星(amikacin, AKN)是第三代氨基糖苷类抗生素,可用于敏感细菌感染的治疗,其对革兰阴性菌效果较好。此外,AKN对耐药结核杆菌具有较好的杀伤作用,但是其在临床应用时会导致明显的肾毒性和耳毒性。有研究^[1]显示AKN可以通过氧化应激和炎症反应引起肾脏损伤。AKN在肾组织中积累显著,并可以与线粒体发生作用,促使线粒体发生功能障碍,同时增加肾脏组织中氧自由基的产

Results HE staining showed that administration of STAT3 inhibitor (BP-1-102) could inhibit the thickening of subperitoneal tissue and the proliferation of vessels in HG dialysis rats. The expression of TGF-β1 in the rats peritoneum of the model group was significantly higher than that in the sham group, and the level of TGF-β1 was markedly lower in the STAT3 inhibitor group compared to the model group ($P<0.05$). Compared to the control group, high glucose induced the up-regulation of α-smooth muscle actin (α-SMA), the down-regulation of E-cadherin and STAT3 activation in HMrSV5 ($P<0.05$). Mesothelial cells treated with high glucose also exhibited high expression of the key enzymes of glycolysis (PFKFB3, LDHA) ($P<0.05$), and si-STAT3 can effectively inhibit the overexpression of PFKFB3 and LDHA induced by high glucose ($P<0.05$). **Conclusion** STAT3 is involved in high glucose-induced HMrSV5 hyperglycolysis and MMT, and targeting STAT3 alleviates peritoneal fibrosis and angiogenesis during peritoneal dialysis treatment in rats.

Key words STAT3; PFKFB3; peritoneal fibrosis; mesothelial-mesenchymal transition; glycolysis; peritoneal dialysis; BP-1-102